

# УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ-ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

**Предмет:** Образложење теме докторске дисертације кандидаткиње Маје С. Младеновић Стоканић, мастер биохемичара, пријављене под насловом „Производња рекомбинантног протеина нуклеокапсида SARS-CoV-2 вируса и његова примена у развоју антигенског теста“.

**1. Научна област:** Хемијске науке

**Ужа научна област:** Биохемија

**2. Предмет научног истраживања**

Предмет истраживања у оквиру ове докторске дисертације је добијање рекомбинантног протеина нуклеокапсида SARS-CoV-2, као и развој ЕЛИСА теста за квантификацију N протеина базираног на поликлонским антителима из две различите врсте животиња.

Први део докторске дисертације биће фокусиран на експресију, пречишћавање, као и биохемијску и имунолошку карактеризацију рекомбинантног нуклеокапсида, најзаступљенијег протеина SARS-CoV-2. Посебна пажња биће посвећена његовој ефикасној и јефтиној производњи, што би тестирање и дијагностику на SARS-CoV-2 учинило приступачнијим.

Предмет другог дела докторске дисертације биће фокусиран на развој осетљивог и специфичног ELISA теста за квантификацију нуклеокапсидног протеина SARS-CoV-2 у биолошким течностима. Пречишћен рекомбинантни нуклеокапсид (N протеин) биће коришћен за имунизацију експерименталних мишева и зечева. Добијена високо специфична поликлонска антитела на N протеин вируса из имунизованих животиња биће изолована и пречишћена. Пречишћена антитела биће употребљена за развој сендвич ELISA теста за детекцију и квантификацију SARS-CoV-2 вируса базираног на поликлонским антителима из две животињске врсте која обезбеђују широк репертоар антитела на вишеструке епитопе N протеина.

### 3. Основне хипотезе

Болест КОВИД-19 први пут је пријављена у Кини у Вухану у децембру 2019. године, а 12. марта 2020. године је проглашена глобална пандемија која представља глобалну претњу за јавно здравље. Резултати секвенцирања целог генома су показали да је њен узрочник нови корона вирус, познат као SARS-CoV-2 и припада групи једноланчаних РНК вируса [1,2]. Брзо је постао глобални проблем јер је изазвао респираторне инфекције које могу имати веома тешке клиничке последице са смртним исходом. Брзо ширење вируса, недостатак имунитета код људи и ограничена доступност поузданих тестова у почетку пандемије претворили су ову болест у велики здравствени и друштвени проблем. Иако су велике биотехнолошке компаније убрзано развијале и производиле дијагностичке тестове и вакцине, у тренуцима највеће потражње њихова доступност је била недовољна, а високе цене представљале су ограничавајући фактор у контролисању болести и ширења пандемије [3].

Најпоузданији дијагностички тест за утврђивање инфекције новим коронавирусом је тренутно RT-PCR и изводи се узимањем бриса из носа или грла. Овај тест функционише тако што прво претвара вирусну једноланчану РНК у ДНК помоћу реверзне транскрипције, а затим умножава специфичне делове вирусног генома применом PCR методе. Највећа предност ових тестова је њихова висока специфичност и због тога се и сматрају златним стандардом у дијагностици SARS-CoV-2 изазваних инфекција.

Међутим, резултати RT-PCR теста могу бити лажно негативни из више разлога. То укључује лош квалитет узорка, прикупљање узорка у прераној или прекасној фази инфекције, неисправно руковање или транспорт узорка, оштећење вирусне РНК или инхибиција саме RT-PCR -а реакције различитим контаминантима ензима који се користе у овом тесту (реверзна транскриптаза, ДНК полимераза). Поред тога, извођење RT-PCR тестова је процес који траје релативно дуго и захтева изузетно добро обучен кадар, што негативно утиче на ефикасност и брзину тестирања, као и на контролу болести у најранијим фазама инфекције [4].

