

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra Biochemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Biochemistry**

Doktorský studijní program: Biochemie
Ph.D. study program: Biochemistry

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Produkce heterologních proteinů v rostlinách se zaměřením na antigeny odvozené od lidského papillomaviru (HPV 16)

Production of heterologous proteins in plants – human papillomavirus (HPV 16) derived antigens

RNDr. Jitka Folwarczna

Školitel/Supervisor: Doc. RNDr. Noemi Čeřovská, CSc.

Školitel-konzultant/Supervisor-consultant:

Mgr. Tomáš Moravec, Ph.D., Dr.rer.nat.Ing. Helena Plchová,

Doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

Praha 2013

Abstrakt

Infekce lidskými papillomaviry (HPV) je zejména v rozvojových zemích stále velkým problémem. Přestože jsou proti HPV komerčně dostupné profylaktické vakcíny, je jejich využití ekonomicky náročné a neřeší problém již infikovaných osob. Proto se vyvíjí další úsilí vedoucí ke vzniku terapeutických vakcín a zároveň se hledají postupy vedoucí ke snížení produkční ceny profylaktických vakcín. Virové proteiny, jako například E7 onkoprotein a L2 kapsidový protein z HPV typu 16, patří mezi slibné kandidáty pro přípravu experimentálních vakcín proti HPV.

V předkládané práci jsme optimalizovali expresi mutovaného E7 onkoproteinu (E7ggg) připojeného k C-konci kapsidového proteinu (CP) *Viru tabákové mozaiky* (TMV) nebo *X viru bramboru* (PVX). Byl sledován vliv linkerů spojujících CP a E7ggg na expresi a stabilitu fúzních proteinů. Fúzní proteiny byly nejprve produkovány v bakteriích *Escherichia coli* (*E. coli*) MC1061 a poté v netransgenních i transgenních rostlinách *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*). Protože se fúzní proteiny obsahující TMV CP připravené v *E. coli* produkovaly v nerozpustné podobě, byl pro zvýšení podílu rozpustných proteinů testován vliv molekulárních chaperonů (Trigger faktoru (TF), DnaK-DnaJ-GrpE, GroEL-GroES). L2₁₀₈₋₁₂₀ epitop připojený k C-konci PVX CP byl produkován v transgenních rostlinách *N. benthamiana* nesoucích gen pro pohybový protein (MP) z TMV. Připojení E7ggg a L2₁₀₈₋₁₂₀ na C-konec PVX CP je prvním příkladem fúze v této pozici popsáním v literatuře.

Další části práce se zabývají charakterizací vlastností exprimovaných fúzních proteinů jako jsou rozpustnost, stabilita, schopnost reagovat s příslušnými protilátkami a schopnost tvořit viru podobné částice (VLP).

Biotechnologické využití rostlin jako nového produkčního systému pro medicínsky cenné proteiny založené na výzkumu variabilních expresních kazet odvozených od rostlinných virů je nadějnou koncepcí pro přípravu experimentálních vakcín v rostlinách.

Abstract

Even though prophylactic vaccine against human papillomavirus (HPV) is currently licensed, infections by the virus continue to be the major health problem mainly in developing countries. Considerable effort is being devoted to preparation of therapeutic vaccine and to decrease of the production costs of current vaccine. Viral proteins such as the E7 oncoprotein and the L2 capsid protein from HPV type 16 are promising targets for the development of the experimental anti-HPV vaccine.

The aim of our work was optimization of expression of mutagenized E7 oncoprotein (E7ggg) fused to the C-terminus of *Tobacco mosaic virus* (TMV) coat protein (CP) or *Potato virus X* (PVX) CP in viral vectors derived from these plant viruses. The impact of linkers connecting CP and E7ggg fusion partners on expression and stability of fusion proteins was examined. The fusion proteins were first expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*) MC1061 to assess the characteristics of the recombinant protein prior to their transient expression in both non-transgenic or transgenic *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*). We have obtained the high level expression in *E. coli*, but most of the expressed proteins based on TMV CP remained in insoluble inclusion bodies. To increase the ratio of soluble protein various molecular chaperones (Trigger factor (TF), DnaK-DnaJ-GrpE, GroEL-GroES) were used. The L2₁₀₈₋₁₂₀ epitope fused to the C-terminus of PVX CP was successfully expressed in transgenic *N. benthamiana* carrying gene for movement protein (MP) from TMV. Fusion of E7ggg or L2₁₀₈₋₁₂₀ to the C-terminus of PVX CP is the first report of the C-terminal protein/epitope fusion with PVX CP *in planta*.

Other topic solved in our work was the characterization of some properties of expressed fusion proteins like solubility, stability, immunological reactivity and ability to form virus-like particles (VLP).

Biotechnological use of transient expression of pharmaceutical proteins in plants using viral vectors derived from plant viruses seems to be a promising nascent technology for production of experimental vaccines and pharmaceutical proteins in plants.

Úvod

Pro produkci heterologních proteinů v rostlinách se ujal označení „plant molecular farming“, pěstování proteinů v rostlinách. Proteiny připravené v rostlinách nejsou kontaminované savčími patogeny nebo bakteriálními toxiny. Navíc jsou rostliny relativně levným a nenáročným produkčním systémem, který zajišťuje posttranslační modifikace a správné poskládání proteinů (Cunningham a Porter, 1998).

Heterologní proteiny mohou být v rostlinách produkovány buď trvale (permanentně) nebo přechodně (transientně). Při transientní expresi je gen pro heterologní protein exprimován pouze dočasně. Pro transientní expresi heterologních proteinů se využívá pozměněných rostlinných virů, tzv. rostlinných virových vektorů (Gleba a kol., 2004). S malými genomy rostlinných virů se poměrně snadno manipuluje, inokulace rostlin je jednoduchá a rychlá a vložené sekvence jsou amplifikovány do vysokých koncentrací. Na druhou stranu mohou být tyto konstrukty nestabilní, což může mít za následek ztrátu vloženého genu rekombinací (Angell a Baulcombe, 1997). Rostlinné virové vektory jsou odvozeny od virů, které se v hostitelské rostlině množí do vysokých titrů a jsou snadno přenosné. Jsou to například vektory odvozené od TMV nebo PVX.

TMV je členem rodu *Tobamovirus*. Jeho částice mají tyčinkovitý tvar o rozměrech 18x300 nm. Uvnitř částice je vnitřní kanál o velikosti 4 nm. TMV obsahuje +ssRNA, která je přibližně 6400 nukleotidů (nt) dlouhá a je obalená zhruba 2130 kopiemi TMV CP (Goelet a Karn, 1982). TMV má schopnost samovolně polymerovat bez přítomnosti genomové RNA za vzniku viru podobných částic (tzv. virus-like particles, VLP).

PVX je členem rodu *Potexvirus*. Virová částice PVX má tvar vlákna o rozměrech 13x515 nm (Huisman a kol., 1988). PVX obsahuje +ssRNA, která je přibližně 6400 nt dlouhá a je obalená 1300 kopiemi PVX CP (Tollin a kol., 1980). Také PVX CP je schopný formovat VLP.

Lidské papillomaviry patří do čeledi *Papovaviridae*. Jejich genom je tvořen kovalentně uzavřenou dsDNA o 7500 – 8000 bp. Virové částice jsou neobalené, mají průměr 55 nm. Podle typu cílové tkáně, kterou napadají, je dělíme na genitální a kožní. Dále lze HPV dělit podle jejich onkogenního potenciálu na nízké- a vysoce-rizikové (Vonka, 1997). Infekce vysoce-rizikovými typy HPV je úzce spojena s rakovinou děložního čípku (Touze a kol., 1998), která je druhou nejčastější rakovinou u žen na světě. V současné době jsou komerčně dostupné dvě profylaktické vakcíny proti HPV založené na kombinaci rekombinantně připravených VLP složených ze strukturního proteinu L1 HPV typů 6, 11, 16 a 18

(Fernández-San Millán a kol., 2008). Tyto vakcíny vyvolávají vznik neutralizačních protilátek proti virionům HPV (Cutts a kol., 2007) a mají vysoký ochranný účinek pro zabránění infekce daným typem HPV. Vakcíny založené na L1 VLP však nemají žádný terapeutický efekt u pacientů, u nichž již došlo k infekci.

HPV onkoproteiny E6 a E7 hrají zásadní roli při rozvoji rakovinného onemocnění, proto představují ideální cíl pro vývoj terapeutických vakcín (McLaughlin-Drubin and Münger, 2009). Cílem terapeutické vakcíny je vybudit buněčnou imunitní odpověď, a tak vyvolat tvorbu cytotoxických lymfocytů, které rozruší buňky nesoucí příslušné antigeny. Vzhledem k redukovanému transformačnímu potenciálu jsme pro vývoj terapeutických vakcín použili bezpečnější mutovanou formu onkoproteinu E7 - E7ggg. E7ggg nese mutaci tří aminokyselin v oblasti vázající retinoblastomový protein (pRB; Asp21Gly, Cys24Gly, Glu26Gly, Šmahel a kol., 2001).

Cíle práce

Cílem předkládané disertační práce bylo rozšíření současných znalostí z oblasti exprese heterologních proteinů v rostlinách a vývoje nových expresních systémů založených na rostlinných virech. Práce navazuje na dosavadní výzkum Laboratoře virologie ÚEB AV ČR, v. v. i. studující expresi proteinů a antigenů odvozených od HPV 16 v bakteriích a rostlinách.

1. Hlavním úkolem této práce bylo připravit fúzní protein složený z TMV CP, 15 AK linkeru a celého mutovaného onkoproteinu E7ggg z HPV 16 a exprimovat ho v *E. coli* a *N. benthamiana*. Dále sledovat vliv vloženého onkoproteinu E7ggg (98 AK) na expresi, rozpustnost a stabilitu fúzního proteinu a zároveň ověřit jeho schopnost tvořit VLP.
2. Dalším úkolem bylo produkovat 3 různé fúzní proteiny složené z PVX CP a mutovaného onkoproteinu E7ggg z HPV 16, které se lišily napojením E7ggg na C-konec PVX CP (bez linkeru, s 4 AK linkerem, s 15 AK linkerem) v *E. coli* a *N. benthamiana* a popsat jejich vlastnosti – rozpustnost, stabilitu, infekčnost konstruktů a jejich schopnost tvořit VLP. Dále zhodnotit vliv linkerů na výše jmenované vlastnosti.
3. Posledním úkolem bylo produkovat fúzní proteiny složené z epitopu L2₁₀₈₋₁₂₀ z HPV 16 připojeného na C-konec PVX CP v *N. benthamiana* a dokázat tvorbu VLP.

