

Tallinna Reaalkool

**Erinevate kapsiidivalkudega pakitud
adenoassotsieeritud viirusvektorite
nakatumisvõime mõõtmine koekultuurides**

Uurimistöö

Mia Marleen Rahe

140.a, reaal-programmeerimise õppesuund

Juhendajad: PhD Illar Pata

õp Kersti Veskimets

Tallinn 2024

Sisukord

Lühendite loetelu	4
Sissejuhatus	7
1. Kirjanduse ülevaade	9
1.1. Geeniteraapia üldiseloomustus	9
1.1.1. Geeniteraapia ajaloost	9
1.1.2. Mitteviiruslikud geenide rakku viimise viisid	10
1.1.3. Viirusvektorid geeniteraapias	12
1.1.4. Kasutusel olevad ravid	12
1.2. Adenoassotsieeritud viirus	13
1.2.1. Viiruse genoom	13
1.2.2. Viiruse kapsiid	15
1.2.3. Adenoassotsieeritud viiruse paljunemine	16
1.2.4. Viiruse serotüübid	18
1.2.5. AAV kasutamine geeniteraapias	21
1.2.6. AAV kapsiidide modifitseerimine peptiididega	22
1.3. Golden Gate klonimine	23
2. Eksperimentaalne osa	26
2.1. Töö eesmärk	26
2.2. Materjalid ja meetodika	26
2.2.1. Töös kasutatud plasmiidid	26
2.2.2. Töös kasutatud peptiidide ja oligonukleotiidpraimerite järjestused	27
2.2.3. Ligeerimine ja transformeerimine	28
2.2.4. Plasmiidse DNA eraldamine aluselise lüüsi meetodil	28
2.2.5. DNA restriksioon, geelelektroforees ja fragmentide puhastamine	29
2.2.6. Golden Gate klonimine	30
2.2.7. Koekultuuri rakkude kasvatamine	30
2.2.8. AAV viirusvektorite tootmine ja puhastamine	30
2.2.9. AAV transduktsioonivõime mõõtmine koekultuurirakkudes	31
2.3. Tulemused	32
2.3.1. Kanamütsiini resistentse sinivalget selektsiooni võimaldava Golden Gate vektori (pGGA_Kan_LacZ α) konstrueerimine	32

2.3.2.	Fragmentide kloneerimine pGGA_Kan_LacZ α vektorisse	33
2.3.3.	Golden Gate kloneerimine	36
2.3.4.	Peptiididega modifitseeritud täispikkade pRepCap plasmiidide konstrueerimine	37
2.3.5.	Tõhusamate Golden Gate aktseptorplasmiidide konstrueerimine .	39
2.3.6.	AAV transduktsiooni võime mõõtmine koekultuuri rakkudes . . .	39
2.4.	Arutelu	40
	Kokkuvõte	43
	Kasutatud materjalid	45
	Lisa 1 Metsiktüüpi AAV-de kapsiidivalkude aminohappelised järjestused	51
	Resümee	55
	Abstract	56
	Kinnitusleht	57

Lühendite loetelu

Lühend	Tähendus inglise keeles	Tähendus eesti keeles
AADC	aromatic L-amino acid decarboxylase	aromaatne L-aminohappe dekarboksülaas
AAV	adeno-associated viruses	adenoassotsieeritud viirus
AAVS1	adeno-associated virus integration site 1	adenoassotsieeritud viiruse integratsioonisaht 1
ADA-SCID	adenosine deaminase deficient severe combined immunodeficiency	adenosiini deaminaasi raske kombineeritud immuunpuudulikkus
ADV	aleutian disease virus	aleuudi haiguse viirus
B-ALL	B-cell acute lymphoblastic leukemia	B-rakuline äge lümfoidne leukeemia
CALD	cerebral adrenoleukodystrophy	tserebraalne adrenoleukodüstroofia
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma	difuusne B-suurerakuline lümfoom
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium	Dulbecco muudetud Eagle sööde
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	etüleendiamiintetraädikhape
EGFR	epidermal growth factor receptor	epidermaalse kasvufaktori retseptor
EMEM	Eagle's minimum essential medium	minimaalne Eagle sööde
FBS	fetal bovine serum	veise loote seerum
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	fibroblasti kasvufaktori retseptor 1
HEK293FT	human embryonic kidney cell line 293FT	inimese embrüonaalsete neerurakkude liin 293FT
HGFR	hepatocyte growth factor receptor	hepatotsüütide kasvufaktori retseptor

HSPG	heparan sulfate proteoglycan	heparaansulfaat proteoglükaan
ITR	inverted terminal repeat	otsmine pöördkordusjärjestus
LamR	Laminin receptor	laminiini retseptor
LB	Luria–Bertani medium	Luria–Bertani sööde
LCA	Leber’s congenital amaurosis	Leberi kaasasündinud amauroos
MLD	metachromatic leukodystrophy	metakromaatileine leukodüstroofia
MM	multiple myeloma	hulgimüeloom
OTCD	ornithine transcarbamylase deficiency	ornitiini transkarbamülaasi puudulikkus
PBS	phosphate-buffered saline	fosfaatpuhverdatud soollahus
PDGFR	platelet-derived growth factor receptors	trombotsüütidest pärinev kasvufaktori retseptor
PEST	penicillin G and streptomycin solution	G-penitsilliini ja streptomütsiini lahus
PMBCL	primary mediastinal large B-cell lymphoma	primaarne mediastiinumi B-suurrakkümfoom
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon
RP	retinitis pigmentosa	pigmentoosne retiniit
rpm	revolutions per minute	pööret minutis
SCID	severe combined immunodeficiency	raske kombineeritud immuunpuudulikkus
SMA	spinal muscular atrophy	spinaalne lihasatroofia
VP	viral protein	viirusvalk
VR	variable region	muutuv piirkond AAV kapsiidivalgus

Lühend	Aminohape
A	alaniin
R	arginiin
N	aspargiin
D	aspargiinhape
Q	glutamiin
E	glutamiinhape
G	glütsiin
H	histidiin
I	isoleutsiin
L	leutsiin
K	lüsiin
M	metioniin
F	fenüülalaniin
P	proliin
S	seriin
T	treoniin
W	trüptofaan
C	tsüsteiin
Y	türosiin
V	valiin

Sissejuhatus

Ligikaudu 80% teadaolevatest haigustest on põhjustatud geenivigade tõttu. Nende ravimiseks on võimalik kasutatada geeniteraapiat. Geeniteraapia on ravi, mille eesmärgiks on organismi geeniekspressiooni muutmine või ebanormaalsete geenide korrigeerimine. Geeniteraapia käigus siirdatakse geeni terve koopia kahjustunud kudede rakkudesse. Terve geenikoopia rakku viimiseks kasutatakse nii vektoreid kui ka füüsikalisi ja keemilisi meetodeid. Kõige sagedamini tehakse seda siiski viirusvektorite abil. Viirusvektorid on viirused, milles enamik pärilikkusainest on asendatud terapeutilise geeniga ning mis ei suuda seetõttu enamasti rakus paljuneda.

Viirusvektoritest on ühed sagedamini kasutatavad adenoassotsieeritud viirusvektorid (AAV). AAV on saanud niivõrd laialdaselt kasutatavaks, sest nende looduslikud serotüübid ehk AAV-d, mis erinevad vaid oma kapsiidivalkude ja neid kodeerivate DNA järjestuste poolest, pole inimese jaoks patogeensed, nad ei suuda rakus iseseisvalt paljuneda ning nende poolt kantav geneetiline materjal ei integreeru peremeesraku genoomi. Lisaks on AAV puhul võimalik koespetsiifiline nakatamine, mis tähendab, et sõltuvalt AAV kapsiidist nakatab ta eelkõige teatud kudesid. See on geeniteraapia aspektist oluline, kuna võimaldab paremini tabada terapeutiliselt olulist sihtmärkkude.

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks on konstrueerida esmalt platvorm erinevatest plasmiidsetest DNA konstruktidest, mis võimaldaks lihtsa vaevaga muuta AAV kapsiidide järjestusi; teiseks, kasutades reportergeeni ekspresseerivat AAV vektorit, pakkida AAV erinevate kapsiidivalkudega ning nakatada nendega koekultuuri rakke. Määrates rakku sisenenud ning seal ekspresseerunud AAV-ga kantava geneetilise materjali hulka, loodetakse saada vastus uurimistöö peamisele uurimisküsimusele, millised kapsiidivalgud on sobilikumad erinevate inimeste kudede transdutseerimiseks.

Uurimistöö jaguneb teoreetiliseks ja eksperimentaalseks osaks. Töö teoreetilises osas antakse ülevaade geeniteraapiast, adenoassotsieeritud viirustest ning kasutusest geeniteraapias, erinevatest adenoassotsieeritud viirusvektorite kapsiidivalkude variantidest ning nende

modifitseerimisest peptiididega. Uurimistöö eksperimentaalses osas luuakse platvorm AAV kapsiidide mugavaks modifitseerimiseks, kloonitakse rida vähi- ja kopsuspetsiifiliste peptiididega muteeritud kapsiide. Valitud kapsiididega testitakse AAV tootmist ja transduktsiooni rakkudes.

Uurimistöö geeniteraapia teoreetiline alus põhineb peamiselt artiklidel *Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview* ja *Gene therapy: advances, challenges and perspectives*. Adenoassiotseeritud viiruste ülevaade tugineb suures mahus artiklitele *AAV vectors: The Rubik's cube of human gene therapy* ning *AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes*.

Uurimistöö koostaja tänab uurimistöö valmimisele kaasa aidanud juhendajaid PhD Illar Patat ja õpetaja Kersti Veskimetsa, kes aitasid leida tööks sobivaid materjale, vormistada uurimistööd ning panustasid töö edukale valmimisele.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Geeniteraapia üldiseloostus

1.1.1. Geeniteraapia ajaloost

Geeniteraapia on defineeritud kui haiguse või häire ravi geneetiliselt muundatud materjali viimine inimese rakkudesse (Scheller, Krebsbach 2009). Mõte geeniteraapiast kui viisist raviga geenivigade tõttu tekitatud haigusi kerkis esile juba 1960. aastatel. 1961. aastal viidi esimest korda DNAd inimeselt võetud rakkudesse. Esimene katse geeniteraapiat rakendada inimeste puhul tehti 1971. aastal, kahjuks ei kandnud see katsetus aga vilja. (Marks 2018) Kuigi rekombinantne insuliin ei lähe otseselt geeniteraapia alla, oli selle esmakordne tootmine 1978. aastal geenide muundamise valdkonnas suureks läbimurdeks (Alyas *et al.* 2021).

1989. aastal kiitis Ameerika Ühendriikide riiklik terviseinstituud (NIH) heaks esimese raviprotokolli, mis hõlmas endas võõrgeeni sisestamist vähihaige inimese immuunrakkudesse. Esimene õnnestunud ravi viidi läbi 1990. aastal, mil raviti ADA-SCID sündroomiga lapsi. (Scheller, Krebsbach 2009) Kuigi mõnel lapsel tekkis raviks kasutatava viiruse ühinemisel genoomi teatud piirkonda leukeemia, oli see tavapäraste vahenditega ravitav ning seetõttu võis ADA-SCID ravi siiski edukaks pidada (Lundstrom 2023). Esimene laps, kes seda ravi sai oli tola neljaastane Ashanthi de Silva, kes on tänu saadud ravile üle kolmekümne aasta täisväärtuslikku elu elanud (Fliesler). Suur tagasilöök saabus geeniteraapia valdkonda 1999. aastal kui kaheksateistkümnepäevane Jesse Gelsinger, suri neli päeva pärast OTCD-d raviva geeniteraapia saamist. Peale tema surma peatati mõneks ajaks kõik geeniteraapia kliinilised katsed. (Sibbald 2001) Nüüdseks on geeniteraapia valdkond sellest kurvast sündmusest jõudsalt taastumas ning praegu on maailmas kliinilises katsetusjärgus üle 2500 geeniteraapial põhineva ravi (National Institutes of Health).

1.1.2. Mitteviiruslikud geenide rakku viimise viisid

Geenide rakku viimiseks on mitmeid võimalusi. Selleks on kasutusel nii keemilised mitteviiruslikud vektorid kui ka füüsikalised meetodid. Mitteviiruslike meetodide tööpõhimõte on kerge, kuid nende rakendamine praktikas hõlmab endas mitmeid väljakutseid. Peale rakusüste ja -väliste membraanide läbimise, tekitab raskusi ka nende tootmine, formuleerimine ja hoiustamine. (Ramamoorth, Narvekar 2015).

Füüsikalised meetodid on kõige lihtsamateks geneetilise materjali rakku viimise viisiks. Nende puhul ei kasutata kandjaid, vaid neile on omane rakumembraani füüsiline kahjustamine, et võimaldada plasmiidsetel DNA molekulidel rakku siseneda. Järgnevalt on toodud peamised füüsikalised meetodid geeniteraapia teostamiseks.

Üks lihtsamaid viise geneetilise materjali huvipakkuvasse rakku viimiseks on neid mikronõelaga süstides. Selles protsessis läbistatakse rakumembraan nõela abil.

Võimalik on ka niinimetatud geenipüssi meetod, mis põhineb DNA-ga kaetud raske-metalliosakeste „tulistamisel“ huvipakkuva koe rakku. Seda meetodit arendatakse eelkõige munasarjavähi raviks.

Kolmas füüsikaline meetod on elektroporatsioon, mille käigus tekitatakse erinevatele rakumembraani pooltele elektrivälja abil erinev laeng, selle tõttu tekib rakumembraani poor, mille kaudu saab plasmiidne DNA molekul rakku siseneda.

Sonoporatsioon seisneb ultrahelilainete abil rakumembraani ajutiselt DNA-le läbitavaks muutmises.

Fotoporatsiooni käigus tekitatakse laserimpulsiga rakumembraani ajutised poorid, mille kaudu saab DNA rakku siseneda.

Veel on võimalik ka geneetiline materjal siduda magneetilise nanoosakesega ning selle magnetvälja tekitamise abil rakku transportimine.

Hüdroporatsiooni ehk hüdrodünaamilise geeniülekanne teostamiseks süstitakse suur hulk DNA lahust ülilühikese aja vältel huvipakkuvasse koesse. Vedeliku hulk avaldab rakumembraanidele rõhku ja tekitab neisse poorid, mille kaudu DNA rakku siseneb. Seda tehnikat

arendatakse peamiselt maksahaiguste ravis. (Ramamoorth, Narvekar 2015)

Maksarakkudesse on võimalik geneetilist materjali viia ka mehhaanilise massaaži käigus. Surve, mida massaažiga avaldatakse, tekitab mõneks minutiks mööduvaid membraanidefekte ning laseb koesse süstitud plasmiididel DNA-l maksarakkudesse siseneda. (Liu *et al.* 2004)

Keemilised kandjad liigitatakse anorgaanilisteks, lipiidi-, polümeeri- ja peptiidipõhisteks. Anorgaanilistest osakesed on üldiselt nanoosakesed, mida saab konstrueerida erineva suuruse, kuju ja poorsusega, et kaitsta sellele kinnitatud molekuli fagotsütoosi ja lagunemise eest. Anorgaanilistest osakestest on kõige uuritumad kaltsiumsulfaat, ränidioksiid, kuld, magneetilised ühendid, kvanttäpid, fullereenid ehk ainult süsiniku aatomitest koosnevad kera-, ellipsoidi- või torukujulised molekulid ning supramolekulaarkompleksid ehk omavahel mittekovalentsete sidemetega seotud molekulid (Cambridge Dictionary *s.v.* fullerene); (New World Encyclopedia *s.v.* Supramolecular chemistry).

