

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Sertés circovírus vakcinák
fejlesztése

PhD értekezés

Tombácz Kata

2015

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Dr. Tuboly Tamás, egyetemi tanár
Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
témavezető

Dr. Kiss István, PhD
CEVA-Phylaxia Zrt.
témabizottság tagja

Bányai Krisztián, PhD, tudományos főmunkatárs
Magyar Tudományos Akadémia
Agrártudományi Kutatóközpont
Állatorvos-tudományi Intézet
témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez a n. sz. példány.

.....
dr. Tombácz Kata

1. TARTALOMJEGYZÉK	
2. Rövidítések jegyzéke	5
3. Összefoglalás.....	6
4. Summary	8
5. Bevezetés	10
5.1. CÉLKITŰZÉSEK	11
6. Irodalmi áttekintés.....	12
6.1. ALEGYSÉGVAKCINÁK	12
6.1.1. Prokarióta expressziós rendszerek	13
6.1.2. Eukarióta expressziós rendszerek.....	14
6.1.4. Élő aleggységvakcinák	16
6.2. NYÁLKAHÁRTYA-IMMUNIZÁLÁS	16
6.3. AZ ANTIGÉNELŐÁLLÍTÁS LEHETŐSÉGEI NÖVÉNYEKBEN	17
6.3.1. Transzformálható növényfajok.....	17
6.3.2. A növényekben történő antigénelőállítás módszerei.....	19
6.4. AZ UBORKA-MOZAIKVÍRUS, MINT EXPRESSZIÓS VEKTOR	23
6.5. ANTIGÉN-ELŐÁLLÍTÁS THALASSIOSIRA PSEUDONANA MIKROALGÁBAN	25
6.6. A KETTES TÍPUSÚ SERTÉS CIRCOVÍRUS (PCV2)	27
6.6.1. A sertés circovírusok	27
6.6.2. A PCV2 járványtana és a védekezés lehetőségei.....	32
7. Anyag és módszer.....	36
7.1. A PCV2-EPITÓPOT EXPRESSZÁLÓ REKOMBINÁNS CMV LÉTREHOZÁSA ÉS IMMUNOGENITÁSÁNAK VIZSGÁLATA	36
7.1.1. Egérkísérlet a CMV gasztrointesztinális túlélésének vizsgálatára	36
7.1.2. A PCV2 virion szerkezetének meghatározása és epitópok azonosítása	38
7.1.3. A rekombináns CMV előállítása.....	39
7.1.4. Egérkísérlet az RCMV immunogenitásának vizsgálatára	43
7.1.5. Immunizálási és fertőzőes kísérlet az RCMV hatékonyságának vizsgálatára sertésekben	45
7.1.6. Az RCMV orális immunogenitásának vizsgálata sertésekben.....	48
7.2. A PCV2 KAPSZIDFEHÉRJE ELŐÁLLÍTÁSA REKOMBINÁNS THALASSIOSIRA PSEUDONANA MIKROALGÁBAN	49
7.2.1. A PCV2 ORF2-génjének megtervezése	49
7.2.2. A PCV2 ORF2-génjének klónozása és az alga expressziós vektor előállítása	49
7.2.3. A <i>T. pseudonana</i> sejtek transzformálása.....	53
7.2.4. A transzformált sejtek szelekciója és ellenőrzése	55

8. Eredmények	57
8.1. A PCV2-EPITÓPOT EXPRESSZÁLÓ REKOMBINÁNS CMV LÉTREHOZÁSA ÉS IMMUNOGENITÁSÁNAK VIZSGÁLATA	57
8.1.1. Egérkísérlet a CMV gasztrointesztinális túlélésének vizsgálatára	57
8.1.2. A PCV2-virion szerkezete és az epitópok predikciója	58
8.1.3. A rekombináns CMV előállítása	60
8.1.4. Egéroltási kísérlet az RCMV immunogenitásának vizsgálatára	62
8.1.5. Immunizálási és fertőzéses kísérlet sertésben	62
8.1.6. Az RCMV orális immunogenitásának vizsgálata sertésekben.....	64
8.2. A PCV2-KAPSIDFEHÉRJE ELŐÁLLÍTÁSA REKOMBINÁNS THALASSIOSIRA PSEUDONANA MIKROALGÁBAN	66
8.2.1. Az algában expresszálandó PCV2-kapszidgén megtervezése és előállítása	66
8.2.2. A <i>T. pseudonana</i> sejtek transzformálása	67
8.2.3. A transzformált sejtek szelekciója és vizsgálata	67
9. Megbeszélés.....	70
9.1. A PCV2 EPITÓPOT EXPRESSZÁLÓ REKOMBINÁNS CMV IMMUNOGENITÁSA	70
9.1.1. A CMV gasztrointesztinális túlélése.....	70
9.1.2. A PCV2-virion szerkezete, epitópjainak elhelyezkedése és a rekombináns CMV előállítása	71
9.1.3. A rekombináns CMV immunogenitása	75
9.2. PCV2 CAP GÉN EXPRESSZIÓ T. PSEUDONANA MIKROALGÁBAN	79
9.2.1. A PCV2-cap-gént tartalmazó plazmidvektor előállítása	79
9.2.2. A <i>T. pseudonana</i> sejtek transzformálása	79
9.3. KONKLÚZIÓ	82
10. Új tudományos eredmények	83
11. Irodalomjegyzék.....	84
12. Tudományos publikációk.....	101
12.1. A DOLGOZAT SORÁN FELHASZNÁLT CIKKEK	101
12.2. A DOLGOZAT ANYAGÁT KÖZVETLENÜL NEM KÉPEZŐ CIKKEK	101
12.3. ELŐADÁSOK	102
12.4. POSZTER PREZENTÁCIÓK	103
13. Köszönetnyilvánítás.....	104

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A periódusos rendszer elemeinek esetében azok vegyjeleit, az aminosavak esetében azok egybetűs rövidítéseit használtam.

aa	aminosav(ak) (amino acid(s))
ASW	mesterséges tengervíz (artificial seawater)
BSA	szarvasmarha-szérumalbumin (bovine serum albumin)
CHO	kínaihörcsög-petefészek (chinese hamster ovary)
CaMV	karfiol-mozaikvírus (cauliflower mosaic virus)
CMV	uborka-mozaikvírus (cucumber mosaic virus)
cap	kapszidfehérje (capsid protein), a PCV2 vonatkozásában
CP	kapszidfehérje (coat protein), a CMV vonatkozásában
DNS	dezoxiribonukleinsav
eGFP	felerősített zöld fluoreszcens fehérje (enhanced green fluorescent protein)
ELISA	enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat (enzyme linked immunosorbent assay)
FBS	magzati borjúszérum (foetal bovine serum)
fcp	fucoxantin clorofill a/c kötő fehérje (fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein)
FITC	fluoreszcein-izotiocianát (fluoresceine isothiocyanate)
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
HEK	humán embrionális vesesejt (human embryonic kidney)
HRPO	tormaperoxidáz (horse radish peroxidase)
iIF	indirekt immunfluoreszcens próba (indirect immune fluorescence)
MALT	nyálkahártya-asszociált limfoid szövet (mucosa associated lymphoid tissue)
mRNS	hírvivő (messenger) RNS
NAT	nurszeotricin (nourseothricin)
NLS	sejtmagi lokalizációs jel (nuclear localisation signal)
ORF2	kettes számú nyílt leolvasási keret (open reading frame 2)
PBS	foszfát-pufferolt sóoldat (phosphate buffered saline)
PCV2	kettes típusú sertés circovírus (porcine circovirus type 2)
PK-15	sertés vese 15 sejtvonal (porcine kidney 15)
PDNS	sertések dermatitisz nefropátia tünetegyüttese (porcine dermatitis nephropathy syndrome)
PMWS	választott malacok circovírus okozta sorvadása (postweaning multisystemic wasting syndrome)
PRDC	sertések légzőszervi betegség komplexe (porcine respiratory disease complex)
RCMV	rekombináns uborka-mozaikvírus (recombinant cucumber mosaic virus)
Ri-	gyökérindukáló (root inducing)
RNS	ribonukleinsav
SDS-PAGE	nátrium-lauril-szulfát poliakrilamidgél-elektroforézis (sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis)
SPF	meghatározott kórokozótól mentes (specified pathogen free)
Ti-	tumorindukáló (tumor inducing)
<i>vir</i>	virulenciagén
VLP	vírus-szerű részecske (virus-like particle)
WB	Western blot

3. ÖSSZEFOGLALÁS

A fertőző betegségek elleni védekezés egyik legfontosabb eleme a vakcinázás. A vakcinafejlesztés területén a rekombináns DNS technológiának köszönhetően a hagyományos vakcinatípusokon túl az új generációs vakcinák rendkívül széles repertoárja áll a kutatók rendelkezésére. Az eredeti kórokozótól eltérő, prokarióta vagy eukarióta sejtben történő antigén előállítás módszerei igen változatosak lehetnek. Az egyik, eukarióta szervezeteket használó módszer a növényekben történő fehérjeelőállítás, amely számos előnnyel rendelkezik más expressziós rendszerekhez képest, például a gazdaságos és biztonságos antigéntermelés, az előállított fehérje hosszú, hűtés nélküli tárolhatósága és az ehető, vagy takarmányba keverhető vakcinák előállításának lehetősége. A növényekben két fő módszerrel termelhető fehérje: az egyik a genetikailag módosított növény létrehozása, más néven stabil transzformáció, a másik az átmeneti fehérjeexpresszió vírusvektorok alkalmazásával, ez utóbbi esetben a növényben szaporodó rekombináns vírusról van szó. A növényekben termelt vakcinák előnyös tulajdonságai és ígéretessége ellenére még egyetlen így készült termék sem került kereskedelmi forgalomba.

A kettős típusú sertés circovírus (PCV2) világszerte elterjedt és a sertésállományokban jelentős gazdasági károkat előidéző kórokozó, ellene inaktivált és alegységvakcinák állnak rendelkezésre, amelyek használata a vírus kártételét jelentősen csökkenti, terjedését azonban nem akadályozza meg. Szájon át alkalmazható és emiatt potenciálisan a fertőződést megakadályozó, nyálkahártya-immunitást eredményező PCV2-antigének előállítására tettünk kísérletet növényi expressziósrendszerek felhasználásával.

Az első esetben uborka-mozaikvírus- (CMV-) vektor segítségével állítottuk elő a PCV2 kapszidfehérjéjének egy szakaszát. Ehhez előzetesen a virion három dimenziós modellezése után a feltehetően immunogén szakaszokat vizuális alapon határoztuk meg, majd kettőt kiválasztottunk és CMV-vektorba ültettünk. Az így létrehozott rekombináns vírusok egyike dohányban szaporodóképesnek bizonyult. Az elszaporított és kitisztított vírus felületén a PCV2 eredetű epitóp kifejeződését ELISA-teszttel igazoltuk. A CMV gasztrointesztinális túlélését egérkísérletben vizsgáltuk, amely során az állatokkal megetetett virionok specifikus szérum-IgG és a bélcsatornában IgA molekulák megjelenését eredményezték. A rekombináns CMV PCV2-specifikus immunválasz-kiváltó képességét először egéroltással, majd malacimmunizálással és kísérleti PCV2-fertőzéssel értékeltük. Az antigénnel oltott egerek és malacok szérummintáiból PCV2 elleni ellenanyagok megjelenését és mennyiségének emelkedését mutattuk ki indirekt immunfluoreszcens módszerrel. Az immunizált malacokban a rekombináns CMV-antigén a PCV2 szaporodását az oltatlan állatokban tapasztaltakhoz képest csökkentette, ezt valós idejű PCR-rel igazoltuk. Az antigén

orális immunogenitását sertésekben vizsgáltuk, az antigénnel négyszer etetett állatok szérumban PCV2-specifikus IgG jelent meg.

Kísérletet tettünk a teljes PCV2 kapszidfehérje előállítására is tengeri mikroalga sejtek stabil transzformálásával. Gazda sejtéül *Thalassiosira pseudonana* törzset használtunk, amely egysejtű, fotoszintetizáló kovamoszat faj. A PCV2 teljes kapszidfehérje-génjét kodonoptimalizálás után, zöld fluoreszcens fehérjével (GFP) fuzionálva algaexpressziós plazmidba ültettük át és antibiotikumrezisztencia-gént kódoló plazmiddal együtt biológiai módszerrel vittük a sejtekbe. A szelektív tápfolyadékban növesztett sejtek GFP-t és PCR-rel kimutatható PCV2-kapszidgént nem tartalmaztak, a termelődő fehérje feltételezhetően toxikus volt a gazdas sejtek számára.

A PCV2 antigének előállítása növényi expressziós rendszerekben lehetséges, gyakorlati alkalmazhatóságáig azonban más, növényekben előállított fehérjékhez hasonlóan még hosszú út vezet az expresszió optimalizálásán, a helyes adagolás, beviteli módok, a mucosális immunogenitás vizsgálatán és a gazdaságossági szempontok értékelésén keresztül.

4. SUMMARY

Vaccination is one of the most important components of infectious disease control and prevention. As a result of recombinant DNA technology, aside from conventional antigen production platforms, a wide range of new generation vaccine methods is available to vaccine developers. Current methods of antigen generation in prokaryotic or eukaryotic hosts differing from the original pathogen are quite diverse. One of these eukaryotic expression systems is the utilisation of plants as hosts, which has several advantages over other platforms. These include cheap and safe antigen expression, long-term storage of proteins that is independent of refrigeration, and the potential for the production of oral vaccines. Two different methods can be used for recombinant protein expression in plants: the generation of genetically modified plants or stable transformation, and transient expression achieved by virus vectors, that is the propagation of recombinant viruses in their plant hosts. Despite all the benefits of plant based expression systems, no such products are commercially available thus far.

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a ubiquitous and economically very damaging pathogen of swine herds. Although the available inactivated whole virus and subunit vaccines are effectively decreasing these damages, they are not able to prevent the spread of the virus and to produce sterile immunity. In an effort to produce PCV2 antigens that can be administered orally to elicit mucosal immune responses, we expressed the antigens in plant systems.

In the first instance we produced a PCV2 derived peptide in a cucumber mosaic virus (CMV) vector. In order to do this, we generated the three dimensional model of the PCV2 virion and selected potentially immunogenic elements on a visual basis, then inserted two of these into the CMV coat protein. One of the resulting constructs could be propagated in tobacco plants. This recombinant CMV was accumulated and purified from tobacco leaves. The expression of the PCV2 derived peptide on its surface was verified by enzyme-linked immunosorbent assay. Gastrointestinal survival of the CMV particle was assessed in a mouse experiment, where the virions fed to mice were shown to elicit CMV specific serum IgG and intestinal IgA response. PCV2 specific immunogenicity of the recombinant CMV was tested in a mouse immunization and a pig immunization and challenge infection experiment. Appearance and later elevation of PCV2 specific serum IgG levels were detected in immunized animals using indirect immune fluorescence. Recombinant CMV administration decreased consecutive PCV2 replication compared to non-vaccinated piglets, as measured by real-time PCR. We also assessed oral immunogenicity of the recombinant antigen in pigs;

PCV2 specific antibodies could be detected in serum samples of animals after they were fed with the particle four times.

In addition, we attempted to produce the whole PCV2 capsid protein by stable transformation of marine microalga cells. The unicellular, photosynthesising diatom, *Thalassiosira pseudonana* was used as expression host. Following codon optimisation and fusion with green fluorescent protein (GFP), the PCV2 capsid gene was cloned into an algal expression vector and co-transformed together with an antibiotic resistance plasmid into the diatom cells using the biolistic method. In transformants grown in selective media, GFP was not visible by microscopy or flow cytometry, and the PCV2 gene was not detectable by PCR. We propose that the produced protein was toxic to the host cells.

Production of PCV2 antigens in plant expression systems is possible; however, similarly to other protein products generated in plants, further optimisation is required before becoming practically applicable. These include expression optimisation, adjustments of dosage and administration, assessments of mucosal protection and evaluation of economic feasibility.

5. BEVEZETÉS

A vakcinázások bevezetése forradalmasította a fertőző betegségek elleni védekezést mind a közegészségügy, mind az állategészségügy területén. A vakcinológia, mint önálló tudományág, kezdetei az Ókorig nyúlnak vissza, ám ugrásszerű fejlődésnek csak a XVIII. század elején történt újrafelfedezésétől indult, amikor Lady Montagu 1718-ban saját gyerekeit variolációnak vetette alá. Az immunológia megszületésének 1798-at tekintjük, amikor Edward Jenner publikálta vakcinázási eredményeit. Innentől a vakcinák fejlődése beindult, Louis Pasteur munkásságának eredményeképpen megjelentek az első attenuált vakcinák. Az immunizálásnak ma már számos fajtája és módja ismert, sikertörténetei közé tartoznak többek között a Föld fekete himlőtől (1980) és keleti marhavészről (2011) való mentesítése, a fertőző gyermekbénulás, a mumpsz, a diftéria, a szamárköhögés visszaszorítása.

Az elért jelentős sikerek és a tudományág gyors fejlődése ellenére a vakcinológia területén még manapság is számos kihívás adódik, amelyek újszerű fejlődési irányba terelik a vakcinológiai kutatásokat. Problémát jelent ugyanis a mai napig, hogy a legtöbb vakcina, bár csökkenti ugyan a kórokozók szisztémás szaporodását, magától a fertőzéstől nem védi meg a szervezetet. Ez állat-egészségügyi szempontból azt jelenti, hogy egy állományban egy adott patogén által okozott gazdasági károkat képesek vagyunk csökkenteni a vakcinázással, ám az ágens az állományban fennmarad, onnan rendszerint csak teljes állománycserével tüntethető el, és a kórokozó járványtani tulajdonságaitól függően az állatok bármikor újrafertőződhetnek. Ez a pénzübeli károkon túl azzal is jár, hogy a vakcinázással párhuzamosan jelenlévő kórokozóra folyamatosan mesterséges szelekciós nyomás nehezedik, ami a patogén evolúcióját úgy befolyásolja, hogy az a vakcinák csökkent hatékonyságához vezet.

A fertőzés elleni védekezés akkor lehet a legsikeresebb, ha az adott patogén szervezetbe jutási módját ismerjük, és ezen a ponton tudunk olyan szintű specifikus védelmet létrehozni, ami a fertőzést megakadályozza. A legtöbb kórokozó valamelyik nyálkahártya (leggyakrabban a légző- és emésztőszervi) felületén keresztül hatol be az állatokba és az emberbe. Optimális esetben tehát a vakcinázás eredményeképpen nyálkahártya (mucosális) immunitásnak kell kialakulnia.

A mucosális immunitás kialakítására az élő vakcinák a legalkalmasabbak, mert ezek hatása utánozza legjobban a természetes fertőzés folyamatait. Mára azonban a jelentősen olcsóbb és biztonságosabb aegységvakcinák alkalmazása kerül egyre inkább előtérbe, amelyek a kórokozók egy-egy immunogén darabját tartalmazzák csupán. Emiatt fertőző betegséget biztosan nem okoznak, azonban hatékonyságuk, főleg a nyálkahártya-védelem

kialakítása terén, elmarad az élő vakcinákétól. Ennek az ellentmondásnak a feloldása a vakcinológia egyik fő kihívása.

Az aleggységvakcinákat leggyakrabban rekombináns DNS-technológia segítségével állítják elő. Ennek egy különleges és nagyon ígéretes formája a növényekben történő antigénelőállítás, akár növényeken szaporítható rekombináns vírusok, akár génmódosított növények létrehozásával. A növényekben gyártott antigéneknek számos előnyös tulajdonsága van a hagyományos vakcinákkal szemben, úgy, mint stabilitás, biztonságosság, jó minőségű fehérjeantigének előállítása, helyben történő vakcinaelőállítás, jó tárolhatóság szobahőmérsékleten, és nem utolsósorban az, hogy az így előállított antigének a növényi sejtekből kitisztítva, vagy akár a növényi résszel együtt ehető vakcinák létrehozására lehetnek alkalmasak.

A növényi antigénexpresszió már több mint 20 éve foglalkoztatja a kutatókat, és számos, állategészségügyi szempontból jelentős antigént állítottak már elő a kifejlesztett módszerek segítségével. Ennek ellenére csak egy ilyen termék forgalomba hozatali engedélyezésére került sor ezidáig, ez egy növény sejtvonalon termelt, parenterálisan adandó baromfipestis-antigén, amely kereskedelmi forgalomba azóta sem került. Látható tehát, hogy a növényekben termelt vakcinák kifejlesztése bármennyire ígéretes, még csak gyerekcipőben jár, és a gyakorlatban alkalmazható termékek, vakcinák elkészültéig még hosszú folyamat vezet. Munkánk során ebbe a folyamatba kapcsolódtunk be, kettes típusú sertés circovírus- (porcine circovirus 2, PCV2) antigének növények segítségével történő előállításán keresztül.

A PCV2 a sertések jól ismert, világszerte elterjedt és óriási gazdasági károkat okozó vírusa. Ellene az általános állathigiéniai szabályok betartásán kívül vakcinázással védekezhetünk. A kereskedelmi forgalomban kapható inaktivált és aleggységvakcinák hatékonyan csökkentik a szubklinikai és klinikai fertőzés negatív hatásait, de a kórokozóval való fertőzést és annak terjesztését nem akadályozzák meg. A PCV2 legfőképpen oronazális úton terjed, ezért nyálkahártya-immunitás kialakításával az immunizálás hatékonysága jó eséllyel növelhető lenne. A vírus egyszerű szerkezetű és igen kis méretű, egyetlen strukturális fehérjét tartalmaz, ami ellen ellenanyagok képződnek a fertőzött szervezetben. E tulajdonságok alkalmassá tették a PCV2-t arra, hogy modellként szolgáljon vizsgálatainkban.

5.1. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk első részében célunk volt a PCV2 akkor még ismeretlen, 3 dimenziós szerkezetének megállapítása számítógépes modellezéssel, majd ennek használatával potenciális epitópok (PCV2 elleni immunglobulin molekulákhoz specifikusan kapcsolódni

képes részek) keresése. További célunk volt a kiválasztott epitóp előállítása növényvírusvektorban, a kifejezett epitóp immunogenitásának vizsgálata *in vitro* és *in vivo* módszerekkel, végül ezeken keresztül annak megismerése, hogy az alkalmazott vírusvektor használható-e orális immunizálásra, és, hogy a pusztán számítógépes modell alapján meghatározható immunodomináns szakaszok valóban epiópként funkcionálnak-e. A PhD-munka második felében a PCV2 teljes kapszidfehérjéjének előállítása volt a cél egy fotoszintetizáló, egysejtű kovamoszat fajban, szintén etethető vakcinaantigén előállításának szándékával.

6. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

6.1. ALEGYSÉGVAKCINÁK

A vakcinázás a mai napig a fertőző betegségek megelőzésének leghatékonyabb módszere, ami a szervezetbe juttatott antigén elleni aktív immunválasz kialakításán alapul. A vakcinák klasszikus csoportosítása szerint hagyományos és új generációs vakcinákat különböztetünk meg. A hagyományos vakcinák közé tartoznak az élő kórokozót tartalmazó attenuált és az elölt mikroorganizmusokból álló inaktivált vakcinák. Az a felismerés, hogy egyes fertőző betegségek kórfejlődésében a legnagyobb szerepet a kórokozó bizonyos része, például egy baktérium toxinja okozza, a kórokozónak csak ezt a részletét, a toxikus hatást kifejtő részt semlegesítve tartalmazó toxoid vakcinák létrehozásához vezetett, amelyek egyben az első alegységvakcináknak is tekinthetők.

Az alegységvakcinákra jellemző tehát, hogy ellentétben a hagyományos, attenuált vagy inaktivált vakcinákkal, nem tartalmazzák a kórokozó teljes antigénkészletét, hanem annak csak egy részét (alegységét), természetesen éppen azt, amelyik a protektív immunitás kiváltásáért felel. Ez az alegység lehet egy teljes fehérje az eredeti kórokozóból, lehet azonban annak egy rövidebb szakasza, antigéndeterminánsa (epitópja) is. Vakcinázásra az antigéndetermináns csak akkor alkalmas, ha képes arra, hogy immunválaszt indukáljon, és az is elengedhetetlen, hogy ez az eredeti kórokozóhoz mérten viszonylag szűk szakasz olyan immunválaszt váltson ki, ami a kórokozóval szemben megfelelő védelmet nyújt.

Az alegységvakcinák a vakcinák más csoportosítása szerint többnyire a nem élő vakcinák közé tartoznak, ez előnyöket és hátrányokat is hordoz magában az élő vakcinákhoz képest. Előny, hogy biztonságosabbnak tekinthetők, mert nem képesek önálló szaporodásra, valamint, hogy nehezen szaporítható kórokozók esetében, főleg rekombináns technológia alkalmazásával, nagyobb mennyiségben lehet az adott antigént előállítani. Hátrányuk, hogy hatékonyságuk az élő vakcinákétól elmarad, mert azon kívül, hogy nem tartalmazzák az

adott patogén összes antigénjét, a megfelelő mértékű specifikus ellenanyagtermelés indukálása mellett jellemzően nem váltanak ki megfelelő hatékonyságú sejtes immunválaszt (Nascimento és Leite, 2012).

A sejtes immunválasz erősítését célozza, ha az antigénalegységet úgynevezett nanopartikulumok (nanométeres nagyságrendű részecskék) formájában alkalmazzák, így elősegítve az antigének antigénprezentáló sejtek által történő felvételét és a nem specifikus immunrendszer receptorainak aktiválását (Sahdev és mtsai., 2014).

Kisméretű, kevés-féle fehérjét tartalmazó kórokozók esetében (ilyenek a vírusok) lehetséges a teljes kapszid előállítás, és ebben az esetben ezek a fehérjék spontán összeállhatnak egy egész vírusszerű partikulává (virus-like particle, VLP). A VLP szerkezete nagyon hasonlít az eredeti víruséhoz, ezért igen immunogén lehet, és a többi alegységvakcinától eltérően tartalmazza a vírus összes kapszidepitópját, örökítőanyagot azonban nem, ezért az alegységvakcinák közé soroljuk őket. Természetesen a nukleinsav hiánya miatt önálló szaporodásra sem képesek (Brun és mtsai., 2011).

A VLP-k mellett hatékony nanopartikulumok létrehozására alkalmazhatók még liposzómák, természetes vagy szintetikus polimerek, lipid-polimer hibridek (Sahdev és mtsai., 2014), vagy az antigént kapszidfehérjékben kifejező, rekombináns vírusvakcinák.

Ma a legtöbb alegységvakcina-antigén új generációs, azaz a rekombináns DNS-technológia segítségével állítják elő. A rekombináns fehérje-előállítás számos módszer segítségével lehetséges és folyamatosan fejlődik, ezért csak a legjelentősebbek áttekintésére van lehetőség a dolgozat keretein belül.

6.1.1. Prokarióta expressziós rendszerek

A biotechnológiában leggyakrabban a prokarióta expressziós rendszereket használják, tehát valamilyen baktériumsejtben állítják elő a termelni kívánt fehérjét. A legnépszerűbb faj erre a célra ma is az *Escherichia coli*, amelynek használatával a bevitt gén expressziója gyorsan, egyszerűen és költséghatékonyan megvalósítható. A gyógyszeriparban használt fehérjék közel 30%-át ebben az egy fajban termelik (Huang és mtsai., 2012). Számos olyan törzs áll rendelkezésre, amelyekbe a termelni kívánt fehérjét kódoló plazmid könnyen bejuttatható, például elektrokompetens törzsek elektroporáláshoz vagy kemikompetens törzsek hősokk-transzformációhoz. A rekombináns fehérje termeléséhez szükséges hírvívő (messenger, m) RNS a bejuttatott plazmidról íródik át. Ez a plazmid köralakú, dupla szálú DNS, tartalmaz egy replikációs origót, amelynek segítségével a baktériumsejten belül önállóan megsokszorozódik, valamint olyan promotert, amely a beültetett génről nagymértékű mRNS-átírást, majd fehérjeexpressziót tesz lehetővé. Számos indukálható promóter is létezik, amelyek elősegítik a termelt fehérje mennyiségének szabályozását. Ezen

kívül általánosan tartalmaznak antibiotikumrezisztencia-géneket és egyéb szelekciós markergéneket, amelyek alapján lehetőség nyílik a plazmidot tartalmazó, valamint a plazmidban a beültetett gént tartalmazó sejtek kiválasztására. A termelt fehérje általában a citoplazmában marad, de N-terminálisára kapcsolható szignálfehérje segítségével a baktériumsejt szekretálhatja is. Olyan jelölő molekulák is kapcsolhatók a termelt fehérjéhez, amelyeknél fogva tisztításuk könnyebbé válik, ilyen pl. a polihisztidin tag.

A baktériumok segítségével tökéletes formában állíthatók elő egyszerűbb és rövidebb fehérjék, viszont a nagyobb méretű és komplexebb fehérjék termelésénél fennál a veszélye annak, hogy nem hajtogatódnak rendesen, így térszerkezetük nem lesz megfelelő és ezért nem tudják kifejezni biológiai funkciójukat, vagy antigenitásuk megváltozik. Ezen kívül hátrány még, hogy a poszttranszlációs módosítások, amelyek eukarióta sejtekben megtörténnek (pl. glikoziláció, diszulfid hidak kialakulása), baktérium sejtekben nem mennek végbe, ez a hibás térszerkezetnél kialakulókhhoz hasonló következményekkel jár és az előállított fehérje értéktelen vagy korlátozott értékű lesz. Az *E. coli*-ban használt módszerek azonban rendkívül gyorsan fejlődnek és ezek a felmerülő problémák is megoldódni látszanak (Wacker és mtsai., 2002).

6.1.2. Eukarióta expressziós rendszerek

A prokarióta fehérjeelőállító módszerek hiányosságainak kiküszöbölése érdekében az eukarióta sejtekben történő génexpressziós módszerek is széles körben elterjedtek, amelyek segítségével jobb biológiai minőségű fehérjék állíthatók elő. Az eukarióta sejtek a baktériumoknál jóval igényesebbek és érzékenyebbek, ezért használatuk drágább, kifejlesztésük időigényesebb és bonyolultabb.

6.1.2.1. Élesztősejtek

Az antigének élesztőben történő előállítása ötvözi a prokarióta és eukarióta fehérjetermelés tulajdonságait; a módszer előnye, hogy az egysejtű élesztőfajok gyorsabban szaporodnak az emlős- vagy rovarsejtekénél, és a termelt fehérjék térszerkezetének kialakítása és a poszttranszlációs módosításaik is végbemennek, habár nem az emlősökével teljesen megegyező módon. Egyszerűbb fehérje antigének esetén ez nem jelent gondot, és a folyamatosan fejlődő módszereknek köszönhetően a közeljövőben kiküszöbölhetők lesznek. A fehérje előállításra leggyakrabban használt fajok a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Pichia pastoris*, és a *Hansenula polymorpha*. Az élesztőben történő fehérjeexpresszió VLP-k előállítására is alkalmas (Mattanovich és mtsai., 2012). A legelső rekombináns, humán egészségügyi jelentőségű vakcina *S. cerevisiae*-ben előállított Hepatitis B vírusantigént

tartalmazott (McAleer és mtsai., 1984). A humán papillómavírus-fertőzés által okozott méhnyakrák megelőzésére alkalmazott vakcinák közül az egyik szintén *S. cerevisiae*-ben készült (Armstrong, 2010).

6.1.2.2. Rovarsejtek

Népszerű módszer a rovarsejtekben baculovírus-vektor (pl. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrosis virus) segítségével fehérjét előállító rendszer. A baculovírus szaporodása során egy polihedrin nevű fehérjét termel, amely génjének expresszióját nagyon erős promóter szabályozza, a polihedrin azonban a vírus sejttenyészetén történő szaporodásához nem szükséges. A polihedrin génjét az expresszálandó fehérje génjére cserélve, az eredeti promótert megtartva az így összeállított rekombináns baculovírussal fertőzött sejtekben a beültetett génről a fehérje nagy mennyiségben termelődik (Smith és mtsai., 1983; Pennock és mtsai., 1984). A vírusokat leggyakrabban őszi sereghernyó (*Spodoptera frugiperda*; Sf21 vagy Sf9 jelű) és U betűs aranybagoly (*Trichoplusia ni*; High Five™ jelű) sejtvonalakon szaporítják. Ezek adherens, vagy leves formában is növeszthetők. A termelt fehérjék a tápfolyadékba szekretálhatók, és a rovarsejtekre jellemző poszttranszlációs módosítások bár nem teljesen egyeznek meg az emlősökre jellemzőkkel, jó minőségű rekombináns fehérje-előállítást tesznek lehetővé, a módszerrel VLP-k is előállíthatók. A baculovírus expressziós-rendszerben előállított antigének mind humán (influenza, humán papillómavírus), mind állategészségügyi (PCV2, klasszikus sertéspestis) vakcinákban megtalálhatók (van Oers és mtsai, 2014).

6.1.2.3. Emlőssejtek

A legjobb minőségű és legtökéletesebben működő fehérjéket emlőssejtekben lehet előállítani. Az erre leggyakrabban használt sejtvonalak a kínaihörcsög-petefészek (chinese hamster ovary, CHO) és humán embrió-vese (human embryonic kidney, HEK 293) sejtvonalak, melyek könnyen transzfektálhatók, emlős sejtvonalakhoz képest könnyen szaporíthatók és fenntarthatók (Almo és Love, 2014). Az expresszálni kívánt gént az emlős eredetű sejtekbe plazmid- vagy vírus-vektorok segítségével viszik be (transzfekció), amelynek eredményeképpen átmeneti expresszió, vagy a sejt genomjába integrálódva stabil transzformáció jön létre. Az emlős expressziós rendszer hátrányai a nagy költségek és a kis fehérjehozam, de ezek a területek is gyorsan fejlődnek, erős promóterek (például citomegalovírus-promóter) és további, génexpressziót szabályozó, úgynevezett transzkripciós szabályozó elemek alkalmazásával a hatékonyság jelentősen növelhető

(Backliwal és mtsai., 2008). Mivel az emlős sejtvonalakban történő fehérjegyártás jó minőségű, emlősökre jellemző poszttranszlációs módosításokkal ellátott terméket eredményez, a felhasználása inkább terápiás fehérjék előállításában jellemző, például hormon-, enzim-, vérfehérjepótló készítmények esetében (Khan, 2013). A kórokozók elleni vakcinázáshoz használt antigének gyártása sokkal gazdaságosabb a korábban felsorolt rekombináns fehérjeelőállító módszerek használatával.

6.1.4. Élő alegységvakcinák

A rekombináns alegységvakcinák tartozhatnak az élő vakcinák csoportjába is, ebben az esetben az immunogén antigénalegység egy élő baktériumsejtben, vagy élő vírus vektorba ültetve termelődik, ennek előnye, hogy az immunizálás folyamata jobban utánozza a természetes fertőzést, ezért a humorális mellett hasonlóan erős, celluláris immunválasz kiváltására, ráadásul nyálkahártyán történő vakcinázásra is alkalmas lehet (Nascimento és Leite, 2012). Ennek oka, hogy az antigént az élő, rekombináns vírussal fertőzött sejtek állítják elő a vakcinázott állatban. A vektorként használt vírusok általában nagyméretűek (herpesz-, vagy himlővírusok, például Marekbetegség-vírus, kanárihimlő, baromfihimlő, vacciniavírusok), hogy viszonylag hosszú gének befogadására legyenek alkalmasak. A legismertebb példa az élő vírusvektor-vakcinára a vadállatok veszettség elleni orális immunizálására használt, vacciniavírus-vektort tartalmazó vakcina (Wiktor és mtsai., 1984).