Materiál a metodika

DNA kódující fúzní protein TMV CP-L15-3'NTR byla vytvořena pomocí Splicing by overlap extension (SOE) polymerasové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR), která spojuje fragmenty DNA na základě jejich překrývajících se konců (Higuchi a kol., 1988; Horton a kol., 1989; Horton, 1995). Získaný fragment správné velikosti byl klonován do vektoru pTZ57T/R za vzniku konstruktů pTZ:TMV CP-L15. Do konstruktů pTZ:TMV CP-L15 linearizovaného pomocí NotI a defosforylovaného alkalickou fosfátasou byla vložena sekvence kódující E7ggg. Pro expresi TMV CP-L15-E7ggg a TMV-L15 v *E. coli* byla do sekvencí kódujících oba proteiny vložena restriční místa NcoI a HindIII pomocí PCR. Takto upravené sekvence byly vloženy do bakteriálního expresního vektoru pMPM-4AΩ (Mayer, 1995) linearizovaného pomocí restričních enzymů NcoI a HindIII za vzniku konstruktů pMPM:TMV CP-L15-E7ggg a pMPM:TMV CP-L15. Pro expresi v rostlinách byl fragment TMV CP-L15-E7ggg-3'NTR vložen do binárního vektoru pGR-dCP-GFP pomocí NcoI a KpnI restričních míst za vzniku konstruktů pGR:TMV CP-L15-E7ggg. Správnost jednotlivých sekvencí byla postupně ověřována pomocí nukleotidové sekvenace (provedla firma Biogen, Praha).

Konstrukty pMPM-PVX CP-E7ggg, pMPM-PVX CP-L4-E7ggg, pMPM-PVX CP-L15-E7ggg pro expresi v *E. coli* a pGR-PVX CP-E7ggg, pGR-PVX CP-L4-E7ggg, pGR-PVX CP-L15-E7ggg pro expresi v transgenních *N. benthamiana* nesoucích gen pro HC-Pro z *A viru bramboru* (*Potato virus A*; PVA) byly připraveny podle postupu popsaného v publikaci 4. Konstrukty pGR:PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀ a pGR:PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀mut byly připraveny podle postupu popsaného v publikacích 2 a 3.

Expres v *E. coli* pomocí molekulárních chaperonů a následná purifikace fúzních proteinů TMV CP-L15 a TMV CP-L15-E7ggg byla provedena podle postupu popsaného v publikaci 1.

Expres TMV CP-L15-E7ggg v netransgenních a transgenních *N. benthamiana* byla provedena podle postupu popsaného v rukopisu v přípravě. Získaný fúzní protein byl purifikován postupem podle Asselina a Zaitlina, 1978.

Expres fúzních proteinů PVX CP-E7ggg, PVX CP-L4-E7ggg a PVX CP-L15-E7ggg v *E. coli* a v transgenních *N. benthamiana* exprimujících HC-Pro z PVA byla provedena podle postupu popsaném v publikaci 4. Fúzní proteiny připravené v *E. coli* byly purifikovány podle Čeřovské a kol. (2002 a 2004) a podle Folwarczné a kol. (2008). Fúzní proteiny připravené v rostlinách byly purifikovány podle Čeřovské a kol. (1991 a 2004).

Expresse fúzních proteinů PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀ a PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀mut v *N. benthamiana* nesoucích gen pro TMV MP byla provedena podle postupu popsaném v publikaci 2 a 3. Fúzní proteiny byly purifikovány podle Čěrovské a kol. (1991 a 2004).

Přítomnost fúzních proteinů byla analyzována pomocí polyakrylamidové elektroforesy v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE; Laemmli, 1970) a Western blotem (WB; Hirano a Watanabe, 1990). Rekombinantní proteiny byly detekovány anti-E7, anti-TMV a anti-PVX protilátkami.

Přítomnost VLP byla ověřena analýzou RNA izolované z listů *N. benthamiana* a pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Byly použity dva způsoby získání virové RNA – izolace celkové RNA (provedeno pomocí TRI Reagent[®] (MRC) kitu s následným ošetřením DNAsou I dle pokynů výrobce) nebo izolace RNA pomocí vazby VLP na specifickou protilátku (immunocapture – IC; provedeno podle Čěrovské a kol., 2004). Získaná RNA byla následně analyzována pomocí RT-PCR. Transmisní mikroskopii provedla RNDr. Helena Synková, CSc. (ÚEB AV ČR, v. v. i.) a pan Milan Jokeš (VÚRV, v. v. i.).

Výsledky a diskuse

Předkládaná doktorská práce se zabývá přípravou celého onkoproteinu E7 ve fúzi s TMV CP a PVX CP a epitopu L2₁₀₈₋₁₂₀ z HPV 16 ve fúzi s PVX CP. Pro vývoj experimentální terapeutické vakcíny byl použit bezpečnější E7ggg, který má redukovaný transformační potenciál. Vzhledem k tomu, že HPV se nereplikuje v běžných typech tkáňových kultur, je při vývoji vakcín výhodné využít genové inženýrství. V této práci jsme se pokusili antigeny odvozené od HPV 16 exprimovat buď v *E. coli* MC1061 nebo v netransgenních a transgenních rostlinách *N. benthamiana*.

Produkce onkoproteinu E7ggg z HPV 16 pomocí virového vektoru odvozeného od TMV

TMV CP byl již mnohokrát použit pro účely přípravy experimentálních vakcín proti různým onemocněním (Nemchinov a kol., 2000; Fitchen a kol., 1995; Beachy a kol., 1995). Většinou byly na C-konec kapsidového proteinu přidávány epitopy o velikosti maximálně 20 AK. Přidání větších peptidů vedlo k inhibici vzniku virových částic. V naší práci jsme se pokusili umístit na povrch virové částice TMV celý onkoprotein E7ggg o velikosti 98 AK. Mezi kapsidový protein TMV a E7ggg byl přidán flexibilní 15 AK dlouhý linker (L15). L15 má sekundární strukturu β skládaného listu a je bohatý na glycin (Werner a kol., 2006). Smyslem linkeru bylo snížit případné stérické pnutí na povrchu VLP.

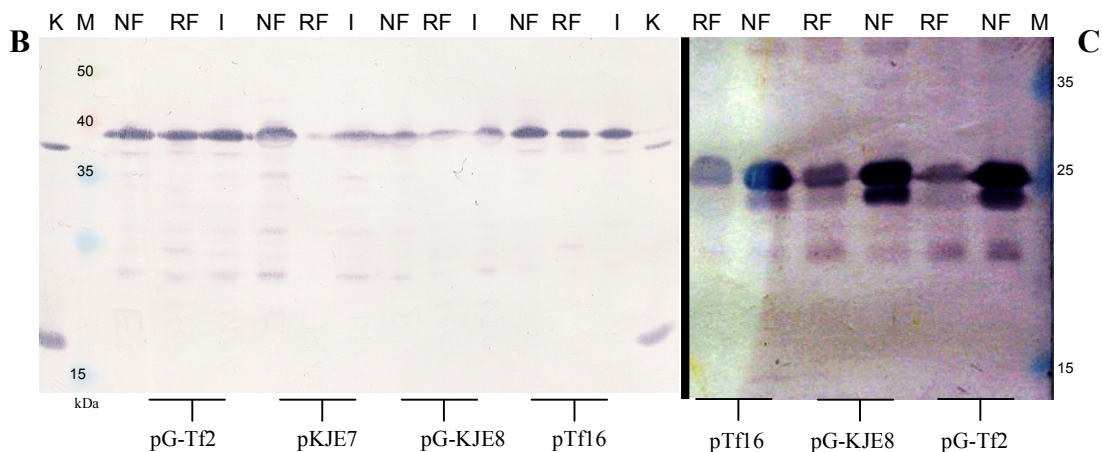
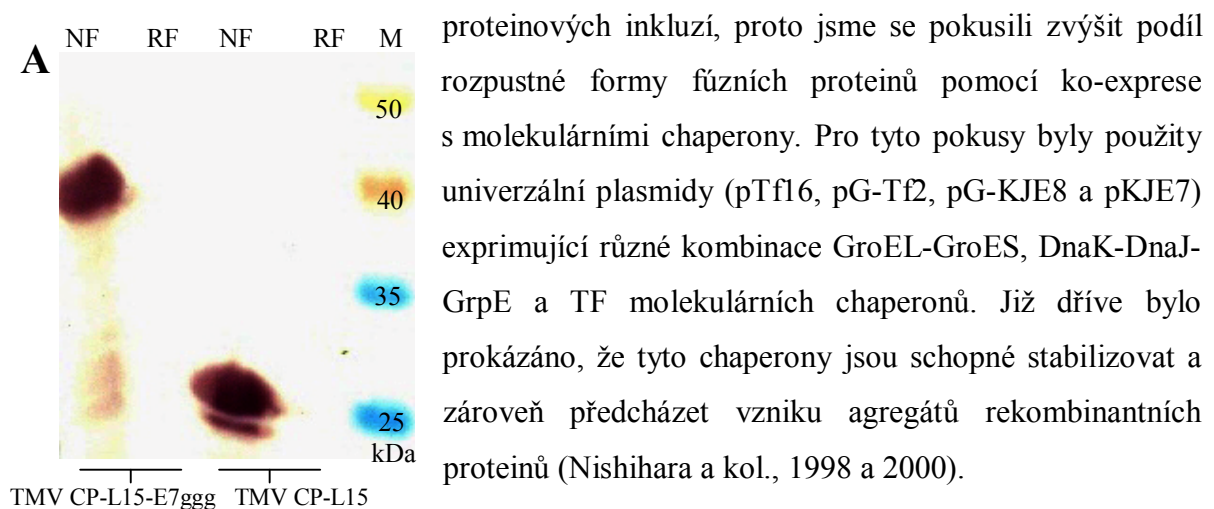
Nejprve jsme expimovali TMV CP-L15-E7ggg v *E. coli*, kdy jsme chtěli ověřit stabilitu, rozpustnost a schopnost rekombinantního proteinu tvořit multimerní struktury a VLP. Také jsme chtěli zjistit, jaký vliv má přítomnost onkoproteinu E7ggg na vlastnosti celého fúzního proteinu. Pro porovnání tohoto vlivu byl vytvořen konstrukt exprimující pouze TMV CP s C-terminálně připojeným 15 AK linkerem. Poté byl TMV CP-L15-E7ggg exprimován v *N. benthamiana*.