Katioonsete lipiidide põhistel kandjatel on positiivselt laetud pearühm seondunud nukleiinhapetes negatiivselt laetud fosfaatrühmaga ehk on moodustunud lipopleks. Geneetilist materjali ümbritsevad positiivselt laetud lipiidid aitavad seda kaitsta rakusiseste ja -väliste nukleaaaside eest. Samuti omavad need vastastikmõju rakumembraanil asuvate negatiivselt laetud glükoproteiinide ja proteoglükaanidega. See võib hõlbustada nukleiinhapete sisenemist rakku. Lipiidide nanoemulsioon koosneb umbes 200 nm suurustest osakestest, mis on moodustunud õlist, veest ja pindaktiivsest ainest. Lipiidide emulsiooni eeliseks on selle suurem stabiilsus. Tahked lipiidid nanoosakesed on valmistatud lipiididest, mis on nii toa- kui ka kehatemperatuuril tahked. Nendel on nii katioonsete lipiidide kui ka lipiidse nanoemulsiooni eelised.

Peptiidipõhiste vektorite eelis teiste mitteviiruslike vektorite ees on kompaktsus, DNA tõhus kaitse ja sihtrakkude spetsiifilised retseptorid. Peptiidiligande kinnitatakse ka polüplekside ja lipoplekside külge, et muuta neid rakuspetsiifiliseks.

Katioonsed polümeerid moodustavad DNA-ga nanoosakesi polüplekse, mis on stabiilsemad kui lipopleksid. Polümeerid jaotatakse looduslikeks ja sünteetilisteks. Looduslikud polümeerid on valgud, peptiidid ja polüsahhariidid. Sünteetilistest polümeeridest on kasutusel polüetüleenimiin, dendrimeerid ja polüfosfoestrid. (Ramamoorth, Narvekar 2015)

1.1.3. Viirusvektorid geeniteraapias

Geeniteraapias viiakse kõige sagedamini geneetiline materjal rakkudesse viirusvektori abil, kuna neil on parem geenide kohaletoimetamise võime võrreldes mitteviiruslike vektoritega (Lundstrom 2023). Hetkel on ligikaudu 70% kliinilise uuringu faasis olevatest geeniteraapiatest viirusvektoripõhised (Wang, Pan *et al.* 2023). Viirusvektorid on viirused, milles enamik viiruse pärilikkusainet on asendatud terapeutilise geeniga ja selle ekspressiooni reguleerivate järjestustega, nagu promootor ja polüadenülatsoonisignaali (Bulcha *et al.* 2021). Viirusvektorid organismis ei paljune, sest neil puuduvad replikatsiooni jaoks vajalikud järjestused, ning seetõttu toodetakse viirusvektorid *in vitro* rakukultuuris. Kasutusel on retroviirusvektorid, adenoviirusvektorid, adenoassotsieeritud viirusvektorid (AAV), lentiviirusvektorid ja herpesviiruse vektorid (Wivel, Wilson 1998).

Viirusvektorite kasuks räägib veel ka see, et olenevalt vajadusest on nendega võimalik saavutada nii lühi- kui ka pikaajalist raviefekti. Näiteks vähiraviks on vaja lühiajalist kõrgetasemelist transgeeni ekspressiooni, samas kui krooniliste haiguste puhul on vaja pikaajalist, elukestvat transgeeni ekspressiooni. Viirusvektorite peamiseks puudusteks on aga nende kõrge immuunreaktsiooni esilekutsumise tõenäosus ning tsütotoksilisus (Ramamoorth, Narvekar 2015). Väljakutset pakub ka transgeeni ekspressiooni reguleerimine ja lõpetamine. Lisaks nõuab viirusvektorite tootmine kõrgemat bioohutuse taset võrreldes mitteviiruslike vektoritega, viiruse leviku ohu tõttu. (Lundstrom 2023)

1.1.4. Kasutusel olevad ravid

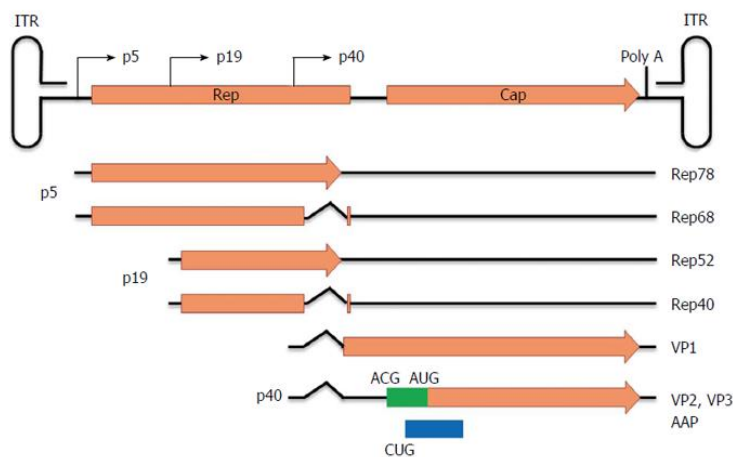
Euroopa Liidus on praeguseks müügiloo saanud üksteist raku- ja geeniteraapiat. Hetkel ravitakse Euroopa Liidus kombineeritud raku- ja geeniteraapiaga ehk *ex vivo* ehk kehavälise geeniteraapiaga B-rakulist ägedat lümfoidset leukeemiat (B-ALL), difuusset B-suurerakulist lümfoomi (DLBCL), primaarset mediastiinumi B-suurrakklümfoomi (PMBCL), hulgimüeloomi (MM), rasket kombineeritud immuunpuudulikkust (SCID), beeta-talasseemiat, tserebraalset adrenoleukodüstroofiat (CALD), metakromaatilist leukodüstroofiat (MLD) ning raskekujulisi silma sarvkesta kahjustusi nagu näiteks keemilisi põletusi. *In vivo* ehk kehasiseses geeniteraapiaga on võimalik ravida rasket kombineeritud immuunpuudulikkust (SCID), melanoomi metastaase, spinaalset lihastroofiat (SMA), pigmentooset retiniiti (RP) ja Leberi kaasasündinud amauroosi (LCA). (EuroGCT)

Praegu kasutusel olevate geeniteraapiate peamiseks probleemiks on nende kõrge hind, ühekordse ravi hind jääb sageli ühe kuni kahe miljoni euro vahele. Sellest hoolimata on ühekordse geeniteraapia kulu sageli väiksem kui elukestva ravi puhul kulutatav summa. Lisaks sellele on geeniteraapia sageli ainus viis patsiendile täisväärtusliku elu võimaldamiseks. Sellegi poolest jäävad mitmete geeniteraapiate hinnad Euroopa Liidu jaoks liiga kõrgeks ning see tõttu on Euroopas tekkinud Ameerika Ühendriikidega võrreldes mahajäämus nii geeniteraapia arendamisega kui ka patsientidele kättesaadavate ravide osas. (Nature 2023) Euroopa Liidu üheteistkümne müügiloa saanud raku- ja geeniteraapiaga võrreldes on Ameerika Ühendriikides heakskiidu saanud juba 35 geneetiliselt muundatud materjali rakku viimisel põhinevat ravi (Food and Drug Administration).

1.2. Adenoassotsieeritud viirus

1.2.1. Viiruse genoom

Adenoassotsieeritud viirused on üheaahelised DNA-viirused, mille genoom on ligikaudu 4700 aluspaari pikk (Pupo *et al.* 2022). AAV genoom võib olla kas pluss- või miinusahelaline, kusjuures mõlemad DNA variante pakitakse kapsiididesse sama efektiivsusega. (Gonçalves 2005) DNA on plussahelaline, kui ta on mRNA-ga samapidine, DNA on miinusahelaline, kui ta on vajaliku mRNA-ga komplementaarne. (Oxford Refrence)



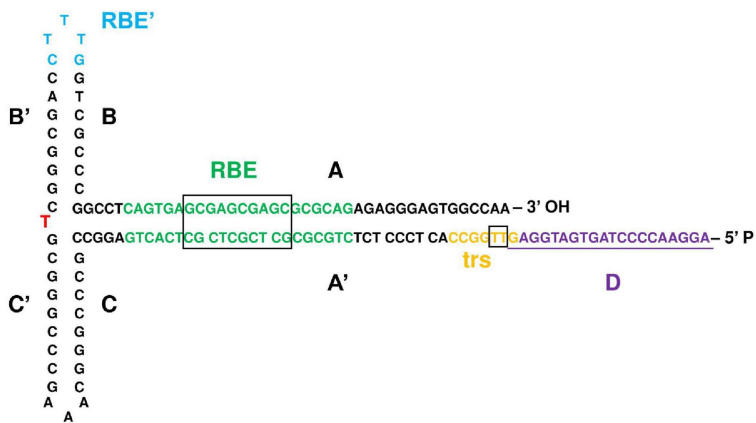
Joonis 1. AAV genoomi skeem

Allikas: Chen 2015

Viiruse genoom koosneb kolmest avatud lugemisraamist, mis kodeerivad kaheksat kolmelt promootorilt ekspresseeritud valku (Joonis 1). Rep lugemisraam kodeerib nelja valku:

Rep78 ja Rep68, mille valmistamiseks vajaliku mRNA süntees on alguse saanud p5 promootorilt, ning Rep52 ja Rep40, mille mRNA süntees on alguse saanud p19 promootorilt. Rep78 ja Rep68 on saadud samast pre-mRNA-st nii, et Rep68 jaoks on pre-mRNA splaissitud ja Rep78 jaoks tervikuks jäetud. Sama kehtib ka Rep52 ja Rep40 puhul. Kahel suuremal replikatsioonivalgul (Rep78 ja Rep68) esineb kohaspetsiifilise üheaahelalise endonukleaasi, DNA helikaasi ja ATPaasi aktiivsus, mis on vajalik AAV DNA replikatsiooniks. Kaks väiksemat Rep-valku (Rep52 ja Rep40), mis on vajalikud AAV DNA pakkimiseks kapsiididesse, sisaldavad ainult ka suuremates valkudes esinevat helikaasi domeeni. (Samulski, Muzyczka 2014)

Cap lugemisraam kodeerib nelja valku VP1, VP2, VP3 ja AAP. Kõikide nende valkude tootmiseks vajaliku ühise pre-mRNA tootmine on alguse saanud p40 promootorilt. Ühisest pre-mRNA-st on erinevaid valke kodeerivad mRNAd saadud pre-mRNA alternatiivse splaissimise teel. Nii moodustunud VP1, VP2 ja VP3 ühine osa on vajalik viiruse ikosaedrilise kapsiidi moodustamiseks. Ainult VP1-s sisaldub oluline ensüüm fosfolipaas A2 ning VP1 ja VP2 ühisosas sisalduvad tuumalokatsiooniks vajalikud järjestused. AAP hõlbustab peamise kapsiidivalgu VP3 rakutuumas sisenemist ning soodustab kapsiidi kokkupanemist ja valmimist, kuid küpses kapsiidis AAP-d ei esine. (*ibid.*); (Wörner *et al.* 2021)



Joonis 2. AAV otsmine pöördkordusjärjestus

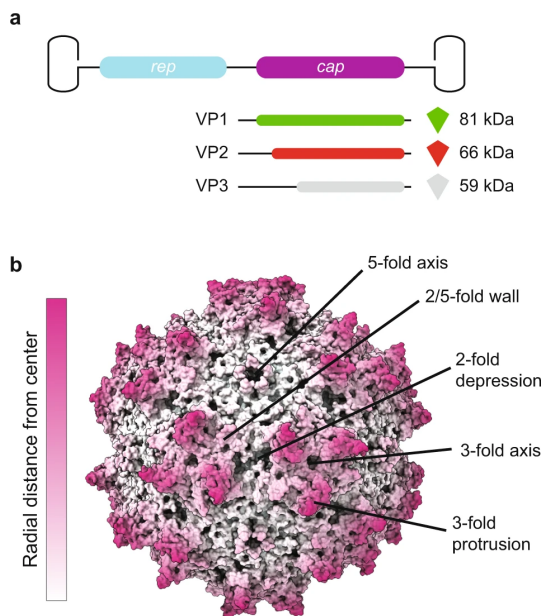
Allikas: Shitik *et al.* 2023

AAV genoomi otstes asuvad 145 nukleotiidi pikkused otsmised pöördkordusjärjestused ehk ITR-id (Joonis 2). ITR-idest algab AAV DNA replikatsioon, samuti on neil ka esmane DNA pakkesignaali funktsioon. Lisaks on ITR-id vajalikud AAV pärilikkusaine integreerumiseks peremeesraku genoomi (Shitik *et al.* 2023). ITR-id on ka ainsad rekombinantsete AAV

vektorite tootmiseks vajalikud *cis*-toimelised järjestused ehk valke mitte kodeerivad DNA järjestused, mis on siiski olulised lähedal asuvate geenide transkriptsiooni reguleerimiseks. Kuigi AAV ITR-id võimendavad Rep-valgu juuresolekul transkriptsiooni, on Rep-valgu puudumisel minimaalne geeniekspressiooni reguleeriv roll. Seega peavad AAV vektorisse sisestatud transgeenid olema konstrueeritud sobiva geeniekspressiooni võimendavate transkriptsioonifaktorite, seostumissaitide, promootori, polü(A) ja splaissimissignaalidega, et tagada õige geeniekspressioon. (Samulski, Muzyczka 2014)

1.2.2. Viiruse kapsiid

Adenoassptsieeritud viirusel on väike, kõigest 25 nm diaameetriga ikosaeedriline kapsiid (Joonis 3), mis koosneb 60 molekulist. (*ibid.*). Võrdluseks võib öelda, et tavaliselt on viiruste läbimõõduks ~ 100 nm. Ikosaeedriline kapsiidil on 20 kolmnurkset külge, AAV puhul koosneb iga kolmnurk kolmest alaosast. (Louten 2016) Selline kapsiidiehitus muudab viirusosakese väga stabiilseks: see suudab taluda nii lühiajalist kuumust, happelist keskkonda kui ka kokkupuudet proteaasidega. Ikosaeedriline AAV-osakese viiekiirelise sümmeetriatelje tipus on $8,5 \text{ \AA}$ läbimõõduga poor, mis arvatakse olevat viiruse DNA sisenemise kohaks. (Samulski, Muzyczka 2014)



Joonis 3. AAV kapsiidi ehitus

Allikas: Wörner *et al.* 2021

Viiruse kapsiid koosneb kolmest erinevast viirusvalgust (VP), mis erinevad vaid oma N-otsade poolest. Kapsiid koosneb viirusvalkudest VP1, VP2 ja VP3 hinnanguliselt