6.2. NYÁLKAHÁRTYA-IMMUNIZÁLÁS

A fertőző betegségek kórfejlődésében és az ellenük való védekezésben is meghatározó tényező a kórokozó bejutási módja. A bemeneti kapu gyakran valamelyik nyálkahártya felszíne, vagyis a legtöbb kórokozó a légutak, az emésztőcső vagy ritkábban a húgy-nemi szervek nyálkahártyáin keresztül fertőzi az állatok szervezetét. Nem meglepő tehát, hogy az itt működő nyálkahártya-asszociált limfoid szövetekben (mucosa associated lymphoid tissues, MALT) található az immunrendszer sejtjeinek 80%-a (Anjuère és Czerkinsky, 2007). Ahhoz, hogy ezeket a felszíneket specifikus védelemben részesíthessük, el kell érni azt, hogy a vakcinázás eredményeképpen a bemeneti kapukban is megjelenjenek az aktív immunválasz termékei (ellenanyagok, aktivált sejtek). Ilyen típusú immunválaszra a parenteralisan adott, ezek közül is különösen az előlt vakcinák esetében nincs mód vagy csak korlátozott védelem várható (Mason és mtsai., 2002). Mindez azt jelenti, hogy a szisztémásan szaporodó kórokozó ugyan nem, vagy csak csökkent mértékben képes klinikai tüneteket kiváltani, de a fertőzést, a helyi szaporodást és ennek következtében a kórokozó ürítését, terjedését a vakcina nem tudja teljes mértékben megakadályozni.

A fertőzést meggátolni képes védelem csak azokban az esetekben várható, amikor a vakcina lokálisan, a nyálkahártyán indukál immunválaszt, amihez társul a szervezet egészét védő szisztémás immunitás. A nyálkahártya-immunitás kiváltása azokban az esetekben lehetséges, amikor az antigénként alkalmazott vakcina eljut a nyálkahártyára és ott az immunválasz felépülésének valamennyi feltételét teljesíti. Ezek a feltételek gyakorlatilag három fő részből tevődnek össze: a) veszélyjelzések szabadulnak ki sérült sejtekből; b) olyan molekuláris mintázatokat hordoz az antigén, ami a nem specifikus védekezési rendszer számára patogén mintázatként ismerhető fel; c) az antigén felismerésére képes receptorokkal rendelkeznek a B- és T-lymphocyták.

Ahhoz, hogy mindez teljesüljön, az antigénnek lehetőleg intakt állapotban kell elérnie azt a nyálkahártyaterületet, ahol a védelmi rendszer elemei és az antigén kölcsönhatásba léphetnek. A hagyományos vakcinák közül az élő kórokozót tartalmazók azok, amelyek erre képesek, és amennyiben a természetes bemeneti kapujuk a nyálkahártya valamely része, akkor ezt a tulajdonságot kihasználva, helyi immunizálásra (is) alkalmasak lehetnek. A nem élő (inaktivált, aleggység-) vakcinák esetén az antigén önmagában rendszerint nem indukál veszélyjelzéseket, és jó eséllyel csak akkor jut el a megfelelő helyszínre, ha kellően nagy adagban van jelen és a nyálkahártyán zajló lebontási folyamatoknak kellőképpen ellenáll. Különösen igaz ez a szájon át (ivóvízben vagy takarmányban) adott antigénekre, vagyis az úgynevezett ehető vakcinákra vonatkozóan. A folyamatosan megújuló és fejlődő állatorvosi vakcinakutatásnak egyik célja az orálisan adható antigének fejlesztése (Tacket, 2009), legyen szó mezőgazdasági haszonállatok vagy vadon élő állatok immunizálásáról.

6.3. AZ ANTIGÉNELŐÁLLÍTÁS LEHETŐSÉGEI NÖVÉNYEKBEN

A génexpresszió, így a fehérjeantigén-előállítás növényekben is lehetséges. Az első rekombináns, növényben előállított vakcinaantigén létrehozása óta (Mason és mtsai., 1992) a növényi vakcina előállítás kiterjedten kutatott területté vált.

6.3.1. Transzformálható növényfajok

A vakcinaantigéneket előállító növények nem csak a fehérjetermelés eszközeiként jöhetnek szóba, hanem újszerű vakcinabeadási módszerként is. Megfelelő genetikai szabályozás segítségével egyes növényi szervekben (mag, gyümölcs, gyökérgumó) az antigének felhalmozhatók. A transzformálás vagy az expressziós rendszer kifejlesztése után az antigéntermelés igényei gyakorlatilag megegyeznek a növénytermesztés igényeivel, nagyon leegyszerűsítve jobbára csak napfényre, termőföldre és vízre van szükség. Az antigént termelő növény helyben is termeszthető, ott, ahol vakcinára igény merül fel, így a

szállítási és tárolási költségek is jelentősen csökkenthetők (Warzecha és Mason, 2003). A sejten belüli antigéneket a sejtfal védi a környezet hatásaitól, például magvakban helyes tárolás mellett évekig stabilak maradnak (Wright és mtsai., 2001; Khan és mtsai., 2012).

Számos növényfaj szerepelt már lehetséges gazdafajként vakcinaelőállítási kísérletekben. A dohány (*Nicotiana tabacum*) az elsőként transzformált növényfajok közé tartozik, toxikus alkaloidoktól mentes változata használható lehet állatok szájon át történő immunizálására. A Pillangósvirágúak (*Fabaceae*) család tagjai elterjedten természetesen takarmány- vagy élelmiszernövények, nagy fehérjetartalmú leveleik vagy terméseik (hüvelyesek) miatt. Antigéntermelést létrehozta már lucernában (*Medicago sativa*), fehér herében (*Trifolium repens*), galambborsóban (*Cajanus cajan*), tehénborsóban (*Vigna unguiculata*) és földimogyoróban (*Arachis hypogaea*). A gabonamagvak szintén nagy fehérjetartalmúak, és ipari feldolgozásukra régóta kialakult gyakorlat áll rendelkezésre, ráadásul hosszútávú tárolásuk is megoldott. Hátrányuk fehérjetermelési szempontból, hogy természetük rendkívül nagy területet igényel, és ez megnehezíti a transzgenikus növények megfelelő elszigetelésére hozott szabályok betartását. Több, burgonyát (*Solanum tuberosum*) felhasználó expressziós rendszert fejlesztettek már ki, valamint olyan promótereket is, amelyek a fehérje termelést a burgonya ehető részébe, a gyökérgumóba koncentrálnak. A gyümölcsök, mint vakcinaelőállító gazdák felhasználásának óriási lehetősége, hogy emberekben is alkalmasak lehetnek szájon át történő antigénbevitelre, mert nyersen is fogyaszthatók. A paradicsom (*Solanum lycopersicum*) transzformálására már olyan promóter is elérhető, amely az antigénexpressziót a gyümölcsbe irányítja, viszont az ott uralkodó, viszonylag savas pH egyes antigéneket károsíthat. A fejlődő országokban a banán (*Musa paradisiaca*) termesztése népszerű, és vegetatív szaporítása miatt a transzgen elvesztésének esélye is elhanyagolható, de sajnos a gyümölcsspecifikus promóterek még nincsenek meghatározva ebben a fajban és termesztése a gabonamagvakénál lényegesen költségesebb (Warzecha és Mason, 2003).

A lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) az élettudományi kutatásokban előszeretettel használt modellnövény, így ez is egyike az elsőként transzformált növényeknek (Lloyd és mtsai., 1986), a mai napig kedvelt gazdafaj. A nagy és értékes fehérjetartalma miatt a reformkonyhában egyre népszerűbb növény a libatopfélék családjába tartozó quinoa (*Chenopodium quinoa*), ugyanezen okból a fehérjetermelésre is ígéretes jelölt. Sajnos azonban, a gabonához hasonlóan, ezt is hőkezelésnek kell alávetni az emberi fogyasztást megelőzően.

6.3.2. A növényekben történő antigénelőállítás módszerei

A növényi expressziós rendszerek két különböző módszeren alapulhatnak. Az első esetben a beültetendő fehérjeantigén genetikai kódját a gazdanövény genomjába illesztik, amelynek eredménye genetikailag módosított, transzgenikus növény. A másik módszer használata során a gazdanövény genetikai módosítására nincs szükség, mert ebben az esetben egy növényeket fertőző vírus juttatja az antigén kódját a fertőzött növény sejtjeibe. Ezesetben az antigén kifejeződése csupán átmeneti, és a gazda számára idegen fehérje termelődése csakis addig zajlik, amíg a növény vírushatározottsága tart és a vírusnukleinsav jelen van a sejtben. Másként fogalmazva, ebben a második esetben genetikailag módosított vírusról beszélünk, amelynek szaporítása csak növényekben lehetséges. Ugyan mindkét módszernek megvannak a maga előnyei és hátrányai, mindkettő alkalmas lehet nagy mennyiségű, gazdaságos fehérjeelőállításra.

6.3.2.1. Stabil transzformálás

A vakcina előállítást célzó transzgenikus növény-előállítás ma már rutinszerűen alkalmazott eljárásokon alapul. Legelső lépésként az adott kórokozó azon antigénjét kell kiválasztani, ami a legerősebb és protektív immunválasz kiváltására képes. A legtöbb állategészségügyi jelentőségű kórokozó esetében ezek már jól ismertek. A kiválasztott fehérjeantigén DNS-kódja lesz a transzgén. A transzgénről történő mRNS-átírás szabályozásához azután megfelelő promotorszekvenciát is kell a gén elé illeszteni. Egy jól kiválasztott promóter növeli a génről termelődő mRNS, majd fehérje mennyiségét, és lehetővé teszi a fehérjeantigén termelésének bizonyos szintű szabályozását is, például használhatók indukálható promóterek, vagy olyanok, amelyek a gének kifejeződését a növényi szervezeten belül bizonyos szervekre irányítják (egész növény, levelek, gyökérgumók, termés), ahol a fehérje fel is halmozható. A promóter ezen kívül befolyásolhatja azt is, hogy a növény életének melyik szakaszában termeli az előállítani kívánt fehérje legnagyobb részét. Ésszerű az antigént abban a növény szervben előállítani, amelynek összfehérje-tartalma viszonylag nagy (pl. mag), mert a transzgenikusan előállított fehérje az összfehérjének csak kis hányadát teszi ki. Kísérleti és kutatási célokra elterjedten használt például a karfiol-mozaikvírus 35S (cauliflower mosaic virus, CaMV 35S) promóter, mert erős és hosszan tartó génexpressziót tesz lehetővé gyökérben és levelekben, viszont mivel ezeknek a szöveteknek az összfehérje-tartalma viszonylag kicsi (2–5%), vakcinagyártásra ezek nem alkalmasak (Tiwari és mtsai., 2009). A génexpresszió hatékonysága jelentősen növelhető kodonoptimalizáció segítségével, mert a genetikai kód univerzális ugyan, az egyes élőlények eltérő gyakorisággal használnak egy-egy kódot az

azonos aminosavakat kódoló tripletek közül. A fehérjetermelés ezért nagymértékben javítható, ha a gazda faj által preferált kódokat részesítjük előnyben.

A transzformáció eredményeképpen az idegen gén a növénysejt genomjába stabilan integrálódik, a gén ezután a mendeli genetikának megfelelően öröklődik az ivaros szaporodás során. Ez magában hordozza az ún. kikereszteződés lehetőségét, amelynek megelőzése és általában a transzgénnel történő kontamináció veszélyeinek kiküszöbölésére mezőgazdasági körülmények között használt módszerek egy önálló tudományágat képeznek (Daniell, 2002).

A transzformálás egyetlen sejtet érint, majd ebből a sejtből regenerálódik a teljes, immár transzgénikus növényi szervezet. Egyes növény sejtek, az úgynevezett merisztémasejtek ugyanis rendelkeznek azzal a tulajdonsággal, hogy megfelelő biokémiai környezetben visszanyerjék totipotenciájukat, vagy dedifferenciálódnak, ezután erre alkalmas biokémiai irányítás alatt egyes szervek, vagy teljes növény nőjön ki belőlük. Ezt a jelenséget használják ki egyébként a növények vegetatív szaporítása során (pl. bujtás, dugványozás). Minden, az eredeti sejtől kifejlődött utód sejt azonos genommal rendelkezik. A növények stabil transzformálására számos közvetett és közvetlen eljárás létezik.

6.3.2.1.1. Közvetett transzformálás

A közvetett, vagyis indirekt transzformálás során növényekben tumorokat okozó baktériumfajokat használunk. Az *Agrobacterium tumefaciens* a golyvásodás kórokozója, míg az *A. rhizogenes* a gyökérszörösödésért felelős, mindkét kórkép daganatszerű növedékek megjelenésével jár a növények különböző részein. Kórokozó képességükért a bennük megtalálható plazmidok a felelősek: az *A. tumefaciens* Ti- (tumor indukáló-, tumor inducing-) és az *A. rhizogenes* ehhez nagyon hasonló szerkezetű Ri- (gyökér indukáló-, root inducing-) plazmidja (Zaenen és mtsai., 1974). A Ti-plazmidon található egy T-DNS nevű szakasz, amely a daganatos transzformáció során a fertőzött sejt genomjába integrálódik (Joos és mtsai., 1983). A gazdasejt azután az ezen a szakaszon elhelyezkedő génekről sejtburjánzást okozó fehérjét (auxinszintézisért felelős enzimeket és növényi citokineket) termel, valamint olyan enzimeket, amelyek az úgynevezett opinszintézist katalizálják. Az opinok olyan aminosavak, amelyek alapvető nitrogén- és energiaforrásként szolgálnak az *Agrobacterium*-ok számára, de más organizmusok nem képesek hasznosítani őket. A T-DNS akkor is a gazdasejt genomjába integrálódik, ha a T-DNS-szakaszból a sejtburjánzásért felelős géneket kivágják (Chilton és mtsai., 1977), helyükre a genomba ültetendő transzgén és promotere kerül, az opinszintézis enzimeinek helyére pedig promotereik meghagyásával antibiotikumrezisztencia-gének ültethetők (pl. kanamycin-rezisztencia gén), így a Ti-plazmid vektorként használható (Binns, 2002), a transzformált sejtek pedig kanamycinnel

szelektálhatók. Szintén a Ti-plazmidon foglalnak helyet azok a virulencia (*vir*) gének, amelyek a fertőzésért és a Ti-plazmid sejtbe juttatásáért, majd a T-DNS integrálásáért felelős fehérjéket kódolják. A *vir* gének által kódolt fehérjék akkor is képesek a T-DNS szakaszt a fertőzött sejt genomjába integrálni, ha azoktól külön plazmidon foglalnak helyet, de közös baktérium sejtben vannak jelen. A *vir* plazmidok és a T-DNS plazmidok szétválasztásával jöttek létre a bináris vektorok, amelyekben a T-DNS szakasz sokkal könnyebben manipulálható, mint az óriási (~200 kb) méretű teljes Ti-plazmid esetében (Hoekema és mtsai., 1983). Egyetlen, *Agrobacterium* közvetítésével transzformált totipotens növénysejtből egy teljes transzgenikus növénysejt felnevelhető, melynek minden sejtje tartalmazza a transzgént. Ma a jól megtervezett, ismert restriktációs endonukleáz hasítási helyeket, erős promótereket és meghatározott szelekciós rendszereket tartalmazó bináris vektorok széles köre áll rendelkezésre (Rao és mtsai., 2009).

6.3.2.1.2. Közvetlen transzformálás

Az *Agrobacterium* közvetítette indirekt transzformáció ma már egyszikű és kétszikű növényekben is elvégezhető, és ez a leggyakrabban alkalmazott módszer a növények genetikai módosítására, ám kezdetben kivitelezése egyszikűekben nehézségekbe ütközött, ezért közvetlen génbeviteli módok is fejlődésnek indultak, amelyek során baktérium közvetítő szerepére nincs szükség (Rao et al., 2009).

A leggyakrabban használt közvetlen módszer a részecskebombázás vagy más néven bioliztikus transzformálás, melyet Sanford és Klein fejlesztett ki a növények sejt falán való áthatolásra (Klein és mtsai., 1987; Sanford és mtsai., 1987). Előnye, hogy gazdafajtól független, és egyszerre több transzgén is bevihető a növényi sejtbe. A folyamat során a DNS-t kis (0,5–5 µm) átmérőjű hordozórészecskékre, ún. microcarrierekre viszik fel.

Ezek anyaga leggyakrabban arany vagy wolfram, ami biztosítja, hogy az örökítő anyaggal nem lépnek kémiai kölcsönhatásba. A hordozók sejtbe juttatása génpuskával történik. A részecskék felgyorsítására hélium- vagy nitrogéntűnyomást alkalmaznak (gondoljunk a légpuskákra). A nagy sebességre felgyorsított részecskék képesek a növényi sejtek falán áthatolni, így a sejtbe jutni (Uchida és mtsai., 2009).

Az elektroporálás, más élőlények sejtjeihez hasonlóan, a növényi sejtekben is alkalmazható a DNS sejtbe juttatására. Az eljárás során egy erős, de rövid ideig tartó elektromos impulzus pórusokat nyit a sejtmembránon, amiken keresztül a nagyobb molekulák (plazmidok, fehérjék) képesek a sejtekbe jutni. Az elektroporálást kezdetben csak protoplastokon (leemésztett sejt falú növénysejt) tudták elvégezni, mára azonban sejtfallal rendelkező sejteken és növényi szöveteken is alkalmazhatónak bizonyult. Előnye, hogy

eszközige nye kicsi és több sejt éli túl, mint a részecskebombázást (Sorokin és mtsai., 2000). A módszer egyszerűsége és viszonylagos hatékonysága ellenére kevésbé terjedt el.

A közvetlen transzformálásra más módszerekkel is történtek próbálkozások, de ezek egyike sem hozott átütő sikereket. Ilyen módszerek az imbibíció, kémiai módszerek, a pollencső módszer, liposzómák alkalmazása, szilikon-karbin mediált transzformáció és az elektroforézis (Rao és mtsai., 2009).

Az egész növényi sejthez hasonlóan a zöld színtestek (kloroplasztok) is transzformálhatók. Ennek előnye, hogy a kloroplaszt DNS-e nagy kópiaszámban van jelen (100/színtest, a zöld levél egy sejtjében pedig akár 100 kloroplaszt is lehet), valamint, hogy kizárólag anyai öröklődése révén a pollenben nem található meg a transzgén, így az ilyen növények esetén a transzgén terjedésének kisebb az esélye. Hátránya, hogy a transzgenről termelt fehérjék zárványokban akkumulálódnak és ilyenkor térszerkezetük is megváltozhat, valamint, hogy a poszttranszlációs módosítások (Gleba és mtsai., 2005) ritkán játszódnak le, feltehetően a kloroplasztok prokarióta eredete miatt.

6.3.2.2. Átmeneti transzformálás vírusvektorok közvetítésével

Növényeket fertőző vírusok felhasználásakor genetikailag módosított vírus viszi be az antigén genetikai kódját a növényi szervezetbe szisztémás fertőzés során, és erről képződik a termelni kívánt fehérje (Koprowski és Yusibov, 2001). A módszer előnye, hogy nem kell transzgenikus növényt előállítani, ezáltal egy adott rendszer kifejlesztésének ideje jelentősen lerövidül. Az így termelhető fehérje mennyisége több és kisebb az esélye a géncsendesítés jelenség kialakulásának (Warzecha és Mason, 2003).

Az átmeneti expresszió lehetőségeit korlátozza, hogy a vírusgenomba építhető idegen gének mérete véges (Koprowski és Yusibov, 2001). Akár transzgenikus növényi expresszióról, akár pedig egy növényi vírusvektor által bevitt gén expressziójáról van szó, minden esetben kizárólag alegységvakcina előállítása lehetséges. A vírusvektorok alkalmazása esetén előnyös, ha sikerül egy kórokozó elleni protektív immunitást egy-két rövidebb, de erősen immunogén expresszálandó epitópra leszűkíteni. A vírusvektorok esetén ugyanis, bár megoldható, hogy a vírusgenom egy teljes idegen gént tartalmazzon, ennek a stabilitása a genomon belül nem minden esetben tökéletes, a vírus replikációja során megszabadulhat a bevitt géntől (Marillonnet és mtsai., 2005). A stabilitás szempontjából előnyösebb a helyzet, ha nem a teljes idegen gént, hanem csak a fontos epitóp kódját ültetik be. Ilyenkor lehetőség nyílik arra is, hogy ezt az epitópot a növényi vírus a felszínén, valamelyik struktúrális fehérjében jelenítse meg, pl. egy, a növényvírus életciklusa számára nélkülözhető epitóp idegen epitópra történő cseréjével, vagy, az eredeti

fehérjeszerkezet megőrzése mellett, megfelelő pozícióba illesztjük a beépíteni kívánt epitópot.

Ez nem csak a rekombináns vírus stabilitása szempontjából lehet jelentős, hanem több hely maradhat a vektoron egyéb, akár más kórokozóból származó epitópok vagy adjuváns hatású fehérjék együttes expressziójára, bi- vagy polivalens alegységvakcinák előállításához.

A növényvírusokkal történő transzfekeció mellett más lehetőség is rendelkezésre áll az átmeneti expresszió létrehozására: ez az agroinfiltráció. Hasonlóan az *Agrobacterium*-mediált stabil transzformáláshoz, itt is a baktériumban lévő bináris plazmidba ültetett transzgenről történik az expresszió. A baktériummal nem egy sejtet fertőznek, amiből aztán később egy teljes növény alakul ki, hanem egy növény már differenciált részét, leggyakrabban a levelét. Ennek során a T-DNS a növénysejt citoplazmájába jut, de nem épül be annak genomjába, fehérje átírás viszont átmenetileg így is történik róla. Így az átmeneti expresszióra jellemzően gyorsan kifejleszthető a rendszer és a transzformációhoz viszonyítva, nagy fehérjehozam érhető el, rövidebb ideig. Az agroinfiltráció során a leveleket *Agrobacterium* szuszpenziójával infiltrálják vákuum vagy nyomás segítségével (Kapila és mtsai., 1997). A módszer még nem alkalmas ipari mértékű rekombináns fehérje előállítására, ám folyamatosan fejlődik, például egyes géncsendesítés-szupresszorok ko-expressziójával a hozam ötvenszeresére növelhető (Voinnet és mtsai., 2003).

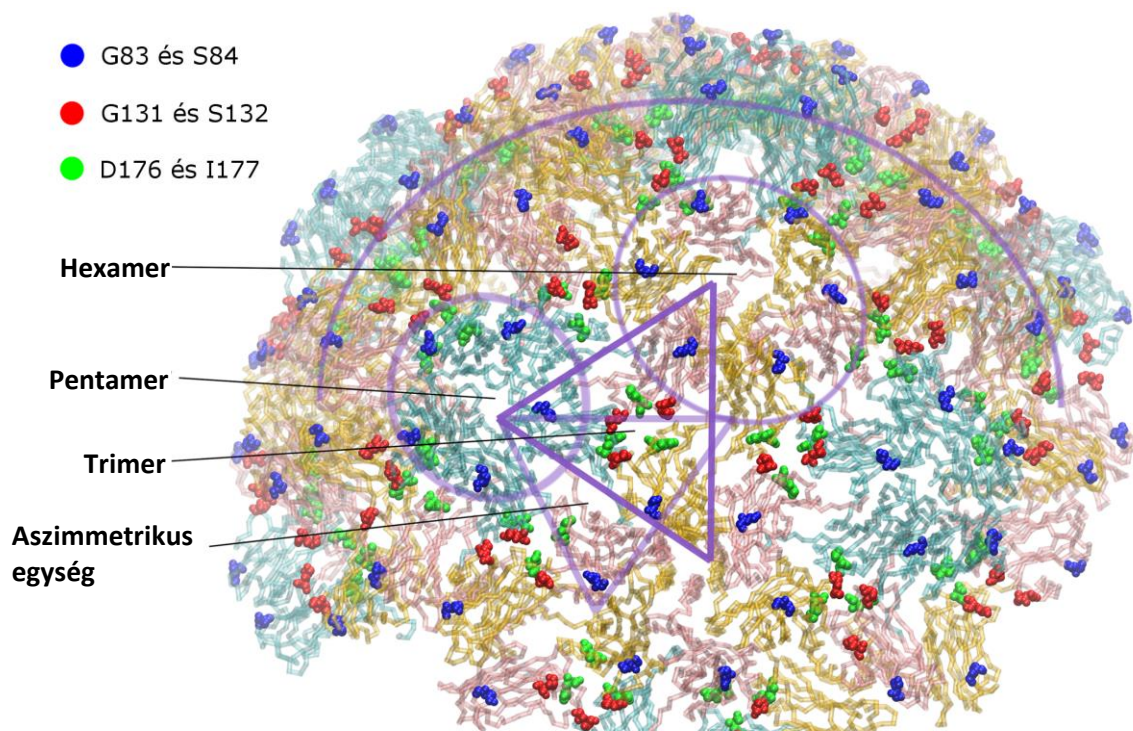
6.4. AZ UBORKA-MOZAIKVÍRUS, MINT EXPRESSZIÓS VEKTOR

A munkánk során expressziós vektorként az uborka-mozaikvírust (cucumber mosaic virus, CMV) használtuk fel. A CMV a *Bromoviridae* családon belül a *Cucumovirus* nemzetségbe tartozik, gazdaspektruma rendkívül széles, több mint 1200 növényfajra kiterjed (Mochizuki és Ohki, 2012), amelyek között számos mezőgazdasági és dísnövény található. Sok ehető faj is fertőzhető, például banán (*Musa spp*), uborka (*Cucumis sativus*), eper (*Fragaria x ananassa*), sárgarépa (*Daucus carota*), paprika (*Capsicum spp*), paradicsom (*Solanum lycopersicum*), saláta (*Lactuca sativa*), zeller (*Apium graveolens var. dulce*; Natilla és mtsai., 2004). A vírus széles gazdaspektruma, részletesen jellemzett genomszerkezete, replikációjának, valamint növényen belüli (sejtek közötti és szisztémás), és növények közötti terjedésének módjai mind jól ismertek, ezért ígéretes vektorjelölt rekombináns fehérje és ehető vakcina előállításához akár emberek, akár állatok részére.

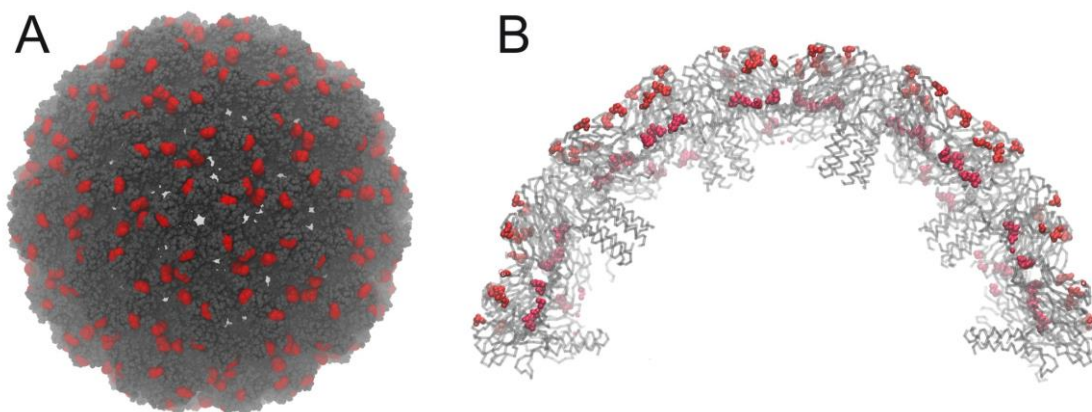
A CMV-virionok izometrikusak, körülbelül 28–30 nm átmérőjűek, pozitív irányítottságú, egyszálú RNS genomot tartalmaznak. Az RNS-genom három különálló szálból épül fel: az RNS 1 és RNS 2 a vírus replikáz-komplexének génjeit kódolják, valamint az RNS 2 szálon egy olyan gén is található, ami a fertőzött uborkában a jellegzetes tünetek kialakulásáért és a

vírus szisztémás terjedéséért felelős. Az RNS 3 két fehérjét kódol, az egyik szintén a vírus terjedésében játszik szerepet, a másik pedig a kapszidfehérje (coat protein, CP; Salánki és mtsai., 1997). Rekombináns uborka-mozaikvírus létrehozásához, ha a beültetendő epitópot a vírus felszínén tervezzük megjeleníteni, akkor a CP-t kódoló RNS 3 szakasznak az átszerkesztésére van szükség. A kapszid ikozahedrális, trimeres szerkezetű (háromszög alakú egységekből áll) és minden trimert egy A, egy B és egy C alegység alkot (1. ábra), amelyek aminosavsorrendje megegyezik, térszerkezetük viszont különböző. Másféle megközelítésben 5 db A alegység egy pentamert, 3 B és 3 C alegység pedig egy hexamert alkot (Smith és mtsai., 2000).

Három olyan inzerciós pontot ismerünk a CMV kapszidjában, ahová idegen epitópot ültetve a CMV szaporodása és terjedése a fertőzött növényben nem szenved zavart (Nuzzaci és mtsai., 2007; Vitti és mtsai., 2010). Ezek közül egy a virion belső felületén, kettő pedig a külső felszínén helyezkedik el (1. és 2. ábrák). A belső felületen található inzerciós helyen uralkodó elektrosztatikus viszonyok csak pozitív töltésű epitópok beültetését teszik lehetővé, a nagy, semleges, vagy negatív töltésű epitópok a vírusgenom-RNS kapszidhoz kötődését akadályozzák, így az erre a helyre inzertált konstrukciók viszonylag instabilak.



1. ábra. A CMV virion szerkezete és az inzerciós helyek. Az A, B és C alegységek sorrendben cián, rózsaszín és narancsárga színűek. Az inzerciós helyek kék, vörös és zöld színűek (Gellért és mtsai., 2012).



2. ábra. Az uborka-mozaikvírus virionjának molekuláris felszíne (A) és részleges keresztmetszeti képe (B) Piros gömbökkel jelöltük azokat az aminosavakat, amelyek mögé idegen eredetű vírus epitóp szekvenciákat lehet úgy beépíteni, hogy közben a CMV fertőzőképes marad a gazdanövényen (Tombác és mtsai., 2012).

Legelőször Hepatitis C vírusantigéneket állítottak elő rekombináns CMV segítségével, a létrehozott konstrukciók alkalmasak voltak humorális immunválasz kiváltására nyulakban és a celluláris immunválasz erősítésére krónikusan fertőzött emberekben (Piazzolla és mtsai., 2005; Nuzzaci és mtsai., 2007). A szintén humán egészségügyi jelentőségű Alzheimer-kór megelőzésével kapcsolatos epitópokat is sikerrel inwertáltak CMV-be (Vitti és mtsai., 2010).

Ahhoz, hogy a CMV-vektor segítségével előállított antigéneket orális immunizálásra lehessen használni, a víruspartikuláknak elegendő arányban kell túlélniük az emésztőrendszer számukra káros hatásait, hogy megfelelő immunválaszt tudjanak indukálni. Egy vizsgálatban szimulált gyomor- és bélfolyadékmal kezelt vad típusú és Hepatitis C epitópot expresszáló rekombináns CMV virionokat, azután poliakrilamidgél-elektroforézissel ellenőrizték azok épségét. A partikulák a kezelés után intaktak maradtak. Ugyanebben a vizsgálatban nyulakkal etettek rekombináns CMV-vel kezelt salátát, és a belőlük vett vérszérummintában lévő ellenanyagok specifikusan tudtak kapcsolódni a csak az inwertet tartalmazó antigénnel Western Blot kísérletben (Nuzzaci et al., 2010).

6.5. ANTIGÉN-ELŐÁLLÍTÁS *THALASSIOSIRA PSEUDONANA* MIKROALGÁBAN

A *Thalassiosira pseudonana* a kovamoszatok (Bacillariophyta) osztályába és a centrikus kovamoszatok családjába (*Coscinodiscophyceae*) tartozó egysejtű, eukarióta, fotoszintetizáló mikroalgafaj, világszerte elterjedt, a fitoplankton gyakori alkotója. A kovamoszatok (más néven diatómok) a Föld szerves szén termelésének 20%-át adják, és barna színű kloroplasztjaikat másodlagos endoszimbiózis útján, valószínűleg egy vörösmoszatfaj bekebelezésével szerezték (Falkowski és mtsai., 2004). Az 1958-ban gyűjtött

és azóta laboratóriumban fenntartott CCMP 1335 jelű törzse volt a legelső, teljes egészében megszekvenált genomú eukarióta fitoplankton (Armbrust és mtsai., 2004). A *T. pseudonana* modelltörzsként szolgál a kovamoszatok biológiájának tanulmányozására, genomja viszonylag rövid (~34 Mbp), emellett genetikai módosítására a legalapvetőbb eszközök már rendelkezésre állnak.

A traszgenikus mikroalgák létrehozásának legnagyobb jelentősége ma abban rejlik, hogy a fosszilis energiaforrások kimerülésével egyre inkább előtérbe kerülnek a bioüzemanyagok kínálta lehetőségek, erre a célra a kovamoszatok alkalmas jelöltek lehetnek. A kovamoszatok környezeti stressz hatására nagymértékű lipidfelhalmozásba kezdenek, ami kedvez a bioüzemanyag gyártásnak. A mikroalgák biomassza-előállító képessége jóval meghaladja a szárazföldi növényekét és mivel vízben növeszthetőek, nem foglalnak helyet a szántóföldi növények, vagy a legelők előtt (Radakovits és mtsai., 2010). Feltételezhetően a kőolajkincs legnagyobb része amúgy is kovamoszat eredetű (Ramachandra és mtsai., 2009). A stresszhatás (például Si-megvonás) alatt azonban szaporodásuk is jelentős mértékben lelassul, emiatt szükséges e sejteket úgy módosítani, hogy normális szaporodási ráta mellett is indukálható legyen a lipidfelhalmozás (Roessler és mtsai., 1994). Ez az igény jelentős löketet adott a diatóm sejtek génmódosításához rendelkezése álló eszköztár kifejlesztésének.

A mikroalgákat az teszi különösen vonzóvá a rekombináns fehérje, így a vakcina előállítás szempontjából, hogy egysejtűek, növekedési erélyük egyszerű tápanyagok, víz és napfény esetén megközelíti a baktériumokét, vagy az élesztő sejtekét. Mivel szénforrásként szén-dioxidot használnak, a növesztett kultúrák bakteriális vagy fungális kontaminációnak kevésbé vannak kitéve. Növények, de nem tartoznak a hagyományosan fogyasztott élelmiszer- vagy takarmánynövények közé, ezért annak az esélye, hogy ezeket rekombináns fehérjével kontaminálják, elhanyagolható (Rasala és Mayfield, 2015). A szántóföldi növényekhez képest különbség, hogy vízben tenyésznek és termesztésük mindenképpen zárt rendszert, tankokat igényel, ám ebben a zárt rendszerben könnyebben megoldható a kontamináció csökkentése mellett a tápanyagok és a víz visszaforgatása. Az előállított rekombináns sejtek esetében, éppen egysejtű mivoltuk miatt nincs szükség a rekombináns növény további feldolgozására, az ehetetlen részek eltávolítására és megsemmisítésére, és a felhasznált tápanyag mind a termelt fehérjét tartalmazó részben hasznosul. (Specht és Mayfield, 2014). A mikroalgák liofilizálással hosszan, akár 20 hónapon át tárolhatók, sejtfaluk a pepszines emésztésnek *in vitro* körülmények között ellenáll (Dreesen és mtsai., 2010).

A *T. pseudonana* esetében elsőként Poulsen és munkatársai (2006) írták le a faj stabil transzformálásának módszertani alapjait, amely szerint a génbevitel leghatékonyabb módja a részecskebombázás (biolisztikus transzformáció). Ennek során antibiotikumrezisztencia-gént és erős, konstitutív génexpressziót lehetővé tévő promotert (fucoxanthin chlorophyll a/c-

binding protein, fcp promoter; Falcatore és mtsai., 1999) tartalmazó vektort is kifejlesztettek, valamint zöld fluoreszcens fehérjét (enhanced green fluorescent protein, eGFP) stabilan kifejező törzset is sikerült előállítaniuk.

A rekombináns fehérje kísérleti előállítására leggyakrabban használt mikroalgafaj a *Clamydomonas reinhardtii* (Rasala és Mayfield, 2015). Diatómokban, így *T. pseudonana* mikroalgában termelt vakcinaantigénekről még nem született tudományos publikáció, az erről szóló információ szabadalmi bejelentés formájában érhető el (<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2013063388>).