Příprava TMV CP-L15-E7ggg v *E. coli*

U sekvencí kódujících fúzní proteiny TMV CP-L15-E7ggg a TMV CP-L15 byla nejprve druhá aminokyselina TMV CP - serin nahrazena alaninem. Tato změna by měla usnadnit vznik VLP v *E. coli* (Hwang a kol., 1994). Takto upravené sekvence byly vloženy do expresního vektoru pMPM-4A Ω (Mayer, 1995). Získané konstrukty byly transformovány do *E. coli* MC1061. Byla provedena optimalizace exprese. Exprimované fúzní proteiny byly stabilní. V imunoblotu TMV CP-L15-E7ggg reagoval s protilátkami proti TMV CP i proti

HPV 16 E7. McLaughlin-Drubinem a Müngerem bylo prokázáno, že HPV E7 putuje na polyakrylamidovém gelu jako protein o velikosti 18-20 kDa, přestože jeho teoretická molekulová hmotnost je přibližně 11 kDa (McLaughlin-Drubin a Münger, 2009). Také my jsme zjistili, že fúzní protein obsahující HPV E7 putoval přibližně o 9 kDa výš oproti teoretické molekulární hmotnosti. Fúzní protein TMV CP-L15 reagoval s anti-TMV protilátkou. TMV CP-L15 putoval přibližně o 4 kDa výš oproti teoretické molekulové hmotnosti. Elektroforetická mobilita TMV CP-L15 byla pravděpodobně ovlivněna přítomností dlouhé β struktury, kterou tvoří L15.

TMV CP-L15-E7ggg a TMV CP-L15 se produkovaly pouze v nerozpustné formě



SDS PAGE/WB: Analýza rozpustných a nerozpustných frakcí fúzních proteinů TMV CP-L15-E7ggg a TMV CP-L15 produkovaných v *E. coli*. A: Fúzní proteiny byly produkovány bez přítomnosti molekulárních chaperonů. Fúzní proteiny TMV CP-L15-E7ggg (B) a TMV CP-L15 (C) byly produkovány s různými kombinacemi molekulárních chaperonů. Fúzní proteiny byly detekovány anti-TMV protilátkou. I – indukované bakterie *E. coli* MC1061 nesoucí konstrukt s TMV CP-L15-E7ggg a plasmid s molekulárními chaperony, RF – rozpustné frakce, NF – nerozpustné frakce, M – proteinový marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, K – nemodifikované TMV částice použité jako pozitivní kontrola.

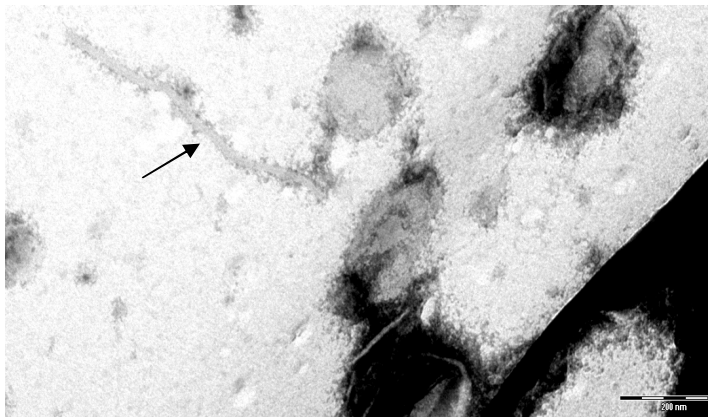
Expres chaperonů z plasmidů pTf16, pG-KJE8 a pKJE7 byla indukována L-arabinosou, což byl zároveň i induktor exprese chimerních proteinů. Dalším indukčním činidlem molekulárních chaperonů byl tetracyklin, který byl použit buď samotný (pG-Tf2) nebo v kombinaci s L-arabinosou (pG-KJE8). Byla optimalizována ko-exprese chaperonů a TMV CP-L15-E7ggg a TMV CP-L15. Použití molekulárních chaperonů bylo nezbytné pro produkci chimerních proteinů TMV CP-L15-E7ggg a TMV CP-L15 v rozpustné podobě (obr. 1, str. 10). Nejvyššího výtěžku rozpustných proteinů TMV CP-L15-E7ggg bylo dosaženo při expresi s molekulárními chaperony GroEL-GroES a TF. GroEL-GroES se podílí na zvyšování rozpustnosti a zlepšení skládání proteinu TMV CP v *E. coli* (Hwang a kol., 1998), což je v souladu s našimi výsledky. Expres se samotným TF zvýšila podíl rozpustné formy TMV CP-L15-E7ggg a TMV CP-L15. Kombinace GroEL-GroES s TF může být efektivnější při solubilizaci některých heterologních proteinů produkovaných v *E. coli* než působení samotného TF, protože TF a GroEL-GroES úzce spolupracují. Na druhou stranu účinek TF se může lišit v závislosti na produkovaném proteinu (Nishihara a kol., 2000). Tento fakt potvrzují i naše výsledky, protože použití samotného TF vedlo k získání vyšších výtěžků v případě rozpustné formy TMV CP-L15, zatímco v případě TMV CP-L15-E7ggg bylo efektivnější použití kombinace TF s GroEL-GroES. Použití DnaK-DnaJ-GrpE vedlo k solubilizaci TMV CP-L15, což je v souladu z dříve publikovanými výsledky Hwanga. Bylo totiž prokázáno, že produkce DnaK má významný vliv na celkovou expresi a správné poskládání TMV CP *in vivo* (Hwang a kol., 1998). Na druhou stranu v případě TMV CP-L15-E7ggg ko-exprese s DnaK-DnaJ-GrpE nevedla k získání vyššího podílu jeho rozpustné formy ani v kombinaci s GroEL-GroES. Bylo to způsobeno pravděpodobně přítomností DnaJ, který může negativně ovlivňovat expresi a sbalení TMV CP v *E. coli* (Hwang a kol., 1998).

Pro potvrzení tvorby VLP a další charakterizaci chování E7ggg byla provedena ultracentrifugace v sacharosovém gradientu (10%, 30%, 50% a 60%) rozpustných frakcí získaných expresí s plasmidy pG-Tf2 (GroEL-GroES, TF) a pTf16 (TF). Chimerní proteiny TMV CP-L15-E7ggg a TMV CP-L15 byly identifikovány ve všech odebraných frakcích. Tento fakt naznačuje, že oba fúzní proteiny jsou schopné tvořit multimerní a viru podobné struktury a že tato schopnost není ovlivněna ani přítomností celého onkoproteinu E7ggg (98 AK). Ze získaných frakcí multimerů TMV CP-L15-E7ggg a TMV CP-L15 byly připraveny vzorky pro transmisní elektronovou mikroskopii. V případě fúzních proteinů TMV CP-L15-E7ggg a TMV CP-L15 připravených v *E. coli* MC1061 nebyly VLP pozorovány.

Příprava TMV CP-L15-E7ggg v *N. benthamiana*

Sekvence pro fúzní protein TMV CP-L15-E7ggg byla vložena do binárního vektoru založeného na TMV a celý konstrukt (pGR:TMV CP-L15-E7ggg) byl transformován do *A. tumefaciens* GV3101. Transformovanými kulturami *A. tumefaciens* byly infikovány rostliny *N. benthamiana*. Testovány byly 4 genotypy rostlin *N. benthamiana* (Nb) – netransgenní Nb, transgenní Nb exprimující pohybový protein (MP) TMV, transgenní Nb exprimující HC-Pro protein z *A. viru bramboru* (PVA) a transgenní Nb exprimující TMV MP i PVA HC-Pro. Infekce se na inokulovaných listech projevila 7-10 dní po inokulaci (dpi) vznikem nekrotických lezí. Ke vzniku systémové infekce nedošlo u žádného z testovaných genotypů. Transientně exprimovaný TMV CP-L15-E7ggg reagoval v imunoblotu s anti-TMV i s anti-E7 protilátkou. I v tomto případě fúzní protein putoval zhruba o 9 kDa výš na SDS PAGE gelu. Fúzní protein TMV CP-L15-E7ggg se exprimoval ve všech testovaných genotypech *N. benthamiana* přibližně stejně.

V případě TMV CP-L15-E7ggg vedla modifikace kapsidového proteinu zřejmě ke změně jeho vlastností, protože TMV CP-L15-E7ggg zůstával při purifikaci z velké části v rostlinném



Obr. 2: Chimerní VLP složené z TMV CP-L15-E7ggg na snímku z transmisního elektronového mikroskopu. Částice byly kontrastovány 2% uranylacetátem.

homogenátu. VLP byly hůře rozpustné a agregovaly buď samostatně nebo spolu s jinými rostlinnými proteiny. Vznik VLP byl prokázán pomocí IC-RT PCR a transmisní elektronové mikroskopie (obr. 2). Přítomnost kompletní sekvence E7ggg na C-konci TMV CP ovlivňuje tvorbu VLP, protože chimerní částice TMV CP-L15-E7ggg se akumulují do velice

nízkých koncentrací (1 mg/kg čerstvých listů). Ze získaných výsledků vyplývá, že připojení onkoproteinu E7ggg k TMV CP přímo nebrání vzniku VLP, ale mění elektrostatické, stericke a další jejich vlastnosti, čímž významně ovlivňuje stabilitu vzniklých VLP. Oproti tomu 133 AK dlouhý fragment A proteinu z *Staphylococcus aureus* přidaný na C-konec kapsidového proteinu *Turnip vein-clearing virus* (TVCV) pomocí 15 AK linkeru neovlivnil ani systémový pohyb chimerního viru ani jeho akumulaci. Navíc chimerní částice TVCV tvořily poměrně homogenní populaci VLP (Werner a kol., 2006). V případě TMV CP-L15-E7ggg VLP tvořily heterogenní populaci částic.

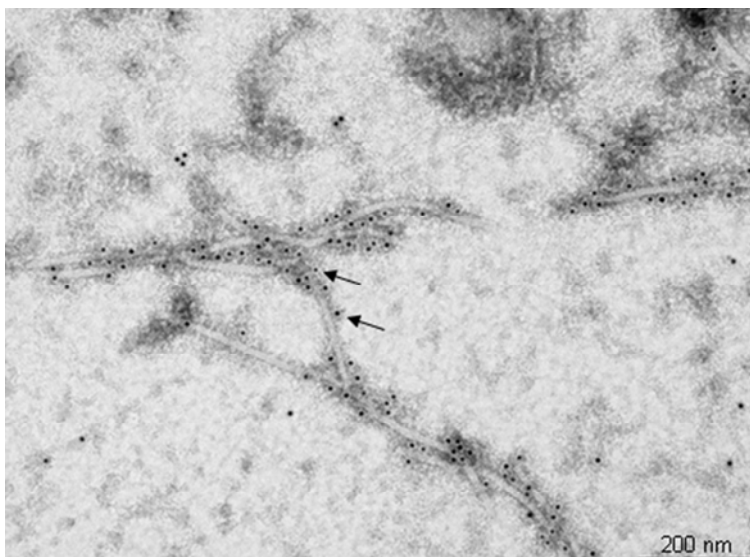
Materiál z listů inokulovaných pGR:TMV CP-L15-E7ggg byl infekční, což bylo prokázáno mechanickým přenosem inokula na rostliny *N. benthamiana* exprimující TMV MP i PVA HC-Pro, *Nicotiana tabacum*, cv. Petit Havana SR1 a *Nicotiana tabacum*, cv. Samsun NN. Infekce se z inokulovaných listů systémově nešířila.