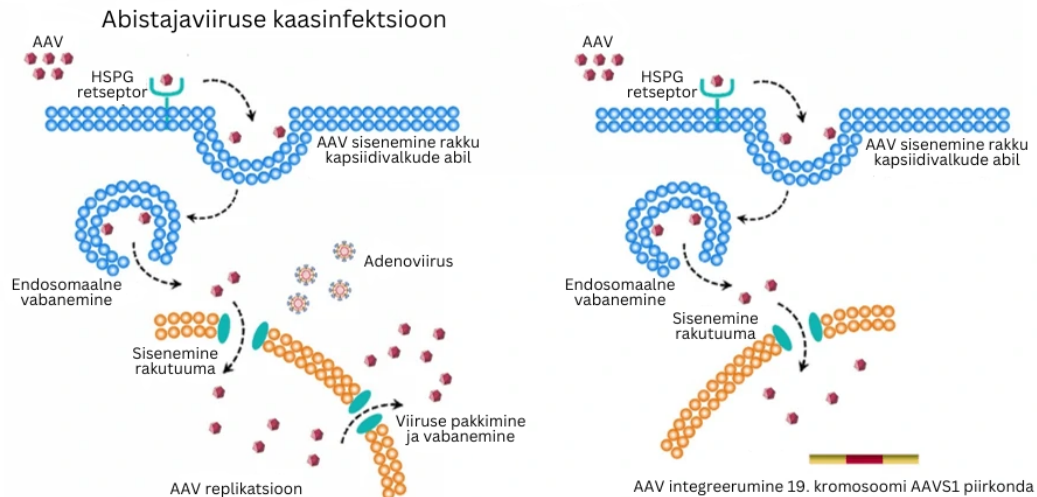
proportsioonis 1:1:10. Kapsiidi moodustamiseks ei ole ilmtingimata VP1 ja VP2 vaja, vaid terapeutilise geeni kohaleviimiseks vajaliku vektori moodustamiseks piisab ka ainuüksi VP3. Siiski tõstab VP1 ja VP2 olemasolu kapsiidi koostises toodetud viirusvektorite hulka ja nende transduktsiooni efektiivsust. Seda seetõttu, et VP1-l ja VP2-l on märgatav roll viiruse endotsütoosi teel rakku sisenemisel, viriooni endosomaalsel vabanemisel vesiikulist, viirusosakese rakutuuma sisenemisel ja viiruse genoomi vabanemisel kapsiidist. (Wörner *et al.* 2021)

1.2.3. Adenoassotsieeritud viiruse paljunemine

AAV rakku sisenemiseks seondub ta esmalt raku pinnal primaarse retseptoriga, milleks on proteoglükaanides leiduvad suhkrud, nagu siaalhape, galaktoos või heparaansulfaat (Samulski, Muzyczka 2014). Viiruse laia tropismi ehk võimet nakatada paljude eri kudede rakke selgitabki seondumine peaaegu kõikides rakudes toodetavate proteoglükaanidega (Variki *et al.* 1999). Rakku sisenemiseks peab viirus seostuma sekundaarse retseptoriga. Üheks tähtsaimaks selliseks retseptoriks on AAVR, mida on varasemalt tuntud ka KIAA0319L nime all ning mis on enamuse AAV serotüüpide rakku sisenemiseks hädavajalik. Täpsed sekundaarsed retseptorid, mida viirus rakku sisenemiseks kasutab erinevad serotüübiti, kuid mõned levinumad on FGFR1, CD9, $\alpha V\beta 5$ integriin, $\alpha 5\beta 1$ integriin, HGFR, PDGFR, EGFR ja LamR. (Pupo *et al.* 2022) Ühinenud rakupinnal olevate retseptoritega, siseneb viirus endotsütoosi teel klatriiniga kaetud vesiikulis rakku (Samulski, Muzyczka 2014). Klatriin on kuuest polüpeptiidahelast koosnev valk, mis hõlbustab vesiikuli eraldumist rakumembraanist (Royle 2006).

Peale rakku sisenemist võib viirusosakesi leida peaaegu kõigist tsütoplasmat sisaldavatest raku osadest. Esimese 2 tunni jooksul pärast nakatumist koguneb suurem osa viirusest tuumalähedasse tsütoplasmasse ja teeb sealses happelise pH-ga piirkonnas, mis on AAV infektsiooniks hädavajalik, läbi struktuurimuutuse. Seejärel siseneb AAV peremeesraku tuuma ning vabastab oma DNA seda kaitsnud kapsiidist. Kapsiidist vabanenud üheaheelalise DNA põhjal sünteesitakse sellele komplementaarne DNA ahel. Nii moodustub kaheaheelaline DNA genoom, mis on võimeline transkriptsiooniks. (Samulski, Muzyczka 2014)

Jõudnud peremeesraku tuuma võib AAV elutsükkel jätkuda, kas lüütiliselt või lüsogeenselt



Joonis 4. AAV lüütiline ja lüsogeene tsükkel

Allikas: Genemedi

(Joonis 4). Elutsükkel jätkub lüütiliselt, kui rakus esineb kaasinfektsioon abistajaviirusega, milleks on kas adenoviirus või herpesviirus. Viirus lülitub lüsogeensesse tsükklisse abistajaviiruse puudumisel, sel juhul represseeritakse viiruse geeniekspressioon. Peiteajal integreerub viiruse genoom eelistatult inimese 19. kromosoomi pikema öla ligikaudu 4 kb pikkusesse piirkonda AAVS1 (Adeno-associated virus integration site 1) ning kandub nii rakujagunemisel tütarrakkudesse edasi. AAVS1 asub geeni MBS85 5' otsapoolses osas ning see paikneb lihasspetsiifiliste geenide TNNT1 ja TNNT3 lähedal. MBS85 on tuntud ka kui PPP1R12C ning see geen kodeerib müosiinfosfataasi alaühikut, mis reguleerib valgu fosfataas 1 delta katalüütilist aktiivsust ja aktiini tsütoskeleti kokkupanekut (National Institutes of Health). Kohaspetsiifilises integratsioonis mängivad olulist rolli AAV otsmine pöördkordusjärjestus (ITR), replikatsioonivalgud Rep78 ja Rep68 ning 138 aluspaari pikkune järjestus, mida nimetatakse integratsiooni efektiivsuse elemendiks (IEE). (Daya, Berns 2008)

Inaktiivses olekus AAV-d sisaldava raku nakatumisel abistajaviirusega lülitub viirus lüütilisse tsükklisse, mille käigus pääseb AAV proviiruse DNA peremeesraku kromosoomist ning aktiveeritakse AAV geeniekspressioon. Seejärel viiruse genoom replitseerub, toodetakse kapsiidivalke ning seejärel pakitakse need terviklikuks viriooniks. Rakust väljumiseks lüüsib abistajaviirus rakud, mille tulemusel vabanevad ka valminud AAV virioonid. Adenoviiruse geenide hulka, mis on abiks AAV geeniekspressioonil, kuuluvad E1a, E1b, E2a, E4 ja

VA RNA. Herpesviirus aitab AAV geeni ekspressioonile kaasa, tuues rakku viiruse DNA polümeraasi ja helikaasi. AAV võib ka ilma abistajaviirusega oma elutsükli lüütilisse faasi siseneda, kuigi sel juhul on efektiivsus madalam. Abistajaviirusega pääseb AAV proviiruse DNA peremeesraku kromosoomist, kui peremeesraku mõjutavad ainevahetuse inhibiitorid ehk raku ainevahetust aeglustavad ained või genotoksilised ühendid. (Daya, Berns 2008)

1.2.4. Viiruse serotüübid

Viiruse serotüübid erinevad teineteisest ainult kapsiidi valgulise ehituse poolest, genoom, välja arvatud kapsiidi määrav DNA järjestus, on neil kõigil sama. Loodusest leitud AAV serotüüpidest on enim uuritud serotüüpe AAV1-AAV13. Seetõttu öeldakse, et AAV-l on 13 looduslikku serotüüpi. Tegelikult leidub aga looduses sadu erinevaid AAV kapsiidi variante. Sõltuvalt kapsiidivalkudest omavad AAV serotüübid erinevate kudede osas erinevat tropismi ehk võimet nakatada eelistatult teatud koe rakke. (Pupo *et al.* 2022) Järgnevalt kirjeldatud AAV-de kapsiidivalkude aminohappelised järjestused ning nende erinevused on toodud lisas 1.

AAV1 serotüübi täpset päritolu pole teada, aga ilmselt pärineb see primaatidelt. Tema peamiseks retseptoriks on N-atsetüülitud siaalhape ning koretseptoriteks AAVR, GPR108, TM9SF2. Need retseptorid tekitavad AAV1 koespetsiifilist tropismi vööt-, sile- ja südame-lihaskoe, kesknärvisüsteemi, kopsu, silma võrkkesta, kõhunäärme ja maksa rakkude suhtes. AAV1 on võrreldes teiste AAV looduslike serotüüpidega kõige efektiivsem vöötlihaskoe transdutseerimiseks. (*ibid.*); (Issa *et al.* 2023)

AAV2 pärineb inimpopulatsioonist ning seda peetakse kõige põhjalikumalt uuritud AAV serotüübiks. Sõltuvalt vanusest ja päritolust on hinnanguliselt 50%-96% meist AAV2 suhtes seroposiitvused. Tema peamiseks retseptoriks on heparaansulfaadi proteoglykaan. Sekundaarseteks retseptoriteks on AAVR, GPR108, TM9SF2, LamR, $\alpha V\beta 5$ integriin, $\alpha 5\beta 1$ integriin, FGFR1, CD9 ja HGFR. AAV2 omab tugevamat tropismi vöötlihaskoe, kesknärvisüsteemi, maksa, neeru, võrkkesta, kopsu ja liigese rakkude suhtes. (Pupo *et al.* 2022); (Issa *et al.* 2023)

AAV3 pärineb samuti inimpopulatsioonist. Sarnaselt AAV2-le on tema peamiseks retseptoriks HSPG. Teisesteks retseptoriteks on AAV3 puhul AAVR, GPR108, LamR, FGFR1 c-MET ja HGFR. Kuna esialgsetes uuringutes oli AAV3 transduktsiooni efektiivsus madal,

jäeti see algselt geeniteraapiaks sobilike viirusvektorite kandidaatide hulgast välja. Hiljem avastati aga, et AAV3 omab tugevat tropismi inimese maksa kasvaja rakkude suhtes. Lisaks nakatab AAV3 ka eelkõige vöotlihaskoe, kesknärvisüsteemi ja sisekõrvas paiknevaid kuulmerakke. (Pupo *et al.* 2022); (Issa *et al.* 2023)

AAV4 kapsiidivalkude järjestused erinevad keskmiselt suuremal määral teiste AAV-de kapsiidivalkude järjestustest, sarnanedes AAV2-le kõigest 58% ulatuses. AAV4 pärineb primaatidelt, arvatavasti Aafrika roheahvidelt. AAV4 kapsiidi pinna struktuur sarnaneb üllataval kombel naaritsate aleuudi haiguse viiruse (ADV) ja inimese parvoviiruse B19-ga, mis kuuluvad AAV-ga samasse perekonda. AAV 4 peamiseks retseptoriks on O-atsetüülitud siaalhappe ning teiseseks retseptoriks GPR108. AAV4 omab tugevamat tropismi kesknärvisüsteemi, silma võrkesta, kopsu, neeru ja südamelihaskoe rakkude suhtes. (Padron *et al.* 2005); (Pupo *et al.* 2022); (Issa *et al.* 2023)

AAV5 on teistest looduslikest AAV kapsiidivariantidest kõige erinevam. Võrreldes AAV2 ja AAV8-ga on tema kapsiid ainult 57% ulatuses homoloogiline ning AAV10-ga on kapsiidihomoloogia samuti vaid 58%. Võrdluseks on teistel AAV serotüüpidel omavaheline homoloogia märksa suurem, ligikaudu 80%. AAV5 pärineb inimestelt ning see on ühtlasi ka ainus AAV serotüüp, mis on otse inimese kudetest eraldatud. Selle peamiseks retseptoriks on N-atsetüülitud siaalhappe ning koretseptoriteks AAVR, PDGFR ja TM9SF2. AAV5 nakatab eelkõige vöotlihaskude, kesknärvisüsteemi, kopse, silma võrkesta ja maksa. (Pupo *et al.* 2022); (Issa *et al.* 2023)

AAV6 on homoloogiliselt väga sarnane AAV serotüüpidega 1 ja 2, olles eri piirkondades, kas AAV1 või AAV2-ga peaaegu identne. Seetõttu arvatakse, et AAV6 on tekkinud nende kahe homoloogilise rekombinatsiooni käigus (Xiao *et al.* 1999). See AAV serotüüp on pärit inimeselt ning selle peamiseks retseptoriteks on HSPG ja N-atsetüülitud siaalhappe. Teisesteks retseptoriteks on AAV6-l AAVR, GPR108, TM9SF2 ja EGFR. AAV6 omab kõrgemat tropismi vöotlihaskoe, südamelihaskoe, maksa, kesknärvisüsteemi, silma võrkesta, kopsu ja teiste hingamiseldukonna rakkude suhtes. (Pupo *et al.* 2022); (Issa *et al.* 2023)

AAV7 avastati reesusmakaakidelt. Selle serotüübi rakule kinnitumise ja rakku sisenemise meetoodika pole täpselt teada, küll aga teatakse, et AAV7 ei kasuta rakule kinnitumiseks HSPG-d (Mietzsch *et al.* 2014). Teisesteks retseptoriteks on AAV7-l GPR108 ja TM9SF2.