6.6. A KETTES TÍPUSÚ SERTÉS CIRCOVÍRUS (PCV2)

A PCV2 által okozott megbetegedések első leírásuk (Harding és Clark, 1996) óta közismerten hatalmas károkat okoznak a sertés ágazatban világszerte. A PCV2 az egyik legkisebb ismert, állatokat fertőző vírus. Genomja 1767 vagy 1768 nukleotid hosszúságú szimpla szálú cirkuláris DNS. Egyetlen strukturális fehérjéje a kapszidfehérje (capsid protein, cap), amely 233 aa hosszúságú. A PCV2 kis mérete, más vírusokhoz viszonyított egyszerűsége, járványtana (nagyreszt oronazális tejedése) és jó genetikai jellemzettsége alkalmas jelöltté tette arra, hogy modellként szolgáljon ehetső állat-egészségügyi antigén létrehozására tett kísérletekben.

6.6.1. A sertés circovírusok

A sertés circovírusoknak két típusa ismert. Az egyes típusú sertés circovírus (PCV1) a legelső ismert circovírus, 1974-ben izolálták sertésvese (porcine kidney, PK–15) sejtenyészetből (Tischer és mtsai., 1974; 1982). A PCV1 apatogén (Allan és mtsai., 1995, Puvanendiran és mtsai., 2011), ezt azonban néhányan megkérdőjelezi (Saha és mtsai., 2011). A PCV1 megtalálható a házi sertésekben (Ellis és mtsai., 2000, Calsamiglia és mtsai., 2002) és a vaddisznókban (Cságola és mtsai., 2008), kereskedelmi forgalomban kapható, pepszint tartalmazó készítményekben (Fenau és mtsai., 2004b) és vakcinákban (Quintana és mtsai., 2006, Victoria és mtsai., 2010, Ma és mtsai., 2011, Gilliland és mtsai., 2012). Állat-egészségügyi jelentősége valószínűleg csekély.

A PCV2 genetikailag meglehetősen változatos vírus, a jelenleg elfogadott csoportosítás szerint 3 genotípusa létezik: a PCV2a, a PCV2b és a PCV2c (www.pcvd.org). A PCV2c genotípust csak Dániában írták le, 1980-ból, 1987-ből és 1990-ből származó mintákat feldolgozó vizsgálat során (Dupont és mtsai., 2008), azóta sehol máshol nem mutatták ki.

A PCV2a- és PCV2b-genotípusok világszerte elterjedtek, a kezdetben jellemző PCV2a túlsúly helyett mára a PCV2b, azon belül is annak egyik szubtípusa, az Olvera és mtsai. (2007) szerinti 1A vált dominánssá (Carman és mtsai., 2006, Gagnon és mtsai., 2007, Cságola, 2009, Wang és mtsai., 2009). Ezt a genetikai beszűkülést most valószínűleg a vakcinázások hatásaként jelentkező szelekciós nyomás miatt újabb és újabb variánsok megjelenése követi (Lőrincz, 2014). A PCV2-genotípusokban patogenitásbeli különbség feltételezhető (Allan és mtsai., 2012; Li és mtsai., 2010), ám ezzel kapcsolatban nincs teljes egyetértés a szakirodalomban (Oppriessnig és mtsai., 2008).

Kínából származó szekvenciák alapján további két, PCV2d és PCV2e elnevezésű genotípus létezését is feltételezik (Wang és mtsai., 2009; Guo és mtsai., 2010). A PCV2d-csoport tagjait Európában és Amerikában is kimutatták (Toplak és mtsai., 2012; Xiao és mtsai., 2012). A PCV2d- és PCV2e-genotípusok tagjai nem különböznek eléggé a korábban leírt genotípusokba tartozó vírusoktól ahhoz, hogy a PCV2 genotípusokra vonatkozó ajánlás (Grau-Roma és mtsai., 2008) szerint valóban külön csoportot képviseljenek, ezért létezésük ma nem elfogadott (Lőrincz, 2014).

6.5.1.1. A PCV2-asszociált kórképek

A legelsőként leírt PCV2 okozta betegséget a választott malacok circovírus okozta sorvadásának (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) nevezték el (Clark, 1996; Harding és Clark, 1996). Ezt követően a betegséget számos más kórképhez is kapcsolták: szerepe lehet a sertések légzőszervi betegségkomplexe (porcine respiratory disease complex, PRDC, Halbur, 1998; Thacker, 2001), a sertések dermatitisz nefropátiája (porcine dermatitis nephropathy, PDNS, Segalés és mtsai., 1998, Rosell és mtsai., 2000) kialakításában. Kimutatták szaporodás biológiai rendellenességek (West és mtsai., 1999), elhalásos tüdőgyulladás (Pesch és mtsai., 2000) és exszudatív epidermitisz (Kim és Chae, 2004) hátterében is. A PCV2 által okozott betegségek új beosztásuk szerint 2 csoportra oszthatók: szubklinikai formára és klinikai megbetegedésre (Segalés, 2012). Eszerint a klinikai megbetegedések közé tartozik a PCV2 okozta szisztémás megbetegedés, a PCV2 okozta légzőszervi megbetegedés, a PCV2 okozta emésztőszervi betegség a PCV2 okozta reprodukciós zavar és a PDNS. A szubklinikai fertőzés esetében a vírus kimutatható az állatok szérumából, és növekedésbeli visszamaradás figyelhető meg. A PCV2 fertőzöttség klinikai és szubklinikai formában is immunszuppressziót okoz (Mavrommatis és mtsai., 2014). Ez a vakcinázások hatékonyságát csökkenti, és más kórokozók, valamint fakultatív patogének károkozását növeli, csökkenti a súlygyarapodást, növelheti az antibiotikum-felhasználást és az állat-egészségügyi költségeket.

6.5.1.2. A PCV2 antigenitása

A PCV2 egyetlen szerkezeti fehérjéje a kapszidfehérje (cap), amely a vírusok túlnyomó többségében 233 aminosav hosszúságú és a PCV2 egyszálú genomjáról átíródó komplementer szálon helyet foglaló ORF2-gén kódolja.

Crowther és mtsai. (2003) derítették fel elsőként a PCV2-virion struktúráját elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével. Megállapították, hogy a virion T1-es szimmetriájú ikozaéder, ami azt jelenti, hogy az egyes kapszidfehérje-alegységek ötösével úgynevezett pentamereket alkotnak, és az ötszögek közepén az öt kapszidfehérje-alegység találkozási pontja felel meg az összesen 20 háromszöglapból álló ikozaéder egyes csúcsainak. A kapszid átmérőjét 20,5 nm-nek, vastagságát 2,5 nm-nek találták.

A cap-fehérje N-terminális része a sejtmagba jutásért felelős jelet (nuclear localization signal, NLS) tartalmazza, amely bázikus aminosavakban gazdag (Liu és mtsai., 2001a).

A cap-fehérje antigén-ellenanyag kötődésben szerepet játszó epitópjait Mahé és mtsai. (2000) kezdték el felderíteni és összesen öt immundomináns szakasz jelenlétét állapították meg PEPSCAN módszerrel, amely többnyire csak lineáris epitópok azonosítására alkalmas. Ezek közül az epitópok közül négy kizárólag a PCV2-re jellemző (25–43., 65–87., 113–139. és 193–207. aa), egy pedig keresztreakál a PCV1 antigénnel (157–183. aa). A keresztreakáló antigén-determináns jelenléte ellenére a két PCV-típus közötti keresztreakció a gyakorlatban nem jellemző, mert ez az epitóp valószínűleg a virionokon belül rejtve foglal helyet és az ellenanyagok számára nem hozzáférhető.

A keresztreakció hiányát kihasználva Lekcharoensuk és mtsai. (2004) az epitópok vizsgálatát PCV1–PCV2 kiméra virionok segítségével folytatták. Ezekben a vírusokban a kapszidfehérjék eltérő arányban tartalmaztak PCV1 és PCV2-ből származó részleteket, és PCV2-vel szemben termelt monoklonális ellenanyaghoz való specifikus kapcsolódásuk vizsgálatával az immundomináns, konformációs epitópok helyét három régióra tudták szűkíteni: ezek a 47–84., a 165–200. és a 230–233. aminosavak.

Shang és mtsai. (2009) további lineáris epitópokat határoztak meg monoklonális ellenanyagok és PEPSCAN módszer használatával, ezek a 230–233., 195–202., és a 92–103. aminosavak. Azoknak az ellenanyagoknak a segítségével, amelyek lineáris epitópokkal nem, de a teljes cap-fehérjével reagáltak, konformációs epitópokat kerestek, ezek lehetséges helyeként a 205–230. aa-kat, valamint az első hatvan és az utolsó három aa-at együtt tartalmazó régiókat határozták meg. A szerzők a különböző PCV2-genotípusok antigenitásában is különbséget találtak. A PCV2b-izolátum utolsó négy epitópját felismerő monoklonális ellenanyag nem reagált a PCV2a-genotípusú izolátummal. Egyes genotípusok közötti, antigenitásbeli különbségeket más vizsgálatok is felfedeztek (Lefebvre és mtsai.,

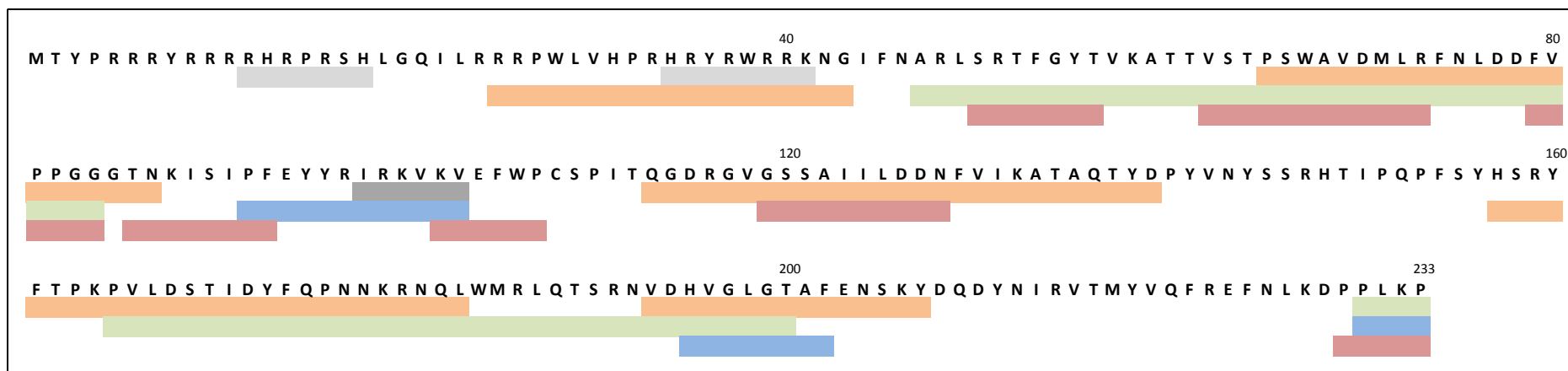
2008; Tribble és Rowland, 2012) és a két PCV2-genotípus között legnagyobb különbséget mutató szakaszként a 86–93. aa-kat határozták meg.

Tribble és mtsai. (2011) prokarióta rendszerben expresszált PCV2-kapszidfehérje szakaszokon vizsgálva fertőzött és vakcinázott malacok ellenanyagait arra a feltételezésre jutottak, hogy a PCV2 cap-fehérjéjén a PRRSV-hez hasonlóan egy csaliepitóp található, amely erős immunogenitása miatt jelentős, de nem neutralizáló ellenanyagválaszt indukál. Ez a feltételezett csaliepitóp a 169–180. aa-knak felel meg.

A kísérletes epitóp-feltérképezést követően a PCV2-kapszid első három dimenziós modelljét Khayat és mtsai. (2011) készítették el és elhelyezték rajta az addig megismert antigén-determinánsokat, valamint azonosították a virion sejtbe jutásáért feltehetően felelős heparán-szulfát (Misinzo és mtsai., 2006) kötőhelyet is (98–103 aa). A szerzők külön kitérnek a Mahé és mtsai. szerinti 25–43. aa között található epitóp helyzetére, mert eredményeik alapján ezek az aminosavak a PCV2-virionok belső felszínén találhatóak, ezért valószínűnek tartják, hogy a vírus sejtbe jutása során ez a rész átmenetileg externalizálódik a más vírusok esetén már leírt, ún. víruslégzés jelensége során (Lewis és mtsai., 1998; Li és mtsai., 1994). A vírusok kapszidja ugyanis nem merev, a térszerkezete a környezeti tényezőktől függően és más fehérjékkel való kölcsönhatások során dinamikusan változhat, ez elengedhetetlen például a sejtekbe jutáshoz vagy a vírusok örökítőanyagának sejtbe bocsátásához.

A lineáris epitópok keresését továbbfolytatták poliklonális, PCV2-vel fertőzött sertésekben tisztított PCV2-specifikus ellenanyagok segítségével, amelyekhez véletlenszerű aa sorrendű, fágkönyvtárban expresszált heptapeptidek kapcsolódását vizsgálták (Ge és mtsai., 2013). A módszerrel 8 antigéndetermináns régiót azonosítottak a cap-fehérjén, ezek között 3, azelőtt ismeretlen epitópot (50-56., 86–93., 102.-107. aa). Az azonosított epitópokkal Kunming egereket immunizáltak, a 8 epitóp közül 2 nem indukált PCV2-specifikus ellenanyagválaszt, ezek az 50–56. és 229–233. aminosavak.

A szakirodalomban fellelhető, különböző módszerekkel azonosított epitópokat a PCV2-kapszid GenBankban elérhető referenciaszekvenciájának példáján a **3. ábra** foglalja össze.



3. ábra. A PCV2 immundomináns régióinak elhelyezkedése a kapszidfehérjén (NP_937957 számú referencia szekvencia). A világosszürke régió az NLS-t (Liu és mtsai., 2001a); a sötétszürke a megjósolt heparán-szulfát kötőhelyet (Khayat és mtsai., 2011) jelölik. Narancssárgával a Mahé és mtsai. (2000), zöld színnel a Lekcharoensuk és mtsai. (2004), késsel a Shang és mtsai. (2009), bordóval a Ge és mtsai. (2013) által meghatározott epitópokat jelöltük. A számok az egyes aminosavak sorszámát jelölik.

6.6.2. A PCV2 járványtana és a védekezés lehetőségei

A PCV2 világszerte előfordul (Segalés, 2012). Megbetegítő képessége függ az állomány PCV2-terheltségétől, más kórokozókvaló fertőzöttségétől, a vakcinázottságától, a tartástechnológiától, az állathigiéniai körülményektől.

A PCV-virion fertőtlenítő szerekkel szemben és a környezeti hatásoknak kitéve is nagyon ellenálló, burok nélküli, ezért a zsírolószer nem hatástalanítja, viszonylag alacsony pH-n (pH=3) és akár a 70 °C-os hőmérsékleten is túlél (Allan és mtsai., 1994). Érzékenyebb oxidálószer és lúgok roncsoló hatására, ezek használata viszont gyakorlati körülmények között nem ajánlott, mert a berendezéseket is károsítja (Royer és mtsai., 2001). Ezen okok miatt a mentesítés még teljes állománycsere mellett is igen nehézkes.

A PCV2 horizontálisan és vertikálisan is terjed. A horizontális terjedés általában az együtt tartott állatok között, illetve ragályfogó tárgyakkal és többször használt injekciós tűvel történik. Az állatok egymást leginkább az oronazális terjedési útvonalon fertőzik, de nem elhanyagolható a bélsárral ürített virionokkal történő fertőzés jelentősége sem (Patterson és mtsai., 2011). A PCV2 járványtanában rágcsálóknak (egér, patkány) rezervoár szerepe lehet (Lőrincz és mtsai., 2010).

A PCV2 a mesterséges termékenyítésre használt spermában is jelen lehet (Schmoll, 2008). A fertőzött kanok vírusürítése a spermával szakaszosan változik (Larochelle és mtsai., 2000). A spermában lévő vírus mennyiségétől függően alakul a szaporodás biológiai zavarok súlyossága. Egyes esetekben a kocák meg sem fertőződnek (Madson és mtsai., 2009a), de nagy vírustartalmú spermával termékenyített kocák esetében létrejöhethat visszaivarzás, magzatsorok kialakulása, vetelés. Ilyenkor a magzatok szívizomzatából a vírus kimutatható, az esetleg élve született malacok pedig virémiások lesznek (Madson és mtsai., 2009b). Mindenesetre, ha a kereskedelmi forgalomban kapható helyett a telepen termelt spermával termékenyítenek, akkor az adott telepen előfordulhat a PCV2 felhalmozódása (Rose és mtsai., 2003).

A PCV2 elleni vakcinák 2008-as bevezetése előtt a kórokozó ellen az általános járványvédelmi és állathigiéniai szabályok betartásával lehetett védekezni. Erre vonatkozó ajánlásokat fogalmazott meg Madec 2001-ben, amelyek jórészt alapvető állathigiénia, állatjóllétre és biológiai biztonságra vonatkozó feltételeket tartalmaztak az elletés környékét, a választás utáni időszakot, a hizlalás végének időszakát, és egyéb általános irányelveket, mint például a megfelelő vakcinázási protokollt kiemelve (Madec, 2001).

A PCV2-vakcinák kereskedelmi forgalomban történő megjelenése előtt, a PCV2 epidémiás időszakában (kb. 1996–2004) a morbiditás 50–60%, a választás utáni mortalitás pedig 4 és 20% között mozgott Európában (Madec és mtsai., 2000; Segalés és Domingo, 2002). A vakcinázással a vírus által okozott kártételek jelentősen csökkenthetők, azonban az

okozott anyagi károk becslése és ez alapján a vakcinázás gazdasági hasznának kiszámítása igen bonyolult. Angliában például az epidémiás időszakban 35 millió GBP/évre tették, pusztán a választás után elhullott és a vágó kort el nem érő malacok kiesésével képződött veszteséget figyelembe véve (Armstrong és Bishop, 2004). A vakcinázások bevezetése után jelentkező haszon azonban nagyobb volt, mint amit a klinikai megbetegedések elmaradása indokolt volna (Kurmán és mtsai., 2011; Young és mtsai., 2011). Így valószínű, hogy a PCV2 által okozott kár nagy része a szubklinikai fertőzésekkel magyarázható, és ezek gazdasági jelentősége jóval nagyobb, mint korábban gondolták, ezért az epidémiás időszakban okozott gazdasági veszteség inkább 80 millió GBP/év-re korrigálendő (Alarcon és mtsai., 2013a).

Endémiás járvány esetén (az európai országokra ma ez jellemző) egy állomány fertőzöttségének mértéke, a klinikai tünetek súlyossága és az okozott anyagi kár nagymértékben különbözhetnek a telepek között. Ezekről a tényezőktől függően érdemes többféle védekezési módszert is fontolóra venni, mert az egyedi esetekben más–más stratégia bizonyulhat hatékonynak. Pusztán rövidtávú, gazdasági megfontolások alapján, a kizárólag szubklinikailag fertőzött állományok esetén elegendő a vakcinázás bevezetése, és csak súlyosabb, klinikai kórképek megjelenésével járó fertőzöttségnél ajánlott javítani a higiénés viszonyokat is, így, bár a PCV2 vírust teljesen eltüntetni nem mindig lehet, a másodlagos fertőzések esélyének csökkentésével azonban azok immunrendszert aktiváló hatása, és ezen keresztül a PCV2 okozta veszteség is jelentősen csökkenthető (Alarcon és mtsai., 2013b). Gyakorlati körülmények között és a hosszútávú, járványtani szempontokat is figyelembe véve minden esetben törekedni kell az állathigiéniai körülmények olyan szintre történő javítására, hogy a vakcinázás bevezetésére csak akkor kerüljön sor, ha az elkerülhetetlen. A PCV2 elleni vakcinázásnak tehát van létjogosultsága és gazdaságilag megalapozott (Kristensen és mtsai., 2011), de jelen formájában nem képes megakadályozni a vírussal való fertőződést és a vírusűrtést.

A sertések PCV2 elleni immunizálására kétféle gyakorlat áll rendelkezésre: A malacok vakcinázása 2–3 hetes koruk környékén, vagy a kocák ellés előtti kétszeri immunizálásán keresztül a malacok passzív védelme maternális ellenanyagokkal.

Európában és Észak-Amerikában jelenleg kétféle PCV2 elleni vakcina kapható kereskedelmi forgalomban, amelyek vagy inaktivált, vagy rekombináns PCV2-ORF2-gént expresszáló baculovírust tartalmazó aleggységvakcinák (Beach és Meng, 2011). Ezeknek közös eleme, hogy kizárólag parenterálisan (izomba oltva) használandók.

A Circovac (Merial) sejttenyészetten elszaporított, thiommerzállal tartósított és paraffinolajjal adjuvált, inaktivált PCV2-vírust tartalmaz. Kocák és hízók vakcinázására is ajánlják. Alapimmunizálásra kocasüldők esetében két oltás ajánlott, 3–4 hét különbséggel, de legalább két héttel a termékenyítést megelőzően, majd egy újabb adag, ellés előtt két

héttel. Kocáknak szintén kétszer, 3–4 hét különbséggel, az ismétlő oltás legalább az ellés előtt két héttel ajánlott. Emlékeztető oltásként minden ellés előtt 2–4 héttel lehet ismételni. A gyártó szerint a maternális immunitás a kolosztrum felvételét követően öt héten keresztül tart. Malacok aktív immunizálására 3 hetes koruktól ajánlott, amely 2 hét alatt kialakuló és 14 héten keresztül tartó védelmet ígér (Circovac, Merial, használati utasítás).

A másik inaktivált PCV2-vakcina a Suvaxyn PCV (Zoetis), amely PCV1 vázba ültetett, PCV2-ből származó ORF2-t tartalmazó vírusból készül (az USA-ban Foster PCV, vagy *Mycoplasma hyopneumoniae* antigénnel kombinációban Foster PCV MH néven van forgalomban). A vakcina szqualén-adjuvánst és thiommerzált tartalmaz és malacok három hetes kortól kezdődő, egyszeri vakcinázására ajánlja a gyártó, 3 hét alatt kialakuló, 19 héten keresztül tartó immunitást biztosítva (Suvaxyn PCV, Zoetis, használati utasítás). A PCV1/2 kiméravírus kísérleti körülmények között igazoltan, élővírus vakcinaként használva nem betegíti meg az állatokat, de PCV2 specifikus immunválaszt vált ki, ezért vizsgálták élő attenuált vakcinaként történő alkalmazhatóságát (Fenaux és mtsai., 2003; 2004a). Ennek ellenére inaktiválva hozzák forgalomba, egyrészt, mert a PCV1 apatogenitása újabban vitatott (Saha és mtsai., 2011), másrészt, mert klinikai tüneteket mutató sertésekből kimutattak ismeretlen eredetű, a vakcinatörzshöz hasonló genomszerveződésű PCV1/2a kiméra vírust (Gagnon és mtsai., 2010). Az inaktivált vakcinánál várhatóan hatékonyabb, élő attenuált vakcina létrehozása azonban még mindig foglalkoztatja a kutatókat (Hemann és mtsai., 2014).

Rekombináns, ORF2-gént expresszáló baculovírust tartalmazó vakcinák a Porcilis PCV (Intervet) olajemulziós és az Ingelvac Circoflex (Boehringer Ingelheim) karbomerrel adjuvált vakcinák. A Porcilis PCV használati utasításában már figyelembe veszik a malacokban mérhető maternális ellenanyagszintet: kis vagy közepes titerek esetén 3 hetes kortól egyszeri, erős kolosztrális immunitás áttörésére kétszeri immunizálást javasolva, ez utóbbi esetben az első oltást már 3–5 napos korban, a másodikat 2–3 héttel ezután adva. A két hét alatt kialakuló védettség várhatóan 22 hétig kitart (Porcilis PCV, Intervet, használati utasítás). Az Ingelvac Circoflex malacok aktív immunizálására két hetes kortól használható egyszeri adagban, amelytől 2 hét alatt kialakuló, legalább 17 hétig tartó védettség várható (Ingelvac Circoflex, Boehringer Ingelheim, használati utasítás).

Egy, a közelmúltban megjelent magyarországi felmérés során a 2011/2012-ben vizsgált 52 sertéshízlaló telep 92,5%-a, és a 2013/2014-ben vizsgált 15 nagylétszámú sertéstelep 100%-a bizonyult PCV2-fertőzöttnek. Az első felméréskor a telepek 75%-a vakcinázott PCV2 ellen, általában három hetes korukban oltva a malacokat. A későbbi felmérés során a telepek 86,6%-a vakcinázott, a leggyakrabban szintén három hetes korban, de az ekkor történő vakcinázások aránya a korábbi 77,5%-ról 62,5%-ra csökkent, és elterjedt (30,8%) a hat, vagy hét hetes korban történő immunizálás (Ózsvári és Búza, 2015).

Kínában, az Európában használatos vakcinák közül csak az Ingelvac Circoflex használata engedélyezett, azonban ennek 2009-es bevezetése óta összesen 16 gyártótól további 5-féle PCV2 törzset tartalmazó inaktivált vakcina került forgalomba, amelyek közül három a PCV2b-, egy a PCV2d- és egy a PCV2a-genotípusba tartozik (Zhai és mtsai., 2014). Ez azért érdekes, mert a PCV2 a DNS-vírusokhoz képest nagy mutációs rátával rendelkezik (Firth és mtsai., 2009), ezért gyorsan tud reagálni a folyamatosan változó szelekciós nyomásra, jelen esetben újabb és újabb vakcinatörzsek használatának bevezetésére, ez tovább bonyolítja a PCV2 filogenetikáját.

A malacok és a kocák immunizálásán kívül még létjogosultsága lehet a kanok vakcinázásának is. Erre a célra még egy PCV2 vakcinát sem engedélyeztek. Megfontolandó tényezők ezekben az esetekben, hogy ugyan van PCV2 a spermában, ez nem mindig fertőzi a kocákat, valamint, maga az oltás okozta stressz, esetleg az oltás helyén kialakuló helyi gyulladás csökkentheti a spermatogenezist, ezáltal kevesebb, vagy rosszabb minőségű sperma előállítását kockáztatjuk. Egy tanulmányban sem az inaktivált, sem az aleggységvakcina nem rontotta a sperma minőséget, viszont egy-egy kanban a kezelés által kiváltott stressz átmeneti hőmérséklet-emelkedést okozott mind az egyik vakcinával, mind a placebóval oltott csoportban (Caspari és mtsai., 2014). Fertőzött kanokban a vakcinázás csökkentette a spermával ürített PCV2 mennyiségét (Madson és Opriessnig, 2011; Opriessnig és mtsai., 2011).

Az engedélyezett vakcinákon kívül számos, még kísérleti fázisban lévő vakcinajelölt áll fejlesztés alatt, például PCV2 kapszidfehérjéjét expresszáló rekombináns adenovírus (Wang és mtsai., 2007), rekombináns Aujeszky-féle betegség vírusával előállított PCV2 VLP-k (Chi és mtsai., 2014), egy 20 aa hosszúságú ragadós száj-és körömfájás vírus fehérjeépítópót tartalmazó rekombináns PCV2 (Huang és mtsai., 2014), PCV2-kapszidot, interleukin-18 fehérjét és *Streptococcus equi* ssp. *Zoopidemicus* antigént előállító rekombináns sertéshimlő vírus (Lin és mtsai., 2014). *Saccharomyces cerevisiae* (Bucarey és mtsai., 2014) és *Pichia pastoris* (Silva és mtsai., 2014) élesztőfajokban is sikerrel termeltek PCV2-kapszidfehérjét vakcinafejlesztési céllal.

7. ANYAG ÉS MÓDSZER

7.1. A PCV2-EPITÓPOT EXPRESSZÁLÓ REKOMBINÁNS CMV LÉTREHOZÁSA ÉS IMMUNOGENITÁSÁNAK VIZSGÁLATA

7.1.1. Egérkísérlet a CMV gasztrointesztinális túlélésének vizsgálatára

A legelső kísérletben arra voltunk kíváncsiak, hogy a CMV virionok használhatóak-e vektorként szájon át történő immunizálásra, és, hogy az antigének a gasztrointesztinális rendszerben uralkodó fizikokémiai és biológiai körülményeket túlélve jelentősebb szerkezeti károsodások nélkül elérnek-e azon limfoid szövetekhez, ahol immunválasz kialakulását tudják kezdeményezni. Ebből a célból egér–etetési kísérletet végeztünk.

Ebben a kísérletben és a dolgozatban szereplő összes további állatkísérletben szem előtt tartottuk a Szent István Egyetem állatkísérletekre vonatkozó irányelveit és a 2010/63/EU irányelvet. A használt protokollokat a Szent István Egyetem Állatkísérleti Etikai Bizottsága és a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal (2012 óta: Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal) Állat-egészségügyi és Állatvédelmi Igazgatósága jóváhagyta (engedélyszám: 22.1/1020/3/2010). Az állatokat folyamatosan megfigyeltük a kísérletek teljes időtartama alatt és mindent megtettünk az állatok szenvedésének minimalizálása érdekében.

7.1.1.1. A kísérleti elrendezés

A kísérlet során 40 egyed, 8 hetes, nőstény, meghatározott patogénektől mentes (specified pathogen free, SPF) egeret használtunk fel (CRL: NMRI BR, Charles River, USA), melyeket a ToxiCoop Kft-től szereztünk be. Az állatokat a SzIE ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékének kísérleti állatházában tartottuk, csoportonként külön dobozokban.

Az állatokat 6 csoportra osztottuk. Az első, negatívkontroll-csoport (n=5) egerei semmilyen kezelésben nem részesültek. A második csoport egereinek (n=5) 1 g dohánylevélből (*Nicotiana benthamiana*) Lot és mtsai. (1972) szerint, a levelek homogenizálása után szukróz-grádiens-, majd többszöri ultracentrifugálással kivont, vad típusú CM-vírust hasüregbe oltva adtunk be, ez körülbelül 0,7 mg virionnak felel meg. A növényvírus szaporítását és kivonását Dr. Salánki Katalin, a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont tudományos főmunkatársa végezte. A harmadik csoportban (n=5) és a negyedik csoportban (n=10) minden egér egyedenként 1 g levél kivonatát kapta

szájon át. Az ötödik (n=5) és a hatodik (n=10) csoportok egereinek négyszer ennyi, állatonként 4 g levél kivonatát (körülbelül 2,8 mg CMV-virion) adtuk be *per os*. Ahhoz, hogy biztosítsuk a teljes vírusadag bevitelét, az etetéseket egérgyomorszonda használatával végeztük. Minden oltást és szájon át történő immunizálást 14 nap elteltével megismételtünk. Az első immunizálások időpontjában (0. nap), majd hetente vérmintát vettünk a belső szemzúgból az első, a második, a harmadik és az ötödik csoport egereiből. A vérmintákat szobahőmérsékleten hagytuk megalvadni, majd 3000 xg-n 5 percig centrifugáltuk és a szérumot leszívtuk, majd felhasználásig –20 °C-on tároltuk. A negyedik és a hatodik csoportban csoportonként 5 egér életét kioltottuk a kísérlet 14. napján, majd a 28. napon az összes egeret extermináltuk. A negyedik és a hatodik csoportok egereiből bélfolyadékot gyűjtöttünk a csípőbelet 0,5 ml foszfát-pufferolt sóoldatban (phosphate buffered saline, PBS) eldörzsölve, amit felhasználásig –20 °C-on fagyasztottunk. A kísérleti elrendezést az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat. Az egéretetési kísérlet elrendezése. Rövidítések: v: vérminta vétel, i.p.: intraperitoneális, p.o.: per os

	1. csoport	2. csoport	3. csoport	4. csoport	5. csoport	6. csoport
egyedszám	5	5	5	10	5	10
0. nap	v	1 g levél-kivonat, i.p. v	1 g levél-kivonat, p.o. v	1 g levél-kivonat, p.o.	4 g levél-kivonat, p.o. v	4 g levél-kivonat, p.o.
7. nap	v	v	v		v	
14. nap	v	1 g levél-kivonat, i.p. v	1 g levél-kivonat, p.o. v	5 egér: 1 g levél-kivonat, p.o. 5 egér: euthanázia, bélminta	4 g levél-kivonat, p.o. v	5 egér: 4 g levél-kivonat, p.o. 5 egér: euthanázia, bélminta
21. nap	v	v	v		v	
28. nap	euthanázia v	euthanázia v	euthanázia v	5 egér: euthanázia, bélminta	euthanázia v	5 egér: euthanázia, bélminta
vizsgálat	IgG	IgG	IgG	IgA	IgG	IgA

7.1.1.2. A CMV-specifikus ellenanyagok kimutatása és mérése

A szérum- és bélfolyadékminták ellenanyag-tartalmát indirekt ELISA- (enzyme-linked immunosorbent assay) teszttel mértük. A 96 lyukú mikrotiter lemezeket (Enzy-Plate, Propilén Kft.) vad típusú, az említett módon, fertőzött levelekből kitisztított CMV-antigénnel érzékenyítettük a következő módszerrel: a tisztított virionokat PBS-ben 20 mg/ml-re hígítottuk és 1% nátrium-szarkozinát (Sigma-Aldrich) oldatot kevertük hozzá, majd

lyukanként 100 µl-t a lemezre mértünk, ezután egy éjszakán át nedves kamrában 4 °C-on inkubáltuk. Másnap a lemezeket háromszor mostuk lyukanként 150 µl, 0,05 % Tween 20-at tartalmazó PBS-sel. A mosás után a lemezeket lyukanként 100 µl, 0,05% Tween 20-at és 1% szarvasmarha-szérumalbumint (bovine serum albumine, BSA) tartalmazó PBS-sel blokkoltuk 1 órán keresztül, nedves kamrában, szobahőmérsékleten. Újabb háromszori mosást követően a mintákat oszloponként felező hígítási sorban a lemezre mértük. A hígításokat szérumminták esetén 1:50, bélfolyadékmintáknál 1:2 arányú hígításokkal kezdtük. A hígításhoz a blokkoló oldatot használtuk. A lemezeket háromszor mostuk, majd a szérummintákat tartalmazó lyukakban a kötődött IgG-ellenanyagokat lyukanként 100 µl, egér-IgG-specifikus, tormaperoxidázzal (horse radish peroxidase, HRPO; Sigma-Aldrich) jelölt konjugátummal detektáltuk, 1:1000-es hígításban, 1 órán keresztül, szobahőn. A bélfolyadékmintákból az IgA-antitesteket hasonló módon, HRPO-val jelölt egér IgA specifikus konjugátummal (Sigma Aldrich) mutattuk ki, 1:500-as hígítást alkalmazva.

Háromszori mosás után utolsó lépésként hozzáadtuk a szubsztrát és kromogén keveréket. Ehhez 10 µg tetrametil-benzidin port 1 ml dimetil-szulfoxidban oldottunk fel, hozzáadtunk 9 ml citrát puffert és 3 µl hidrogén-peroxidot. Az oldatból lyukanként 100 µl-t mértünk a lemezekre, majd 20 percig sötétben tároltuk. Egy minta azon legnagyobb hígítását tekintettük a titerértéknek, ahol még kék színreakció megjelent.

7.1.2. A PCV2 virion szerkezetének meghatározása és epitópok azonosítása

A PCV2-kapszid szerkezetének meghatározását és háromdimenziós modellezését Dr. Gellért Ákos, a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézetének tudományos főmunkatársa végezte az AAC35310 genbanki azonosító számú PCV2 ORF2-szekvencia alapján. A cap szerkezetének meghatározása az I-TASSER program használatával történt. A PCV2 cap pentamer összeállítása a Symmdock programmal készült, a modell további szerkezeti finomítása pedig a Schrödinger Suite programcsomaggal. A grafikai modellek megrajzolása a VMD 1.9-es verziójával, a pentamerekből a teljes kapszid összeállítása pedig a VIPERdb Oligomer Generator nevű alkalmazásával történt (Gellért és mtsai., 2012).

A protektív immunitás kiválásáért valószínűsíthetően felelős epitópok kiválasztását a létrehozott háromdimenziós grafikai modell alapján vizuálisan végeztük, a szakirodalomban addig elérhető adatok figyelembevételével.

A rekombináns CMV előállítás előtt annak megjósolt háromdimenziós modellje is elkészült a fent említett programok segítségével.