Produkce onkoproteinu E7ggg z HPV 16 pomocí virového vektoru odvozeného od PVX

E7ggg byl napojen na C-konec kapsidového proteinu viru PVX, a to buď přímo (PVX CP-E7ggg) nebo přes 4 AK/15 AK linker (PVX CP-L4-E7ggg/PVX CP-L15-E7ggg). Dosud nebyl popsán žádný případ úspěšné exprese heterologního proteinu vloženého na C-konec PVX CP. Posledních 60 bp na 3'-konci PVX CP RNA má kromě protein-kódující funkce ještě funkci při replikaci virového genomu (Hu a kol., 2007). Pokud by do této oblasti byl vložen fragment kódující fúzní rekombinantní protein, došlo by k přerušení 3'NTR oblasti a vyřazení funkcí nezbytných pro replikaci virové RNA. Proto bylo nutné tuto část genomu PVX duplikovat, přičemž první kopie si zachovala svoji protein-kódující funkci, poté následovala sekvence kódující heterologní protein se stop kodonem a nakonec druhá kopie zahrnující nepřerušenu 3' terminální oblast genomu PVX. Toto zdvojení mělo zajistit správnou replikaci rekombinantního virového vektoru (Verchot-Lubicz a kol., 2007).

Příprava PVX CP-E7ggg, PVX CP-L4-E7ggg a PVX CP-L15-E7ggg v *E. coli*

Byly připraveny tři konstrukty, exprimující fúzní proteiny PVX CP-E7ggg, PVX CP-L4-E7ggg a PVX CP-L15-E7ggg z vektoru pMPM-4A Ω . Získané konstrukty byly transformovány do *E. coli* MC1061. Expese fúzních proteinů byla indukována L-arabínosou a proteiny byly exprimovány přes noc při teplotě 25°C. Exprimované fúzní proteiny reagovaly s anti-PVX a anti-E7 protilátkami. I zde putovaly proteiny zhruba o 8 kDa výš, než bylo předpokládáno. Tento výsledek povrzuje data získaná při produkci onkoproteinu E7ggg v systému založeném na TMV. Všechny fúzní proteiny se produkovaly převážně v rozpustné formě a byly stabilní. Na rozdíl od fúzních proteinů TMV CP-L15-E7ggg a TMV CP-L15 nebylo k produkci PVX CP-E7ggg, PVX CP-L4-E7ggg a PVX CP-L15-E7ggg v rozpustné podobě nezbytné použití molekulárních chaperonů (Lidický, 2010).



Obr. 3: Chimerní částice složené z PVX CP-E7ggg z *E. coli* MC1061 na snímku z transmisního elektronového mikroskopu. VLP byly značené primární králičí anti-PVX a sekundární anti-králičí protilátkou značenou zlatými částicemi (10 nm) a rovněž primární myší anti-E7 a sekundární anti-myší protilátkou značenou zlatými částicemi (15 nm).

Přidání linkerů mezi PVX CP a E7ggg nemělo žádný vliv na exprimované množství jednotlivých fúzních proteinů. Fúzní proteiny tvořily VLP, což bylo dokázáno pomocí transmisní elektronové mikroskopie (obr. 3).

Příprava PVX CP-E7ggg, PVX CP-L4-E7ggg a PVX CP-L15-E7ggg v *N. benthamiana*

PVX CP-E7ggg, PVX CP-L4-E7ggg a PVX CP-L15-E7ggg byly produkovány v transgenních rostlinách *N. benthamiana* nesoucích HC-Pro z PVA. Ani zde nebyl pozorován vliv vložených linkerů na hladinu exprese jednotlivých fúzních proteinů. V systémových listech fúzní proteiny detekovány nebyly. Inokulované listy byly infekční v následných mechanických inokulacích. Při purifikaci docházelo k degradaci všech fúzních proteinů. Tento fakt je zřejmě způsoben připojením E7ggg na C-konec PVX CP, protože při N-terminální fúzi E7ggg s PVX CP k degradaci nedocházelo. Navíc bylo prokázáno, že N-terminální fúze PVX CP s E7 může vést ke stabilizaci E7 při expresi v chloroplastech (Morgenfeld a kol., 2009). VLP se detekovat nepodařilo.

Produkce epitopu L2₁₀₈₋₁₂₀ z HPV 16 pomocí virového vektoru odvozeného od PVX v *N. benthamiana*

Epitop L2₁₀₈₋₁₂₀ je vysoce konzervovaný mezi různými druhy HPV a je pravděpodobně umístěn na povrchu virionů HPV. Z těchto důvodů patří také mezi vhodné kandidáty pro vývoj vakcíny proti HPV. Sekvence pro 60 bp na 3'-konci PVX CP je v konstruktech pGR: PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀ a pGR: PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀mut obsažena dvakrát, a to na 3'-konci PVX CP a

zároveň za stop kodonem L2₁₀₈₋₁₂₀. Konstrukty pGR:PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀ a pGR:PVX CP L2₁₀₈₋₁₂₀mut byly transformovány *N. benthamiana* exprimující MP TMV. Je totiž známo, že některé pohybové funkce PVX CP jsou plně zastupitelné MP TMV (Fedorkin a kol., 2001). V případě konstruktů pGR:PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀ nedošlo k expresi očekávaného fúzního proteinu. Pomocí RT PCR a následné sekvenace bylo zjištěno, že došlo k eliminaci epitopu L2₁₀₈₋₁₂₀ pomocí rekombinace pravděpodobně díky přítomnosti dvou identických repetitivních sekvencí. Tato eliminace je zřejmě specifická pro kratší úseky (v tomto případě 13 AK), protože v případě produkce E7ggg (98 AK) mezi těmito dvěma sekvencemi k eliminaci nedošlo. V konstruktě pGR:PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀mut je první kopie této duplicitní sekvence nahrazena jinou sekvencí, která však kóduje stejných 20 C-terminálních aminokyselin PVX CP. Tím by mělo být zabráněno homologní rekombinaci mezi identickými sekvencemi. V listech *N. benthamiana* infikovaných pGR:PVX CP L2₁₀₈₋₁₂₀mut byl detekován produkt o očekávané velikosti (34 kDa). Inokulované listy nebyly infekční v následných mechanických inokulacích. Ani v tomto případě se nepodařilo detekovat VLP. Z těchto faktů vyplývá, že tato C-terminální modifikace PVX CP zřejmě neumožňuje vznik VLP *in vivo*.

Závěry

1. Fúzní protein TMV CP-L15-E7ggg byl exprimován v *E. coli* MC1061 v rozpustné podobě pomocí molekulárních chaperonů. TMV CP-L15-E7ggg reagoval s příslušnými protilátkami a byl stabilní. Pomocí gradientové centrifugace bylo prokázáno, že přítomnost E7ggg neovlivnila tvorbu multimerních struktur. Tvorba VLP tvořených z TMV CP-L15-E7ggg připraveného v *E. coli* prokázána nebyla. Fúzní protein TMV CP-L15-E7ggg byl také exprimován v *N. benthamiana* a to ve všech testovaných genotypech. Infekce TMV CP-L15-E7ggg se rostlinou nešířila. Agroinfiltrované listy byly infekční v následných mechanických inokulacích. Pomocí IC RT-PCR a transmisní elektronové mikroskopie bylo prokázáno, že TMV CP-L15-E7ggg je schopný tvořit VLP.

2. V bakteriích *E. coli* MC1061 byly exprimovány fúzní proteiny PVX CP-E7ggg, PVX CP-L4-E7ggg a PVX CP-L15-E7ggg. Vliv linkerů na hladinu exprese jednotlivých chimerních proteinů nebyl prokázán. Fúzní proteiny připravené v *E. coli* byly schopné tvořit VLP. PVX CP-E7ggg, PVX CP-L4-E7ggg a PVX CP-L15-E7ggg byly produkovány v *N. benthamiana* exprimujících HC-Pro z PVA. Infekce se nešířila rostlinou. Agroinfiltrované listy byly infekční v následných mechanických inokulacích. Jednotlivé fúzní proteiny se nepodařilo purifikovat a nepodařilo se zjistit, zda se tvoří VLP.

3. Pro expresi proteinu PVX CP-L₂₁₀₈₋₁₂₀ v *N. benthamiana* exprimujících MP TMV bylo nutné zabránit rekombinaci pomocí mutace jedné z 3'-terminálních 60 bp sekvencí PVX CP. V listech *N. benthamiana* infikovaných pGR:PVX CP L₂₁₀₈₋₁₂₀mut byl detekován produkt o očekávané velikosti (34 kDa). Infekce se rostlinou nešířila. Inokulované listy neobsahovaly infekční virové částice. Ovšem ani v tomto případě nebyl prokázán vznik VLP.

4. Výzkum vlastností expresních kazet odvozených od rostlinných virů určených pro transientní expresi experimentálních vakcín v rostlinách je slibným základem pro biotechnologické využití rostlin jako nového produkčního systému pro medicínsky cenné proteiny.

Introduction

Plant expression systems have a significant advantage compared to other methods of recombinant protein production since plants are much cheaper and easier in cultivation than mammalian cell cultures. They provide an optimal system for the expression of recombinant proteins free of contamination by bacterial toxins or animal pathogens. They also offer eukaryotic protein modification machinery, allowing subcellular targeting, proper folding, and posttranslational modifications (Cunningham and Porter, 1998).

Foreign genes can be produced in plants by permanent insertion or by transient expression using virus-based vectors. Plant viral vectors are being successfully applied for production of recombinant antigens. The major advantage of the use of plant virus based vectors is that the constructs could be prepared and assayed *in planta* within a period of weeks rather than months necessary for stable transformation based approaches. On the other hand the genetic instability of the construct *in planta* very often results in the loss of the inserted gene by recombination (Angell and Baulcombe, 1997). TMV and PVX based vectors are widely used for heterologous protein production in plants, because they accumulate to high levels in infected tissues, provide an extremely cheap source of protein biopolymers of discrete size of particles and can be manufactured under simple conditions.

TMV, type member of *Tobamovirus*, is a rod-shaped plant virus. TMV particles are about 18x300 nm and consist of a positive-sense, single-stranded genomic RNA (6400 nt) encapsidated with 2130 copies of TMV CP (Goelet and Karn, 1982). TMV particles have an inner channel about 4 nm in diameter. TMV CP is able to form virus-like particles (VLP).

PVX is a type member of *Potexvirus*. PVX is characterized by flexous, filamentous virions about 13x515 nm (Huisman a kol., 1988), which consist of a +ssRNA (6400 nt) encapsidated with 1300 copies of PVX CP (Tollin a kol., 1980). PVX CP is also able to form VLP.