AAV7 nakatab eeskätt vöotlihaskoe, kesknärvisüsteemi, silma võrkkesta ja maksa rakke. (Pupo *et al.* 2022); (Issa *et al.* 2023)

AAV8 leiti samuti reesusmakaakidelt ning nagu AAV7-l ei ole teada selle primaarset retseptorit. AAV8 sekundaarseteks retseptoriteks on AAVR, GPR108, TM9SF2 ja LamR. AAV8 nakatab maksa, vöotlihaskoe, kesknärvisüsteemi, võrkkesta, kõhunäärme, südamehaskoe, neerude ja rasvkoe rakke. AAV8 91% ulatuses sarnanev AAVrh.8 suudab erinevalt teistest eelpool mainitud AAV serotüüpidest ületada vere-aju barjääri (Halder *et al.* 2015). AAVrh.8 leitud sekundaarseks retseptoriks on GPR108 ning see omab kõrgemat tropismi vöotlihaskoe, maksa ja kesknärvisüsteemi rakkude suhtes. (Pupo *et al.* 2022); (Issa *et al.* 2023)

AAV9 leiti inimeselt ning suudab samuti ületada vere-aju barjääri. Lisaks neuronite suudab AAV9 ajus nakatada ka neuronite tööks hädavajalikke astrotsüüte (Song *et al.* 2022). AAV9 primaarseks retseptoriks on N-atsetüülgaloktosamiin. Sekundaarseteks retseptoriteks on AAV9 puhul AAVR, GPR108, TM9SF2 ja LamR. Antud serotüüp nakatab eelistatult maksa, kopsu, kõhunäärme, kesknärvisüsteemi, võrkkesta, neerude, munandite, südame- ja vöotlihaskoe rakke. (Pupo *et al.* 2022); (Issa *et al.* 2023)

AAV10 avastati jaava makaakidelt ning selle rakule kinnitumiseks ja sellesse sisenemiseks vajalikke retseptorid on teadmata. AAV10 on leitud kõrgem tropism südamehaskoe, kopsu, maksa, neeru ja emaka rakkude suhtes. AAVrh.10 pärineb reesusmakaakidelt ning suudab sarnaselt AAV9-le ületada vere-aju barjääri ja nakatada astrotsüüte (Song *et al.* 2022). Selle serotüübi teisesteks retseptoriteks on GPR108 ja LamR. AAVrh.10 nakatab eeskätt maksa, neeru, kopsu, kõhunäärme, kesknärvisüsteemi, võrkkesta, vööt- ja südamehaskoe rakke. (Pupo *et al.* 2022); (Issa *et al.* 2023)

AAV11 pärineb jaava makaakidelt ning selle retseptorid pole teada. AAV11 nakatab eelistatult neeru, põrna, kopsu, mao, vööt- ja südamehaskoe rakke. AAV12 ja AAV13 pärinevad mõlemad primaatidelt ning nende rakku sisenemise mehhanismid on teadmata. AAV12 omab kõrgemat tropismi vöotlihaskoe ja süljenäärmete suhtes. AAV13 on hetkel veel vähe uuritud, kuid on teada, et see sarnaneb enim AAV2 ja AAV3-ga. (Pupo *et al.* 2022); (Issa *et al.* 2023)

1.2.5. AAV kasutamine geeniteraapias

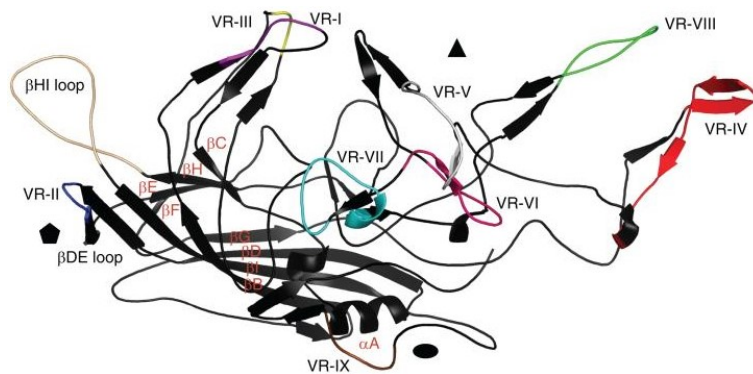
Adenoassotsieeritud viirused avastati saasteainena 1965. aastal ahvi adenoviiruse preparaadist (Bower *et al.* 2021). Mõni aasta hiljem eraldati seda juba inimkudedest (Wang, Tai *et al.* 2019). Nüüdseks on rekombinantse AAV kaasutamine saanud üheks perspektiivikaimaks geeniteraapia rakendamise viisiks ning see on kõige laialdasemalt kasutatav viirusvektor (Zhao *et al.* 2021). Esimene AAV-l põhinev ravi Glybera, mis ravib lipoproteiini lipaasi vaegust, sai Euroopas heakskiidu 2012. aastal. Hetkel on kliinilise uuringu faasis üle saja AAV-l põhineva geeniteraapia protokoli (World Health Organisation). 2023. aasta seisuga on Euroopa Liidus lisaks Glyberale müügiloa saanud viis AAV põhist geeni-ravi: Luxturna, Zolgensma, Upstaza, Roctavian ning Hemgenix. Need ravivad vastavalt RPE65 puudulikkusest põhjustatud retinaalset düstroofiat ja spinaalset lihasatroofiat, aromaatses L-aminohappe dekarboksülaasi (AADC) puudulikkust ning A- ja B-hemofiiliat (Ravimiamet).

Geeniteraapia valdkonnas AAV uurimiseks ning käsitlemiseks kui perspektiivika viirusvektori on mitmeid põhjuseid. Üks põhjustest on AAV võrdlemisi madal immunogeensus ehk immuunvastuse esilekutsumise tõenäosus (Pupo *et al.* 2022). Samuti ei põhjusta AAV inimestes teadaolevalt mitteühtegi haigust, mis muudab nendega töötamise tunduvalt ohutumaks. Bioohutust tõstab veelgi viiruse enda geneetilise materjali eemaldamine viirusvektorst. (Wang, Tai *et al.* 2019) AAV laia kasutamise põhjuseks on ka viiruse lai tropism, mis võimaldab AAV vektoritega transdutseerida peaaegu, et kõiki kudesid (Castle *et al.* 2016).

Kuna paljudel inimestel esineb juba AAV looduslike serotüüpide vastane immuunsus, tuleb AAV efektiivseks kasutamiseks leida viis sellest mööda pääsemiseks. Samuti peab vältima uute humoraalsete ja rakuliste immuunvastuste tekkimist (Pupo *et al.* 2022). Piiranguid AAV laialdasele kasutamisele seab ka selle genoomi väike suurus, mis takistab suurte transgeenide pakkimist. Selle probleemi ületamiseks on proovitud sisestatav transgeen mitme AAV vahel ära jaotada. Sellisel meetodil pakitud transgeeni ekspressioon pole aga osutunud nii tõhusaks kui ühtsena pakitud transgeeni oma. (Hirsch *et al.* 2016)

1.2.6. AAV kapsiidide modifitseerimine peptiididega

Kuigi geeniteraapia katsed nii-öelda metsiktüüpi AAV-dega ehk looduslike AAV serotüüpidega on andnud edukaid tulemusi, on kliinilistes katsetes selgunud, et metsiktüüpi AAV serotüübid geeniteraapia ravimites ei ole tihti efektiivsed, sest sageli on täiskasvanud patsientidel nende vastu juba väljakujunenud immuunsus. Näiteks hiljuti heakskiidetud geeniteraapia ravim Elevidys Duchenne'i lihasdüstroofia ravimiseks põhineb reesusmakaagi AAV serotüübil rh74, kuid isegi selle haruldase serotüübi puhul peetakse vajalikuks teha suunatud mutatsioone. (Shoti *et al.* 2023) Seetõttu pööratakse viimasel ajal rohkem tähelepanu rekombinantsete AAV viirusvektorite arendamisele. Looduslikult AAV serotüübile vastava tropismi muutmiseks või selle võimendamiseks saab luua kimaarseid AAV-sid, mille kapsiid koosneb mitme erineva serotüübi järjestusest. Neid on võimalik luua sisestades peptiide või isegi terveid valke kodeerivaid DNA-järjestusi kindlatesse viiruse kapsiidigeeni piirkondadesse (Pupo *et al.* 2022).



Joonis 5. VP3 monomeer üheksa VR-iga

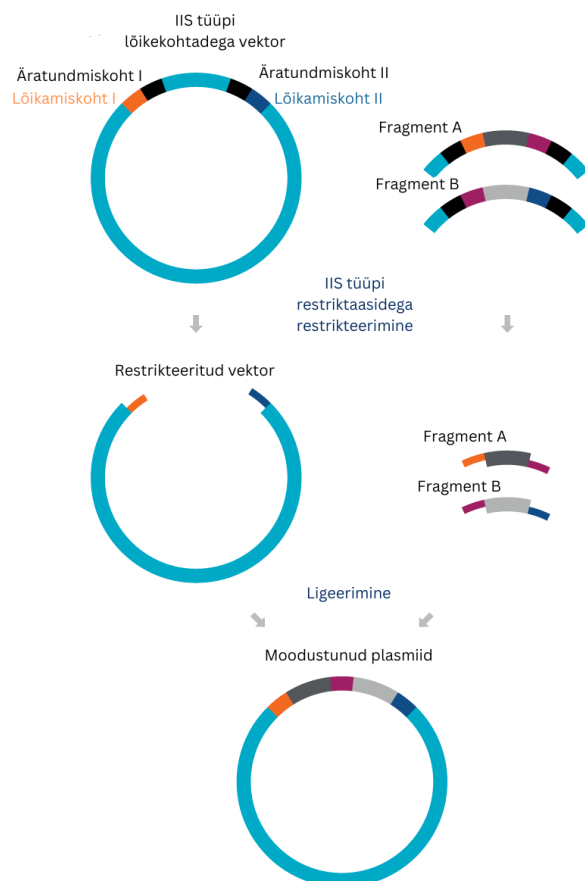
Allikas: Drouin, Agbandje-McKenna 2013

AAV kapsiidi pinnal VP3-s leiduvates β -ahelate ühenduskohtades ehk pinnasilmustes esinevad struktuuriliselt varieeruvad piirkonnad (VR-id) (Joonis 5). Need pinnasilmused kleepuvad kokku, tekitades kapsiidi pinnal variatsioone. Eeldatakse, et erinevustest VR-ide kokkuhaakumises, sõltub rakuline tropism ja koetransduktsiooni efektiivsus. (DiMattia *et al.* 2012) AAV kapsiidi pinnal saab eristada üheksat muutuvat piirkonda (Drouin, Agbandje-McKenna 2013). VR-IV, VR-V ja VR-VIII moodustavad eendite ülaosas silmuseid, samas kui VR-VI ja VR-VII asuvad eendite alaosas. Nende VR-ide avatud, mitte kapsiidi struktuuri moodustamiseks asendi, ja retseptoriga seondumise funktsiooni tõttu, on VR-id

ideaalsed kapsiidi modifitseerimiseks ja neisse peptiidide sisestamiseks. (Büning, Srivastava 2019)

1.3. Golden Gate kloneerimine

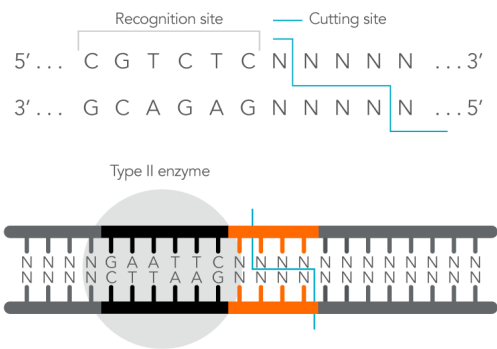
Molekulaarne kloneerimine on protsess, mille käigus kombineeritakse kokku mitu DNA fragmenti üheks plasmiidiks, mida saab seejärel paljundada bakterites (tavaliselt *Escherichia coli*'s). Kõige tavalisem praktika selle protsessi läbiviimiseks on esmalt olemasolevaid DNA-sid restrikteerida ehk lõigata neist välja vajaminevad DNA-fragmendid. Seejärel eraldatakse saadud DNA-fragmendid üksteisest geelelektroforeesi teel, millele järgneb nende väljapuhastamine geelist. Viimaseks etapiks on selle protsessi puhul saadud fragmentide kokku ligeerimine. Selline viis rekombinantse DNA saamiseks on aga töö- ja ajamahukas protsess, mis hõlmab enda mitmeid etappe, mis võivad ebaõnnestuda. (Sorida, Bonasio 2023)



Joonis 6. Golden Gate kloneerimine

Allikas: Bode 2023

Mõnevõrra lihtsam molekulaarse kloneerimise meetod on Golden Gate kloneerimine. Golden Gate kloneerimise meetod erineb tavapärasest DNA rekombineerimisest selle poolest, et see võimaldab korraga ühes reaktsioonisegus teostada nii restrikteerimist kui ka ligeerimist, kusjuures fragmente pole vaja geelist puhastada (Joonis 6). (Sorida, Bonasio 2023) Sellise kloneerimisviisiga on korraga ühte plasmidi viidud kuni 52 DNA-fragmenti (Sikkema *et al.* 2023). Golden Gate meetodika eeldab aktseptorvektori ja doonorvektorite eelnevat konstrueerimist, millesse on sisse disainitud üks või mitu sobivate restriктаaside äratundmiskohta. Golden Gate kloneerimisel kasutatakse ainult teatud tüüpi IIS restriктаase, mis tekitavad 4 nukleotiidi suurusi 5' üleulatuvaid otsi (BbsI, BsaI, Esp3I ja SapI), mis võivad olla ükskõik, millise järjestusega. See võimaldabki Golden Gate meetodikat rakendada paljude insertide sisestamiseks ühte vektorisse kindlas järjekorras, kuna teoreetiliselt on võimalik disainida 256 erinevat üleulatuvat järjestust. (Weber *et al.* 2011)



Joonis 7. Restrikteerimine IIS tüüpi restriктаasiga

Allikas: Bode 2023

Täpsemalt töötab Golden Gate kloneerimine nii, et IIS tüüpi restriктаas lõikab DNA fragmente oma äratundmiskohast veidi eemal ning tekitab kas 3' või 5' üleulatuvaid otsi (Joonis 7) (Pingoud, Jeltsch 2001). Kuna restriктаasi äratundmis- ja lõikamiskoht ei ühti, siis võib üleulatava otsa nukleotiidijärjestus olla ükskõik milline, seega, vastavalt vajadusele luuakse kindlate järjestustega fragmentide otsad (Bode 2023). Seejärel ligeeritakse erinevate DNA fragmentide üleulatuvad otsad omavahel T4 DNA ligaasi abil kokku. Seda võimaldavad sama restriктаasi kasutamisel tekkinud ühepikkused üleulatuvad otsad ning plasmiidide konstrueerimine selliselt, et vajaminevad DNA fragmendid ei sisaldaks ühtegi IIS restriктаasi äratundmiskohta. Lõpptulemusena moodustub ainult korrektne DNA plasmiid, nii-öelda üle jäänud DNA lõigud kogunevad puhverlahusesse. (Sorida, Bonasio 2023);

(Bird *et al.* 2022)

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärkideks on:

- 1) Golden Gate kloneerimiseks sobiliku platvormi loomine AAV kapsiidide modifitseerimiseks;
- 2) eeldatavalt kopsukoe ja vähkkasvaja spetsiifiliste peptiidide sisestamine AAV2 ja AAV8 kapsiididesse;
- 3) uute kapsiidivariantidega viiruste tootmine ja testimine.

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Töös kasutatud plasmiidid

Töös on kasutatud olemasolevaid AAV vektorite plasmide: pHelper, pRC2 (Takara Bio), pAAV2/8 (Addgene, plasmid nr 112864), lühendatud AAVcap2 ja lühendatud AAVcap8 ning AAV8 VR-IV ja VR-VIII vasakuid ja paremaid õlgu kodeerivad plasmiidid (IVEX Lab, Liisa Pata). Lisaks kasutati IVEX Lab OÜ-s disainitud ja ettevõttest Twist Biosciences tellitud sünteetilisi DNA plasmide (Q1-Q8). Plasmiidid transformeeriti kompetentsetesse bakterirakkudesse (*Escherichia coli* tüvi DH5 α) ning kasvanud kolooniatest eraldati aluselise lüüsi meetodil FavorGen FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kiti ja tootja protokollil abil plasmiidse DNA minipreparatsioonid. Eraldatud DNA-st restrikteeriti 1-2 μ g restriктаasidega EcoRI ja HindIII ning tekkinud fragmendid lahutati üksteisest elektroforeesiga 1,5% TAE-agarosgeelil. Õiged fragmendid lõigati geelist välja ning neist puhastati DNA kolonnidega FavorGen FavorPrep GEL/PCR Purification Kitiga vastavalt tootja protokollile. Plasmiidist Q1 eraldati peptiidi uCendR ning AAV2 kapsiidi VR-VIII paremat ja vasakut õlga kodeerivad DNA järjestused. Plasmiididest Q2 ja Q3 vastavalt peptiide LuS7A ja uEdbTnc kodeerivad DNA järjestused. Plasmiidist Q4 peptiidi abIntNRP ja AAV5 kapsiidi VR-IV parema ja vasaku õla kodeerivad DNA järjestused. Plasmiididest Q5-Q7 eraldati vastavalt peptiide LuVG, IVEX1 ja LinTT1 ning plasmiidist Q8 peptiidi

XBB1.5 ja AAV2 kapsiidi VR-IV paremat ja vasakut õlga kodeerivad DNA järjestused.