7.1.3. A rekombináns CMV előállítás

7.1.3.1. A PCV2-epitópok expressziója a CMV-virionok felszínén

A rekombináns, grafikai modellezés alapján kiválasztott PCV2-epitópot felszínén expresszáló uborka-mozaikvírust Dr. Salánki Katalin állította elő, ennek menetét röviden áttekintem (részletesen: Gellért és mtsai., 2012). A CMV három részből álló RNS-genomja külön-külön plazmidokban, DNS-re átírt formában (pR1, pR2 és pR3 klónok) korábbról rendelkezésre álltak (Salánki és mtsai., 1997). A PCV2 epitóp kifejezéséhez csak a CMV CP-fehérjéjét kódoló gén, így csak a pR3 plazmid módosítására volt szükség, ezt polimeráz láncreakció- (polymerase chain reaction, PCR-) alapú mutagenézis segítségével állítottuk elő. A használt primerek a PCV2 224–233 epitóp inzerciójához a következők voltak:

R3/131PCV224-233 F: 5'-GGG **GGA TCC ACC ACT AAA ACC** ATC CGA TCT TTC CGT CGC CG-3'

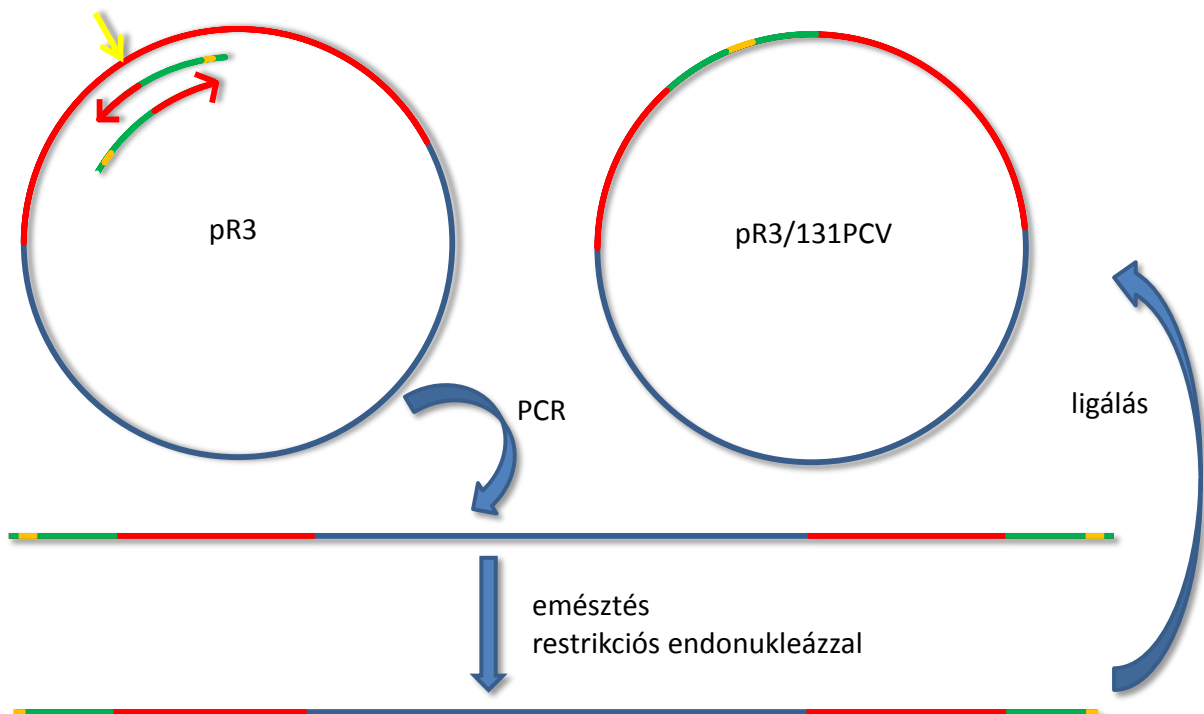
R3/131PCV224-233 R: 5'-GGG **GGA TCC** TTA AGT TGA ATC CTG AAG GTA CTT TCC GAA CTG TAA CCC-3'

A PCV2 126–145 epitóp beillesztése a következő primerek segítségével történt:

R3/131PCV126-145 F: 5'-GGG **TAC GTA CGA CCC ATA TGT AAA CTA CTC** ATC CGA TCT TTC CGT CG-3'

R3/131PCV126-145 R: 5'-GGG **TAC GTA** AGT GCT GTT GCT TTA GTG ACA AAG TTA TCG TCT CCT GAA AGG TA CTT TCC GAA CTG T-3'

Az aláhúzott rész az első esetben *Bam*HI, a második esetben *Sna*BI hasítási helyet, a félkövér kiemelés a PCV2 epitópra jellemző részt jelölik. A PCR után a termékeket a megfelelő restrikciós endonukleázzal emésztve és ligálva az eredmény olyan plazmid lett, ami a CMV CP génjében a 131. aminosavnak megfelelő helyen a kiválasztott PCV2 epitóp DNS kódját tartalmazta (**4. ábra**), ezt szekvenálással ellenőriztük.



4. ábra. A PCR alapú mutagenezis. Piros színnel a CMV RNS3-eredetű szakaszt jelöltük. A használt primereket nyilak képviselik. Piros színnel a CMV CP-specifikus, zöld színnel a PCV2 inzert-specifikus szakaszokat jelöltük. A restrikciós endonukleáz hasítási helyeket narancssárga színnel, a használt inzerciós helyet citromsárga nyíllal jelöltük. pR3: a CMV-eredetű RNS3 DNS másolatát tartalmazó plazmid, pR3/131PCV: A PCV-eredetű építő DNS kódját tartalmazó plazmid. Az ábra nem méretarányos.

A pR1, pR2, vad típusú pR3, a pR3/131PCV126-145 és a pR3/131PCV224-233 plazmidokról T7 RNS-polimeráz (Fermentas) felhasználásával RNS-másolat készült, ezekből fertőzésenként és genomszegmentenként 2 µg-ot 50 ml, 50 mM-os és pH=8,6 kémhatású nátrium-foszfát pufferben feloldva fertőztük a három- (*N. tabacum cv. Xanthi*), vagy hatlevelű (*Nicotiana clevelandi*) stádiumban lévő dohányhajtásokat. Egy-egy növény csak egyféle R3 RNS-t tartalmazott, tehát a 3. PCV2 építőt tartalmazó rekombináns CMV esetén R1, R2, R3/131PCV126-145, az 5. építőt expresszáló CMV létrehozásához R1, R2, R3/131PCV224-233, a vad típusú CMV létrehozásához R1, R2, R3 RNS-ek kombinációjával transzfektáltuk a hajtásokat. A fertőzés során a fertőző RNS klónokat a levelekbe dörzsöltük.

Huszonegy nappal a fertőzést követően a szaporodó vírusokat RNS kivonás után Northern blot analízissel, valamint a fertőzött levelekből kivont rekombináns CMV-ből az RNS-t kitisztítva reverz transzkripció PCR-t követően szekvenálással is ellenőriztük.

7.3.2. A rekombináns CMV-virion felszínén megjelenő epitóp ellenőrzése

A létrehozott rekombináns CMV- (RCMV-) nanopartikulán az inzertált PCV2-epitóp megjelenését és helyes térszerkezetben történő kifejeződését ELISA-tesztel és Western blot-tal ellenőriztük.

7.1.3.2. A PCV2 epitóp kifejeződésének ellenőrzése Western Blot-tal

A vírusfehérjék méretének meghatározására poliakrilamidgél-elektroforézist (sodium dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS–PAGE) végeztünk. Az elektroforézishez Protean Mini Kit-et (BioRad) használtunk, a gél öntéséhez az ehhez tartozó gélöntő állványt és tartozékait vettük igénybe. A készlet körülbelül 83 mm széles, 70 mm magas és pontosan 1 mm vastag gélek öntésére alkalmas. A használt receptet 10%-os alsó és 5%-os felső gélhez a **2. táblázat** mutatja be. Az alsó gélhez egy gél esetén 6 ml, a felső gélhez 3 ml keveréket készítettünk elő, majd ezekből rendre 4,5 és 1,5 ml-t mértünk a gélöntő állványon az üveglapok közé. A készlettel öntött gélekben 10 mintazseb áll rendelkezésre.

2. táblázat. A 10%-os alsó gél és az 5%-os felső gél összetétele. Rövidítések: SDS: nátrium-lauril-szulfát, sodium dodecil sulfate; TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin; APS: ammónium-peroxo-diszulfát

Összetevő	Alsó gél (30 ml-hez)	Felső gél (10 ml-hez)
akrilamid (0,3 g/ml) és bisz-akrilamid (0,008 g/ml)	10 ml	1,67 ml
1,5 M Trisz puffer, pH=8,8	7,6 ml	–
0,5 M Trisz puffer, pH=4,7	–	2,5 ml
10% SDS	0,3 ml	0,1 ml
kétszer desztillált víz	11,5 ml	5,53 ml
TEMED	20 µl	5 µl
10% APS	0,4 ml	0,1 ml

A gélt megszilárdulás után a futtatókádba helyeztük, azt megtöltöttük futtató pufferrel (0,025 M Tris, 0,192 M glicin, 0,1% SDS) és zsebenként 20 µl mintát töltöttünk be. A mintákat előzetesen azonos térfogatú minta pufferhez kevertük (0,125 M, pH=6,8 Tris, 5% SDS, 10% merkaptó-etanol, 20% glicerin, 0,005% brómfenolkék), és 95 °C-on 10 percig inkubáltuk. A minták sorrendje a következő volt: Fehérjetömeg marker (PageRuler, Thermo Scientific, 5 µl), tisztított, vad típusú CMV, rekombináns CMV, PCV2-vel fertőzött PK-15-sejtenyészlet felülúszó, egy zseb üresen hagyva, majd ugyanez a sorrend mégegyszer. Az elektroforézis 120 V állandó feszültség mellett körülbelül 45 percig tartott (ameddig a brómfenolkék ki nem fut a gélből).

Az elektroforézis végeztével a gélt középen függőlegesen kettévágtuk, az egyik felét coomassie brillant blue (CBB–G250) festékkel egy éjszakán át festettük, másnap kivonó oldattal (víz, ecetsav és metanol 5:1:5 arányú keveréke) a festéket a gélből kivontuk.

A gél másik felét nitrocellulóz membránra (0,45 µm pórus méret, Biocenter) vittük át TransBlot félszáraz blottoló használatával (BioRad). A transzferhez 20% metanol tartalmú futtató puffert használtunk. A transzfer maximum 15 V feszültség mellett 45 percig tartott. A membránt ezután egy éjszakán át, 4 °C-on blokkoltuk 0,05% Tween 20-at és 1% BSA-t tartalmazó PBS-sel, majd háromszor 5 percig mostuk 0,05% Tween 20 tartalmú PBS-ben. Ezt követően 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk 1:500 hígítású hiperimmun poliklonális sertéssavóval (Cságola, 2009), ezután újabb háromszor 5 perc mosás következett. A kötődött ellenanyagokat 1:1000 hígítású, HRPO enzimmel jelölt anti-sertés IgG-konjugátummal (Sigma–Aldrich) detektáltuk, 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezután háromszori mosás következett, majd a szubsztrát (H₂O₂) és a kromogén (diamino–benzidin, DAB) hozzáadása. 1 DAB tablettát (Sigma–Aldrich) 15 ml, 7,5-ös pH-jú, 1 M-os Tris pufferben oldottunk fel, majd ehhez 12 µl hidrogén-peroxidot kevertünk. A membránt az egyértelmű színreakció megjelenéséig ebben az előhívó folyadékban áztattuk. A tesztet a kapott eredmény miatt 1:1000-es és 1:5000-es primer savó hígításokkal is megismételtük.

7.1.3.3. A PCV2-epitóp kifejeződésének ellenőrzése ELISA-val

Az ELISA-lemezt az első két, az 5. és a 6., valamint a 9. és 10. oszlopokban tisztított RCMV-virionokkal érzékenyítettük 1 mg/ml koncentráció 1:50-es hígításával kezdve és oszloponként függőlegesen felező hígítási sorban haladva. Negatív antigén kontrollként vad típusú CMV-t használtunk ugyanebben a hígításban, a 3. és 4., 7. és 8., végül a 11. és 12. oszlopokban. Az RCMV-virionok felszínén megjelenő PCV2-epitóp detektálására hiperimmun, poliklonális sertéssavót használtunk, (Cságola, 2009), amely PCV2-vírusantigénnel szemben ismerten legalább 1:10000-es titerértékű volt; az első oszlopban 1:100-as hígítással kezdve, felező hígítási sorban, vízszintesen haladva, úgy, hogy négy oszloponként az egyes antigén hígításokra azonos savóhígítás kerüljön. A kötődő PCV2-specifikus ellenanyagok kimutatására sertés-IgG-specifikus, HRPO-val jelölt konjugátumot használtunk 1:1000 hígításban (Sigma–Aldrich). Az ELISA-teszt egyéb, általános lépései megegyeztek a 7.1.2. pontban leírtakkal. A lemez elrendezését a **3. táblázat** mutatja be.

-

3. táblázat. Az ELISA-lemez beosztása. R: rekombináns CMV-antigént, C: vad típusú CMV antigént tartalmazó oszlopok.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Antigénhígítás
A	R	R	C	C	R	R	C	C	R	R	C	C	1:50
B													1:100
C													1:200
D													1:400
E													1:800
F													1:1600
G													1:3200
H													1:6400
Szérum hígítás	1:100				1:200				1:400				

A kapott eredmények a teszt megismétlését tették szükségessé a hiperimmun sertéssavó kimerítésével: a teszt elvégzését megelőzően az egyes savóhígításokat csak vad típusú CMV-vel érzékenyített lemezen inkubáltuk 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A lemez érzékenyítéséhez a CMV-antigén 1:50-es hígítását használtuk, a savó hígítások megegyeztek a tesztlemez esetében használtakkal. Az inkubálás után a savókat a már érzékenyített tesztlemez azonos lyukaiba mértük át, majd az előző bekezdésben leírt módon folytattuk az ELISA tesztet.

7.1.4. Egérkísérlet az RCMV immunogenitásának vizsgálatára

A PCV2 epitóp virionon való jelenlétének ellenőrzése után megvizsgáltuk, hogy képes-e olyan immunválaszt indukálni, amely erre az epitópra specifikus. Ehhez egéroltási kísérletet végeztünk, amelyben az antigént parenterális beadást követően teszteltük.

7.1.4.1. A kísérleti elrendezés

A kísérlet során 15, 8 hetes nőstény SPF-egeret (CRL: NMRI BR, Charles River, USA), rendeltünk a ToxiCoop Kft-től, ezeket 3 csoportra osztottuk. Az első csoport egereit (n=5) vad típusú CMV-vel immunizáltuk, a második csoport állatait a PCV(224-233) epitópot tartalmazó RCMV-vel. Az oltóanyagokat mindkét csoportban úgy kevertük össze, hogy azok egyedenként 10 µg virionot tartalmaztak 100 µl PBS-ben, ehhez 100 µl inkomplett Freund-adjuvánt (Sigma–Aldrich) adtunk és összevortexeltük. Az olajadjuváns az antigén-oldattal víz-az-olajban emulziót képez, és gyakran használják az ellenanyag-termelő plazmasejtek stimulálására. A harmadik, negatívkontroll-csoport állatait 100 µl PBS és 100 µl inkomplett Freund adjuváns keverékével oltottuk. Az oltásokat az összes egér esetében hasüregbe adtuk és 14 nap múlva megismételtük. Az állatokat újabb két hét elteltével humánus módon,

a szakma szabályai szerint extermináltuk és vérmintákat gyűjtöttünk, majd a szérumot a 7.1.1. pontban leírtak szerint szeparáltuk.

7.1.4.2. A PCV2-specifikus ellenanyagok kimutatása és mérése indirekt immunfluoreszcens módszerrel

A szérummintákban indirekt immunfluoreszcens (iIF) módszerrel vizsgáltuk és határoztuk meg a PCV2-specifikus ellenanyagok titerét. Antigénként rekombináns baculovírus segítségével előállított PCV2 cap-ot vettünk igénybe. A rekombináns baculovírus laboratóriumunkban rendelkezésre állt, Cságola Attila készítette el a BacPAK™ 25 Expression System (Clontech) segítségével a használati utasítás szerint.

Az iIF-teszthez lemezeket készítettünk a következő módon: 96 lyukú sejtenyésző lemezekre (Orange Scientific) lyukanként 200 µl, 10⁵/ml koncentrációjú Sf-9-(*Spodoptera frugiperda*) sejtet mértünk (2x10⁴ sejt/lyuk). A sejteket 10% magzati borjúsérumot (fetal bovine serum, FBS; FBS Gold, PAA Laboratories) tartalmazó Grace's medium (Gibco) tápfolyadékban növesztettük. A sejteket a leülepités után baculovírusal fertőztük, úgy, hogy egy sejtre körülbelül egy virion jusson. Egy 96 lyukú lemezen minden páratlan oszlop sejtjeit rekombináns, PCV2 kapszidot tartalmazó baculovírusal, minden második oszlop sejtjeit vad típusú baculovírusal fertőztük. A fertőzés után a lemezeket 27 °C-on nedves kamrában inkubáltuk 72 órán keresztül, majd a sejtekről a tápfolyadékot leöntöttük és lyukanként 200 µl fixáló folyadékkal (aceton és etanol 1:1 arányú keveréke) 10 percen keresztül fixáltuk. A fixáló folyadék leöntését követően a lemezeket körülbelül 30 percen át szobahőmérsékleten szárítottuk, majd felhasználásig -20 °C-on tároltuk. Ezzel a módszerrel olyan iIF-re használható lemezeket hoztunk létre, amelyek minden páratlan oszlopban lyukanként megközelítőleg azonos mennyiségű, fixált PCV2-antigént tartalmaztak, az Sf-9-sejtek sejtmagjában helyeződve, a baculovírusok szaporodásának megfelelően, míg minden második oszlopban csupán Sf-9-sejt és baculovírus-antigén volt megtalálható.

A savók teszteléséhez a lemezeket szobahőmérsékleten kiolvastottuk, majd 5 percen keresztül mostuk lyukanként 150 µl, 0,02% nátrium-azid tartalmú PBS-sel. Az egérszérum-mintákból felező hígítási sorokat készítettünk, 1:5-tel kezdve. A mintákat 1% BSA-t és 0,05% Tween 20-at tartalmazó PBS-ben hígítottuk és lyukanként 100 µl-t mértünk a lemezekre az egyes hígításokból, úgy, hogy egy-egy minta azonos hígításából két egymás melletti (például A1-es és A2-es) lyukba került. Ezután a lemezt nedves kamrában, 37 °C-on 1 órán keresztül inkubáltuk. A nem kötődő ellenanyagokat inkubálás után háromszor 5 percig mostuk le azidos PBS-ben, majd 1:1000-es hígítású, fluoreszcein-izotiocianáttal (fluorescein isothiocyanate, FITC) jelölt, anti-egér IgG konjugátumból (Sigma-Aldrich) lyukanként 100 µl-t mértünk a lemezekre. A másodlagos ellenanyaggal nedves kamrában, 37 °C -on, 1 órán

keresztül inkubáltuk a lemezeket. Ezután háromszor öt percig mostuk azidos PBS-sel, egyszer Evanskék-festékkel, utoljára pedig desztillált vízzel. Ekkor a lemezek készen álltak a fluoreszcens mikroszkóppal történő kiértékelésre. Az ultraibolya tartományú fényvel gerjesztett FITC almazöld színű (kb. 519 nm hullámhosszú) látható fényt bocsát ki. Azt a legnagyobb hígítást tekintettük egy minta PCV2-specifikus IgG-titerének, ahol még fluoreszcencia egyértelműen látható volt.

7.1.5. Immunizálási és fertőzéses kísérlet az RCMV hatékonyságának vizsgálatára sertésekben

A rekombináns CMV immunogenitásának egérkísérletben való igazolása után a célállatfajban, házi sertésben teszteltük a vakcinajelölt nanopartikulum hatékonyságát immunizálási, majd élő PCV2-törzsszel való ráfertőzéses kísérlettel.

7.1.5.1. A kísérleti elrendezés

A kísérleti állatok konvencionális, PCV2-mentes sertéstelepről származtak. A telepen a kocákat nem vakcinázták PCV2 ellen. Az állatok mentességét korábban iIF-teszttel igazoltuk (lásd 7.1.5.2.). A 13 malacot 2 hetes korukban választották és szállították át a SZIE ÁOTK Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékének állatházába. Két hét akklimatizálódás után, az első immunizáláskor az állatok négy hetes korúak voltak. A malacokat mindennapos megfigyelés alatt tartottuk.

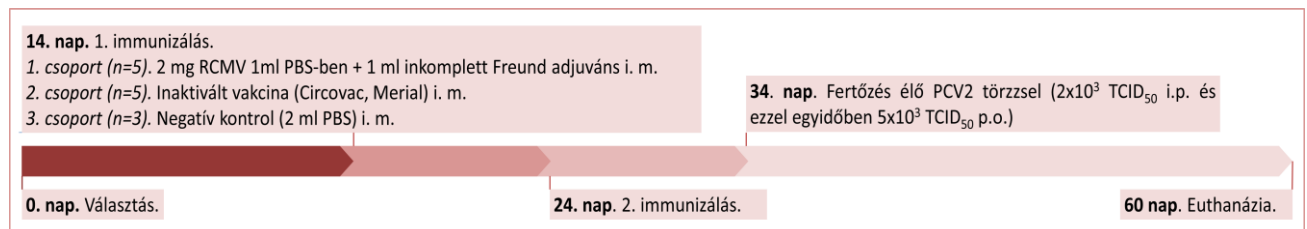
Az állatokat három csoportra osztottuk. Az első csoportban ($n = 5$) a malacokat rekombináns CMV-vel oltottuk izomba. Egy állat oltóanyag adagja 2 mg RCMV-nanopartikulát tartalmazott 1 ml-re kiegészítve PBS-sel, majd ugyanekkora térfogatú inkomplett Freund-adjuvánssal homogénre vortexelve. A második csoport állatai ($n = 5$) pozitív kontrollként szerepeltek és 2 ml inaktívált PCV2-vakcinát kaptak intramuszkulárisan (Circovac, Merial). A harmadik, negatívkontroll-csoport ($n = 3$) malacai egyedenként 1 ml PBS-t 1 ml Freund-adjuvánssal szuszpenzióban kaptak, izomba oltva. Az oltásokat 10 nap elteltével ismételtük.

A második immunizálás után 10 nappal a malacokat élő, R15-ös jelölésű PCV2 törzsszel fertőztük (Cságola, 2009), szájon át és hasüregbe oltva is. A szájon át történő fertőzéshez a vírusadagokat (5×10^3 TCID₅₀) kis mennyiségű takarmányba kevertük és egyesével etettük meg az állatokkal, hogy biztosítsuk a fertőző anyag maradéktalan felvételét. A hasüregbe 2×10^3 TCID₅₀ mennyiségű vírust injektáltunk.

A kísérlet 60. napján az állatokat általános anaesthesia alatt extermináltuk. A hullákat a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságának

bonctermeiben boncoltuk és részletes kórbonctani vizsgálatnak vetettük alá. A boncolás során szervmintákat vettünk a lépből, a szívből, a tüdőből, a bélfodri és a gátorközi nyirokcsomókból, a lágyéki nyirokcsomókból, a mandulákból, a májból és a vesékből.

A malacok állatházba érkezésük után, az immunizálás időpontjában, a ráfertőzéskor, majd további három alkalommal minden állatból vérmintát vettünk a *vena cava cranialis*ből, hogy azokból a PCV2-specifikus ellenanyagszinteket meghatározzuk. A vérmintákat szobahőmérsékleten hagytuk megalvadni, majd 3000 xg-n 5 percig centrifugáltuk és a szérumot leszívtuk. A szérumokat felhasználásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A ráfertőzés után heti kétszer bélsármintákat is gyűjtöttünk egyedileg, tampon segítségével, a PCV2-ürítés kimutatásának céljából, ezeket is $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztottuk. A kísérlet időbeosztását a könnyebb áttekinthetőség érdekében a **5. ábra** mutatja be.



5. ábra. A malac-immunizálások és a kísérleti fertőzés ütemezése.

7.1.5.2. Indirekt immunfluoreszcens vizsgálat a PCV2-specifikus ellenanyagok titerének meghatározására

A szérummintákból a PCV2-specifikus ellenanyagtiterek mérése az egéroltási kísérletben használt indirekt IF teszthez hasonlóan, a 7.4.2.-es pontban leírtak szerint történt, azzal a különbséggel, hogy a PCV2-antigénekhez kötődött ellenanyagok detektálására sertés-IgG-specifikus, FITC-cel jelölt konjugátumot (Sigma-Aldrich) használtunk. A minták felező hígítását 1:20 aránnyal kezdtük, így egy lemezen legfeljebb 1:2560 értékig tudtunk titert megállapítani. Azokban az esetekben, ahol ez a hígítás még mindig pozitív eredményt adott, a minta hígítását tovább folytattuk és külön lemezen mértük.

7.1.5.3. A PCV2-vírus DNS detektálása

7.1.5.3.1. DNS-kivonás a szerv-, szérum- és bélsármintákból

A DNS-kivonásra minden minta esetében az InnuPREP Virus DNA/RNA Kit vírus-nukleinsav-kivonó kit-et (Analytik Jena AG) használtuk, a használati utasításnak megfelelően. Röviden összefoglalva: a szervmintákból mintánként külön szikével körülbelül $0,5\text{ cm}^3$ nagyságú darabot vágunk ki és 1 ml kétszer desztillált vízben TissueLyser II

(Quiagen) használatával homogenizáltuk. A homogenizátumból 150 µl mennyiséget összekevertünk 450 µl lízispufferrel, 10 másodpercig vortexeltük, és 30 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. A szérumminták esetében 150 µl mintát kevertünk 450 µl lízispufferhez és 15 percig inkubáltuk szobahőn. A bélsár minták esetében a vattatampont a pálcáról levágva 15 percig áztattuk a 450 µl lízispufferben, szobahőmérsékleten. A lizátumot szervminták esetén 450 µl, a többi minta esetén 600 µl kötőpufferhez kevertük, amely a mintában lévő vírusnukleinsavat a kitben található centrifugálható oszlop szűrőrétegéhez köti.

Ezt követően a háromféle minta további feldolgozására használt protokoll megegyezett. A keverékből 650 µl-t az oszlopra mértünk, majd 10000 xg-n 1 percig centrifugáltuk. A szűrletet kiöntöttük, és a maradék lizátum-kötőpuffer keveréket is az azonos mintához használt oszlopra mértük, majd újra 1 percig centrifugáltuk 10000 xg gyorsuláson. A szűrőre kötődött vírusnukleinsavat ezután egymás után kétszer mostuk etil-alkohol tartalmú mosópufferrel. A mosáslépések szintén 10000 xg-n, egy-egy percig történtek. A szűrletek elöntése után az oszlopokat üres gyűjtőcsőben 10000 xg-n 2 percig szárítottuk a maradék alkohol eltávolítására. A szűrőre kötött nukleinsavat ezután mintánként 60 µl, kétszer desztillált vízzel történő egy perces inkubálás után mostuk le 6000 xg-n, 1 perc centrifugálással. Az így kitisztított DNS-mintákat -20 °C-on tároltuk a PCR elvégzéséig.

7.1.5.3.2. Valós idejű PCR

A mintákban a PCV2-DNS-t valós idejű (real-time) PCR-rel mutattuk ki. Ehhez saját tervezésű primereket és TaqMan probe-ot használtunk. A primerek és a probe tervezését online programmal végeztük (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>), az R15-ös törzs cap-gén szekvenciája alapján és a Macrogen Europe Inc.-től rendeltük meg. A szekvenciák a következők voltak:

KCV-F: 5'-AAGTAGCGGGAGTGGTAGGA-3'

KCV-R: 5'-GGGCTCCAGTGCTGTTATTC-3'

KCV-P: 5'FAM-TCCCGCCATACCATAACCCAGC-3'BHQ1

Az egyes reakciókat úgy állítottuk össze, hogy a mintánként: 50 µl reakcióelegy 36,3 µl kétszer desztillált vizet, 5 µl DreamTaq puffert (Thermo Scientific), 1 µl (0,5 mM) MgCl₂-t (Thermo Scientific), 1 µl (0,2 mM) dNTP keveréket (Thermo Scientific), 0,2 µl (1 egység) DreamTaq polimerázt (Thermo Scientific) és 1-1 µl-t (0,2 µM) tartalmazott mindkét primerből és a probe-ból. 5 µl kivont DNS mintát tettünk minden reakcióhoz. A PCR-eket Mastercycler Realplex thermocycler (Eppendorf) gépben végeztük az alábbi programmal:

- előmelegítés: 94 °C, 2 perc,
- 30 cikluson keresztül: denaturáció: 94 °C, 30 s,
primer tapadás: 60 °C, 30 s,
láncosszabbítás: 72 °C, 45 s,
- hűtés 25 °C-ra.

Standardként PCV2 ORF2-t tartalmazó pET6xHN plazmidot használtunk. A PCR-módszer érzékenységének meghatározásához a plazmid-DNS kópiaszámát NanoDrop 2000 spektrofotométer segítségével megmértük, azután 10^8 kópia/μl koncentrációtól kezdődő, 10^1 kópia/μl-g terjedő, 10-es alapú hígítási sort készítettünk, majd minden hígításból kétszer elvégeztük a PCR-reakciót.

7.1.6. Az RCMV orális immunogenitásának vizsgálata sertésekben

Az eddigi állatkísérletek eredményei alapján olyan sertésetetési kísérletet terveztünk, amelynek segítségével vizsgálni tudjuk az RCMV gasztrointesztinális ellenállóképességét és orális immunogenitását a célállatfajban, a házi sertésekben.

A kísérlethez egy alom konvencionális, négy hetes, frissen választott malacot használtunk, két, 5–5 egyedből álló csoportra osztva őket. Az állatok ugyanarról a telepről származtak, mint a 7.1.5. fejezetben leírt, immunizálási és fertőzéses kísérlet esetében.

Az első csoport állatai a kísérlet nulladik napján, majd ezt követően egy, két és három héttel, egyedenként és alkalmanként 50 mg tisztított RCMV-t kaptak szájon át, kis mennyiségű takarmányba keverve, azt egyedileg, maradéktalanul feletetve. Állatonként ez négy hét alatt összesen 200 mg RCMV-virion orális bevitelét jelentette. A második csoport állatait nem kezeltük.

A kísérlet kezdetekor és az immunizálások időpontjában, végül az utolsó immunizálás után egy héttel minden állattól vérmintát vettünk az elülső üresvénából és a szérumot szeparáltuk. A szérummintákból PCV2-specifikus IgG-ellenanyag mennyiségi meghatározását végeztük, a 7.1.4.2. és a 7.1.5.2. bekezdésben részletezett iIF-módszer segítségével.

7.2. A PCV2 KAPSZIDFEHÉRJE ELŐÁLLÍTÁSA REKOMBINÁNS *THALASSIOSIRA PSEUDONANA* MIKROALGÁBAN

7.2.1. A PCV2 ORF2-génjének megtervezése

A kereskedelmi forgalomban elérhető PCV2 vakcinához hasonlóan a teljes ORF2-t expresszázó, takarmányba keverhető antigén létrehozására is kísérletet tettünk, e célból rekombináns mikroalgatörzs elkészítését tűztük ki célul. Az előállítandó fehérje aminosavsorrendjét úgy terveztük meg, hogy az Európában előforduló PCV2-változatokat reprezentálja. A hazánkban és Európában azonosított PCV2b 1A genotípusú vírusok konszenzus szekvenciáját a MEGA 5 programmal készítettük el. Ehhez felhasználtunk 5 szlovákiai (Slo2, Slo3, Slo4, Slo5, Slo6; Lőrincz, 2014), 3 romániai (2rom, 3rom, ROM; Lőrincz, 2014), 7 horvátországi (HQ591378, HQ591375, HQ591371, HQ591370, HQ591365 genbanki azonosító számú szekvenciák, 651., 642. számú minták; Lőrincz, 2014), 2 szerbiai (17Szerb, 18Szerb; Lőrincz, 2014), egy magyarországi (AY256457 GenBank hozzáférési számú szekvencia), egy portugáliai és végül 2 franciaországi (HQ831538, AY321998, AY321997 genbanki számú) szekvenciát. Az így megtervezett ORF2 bázissorrendjét a *T. pseudonana* kodonpreferenciáinak megfelelően optimalizáltattuk, 5' vége elé attB1 (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTA) 3' vége után közvetlenül attB2 (TACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC) rekombinációs helyeket inzertáltunk, a stop-kodont elhagytuk és a gént szintetizáltattuk. A kodonoptimalizálást és a gén szintézisét a Genscript USA Inc. végezte.

7.2.2. A PCV2 ORF2-génjének klónozása és az alga expressziós vektor előállítása

A munka innentől kezdve a Scripps Óceánográfiai Intézet (Scripps Institution of Oceanography, University of San Diego, San Diego, USA) tengerbiológiai laboratóriumában, Dr. Mark Hildebrand irányításával zajlott.

A szintetizált PCV2-ORF2-gént kanamycinrezisztencia-génnel ellátott pUC plazmidban szállították ki (pUC_PCV2). A kodonoptimalizált ORF2-szekvenciát az expressziós plazmidba a helyspecifikus rekombináción alapuló Gateway technológia (Invitrogen, USA) használatával ültettük át. A módszer bakteriofág-eredetű enzimek keverékét használja fel, amelyek bizonyos szekvenciák pontos felismerésére és a közöttük lévő DNS-szakaszok kicserélésére (helyspecifikus rekombináció) képesek. Ezeket a DNS-szakaszokat „att” helyeknek, az enzimeket pedig klonázoknak nevezzük. A BP-klonáz enzimkeverék attB1 és attB2 helyeket ismer fel, a közöttük lévő szakaszt egy másik DNS-molekula attP1 és attP2 szakaszai közé épített DNS-darabra cseréli ki. A csere során az attP-helyek attL-

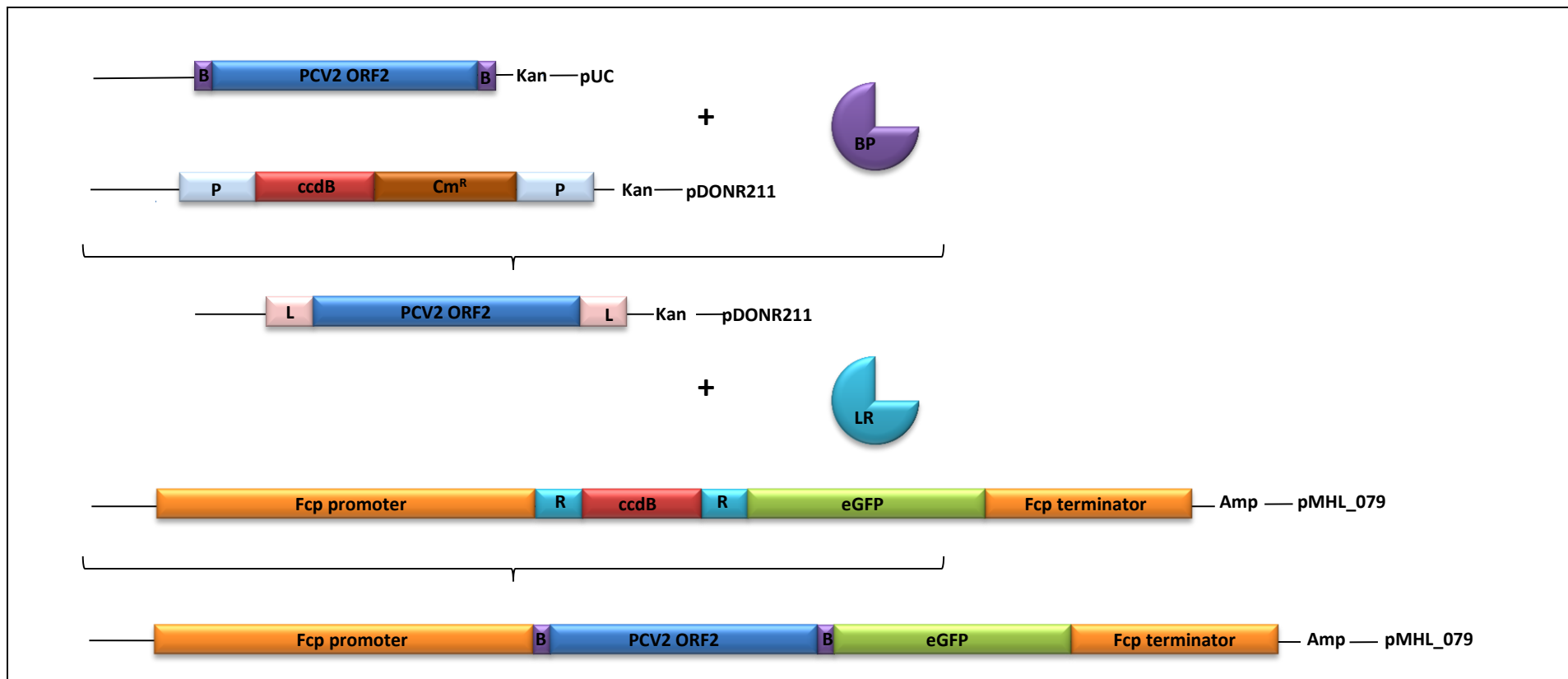
szekvenciájú helyekké alakulnak, ezeket az LR-klonáz keverék enzimei ismerik fel, amelyek az itt található gént attR rekombinációs helyek által határolt szakaszra váltják.