Human papillomavirus (HPV), type member of *Papovaviridae*, is a double-stranded DNA (7500-8000 bp) virus that is non-enveloped. HPV has an icosahedral capsid about 55 nm. HPV can be classified as cutaneous or mucosal, depending on whether they infect cutaneous or mucosal epithelial cells. Depending on the risk of malignancy, HPV are further grouped as high-risk or low-risk types (Vonka, 1997). Infection by high-risk HPV is causally associated with cervical cancer (Touze *et al.*, 1998), which represents the second most common cancer among women worldwide. The availability of prophylactic vaccines against HPV (based on HPV 6, 11, 16 and 18 L1 structural proteins assembled in VLP, Fernández-San Millán *et al.*,

2008) represents a milestone in the prevention of this infection. Despite the high efficacy of prophylactic HPV vaccines in protection against infection, they do not have therapeutic effect against pre-existing infection.

For the development of therapeutic vaccines the E7 HPV 16 oncoprotein is a promising target antigen, because it plays an important role in both malignant transformation and in the maintenance of the transformed state of HPV infected cells (McLaughlin-Drubin and Münger, 2009). Therapeutic vaccine should elicit specific cell-mediated immunity that would rapidly clear an established infection and provide protection against future exposure. Due to its reduced transformation potential, an attenuated mutagenized coding sequence of HPV16 E7_{ggg} possessing three amino acid substitutions in the retinoblastoma protein (pRB; Asp21Gly, Cys24Gly, Glu26Gly) binding site, has been proposed as a safer candidate than E7 for vaccine development (Šmahel *et al.*, 2001).

Aims of the study

The aim of the Ph.D. thesis was to widen the spectrum of knowledge concerning expression of heterologous proteins in plants and to develop new expression systems based on plant viruses. The study is the continuation of present work of the Laboratory of virology IEB AS CR, v. v. i.. on the expression of HPV 16 proteins and antigens in bacteria and plants.

1. The main aim of this study was to prepare and express the fusion protein consisting of a TMV CP, a 15 amino acids (aa) β -sheet linker (L15) and complete mutagenized E7ggg (98 aa) from HPV 16 in *E. coli* and *N. benthamiana*. Then to observe the influence of E7ggg on protein expression, its solubility, stability and ability to form VLP.
2. The next aim of the study was to express three different fusion proteins consisting of PVX CP and mutagenized E7ggg from HPV 16 in *E. coli* and *N. benthamiana* and to examine the impact of linkers (no linker, 4 aa linker (L4), 15 aa linker (L15)) connecting PVX CP and E7ggg. Then to describe properties such as solubility, stability, infectivity of the constructs and its ability to form VLP.
3. The last aim of the work was to express fusion proteins consisting of epitope L2₁₀₈₋₁₂₀ from HPV 16 fused to C-terminus of PVX CP in *N. benthamiana* and to prove VLP formation.

Material and methods

In the first step DNA coding TMV CP-L15-3'NTR fragment was assembled using Splicing by overlap extension (SOE) PCR (Higuchi *et al.*, 1988, Horton *et al.*, 1989; Horton, 1995). Obtained fragment of the correct size was subcloned into pTZ57T/R vector giving pTZ:TMV CP-L15. In the second step complete sequence coding for E7ggg (98aa) from HPV 16 was inserted into pTZ:TMV CP-L15 linearised with NotI and dephosphorylated with shrimp alkaline phosphatase. For expression of TMV CP-E7ggg and TMV CP-L15 in *E. coli* NcoI and HindIII restriction sites were inserted into sequence coding both proteins using PCR. These fragments were then inserted into bacterial vector pMPM-4A Ω (Mayer, 1995) linearized with NcoI and HindIII giving pMPM:TMV CP-L15-E7ggg a pMPM:TMV CP-L15 constructs. For transient expression in plants TMV CP-L15-E7ggg-3'NTR fragment was recloned into pGR-dCP-GFP binary plasmid using NcoI and KpnI restriction sites giving pGR:TMV CP-L15-E7ggg construct. The accuracy of all sequences was verified by nucleotide sequencing (Biogen, Prague).

pMPM:PVX CP-E7ggg, pMPM:PVX CP-L4-E7ggg, pMPM:PVX CP-L15-E7ggg constructs for bacterial expression and pGR:PVX CP-E7ggg, pGR:PVX CP-L4-E7ggg, pGR:PVX CP-L15-E7ggg constructs for expression in transgenic *N. benthamiana* expressing HC-Pro protein from *Potato virus A* (PVA) were prepared according to selected publication 4. pGR:PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀ and pGR:PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀-mut constructs were prepared in conformity with selected publications 2 and 3.

Bacterial expression using molecular chaperones and purification of fusion proteins TMV CP-L15-E7ggg and TMV CP-L15 was done according to selected publication 1.

Transient expression of TMV CP-L15-E7ggg in both non-transgenic and transgenic *N. benthamiana* was done in conformity with manuscript in preparation. TMV CP-L15-E7ggg was purified according to Asselin and Zaitlin, 1978.

Expression of fusion proteins PVX CP-E7ggg, PVX CP-L4-E7ggg and PVX CP-L15-E7ggg in *E. coli* and in transgenic *N. benthamiana* carrying PVA HC-Pro gene was done in conformity with selected publication 4. Bacterial fusion proteins were purified according to Čeřovská *et al.* (2002 and 2004) and Folwarczna *et al.* (2008). Fusion proteins expressed in plants were purified in conformity with Čeřovská *et al.* (1991 a 2004).

Expression of PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀ and PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀mut in transgenic *N. benthamiana* carrying gene for TMV MP was carried out according to Čeřovská *et al.* (1991 a 2004).

The presence of fusion proteins was analyzed by standard polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE; Laemmli, 1970) and subsequent Western blot analysis (WB; Hirano and Watanabe, 1990). Recombinant fusion proteins were detected using anti-E7, anti-TMV or anti-PVX.

The ability of fusion proteins to form VLP was verified by RNA analysis isolated from leaves of *N. benthamiana* plants and by the transmission electron microscopy. RNA was isolated by total RNA isolation kit (done by TRI Reagent[®] (MRC) followed by DNase I treatment according to the manufacturer's instructions) or by immunocapture (IC) of VLP to specific antibody (Čeřovská *et al.*, 2004). RNA was analyzed by reverse PCR (RT-PCR). The transmission electron microscopy was carried out by RNDr. Helena Synková, CSc. (IEB AS CR, v. v. i.) and by Milan Jokeš (CRI v. v. i.).

Results and discussion

In this study, we have prepared the oncoprotein E7 from HPV 16 fused to TMV CP and PVX CP and the epitope L2₁₀₈₋₁₂₀ from HPV 16 in fusion with PVX CP. Due to its reduced transformation potential, an attenuated mutagenized HPV16 E7ggg was used for experimental therapeutic vaccine development. As the virus cannot be propagated in culture, vaccines have been based on recombinant antigens with inherited high-cost production. In a search of alternative inexpensive production system, HPV16 antigens were expressed in *E. coli* MC1061 and in non-transgenic and transgenic *N. benthamiana* plants.

Production of oncoprotein E7ggg from HPV 16 using viral vector based on TMV

TMV-based vectors have been successfully applied for the production of medically relevant peptides or proteins in tobacco, such as malaria epitopes (Fitchen *et al.* 1995, Beachy *et al.*, 1995) and a vaccine candidate against *Hepatitis C virus* (Nemchinov *et al.*, 2000). Attempts by numerous groups to create new products based on protein fusions have so far met with limited success. CP fusion proteins carrying an up to 20 aa extension of the C-terminus were shown to assemble into infectious virions. However, addition of larger peptides at the C-terminus of TMV CP always proved to be assembly-defective. In this study we fused complete mutagenized E7ggg gene (98 aa) to C-terminus of TMV CP. TMV CP and E7ggg were connected by the 15 aa β sheet flexible linker (Werner *et al.*, 2006). L15 should decrease steric tension on the surface of chimeric particle.

At first we have expressed TMV CP-L15-E7ggg in *E. coli* MC1061 to assess stability, solubility and ability of the chimeric protein to form multimers and VLP. The impact of E7ggg on the properties of fusion protein was examined. The TMV CP fused only with the 15 aa β -sheet linker was used as a control sample. Finally TMV CP-L15-E7ggg was expressed in *N. benthamiana*.

Production of TMV CP-L15-E7ggg in *E. coli*

At first the second amino acid serin was replaced by alanine in sequences coding for TMV CP-L15-E7ggg and TMV CP-L15. This substitution should improve the efficiency of VLP formation in bacteria (Hwang *et al.*, 1994). These sequences were inserted into expression vector pMPM-4A Ω (Mayer, 1995). *E. coli* MC1061 cells were transformed with the recombinant expression plasmids and protein expression was carried out. The expressed

fusion proteins were stable. Fusion proteins reacted with both polyclonal anti-TMV and monoclonal anti-E7 antibodies in immunoblot. McLaughlin-Drubin and Münger was proved, that HPV E7 migrates on SDS PAGE as 18-20 kDa protein, although its molecular weight is about 11 kDa (McLaughlin-Drubin and Münger, 2009). In our case TMV CP-L15-E7ggg migrated approximately 9 kDa higher than expected. TMV CP-L15 reacted with anti-TMV antibody. TMV CP-L15 migrated approximately 4 kDa higher than expected. Its electroforetic mobility was probably influenced by long β sheet structure of L15.