2.2.2. Töös kasutatud peptiidide ja oligonukleotiidpraimerite järjestused

Töös kasutatud peptiidide aminohappelised- ja oligonukleotiidpraimerite nukleotiidjärjestused on toodud järgnevalt.

Peptiidi IVEX1, mis on disainitud IVEX Lab OÜ-s, järjestus on HSRGDPRRSVST. SARS-CoV-2 tüve Omikron XBB1.5 ogavalgu RBD domeeni osa on töös valitud GVAGPANTSPLAYGFRP, mis põhineb NCBI valguandmebaasis avaldatud järjestusel (Schwem *et al.*). Peptiidi uCendR järjestus on RPARSGRSAGGSVA (Braun *et al.* 2016). LinTT1 järjestus on AKR-GARSTA (Simón-Gracia *et al.* 2018). LuS7A järjestus on APWHLSAQYSRT (McCandless *et al.* 2021). LuVG järjestus on KDNTTPGR (Goertsen *et al.* 2022). Peptiidide uEdbTnC ja $\alpha\beta$ 3-Int-NRP1 järjestused on vastavalt PPRRGLIALKTSSAGGSVA ja RGDSGSGA-TWLPPR, mis pärinevad Tambet Teesalu patendist EP3921329A1.

Golden Gate aktseptorplasmiidide konstrueerimiseks vajalikud praimerid:

GGA.Cap2-5 5'-TTG AAG CTT GAA GAC TGC TAG CTT CAT CAC ACA GTA CT-3';

GGA.Cap5-5 5'-TTG AAG CTT GAA GAC TCT CGA GGG CAA CAT GCT CA-3';

GGA.Cap5-3 5'-ATG AAG CTT GAA GAC GGG ATC CGC TGG GTC CA-3';

GGA.Cap8-3 5'-ATG AAG CTT GAA GAC ACG TAC GGC AGC TGG TAC TCC-3';

GGA.Cap8-5 5'-TTC AAG CTT GAA GAC AAC CGG TTG ATT CGT TTC AGT T-3';

GGA.Cap9-3 5'-ATG AAG CTT GAA GAC ACG TAC GGG AGC TGA TAG TC-3';

GGA.Cap9-5 5'-TTC AAG CTT GAA GAC CGG ATC CTC CAA CGG CCT-3'.

Valmis kapsiidi kodeerivate plasmiidide sekveneerimiseks vajalikud praimerid:

Cap5_seqF1 5'-CCC TTC CAC TCC AGC TTC-3';

Cap2_seqF1 5'-TCC TTT CCA CAG CAG CTA C-3';

Cap8_seqF1 5'-TAC TTA CAC CTT CGA GGA CG-3';

Cap8_seqF2 5'-CGA TGT CAT GCT CAC CAG-3';

Cap9_seqF1 5'-CTA CGC TCA CAG CCA AAG-3'.

Sinivalget selektsiooni võimaldava kanamütsiini resistentse plasmidi konstrueerimiseks vajalikud praimerid:

LacZ α -3Ade 5'-GTG TCA CGT AGT GTC GGG GCT GGC TTA ACT A-3';
pBR322oriF 5'-GGG AAA CGC CTG GTA TCT TT-3'.

2.2.3. Ligeerimine ja transformeerimine

Ligeerimisegu, mille kogumaht oleks 10 μ l, valmistamiseks segati kokku \sim 5 μ l vajaminevat DNA-d, 0,6 μ l T4 DNA ligaasi, 1 μ l 10X T4 DNA ligaasi puhvrit ning lahjendati destilleeritud veega 10 μ l. Seejärel jäeti ligeerimisegu tavaliselt üle öö toatemperatuurile ligeerima.

Transformeerimiseks segati \sim 10 μ l ligeerimisegu kokku \sim 70 μ l -80°C hoiustatud bakterirakkudega (*Escherichia coli* tüvi DH5 α). Segu inkubeeriti jääl 45 minutit, millele järgnes kuumašokk 42°C 1 minut. Peale kuumašokki pandi transformatsioonisegu paariks minutiks tagasi jääle. Kui bakterisse viidi ampitsilliiniresistentsusega plasmid, külvati segu seejärel otse Petri tassil olevasse LB-tardsöötmesse, mis sisaldas 100 $\mu\text{g/ml}$ ampitsilliini. Kanamütsiiniresistentsusega plasmidi puhul lisati transformatsioonisegule 800 μ l LB-vedelsöödet ning inkubeeriti saadud segu 45 minutit 180 rpm juures. Bakteriloksutist võetud segust kanti 100 μ l Petri tassil olevasse LB-tardsöötmesse, mis sisaldas 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamütsiini. Tasse inkubeeriti üle öö 37°C juures ning seejärel hoiustati 4°C juures.

2.2.4. Plasmiidse DNA eraldamine aluselise lüüsi meetodil

Plasmiidse DNA eraldamiskes külvati Petri tassidel kasvanud bakterikolooniad katseklaasi, mis sisaldas 4 ml LB-vedelsöödet ja vastavalt bakterisse viidud plasmidi tekitavale antibiootikumiresistentsusele, kas 100 $\mu\text{g/ml}$ ampitsilliini või 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamütsiini. Inokuleeritud katseklaase ehk katseklaase, kuhu oli viidud bakterid, inkubeeriti üle öö 37°C juures loksutil kiirusega 180 rpm (pööret minutis).

Bakteritest plasmiidse DNA eraldamiseks aluselise lüüsi meetodil kasutati FavorGen Favor-Prep Plasmid Extraction Mini Kiti ja tootja protokoll. 2 ml eppendorfi valati katseklaasist bakterisegu ning tsentrifuugiti 30 s 11 000 g juures, bakterirakud kogunesid eppendorfi põhja ning ülejäänud bakterisööde kallati ära, protsessi korrati veel ühe korra. Seejärel lisati bakteritele 240 μ l FAPD1 puhvrit ning suspendeeriti need selles vortexi abil täielikult. Lüüsimiseks lisati eppendorfidesse 240 μ l FAPD2 puhvrit, loksutati neid \sim 10 korda ning inkubeeriti toatemperatuuril \sim 4 minutit. Neutraliseerimiseks lisati lahustele 360 μ l FAPD3

puhvrit, loksutati neid ~ 10 korda ning tsentrifuugiti 5 minutit 16 100 *g* juures. Lüsaat kanti kogumistuubis olevasse kolonni ning tsentrifuugiti 30 s 11 000 *g* juures. Läbivoolanud vedelikust vabaneti ning kolonni lisati 400 μ l WP puhvrit, tsentrifuugiti 30 s 11 000 *g* juures, läbivoolanud puhvrist vabaneti ning kolonni lisati 700 μ l Wash puhvrit, mida tsentrifuugiti samuti 30 s 11 000 *g* juures ning millest seejärel vabaneti. Kolonnid tsentrifuugiti 3 minutit 16 100 *g* juures kuivaks ning asetati uutesse kogumistuubidesse (eppendorfidesse). Elueerimiseks ehk kolonni membraansesse filtrisse jäänud plasmiidse DNA vabastamiseks lisati kolonni membraanile 100 μ l elueerimispuhvrit ning lasti ~ 3 minutit seista, misjärel tsentrifuugiti tuube minut aega 16 100 *g* juures. Läbivalgunud vedelik sisaldaski plasmiidset DNA-d ning see säilitati eppendorfides -20°C juures.

2.2.5. DNA restriksioon, geelelektroforees ja fragmentide puhastamine

Restriksioonisegu saamiseks segati kokku 0,6 μ l vastavat restriктаasi, 1,5 μ l vastava restriктаasi 10X puhvrit, ~ 1 μ g plasmiidset DNAd ning vastav kogus destilleeritud vett, et restriksioonisegu kogumaht oleks 15 μ l. Restriktreerimiseks inkubeeriti restriksioonisegu 45 minutit 37°C juures.

Geelelektroforeesi teostamiseks segati 150 ng DNAd 8 μ l 1 kordse Bromophenol Blue laadimispuhvriga. Vastavalt DNA pikkusele kanti need kas 1,5% või 0,8% TAE-agarosgeelile, lühemaid DNA fragmente analüüsiti kangemal ning pikemaid lahjemal geelil. DNA kanti TAE-puhverlahuses olevale geelile, samuti kanti geelile Solis markerid. Geelile avaldati 120 V pinget.

Geelelektroforeesil eraldunud sobivad fragmendid lõigati UV-lambi all välja ning puhastati FavorGen FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kiti ja tootja protokollil abil. Geelitükid asetati eppendorfi, millele lisati 500 μ l FADF puhvrit. Segu segati vortex segistil, misjärel inkubeeriti seda aeg-ajalt segades 10 minutit 55°C juures. Segul lasti maha jahtuda ning kanti seejärel kogumistuubis olevasse kolonni ning tsentrifuugiti 30 s 11 000 *g* juures, läbivoolanud puhvrist vabaneti, kolonni lisati 750 μ l Wash puhvrit, mida tsentrifuugiti samuti 30 s 11 000 *g* juures ning millest seejärel vabaneti. Kolonnid tsentrifuugiti 3 minutit 16 100 *g* juures kuivaks ning asetati uutesse eppendorfidesse. Kolonni membraanile lisati 100 μ l elueerimispuhvrit ning lasti ~ 3 minutit seista, misjärel tsentrifuugiti tuube minut aega 16 100 *g* juures. Saadud plasmiidne DNA hoiustati -20°C juures.

2.2.6. Golden Gate klonimine

Kapsiide määrava DNA valmistamiseks Golden Gate klonimise meetodil segati PCR tuubis kokku 20 µl reaktsioonisegu, mis sisaldas vektorit, vastava kapsiidivalgu muutuva piirkonna paremat ja vasakut õlga ning sinna sisestatavat peptiidi määravad DNAd. Vajaminevad DNA kogused arvutati valemiga $\frac{20 \text{ (fmol)} \cdot \text{suurus(kb)}}{\text{kontsentratsioon(ng/}\mu\text{l)} \cdot 1520}$. Lisaks DNadele sisaldas reaktsioonisegu veel 2 µl 10x T4 DNA ligaasi puhvrit, 1 µl T4 DNA ligaasi, 1 µl IIs tüüpi restrikaasi BpiI, ning vajaminev kogus destilleeritud vett, et tuubis oleva segu kogumaht oleks kokku 20 µl. Korraga ligeerimine ja restrikteerimine viidi läbi PCR masinas, millesse programmeeriti järgnev programm. 50 tsükli: 2 minutit 37 °C ja 5 minutit 16 °C, kusjuures 37 °C juures toimus restriksioon ning 16 °C juures ligeerimine. Lõpus esmalt 5 minutit 37 °C ning seejärel 10 minutit 80 °C juures ensüümide inaktiveerimiseks. Saadused säilitati –20 °C juures.

2.2.7. Koekultuuri rakkude kasvatamine

AAV viirusvektorite tootmiseks kasutati stabiilset rakuliini HEK293FT. Rakke kasvatati 10 cm läbimõõduga Petri tassidel Eagle' minimaalsöötmes, mis sisaldas L-glükoosi, L-glutamiini ja naatrium-püruvaati (DMEM, Corning). Söötmesse lisati veel ruumala järgi 10% veise loote seerumit (FBS, PAN Biotech), 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini (PEST, Corning). Rakukultuuri inkubeeriti 37 °C juures 5% CO₂ keskkonnas. Iga 2-3 päeva tagant vahetati rakkudel söödet ja külvati need edasi. Selleks pesti rakke 4-5 ml PBS-iga ning lisati neile 1 ml 0,05% trüpsiini ja 0,53 mM EDTA lahust, lastes sellel rakkudel mõjuda 1-2 minutit 37 °C juures. Seejärel lisati tassile 1 ml söödet ja kanti $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{8}$ ühel tassil olnud rakkudest edasi järgmisele söötmetassile, mis tähendab, et ühest söötmetassist võis saada kuni 8 uut tassi.

2.2.8. AAV viirusvektorite tootmine ja puhastamine

Viirusvektorite tootmiseks transfecteeriti HEK293FT rakke transientselt (rakkudesse viidud nukleinhape jääb sinna piiratud ajaks ning ei pärandu tütarrakkudesse) AAV plasmiididega, selleks kasutati IVEX Labi OÜ-s väljatöötatud transfektsiooni protokoll ja reagentide. 8 tundi enne transfecteerimist külvati rakud teisele 10 cm läbimõõduga söötmetassile hõredamalt edasi. 30 minutit enne transfektsiooni lisati rakkudele 4 ml 37 °C juures soojendatud söödet. Seejärel valmistati 1,5 ml eppendorfis transfektsioonisegu, mis sisaldas

3 µg genoomset AAV reporterplasmidi, 4 µg abiplasmidi pHelper, 3 µg pRepCap plasmidi ja 1 ml eFECT diluenti (IVEX Lab). Segu segati vortexil õrnalt ning seejärel fuugiti. Siis lisati segule 40 µl eFECT transfektsiooni reagenti (IVEX Lab), vortexiti 10 sekundit, fuugiti õrnalt ning jäeti 15-20 minutiks toatemperatuurile. Seejärel ühtlustati transfektsioonisegu seda õrnalt pipetiga segades ning kanti tilkhaaval rakkudele. Transfektsioonisegu ühtlase jaotumise tagamiseks loksutati Petri tasse õrnalt laua pinnal. Nakatatud rakud viidi tagasi 37 °C ja 5% CO₂ keskkonda ning iga 12-24 tunni tagant vahetati nende söödet. Viirusel lasti neli ööpäeva rakkudesse akumulieruda.

Rakkude puhastamiseks lisati neile 0,1 ml 0,5 M EDTA lahust ning lasti neil 10-15 minutit toatemperatuuril inkubeerida, et lasta rakkudel üksteisest eralduda. Seejärel koguti rakusegu tuubi, mida tsentrifuugiti 10 minutit 3000 *g* juures, rakkude peale kogunenud lahusest vabaneti. Rakkude kasvatamiseks kasutatud söötmetassi täielikuks puhastamiseks pesti seda 10 ml PBS-i lahusega ning koguti vabanenud rakud tuubi. Tuubi tsentrifuugiti taaskord 10 minutit 3000 *g* juures ning rakkude peale kogunenud supernatandist vabaneti. Siis suspendeeriti tuubi kogutud rakud 1 ml PBS-is ning säilitati –80 °C juures.