A 4 µg liofilizált plazmidot 40 µl TE-pufferben (Invitrogen, USA) vettük fel, így a DNS töménysége 100 ng/µl lett. A gént ezután attP rekombinációs helyeket és kanamycinrezisztencia-gént tartalmazó pDONR221- (Invitrogen, USA) vektorba helyeztük át BP-reakció segítségével, majd attR-helyeket és ampicillinrezisztencia-gént magában foglaló, pBluescript vázú pMHL_079 expressziós vektorba LR-reakció használatával. A klónozás menetét a **6. ábra** foglalja össze. A reakció keveréket a következő módon állítottuk össze: 0,5 µl pUC_PCV2-plazmidot 0,5 µl (75 ng) pDONR221-vektorral és 0,5 µl (50 ng) pMHL_079-plazmiddal kevertünk össze és TE-pufferrel 3 µl-re egészítettük ki, majd ehhez 1 µl BP-klonáz és 1 µl LR-klonáz enzimkeveréket (Invitrogen) adtunk hozzá. Az elegyet 25 °C hőmérsékleten, száraz blokkban egy éjszakán át inkubáltuk, a reakciót 0,5 µl proteináz K (Thermo Scientific) hozzáadásával 37 °C-on 10 percig inkubálva állítottuk le.

A reakció leállítása után a teljes keverékkel 25 µl OneShot Mach1 (Invitrogen) kemikompetens *E. coli* sejtet transzformáltunk: A sejtek és a DNS keverékét 30 percen át jégen inkubáltuk, majd 30 s-re 42 °C-os vízfürdőbe helyeztük, ezután 2 percig jegeltük és 125 µl Super Optimal Broth médium hozzáadása után 1 órán át 37 °C-on, 220/perc fordulatszámmal ráztattuk. A rázatás után a baktériumokat 50 µg/ml ampicillin tartalmú, 1,5% bakteriológiai agarral (Sigma) készült LB táptalajra szélesztettük. A táptalajokat egy éjszakán át 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk. A táptalajon csak az ampicillinrezisztencia-gént tartalmazó pMHL_079 plazmiddal transzformált sejtek voltak képesek telepet formálni. A PCV2-ORF2-inzertet nem tartalmazó pMHL_079-konstrukcióval transzformált sejteket a termelődő ccdB-toxin megakadályozta a növekedésben. A ccdB-toxin-gén az azt tartalmazó plazmidokkal transzformált sejtek negatív szelekciójára alkalmas, mert olyan fehérjét kódol, ami a DNS-giráz enzim működését blokkolva megakadályozza a baktérium-sejtek szaporodását. Előállításra olyan baktériumsejtekben lehetséges, amelyek az antidótumát (ccdA) kódoló gént is expresszálják.

A kinőtt telepekből másnap 3 ml térfogatú, 50 µg/ml ampicillin tartalmú LB-leves-kultúrákat készítettünk, ezeket egy napig 37 °C-on ráztattuk, majd a sejtekből a plazmidokat PureLink Quick Plasmid MiniPrep Kit-tel preparáltuk a gyártó (Invitrogen) használati utasítása szerint: az *E. coli* sejteket pelletálás után 250 µl reszuszpendáló folyadékban oldottuk fel, ehhez 250 µl lízispuffert adtunk, összekevertük és 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Ezt követően 350 µl precipitáló pufferrel ráztuk össze, majd 13000 xg gyorsulással 10 percig centrifugáltuk. Ezt követően a felülúszót leszívtuk és DNS-kötő szűrőt tartalmazó oszlopra pipettáztuk, majd 13000 xg-n 1 percen át centrifugálva a DNS-t a membránra kötöttük. A membránt kétszer mostuk etanol tartalmú mosópufferrel. A csöveket a mosások között, majd 1 percig üresen is centrifugáltuk 13000 xg-n. A membránon 75 µl

TE-puffert inkubáltunk 1 percig, majd a DNS-t egy utolsó centrifugálással eluáltuk. A kapott plazmidkoncentrációt Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) spektrofotométerrel mértük. A plazmidpreparátumokat szekvenálással ellenőriztük (SGI-DNA, La Jolla, USA) és felhasználásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztottuk.



6. ábra. A Gateway klónozás menete. A „pUC”, „pDONR211” és a „pMHL_079” a résztvevő plazmidok egyszerűsített ábráit jelölik. A „B”, „P”, „L” és „R” betűk a megfelelő att rekombinációs helyeket jelentik. A BP klonáz enzimkeverék („BP”) az attB és attP helyeket, az „LR” klonázkeverék (LR) az attL és attR helyeket ismeri fel. A „Kan” és az „Amp” rövidítések kanamycin- és ampicillinrezisztencia-géneket jelentenek. A plazmidokon az alábbi DNS-szakaszokat emeltem ki: „PCV2 ORF2” (kodon optimalizált PCV2-ORF2-szakasz), „ccdB” (bakteriális toxin gén, az ezzel ellátott plazmidokat tartalmazó baktériumok negatív szelekcióját teszi lehetővé). „Cm^R” (klóramfenikol rezisztencia gén), „Fcp promoter” és „Fcp terminator” (*T. pseudonana* és más algafajokban erős génexpressziót lehetővé tévő DNS szakaszok), „eGFP” (kodonoptimalizált zöld fluoreszcens fehérje génje). Az ábrán a klonázreakciók során keletkező melléktermékeket a könnyebb áttekinthetőség érdekében nem jelöltük.

7.2.3. A *T. pseudonana* sejtek transzformálása

Az elkészített expressziós vektort mikroalgasejtekbe vittük be biolisztikus módszerrel.

7.2.3.1. A *T. pseudonana* növesztése és a sejtek előkészítése

A vad típusú *T. pseudonana* kultúrák (CCMP1335) a laboratóriumban rendelkezésre álltak. A mikroalgasejteket mesterséges tengervízben (artificial seawater, ASW) növesztettük (Darley és Volcani, 1969; 1971) 1 ng/l biotinnel és ugyanennyi B₁₂-vitaminnal, valamint 100-100 µg/ml penicillinnel és streptomycinnel kiegészítve. Az 50 ml térfogatú kultúrákat folyamatos megvilágításban, 16–18 °C közötti állandó hőmérsékleten, 200/perc fordulatszámú rázással növesztettük. Az exponenciális növekedési fázisban lévő (1–2 × 10⁶ sejt/ml) mikroalgából agarlemezenként 10⁸ sejtet 10 percen keresztül 3000 xg-n pelletáltunk, 100 µl ASW-ben reszuszpendáltunk és agarlemez közepére szélesztettük 6 cm átmérőjű körben. A sejtek számolásához Muse® Cell Analyzer mini áramlásos citométert (Millipore) használtunk. Az agartáptalajt ASW-rel és 1,5% bakteriológiai agarral (Sigma) készítettük. A lemezekre szélesztett sejteket másnap transzformáltuk.

7.2.3.2. A DNS hordozóra kötése

A PCV2-kapszid gént tartalmazó alga expresszió plazmid-konstrukciót (pMHL_079_cap) 1,1 µm átmérőjű volfrám (W) mikokarrier részecskékre (Tungsten M17, BioRad) kötöttük. A W-partikulákból 30 mg-ot 500 µl etil-alkoholban vettünk fel, majd fél percen keresztül 13000/perc fordulatszámon pelletáltunk, ezután két percen át vortexeltük és újra pelletáltuk. A felülúszó leöntése után a W-pelletet 250 µl steril vízzel háromszor mostuk, végül 150 µl steril desztillált vízben reszuszpendáltuk. Ezt folyamatos vortexelés közben 50 µl-es adagokra osztottuk szét.

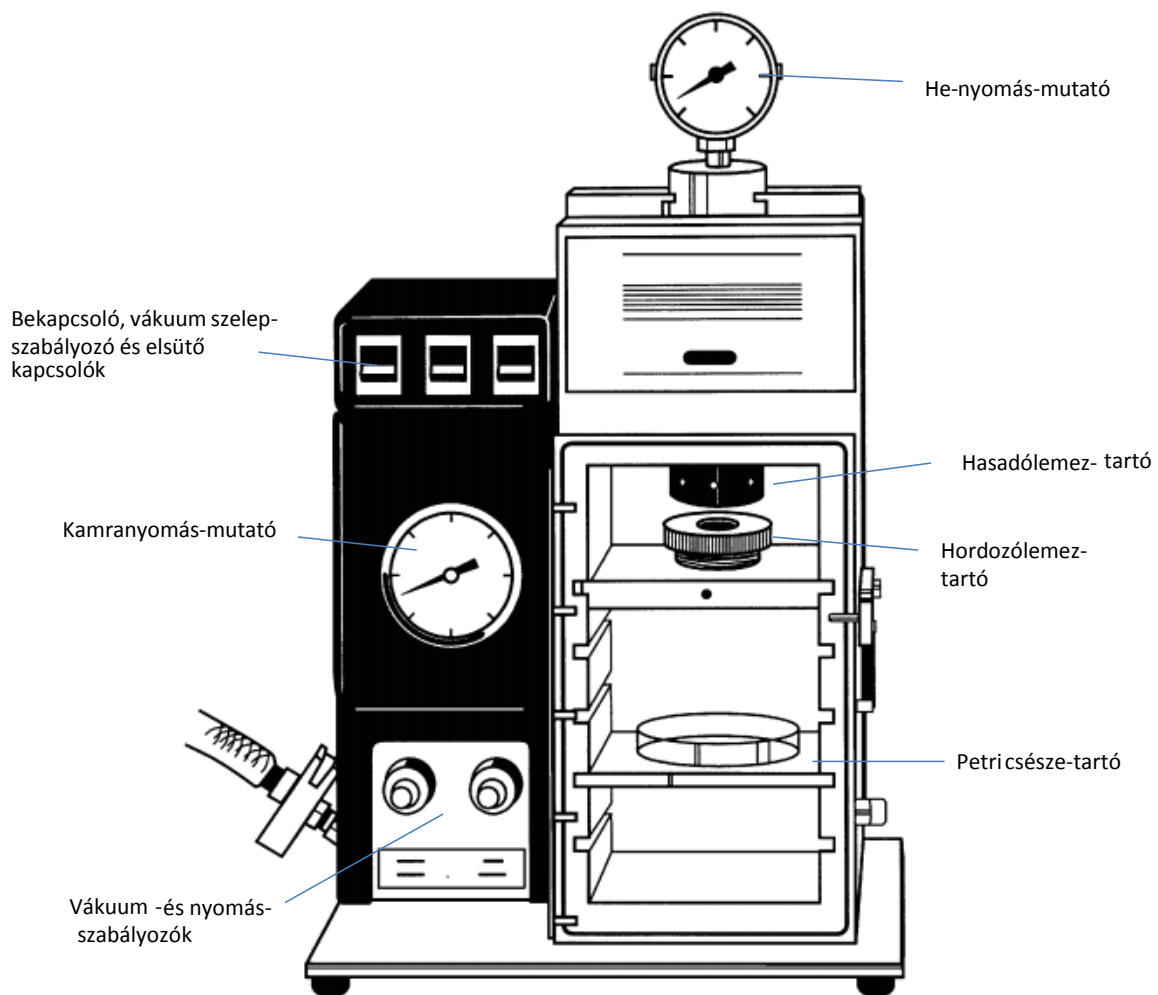
A transzformált *T. pseudonana* sejtek szelekciójának érdekében a pMHL_079_cap-plazmiddal egyidejűleg nourseothricin- (NAT) rezisztencia-gént expresszáló vektort is a hordozó részecskékre kötöttünk. A használt plazmid (pTpNAT) pBluescript SK II vázat és *fc*p-promótort tartalmazott (Poulsen és mtsai., 2006). Pozitív kontrollnak a szintén rendelkezésre álló, csak kodonoptimalizált eGFP-t expresszáló pMHL_079_GFP plazmidot használtunk.

A részecskére kötéshez a plazmidokat egységesen 500 ng/µl töménységűre hígítottuk. A W-partikulákat újra pelletáltuk és a felülúszóból 15 µl-t leszívtunk, majd folyamatos vortexelés mellett az első esetben hozzáadtunk 10 µl pMHL_079_cap és 10 µl pTpNAT DNS-t, 50 µl steril, 2,5 M-os CaCl₂-t és 20 µl steril, 0,1 M-os spermidint (Sigma). A második

esetben a W-pellethez a pMHL_079_cap plazmid helyett ugyanennyi pMHL_079_GFP plazmidot adtunk. A harmadik esetben a plazmidok helyett 20 µl vizet adtunk ez elegyhez. A keverékeket 3 percig vortexeltük, 10 másodpercig centrifugáltuk, a felülúszót leszívtuk, a pelletet 250 µl alkoholban reszuszpendáltuk, 1 percig vortexeltük, újra centrifugáltuk 10 s-on keresztül, a felülúszó eltávolítása után a pelleteket egyenként 50 µl etil-alkoholban vettük fel és felhasználásig jégen tároltuk.

7.2.3.3. A bioliztikus transzformálás

A transzformáláshoz PDS-1000/He™ (Bio-Rad) rendszert használtunk (7. ábra). A mikrokarriertartó részeket a hordozó lemezzel együtt és a hasadó lemezt megállító rácsot előzetesen autoklávoztuk, a hasadó lemezeket pedig izopropanolban áztattuk. A kamra teljes egészét belülről 70%-os etil-alkohollal fertőtlenítettük.



7. ábra. A PDS-1000/He™ vázlatos felépítése a használati utasítás (<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1652249.pdf>) alapján.

A fertőtlenítés után a hordozólemezekre a DNS-sel borított W-karrierből 10 µl-t csepegtettünk, majd a hordozólemez-tartóba helyeztük, amibe előzetesen olyan rácsot tettünk, amely a génpuska elsütésekor megakadályozza a hordozólemez darabkáinak kilövését. A hordozólemez-tartót ezután a kamrába rögzítettük. A hasadólemez-tartóba pedig sterilizált, 1350 psi nyomáson elpattanó lemezt helyeztünk és a kamra tetejébe csavartuk. Az előző nap előkészített *T. pseudonana* sejteket tartalmazó Petri-csésze fedelét levettük és a hordozólemez tartótól 9 cm távolságra elhelyezkedő fiókra tettük. Ezután a kamra ajtaját becsuktuk, a rendszert He-túlnyomás alá helyeztük (legalább 1700 psi), a kamrában pedig vákuumot hoztunk létre, majd megnyomtuk az elsütő gombot. Ilyenkor a kamra fölötti térben a He-nyomás folyamatosan emelkedik és abban a pillanatban, amikor a túlnyomás mértéke eléri a hasadólemez tűrőképességét (1350 psi), a lemez elpattan és a kamrába érkező He-túlnyomás a hordozó lemezt kilövi, a felgyorsított és DNS-sel borított W-partikulák az algasejtekbe csapódnak. A hordozó lemezt az alatta helyeződő rács állítja meg. Az elsütő gombot a hasadólemez jól hallható elpukkanásáig lenyomva kell tartani, majd azonnal felengedni, hogy megakadályozzuk a He szökését. Az elsütés után a vákuumot feloldottuk, a kamra ajtaját kinyitottuk, és az eldobható részeket (rács, hordozólemez, hasadólemez) újakra cseréltük. Az 1350 psi nyomást bíró lemez helyett 1550 psi-set töltöttünk be és ugyanazokat a sejteket újra transzformáltuk. Összesen négy lemeznyi sejtet transzformáltunk, kettőt a pMHL_079_cap és a pTpNAT plazmidok kombinációjával (#1 és #2), egyet a pMHL_079_GFP és a pTpNAT DNS-sel (#3), a negyediket DNS-sel nem borított W-partikulákkal (#0). Minden transzformációt 1350 psi és 1550 psi nyomással is elvégeztünk. Az agar lemezeket 10 ml ASW-vel borítottuk és egy éjszakán át inkubáltuk.

7.2.4. A transzformált sejtek szelekciója és ellenőrzése

A transzformálás másnapján a sejteket steril baktériumszélesztő pálcával megkapartuk, majd a 10 ml folyadékot Pasteur-pipettával leszívtuk és az élő sejteket MUSE[®] mini citométerrel megszámloltuk, majd a kultúrákból 5×10^6 és 2×10^6 sejtet 100 ng/ml NAT-ot tartalmazó ASW-agarra szélesztettünk. A Petri-csészéket parafilmmel lezártuk és 16–18 °C-os állandó hőmérsékletű szobában, folyamatos megvilágítás mellett inkubáltuk, az algatelepek növekedését hetente ellenőriztük. A kinőtt telepeket bakteriológiai oltókacccsal leemeltük és telepenként 2 ml szelektív táptalajba oltottuk 24 lyukú sejtenyésztő lemezen és egy hét elteltével 14 ml-es, lekerekített aljú falcon csőben (BD Biosciences) 10 ml szelektív ASW-be oltottuk tovább. A transzformálás másnapján, a lemezre szélesztés utáni maradék sejteket 50 ml térfogatú szelektív, leves ASW-ben, 200/perc fordulatszámú rázatás mellett

inkubáltuk, a barna elszíneződést mutató kultúrából hét naponként 10 ml-t tovább oltottunk 40 ml friss szelektív ASW tápfolyadékba.

A sejtekből szintén hetente 1 ml mennyiséget kivettünk, 5000 /perc fordulatszámon 5 percig pelletáltuk, 7 µl-t tárgylemezre cseppentettünk és fedőlemezzel borítottuk. A mintákban fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss Axioskop, Carl Zeiss Microimaging Inc.) vizsgáltuk a sejtek életképességét (chloroplast, excitáció: 543 nm, szűrő: >585 nm, vörös) és GFP-expresszióját (excitáció: 488 nm, szűrő: 505–550 nm, zöld).

Három hét elteltével a leves kultúrákból 10–10 ml mennyiséget vettünk ki és a DNS-t kivontuk a következő módon: a sejteket 5000 /perc fordulatszámon centrifugáltuk és a felülúszót leöntöttük, a pelletet 200 µl kétszer desztillált vízben vettük fel. Újabb centrifugálást (5000 /perc, 5 perc) és a felülúszó leöntését követően a sejteket 25 µl TE-pufferben oldottuk fel, majd 10 percre szárazjégbe tettük. A szárazjeges fagyasztás után 2 perc 65 °C-os vízfürdő következett, majd 5 perc szárazjeges fagyasztás és 2 perc 65 °C-os vízfürdő, majd még egy fagyasztás–vízfürdő ciklus. Ezután a mintákat 5 percre 95 °C-os vízfürdőbe helyeztük át. Végül a sejtörmelék lecentrifugálása (5 perc, 5000 /perc fordulatszám) után a celluláris DNS-t a felülúszóban lepipettáztuk és felhasználásig –20 °C-on fagyasztottuk. A beültetett gének jelenlétét a kivont DNS-mintákban PCR-rel ellenőriztük, melyhez az *fcp*-promoterben a startkodontól az 5'-irányban 200 nukleotidnyira kötődő forward és a GFP-génben a 105. nukleotidtól kötődő reverse primerpárt használtunk.

A transzformálástól számítva szintén három hét elteltével a GFP expresszáló sejtek arányát Amnis ImageStreamX áramlási citométerrel mértük meg. Ehhez a #1 és #2 kultúrákból mintánként 3 ml-t, a #3 minta esetén a telepől felnövesztett 10 ml-es kultúrából 3 ml-t pelletáltunk és a pelleteket 200 µl ASW-ben vettük fel. Ezt a szuszpenziót használtuk fel közvetlenül a mérésekhez. A citométerben a 40x-es nagyítású objektívet alkalmaztuk és a zöld színtestek rendkívül erős autofluoreszcenciája miatt a vörös fény csatornát (>550 nm) teljesen kiszűrtük. Az adatokat az IDEAS Analysis Application v6.0 program segítségével elemeztük.

8. EREDMÉNYEK

8.1. A PCV2-EPITÓPOT EXPRESSZÁLÓ REKOMBINÁNS CMV LÉTREHOZÁSA ÉS IMMUNOGENITÁSÁNAK VIZSGÁLATA

8.1.1. Egérkísérlet a CMV gasztrointesztinális túlélésének vizsgálatára

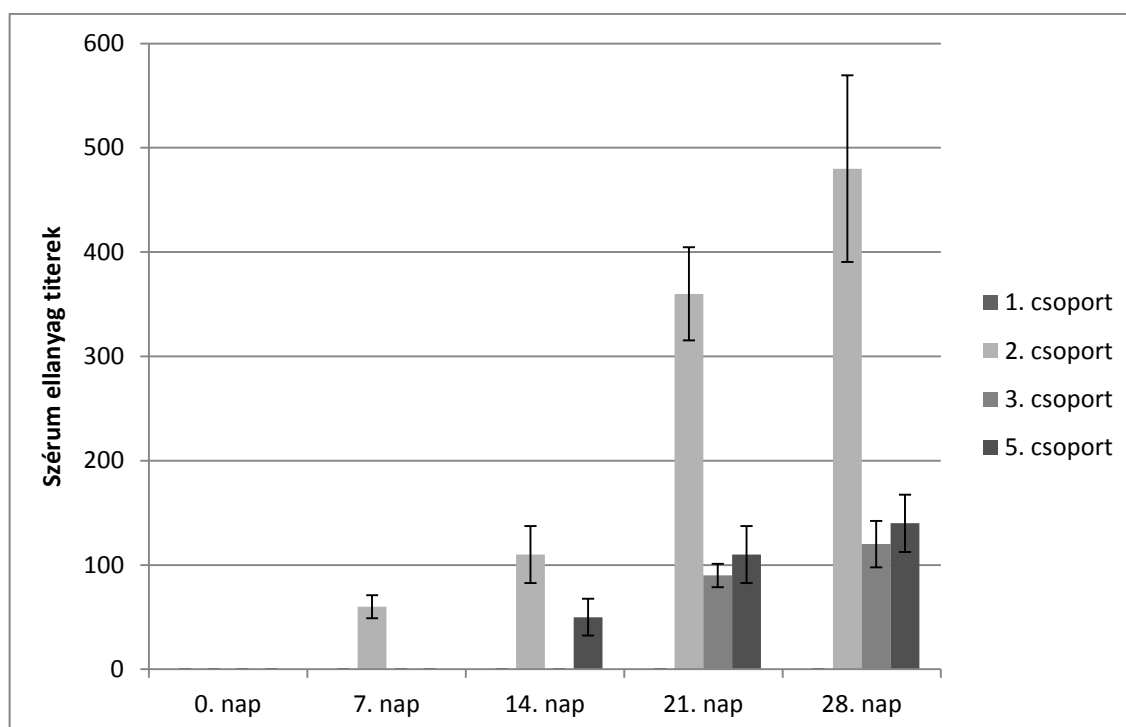
Ebben a kísérletben a CMV túlélését vizsgáltuk egerek bélcsatornájában. A kísérlet során a második, a harmadik és az ötödik csoportban a házi ELISA-módszerrel mért, CMV-specifikus szérum-IgG-titerértékeket a **4. táblázat** mutatja be és az első csoportban mért eredményekkel együtt a **8. ábra** foglalja össze. Az első csoport egereinek mintáiból egy alkalommal sem mutattunk ki CMV-specifikus ellenanyagot. A negyedik és a hatodik csoportokban csípőbélfolyadék mintákból a CMV-specifikus IgA-szinteket mértük a 14. és a 28. napokon. A titerértékeket az **5. táblázat** foglalja össze.

4. táblázat. A második, harmadik, és ötödik csoportban mért CMV-specifikus ellenanyag-titer-értékek egyedenként és időpontonként átlagolva az egyes csoportokban.

Állat sorszáma	0. nap	7. nap	14. nap	21. nap	28. nap
2. csoport					
1	-	50	50	400	400
2	-	50	100	400	400
3	-	50	100	200	400
4	-	100	200	400	400
5	-	50	100	400	800
Átlag	-	60	110	360	480
3. csoport					
1	-	-	-	50	100
2	-	-	-	100	100
3	-	-	-	100	100
4	-	-	-	100	100
5	-	-	-	100	200
Átlag	-	-	-	90	120
5. csoport					
1	-	-	-	50	100
2	-	-	50	100	100
3	-	-	50	100	100
4	-	-	50	100	200
5	-	-	100	200	200
Átlag	-	-	50	110	140

5. táblázat. A negyedik és a hatodik csoportban mért CMV-specifikus ellenanyagtiter-értékek egyedenként és időpontonként átlagolva az egyes csoportokban.

4. csoport	14. nap	28. nap	6. csoport	14. nap	28. nap
1	-	32	1	4	128
2	-	16	2	8	256
3	-	2	3	4	256
4	-	2	4	16	512
5	-	32	5	8	256
Átlag	-	16,8	Átlag	8	281,6



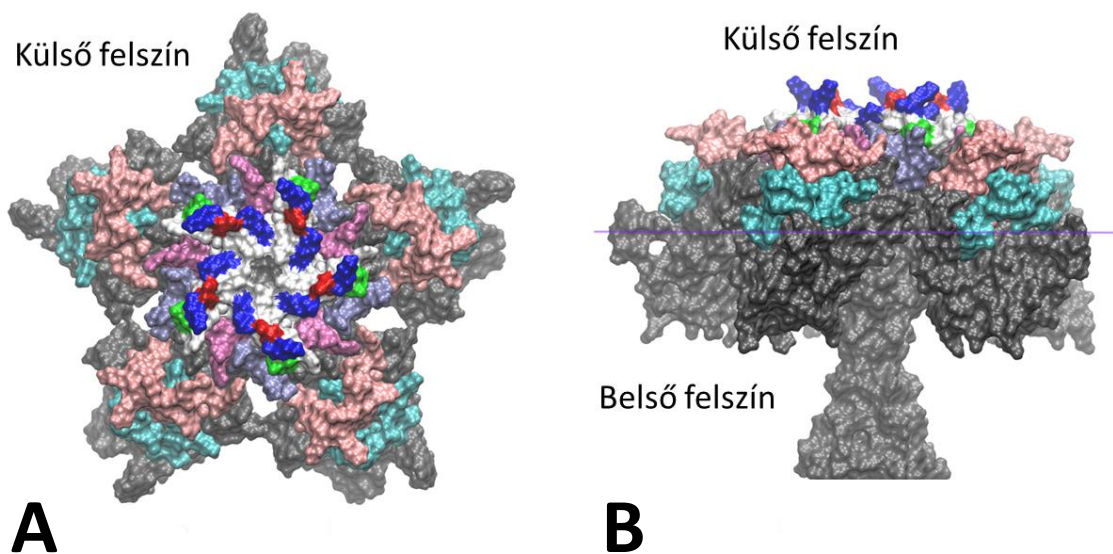
8. ábra. Az egyes csoportokban mért CMV-specifikus szérum-IgG-átlagok és a szórás.

8.1.2. A PCV2-virion szerkezete és az epitópok predikciója

A PCV2-kapszidfehérje háromdimenziós modellje az aminosav sorrend alapján, számítógépes programok segítségével készült. A cap N-terminális részén az aminosavak α -hélixbe rendeződnek, és öt cap N-terminálisának α -hélixe kötegbe rendeződve alkotja a kapszid egy egységének, a pentamernek a virion felszínére merőleges tengelyét. A cap többi része a kapszid külső és belső felszínét alkotja. A C-terminális aminosavai úgy helyezkednek el, hogy a kapszid külső felszínén, a pentamerek közepén foglalnak helyet.

A cap modelljének segítségével, kizárólag vizuális alapon öt lehetséges epitópot jelöltünk ki, ezeket a **6. táblázat** foglalja össze és az **9. ábra** szemlélteti.

Ezek közül az epitópok közül a 3. számút és az 5. számút kíséreltük meg a CMV-vektor segítségével kifejezni. A 3. számú a megjósolt epitópok közül a legnagyobb méretű, 20 aminosav hosszúságú, ezért feltételeztük, hogy az ellene képződő immunválasz elég hatékony lesz a vakcinás védelem kiváltásához. Az 5. számú epitóp a cap C-terminálisán az utolsó 10 aminosavat foglalja magába, és bár mérete csupán fele a 3. számú epitóp hosszának, helyeződése miatt ezt az epitópot is jó immunogénnek gondoltuk és megpróbáltuk a CMV-vektorba inzertálni. Ez az antigéndetermináns ugyanis a PCV2-cap-pentamerek közepén, a virion felszínéből kissé kiemelkedve, egymás mellett öt példányban foglal helyet.

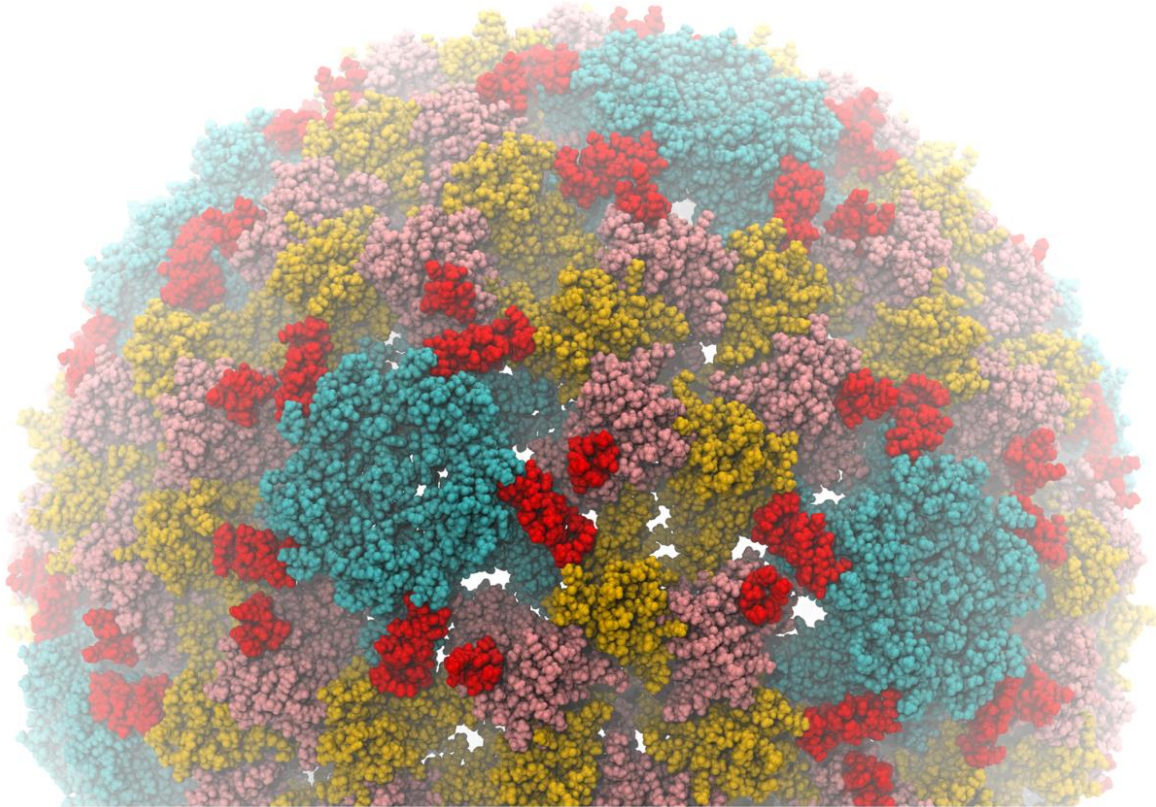


9. ábra. A feltételezett epitópok elhelyezkedése a cap-alegységekben A) kívülről nézve és B) oldalról nézve. Az 1. epitóp (37–43. aa) szürke, a 2. (90–96. aa) lila, a 3. (126–145. aa) türkiz, a 4. (169–186. aa) rózsaszínű. Az egyik kiválasztott epitóp, az 5. számú (224–233. aa) a következő séma szerint jelölt: a bázikus oldalláncú aminosavak kék, a savas oldalláncúak piros, a nem polárosak fehér, a polárosak zöld színűek.

6. táblázat. A PCV2-kapszidban megjósolt epitópok helye, mérete és aminosavsorrendje

	hely, hosszúság (aminosavak)	aminosavsorrend
1.	37–43, 7	RWRRKNG
2.	90–96, 7	SIPFEYY
3.	126–145, 20	DDNFVTKATALTYDPYVNYS
4.	169–186, 18	STIDYFQPNNKRNQLWLR
5.	224–233, 10	FNLKDPPLKP

A rekombináns, 5. számú PCV2-epitópot tartalmazó CMV-virion modelljét a **10. ábra** szemlélteti. A modell alapján a CMV-virion felszínén, a kapszidalegység-trimerek közepén három példányban szerepel a beültetett PCV2-eredetű fehérjerészlet.



10. ábra. A rekombináns CMV modellje. A CMV kapszid A, B és C alegységei rendre kék, rózsaszín és sárga színűek, a 131. aminosav után inzertált PCV2 epitóp (224–233. aa) piros színű.

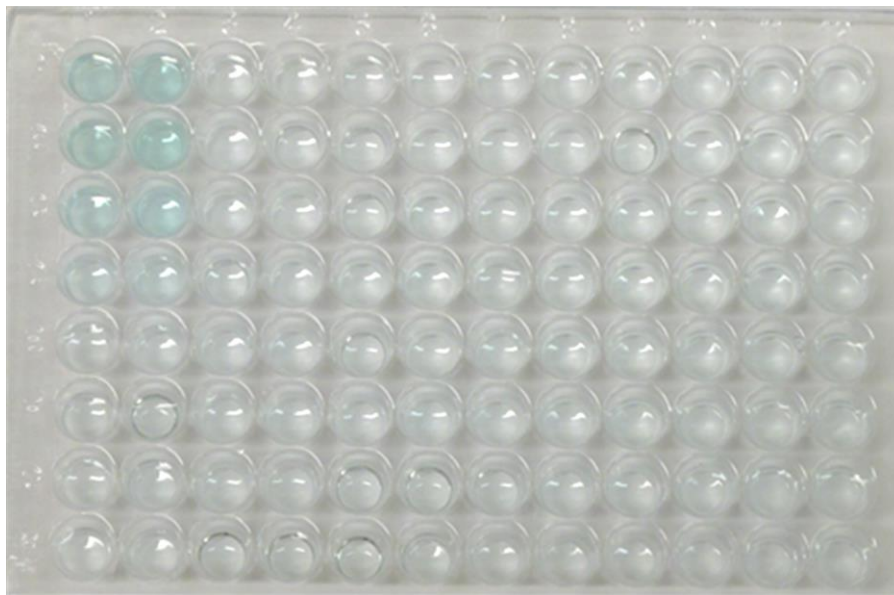
8.1.3. A rekombináns CMV előállítása

A 3. (126–145. aa) és az 5. (224–233. aa) számú inzerteket kódoló pR3-plazmidkonstrukciókat szekvenálással ellenőriztük a növény hajtások fertőzése előtt. A növényeken a CMV szaporodására utaló szisztémás tüneteket leghamarabb 6–8 nappal az inokuláció után, a kontrollvírus esetében lehetett észlelni, a PCV224–233 konstrukcióval történt fertőzés után 8–10 nappal jelentkeztek az első tünetek. A PCV126–145 konstrukcióval transzfektált hajtásokban nem volt megfigyelhető szisztémás tünet. 14 nappal az inokulációt követően a fertőzés helyétől távol eső levelekből kivont RNS-ben Northern blot utáni hibridizációval a CMV-RNS kimutatható volt a kontrollvírus és a rekombináns CMV(PCV224–233) esetén, a CMV(PCV126–145) esetében azonban nem. A sikeresen szaporodó rekombináns vírust (CMV(PCV224–233), a továbbiakban RCMV) és a vad típusú CMV-t *N. clevelandi* Gray növényeken 10 napig szaporítva, majd a levelekből

ultracentrifugálással kitisztítva hasonló vírushozam volt elérhető. A kitisztított vírust reverz transzkripció PCR-rel és szekvenálással ellenőriztük.