TMV CP-L15-E7ggg and TMV CP-L15 were expressed to high levels, but the induced proteins were mostly insoluble and remained in the inclusion bodies. To increase the content of soluble proteins, the universal plasmids (pTf16, pG-Tf2, pG-KJE8 a pKJE7) carrying

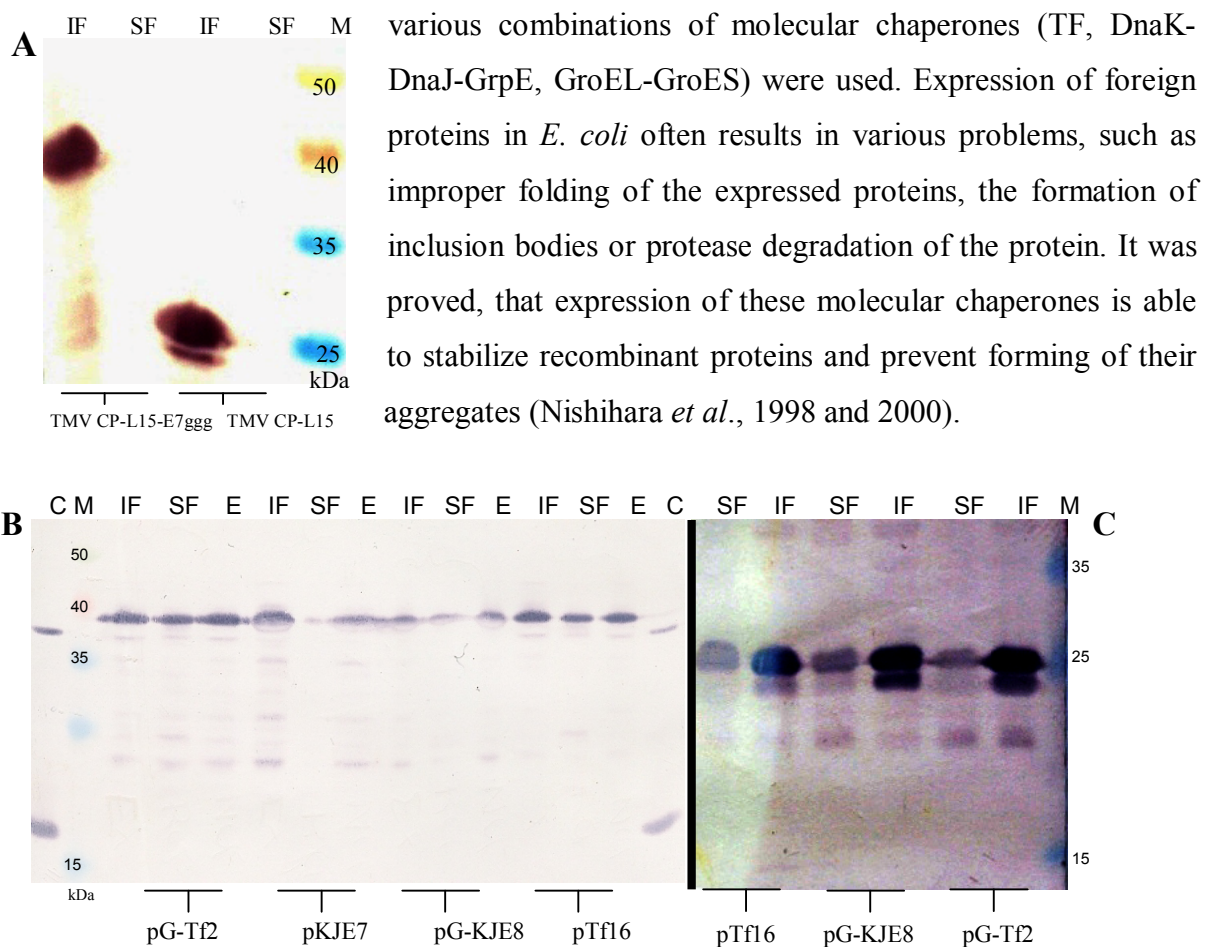


Fig. 1: SDS-PAGE/WB: Analysis of soluble and insoluble fractions of fusion proteins TMV CP-L15-E7ggg and TMV CP-L15 expressed in *E. coli*. A: The fusion proteins were produced without molecular chaperones. Fusion proteins TMV CP-L15-E7ggg (B) a TMV CP-L15 (C) were expressed with various combinations of molecular chaperones. The fusion proteins were detected using anti-TMV antibody. E – total crude extract from induced cultures of *E. coli* MC1061 transformed by pMPM:TMV CP-L15-E7ggg construct and various molecular chaperones, SF – soluble fraction, IF – insoluble fraction, M – protein marker Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, C – TMV particles used as positive control.

Molecular chaperones expressed from pTf16, pG-KJE8 and pKJE7 plasmids were induced with L-arabinose, which was also used for the induction of target fusion proteins. Tetracyclin was another inductor and was used alone (pG-Tf2) or in combination with L-arabinose (pG-KJE8). The expression of fusion proteins and molecular chaperones was optimized. From our results arises that the lack of molecular chaperones is the limiting factor for expression of chimeric proteins TMV CP-L15-E7ggg and TMV CP-L15 in a soluble form (fig. 1, p. 23). The high level expression of TMV CP-L15-E7ggg soluble proteins was achieved, when GroEL-GroES together with TF were used. The GroEL-GroES chaperone complex promotes protein folding, solubility and assembly of TMV CP in *E. coli* (Hwang *et al.*, 1998). This fact is in agreement with our results. The overproduction of TF alone had also a positive effect on solubilization of target fusion proteins. Combination of GroEL-GroES and TF can be more effective for solubilization of some heterologous proteins expressed in *E. coli* than TF alone, because TF and GroEL-GroES closely cooperate. On the other hand effect of TF depends on expressed protein (Nishihara *et al.*, 2000). This fact confirms our results, because use of TF alone had better effect on solubilization of TMV CP-L15, while in the case of TMV CP-L15-E7ggg was more effective use of TF-GroEL-GroES combination. Use of DnaK-DnaJ-GrpE facilitated solubilization of TMV CP-L15. As it was previously shown, the overproduction of DnaK has a significant effect on total expression, correct folding and assembly of TMV CP *in vivo* (Hwang *et al.*, 1998). The co-expression of the TMV CP-L15-E7ggg with DnaK-DnaJ-GrpE complex had no effect on solubilization of this construct. Better results were not obtained also in combination with GroEL-GroES chaperone complex. This can be done by DnaJ presence, which can have negative effect on TMV CP expression, folding and assembly in *E. coli* (Hwang *et al.*, 1998).

Soluble fusion proteins obtained from co-expression with TF (pTf16) and TF-GroEL-GroES (pG-Tf2) were subjected to ultracentrifugation in density gradient of sucrose (10%, 30%, 50% and 60%) to further characterize the behavior of E7ggg fusion protein in comparison with TMV CP-L15. Fusion proteins were detected in all sucrose fractions. The distribution of TMV CP-L15-E7ggg through sucrose gradient suggested that the chimera's ability to form dimers, multimers and VLP were not seriously affected by the E7ggg insertion. The same distribution profile was obtained for TMV CP-L15. The samples for transmission electron microscopy were prepared from sucrose fraction of multimers. VLP were not observed.

Production of TMV CP-L15-E7ggg in *N. benthamiana*

The sequence coding for TMV CP-L15-E7ggg fusion protein was inserted into binary vector based on TMV giving the pGR:TMV CP-L15-E7ggg construct. The pGR:TMV CP-L15-E7ggg transformed *A. tumefaciens* GV3101 cultures were agroinfiltrated into *N. benthamiana* plants. Different genotypes of *N. benthamiana* (Nb) were tested – non-transgenic Nb, transgenic Nb carrying gene for TMV MP, transgenic Nb carrying gene for PVA HC-Pro and transgenic Nb carrying genes for TMV MP and PVA HC-Pro. The plants infected with the chimeric construct developed necrotic lesions on inoculated leaves 7-10 dpi. The pGR:TMV CP-L15-E7ggg construct did not develop any symptoms on upper (non-inoculated) leaves. TMV CP-L15-E7ggg fusion protein was immunoreactive, what was demonstrated by its binding to anti-TMV and anti-E7 antibodies. The fusion protein migrated approximately 9 kDa higher in SDS PAGE than expected. The chimeric protein TMV CP-L15-E7ggg was expressed in all tested genotypes of *N. benthamiana*. There were no substantial differences in expression of this construct in transgenic and non-transgenic plants.

Connection of E7ggg to TMV CP resulted in change of protein properties, because the chimeric protein remained mainly in plant homogenate during purification. VLP formed aggregates and reacted with other plant components or with each other.

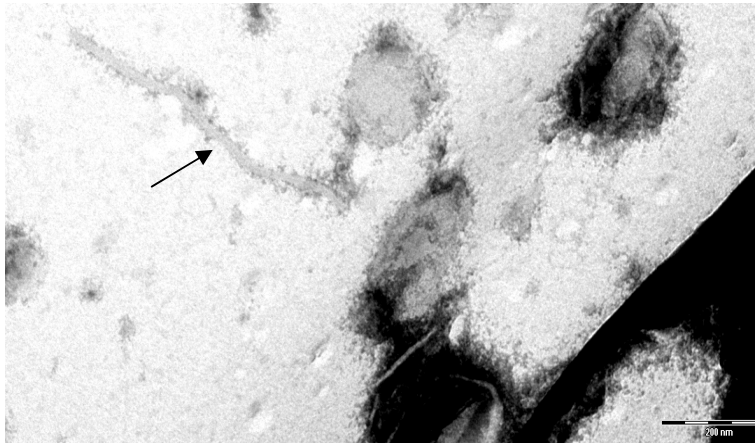


Fig. 2: Electron micrograph of chimeric VLP composed of TMV CP-L15-E7ggg. VLP were negatively stained by 2% uranylacetate.

Forming of VLP was proved by IC-RT PCR and by transmission electron microscopy (fig. 2). Insertion of E7ggg complete sequence influenced strongly the VLP formation, because they accumulated to very low titres (1 mg/ kg fresh leaves) in plant tissue and they did not move systematically. We suppose that this can be done by change of

steric and electrostatic properties of the particles. In comparison the 133 aa fragment A protein from *Staphylococcus aureus* fused to the coat protein of *Turnip vein-clearing virus* (TVCV) via the 15 aa linker did not influence systematic movement of the chimeric virus and its accumulation in plant tissue. Moreover chimeric particles formed homogenous population of VLP (Werner a kol., 2006). VLP composed of TMV CP-L15-E7ggg formed heterogenous population of particles.

pGR:TMV CP-L15-E7ggg infected leaves were infectious, which was proved by mechanical transmission to *N. benthamiana* expressing TMV MP and PVA HC-Pro, *Nicotiana tabacum*, cv. Petit Havana SR1 and *Nicotiana tabacum*, cv. Samsun NN. The infection does not spread systemically in any types of tested plants.

Production of oncoprotein E7ggg from HPV 16 using viral vector based on PVX

E7ggg was fused to the C-terminus of PVX CP either directly (PVX CP-E7ggg) or via 4 aa/15 aa linker (PVX CP-L4-E7ggg/PVX CP-L15-E7ggg). We performed for the first time expression of a protein exploiting the C-terminus of PVX CP in plants. The C-terminal PVX CP sequence (60bp) was duplicated to ensure proper viral replication of these constructs (Verchot-Lubicz a kol., 2007).

Production of PVX CP-E7ggg, PVX CP-L4-E7ggg and PVX CP-L15-E7ggg in *E. coli*

The chimeric proteins were expressed from the pMPM-A4Ω plasmid in *E. coli* MC1061 cells. The fusion proteins were induced by L-arabinose. The optimal conditions for proteins expression required incubation for 12 h at 25°C. The expressed proteins reacted with anti-E7 and anti-PVX CP antibodies and migrated about 8 kDa higher than expected. This result confirms our previous data obtained during production of E7ggg oncoprotein in TMV based construct. The fusion proteins were mainly in a soluble form and were stable. The lack of molecular chaperons was not the limiting factor for expression of these proteins in a soluble form. In comparison, the use of molecular chaperones increased production of a soluble form of TMV CP-L15-E7ggg and TMV CP-L15 (Lidický, 2010).