Rakkudest viiruse väljapuhastamiseks inkubeeriti külmutatud rakke 37 °C veevannis ligikaudu 5 minutit kuni rakud olid täielikult sulanud. Seejärel vortexiti rakke lahuse ühtlustamiseks 10-20 sekundit, misjärel külmutati rakud taaskord vedelas lämmastikus, milleks kulus ~5 minutit. Vesivannil soojendamist, vorteximist ja vedelas lämmastikus külmutamist korrati viis korda. Siis tsentrifuugiti lüüsitud rakke 10 minutit 4500 *g* juures, et rakujäätused põhja koguda. Rakkude peale kogunenud AAV vektoreid sisaldav supernatant viidi uude tuubi ja säilitati –80 °C juures.

2.2.9. AAV transduktsioonivõime mõõtmine koekultuurirakkudes

Rakkude viirusvektoritega transdutseerimiseks külvati esmalt HEK293 rakud 96-kannulisele läbipaistmatule koekultuuri plaadile. Igasse kannu külvati 10000 rakku ning neid kasvatati 100 µl Eagle' minimaalsöötmes, mis sisaldas 1,5 g/l naatriumvesinikkarbonaati, asendatavaid aminohappeid, L-glutamiini ja naatrium-püruvaati (EMEM, Corning). Sööde sisaldas veel ruumala järgi 10% veise loote seerumit (FBS, PAN Biotech), 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini (PEST, Corning). 24 tunni möödudes kanti rakkudele valmistatud viirusvektorid neljakordete lahjendustena, igat lahjendust korrati kolm korda.

Kannudesse viidi vastavalt 4 µl, 1 µl, 0,25 µl, 0,0625 µl, 0,0156 µl ja 0,0039 µl viirusvektori lahust 20 µl EMEM söötmes. 48 tundi peale viirusvektorite pealepanekut lisati igasse kannu 120 µl EMEM söödet.

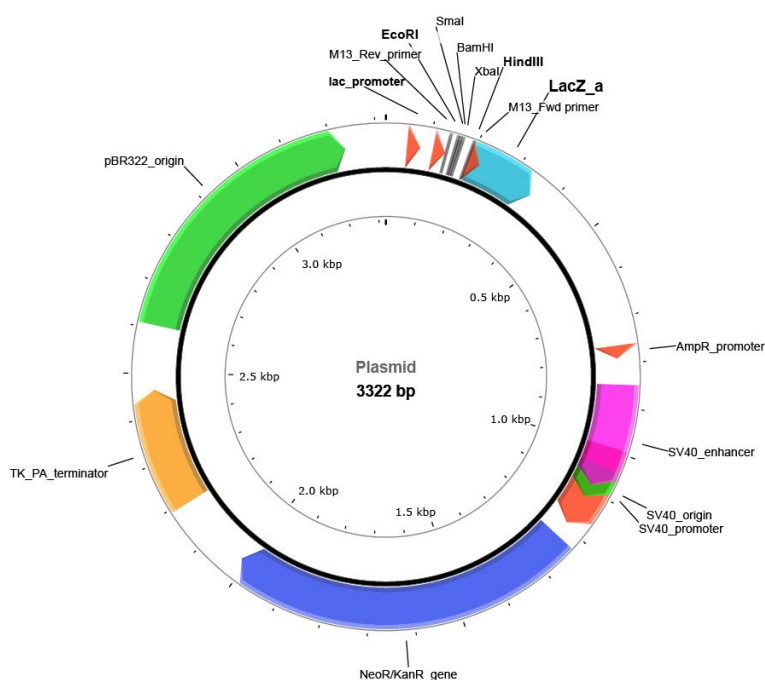
Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine viidi läbi vastavalt tootja protokollile (IVEX Lab). Viis ööpäeva peale viirusvektorite rakkudele viimist eemaldati 96-kannulistel plaatidel olevatelt rakkudelt sööde ning lüüsi need algul lüüsipuhvris 50 µl kannu kohta 10-15 minutit 200 rpm juures. Pärast lüüsimist lisati igasse kannu 50 µl substraadilahust lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks. Lutsiferaasi mõõtmine viidi läbi võimalikult kiiresti, 5-10 minuti jooksul pärast substraadi lisamist. Lutsiferaasi aktiivsust mõõdeti GeniusPro kombineeritud fluoro- ja luminomeetriga (Tecan).

2.3. Tulemused

2.3.1. Kanamütsiini resistentse sinivalget selektsiooni võimaldava Golden Gate vektori (pGGA_Kan_LacZ α) konstrueerimine

Golden Gate (GG) meetodil kloneerimine on eriti efektiivne, kui GG aktseptorplasmidi antibiootikumi resistentsuse geen erineb doonorplasmiidide omast. Kuna käesolevas projektis on GG aktseptorid ehk kapsiidiplasmiidid, ampitsilliini resistentsed, siis oli mõistlik viia GG doonorplasmiidid kanamütsiini resistentsusele. Kloneerimise hõlbustamiseks on kasutusele võetud sinivalget selektsiooni võimaldav LacZ α -komplementatsioonsüsteem. See põhineb aktiivse β -galaktosidaasi tetrameeri moodustumisel, milleks vajalik α -peptiid ekspresseeritakse plasmiidilt. Ensüümi aktiivsuse tulemusena tekib värvitust X-gal substraadist sinine pigment. Inserdi sisestamine plasmidi rikub enamasti α -peptiidi lugemisraami ning seetõttu jäävad kolooniad valgeks. (Ullmann *et al.* 1967)

Kuna sellist plasmidi ei olnud vastaval hetkel saada, konstrueeriti see ise. Selleks kasutati kanamütsiini resistentset plasmidi pFA-CMV, mida lõigati restriктаasidega VspI ja AdeI. LacZ α järjestust sisaldavat plasmidi pUC18 paljundati PCR reaktsioonis praimeritega BR322oriF ja LacZ α -3Ade ning saadud produkti restrikteeriti samuti restriктаasidega VspI ja AdeI-ga. 450 nukleotiidi pikkune fragment ligeeriti ettevalmistatud vektorisse ja transformeeriti *Escherichia coli* tüvve DH5 α . Positiivsed kolooniad värvusid siniseks, neist eraldati plasmiidne DNA. Eraldatud plasmiidse DNA nukleotiidne järjestus kontrolliti



Joonis 8. pGGA_Kan_LacZ α

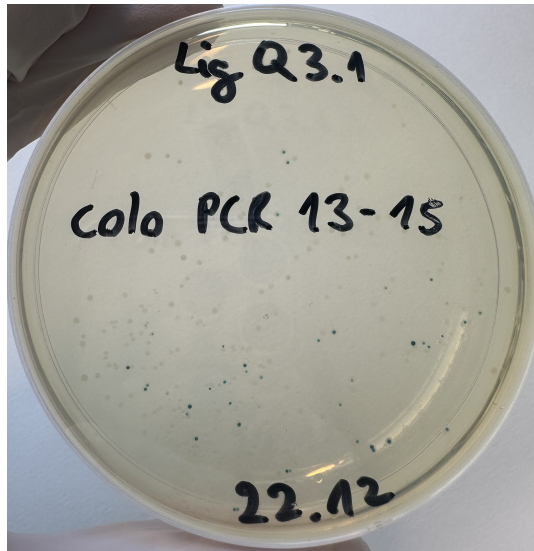
Allikas: Autori andmed

sekveneerimisega, mille tulemus osutus soovituks. Nii saadi sinivalget selektsiooni võimaldav kanamütsiini resistentne plasmiid, mis sisaldas ka sobivaid EcoRI ja HindIII restriksioonisaite (edaspidi nimetatud kui pGGA_Kan_LacZ α) (Joonis 8).

2.3.2. Fragmentide kloneerimine pGGA_Kan_LacZ α vektorisse

Süntetilised DNA plasmiidid Q1-Q8 transformeeriti kompetentsetesse bakterirakkudesse (*Escherichia coli* tüvi DH5 α) ning kasvanud kolooniatest eraldati plasmiidse DNA mini-preparatsioonid. Eraldatud DNA-st restrikteeriti 1-2 μ l restriктаasidega EcoRI ja HindIII ning tekkinud fragmendid lahutati üksteisest elektroforeesiga 1,5% TAE-agaroosgeelil. Õiged fragmendid lõigati geelist välja ning neist puhastati DNA. Plasmiidist Q1 eraldati peptiidi uCendR ning AAV2 kapsiidi VR-VIII paremat ja vasakut õlga kodeerivad DNA järjestused. Plasmiididest Q2 ja Q3 vastavalt peptiide LuS7A ja uEdbTnc kodeerivad DNA järjestused. Plasmiidist Q4 peptiidi abIntNRP ja AAV5 kapsiidi VR-IV paremat ja vasakut õlga kodeerivad DNA järjestused. Plasmiididest Q5-Q7 eraldati vastavalt peptiide LuVG, IVEX1 ja LinTT1 ning plasmiidist Q8 peptiidi XBB1.5 ja AAV2 kapsiidi VR-IV paremat ja vasakut õlga kodeerivad DNA järjestused. Vektorit pGGA_Kan_LacZ α restrikteeriti samuti restriктаasidega EcoRI ja HindIII, tekkinud fragmendid lahutati geelelektroforeesil

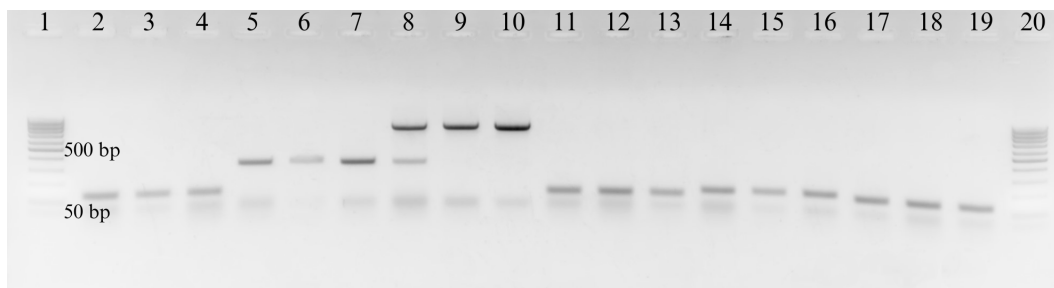
ning vektori 3,3 kb suurune DNA fragment puhastati. Saadud vektori DNA-ga ligeeriti eraldi reaktsioonides kõik inserdid ning transformeeriti saadud ligeerimissegud *E. coli* tüvve DH5 α . Negatiivseks kontrolliks kasutati sama vektorit – EcoRI-HindIII restrikteeritud pGGA_Kan_LacZ α plasmidi, mida ligeeriti ning transformeeriti ilma inserteeritava fragmendi juuresolekuta.



Joonis 9. Sinised ja valged bakterikolooniad Petri tassil

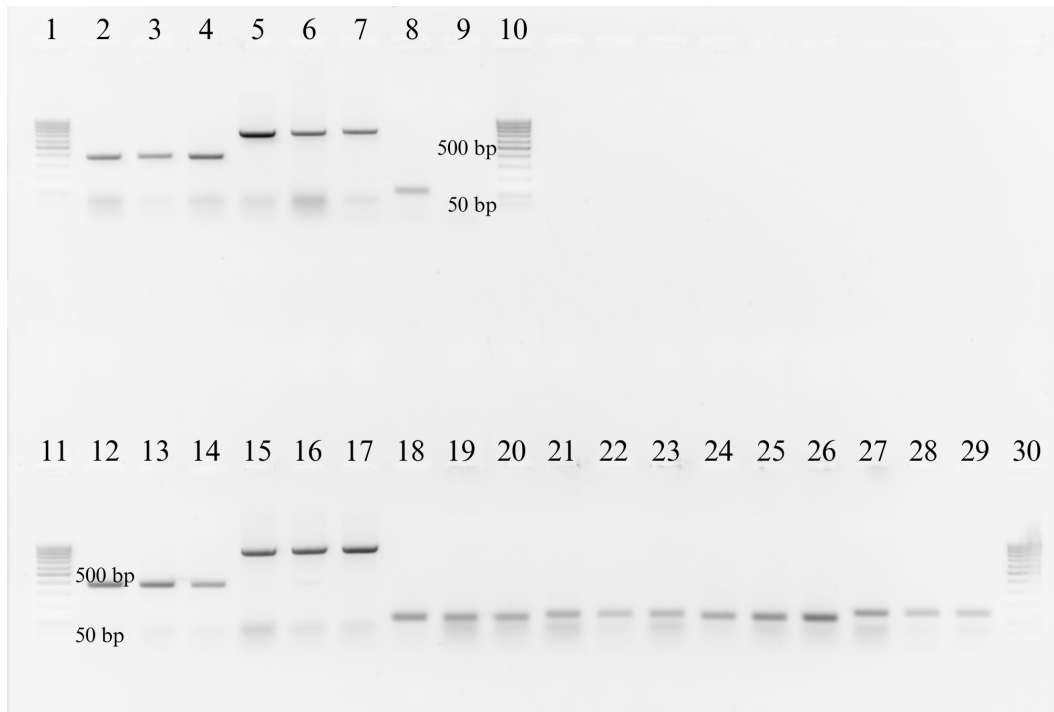
Allikas: Autori andmed

Tassidel, kus kasvasid inserdiga plasmidi omavad bakterid, kasvas üles rohkem kui sada bakterikolooniat, negatiivsel kontrollil aga ainult paar. Üleskasvanud kolooniatest olid osad valged ja osad sinised (Joonis 9). Huvitav on märkida, et paljud õnnestunud ligeerimised andsid tulemuseks sinised kolooniad. Igalt tassilt eraldati kolm bakterikolooniat ja neile tehti koloonia PCR. Koloonia PCR-i produkte analüüsiti geelelektroforeesiga, mille abil kontrolliti inserdi suurust (Joonised 10 ja 11). Sobivatest bakterikolooniatest eraldati plasmiidne DNA, mida seejärel sekveneeriti. Sekveneerimisel saadud DNA nukleotiidne järjestus osutus kõikide uuritud plasmiidide puhul ootuspäraseks, seega oldi saadud kõikide fragmentide jaoks BpiI restriksioonisaaitidega varustatud plasmiidsed DNA konstruktid.



Joonis 10. Bakterikolooniast tehtud PCR-i produktide analüüs geelelektroforeesil
Allikas: Autori andmed

Joonisel 10 on radadel 1 ja 20 50 aluspaari pikkune DNA-marker (GeneON). Ülejäänud radadel on inserdiga plasmiidid. Radadel 2-4 on inserdiks uCendR, 5-7 Cap2_VR-VIII parem õlg, 8-10 Cap2_VR-VIII vasak õlg, 11-13 LuS7A, 14-16 uEdbTncC ja radadel 17-19 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Int-NRP1. Sekveneerimiseks valiti välja plasmiidid geelelektroforeesil saadud tulemuste põhjal: kolmest sama inserdiga plasmiidist eelistati kõige kõrgema kontsentratsiooni ja korrektse pikkusega plasmidi. Valituteks osutusid plasmiidid, mille PCR produkte analüüsiti radadel 2, 5, 10, 11, 14 ja 17.