Серолошки и антигенски тестови који се базирају на препознавању N протеина SARS-CoV-2 имају различите намене и механизме детекције вируса или имунолошког одговора. Серолошко тестирање је важна метода за дијагнозу тешког акутног респираторног

синдрома корона вирус SARS-CoV-2 инфекција. Ови тестови детектују присуство антитела IgM и IgG у крви која су настала као одговор на инфекцију SARS-CoV-2 и показују да ли је особа била изложена вирусу [5]. Антитела обично постају детектабилна неколико дана до недеља након почетка инфекције. Због тога серолошки тестови нису погодни за рану дијагнозу акутне инфекције. Ови тестови се често користе за епидемиолошке студије, одређивање степена изложености популације вирусу и процену имунолошког одговора након вакцинације или природне инфекције. Антигенски тестови детектују присуство вирусних протеина, као што је N протеин, директно из узорака као што су брисеви носа или грла. Ови тестови показују тренутну, активну инфекцију. Базирају се на препознавању самих вирусних антигена (као што је N протеин), који су присутни у телу током активне инфекције. Антигенски тестови могу детектовати вирусне протеине у раној фази инфекције, често у року од неколико дана од почетка инфекције. Ови тестови се користе за брзу дијагнозу активне инфекције, посебно у клиничким окружењима, као и за масовно тестирање, због њихове брзине и једноставности.

Серолошки тестови детектују присуство антитела на протеине вируса, док антигени тестови детектују присуство самог протеина вируса. Важна компонента обе врсте тестова је рекомбинантно произведен протеин. Рекомбинантно произведени протеини нису инфективни, и тестови на бази рекомбинантних протеина се лакше стандардизују. Важно питање је, међутим, који од вирусних протеина одабрати за развој серолошког или антигенског теста. Правилним одабиром антигена, њихове комбинације, или фрагмената истих, могуће је постићи високу осетљивост и високу специфичност серолошких тестова [5]. Први серолошки тестови на рекомбинантне протеине SARS-CoV-2 су били на бази протеина нуклеокапсида, најзаступљенијег протеина SARS-CoV-2. Нуклеокапсид (N) протеин је кључна компонента у структури и функцији многих вируса, укључујући коронавирусе попут SARS-CoV-2, вируса одговорног за КОВИД-19. N протеин је један од најзаступљенијих вирусних протеина произведених током инфекције и игра фундаменталну улогу у животном циклусу вируса, посебно у паковању вирусног РНК генома. Рекомбинантна технологија омогућава производњу протеина у организмима који га природно не производе (хетерологна производња), што је од великог значаја за пречишћавање протеина који се после могу користити у различите сврхе. Најзначајнији организми за експресију рекомбинантних протеина су бактерије, квасци, инсекти и

еукариотске ћелије. Сваки од ових организама захтева одређену технологију за клонирање гена, производњу протеина и узгајање самог организма за експресију, која се разликује у својој специфичности. Клонирање гена у циљу производње протеина може поједноставити процес пречишћавања, захваљујући употреби специјално дизајнираних вектора који омогућавају лакше процесовање производа увођењем секвенци које се касније могу користити у поступку пречишћавања протеина.

Нуклеокапсидни протеин из коронавируса је један од кључних структурних протеина ових вируса. N протеин има молекулску масу од око 50 kDa. Значајан део његове структуре је неуређен, што му омогућава флексибилност у функцији [6]. Аминокиселинска секвенца N протеина је високо конзервирана, односно очувана, међу различитим врстама коронавируса, укључујући и оне који инфицирају људе. Садржи пет домена који су укључени у везивање вирусне РНК, [7,8] што је есенцијално за стабилизацију и заштиту геномске РНК. Поседује домен за димеризацију, који омогућава формирање димера, што је важно за његову функционалност. N протеин је високо имуноген, што значи да изазива јак имуни одговор у организму домаћина, има слабу подложност мутацијама и експримира се у великом броју копија по честици вируса. Због тога је чест избор за развој дијагностичких тестова и истраживање вакцина за коронавирусе. Иако је N протеин чест кандидат за антигене у дијагностичким тестовима и лако се производи у рекомбинантној форми, постоји ризик од неспецифичних реакција у серолошким тестовима, због његове високе конзервације међу различитим коронавирусима. Протеини нуклеокапсида су високо очувани међу члановима фамилије коронавируса, укључујући и оне који изазивају симптоме сличне прехлади у људској популацији [9].