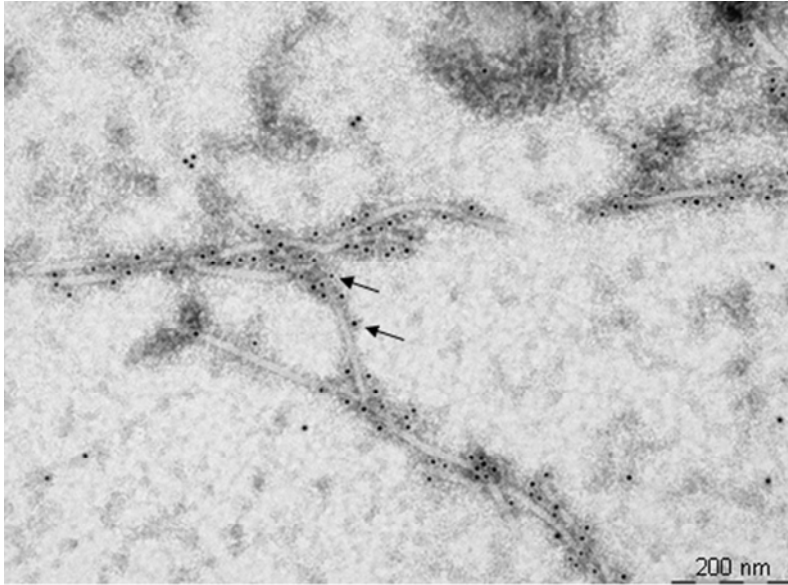


Fig. 3: Electron micrograph of chimeric particles of pMPM:PVX CP-E7ggg isolated from *E. coli* MC1061. The particles were decorated with rabbit anti-PVX and secondary goat anti-rabbit antibodies carrying 10 nm gold particles and with mouse-anti-E7 and secondary goat anti-mouse antibodies carrying 15 nm gold particles.

Insertion of linkers between PVX CP and E7ggg did not influence level of expression of chimeric proteins. PVX CP-E7ggg, PVX CP-L4-E7ggg and PVX CP-L15-E7ggg were able to form VLP, which was proved by transmission electron microscopy (fig. 3).

Production of PVX CP-E7ggg, PVX CP-L4-E7ggg and PVX CP-L15-E7ggg in *N. benthamiana*

PVX CP-E7ggg, PVX CP-L4-E7ggg and PVX CP-L15-E7ggg were transiently expressed in transgenic *N. benthamiana* carrying HC-Pro gene from PVA. The impact of linkers on expression levels of fusion proteins was not observed. The fusion proteins were not detected in upper (non-inoculated) leaves. Agroinfiltrated leaves were infectious, which was proved by mechanical transmission to *N. benthamiana*. Fusion proteins were unstable during purification. This fact can be explained by the fusion of E7ggg to the C-terminus of PVX CP, because in the case of the same fusion to the N-terminus of PVX CP the degradation was not observed. Moreover the N-terminal fusion of PVX CP to E7 can stabilize E7 oncoprotein in tobacco chloroplasts (Morgenfeld et al., 2009). The presence of VLP was not proved.

Production of L2₁₀₈₋₁₂₀ epitope from HPV 16 using viral vector based on PVX in *N. benthamiana*

The epitope L2₁₀₈₋₁₂₀ is highly conserved in various HPV types and is probably located on the virion surface. Therefore L2₁₀₈₋₁₂₀ is also an attractive candidate for experimental vaccine development. In pGR:PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀ a pGR:PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀mut constructs the 3'-terminal PVX CP sequence (60bp) was duplicated to ensure proper viral replication of

these constructs. pGR:PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀ and pGR:PVX CP L2₁₀₈₋₁₂₀mut were agroinfiltrated into transgenic *N. benthamiana* expressing TMV MP. TMV MP can fully compensate transport functions of PVX CP (Fedorkin a kol., 2001). The PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀ protein was not expressed, and therefore we isolated RNA from appropriate infected plants and performed RT PCR. After sequencing of the obtained product we found out that the 3'-terminal epitope was lost together with one copy of the 3'-terminal PVX CP 60bp most probably because of the recombination event between these two identical sequences. In comparison to previous successful expression of HPV 16 E7ggg (98 aa) fused to the 3'-terminus of PVX CP this elimination event seems to be specific for shorter 3'-terminal fusions.

In the case of pGR:PVX CP L2₁₀₈₋₁₂₀mut construct, the inoculated leaves of *N. benthamiana* carrying TMV MP gene contained fusion protein of the expected electrophoretic mobility of approximately 34 kDa. We could not detect protein of this size in upper (non-inoculated) leaves. Agroinfiltrated leaves were infectious in following mechanical inoculations. By electron microscopy we proved the inability of PVX CP-L2₁₀₈₋₁₂₀mut to form virions. It seems that this C-terminal modification of the PVX CP makes virion assembly *in vivo* impossible.

Conclusions

1. Fusion protein TMV CP-L15-E7ggg was expressed in *E. coli* in a soluble form using molecular chaperones. TMV CP-L15-E7ggg reacted with appropriate antibodies and was stable. The presence of E7ggg did not influence the formation of dimers and multimers of chimeric TMV, which was confirmed by gradient ultracentrifugation. Formation of VLP created from TMV CP-L15-E7ggg prepared in *E. coli* was not proved. Fusion protein TMV CP-L15-E7ggg was transiently expressed in all tested *N. benthamiana* genotypes. pGR:TMV CP-L15-E7ggg infection did not move systemically. Agroinfiltrated leaves were infectious in following mechanical inoculations. TMV CP-L15-E7ggg was able to form VLP, which were confirmed by IC RT-PCR and by transmission electron microscopy.

2. The PVX CP-E7ggg, PVX CP-L4-E7ggg and PVX CP-L15-E7ggg fusion proteins were expressed in *E. coli*. The impact of linkers on the level of expression of chimeric proteins was not proved. Fusion proteins prepared in *E. coli* were able to form VLP. PVX CP-E7ggg, PVX CP-L4-E7ggg and PVX CP-L15-E7ggg were transiently expressed in transgenic *N. benthamiana* expressing HC-Pro from PVA. Infection did not move systemically. Agroinfiltrated leaves were infectious in following mechanical inoculations. We were not able to determine the presence of chimeric VLP for plant expressed constructs due to their instability during purification.

3. To ensure the transient expression of PVX CP-L₂₁₀₈₋₁₂₀ in transgenic *N. benthamiana* expressing MP TMV it was necessary to prevent recombination using silent mutations in the first copy of 60 bp sequence of 3' terminus PVX CP. The product of expected size (34 kDa) was detected in the pGR:PVX CP L₂₁₀₈₋₁₂₀mut infected leaves. We could not detect protein of this size in upper non-inoculated leaves. Agroinfiltrated leaves were not infectious. The inability of PVX CP-L₂₁₀₈₋₁₂₀mut to form VLP was proved by transmission electron microscopy

4. Study of expression cassettes derived from plant viruses determined for transient expression of experimental vaccine in plants is a promising technology for biotechnological use of plants as a new expression system for valuable therapeutic proteins.

Použitá literatura/References

- Angell SM, Baulcombe DC (1997): Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating *Potato virus X* RNA. *EMBO J*, 16: 3675-3684.
- Asselin A, Zaitlin M (1978): Characterization of a second protein associated with virions of *Tobacco mosaic virus*. *Virology*, 91(1): 173-81.
- Beachy RN (1995): Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response. *Vaccine*, 13(12): 1051-1057.
- Čeřovská N, Filigarová M, Branišová H, Žák P, Dědič P (1991): Some factors influencing purification of *Potato virus A* (PVA). *Acta Virol*, 35: 469–471.
- Čeřovská N, Moravec T, Velemínský J (2002): Polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of *Potato virus A*. *Acta Virol*, 46 (3): 147-151.
- Čeřovská N, Pečenková T, Moravec T, Velemínský J (2004): Transient expression of heterologous model gene in plants using *Potato virus X*-based vector, *Plant cell tissue org*, 79: 147–152.
- Cunningham C, Porter JR (1998): *Recombinant Proteins from Plants: Production and Isolation of Clinically Useful Compounds*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Cutts FT, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, de Sanjose S, Garnett G, Edmunds WJ, Claeys P, Goldenthal KL, Harper DM, Markowitz L (2007): Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bull World Health Organ*, 85(9): 719-726.
- Fedorkin ON, Solovyev AG, Yelina NE, Zamyatnin AA Jr, Zinovkin RA, Mäkinen K, Schiemann J, Morozov SY (2001): Cell-to-cell movement of *Potato virus X* involves distinct function of the coat protein. *J Gen Virol*, 82: 449-458.
- Fernández-San Millán A, Ortigosa SM, Hervás-Stubbs S, Corral-Martínez P, Seguí-Simarro JM, Gaétan J, Coursaget P, Veramendi J (2008): Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol J*, 6: 427-441.
- Fitchen J, Beachy RN, Hein MB (1995): Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response. *Vaccine*, 13(12): 1051-1057.
- Folwarczna J, Plchová H, Moravec T, Hoffmeisterová H, Dědič P, Čeřovská N (2008): Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of *Potato virus Y*. *Folia Microbiol*, 53(5): 438-442.
- Gleba Y, Marillonnet S, Klimyuk V (2004): Engineering viral expression vectors for plants: the “full virus” and the “deconstructed virus” strategies. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 182- 188.
- Goelet P, Karn J (1982): *Tobacco mosaic virus* induces the synthesis of a family of 3' coterminal messenger RNAs and their complements. *J Mol Biol*, 154(3): 541-550.
- Higuchi R, Krummel B, Saiki RK (1988): A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic acids res*, 16: 7351-7367.
- Hirano H, Watanabe T (1990): Microsequencing of proteins electrotransferred onto immobilizing matrices from polyacrylamide gel electrophoresis: application to an insoluble protein. *Electrophoresis*, 11: 573-580.
- Horton RM (1995): PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes. *Mol Biotechnol*, 3: 93–99.
- Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR (1989): Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 77: 61-68.
- Hu B, Pillai-Nair N, Hemengway C (2007): Long-distance RNA-RNA interactions between terminal elements and the same subset of internal elements on the *Potato virus X* genome mediate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA*, 13 (2): 267-280.