Joonis 11. Bakterikolooniast tehtud PCR-i produktide analüüs geelelektroforeesil
Allikas: Autori andmed

Joonisel 11 on radadel 1, 10, 11 ja 30 50 aluspaari pikkune DNA-marker (GeneON). Rajal 8 on positiivseks kontrolliks 50 bp pikkuse inserdiga plasmiid ja rajal 9 negatiivseks kontrolliks PCR-i segu, millele pole baktereid lisatud. Ülejäänud radadel on inserdiga plasmiidid. Radadel 2-4 on inserdiks Cap2_VR-IV vasak õlg, 5-7 Cap2_VR-IV parem õlg, 12-14 Cap5. VR-IV vasak õlg, 15-17 Cap5. VR-IV parem õlg, 18-20 LuVG, 21-23 IVEX1, 24-26 LinTT1 ja radadel 27-29 XBB1.5. Sekveneerimiseks valiti geelipildi alusel välja plasmiidid, mille PCR produkte analüüsiti radadel 2, 5, 12, 15, 18, 21, 24 ja 27.

2.3.3. Golden Gate kloneerimine

Edasi kloneeriti lühendatud AAV2 ja AAV8 kapsiidiplasmiididesse eeldatavalt kopsukoe ja vähkkasvaja spetsiifilised peptiidid, kasutates Golden Gate metoodikat. Kokku kloneeriti AAV lühendatud plasmiidid, muutuvpiirkondade vasakut ja paremat õlga kodeerivad plasmiidid ning sisestatavat peptiidi kodeeriv plasmiid. Kokku valmis 20 erinevat lühendatud AAV kapsiidiplasmidi (Tabel 1).

Doonorplasmiidid olid varustatud vajalike BpI restriktsioonisaitidega, kuid lühendatud AAV2 ja AAV8 kapsiidiplasmiidid neid ei sisaldanud. Seega aktseptoreid eelnevalt restrikteeriti sobivate restriktaasidega, fragmendid puhastati geelist ja nende DNA segati õiges stöhhiomeetrilises vahekorras Golden Gate reaktsioonisegusse. Peale transformatsiooni ja kolooniate üleskasvamist eraldati plasmiidne DNA, iga kloneerimise kohta kasutati 2-3 kolooniat, millest ühel määrati inserdi järjestus sekveneerimisega. Kõik analüüsitud plasmiidid osutusid ootuspäraseks.

Tabel 1. Golden Gate meetodil kokku kloneeritud fragmendid

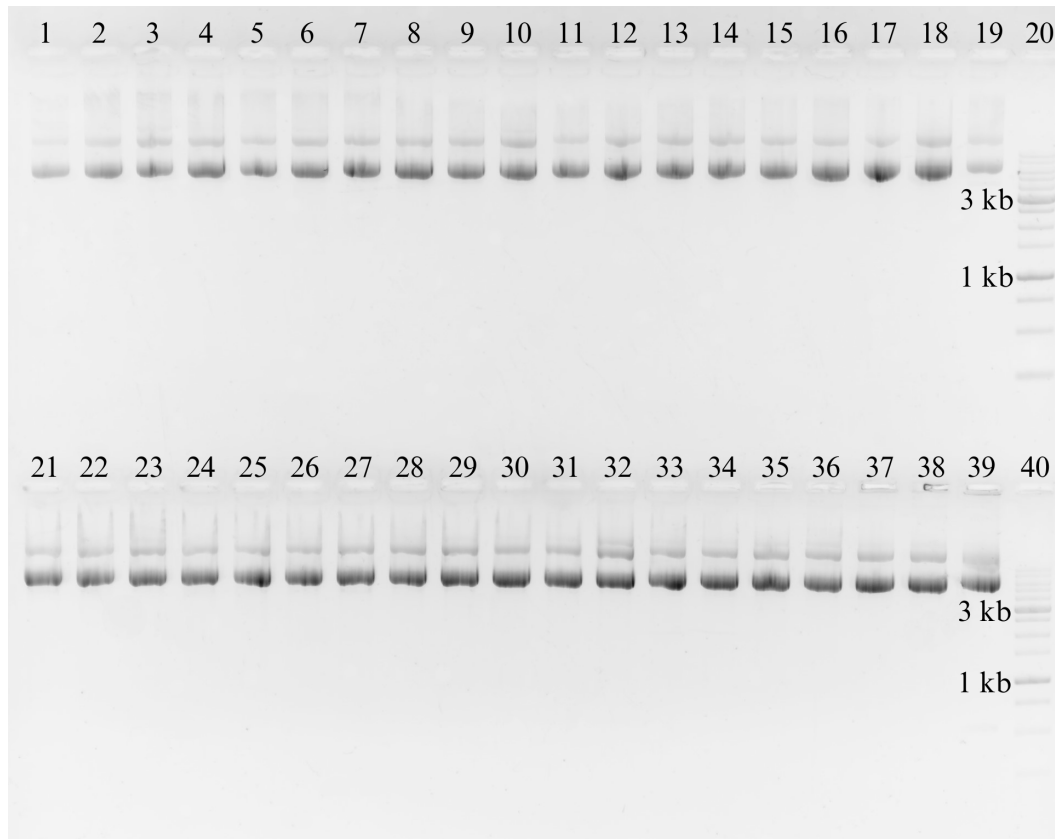
Aktseptor	Sisestuskoht	Peptiid
Cap2	VR-IV	uCendR XBB1.5 LuS7A uEdbTncC $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Int-NRP1 LuVG IVEX1 LinTT1
	VR-VIII	uCendR XBB1.5 LuS7A uEdbTncC $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Int-NRP1 LuVG IVEX1 LinTT1
Cap8	VR-IV	uCendR XBB1.5
	VR-VIII	uCendR XBB1.5

Allikas: Autori andmed

2.3.4. Peptiididega modifitseeritud täispikkade pRepCap plasmiidide konstrueerimine

Golden Gate kloneerimise tulemusena saadi plasmiidid, mis sisaldasid küll peptiididega modifitseeritud kapsiide kodeerivaid järjestusi, kuid kapsiidid ise olid lühendatud. Edasi kloneeriti need täispikka kapsiidi kodeerivasse plasmiidi: Cap2 järjestused kloneeriti plasmiidi pRC2 ja Cap8 järjestused plasmiidi pAAV2/8. Selleks restrikteeriti Cap2 plasmiide restriктаasidega Pfl23II ja NheI ning Cap8 plasmiide restriктаasidega Pfl23II ja NotI, õiged

fragmendid puhastati geelist ja sisestati täispikkade plasmiidide vastavatesse restriksioonisaitidesse. Kõigilt transformeeritud tassidelt eraldati kahe bakterikoloonia plasmiidne DNA ning analüüsiti täispikki pRepCap plasmide geelelektroforeesil.



Joonis 12. Täispikkade pRepCap plasmiidide analüüs geelelektroforeesil

Allikas: Autori andmed

Joonisel 12 on radadel 20 ja 40 1 kb DNA-marker (Solis BioDyne). Rajal 19 on võrdluseks inserdita pAAV2/8 ja rajal 39 inserdita pRC2. Radadel 1-10, 23-24 ja 37-38 on pRC2, milles on inserdiks Cap2_VR-VIII, millesse on sisestatud peptiidid. Radadel 1 ja 2 on peptiidiks uEdbTncC, 3 ja 4 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Int-NRP1, 5 ja 6 LuVG, 7 ja 8 IVEX1, 9 ja 10 LinTT1, 23 ja 24 uCendR ning radadel 37 ja 38 LuS7A. Radadel 21-22 ja 25-36 on pRC2, milles on inserdiks Cap2_VR-IV, millesse on sisestatud peptiidid. Radadel 21 ja 22 on peptiidiks XBB1.5, 25 ja 26 LuS7A, 27 ja 28 uEdbTncC, 29 ja 30 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Int-NRP1, 31 ja 32 LuVG, 33 ja 34 IVEX1 ning radadel 35 ja 36 LinTT1. Radadel 11-18 on inserdiks lühendatud Cap8 plasmiidid. Radadel 11 ja 12 sisaldub inserdis VR-IV sisestatud uCendR, 13 ja 14 VR-IV sisestatud XBB1.5, 15 ja 16 VR-VIII sisestatud uCendR ja radadel 17 ja 18 VR-VIII

sisestatud XBB1.5. Geelipildilt on näha, et peptiide sisaldavate kapsiidivariantide viimine täispikkadesse plasmiididesse läks ootuspäraselt.

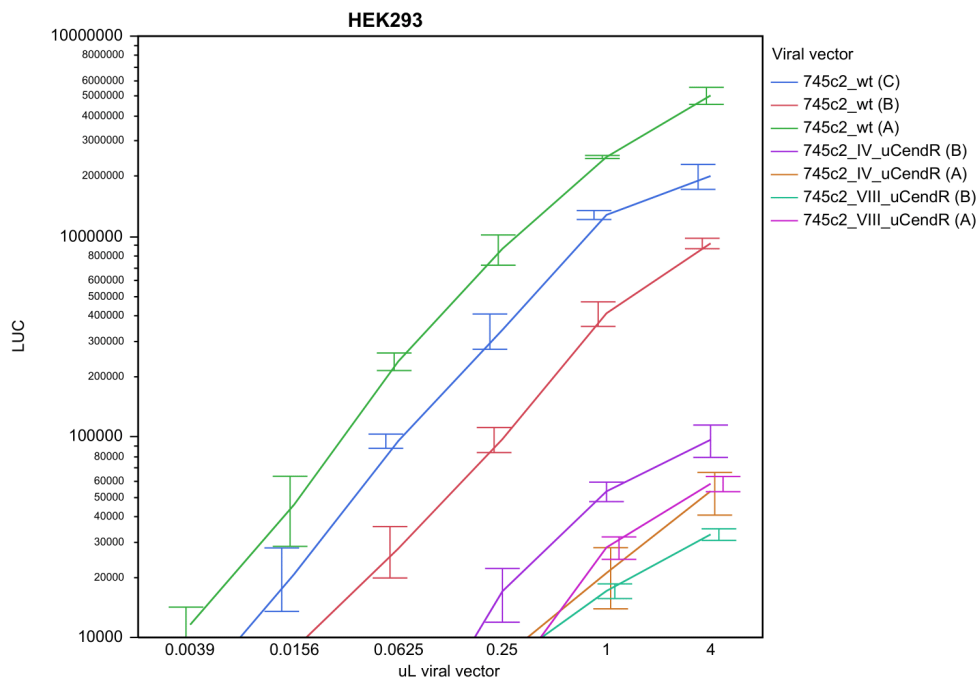
2.3.5. Tõhusamate Golden Gate aktseptorplasmiidide konstrueerimine

Golden Gate meetoodika edaspidiseks hõlpsamaks rakendamiseks otsustati aktseptorfragmentid asendada plasmiididega, kus sobivad üleulatuvad otsad tekiksid restriктаas BpiI lõikamise tulemusena. Sellisel juhul pole vaja enam aktseptorfragmente eraldi plasmiididest puhastada, mis on äärmiselt töömahukas. Selle asemel piisab vaid õigete Golden Gate plasmiidide kokkusegamisest. Selleks telliti oligonukleotiidpraimerid, millesse disainiti sobivad BpiI restriksioonisaadid. Lisaks sisaldab praimer 5' otsas HindIII restriksioonisaiti, et tekkinud PCR-i produkti oleks mugav plasmiidirõngaks ligeerida. See osa projektist on praegu kloneerimise staadiumis.

2.3.6. AAV transduktsiooni võime mõõtmine koekultuuri rakkudes

AAV viirusvektori tootmise testimiseks valiti kapsiidid AAV2_IV-uCendR ja AAV2_VIII-uCendR ning kontrolliks kasutati metsiktüüpi AAV2 kapsiidi. Niinimetatud genoomseks ehk transgeeni plasmiidiks kasutati jaanimardika lutsiferaasi püsivalt ekspresseerivat AAV konstrukti (IVEX Lab, plasmiid nr 745). Viirusvektori tootmisprotsessi käigus rakukultuuris ei olnud märgata erinevusi metsiktüüpi ja uCendR peptiide kandvate kapsiidide vahel. Edasi nakatati HEK293FT rakke puhastatud viirusvektoritega, kasutades viirusvektori neljakordset lahjenduste rida, alates 0,004 µl kuni 4 µl viirusvektorit ühe kannu kohta 96-kannulises koekultuuriplaadis.

Viis päeva hiljem mõõdeti rakkudes lutsiferaasi aktiivsus ehk luminesentsi. Tulemused on esitatud joonisel 13. A, B ja C märgised vektorite juures tähistavad sama vektori tootmise kordusi. uCendR insertiooniga viirusvektoritega mõjutatud rakud andsid 50-100 korda madalamad luminesentsi väärtused kui metsiktüüpi AAV2 kontrollviirused.



Joonis 13. LUC aktiivsus rakuliinis HEK293 erinevate kapsiidivariantide puhul
Allikas: Autori andmed

2.4. Arutelu

Käesoleva töö raames valminud Golden Gate doonorvektor pGGD_Kan_LacZ α osutus tõhusaks kloneerimisvektoriks - kõikide fragmentide kloneerimisel tekkis selle vektoriga liigermisega transformeerimisel kümneid kordi rohkem kolooniaid kui negatiivses kontrollis. Antud vektor sisaldab populaarse pUC18 vektori polülinkerit, mis võimaldab kloneerimisel kasutada EcoRI ja HindIII kõrval ka teisi levinud restriktase, ning LacZ α ekspressioonikasetti, mis võimaldab sinivalget seleksiooni. Varasemalt on samas projektis esinenud suuri probleeme insertide sisestamisega kanamütsiini resistentsesse vektorisse. Uue Golden Gate doonorvektoriga on need mured lahendatud. Huvitav on märkida, et mitmel juhul värvusid ka positiivsed kolooniad siniseks, justkui oleksid need olnud insertita plasmiidid. See on mõisteta, kuna suur osa kloneeritavatest fragmentidest olid lühikesi peptiide kodeerivad järjestused, mille lisamine EcoRI-HindIII sisestuskohtadesse ei põhjustanud stoppkoodoni teket ja LacZ α inaktiivsiooni. Kuna kloneerimine toimus kõrge efektiivsusega, siis sinivalge seleksioon ei osutunud kriitiliseks.

Ka Golden Gate meetodika rakendamine oli edukas: kõik peptiidid õnnestus valitud AAV kapsiidipiirkondadesse sisestada ning sekveneerimistulemuste järgi olid saadud konstruktid

ilma mutatsioonideta ehk korrektsed. Kõik modifitseeritud kapsiidid on ka kloonitud täispikkadesse pRepCap plasmiididesse, kokku on valminud selle uurimistöö raames 20 uut peptiidi insertiooniga serotüüpi, 16 neist on modifitseeritud AAV2 kapsiidid ja neli modifitseeritud AAV8 kapsiidid. Golden Gate näol on valminud AAV kapsiidide modifitseerimise platvorm, millele on edaspidi võimalik lisada kerge vaevaga üha uusi komponente, ning neid omavahel kombineerides saada mahukas modifitseeritud AAV kapsiidivariantide raamatukogu.

Antud katsetes kasutati Golden Gate aktseptorplasmiidina tavapärasel meetodil restrikteeritud ja geelist puhastatud DNA fragmente, mis pärinesid AAV2 ja AAV8 lühendatud kapsiidiplasmiididest. Töö käigus leiti, et mugavam oleks ka aktseptorplasmiidid Golden Gate platvormile viia, sel juhul tekiks ka aktseptorvektori üleulatuvad otsad IIS tüüpi restriктаasidega lõikamise tulemusel. Nii saaks Golden Gate reaktsiooni tegemiseks lihtsalt kokku segada kõik vajalikud plasmidsed DNA-d ja ensüümid, ilma eelneva vektorifragmenti puhastamiseta. AAV2, AAV5, AAV8 ja AAV9 kapsiidiplasmiidide vastav muutmine on praegu töös.