Meghatároztuk továbbá, hogy egy hónapon keresztül tartó passzálás után az RCMV-be ültetett inzert stabil, ám 5–6 hónapos szaporítást követően eltűnt a PCV2-eredetű epitóp. Az RCMV-virionok elektronmikroszkópos vizsgálatát is elvégezték, nem volt látható különbség a rekombináns és az eredeti CMV-virionok között, azok alakja és mérete megegyezett.

A PCV2-epitóp kifejeződését az RCMV felszínén Western blottal és ELISA-val vizsgáltuk. A Western blot kísérlet során a PCV2-specifikus hiperimmun sertéssavó többféle hígítását kipróbáltuk, az első két esetben (1:500 és 1:1000 hígítások) nem jelent meg pozitív reakció a várt molekulatömegnek megfelelő helyen a háttér és az egész membrán gyors elszíneződését megelőzően. Az 1:5000-es hígítású savó használatakor halványan megjelent ugyan pozitív színreakció a megfelelő helyeken, de ez nem volt egyértelműen értékelhető erősségű és dokumentálható minőségű.



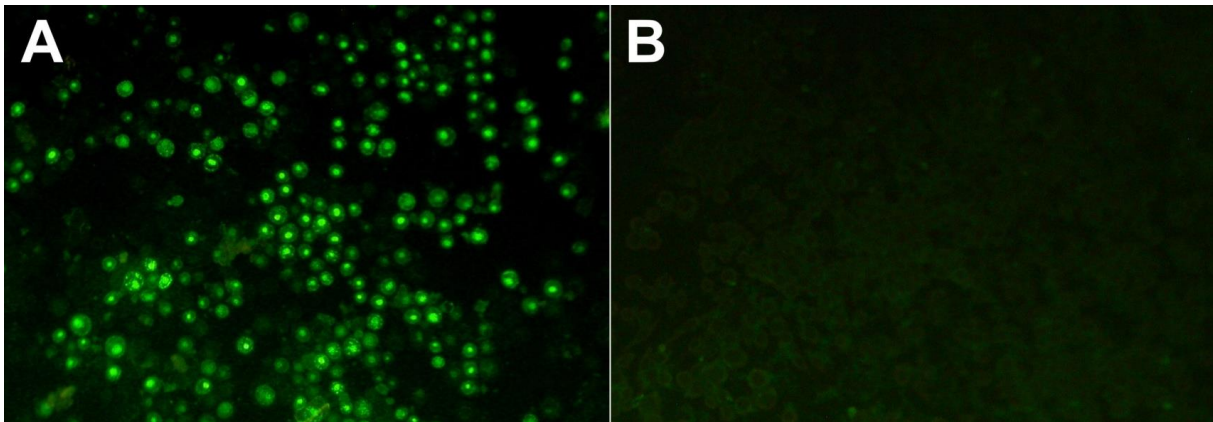
11. ábra. A CMV-antigénen kimerített savók vizsgálatára használt ELISA eredménye.

Az epitóp jelenlétét ezután ELISA-val próbáltuk bizonyítani, amelyhez dupla oszloponként felváltva RCMV- és CMV- partikulákkal érzékenyített ELISA-lemezt használtunk a könnyebb elbírálhatóság érdekében, azonban a PCV2-specifikus sertéssavó a CMV-antigénnel szemben is pozitív reakciót adott, és ennek intenzitása az RCMV-vel szemben adott reakciók erősségétől nem volt megkülönböztethető. Az ELISA-tesztet kizárólag CMV-antigént tartalmazó lemezen kimerített savóval elvégezve végre jól elkülöníthető, egyértelmű színreakciót kaptunk eredményül azokban az oszlopokban, ahol 1:100-ban savóhígítást használtunk (az első két oszlopban). Az RCMV-vel és az azonos

hígítású CMV-antigénnel adott színreakciók közötti egyértelmű különbség az antigének 1:800-as hígításánál (E sor) már nem volt jelen, tehát az utolsó egyértelműen pozitív reakció az antigének 1:400-as hígítását tartalmazó lyukban (D1) volt megfigyelhető. A 3–12. oszlopok egyöntetűen halványkék, negatív hátteret mutattak (**11. ábra**).

8.1.4. Egéroltási kísérlet az RCMV immunogenitásának vizsgálatára

Az adjuvált vad típusú CMV-vel, rekombináns CMV-vel, vagy PBS-sel oltott egerek szérum mintáiból PCV2-specifikus IgG-ellenanyag szintet mértünk iIF-módszer segítségével, amely során egy-egy minta minden hígítását PCV2 antigént tartalmazó és nem tartalmazó sejtenyészeten is vizsgáltuk, a minta ellenanyag titerének azt a hígítást vettük, ahol a pozitív, reakció, a zöld színű fluoreszcencia még egyértelműen megkülönböztethető a sejtek autofluoreszcenciájától (**12. ábra**). A negatívkontroll-csoport és a CMV-vel immunizált csoportok állataiban PCV2-specifikus ellenanyagot nem mutattunk ki. Az RCMV-vel immunizált egerek ellenanyag titer 3 mintában 1:80, egy egérben 1:160, végül egy állatban 1:320 volt.



12. ábra. Az indirekt immunfluoreszcens próba értékelése. A) pozitív reakció: az Sf-9 sejtekben szaporodó, baculovírus-sal termeltetett rekombináns PCV2-kapszidfehérjéhez (antigén) kapcsolódó PCV2 specifikus ellenanyagokat a szérum mintából FITC-cel jelölt, egér-IgG-specifikus másodlagos ellenanyag mutatja ki. A FITC fluoreszcens jelölőmolekula, amely UV-fénnyel gerjesztve zöld színű (519 nm hullámhosszúságú) fényt bocsát ki. B) negatív reakció: ugyanazon savóhígítás negatív antigénkontroll- (nem rekombináns baculovírus-sal fertőzött) sejteken vizsgálva, a sejtek háttérfluoreszcenciája látható.

8.1.5. Immunizálási és fertőzéses kísérlet sertésben

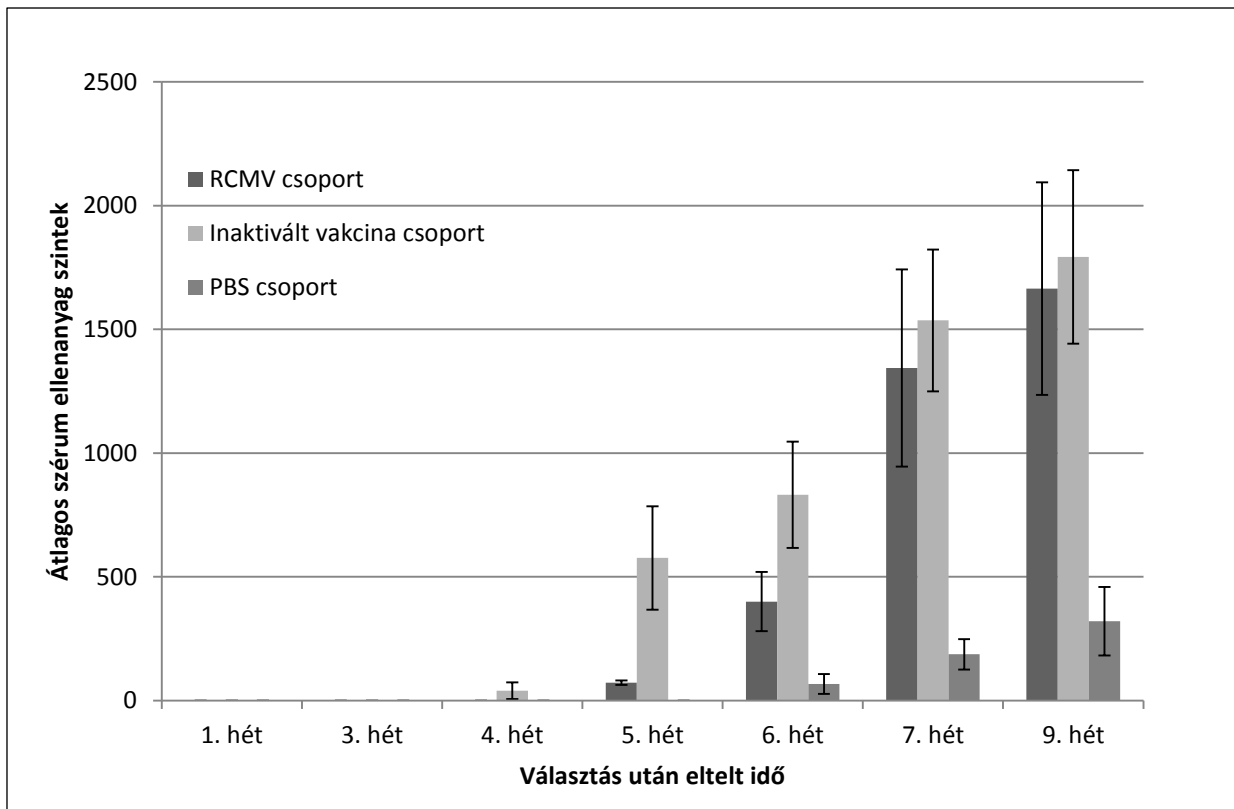
Az előállított RCMV- (PCV224-233) antigénnel malacolást, majd virulens PCV2-vírussal fertőzéses kísérletet végeztünk. Az állatokat a kísérlet 60 napja során minden nap megfigyeltük, majd az eutanáziát követően makroszkópos kórbonctani vizsgálatnak vetettük

alá. Klinikai tünetet egyetlen állatban sem tapasztaltunk és a boncolás során nem láttunk a normálistól eltérő, vagy kóros elváltozást.

A malacok vérszérum mintáiban iIF-módszerrel mértük a PCV2-specifikus IgG-szintet. A pozitív kontrollként inaktivált vakcinával oltott csoport állataiban az ellenanyagok már az első vakcinázást követően kimutathatóak voltak, a kísérlet 25. napján. Az RCMV-vel immunizált sertésekben 10 nappal később, a 36. naptól kezdve tudtunk kimutatni PCV2 elleni IgG-t. A PBS-sel oltott, negatívkontroll-csoportban csak a fertőzés után, a 40. napon kaptunk először pozitív eredményt. A mért titerértékeket az egyes állatokban a **7. táblázat** mutatja be és csoportonként az **13. ábra** szemlélteti. Az iIF-teszt során a mintahígítások 1:20 aránnyal kezdődtek, ezért a negatívnak bírált minták titere <20.

7. táblázat. Az egyes malacok szérummintából mért PCV2-specifikus ellenanyagszintek.

Vérvétel időpontja	3. nap	15. nap	25. nap	36. nap	44. nap	50. nap	60. nap
Kezelés		1. oltás	2. oltás	fertőzés			
RCMV	-	-	-	40	320	1280	1280
	-	-	-	80	640	320	640
	-	-	-	80	80	1280	1280
	-	-	-	80	640	2560	2560
	-	-	-	80	320	1280	2560
Inaktivált vakcina	-	-	160	320	640	1280	2560
	-	-	-	640	320	1280	1280
	-	-	-	1280	1280	2560	2560
	-	-	20	320	640	1280	1280
	-	-	20	320	1280	1280	1280
PBS	-	-	-	-	20	160	160
	-	-	-	-	160	320	640
	-	-	-	-	20	80	160



13. ábra. A PCV2-specifikus szérumból ellenanyag-titer alakulása az egyes csoportokban.

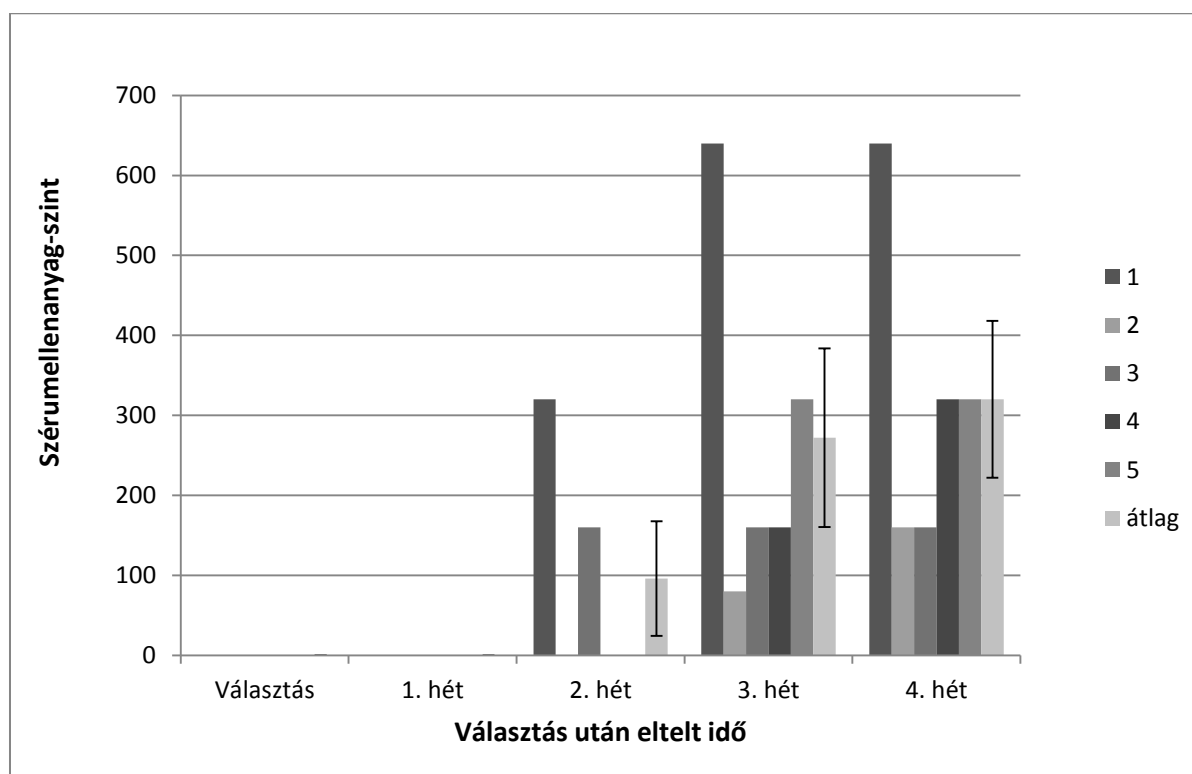
A malacokból a boncolás során szervmintákat gyűjtöttünk, amelyekből a DNS kivonása után valós idejű PCR-rel mutattuk ki a PCV2-nukleinsavat. A módszer érzékenysége 10 és 10² kópiaszám közöttinek bizonyult. A pozitívkontroll-csoport állatainak egyik szervéből sem mutattunk ki PCV2-DNS-t. Az RCMV-vel immunizált malacok közül két állat összesen három (egy tüdő és két gátorközi nyirokcsomó) szervében mutattunk ki PCV2-nukleinsavat. A negatív kontroll csoport minden egyedéből kimutathatónak bizonyult a PCV2. A PCR eredményeit a **8. táblázat** tartalmazza. A szérumból és bélsárból kivont DNS-minták mindegyike negatívnak bizonyult PCV2-DNS jelenlétére.

8.1.6. Az RCMV orális immunogenitásának vizsgálata sertésekben.

A rekombináns CMV felszínén expresszált PCV2-epitóp immunogenitását szájon át adva is vizsgáltuk, úgy, hogy az antigént a malacokkal megetettük és belőlük a kísérlet során több alkalommal vérmintát vettünk, ezek PCV2-specifikus IgG-szintjét iIF-tesztel állapítottuk meg. Az eredményeket az **14. ábra** foglalja össze. A negatívkontroll-csoport állatai nem részesültek kezelésben, és belőlük PCV2-specifikus ellenanyag egy alkalommal sem volt kimutatható. Az immunizált csoport állatai közül kettőben már a második héten kimutattunk PCV2-specifikus ellenanyagot, a harmadik hétre a csoport összes malacában megjelentek ezek az IgG-k.

8. táblázat. Az egyes malacok szerveiből kimutatható PCV2 DNS.

Csoport	Szív	Tüdő	Mandulák	Gátorközi nyirok-csomók	Lágyéki nyirok-csomók	Máj	Lép	Vese
RCMV	-	+	-	+	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	+	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
Inaktivált vakcina	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
PBS	+	+	-	+	-	+	+	-
	-	-	-	+	-	-	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	-



14. ábra. Az egyes malacokban mért PCV2-specifikus szérum IgG szintek.

8.2. A PCV2-KAPSIDFEHÉRJE ELŐÁLLÍTÁSA REKOMBINÁNS *THALASSIOSIRA PSEUDONANA* MIKROALGÁBAN

8.2.1. Az algában expresszálandó PCV2-kapszidgén megtervezése és előállítása

Az első szempontunk a kapszidgén megtervezésekor az volt, hogy a térségünkben előforduló PCV2-változatokra jellemző aminosavsorrendű fehérjét állítsunk elő. Ehhez az Európában jellemzően előtérbe került PCV2b 1A genotípusú vírusok ORF2-nukleotidsorrendjeinek segítségével konszenzus szekvenciát állítottunk elő, majd a *Thalassiosira pseudonana* kodonpreferenciáinak megfelelően optimalizáltattuk. A konszenzus szekvenciát és az optimalizálás eredményét a **15. ábra** szemlélteti.

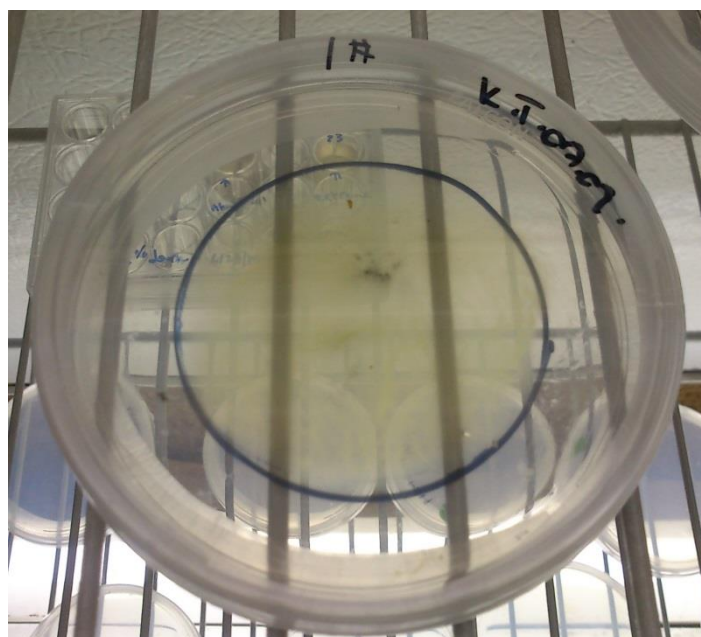
Optimized	32	ATG ACATAC CCAAGGAGGCGT TATCGTCGTCGTAGGCATAGGCCGCGTTTCGCACCTCGGA
Original	32	ATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACC GGAGAAGAAGACACCCGCCCCCGCAGCCATCTTGGC
Optimized	92	CAG ATTCTTCGTCGTAGGCCG TGGCTCGTCCACCCC CGTCATAGGTATCGT TGG CGT AGG
Original	92	CAGATCCTCCGCCCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGTTACCGCTGGAGAAGG
Optimized	152	AAGAACGGA ATCTT CAACTAGGCTTTCGCGTACATTT GGAT ACACCATT AAG CGT ACC
Original	152	AAAAATGGCATCTTCAACACCCGCCCTCTCCCGCACCTTCGGATATACTATCAAGCGAACC
Optimized	212	ACTGTCAAGACGCCATCA TGGGCCGTAGATATGATG CGT TT CAAC ATTAATGACTTT CTC
Original	212	ACAGTCAAAACGCCCTCTGGGCCGTGGACATGATGAGATTCAATATTAATGACTTTCTT
Optimized	272	CCACCTGGAGGAGGATCT AACCCCGTAGTGT ACCGTTCGAGTAC TAT CGTATCCGT AAG
Original	272	CCCCAGGAGGGGGCTCAAACCCCGCTCTGTGCCCTTTGAATACTACAGAATAAGAAAG
Optimized	332	GTGAAGGTTGAATTT TGG CCATGTTCTCCTATT ACC CAAGGAGATCGT GGAGTGG GATCT
Original	332	GTTAAGGTTGAATTTCTGGCCCTGCTCCCCGATCACCAGGGTGACAGGGGAGTGGGCTCC
Optimized	392	TCCGCAGTTATCCTCGATGACAAC TT CGTGACC AAG GCTACTGCCTTGACGTACGACCCA
Original	392	AGTGCTGTTATTTCTAGATGATAACTTTGTAAACAAGGCCACAGCCCTCACCTATGACCCC
Optimized	452	TACGTGAATTACAGTTCGAGGCACACGATTACACAACCT TTCTCATATCATTT CTCGTTAC
Original	452	TATGTAAACTACTCTCCGCCATACCATAACCCAGCCCTTCTCCTACCACTCCCGCTAC
Optimized	512	TTT ACTCCC AAGCCGGT TGGATAGTACGATCGACTACTTCCAG CCAAAC AATAAGAGG
Original	512	TTTACCCCAAACCTGTCTAGATTCCACTATTGATTACTTCCAACCAACAACAAAAGA
Optimized	572	AACCAACT TGG TGCGTCTTCAGACAGCA GAAAT GTCGAT CACGT AGGACTTGGAAAC
Original	572	AATCAGCTGTGGCTGAGACTACAACCTGCTGAAATGTAGACCACGTAGGCCTCGGCACT
Optimized	632	GCTTTTGAGAACTCTATCTATG ACCAGGAATACAAT ATT CGT GTTACT ATGTAT GTT CAG
Original	632	GCGTTCGAAAACAGTATATACGACCAGGAATACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAA
Optimized	692	TTC AGGAGTTCAACCTCAAGGACCCGCTCTCAACCA
Original	692	TTCAGAGAATTTAATCTTAAAGACCCCCACTTAACCCT

15. ábra. A PCV2-ORF2 eredeti („Original”) és *Thalassiosira pseudonana*-ban történő expresszióra optimalizált („Optimized”) szekvenciái a stop-kodon elhagyásával, a megváltoztatott nukleotidok pirossal kiemelve (www.genscript.com).

A megtervezett és szintetizáltatott gént pMHL_079-plazmidba helyeztük át a Gateway technológia segítségével, ennek sikerességét és az eGFP-génnel együtt a bázisrendjének helyességét a szekvenálás megerősítette.

8.2.2. A *T. pseudonana* sejtek transzformálása

A létrehozott, PCV2-cap-gént tartalmazó pMHL_079_cap és az antibiotikumrezisztenciát kódoló pTpNAT-plazmidok 5–5 µg-ját W-karrierekhez kötöttük. Pozitív kontrollnak ugyanennyi pMHL_079_GFP-vektort használtunk a rezisztenciát hordozó plazmiddal együtt, a negatív kontroll pedig azonos kezeléssel átesett, de DNS-t nem tartalmazó W-részecskék szolgáltak. A részecskebombázást 1350 és 1550 psi nyomáson is elvégeztük, a pMHL_079_GFP-plazmiddal 2×10^8 , a kontroll készítményekkel 10^8 algasejtet transzformáltunk. Az agarlemezek közepére szélesztett sejteken a becsapódott hordozórészecskék elhelyezkedése szabad szemmel megfigyelhető (16. ábra).



16. ábra. Szelektív agar lemezre szélesztett *T. pseudonana* sejtek transzformálás után. A becsapódott W részecskék helye szürke foltként látható.

8.2.3. A transzformált sejtek szelekciója és vizsgálata

A sejteket egy éjszakán át történő inkubálás után szelektív ASW-tápfolyadékba oltottuk, ezen kívül szelektív agarlemezre szélesztettük transzformációnként 5×10^6 és 2×10^6 mennyiségben is. A #0, #1 és #2 számú lemezeken 3 hetes inkubációs időszak alatt telepkepződés nem volt megfigyelhető. A #3 számú pozitív kontroll lemezen 7 nap elteltével három barna színű telepet figyeltünk meg, ezeket leemeltük és 24 lyukú lemezen 2–2 ml szelektív ASW-ben, majd 10 ml-es kultúrákban növesztettük tovább. Az ezek között végzett mikroszkópos vizsgálat alapján csak egyetlen kultúra volt GFP-pozitív. A szelektív leves

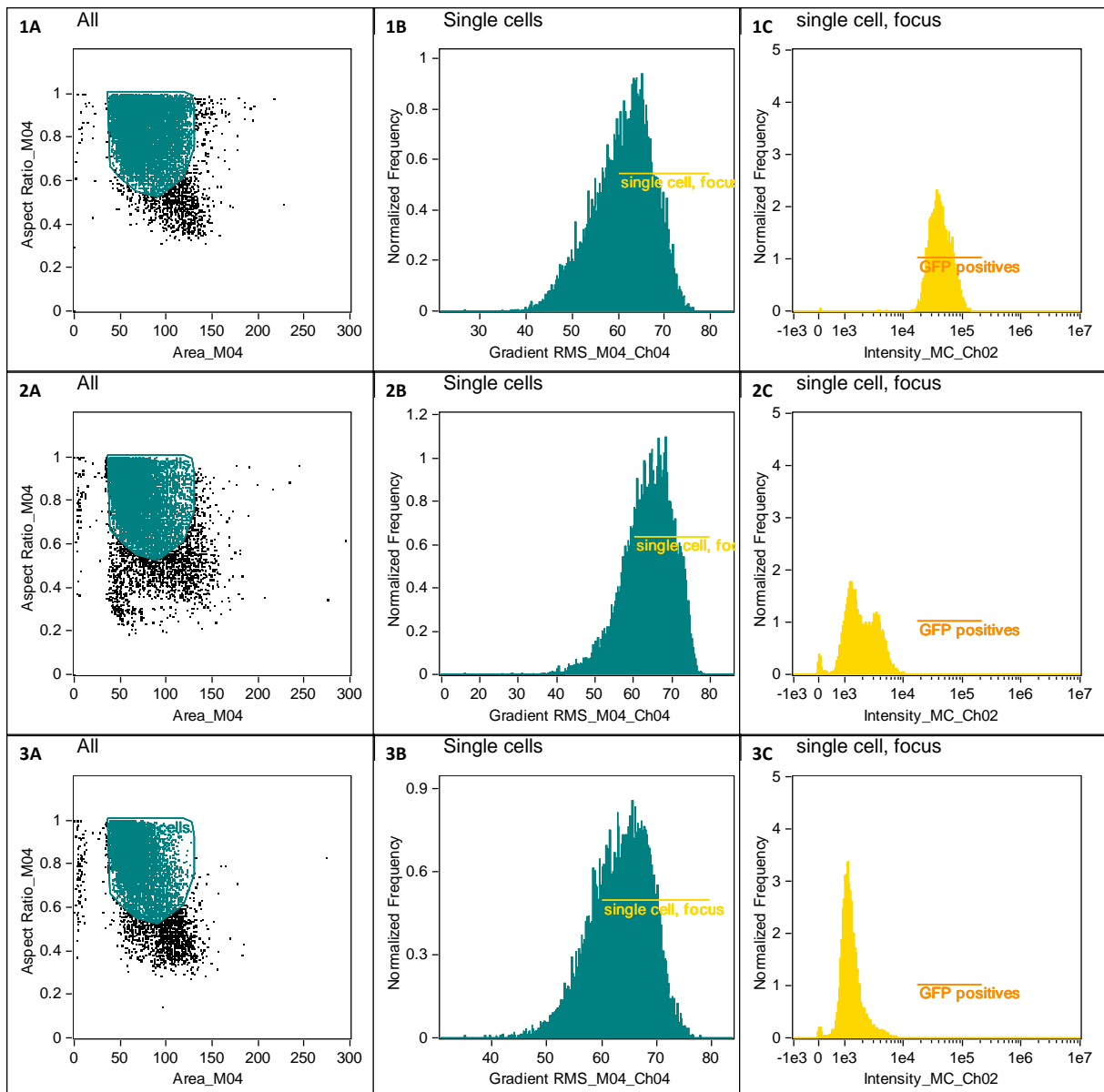
ASW-kultúrák közül a negatív kontroll egy hét alatt kifehéredett, ami a sejtek elpusztulását jelenti. A #1 és #2 számú tenyészetek lassú növekedésnek indultak és két hét elteltével szubkultúrát készítettünk belőlük (10 ml mennyiséget 40 ml friss szelektív táptalajba oltottunk). A pozitívkontroll-tenyészetet (#3) egy és két hét elteltével is passzálni kellett.

A transzformálást követően 3 héttel elvégzett DNS kivonás és PCR során az #1 és #2 számú minták negatív eredményt adtak, a #3 minta esetében a várt, kb 300 bázis méretű terméket figyeltük meg a gélen.

A sejteket Imagestream képalkotó áramlási citométerrel is vizsgáltuk. Ennek során legalább 15 000 sejtet számoltunk meg minden mintából. Az analízist először a pozitívkontroll-populáción (#3) végeztük el, majd kiterjesztettük a többi mintára is. Az eredményeket a **9. táblázat** és a **17. ábra** mutatja be.

9. táblázat. Az Imagestream vizsgálat számszerű eredményei.

	Események száma összesen	A fókuszban lévő egyedi sejtek/összes esemény	GFP pozitív sejtek /összes esemény	GFP pozitív sejtek/fókuszban lévő egyedi sejtek
#3	17374	55,57%	55,19%	99,33%
#1	17906	65,43%	0%	0%
#2	16316	65,86%	0%	0%



17. ábra. Az Imagestream-vizsgálat eredményei. Az első sor ábrái a #3, a második a #1, a harmadik #2 számú kultúrákból származó sejtek analizését szemléltetik. Az „A” ábrákon a sejtek területe (Area) függvényében a sejtek legrövidebb és leghosszabb keresztmetszetének arányát (Aspect Ratio) ábrázoló dot plot látható. Ezekon az ábrákon a kiválasztott egyedi sejtek csoportját a zöldeskék színeli gate (Single cells) jelöli. A „B” jelű hisztogramok az egyedi sejtek eloszlását ábrázolják a sejtekről készült fényképek élességét jellemző érték (Gradient RMS) tengelyén. Ezt a populációt tovább szűkítettük az éles, fókuszban lévő sejtek sárgával jelölt csoportjára (single cell, focus). A „C” hisztogramokon ezen legszűkebb populációk zöld fluoreszcens csatornában mért eGFP intenzitásának eloszlása látható. A pozitívnak tekintett érték sávját narancsárga szín jelöli. Az ábrákat az IDEAS Analysis Application v6.0 alkalmazásból exportáltuk.

9. MEGBESZÉLÉS

9.1. A PCV2 EPITÓPOT EXPRESSZÁLÓ REKOMBINÁNS CMV IMMUNOGENITÁSA

9.1.1. A CMV gasztrointesztinális túlélése

Annak vizsgálatára, hogy a CMV-virionok alkalmasak-e szájon át történő immunizálásra, vagyis az emésztőcsatornában uralkodó körülmények között megőrzik-e specifikus immunogenitásukat, állatkísérletet végeztünk. Ennek során egereket immunizáltunk parenterálisan és szájon át, majd CMV-specifikus ellenanyagok jelenlétét mutattuk ki ELISA-módszerrel.

A legerősebb szérum-IgG-ellenanyagválaszt abban a csoportban kaptuk, amelyikben az antigént az állatok hasüregébe oltottuk. Ebben a csoportban az IgG-ellenanyagok már egy hét elteltével kimutathatóak voltak, jellemzően 1:50 titerértékben. A negyedik hét végéig az IgG-szintek folyamatos emelkedést mutattak, a legtöbb egyedben 1:400 titerértékig. A második csoportban, amelyben az állatokat az első csoportban adott antigénekével megegyező mennyiségű virionnal szájon át immunizáltuk, CMV-specifikus szérum-IgG-ellenanyagokat egészen a második immunizálást követő harmadik hétig nem mutattunk ki. A kísérlet végére ebben a csoportban átlagosan a parenterális oltással elért ellenanyagszintek egynegyedét sikerült csupán elérni. A négyszeres víruspartikula-mennyiséggel szintén szájon át immunizált egerek csoportjában (5. csoport) a szérum-IgG-antitestek már a második vírusvetés előtt elérték az 1:50 szintet. A második immunizálás után az ellenanyagszintek tovább emelkedtek ugyan, de a 3. csoport átlagához hasonló szinten maradtak. Az adag növelésével tehát gyorsabban kialakuló immunválaszt lehetett kiváltani, ennek mértéke azonban nem változott az antigén-mennyiség növelésével.

Az IgA-ellenanyagok vizsgálata során szintén megfigyelhető volt, hogy a négyszeres adag antigén gyorsabban megjelenő ellenanyagválaszt indukált, de ebben az esetben a kísérlet végére elért titerértékekben is különbséget találtunk a csoportok között. A negyedik csoport egerei közül abban az öt állatban, amelyeket a második immunizáláskor extermináltunk, nem mutattunk ki CMV-specifikus IgA-ellenanyagot a bélfolyadékmintákból. Ugyanebben az időpontban a négyszeres CMV-adagot kapott állatok mindegyikében megtalálható volt a keresett IgA. A 28. napra pedig a kevesebb ellenanyagot kapott egerekénél átlagosan 4 hígítással magasabb szinteket kaptunk eredményül. Érdekes lenne annak kiderítése, hogy valóban van-e összefüggés az etetett dózis és a kialakuló szekretoros-IgA-szintek között, ez azonban a mi vizsgálatainkkal összefüggésben nem volt cél.

Eredményeink szerint a tisztított CMV-virion alkalmas volt szájon át történő antigén-bejuttatásra, és az emésztőrendszer körülményeit a nanopartikulák egérben legalább olyan

szinten túléltek, hogy az kimutatható mennyiségű specifikus szérum-IgG és bél-IgA megjelenését eredményezze. Nuzzaci és mtsai. (2010) is hasonló következtetésre jutottak rekombináns CMV *in vitro* tesztelése során.

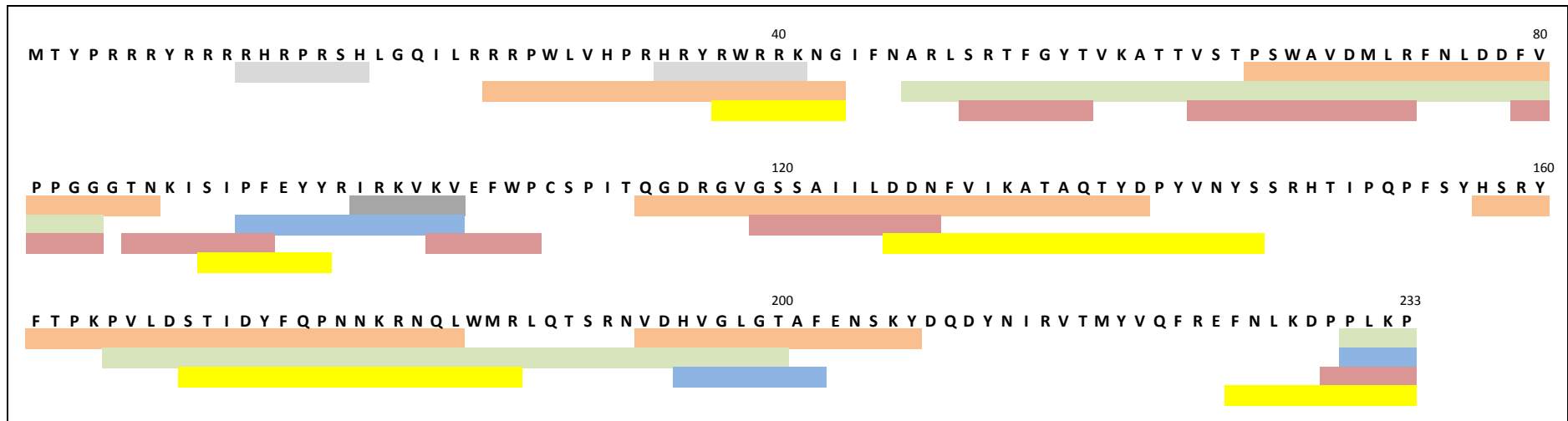
9.1.2. A PCV2-virion szerkezete, epitópjainak elhelyezkedése és a rekombináns CMV előállítása

A PCV2 virion háromdimenziós modellje pusztán a vírus ORF2-nukleotidsorrendjéből származtatott cap-aminosavszekvencia alapján készült el. A munka ezen részének elvégzésével párhuzamosan jelent meg a szakirodalomban a PCV2-kapszid röntgenkrisztallográfián alapuló modellje (Khayat és mtsai., 2011), amely az általunk készített modell helyességét nagyrészt megerősítette.