- Huisman MJ, Linthorst HJM, Bol JF, Cornelissen BJC (1988): The complete nucleotide sequence of *Potato virus X* and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. *J Gen Virol*, 69: 1789-1798.
- Hwang DJ, Roberts IM, Wilson TM (1994): Expression of *Tobacco mosaic virus* coat protein and assembly of pseudovirus particles in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(19): 9067-9071
- Hwang DJ, Tumer NE, Wilson TMA (1998): Chaperone protein GrpE and the GroEL/GroES complex promote the correct folding of *Tobacco mosaic virus* coat protein for ribonucleocapsid assembly *in vivo*. *Arch Virol*, 143: 2203-2214.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lidický, Ondřej (2010): Heterologní exprese onkoproteinů E7 *Lidského papillomaviru* (HPV 16). Diplomová práce, PřF UK, katedra biochemie.
- Mayer MP (1995): A new set of useful cloning, expression vectors derived from PBluescript, *Gene*, 163: 41-46.
- McLaughlin-Drubin ME, Münger K (2009): The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, 384: 335-344.
- Morgenfeld M, Segretin ME, Wirth S, Lentz E, Zelada A, Mentaberry A, Gissmann L, Bravo-Almonacid F (2009): *Potato virus X* coat protein fusion to *Human papillomavirus* 16 E7 oncoprotein enhance antigen stability and accumulation in tobacco chloroplast. *Mol biotechnol*, 43: 243-249.
- Nemchinov LG, Liang TJ, Rifaat MM, Mazyad HM, Hadidi A, Keith JM (2000): Development of a plant-derived subunit vaccine candidate against *Hepatitis C virus*. *Arch Virol*, 145(12): 2557-2573.
- Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T (1998): Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GroE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 64: 1694-1699.
- Nishihara, K, Kanemori M, Yanagi H, Yura T (2000): Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 66: 884-889.
- Šmahel M, Síma P, Ludvíková V, Vonka V (2001): Modified HPV16 E7 genes as DNA vaccine against E7-containing oncogenic cells. *Virology*, 281(2): 231-238.
- Tollin P, Wilson HR, Bancroft JB (1980): Further observations on the structure of particles of *Potato virus X*. *J Gen Virol*, 49: 407-410.
- Touze A, El Mehdaoui S, Sizaret PY, Mougín C, Muñoz N, Coursaget P (1998): The L1 major capsid protein of *Human papillomavirus* type 16 variants affects yield of virus-like particles produced in an insect cell expression system. *J Clin Microbiol*, 36(7): 2046-2051.
- Verchot-Lubicz J, Ye CM, Bamunusinghe D (2007): Molecular biology of potexviruses: recent advances. *J Gen Virol*, 88: 1643-1655.
- Vonka V (1997): Lidské papillomaviry: jejich role při vzniku lidských nádorů a možnosti vývoje očkovacích látek. *Remedia – Klin. mikrobiologie*, 1(7): 206-212.
- Werner S, Marillonnet S, Hause G, Klimyuk V, Gleba Y (2006): Immunoabsorbent nanoparticles based on a tobamovirus displaying protein A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(47): 17678–17683.

Curriculum vitae

RNDr. JITKA FOLWARCZNA

Vašátkova 1019/2, 198 00 Praha 9

Tel: 605 58 71 05

E-mail: j.kmonickova@seznam.cz

Vzdělání:

- **2006** RNDr. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, obor biochemie, jako rigorózní práce uznána práce diplomová
- **2000-2005** Mgr. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, obor biochemie
Diplomová práce: „Vývoj a optimalizace expresních systémů pro β -N-acetylhexosaminidasu z *Aspergillus oryzae*.“

Zaměstnání:

- **2010-přítomnost** Rodičovská dovolená
- **2006-přítomnost** Ph.D student Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, obor biochemie
- **2005-2010** Laboratoř virologie, Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. i.

Stáže:

- **2009** laboratoř Prof. Agnieszky Sirko, Institut Biochemie a Biofyziky, Varšava, Polsko (1 měsíc)

Jazykové znalosti:

- Anglický jazyk First Certificate in English
- Německý jazyk maturitní zkouška

Seznam publikací/Selected publications

ČLÁNKY PŘEDKLÁDÁNÉ K OBHAJOBĚ

1. **Folwarczna J**, Moravec T, Plchová H, Hoffmeisterová H, Čeřovská N (2012): Efficient expression of *Human papillomavirus* 16 E7 oncoprotein fused to C-terminus of *Tobacco mosaic virus* (TMV) coat protein using molecular chaperones in *E.coli*. *Protein Expr Purif*, 85: 152-157. IF= 1,654
2. Čeřovská N, Hoffmeisterová H, Moravec T, Plchová H, **Folwarczna J**, Synková H, Ryšlavá H, Ludviková V, Šmahel M (2012): Transient expression of *Human papillomavirus* type 16 L2 epitope fused to N- and C-terminus of coat protein of *Potato virus X* in plants. *J Biosci*, 37 (1): 125–133. IF= 1,65
3. Hoffmeisterová H, Moravec T, Plchová H, **Folwarczna J**, Čeřovská N (2012): The influence of the N- and C- terminal modifications of *Potato virus X* coat protein on virus properties. *Biol Plantarum*, 56(4): 775-79. IF=1,974
4. Plchová H, Moravec T, Hoffmeisterová H, **Folwarczna J**, Čeřovská N (2011): Expression of *Human papillomavirus* 16 E7ggg oncoprotein on N- and C-terminus of *Potato virus X* coat protein in bacterial and plant cells. *Protein Expr Purif*, 77(2):146-52. IF= 1,654

RUKOPIS V PŘÍPRAVĚ

5. **Folwarczna J**, Moravec T, Hoffmeisterová H, Plchová H, Čeřovská N: Transient expression of *Human papillomavirus* type 16 E7 gene fused to coat protein of *Tobacco mosaic virus* in plants, rukopis v přípravě.

OSTATNÍ ČLÁNKY

1. Čeřovská N, Moravec T, Plchová H, Hoffmeisterová H, **Folwarczna J**, Dědič P (2010). Production of polyclonal antibodies to *Potato virus X* (PVX) using recombinant coat protein. *J Phytopathol*, 158: 66-68. IF = 0,791
2. **Folwarczna J**, Plchová H, Moravec T, Hoffmeisterová H, Dědič P, Čeřovská N (2008). Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of *Potato virus Y*. *Folia mikrobiol*, 53: 438-442. IF = 0,677.
3. Hoffmeisterová H, Čeřovská N, Moravec T, Plchová H, **Folwarczna J**, Velemínský J (2008). Transient expression of fusion gene coding for the HPV-16 epitopes fused to the sequence of potyvirus coat protein using different means of inoculation of *Nicotiana benthamiana* and *Brassica rapa*, cv. *Rapa* plants. *Plant cell tiss org*, 94: 261-267. IF= 3,09
4. Čeřovská N, Hoffmeisterová H, Moravec T, Plchová H, **Folwarczna J**, Hadámková R (2008): Optimum storage conditions for product of transiently expressed epitopes of human papillomavirus using *Potato virus X*-based vector. *Biol Plantarum*, 52: 184-186. IF =1,974

ABSTRAKTY V ČASOPISECH

1. Čeřovská N, Plchová H, Moravec T, Hoffmeisterová H, **Folwarczna J**, Šalanská M, Šmahel M, Ludviková V (2009): Transient expression of E7 and L2 derived peptides from *Human papillomavirus* type 16 using *Potato virus X*-based vector. 34th FEBS Congress, Praha, The FEBS Journal, 276: 275.
2. **Folwarczna J**, Plchová H, Hoffmeisterová H, Moravec T, Dědič P, Čeřovská N (2008): Production of polyclonal antibodies against a recombinant coat protein of *Potato virus X*

(PVX). Central european congress of life science, Krakov (Polsko), *Acta Biochim Pol*, 55: 108.

3. Hoffmeisterová H, Plchová H, **Folwarczna J**, Moravec T, Čeřovská N (2008): Expression of human papillomavirus (HPV) epitopes in plants. Central european congress of life science, Krakov (Polsko), *Acta Biochim Pol*, 55: 46.

ABSTRAKTY VE SBORNÍCÍCH

1. **Folwarczna J**, Moravec T, Plchová H, Hoffmeisterová H, Čeřovská N (2009): Expression and purification of experimental therapeutic anti-HPV vaccine using plant virus. 5. Metodické dny, Malenovice, Sborník abstraktů, s 53.
2. Hoffmeisterová H, Moravec T, Plchová H, **Folwarczna J**, Čeřovská N (2009): Systemic movement of C-terminally modified *Potato virus X* in *Nicotiana benthamiana* plants. 5. Metodické dny, Malenovice, Sborník abstraktů, s 58.
3. **Folwarczna J**, Moravec T, Plchová H, Hoffmeisterová H, Čeřovská N (2009): Construction of *Tobacco mosaic virus* based vector carrying E7 gene from *Human papillomavirus* type 16 and its transient expression. 34th FEBS Congress, Praha, Sborník pozdních abstraktů, s 87.
4. Hoffmeisterová H, Moravec T, Plchová H, **Folwarczna J**, Šalanská M, Šmahel M, Čeřovská N (2009): Expression of the epitope aa 108-120 derived from L2 capsid protein of *Human papillomavirus* type 16 in tobacco plants. 34th FEBS Congress, Praha, Sborník pozdních abstraktů, s 95.
5. Čeřovská N, Plchová H, Moravec T, Hoffmeisterová H, **Folwarczna J**, Šmahel M (2009): Design of constructs for expression of *Human papillomavirus* 16 (HPV16) E7 oncoprotein in plants. 8th international symposium in the series: Recent advances in plant biotechnology, Segedín (Mařarsko), Sborník abstraktů, s 46 - 47.
6. Hoffmeisterová H, Moravec T, Plchová H, **Folwarczna J**, Šalanská M, Čeřovská N (2009): Expression of the epitope aa 108-120 derived from L2 minor capsid protein of *Human papillomavirus* type 16 in tobacco plants. 8th international symposium in the series: Recent advances in plant biotechnology, Segedín (Mařarsko), Sborník abstraktů, s 54.
7. **Folwarczna J**, Plchová H, Moravec T, Hoffmeisterová H, Čeřovská N (2008): Využití rekombinantních antigenů. Biotechnologie 2008, České Budějovice, Sborník abstraktů, s 97 - 99.
8. Čeřovská N, Hoffmeisterová H, Plchová H, Moravec T, **Folwarczna J**, Velemínský J, Pokorná D, Šmahel M (2008): Způsoby zlepšení úrovně transientní exprese epitopů lidského papilomaviru v rostlinách. Biotechnologie 2008, České Budějovice, Book of abstracts, s 49 - 51.
9. Čeřovská N, Hoffmeisterová H, Moravec T, Plchová H, **Kmoníčková J (Folwarczna J)**, Velemínský J (2007): Produkce heterologních proteinů v rostlinách. Konference experimentální biologie rostlin – 11. dny fyziologie rostlin, Sborník abstraktů, s 101.
10. Čeřovská N, Hoffmeisterová H, Plchová H, **Kmoníčková J (Folwarczna J)**, Moravec T (2007): Expression enhancement of epitopes of human papillomavirus in plants. 7 th International Symposium in the Series Recent Advances in Plant Biotechnology Plant Biotechnology: Impact on high quality plant production, Stará Lesná (Slovensko), Book of abstracts, s 113.