Укратко, N протеин је кључна компонента коронавируса, игра значајну улогу у животном циклусу вируса и у имунолошком одговору домаћина, што га чини важним за истраживање и развој терапијских и дијагностичких алата.

#### **4. Циљ истраживања и очекивани резултати**

У оквиру ове докторске дисертације формулисано је неколико циљева:

1. Експресија рекомбинантног нуклеокапсида из SARS-CoV-2 у *E. coli*
2. Пречишћавање експримираног рекомбинантног нуклеокапсида из SARS-CoV-2.
3. Имунолошка и биохемијска карактеризација пречишћеног рекомбинантног нуклеокапсида из SARS-CoV-2.
4. Имунизација мишева и зечева пречишћеним рекомбинантним N протеином из SARS-CoV-2.
5. Пречишћавање и карактеризација поликлонских антитела добијених из серума мишева и зечева
6. Провера реактивности поликлонских антитела са N протеином коришћењем индиректне ЕЛИСЕ и вестерн блота
7. Развој исплативог сендвич ЕЛИСА теста за квантификацију N протеина базираног на поликлонским антителима из две животињске врсте
8. Аналитичка и клиничка валидација развијеног ЕЛИСА теста
9. Употреба N протеина у анализи серолошке реактивности на N протеин у дечијој популацији са потврђеним алергијама на респираторне и нутритивне алергене.

## **5. Методе истраживања**

С обзиром на захтеве исказане у циљевима, у току израде ове докторске дисертације биће коришћене следеће експерименталне методе:

- Биохемијске методе: одређивање концентрације протеина; електрофоретска метода анализе протеина (SDS PAGE); спектрометрија циркуларног дихроизма за карактеризацију рекомбинантног N протеина;
- Методе рекомбинантне технологије: креирање конструкта, трансформација рекомбинантног плазида у компетентне ћелије, индукција експресије рекомбинантног протеина, добијање солубилне фракције лизата;
- Хроматографске технике: афинитетна хроматографија са имобилизованим јоном метала (енг. Immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC) и јоноизмењивачка

хроматографија за пречишћавање N протеина, афинитетна хроматографија са имобилисаним Протеином А за пречишћавање продукованих антитела;

- Имунохемијске технике: ЕЛИСА тестови и имуноблот за имунолошку карактеризацију рекомбинантног N протеина и пречишћених антитела, као и за развој и валидацију ЕЛИСА теста за квантификацију N протеина;

- Методе протеомике: исецање трака са гела SDS PAGE и њихова дигестија у гелу, течна хроматографија-масена спектроскопија (LC-MS) у циљу биохемијске карактеризације рекомбинантног N протеина.

## 5. Литература:

1. Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., ... & Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265-269.
2. Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., ... & Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *nature*, 579(7798), 270-273.
3. Adhikari SP, Meng S, Wu YJ. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. *Infectious Diseases of Poverty*, Vol. 9, pp. 29, 2020.
4. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., ... & Tan, W. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*, 382(8), 727-733.
5. Petherick, A. (2020). Developing antibody tests for SARS-CoV-2. *The Lancet*, 395(10230), 1101-1102.
6. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., ... & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *nature*, 581(7807), 215-220.

7. Ye, Q., West, A. M., Silletti, S., & Corbett, K. D. (2020). Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Protein Science*, 29(9), 1890-1901.
8. Lu, S., Ye, Q., Singh, D., Cao, Y., Diedrich, J. K., Yates III, J. R., ... & Corbett, K. D. (2021). The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. *Nature communications*, 12(1), 502.
9. Yu, I. M., Oldham, M. L., Zhang, J., & Chen, J. (2006). Crystal structure of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein dimerization domain reveals evolutionary linkage between corona-and arteriviridae. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17134-17139.