A modellen vizuális és a szakirodalomban elérhető információk alapján öt feltételezett epitóp helyét határoztuk meg. Ezek elhelyezkedését a kapszidfehérjén belül és a más szerzők által azonosított immunogén szakaszokat a **18. ábra** szemlélteti. Az epitópok meghatározásakor a Mahé és mtsai. (2000), a Lekcharoensuk és mtsai. (2004) és Shang és mtsai. (2009) által leírt immundomináns szakaszok voltak ismertek, Khayat és mtsai. (2011) valamint Ge és mtsai. (2013) eredményei az utólagos ellenőrzésben nyújtanak segítséget.

Az első általunk meghatározott epitóp a 37. és 43. aminosavak között elhelyezkedő szakasz, amely átfedésben van az NLS (Liu és mtsai., 2001a) és az egyik, Mahé és mtsai. (2000) által leírt lineáris epitóppal. Ez a szakasz modellünkön a felszínhez közel helyezkedik el. Khayat (2011) szerint az ezzel egybe eső, de hosszabb lineáris epitóp (Mahé és mtsai., 2000) nem a külső felszínen található, és az immunreceptorok számára akkor elérhető, amikor az ún. vírúslégzés során átmenetileg externalizálódik. Modellünk alapján lehetséges, hogy az epitóp egy része a virion felszínén található és az ellene esetlegesen képződő ellenanyagok a teljes epitóp felszínre kerülése előtt kapcsolódhatnak a vírushoz ezen a ponton. Ennek felderítésére irányuló kísérletet nem végeztünk.

Az általunk feltételezett második epitóp a 90. és a 96. aminosavak között foglal helyet. Ez átfedésben van egy Shang és mtsai. (2009) által korábban leírt lineáris epitóppal, amely a 92–103. aminosavak között található. Ez a hosszabb epitóp az általunk megfigyelt virionfelszíni aminosavakon kívül tartalmazza a vírus sejtbe jutásáért valószínűsíthetően felelős heparán-szulfát kötő domént is (98–103. aa, Misinzo és mtsai., 2006). Érdemes lenne annak vizsgálata, hogy az általunk meghatározott 2. számú epitóp valóban indukál-e specifikus ellenanyag-termelést, és, hogy annak kötődése megakadályozza-e a vírus sejtbe jutását a heparán-szulfát kötő-hely közelsége miatt, vagy helyesebb-e inkább a Shang és mtsai. által meghatározott hosszabb szakasz epitópként való értelmezése.



18. ábra. Az általunk vizuális alapon meghatározott PCV2-epitópok (sárga színnel jelölve) viszonya a más szerzők által leírt immundomináns szakaszok elhelyezkedésével és méretével (az NP_937957 számú referenciaszekvencián ábrázolva). A világosszürke: régió az NLS-t (Liu és mtsai., 2001a); a sötétszürke a megjósolt heparán-szulfát kötő-helyet (Khayat es mtsai., 2011) jelölik. Narancssárgával a Mahé és mtsai. (2000), zöld színnel a Lekcharoensuk és mtsai. (2004), késsel a Shang és mtsai. (2009), bordóval a Ge és mtsai. (2013) által meghatározott epitópokat jelöltem. A számok az aminosavak sorszámát jelölik.

Harmadik számú epitópként a 126–145. aa-kat határoztuk meg. Ez a leghosszabb, 20 aa hosszúságú szakasz nagyrészt átfedésben van egy Mahé és mtsai. (2000) által leírt lineáris epitóppal. Ge és mtsai. (2013) ezt a hosszú szakaszt később 10 aa hosszúságúra (119–128. aa) rövidítették, amely csupán 2 aa átfedést mutat az általunk azonosított epitóppal. Ez az epitóp volt az egyik, amit megkíséreltünk CMV-virionban expresszálni, azonban a létrehozott rekombináns CMV nem volt képes a transzfektált dohány növényben szisztémás terjedésre, tüneteket a vírus nem okozott és a növény nem transzfektált részeiből nem lehetett az örökítőanyagát kimutatni. Az epitóp valószínűleg túlságosan nagy méretű volt a CMV-virionba ültetéshez, és a rekombináns CMV-kapszidfehérje nem tudott úgy hajtogatódni, hogy azután funkcionális, fertőzőképes virionná álljon össze. Vitti és mtsai. (2010) hasonló jelenséget tapasztaltak, miszerint egy ugyanebbe a pozícióba (a CMV kapszidfehérje 131. aa-a mögé) beültetett, 12 aa hosszúságú, Alzheimer-betegséggel kapcsolatos peptid még nem akadályozta meg szaporodóképes rekombináns CMV létrehozását, ám egy 15 aa méretű szakasz már destabilizálta a viriont.

A negyedik számú epitóp a 169–186. aa között helyet foglaló, szintén viszonylag hosszú szakasz. Ez két, korábban leírt antigén-determináns szakasszal is egybe esik, az egyik lineáris epitóp (157–183 aa, Mahé és mtsai., 2000) és a PCV1-gyel keresztreakál, de a virion belsejében található. A másikat (165–200. aa) Lekcharoensuk és mtsai. (2004) konformációs epitópként írták le és vizsgálataikban nem mutatott keresztreakciót a PCV1 eredetű homológ szakaszokkal. Az epitóp az általunk létrehozott modell szerint is a PCV2 virion külső felszínén helyezkedik el.

Ötödik epitópként végül a cap fehérje utolsó 10 aa-át határoztuk meg. PCV2-virion modellünkön ez a szakasz a virion felszínéből kissé kiemelkedik, és a cap-alegységekből összeálló pentamerek találkozási pontjánál, középen helyezkedik el, egymással közvetlen közelségben, öt példányban. Ezen a helyen korábban már Lekcharoensuk és mtsai. (2004; 230–233. aa) és Shang és mtsai. (2009; 230–233.aa) lineáris epitópot feltételeztek, majd később Ge és mtsai. (2013, 229–233) is megerősítették a feltételezést. Ezt a 10 aminosav hosszúságú antigén-determinánst sikerrel inzertáltuk a CMV 131. és 132. aa-ai között található inzerció helyre, és az így létrehozott RCMV viron szisztémás tüneteket okozott a dohánynövényben, valamint a növények között is fertőzőképes volt. Az RCMV 5–6 hónapos passzálás után elvesztette az inzertált PCV2-eredetű fehérjeszakaszt, és néhány esetben a CMV-virion 131. aa-a prolinról szerinre mutálódott. Ez a jelenség biztonságossági szempontból előnyös, mert így valószínűsíthető, hogy természetes körülmények között a mesterségesen létrehozott vírus nem marad fenn és megszabadul a számára értelmetlenül hordozott, funkció nélküli peptidtől. Más részről azonban azt is jelenti, hogy az RCMV szaporítására használt módszerek (passzálás, gazdanövény) még optimalizálásra szorulnak.

A tisztított RCMV-n a PCV2-eredetű epitóp helyes konformációban történő megjelenését először Western blottal próbáltuk megerősíteni, ez nem járt sikerrel, mert a kisebb savóhígításoknál az egész membrán elszíneződött, nagyobb hígítási fok használatakor pedig nem kaptunk értékelhető jelet. Ezt valószínűleg az okozta, hogy a PAGE során az erős redukáló körülmények és fizikai hatások olyan mértékben változtatták meg az epitópok térbeli szerkezetét, hogy az ellenanyagok számára felismerhetetlenné vált. Ezen kívül, mint később kiderült, a használt sertéssavó CMV-specifikus ellenanyagokat is tartalmazott.

A Western blot kudarca után ELISA teszttel próbáltuk a PCV2 eredetű epitóp jelenlétét igazolni. Kezdetben ez sem volt sikeres, mert a negatív kontrollként használt, vad típusú CMV-vel szemben is az RCMV antigénjéhez hasonló mértékű pozitív színreakciót kaptunk. Feltételezésünk szerint ez azért lehetett, mert a CMV igen széles körű elterjedtsége miatt a sertések életük során rendszeresen érintkeznek CMV-antigénnel takarmányon keresztül. Az elsődleges savó ugyanis házilag előállított hiperimmun sertéssavó volt, amelyet sertés nagy dózissal, mesterséges PCV2-fertőzése után nyertek (Cságola, 2009). Ez a savó legnagyobb mennyiségben PCV2-specifikus ellenanyagokat tartalmaz ugyan, de megtalálható benne az állat összes, egyéb antigén ellen korábban képződött és a vérvétel időpontjában jelen lévő immunglobulinja is. Ez a jelenség egyben azt is előrejelítette, hogy a CMV-virion antigénjei az egerekéhez hasonlóan a sertések emésztőcsövében is megőrzik antigenitásukat.

Következő lépésként a hiperimmun sertéssavót kizárólag CMV-antigént tartalmazó lemezen inkubáltuk, ahol a CMV-elleni antitestek megkötődtek. Az így kimerített savót ezután CMV- és RCMV-virionokkal is érzékenyített lemezre mértük át, majd a tesztet befejeztük, és így már egyértelmű eltérés volt látható a kétféle antigénre adott reakció között. Csupán a legelső (1:100) savóhígítás volt pozitív, annak ellenére, hogy ugyanez a savó korábban PCV2-antigénre 1:10000 hígításig reagált. Ennek az a magyarázata, hogy vizsgálatunkban a PCV2-virionból csak egy 10 aa hosszúságú darab volt jelen, nem a teljes vírus, annak minden epitópjával.

A Western blotnál kevésbé elegáns módon ugyan, de sikerült igazolni, hogy a PCV2-eredetű epitóp helyes térszerkezetben és ellenanyagok számára hozzáférhető módon fejeződik ki a CMV felszínén.

9.1.3. A rekombináns CMV immunogenitása

Az RCMV PCV2-specifikus ellenanyagtermelést beindító képességét először egy egyszerű *in vivo* kísérlettel vizsgáltuk. Ennek során 5–5 egeret immunizáltunk CMV-vel, rekombináns CMV-antigénnel és PBS-sel. Az immunizálásokat 2 hét múlva megismételtük, majd újabb két hét elteltével az állatokból vérmintát vettünk és ebből PCV2-specifikus IgG-ellenanyagszintet mértünk indirekt IF módszer segítségével. Antigénként PCV2-cap-fehérjét expresszáló, Sf-9-sejtenyészetben szaporított és fixált rekombináns baculovírust használtunk, amely a PCV2-cap teljes antigénkészletét tartalmazza. Az RCMV-vel immunizált csoport állataiban minden esetben mérhető PCV2-elleni antitesttiter jelent meg és átlagosan 1:140 körül alakult. Sem a CMV-vel, sem a PBS-sel oltott állatokban nem mutattunk ki ilyen ellenanyagot. Az előállított rekombináns nanopartikulumon található mindössze 10 PCV2-eredetű aa alkalmas volt tehát élő állatban specifikus immunválasz indukálására. Ge és mtsai (2013) a PCV2 cap utolsó 5 aminosavából álló epitóppal nem tudtak Kunming egereket immunizálni. Ezt okozhatta például az egérfajok közötti genetikai különbség, de az epitópok eltérő hosszúsága is, miszerint az immunogenitáshoz nem elég pusztán az utolsó öt aminosav. Emellett szerepet játszhat az antigének eltérő szerkezete is, Ge és mtsai. a használt antigént fágvíruson termelték, melynek kapszidszerkezete a CMV CP-től és a PCV2-iriontól is eltér.

A következő kísérletben már a célállatfajban, a sertésben vizsgáltuk az immunogenitás mellett azt is, hogy a kialakított védelem képes-e csökkenteni a PCV2 szaporodását, immunizálással és azt követően fertőzéses kísérlettel. Az állatkísérlet során a malacokat három csoportra osztottuk, kétszer immunizáltuk őket 10 nap különbséggel, az egyik csoportban az adjuvált RCMV-vel, a pozitívkontroll-csoportban kereskedelmi forgalomban kapható, inaktivált vakcinával, a harmadik csoportban PBS-sel, és a második immunizálást követően 10 nappal élő PCV2-vírussal fertőztük meg őket. A kísérlet összesen két hónapig tartott és az állatokból hetente vettünk vérmintát a PCV2-specifikus ellenanyagok kimutatására. Az ellenanyagok legelőször az inaktivált vakcinával oltott állatokban jelentek meg, már a második oltás idején kimutathatóak voltak. Ezzel szemben az RCMV-vel immunizált malacok mintáiban csak a második immunizálás után, a fertőzéskor vett szérummintában találtunk a módszerünkkel kimutatható PCV2-specifikus IgG-ellenanyagot. A negatívkontroll-csoport állataiban a várakozásnak megfelelően csak a kísérletes fertőzés után jelent meg ez az ellenanyag.

A rekombináns nanopartikulum által kiváltott ellenanyag-titer-értékek megközelítették ugyan az inaktivált vakcina hatékonyságát, de a kísérlet időtartama alatt nem érték el azt. A mért ellenanyagszinteket több tényező befolyásolta. Az inaktivált vakcinában szövettenyészetben szaporított és ezután előlt, teljes antigénkészlettel rendelkező PCV2

található, az ellene képződő ellenanyagok több epitópra is specifikusak és a használt indirekt IF-teszt segítségével mindegyikük detektálható, míg az egyetlen PCV2-epitópot, a cap-fehérje 223 aa-ából mindössze 10-et hordozó RCMV ellen képződő ellenanyag-féleségek közül feltételezhetően csak egy specifikus a PCV2-epitóra, a többi a CMV egyéb részleteihez képes kötődni, ezért iIF-tesztünkben ki sem mutatható. Ennek fényében nem meglepő tehát, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható vakcinával oltott állatokban mért szintek korábban érték el a kimutathatósági határt, az viszont igen, hogy a kétféle immunogén erőssége közötti különbség leginkább az időbeli eltolódásban jelent meg, a kísérlet végére kialakult ellenanyagszintek viszont közelítettek egymáshoz. A használati utasítás szerint az inaktivált vakcinát csak egyszer javasolt adni egy malacnak, mi a kísérlet egységessége miatt adtuk kétszer, de mindkétszer az egyszeri oltás esetén javasolt adagban. A túl nagy mennyiségben jelen lévő ellenanyag csökkentheti a második oltás hatékonyságát. Ezen kívül az is magyarázhatja az egymáshoz közelítő végső titerértékeket az első két csoportban, hogy az élő vírussal történő fertőzés ezekben a vakcináson már áthangolt állatokban maximális immunválaszt válthat ki és ez az alkalmazott kísérleti körülmények között egybe esik a kísérlet végén mért titerekkel. A negatívkontroll-csoportban a PCV2 ilyen mértékű antigénhatása azért nem jelentkezik, mert ezek az állatok először találkoztak az antigénnel. Nagyon fontos lenne annak vizsgálata, hogy a kialakult nagy ellenanyag-titer mennyi ideig marad fenn a hízókban.

A kísérlet végén a malacok szervmintáiból PCV2-DNS-kimutatást végeztünk qPCR módszerrel. Az inaktivált vakcinával immunizált állatok közül egyikben sem mutattuk ki a vírus DNS-ét, míg a nem vakcinázott csoport minden állatában megeredt a fertőzés, a vizsgált 8 szerv közül legalább háromban. A gátorközi nyirokcsomókból és lépéből vett szervminták esetében mindhárom állat pozitívnak bizonyult. Az RCMV-vel immunizált csoport malacai közül két állat esetében mutattuk ki a vírus DNS-t, összesen 3 mintában, két gátorközi nyirokcsomóból és egy tüdő mintából. A vakcinajelölt nem akadályozta meg a vírussal való fertőződést, de annak szaporodását a szervekben lecsökkentette. A qPCR módszerünk használatával semelyik állatban nem mutattunk ki vírusürítést a bélsárral, valamint a szérummintákban sem találtunk PCV2-DNS-t. Ezt az okozhatta, hogy nem használtunk elég nagy mennyiségű vírust a kísérletes fertőzéshez, emellett a használt módszerek érzékenysége is okolható lehet. A qPCR ismert mennyiségű, PCV2-ORF2-t hordozó plazmid esetében nagyon kevés, akár 10 kópiát is képes volt kimutatni, így inkább a DNS-kivonás során következhetett be a negativitást okozó hiba. Utólag úgy ítéltük meg, hogy eredményesebb lett volna végbéltampon helyett egyedileg bélsármintát gyűjteni és kimondottan bélsárból történő DNS izolálásra fejlesztett kit-et használni.

A parenterálisan adott rekombináns CMV sikeresen csökkentette a vírus szaporodását a kísérletben az oltatlan állatokban tapasztaltakhoz képest, de nem olyan mértékben, mint az

inaktivált vírussal vakcinázott állatok esetében. Ez az eredmény azért figyelemre méltó, mert az RCMV-antigén a PCV2 kapszidjából mindössze egy igen rövid szakaszt tartalmaz, ráadásul a fertőzésre használt R15 jelzésű élő PCV2-törzs utolsó 10 aminosava az RCMV létrehozásához használt aminosavakkal nem egyezik meg teljes mértékben (az utolsó előtti aminosav az R15 törzsben a bázikus lizin helyett a poláros aszparagin), mégis kialakult bizonyos szintű keresztvédelem. Ez azt is jelenti, hogy az ezen a szakaszon változatos aminosavsorrendű kapszidfehérjék közül egy, vagy néhány verzió antigénként való alkalmazása kialakíthat megfelelő szintű keresztvédelmet, ennek kiderítése a lehetséges variációk nagy száma (30-féle eddig megismert szekvencia) miatt azonban önálló kísérleteket igényelne. Az epitóp 10 aminosava közül ugyanis csak az első (fenilalanin) és a negyedik (lizin) konzervált a PCV2-cap-szekvenciák között. Az R15-törzsben található epitóp a leggyakrabban előforduló aminosavsorrendet képviseli (**10. táblázat**).

A következő állatkísérletben a malacokat takarmányba kevert, tisztított RCMV-vel négy alkalommal szájon át immunizáltuk, negatív kontrollként semmilyen kezelésben nem részesülő állatokat használtunk. A malacokban nem volt kimutatható maternális ellenanyag és a nem immunizált állatok a kísérlet végéig szeronegatívak maradtak.

Két állatban már a második héten kimutattunk PCV2-specifikus ellenanyagokat és a csoportban a többi malac is szeropozitívvá vált a következő hétre. A szérum-IgG kimutatására ugyanazt a módszert használtuk, mint az előző kísérletben a parenterális immunizálást követő ellenanyag szintek mérése során és az ott kapott eredményekkel összevethető szérum-IgG-szinteket kaptunk eredményül. Bebizonyosodott, hogy ekkora, viszonylag nagy adagban adva az RCMV-virionok sertésekben is túlélnek a gyomor-bélcsatornában uralkodó körülményeket és egyszerűen, szájon át adva is képesek specifikus immunválasz kiváltására.

A számítógépes modellezés alapján megtalált és kiválasztott PCV2-cap-fehérje szakaszt expresszálo RCMV tehát stabil, jól szaporítható virionná áll össze és tisztított formában orális immunizálásra használható, az ellene képződő ellenanyagok a PCV2 szaporodását visszafogják. A nanopartikulum immunogenitásával kapcsolatban a biztató *in vitro* és *in vivo* kísérletek után azonban még igen sok kérdés megválaszolatlan maradt. Először is szükséges volna az orálisan immunizált állatokban, a bélcsatornában és más, például a légutakat borító nyálkahártyákon termelődő, PCV2-specifikus szekretoros IgA-ellenanyagokat kimutatni és mérni, hiszen ezek a molekulák képesek a kórokozó szervezetbe jutását megakadályozni. A kereskedelmi forgalomban kapható PCV2-vakcinák közül erre jelenleg egyik sem képes. Másodsorban a nanopartikulum által indukált celluláris immunitás meglétéről és folyamatairól semmilyen információval nem rendelkezünk. Ezen kívül a későbbiekben annak a vizsgálata is szükségessé válik, hogy az RCMV-vel fertőzött levelek a virionok kitisztítása nélkül is alkalmasak-e az immunizálásra, és ha igen, akkor nem

csak a takarmányozási szempontból értéktelen dohánylevél, hanem előnyös beltartalmi értékekkel rendelkező fertőzött takarmánynövények „vakcinabeadási módként” való használhatóságát is meg kell vizsgálni. Végül elengedhetetlen lenne a szájon át történő immunizálás gyakoriságának optimalizálása az orális tolerancia kialakulásának elkerülése érdekében.

10. táblázat. A PCV2-vírusokban előforduló 5. számú epitóp aminosavsorrend-változatai és gyakoriságuk egy korábbi cap-gén analízishez felhasznált szekvenciagyűjtemény (Lőrincz, 2014) alapján. A 0,16%-os gyakoriság egyedi előfordulású szekvenciának felel meg.

Az epitóp aminosav sorrendje	Az epitóp gyakorisága
FNLKDPPLNP	63,20%
FNLKDPPLKP	20,34%
FNLKDPPLNPK	14,91%
FNFKDPPLNP	0,62%
FNLKDPPLHPK	
FILKDPLNK	0,47%
FNLKDPPLEP	
FNLKDPPLNPR	
FNLKDPPLNTK	
FILKDPLNE	0,31%
FNLKDPPL	
FNLKDPPLHP	
FNLKDPPLNLNE	
FSLKDPPLNP	
FNFKDPPLNPK	0,16%
FNLKDPHLTLK	
FNLKDPLLNP	
FNLKDPPLKPK	
FNLKDPPLKPKQ	
FNLKDPPLKTLNE	
FNLKDPPLNT	
FNLKDPPLTP	
FNLKDPPT	
FNLKDPSLNP	
FNLKDSPLNP	
FNLKEPPIKP	
FNLKGPPLNP	
FNLKTPHLTLNE	
FSLKDPPLNPK	
FYFKDPPLNP	

9.2. PCV2 CAP GÉN EXPRESSZIÓ *T. PSEUDONANA* MIKROALGÁBAN

Az átmeneti antigén-expressziót követően próbálkoztunk a teljes PCV2 cap fehérje termelésével is a *T. pseudonana* mikroalgafajban. E gazdafaj esetében a stabil transzformációra használható módszerek már rendelkezésre álltak és korábban sikeresen használták más, állategészségügyi szempontból jelentős antigének előállítására.

9.2.1. A PCV2-cap-gént tartalmazó plazmidvektor előállítása

Az Európában kereskedelmi forgalomban kapható vakcinák olyan PCV2-vírusok antigénkészletét tartalmazzák, amelyek kivétel nélkül a PCV2A genotípusba tartoznak, miközben ez a genotípus világszerte visszaszorulni látszik és a PCV2B, azon belül is az 1A csoportba tartozó vírusok váltak endémiássá. Antigén-előállításra ezért munkánk során a Magyarországon és környékén előforduló PCV2B 1A vírusokra jellemző konszenzus-szekvenciát használtunk fel, amelyet az itt előforduló vírusok kapszidfehérjéinek alignmentjéből számítottunk. Ezután a nagymértékű génexpresszió reményében megrendeltük a gén kodonoptimalizálását és szintézisét. A kodon optimalizálás során a PCV2 cap 233 aminosava közül 160 kodonja szorult módosításra. A megrendelt és leszintetizált gént a Gateway technológia segítségével expressziós vektorba helyeztük át, amit szekvenálással ellenőriztünk.

9.2.2. A *T. pseudonana* sejtek transzformálása

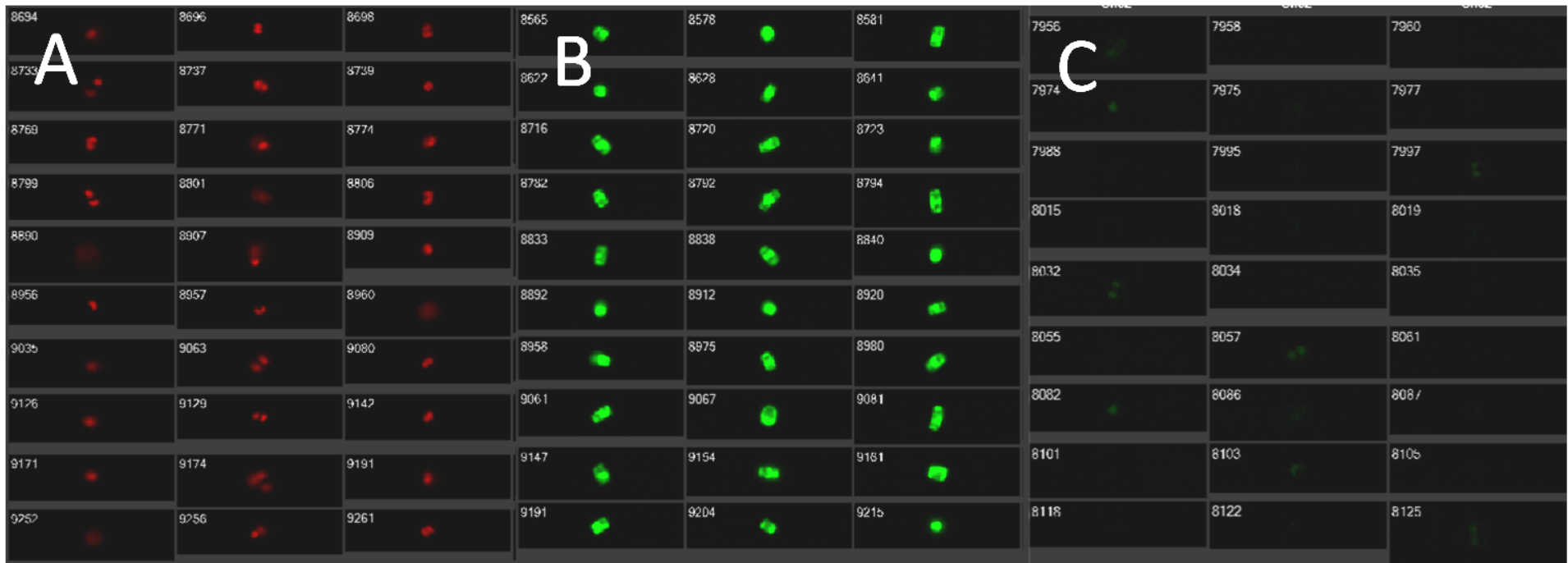
A kitsztított DNS-t W-hordozórészecskékre kötöttük és kontrollvektorokkal együtt bioliztikus módszerrel a *T. pseudonana* sejtekbe juttattuk. A transzformált sejteket egy napig nem szelektív tápfolyadékban hagytuk szaporodásnak indulni, majd antibiotikum-(NAT) szelekció alá helyeztük őket. A várakozásoknak megfelelően a nem transzformált sejteket tartalmazó leveskultúrában a sejtek egy hét alatt elpusztultak, tehát az antibiotikum koncentrációja megfelelő volt a szelekcióhoz. A pozitívkontroll-csoport esetében mind a levestenyészetben, mind az agarlemezekeken tapasztaltunk sejt/telep-növekedést. A PCV2-cap–GFP fúziós génnel transzformált mikroalgák növekedése a levestenyészetekben a pozitívkontroll-csoportéhoz képest késleltetett volt, a sejtek sokkal lassabban tértek magukhoz a transzformálás után. A szelektív ASW-vel készített agar lemezeken egyáltalán nem tapasztaltunk telep-növekedést ezeknél a csoportoknál.

A sejtek növekedési üteme, a PCR-eredmények, a mikroszkópos vizsgálatok során tapasztaltak és az áramlási citometria adatai mind arra engednek következtetni, hogy az #1 és #2 számú csoportokban csupán azok a sejtek maradtak életben, amelyek

pMHL_079_cap-vektort nem, csak az antibiotikumrezisztenciát kódoló pTpNAT-plazmidot tartalmazták.

A W-partikulák sejtekbe lövése után a *T. pseudonana* mikroalgáknak többféle sorsa lehet. Ahogy a **16. ábrán** jól látható, a génpuska célzási pontatlansága miatt a carrier részecskék a szélesztett sejtek körén belül csak kis területre csapódnak be, így a legtöbb sejtet egyáltalán nem érinti a transzformálás. Lesznek olyan sejtek, amelyeket a módszerrel járó erőteljes fizikai behatás elpusztít. Ne felejtjük el, hogy a kovamoszatok igen erős, szilárd szilícium-dioxid sejtfallal rendelkeznek, amelynek áthatolása csak igen nagy nyomással felgyorsított részecskékkel lehetséges. A bioliztikus transzformáció során kotranszformáció esetén a kétféle plazmid mennyisége megközelítőleg egyenlő és a legtöbb mikrokarrier molekula mindkettőt megköti, ezért a túlélő sejtek nagy része tartalmazni fogja őket. Nagy valószínűséggel lesznek azonban olyan részecskék, amelyek csak az egyik féle vektort kötötték meg. Ha egy sejtbe például csak pTpNAT-plazmidot hordozó részecske jut, és a sejt túléli a részecske bombázást, akkor növekedésnek indul szelektív körülmények között is, ezért is van az, hogy az eGFP-pozitív kultúrákban sem 100%-os a zöld fehérje expressziója. Ezeknek a sejteknek az aránya elméletileg nagyságrendekkel kisebb, mint a kotranszformált sejteké.

A #1 és #2 számú kultúrákban nem láttunk eGFP-expressziót és PCV2-cap-gén jelenlétét sem tudtuk kimutatni. Ennek magyarázata lehet, hogy az erős *fcg*-promoter és terminátor szakaszok alkalmazása és a kodonoptimalizálás ellenére nem, vagy a detektálási küszöb alatti mennyiségű cap-GFP fúziós fehérje képződött. Ha ez volt a helyzet, és az összes kotranszformált sejt szaporodott, pusztán a génexpresszió maradt el, akkor a szelektív tenyésztés során a pozitív kontroll #3 számú kultúráéhoz hasonló dinamikával kellett volna sejtek szaporodásának végbemennie, emellett a PCV2-cap-gén az ezekből a sejtekből származó mintákban PCR-rel kimutatható lett volna. Feltételezésünk szerint sokkal valószínűbb, hogy a génexpresszió sikeresen végbement és a fúziós fehérje kifejeződött, de toxikus volt a gazdasejtek számára és emiatt a kotranszformált sejtek elpusztultak. A #1 és #2 kultúrákban így csak azok a sejtek maradhattak életben, amelyek csak a pTpNAT-rezisztencia-plazmidot hordozták és mivel ezek száma a kotranszformáció után nagyon kevés, a sejtek nem pusztultak el, de szaporodásuk csak késleltetve érte el a látható szintet. Ennek a feltételezésnek megfelelően, hogy a már felszaporodott sejtek eGFP negatívnak bizonyultak és még az Imagestream módszerrel sem találtunk pozitív egyedeket (**17. és 19. ábrák**).



19. ábra. Az Imagestream képalkotó áramlási citométer által 40×-es objektívvel készített képek az egyes sejtekről. (A) A vörös (>550 nm hullámhosszúságú) fény kiszűrése nélkül készült képeken a sejtenként 2, apikálisan helyeződő kloroplaszt vörös színű, rendkívül erős autofluoreszcenciája jól látható. (B; C) A vörös fény teljes kiszűrésével készített felvételek a zöld csatornában. Még a szűrő használatával is jól kivehető a zöld tartományba „átfolyó” kloroplaszt autofluoreszcencia. A GFP pozitív #3 kultúra sejteiben a citoplazmában centrálisan felhalmozódott eGFP egyértelműen kivehető (B). A #1 kultúra sejteiben csupán a kloroplasztok adta háttér figyelhető meg (C).

A termelődő PCV2-cap toxicitásának oka feltételezhetően az, hogy a fehérjét az első 41 aminosavval, az NLS-szakasszal együtt kíséreltük meg kifejezni. Az NLS prokarióta sejtekre nézve ismertén toxikus (Liu és mtsai., 2001b). Baktériumokban azonban sejtpusztulást nem, csupán csökkent génexpressziót okoz. Eukarióta sejtekben az NLS toxicitása még nem egyértelmű, de mindenképpen érdemes lenne a szakasz elhagyásával is megpróbálkozni a sikeres antigénelőállítás érdekében.

A sejtek pusztulását okozó, korai cap–GFP fúziós fehérje expressziójáról röviddel a transzformálás utáni mRNS és Western blot vizsgálattal lehetne meggyőződni egy következő kísérletben.

9.3. KONKLÚZIÓ

A növények segítségével történő vakcinaantigén-termelés módszerei még kezdeti szakaszban járnak, a legelőrehaladottabb vakcinajelöltek pre-klinikai és korai fázisú humán kísérleti stádiumnál tartanak (Specht és Mayfield, 2014). Mi az antigénfejlesztés igen korai lépcsőfokainál kapcsolódtunk be ebbe a több évtizedes folyamatba. Az immundomináns szakaszok kiválasztása, sikeres előállítása, az epitópok immunogenitásának *in vitro* és *in vivo* vizsgálata után még rengeteg tényező szorul tisztázásra, főleg egy idáig tömegesen még soha nem alkalmazott platform (növényekben előállított, ehető vakcina) esetén. Az ígéretesnek talált antigénjelöltek körét a további vizsgálatok (statisztikailag értékelhető, nagy állatszámot használó és a gyakorlati körülményeket jobban szimuláló telepi kipróbálás, hosszútávú alkalmazás, biztonságossági, gazdaságossági elemzések stb.) jelentősen leszűkítik. Ezen kívül az antigénelőállításra alkalmas modellek a használt kórokozón kívül más patogének elleni vakcinatermelésre megfelelőbbek lehetnek.

A PCV2 estében nem biztos, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható vakcinákhoz képest egy ehető, növényi vakcina előnyösebb lenne, ez vizsgálatainkból nem derült ki és nem is szerepelt céljaink között. Az viszont megerősítést nyert, hogy a megvizsgált antigénelőállító módszereknek van létjogosultsága az állatokban alkalmazható vakcinák előállításának területén.

10. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. *In vivo* kísérletekkel igazoltuk, hogy a CMV-vektor alkalmas szájon át történő immunizálásra és ennek eredményeként lokális eredetű szekretoros IgA indukcióra az emésztőcsatornában.

2. Számítógépes modellezéssel nyert szerkezeti kép alapján potenciális PCV2-kapszidfehérje-epitópokat azonosítottunk és meghatároztuk azok virionon elfoglalt térbeli elhelyeződését.

3. Elsőként inzertáltunk PCV2-kapszidfehérje-epitópokat a CMV-virion coat proteinjébe és megállapítottuk, hogy a PCV2-kapszid C-terminálisán elhelyezkedő, 10 aminosav méretű epitópja az eredetivel azonos antigenitású epitópként van jelen a CMV felszínén.

4. Egereket immunizálva megállapítottuk, hogy a PCV2 epitópot hordozó CMV vektor alkalmas PCV2-specifikus immunválasz indukálására.

5. A rekombináns nanopartikulák sertésekben nemcsak parenterális, de szájon át történő alkalmazással is képesek PCV2-specifikus ellenanyagválasz kiváltására.

6. Megállapítottuk, hogy a rekombináns vírussal parenterálisan immunizált sertésekben a vakcinázás nem akadályozta meg a vírussal történő fertőződést, de annak szaporodását csökkentette.

7. Elsőként alkalmaztunk mikroalaga expressziós rendszert a PCV2-kapszidfehérje előállítására céljából, és ennek során arra a megállapításra jutottunk, hogy a bakteriális expresszióhoz hasonlóan a fehérje a mikroalgákra nézve is toxikus lehet, feltehetően a nukleáris lokalizációs szignál jelenléte miatt.

11. IRODALOMJEGYZÉK

Alarcon, P., Rushton, J. és Wieland, B. 2013a. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England – an economic disease model. *Prev. Vet. Med.* 110. 88–102.

Alarcon, P., Rushton, J., Nathues, H. és Wieland, B. 2013b. Economic efficiency analysis of different strategies to control post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 subclinical infection in 3-weekly batch system farms. *Prev. Vet. Med.* 110. 103–118.

Allan, G.M., Phenix, K.V., Todd, D. és McNulty M.S. 1994. Some biological and physico-chemical properties of Porcine Circovirus. *J. Vet. Med. B.* 41. 17–26.

Allan, G.M., McNeilly, F., Cassidy, J.P., Reilly, G.A., Adair, B., Ellis, W.A. és McNulty, M.S. 1995. Pathogenesis of porcine circovirus: experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet. Microbiol.* 44. 49–64.

Allan, G., Krakowka, S., Ellis, J. és Charreyre, C. 2012. Discovery and evolving history of two genetically related but phenotypically different viruses, porcine circoviruses 1 and 2. *Virus. Res.* 164. 4–9.

Almo, S.C és Love, J.D. 2014. Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 26. 39–43.

Anjuère, F. és Czerkinsky, C. 2007. Mucosal immunity and vaccine development. *Med. Sci.* 23. 371–378.

Armbrust, E.V., Berges, J.A., Bowler, C., Green, B.R., Martinez, D és mtsai. 2004. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science.* 306. 79–86.

Armstrong, D. és Bishop, S.C. 2004. Does genetics or litters effect influence mortality in PMWS. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress; Hamburg, Germany; 809.*

Armstrong, E.P. 2010. Prophylaxis of cervical cancer and related cervical disease: a review of the cost-effectiveness of vaccination against oncogenic HPV types. *J. Manag. Care. Pharm.* 16. 217–230.

Backliwal, G., Hildinger, M., Chenuet, S., Wulhfard, S., de Jesus, M. és Wurm, F.M. 2008. Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions. *Nucleic Acids Res.* 36. e96.

Beach, N.M. és Meng, X.J. 2011. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res.* 164. 33–42.

Binns, A.N. 2002. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens*: 25 years and counting. *Trends. Plant. Sci.* 7. 231–233.

Brun, A., Bárcena, J., Blanco, E., Borrego, B., Dory, D., Escribano, J.M., Le Gall-Reculé, G., Ortego, J. és Dixon, L.K. 2011. Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development. *Virus Res.* 157. 1–12.

Bucarey, S.A., Pujol, M., Poblete, J., Nuñez, I., Tapia, C.V., Neira-Carrillo, A., Martinez, J. és Bassa, O. 2014. Chitosan microparticles loaded with yeast-derived PCV2 virus-like particles elicit antigen-specific cellular immune response in mice after oral administration. *Virology* 11. 149.

Calsamiglia, M., Segalés, J., Quintana, J., Rosell, C. és Domingo, M. 2002. Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 85. 574–579.

Carman, S., McEwen, B., DeLay, J., van Dreumel, T., Lulis, P., Cai, H. és Fairles, J. 2006. Porcine circovirus-2 associated disease in swine in Ontario (2004 to 2005). *Can. Vet. J.* 47. 761–762.

Caspari, K., Henning, H., Schreiber, F., Maass, P., Gössl, R., Schaller, C. és Waberski, D. 2014. Impact of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on boar semen quality and quantity using two different vaccines. *Theriogenology.* 82. 574–579.

Chi, J.N., Wu, C.Y., Chien, M.S., Wu, P.C., Wu, C.M. és Huang, C. 2014. The preparation of porcine circovirus type 2 (PCV2) virus-like particles using a recombinant pseudorabies virus and its application to vaccine development. *J. Biotechnol.* 181. 12–19.

Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merio, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P. and Nester, E.W. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell.* 11. 263–271.

Circovac használati utasítás, Merial, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000114/WC500061517.pdf

Clark, E.G. 1996. Pathology of postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs. *Proc. Western Can. Assoc. Swine Pract.* 22–25.

Crowther, R. A., Berriman, J. A., Curran, W. L., Allan, G. M. és Todd, D. 2003. Comparison of the Structures of Three Circoviruses: Chicken Anemia Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Beak and Feather Disease Virus. *J. Virol.* 77. 13036–13041.

Cságola, A., Kiss, I. és Tuboly, T. 2008. Detection and analysis of porcine circovirus type 1 in Hungarian wild boars: short communication. *Acta Vet. Hung.* 56. 139–144.

Cságola, A. 2009. Sertés circovírusok járványtani vizsgálata. PhD értekezés. <http://huveta.hu/bitstream/10832/157/1/CsagolaAttilaDissertation.pdf>

Daniell, H. 2002. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat. Biotechnol.* 20. 581–586.

Darley, W.M. és Volcani, B.E. 1969. Role of silicon in diatom metabolism. A silicon requirement for deoxyribonucleic acid synthesis in the diatom *Cylindrotheca fusiformis* Reimann and Lewin. *Exp. Cell Res.* 58. 334–342.

Darley, W.M. és Volcani, B.E. 1971. Synchronized cultures: Diatoms *Meth. Enzymol.* 23A. 85–96.

Dreesen, I.A., Charpin-El Hamri, G. és Fussenegger, M. 2010. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *J. Biotechnol.* 145. 273–280.

Dupont, K., Nielsen, E.O., Baekbo, P. és Larsen, L.E. 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet. Microbiol.* 128. 56–64.

Ellis, J.A., Bratanich, A., Clark, E.G., Allan, G., Meehan, B., Haines, D.M., Harding, J., West, K. H., Krakowka, S., Konoby, C., Hassard, L., Martin, K. és McNeilly, F. 2000. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12. 21–27.

Falciatore, A., Casotti, R., Leblanc, C., Abrescia, C. és Bowler, C. 1999. Transformation of nonselectable reporter genes in marine diatoms. *Mar. Biotechnol.* 1. 239–251.

Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J.A., Schofield, O. és Taylor, F.J. 2004. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science.* 305. 354–360.

Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G. és Meng, X.J. 2003. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *J. Virol.* 77. 11232–11243.

Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F. és Meng, X.J. 2004a. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *J. Virol.* 78. 6297–6303.

Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Xu, Y., Potts, B. és Meng, X.J. 2004b. Detection and in vitro and in vivo characterization of porcine circovirus DNA from a porcine-derived commercial pepsin product. *J. Gen. Virol.* 85. 3377–3382.

Firth, C., Charleston, M.A., Duffy, S., Shapiro, B. és Holmes, E.C. 2009. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *J. Virol.* 83. 12813–12821.

Gagnon, C.A., Tremblay, D., Tijssen, P., Venne, M.H., Houde, A. és Elahi, S.M. 2007. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can. Vet. J.* 48. 811–819.

Gagnon, C.A., Music, N., Fontaine, G., Tremblay, D. és Harel, J. 2010. Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): a type 1 and type 2 PCV recombinant. *Vet. Microbiol.* 144. 18–23.

Ge, M., Yan, A., Luo, W., Hu, Y.F., Li, R.C., Jiang, D.L. és Yu, X.L. Epitope screening of the PCV2 Cap protein by use of a random peptide-displayed library and polyclonal antibody. *Virus Res.* 177. 103–107.

Gellért, A., Salánki, K., Tombácz, K., Tuboly, T. és Balázs, E. 2012. A cucumber mosaic virus based expression system for the production of porcine circovirus specific vaccines. *PLoS One.* 7. e52688.

Gilliland, S.M., Forrest, L., Carre, H., Jenkins, A., Berry, N., Martin, J., Minor, P. és Schepelmann, S. 2012. Investigation of porcine circovirus contamination in human vaccines. *Biologicals.* 40. 270–277.

Gleba, Y., Klimyuk, V. és Marillonnet, S. 2005. Magniffection--a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine.* 23. 2042–2048.

Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., López-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A. és Segalés, J. 2008. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet. Microbiol.* 128. 23–35.

Guo, L. J., Lu, Y. H., Wei, Y. W., Huang, L. P. és Liu, C. M. 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Viol. J.* 7. 273–285.

Halbur, P.G. 1998. Porcine respiratory disease. *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress* 15. 1–10.

Harding, J.C.S. és Clark, E.G. 1996. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 5. 201–203.

Hemann, M., Beach, N.M., Meng, X.J., Wang, C., Halbur, P.G. és Opriessnig, T. 2014. A live-attenuated and an inactivated chimeric porcine circovirus (PCV) 1-2 vaccine are both effective at inducing a humoral immune response and reducing PCV2 viremia and intrauterine infection in female swine of breeding age. *Can. J. Vet. Res.* 78. 8–16.

Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plazmid. *Nature.* 303. 179–180.

Huang, C.J., Lin, H. és Yang X. 2012. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39. 383–399.

Huang, L., Zhang, F., Tang, Q., Wei, Y., Wu, H., Guo, L., Fu, Y. és Liu, C. 2014. A recombinant porcine circovirus type 2 expressing the VP1 epitope of the type O foot-and-mouth disease virus is infectious and induce both PCV2 and VP1 epitope antibodies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98. 9339–9350.

Ingelvac Circoflex, Boehringer Ingelheim, használati utasítás.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000135/WC500061523.pdf

Joos, H., Timmerman, B., Montagu, M.V. és Schell, J. 1983. Genetic analysis of transfer and stabilization of *Agrobacterium* DNA in plant cells. *EMBO J.* 2. 2151–2160.

Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M. és Angenon, G. 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* 122 101–108.

Khan, I., Twyman, R.M., Arcalis, E. és Stoger, E. 2012. Using storage organelles for the accumulation and encapsulation of recombinant proteins. *Biotechnol. J.* 7. 1099–1108.

Khan, K.H. 2013. Gene expression in Mammalian cells and its applications. *Adv. Pharm. Bull.* 3. 257–263.

Khayat, R., Brunn, N., Speir, J.A., Hardham, J.M., Ankenbauer, R.G., Schneemann, A. és Johnson, J.E. 2011. The 2.3-angstrom structure of porcine circovirus 2. *J. Virol.* 85. 7856–62. Erratum in: *J. Virol.* 85. 11542.

Kim J. és Chae C. 2004. Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs. *The Vet. J.* 167. 104–106.

Klein, T.M., Wolf, E., Wu, D.R. and Sanford, J.C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature.* 327. 70–73.

Koprowski, H. és Yusibov, V. 2001. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine.* 19. 2735–2741.

Kristensen, C.S., Baadsgaard, N.P. és Toft, N. 2011. A meta-analysis comparing the effect of PCV2 vaccines on average daily weight gain and mortality rate in pigs from weaning to slaughter. *Prev. Vet. Med.* 98. 250–258.

Kurmann, J., Sydler, T., Brugnera, E., Buergi, E., Haessig, M., Suter, M. és Sidler, X. 2011. Vaccination of dams increases antibody titer and improves growth parameters in finisher pigs subclinically infected with PCV2. *Clin. Vaccine Immunol.* 18. 1644–1649.

Larochelle, R., Bielanski, A., Müller, P. és Magar, R. 2000. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J. Clin. Microbiol.* 38. 4629–4632.

Lefebvre, D.J., Costers, S., Van Doorselaere, J., Misinzo, G., Delputte, P.L. és Nauwynck, H.J. 2008. Antigenic differences among porcine circovirus type 2 strains, as demonstrated by the use of monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 89. 177–187.

Lekcharoensuk, P., Morozov, I., Paul, P.S., Thangthumnyom, N., Wajjawalku, W. és Meng, X.J. 2004. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J. Virol.* 78. 8135-8145.

Lewis, J.K., Bothner, B., Smith, T.J. és Siuzdak, G. 1998. Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95. 6774–6778.

Li, Q., Yafal, A.G., Lee, Y.M., Hogle, J. és Chow, M. 1994. Poliovirus neutralization by antibodies to internal epitopes of VP4 and VP1 results from reversible exposure of these sequences at physiological temperature. *J. Virol.* 68. 3965–3970.

Li, W.L., Wang, X.W., Ma, T., Feng, Z.X., Li, Y.F. és Jiang, P. 2010. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains isolated between 2001 and 2009: genotype PCV2b predominate in postweaning multisystemic wasting syndrome occurrences in eastern China. *Virus Genes.* 40. 244–251.

Lin, H.X., Ma, Z., Yang, X.Q., Fan, H.J. és Lu, C.P. 2014. A novel vaccine against Porcine circovirus type 2 (PCV2) and *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* (SEZ) co-infection. *Vet. Microbiol.* 171. 198–205.

Liu, Q., Tikoo, S.K. és Babiuk, L.A. 2001a. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology.* 285. 91-99.

Liu, Q., Willson, P., Attoh-Poku, S. és Babiuk, L.A. 2001b. Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein. *Protein Expr. Purif.* 21. 115–120.

Lloyd, A.M., Barnason, A.R., Rogers, S.G., Byrne, M.C., Fraley, R.T. and Horsch, R.B. 1986. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Science.* 234. 464–466.

Lot, H., Marrou, J., Quiot, J. B. és Esvan, C. 1972. Contribution à l'étude du virus de la mosaïque du concombre (CMV). I. Méthode de purification rapide du virus [in French]. *Ann. Phytopath.* 4. 25–38.

Lőrincz, M., Cságola, A., Biksi, I., Szeredi, L., Dán, A. és Tuboly, T. 2010. Detection of porcine circovirus in rodents - short communication. *Acta Vet. Hung.* 58. 265–268.

Lőrincz, M. 2014. A sertés circovírusok evolúciója. PhD értekezés. http://huveta.hu/bitstream/10832/1131/1/PhD_Lorincz_Marta.pdf

Ma, H., Shaheduzzaman, S., Williams, D.K., Gao, Y. és Khan, A.S. 2011. Investigations of porcine circovirus type 1 (PCV1) in vaccine-related and other cell lines. *Vaccine.* 29. 8429–8437.

Madec, F., Eveno, E., Morvan, P., Hamon, L., Blanchard, P., Cariolet, R., Amenna, N., Morvan, H., Truong, C., Mahe, D., Albina, E. és Justin A. 2000. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livest. Prod. Sci.* 63. 223–233.

Madec, F. 2001. NPA PMWS/PDNS Meeting East Yorkshire. Online. http://qpc.adm.slu.se/8_Animal_Health_at_Farm_level/page_13.htm.

Madson, D.M., Ramamoorthy, S., Kuster, C., Pal, N., Meng, X.J., Halbur, P.G. és Opriessnig, T. 2009a. Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected boars. *Vet. Res.* 40. 10.

Madson, D.M., Patterson, A.R., Ramamoorthy, S., Pal, N., Meng, X.J. és Opriessnig, T. 2009b. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.* 46. 707–716.

Madson, D.M. és Opriessnig, T. 2011. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. *Anim. Health. Res. Rev.* 12. 47–65.

Mahé, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnouldm C., Le Cann, P., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E. és Justin, A. 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J. Gen. Virol.* 81. 1815–1824.

Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V. és Gleba, Y. 2005. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat. Biotechnol.* 23. 718–723.

Mason, H.S., Lam, D.M., Arntzen, C.J. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89. 11745–11749.

Mason, H.S., Warzecha, H., Mor, T. és Arntzen, C.J. 2002. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol. Med.* 8. 324–329.

Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M. és Porro, D. 2012. Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol. Biol.* 824. 329–358.

Mavrommatis, B., Offord, V., Patterson, R., Watson, M., Kanellos, T., Steinbach, F., Grierson, S. és Werling, D. 2014. Global gene expression profiling of myeloid immune cell subsets in response to in vitro challenge with porcine circovirus 2b. *PLoS One.* 9. e91081.

McAleer, W.J., Buynak, E.B., Maigetter, R.Z., Wampler, D.E., Miller, W.J. és Hilleman, M.R. 1984. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature.* 307. 178–180.

Misinzó, G., Delputte, P.L., Meerts, P., Lefebvre, D.J. és Nauwynck, H.J. 2006. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *J. Virol.* 80. 3487–3494.

Mochizuki, T. és Ohki, S.T. 2012. Cucumber mosaic virus: viral genes as virulence determinants. *Mol. Plant. Pathol.* 13. 217–225.

Nascimento, I.P. és Leite, L.C. 2012. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45. 1102–1111.

Natilla, A., Piazzolla, G., Nuzzaci, M., Saldarelli, P., Tortorella, C., Antonaci, S. és Piazzolla, P. 2004. Cucumber mosaic virus as a carrier of a hepatitis C virus-derived epitope. *Arch. Virol.* 149. 137–154

Nuzzaci, M., Piazzolla, G., Vitti, A., Lapelosa, M., Tortorella, C., Stella, I., Natilla, A., Antonaci, S. és Piazzolla, P. 2007. Cucumber mosaic virus as a presentation system for a double hepatitis C virus-derived epitope. *Arch. Virol.* 152. 915–928.

Nuzzaci, M., Vitti, A., Condelli, V., Lanorte, M.T., Tortorella, C., Boscia, D., Piazzolla, P. és Piazzolla, G. 2010. In vitro stability of Cucumber mosaic virus nanoparticles carrying a Hepatitis C virus-derived epitope under simulated gastrointestinal conditions and in vivo efficacy of an edible vaccine. *J. Virol. Methods.* 165. 211–215.

van Oers, M.M., Pijlman, G.P. és Vlak, J.M. 2014. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: From dark horse to mainstream technology. *J. Gen. Virol.* doi: 10.1099/vir.0.067108-0.

Olvera, A., Cortey, M. és Segalés, J. 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology*. 357. 175–185.

Opriessnig, T., Ramamoorthy, S., Madson, D.M., Patterson, A.R., Pal, N., Carman, S., Meng, X.J. és Halbur, P.G. 2008. Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *J. Gen. Virol.* 89. 2482–2491.

Opriessnig, T., Madson, D.M., Schalk, S., Brockmeier, S., Shen, H.G., Beach, N.M., Meng, X.J., Baker, R.B., Zanella, E.L. és Halbur, P.G. 2011. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination is effective in reducing disease and PCV2 shedding in semen of boars concurrently infected with PCV2 and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Theriogenology*. 76. 351–360.

Ózsvári, L. és Búza, L. 2015. Sertéshizláló telepek technológiai színvonalának, főbb termelési mutatóinak és légzőszervi tünetegyüttese (PRDC) menedzsmentjének összehasonlító vizsgálata. *Magy. Állatorv. Lapja*. 137. 79-92.

Patterson, A.R., Madson, D.M., Halbur, P.G. és Opriessnig T. 2011. Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after natural exposure. *Vet. Microbiol.* 149. 225–229.

Pennock, G.D., Shoemaker, C. és Miller, L.K. 1984. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol. Cell. Biol.* 4. 399–406.

Pesch, S., Schmidt, U. és Ohlinger, V.F. 2000. Proliferative necrotizing pneumonia: a result of coinfection with porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *Pig Progress*. 28–29.

Piazzolla, G., Nuzzaci, M., Tortorella, C., Panella, E., Natilla, A., Boscia, D., de Stradis, A., Piazzolla, P. és Antonaci, S. 2005. Immunogenic properties of a chimeric plant virus expressing a hepatitis C virus (HCV)-derived epitope: new prospects for an HCV vaccine. *J. Clin. Immunol.* 25. 142–152.

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document

library/EPAR-_Product_Information/veterinary/000135/WC500061523.pdf

Poulsen, N., Chesley, P.M. és Kröger, N. 2006. Molecular genetic manipulation of the diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). J. Phycol. 42. 1059–1065.

Puvanendiran, S., Stone, S., Yu, W., Johnson, C.R., Abrahante, J., Jimenez, L.G., Griggs, T., Haley C., Wagner .B. és Murtaugh M.P. 2011. Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV 2 exposure and infection in swine finisher herds. Virus Res. 157. 92–98.

Quintana, J., Segalés, J., Calsamiglia, M. és Domingo, M. 2006. Detection of porcine circovirus type 1 in commercial pig vaccines using polimerase chain reaction. The Vet. Journal. 171. 570–573.

Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A. és Posewitz, M.C. 2010. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. Eukaryot. Cell. 9. 486–501.

Ramachandra, T. V., Mahapatra, D. M., Karthick, B. és Gordon, R.. 2009. Milking diatoms for sustainable energy: biochemical engineering versus gasoline-secreting diatom solar panels. Ind. Eng. Chem. Res. 48. 8769–8788.

Rao, A.Q., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Shahid, A.A., Husnain, T. és Riazuddin, S. 2009. The myth of plant transformation. Biotechnol. Adv. 27. 753–763.

Rasala, B. A. és Mayfield, S. P. 2015. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional and medical uses. Photosynth. Res. 123. 227–239.

Roessler, P.G., Bleibaum, J.L., Thompson, G.A. és Ohlrogge, J.B. 1994. Characteristics of the gene that encodes acetyl-CoA carboxylase in the diatom *Cyclotella cryptica*. Annals of the New York Academy of Sciences. 721. 250–256.

Rose, N., Larour, G., Le Diguerher, G., Eveno, E., Jolly, J.P., Blanchard, P., Oger, A., Le Dimna, M., Jestin, A. és Madec, F. 2003. Risk factors for porcine post-weaning

multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. *Prev. Vet. Med.* 61. 209–225.

Rosell, C., Segalés, J., Ramos-Varta, J.A., Folch, J.M., Rodriguez-Arriola, G.M., Duran, O., Balasch, M., Plana-Duran, J. és Domingo, M. 2000. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet. Rec.* 146. 40–43.

Royer, R.L., Nawagitgul, P., Halbur, P.G. és Paul, P.S. 2001. Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *Swine Health Prod.* 9. 281–284.

Saha, D., Lefebvre, D.J., Ducatelle, R., Doorselaere, J.V. és Nauwynck, H.J. Outcome of experimental porcine circovirus type 1 infections in mid-gestational porcine foetuses. *BMC Vet. Res.* 7. 64.

Sahdev, P., Ochyl, L.J. és Moon, J.J. 2014. Biomaterials for nanoparticle vaccine delivery systems. *Pharm. Res.* 31. 2563–2582.

Salánki, K., Carrère, I., Jacquemond, M., Balázs, E. és Tepfer, M. 1997. Biological properties of pseudorecombinant and recombinant strains created with cucumber mosaic virus and tomato aspermy virus. *J. Virol.* 71. 3597–3602.

Sanford, J., Klein, T., Wolf, E. and Allen, N. 1987. Delivery of substances into cells and tissues using particle bombardment process. *J. Particle Sci. Tech.* 5. 27–37.

Schmoll, F., Lang, C., Steinrigl, A.S., Schulze, K. és Kauffold J. 2008. Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology.* 69. 814–821.

Segalés, J., Piella, J., Marco, E., Mateu-De-Antonio, E.M., Espuma, E. és Domingo, M. 1998. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Vet. Rec.* 142. 483–486.

Segales, J. és Domingo M. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet. Q.* 24. 109–124.

Segalés, J. 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 164. 10–19.

Shang, S.B., Jin, Y.L., Jiang, X.T., Zhou, J.Y., Zhang, X., Xing, G., He, J.L. és Yan, Y. 2009. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2. *Mol. Immunol.* 46. 327–334.

Silva, J.G., Coimbra, E.C., Jesus, A.L., Mariz, F.C., Silva, K.M., Lobato, Z.I., Campos, A.C., Coutinho, L.C., Castro, R.S. és Freitas, A.C. 2014. Secretory expression of Porcine Circovirus Type 2 capsid protein in *Pichia pastoris*. *J. Virol. Methods.* 207. 226–231.

Smith, G.E., Vlak, J. és Summers, M.D. 1983. Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedrin and 10,000 molecular-weight protein. *J. Virol.* 45. 215–225.

Smith, T.J., Chase, E., Schmidt, T. és Perry, K.L. 2000. The structure of cucumber mosaic virus and comparison to cowpea chlorotic mottle virus. *J. Virol.* 74. 7578-7586.

Sorokin, A.P., Ke, X., Chen, D. és Elliott, M.C. 2000. Production of fertile transgenic wheat plants via tissue electroporation. *Plant. Sci.* 156. 227–233.

Specht, E.A. és Mayfield, S.P. 2014. Algae-based oral recombinant vaccines. *Front. Microbiol.* 5. 60.

Suvaxyn PCV, Zoetis, használati utasítás.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000149/WC500069200.pdf

Tacket, C.O. 2009. Plant-based oral vaccines: results of human trials. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 332. 103–117.

Thacker, E.L. 2001. Porcine respiratory disease complex – what is it and why does it remain a problem? *The Pig Journal.* 48. 66–70.

Tischer, I., Rasch, R. és Tochtermann, G. 1974. Characterization of papovavirus- and picornavirus- like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl. Bakteriol. Orig. A.* 226. 153–167.

Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W. és Koch, M.A. 1982. A very small porcine virus with a circular single-stranded DNA. *Nature.* 295. 64–66.

Tiwari, S., Verma, P.C., Singh, P.K. and Tuli, R. 2009. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol. Adv.* 27. 449–467.

Tombácz, K., Salánki, K., Gellért, Á., Tuboly, T. és Balázs, E. 2012. Az állat-egészségügyi célú vakcina-előállítás lehetőségei növények felhasználásával. *Magy. Állatorv. Lapja.* 134. 751–762.

Toplak, I., Lazic, S., Lipulovic, D., Prodanov-Radulovic, J., Becskei, Z., Dosen, R. és Petrovic, T. 2012. Study of the genetic variability of porcine circovirus type 2 detected in Serbia and Slovenia. *Acta Vet. Hung.* 60. 409–420.

Trible, B. R., Kerrigan, M., Crossland, N., Potter, M., Faaberg, K., Hesse, R. és Rowland, R.R.R. 2011. Antibody recognition of porcine circovirus type 2 capsid protein epitopes after vaccination, infection, and disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 18. 749–757.

Trible, B.R. és Rowland, R.R. 2012. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Res.* 164. 68–77.

Uchida, M., Li, X.W., Mertens, P. és Alpar, H.O. 2009. Transfection by particle bombardment: delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochim. Biophys. Acta.* 1790. 754–764.

Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M.S., Jaing, C., McLoughlin, K., Gardner, S. és Delwart, E.L. 2010. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *J. Virol.* 84. 6033–6040.

Vitti, A., Piazzolla, G., Condelli, V., Nuzzaci, M., Lanorte, M.T., Boscia, D., de Stradis, A., Antonaci, S., Piazzolla, P. és Tortorella, C. 2010. Cucumber mosaic virus as the expression system for a potential vaccine against Alzheimer's disease. *J. Virol. Methods.* 169. 332–340.

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. és Baulcombe, D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33. 949–956.

Wacker, M., Linton, D., Hitchen, P.G., Nita-Lazar, M., Haslam, S.M., North, S.J., Panico, M., Morris, H.R., Dell, A., Wren, B.W. és Aebi, M. 2002. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*. 298. 1790–1793.

Wang, X., Jiang, P., Li, Y., Jiang, W. és Dong, X. 2007. Protection of pigs against post-weaning multisystemic wasting syndrome by a recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2. *Vet. Microbiol.* 121. 215–224.

Wang, F., Guo, X., Ge, X., Wang, Z., Chen, Y., Cha, Z. és Yang, H. 2009. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Res.* 145. 151–156.

Warzecha, H. és Mason, H.S. 2003. Benefits and risks of antibody and vaccine production in transgenic plants. *J. Plant. Physiol.* 160. 755–764.

West, K.H., Bystrom, J.M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G.M., Haines, D.M., Clark, E.G., Keakowka, S., McNeilly F., Konoby, C., Martin, K. és Ellis, J.A. 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11. 530–532.

Wiktor, J., Macfarlan, R.I., Reagan, K.J., Dietzschold, B., Curtis, P.J., Wunner, W.H., Kieny, M.P., Lathe, R., Lecocq, J.P., Mackett, M. és mtsai. 1984. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 81. 7194–7198.

Wright, K.E., Prior, F., Sardana, R., Altosaar, I., Dudani, A.K., Ganz, P.R. és Tackaberry, E.S. 2001. Sorting of glycoprotein B from human cytomegalovirus to protein storage vesicles in seeds of transgenic tobacco. *Transgenic Res.* 10. 177–181.

Xiao, C. T., Halbur, P. G. és Opriessnig, T. 2012. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States. *J. Virol.* 86. 12469.

Young, M.G., Cunningham, G.L. és Sanford, S.E. 2011. Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. *J. Swine Health. Prod.* 19. 175–180.

Zaenen, I., Van Larebeke, N., Van Montagu, M. and Schell, J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* 86. 109–127.

Zhai, S.L., Chen, S.N., Xu, Z.H., Tang, M.H., Wang, F.G., Li, X.J., Sun, B.B., Deng, S.F., Hu, J., Lv, D.H., Wen, X.H., Yuan, J., Luo, M.L. és Wei, W.K. 2014. Porcine circovirus type 2 in China: an update on and insights to its prevalence and control. *Virology* 14. 88.

12. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

12.1. A DOLGOZAT SORÁN FELHASZNÁLT CIKKEK

Tombácz, K., Gellért, A., Salánki, K., Balázs, E. és Tuboly, T. 2013. Oral immunogenicity of a plant virus vector based porcine circovirus antigen - short communication. *Acta Vet Hung.* 61. 547–552.

Gellért, A., Salánki, K., Tombácz, K., Tuboly, T. és Balázs, E. 2012. A cucumber mosaic virus based expression system for the production of porcine circovirus specific vaccines. *PLoS One.* 7. e52688.

Tombácz, K., Salánki, K., Gellért, Á., Tuboly, T. és Balázs, E. 2012. Az állategészségügyi célú vakcina előállítás lehetőségei növények felhasználásával. *MÁL.* 134. 751–762.

12.2. A DOLGOZAT ANYAGÁT KÖZVETLENÜL NEM KÉPEZŐ CIKKEK

Tombácz, K., Patterson, R., Grierson, S.S. és Werling, D. 2014. Lack of genetic diversity in newly sequenced porcine circovirus type 1 strains isolated 20 years apart. *Gen. Ann.* 2.

Lőrincz, M. és Tombácz, K. 2014. Hal circovírusok. *Magy. Állatorv. Lapja.* 2014. 136. 123–127.

Cadar, D., Cságola, A., Lőrincz, M., Tombácz, K., Spînu, M. és Tuboly, T. 2012. Detection of natural inter- and intra-genotype recombination events revealed by cap gene analysis and decreasing prevalence of PCV2 in wild boars. *Infect. Genet. Evol.* 12. 420–427.

Cadar, D., Dán, Á., Tombácz, K., Lőrincz, M., Kiss, T., Becskei, Z., Spînu, M., Tuboly, T. és Cságola, A. 2012. Phylogeny and evolutionary genetics of porcine parvovirus in wild boars. *Infect. Genet. Evol.* 12. 1163–1171.

Cságola, A., Lőrincz, M., Cadar, D., Tombácz, K., Biksi, I. és Tuboly, T. 2012. Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. *Arch. Virol.* 157. 1003–1010.

Cságola, A., Lőrincz, M., Tombácz, K., Wladár, Z., Kovács, E. és Tuboly, T. 2012. Genetic diversity of pigeon circovirus in Hungary. *Virus Genes*. 44. 75–79.

Cadar, D., Cságola, A., Lőrincz, M., Tombácz, K., Kiss, T., Spînu, M. és Tuboly, T. 2011. Genetic detection and analysis of porcine bocavirus type 1 (PoBoV1) in European wild boar (*Sus scrofa*). *Virus Genes*. 43. 376–379.

Cadar, D., Cságola, A., Lőrincz, M., Tombácz, K., Spînu, M. és Tuboly, T. 2011. Distribution and genetic diversity of porcine hokovirus in wild boars. *Arch Virol*. 156. 2233–2239.

12.3. ELŐADÁSOK

MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai Beszámoló, 2014. január 28. Budapest. Közép-Európából származó sertés circovírusok felmérése. Lőrincz Márta, Tombácz Kata, Cságola Attila, Tuboly Tamás

MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai Beszámoló, 2013. január 29. Budapest. Uborka-mozaikvírusban expresszált sertés circovírus vakcina immunogenitása sertésben. Tombácz Kata, Gellért Ákos, Salánki Katalin, Balázs Ervin, Tuboly Tamás

ATK Tudományos Nap, Felfedező kutatások az Agrártudományi Kutatóközpontban, 2012. november 14. Martonvásár. Uborka-mozaikvírus nanopartikulomokon alapuló állatorvosi vakcina fejlesztése sertés circovírus 2 ellen. Gellért Ákos, Salánki Katalin, Tombácz Kata, Tuboly Tamás, Balázs Ervin.

MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai Beszámoló, 2012. január 17. Budapest. Sertés circovírus elleni vakcina előállítására uborka-mozaikvírus alapú expressziós rendszer felhasználásával. Tombácz Kata, Gellért Ákos, Salánki Katalin, Tuboly Tamás, Balázs Ervin

MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai Beszámoló, 2012. január 17. Budapest. Új típusú sertés parvovírus fertőzések kimutatása. Cságola Attila, Lőrincz Márta, Cadar Dániel, Tombácz Kata, Biksi Imre, Tuboly Tamás.

MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai Beszámoló, 2011. január 25. Budapest. Kettes típusú sertés circovírus (PCV2) kimutathatósági határának vizsgálata egerekben. Jánosi Katalin, Kollár Anna, Cságola Attila, Tombácz Kata, Tuboly Tamás, Pénzes Zoltán.

MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai Beszámoló, 2011. január 25. Budapest. A különböző genotípusú galamb circovírusok magyarországi előfordulása. Cságola Attila, Csapó István, Lőrincz Márta, Tombácz Kata, Wladár Zsófia, Tuboly Tamás.

MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai Beszámoló, 2010. január 26. Budapest. Sertés hokovírusok Magyarországon. Cságola Attila, Lőrincz Márta, Tombácz Kata, Biksi Imre, Balka Gyula, Tuboly Tamás.

MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága Akadémiai Beszámoló, 2008. január 23. Budapest. Sertés circovírus fertőzöttség a közép–európai régióban. Cságola Attila, Tombácz Kata, Tuboly Tamás

12.4. POSZTER PREZENTÁCIÓK

IX. International Congress of Veterinary Virology, 2012. September 5. Madrid. Immunogenicity of a porcine circovirus epitope subunit. Kata Tombácz, Ákos Gellért, Katalin Salánki, Ervin Balázs, Tamás Tuboly

6th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Disease, 2011. June 12. Barcelona. Porcine parvovirus infections in wild boar populations of Romania. Dániel Cadar, Attila Cságola, Márta Lőrincz, Kata Tombácz, Ádám Dán, Marina Spînu, Tamás Tuboly.

6th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Disease, 2011. June 12. Barcelona. Prevalence of porcine parvoviruses in circovirus infected herds. Márta Lőrincz, Attila Cságola, Dániel Cadar, Kata Tombácz, Tamás Tuboly.

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A PhD munka anyagi háttérét az OTKA-NKTH 78317, 78675, 78608 konzorcium biztosította és az NKB 15929, valamint a KK-PhD pályázat egészítette ki. Konferencia részvételemet az NKB 15752 pályázat tette lehetővé. A Scripps Óceánográfiai Intézetben töltött időszakot a Campus Hungary B1/1SZ/10412 számú ösztöndíja biztosította.

Témavezetőmnek, Tuboly Tamásnak és munkatársaimnak, Cságola Attilának, Lőrincz Mártának, Cadar Dánielnek, Herbák Józsefnének, Salánki Katalinnak, Gellért Ákosnak, Balázs Ervinnek, Kreizinger Zsuzsának, Kovács Eszternek, Dán Ádámnak, Cseh Erikának, Labbancz Tibornak és nem utolsósorban TDK hallgatómnak, Zwillinger Andrásnak tartozom a legtöbb hálával a munka során nyújtott rengeteg segítségért.

A UCSD SIO tengerbiológia laboratórium dolgozóinak köszönöm az ott töltött időszakban a rendkívüli körülmények ellenére nyújtott támogatást.

Családomnak és barátaimnak pedig köszönöm a végtelen türelmet és szeretetet, amiben részesítettek és részesítenek.