Viirusvektorite proovitootmine viidi läbi uCendR-sisaldavaid AAV2 kapsiide kasutades, pakkides lutsiferaasi ekspresseerivat AAV genoomi. Kuna võrreldes kontrolliga, milleks kasutati metsiktüüpi AAV2 kapsiidi, ei ilmnenud tootjarakkudes erinevusi metsiktüüpi ja uCendR-kapsiidide vahel, võib järeldada, et uCendR järjestused kapsiidis ei ole ekspresioonis rakkudele toksilised. See on oluline teave, vastasel juhul oleks neid viirusvektoreid rakkudes keerukas toota. Saadud preparaatide transduktsioonivõime testimisel HEK293FT rakkudes aga ilmnes, et uCendR insertiooni omavad viirused andsid rakkudel 50-100 korda madalamad luminesentsiväärtused kui metsiktüüpi kapsiidiga AAV2. Selle põhjus võib olla kas uCendR-viiruste madalam nakatamisvõime HEK293FT rakkudes või nende viiruste madalamad saagised tootmises. Põhjuste kindlaks määramiseks on edaspidi kavas mõõta iga viiruse preparaadi tiiter ehk AAV genoomi koopiate arv mahuühikus kvantitatiivse PCR-ga, ning uurida eri viiruste nakatamisvõimet ka teistes, kopsukoest ja eri kasvajatest pärit rakuliinides. Kirjeldatud katseid on vaja korrata kõikide loodud AAV kapsiidivariantidega.

Kuna viimastel aastatel on kopsufibroosi põdejate hulk kiiresti kasvanud seoses COVID-19 pandeemiaga ning kopsude ja kasvajate ravivõimalused on hetkel kasinad, on projektis

tehtavad peptiidsed muudatused väga aktuaalsed. Projekti jätkumisel loodetakse luua uudseid kopsu ja vähispetsiifilisi viirusvektoreid, mis parandaksid toodud haiguste ravi väljavaateid.

Kokkuvõte

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli anda ülevaade adenoassotsieeritud viiruste kasutamisest geeniteraapias ning uurida nende modifitseerimist peptiididega. Selleks jaotati töö kaheks osaks. Teoreetilises osas anti üldine ülevaade nii geeniteraapiast kui ka adenoassotsieeritud viirustest. Kirjanduse ülevaade põhineb internetis leiduvatel allikatel ning teemakohastel artiklidel ja raamatutel. Töö praktilises osas loodi platvorm AAV kapsiidide modifitseerimiseks, modifitseeriti ning toodeti ja katsetati uute kapsiidivariantidega viiruseid rakuliinis. Praktiline osa viidi läbi koostöös IVEX Lab OÜ-ga.

Töö esimesene osa jaotus omakorda kolmeks. Esimeses osas anti ülevaade geeniteraapia ajaloost ja tagasilöökidest, füüsikalistest ja keemilistest geenide rakku viimise viisidest, viirusvektorite kasutamisest geeniteraapias ning juba kasutusel olevatest geeniteraapiatest. Teine osa keskendub adenoassotsieeritud viirustele. Kirjeldati viiruse genoomi, kapsiidi ehitust, viiruse paljunemist ning tuntumaid AAV serotüüpe ja nende tropismi. Samuti anti ülevaade AAV-de kasutamisest geeniteraapias ja nende kapsiidivalkude modifitseerimisest peptiididega efektiivsemate ja rakuspetsiifilisemate viiruste loomiseks. Kirjanduse ülevaate viimane osa seletab lahti töö seisukohast äärmiselt olulise Golden Gate klonereimise meetodi.

Töö praktilises osas loodi Golden Gate klonereimiseks sobilik platvorm, mis võimaldaks AAV kapsiidide mugavat modifitseerimist. Loodud sinivalget selektsiooni võimaldavas Golden Gate vektorisse klonereiti lühendatud AAV kapsiidi moodustamiseks vajalikud fragmendid, milleks olid viiruse lühendatud kapsiidi aktseptorplasmidi, muutuvpiirkonna paremat ja vasakut õlga ning kapsiidi viidud peptiidi kodeerivad järjestused. Saadud plasmiididest moodustati Golden Gate klonereimise teel ühtsed lühendatud AAV kapsiidiplasmiidid, kokku valmistati kakskümmend uut AAV kapsiidivarianti. Lühendatud plasmiidid klonereiti edasi täispikkadesse viiruse kapsiidiplasmiididesse. Paari valmisatud plasmidi põhjal toodeti HEK293FT rakkudes viirusvektoreid, millega transdutseeriti samuti HEK293FT rakke, võrdluseks kasutati metsiktüüpi viiruseid. Katsete tulemusel selgus, et valitud uued viirusvektorid, milleks olid AAV2 uCendR-i inserdiga VR-IV ja

AAV2 uCendR-i inserdiga VR-VIII andsid rakkudes 50-100 korda madalamad ekspressiooniväärtused kui metsiktüüpi AAV2 kontrollviirused.

Antud uurimistöö on osa suuremast projektist, mille katseline osa on veel pooleli. Projekti jätkudes toodetakse viiruseid kõigi toodetud plasmiidide põhjal ning transdutseeritakse nendega mitmeid eri rakuliine. Selle käigus soovitakse luua efektiivsemaid rakuspetsiifilisi viirusvektoreid, mida saaks tulevikus geeniteraapia arendamiseks kasutada. Uurimistöö põhiväärtus antud projektis seisneb mugava Golden Gate kloneerimisplatvormi loomises, mis on suureks abiks modifitseeritud AAV-de kiiremaks tootmiseks. Modifitseeritud AAV-de loomise teemal on plaanis tulevikus luua kimäärseid AAV kapsiide ehk mitme serotüübi kapsiidivalkudest kokku kombineeritud AAV-sid.

Kasutatud materjalid

- Alyas, J., Rafiq, A., Amir, H., Khan, S. U., Sultana, T., Ali, A., Hameed, A., Ahmad, I., Kazmi, A., Sajid, T., Ahmad, A. (2021) Human Insulin: History, Recent Advances, and Expression Systems for Mass Production. Loetud: <http://bmrat.org/index.php/BMRAT/article/view/692>, 12.11.2023.
- Bird, J. E., Marles-Wright, J., Giachino, A. (2022) A User's Guide to Golden Gate Cloning Methods and Standards. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9680027/>, 26.02.2024.
- Bode, N. (2023) Cloning Strategies: Golden Gate cloning. Loetud: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/cloning-strategies-golden-gate-cloning>, 26.02.2024.
- Bower, J. J., Song, L., Bastola, P., Hirsch, M. L. (2021) Harnessing the Natural Biology of Adeno-Associated Virus to Enhance the Efficacy of Cancer Gene Therapy. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8309980/>, 01.01.2024.
- Braun, G. B., Sugahara, K. N., Yu, O. M., Kotamraju, V. R., Mölder, T., Lowy, A. M., Ruoslahti, E., Teesalu, T. (2016) Urokinase-controlled tumor penetrating peptide. Loetud: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916302401?via%3Dihub>, 29.02.2024.
- Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L., Gao, G. (2021) Viral vector platforms within the gene therapy landscape. Loetud: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00487-6>, 21.11.2023.
- Büning, H., Srivastava, A. (2019) Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6378346/>, 24.02.2024.
- Cambridge Dictionary. Fullerene. Loetud: <https://dictionary.cambridge.org/dictionary/english/fullerene>, 18.03.2024.
- Castle, M. J., Turunen, H. T., Vandenberghe, L. H., Wolfe, J. H. (2016) Controlling AAV Tropism in the Nervous System with Natural and Engineered Capsids. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4993104/>, 12.03.2024.
- Chen, H. (2015) Adeno-associated virus vectors for human gene therapy. Loetud: <https://www.wjgnet.com/2220-3184/full/v5/i3/28.htm>, 29.02.2024.

Daya, S., Berns, K. I. (2008) Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2570152/>, 18.02.2024.

DiMattia, M. A., Nam, H.-J., Vliet, K. V., Mitchell, M., Bennett, A., Gurda, B. L., McKenna, R., Olson, N. H., Sinkovits, R. S., Potter, M., Byrne, B. J., Aslanidi, G., Zolotukhin, S., Muzyczka, N., Baker, T. S., Agbandje-McKenna, M. (2012) Structural Insight into the Unique Properties of Adeno-Associated Virus Serotype 9. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3393551/>, 05.03.2024.

Drouin, L. M., Agbandje-McKenna, M. (2013) Adeno-associated virus structural biology as a tool in vector development. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3921901/>, 05.03.2024.

EuroGCT. What conditions can currently be treated using gene and cell therapy? Loetud: <https://www.eurogct.org/what-conditions-can-currently-be-treated-using-gene-and-cell-therapy>, 14.11.2023.

Fliesler, N. After decades of evolution, gene therapy arrives. Loetud: <https://answers.childrenshospital.org/gene-therapy-history/>, 11.03.2024.

Food and Drug Administration. Approved Cellular and Gene Therapy Products. Loetud: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>, 11.03.2024.

Genemedi. Life Cycle of AAV Virus-From Infection To Regeneration. Loetud: <https://www.genemedi.net/i/life-cycle-of-aav-virus>, 26.02.2024.

Goertsen, D., Goeden, N., Flytzanis, N. C., Gradinaru, V. (2022) Targeting the lung epithelium after intravenous delivery by directed evolution of underexplored sites on the AAV capsid. Loetud: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2329050122001024>, 29.02.2024.

Gonçalves, M. A. (2005) Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1131931/>, 02.03.2024.

Halder, S., Vliet, K. V., Smith, J. K., Duong, T. T. P., McKenna, R., Wilson, J. M., Agbandje-McKenna, M. (2015) Structure of Neurotropic Adeno-Associated Virus AAVrh.8. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4617535/>, 17.02.2024.

Hirsch, M. L., Wolf, S. J., Samulski, R. (2016) Delivering Transgenic DNA Exceeding the Carrying Capacity of AAV Vectors. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4971574/>, 12.03.2024.

- Issa, S. S., Shaimardanova, A. A., Solovyeva, V. V., Rizvanov, A. A. (2023) Various AAV Serotypes and Their Applications in Gene Therapy: An Overview. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10000783/>, 14.01.2024.
- Liu, F., Lei, J., Vollmer, R., Huang, L. (2004) Mechanism of Liver Gene Transfer by Mechanical Massage. Loetud: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525001603004052>, 13.11.2023.
- Louten, J. (2016) Virus Structure and Classification. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7150055/>, 26.02.2024.
- Lundstrom, K. (2023) Viral Vectors in Gene Therapy: Where Do We Stand in 2023? Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10059137/>, 11.03.2024.
- Marks, L. (2018) *Gene therapy*. Loetud: <https://www.whatisbiotechnology.org/index.php/science/summary/gene-therapy/>, 31.10.2023.
- McCandless, K., Mishra, S., Stiltner, J., Feldman, K. S., Yagi, H., Yurko, R., Islam, K., Brown, J. M., Frizzell, R., Zahid, M. (2021) Novel Lung Targeting Cell Penetrating Peptides as Vectors for Delivery of Therapeutics. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8609903/>, 29.02.2024.
- Mietzsch, M., Broecker, F., Reinhardt, A., Seeberger, P. H., Heilbronn, R. (2014) Differential Adeno-Associated Virus Serotype-Specific Interaction Patterns with Synthetic Heparins and Other Glycans. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3958061/>, 17.02.2024.
- National Institutes of Health. Clinical trials. Loetud: <https://clinicaltrials.gov/search?intr=gene%20therapy>, 11.03.2024.
- National Institutes of Health. PPP1R12C protein phosphatase 1 regulatory subunit 12C [Homo sapiens (human)]. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=54776>, 18.02.2024.
- Nature. (2023) The gene-therapy revolution risks stalling if we don't talk about drug pricing. Loetud: <https://www.nature.com/articles/d41586-023-01389-z>, 11.03.2024.
- New World Encyclopedia. Supramolecular chemistry. Loetud: https://www.newworldencyclopedia.org/entry/Supramolecular_chemistry, 18.03.2024.
- Oxford Reference. plus (+) and minus (–) viral strands. Loetud: <https://www.oxfordreference.com/display/10.1093/oi/authority.20110803100332484>, 02.03.2024.
- Padron, E., Bowman, V., Kaludov, N., Govindasamy, L., Levy, H., Nick, P., McKenna, R., Muzyczka, N., Chiorini, J. A., Baker, T. S., Agbandje-McKenna, M. (2005) Structure of

Adeno-Associated Virus Type 4. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1069529/>, 17.02.2024.

Pingoud, A., Jeltsch, A. (2001) Structure and function of type II restriction endonucleases. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55916/>, 26.02.2024.

Pupo, A., Fernández, A., Low, S. H., François, A., Suárez-Amarán, L., Samulski, R. J. (2022) AAV vectors: The Rubik's cube of human gene therapy. Loetud: [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016\(22\)00569-X#%20](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016(22)00569-X#%20), 16.11.2023.

Ramamoorth, M., Narvekar, A. (2015) Non Viral Vectors in Gene Therapy - An Overview. Loetud: [https://jcd.r.net/articles/PDF/5394/10443_CE\(Ra\)_F\(Sh\)_PF1\(PAK\)_PFA\(AK\)_PF2\(PAG\).pdf](https://jcd.r.net/articles/PDF/5394/10443_CE(Ra)_F(Sh)_PF1(PAK)_PFA(AK)_PF2(PAG).pdf), 31.10.2023.

Ravimiamet. Müügiloaga uudsed ravimid Euroopa Liidus. Loetud: <https://ravimiamet.ee/veri-rakud-koed-elundid-uudne-ravim/uudsed-ravimid/muugiloaga-uudsed-ravimid-euroopa-liidus>, 01.01.2024.

Royle, S. J. (2006) The cellular functions of clathrin. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3475309/>, 18.03.2024.

Samulski, R. J., Muzyczka, N. (2014) AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. Loetud: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-virology-031413-085355>, 16.11.2023.

Scheller, E., Krebsbach, P. (2009) Gene therapy: design and prospects for craniofacial regeneration. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2907101/>, 11.03.2024.

Schwem, B., Verma, S., Markos, S., Bodnar, L., Barnes, C., Filippo, C., Ali, M., Pugliese, M.-M., Woell, D., Jeong, B. surface glycoprotein [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2]. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WCO04151.1>, 29.02.2024.

Shitik, E. M., Shalik, I. K., Yudkin, D. V. (2023) AAV- based vector improvements unrelated to capsid protein modification. Loetud: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2023.1106085/full#B110>, 02.03.2024.

Shoti, J., Qing, K., Keeler, G. D., Duan, D., Byrne, B. J., Srivastava, A. (2023) Development of capsid- and genome-modified optimized AAVrh74 vectors for muscle gene therapy. Loetud: [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/methods/fulltext/S2329-0501\(23\)00186-9](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/methods/fulltext/S2329-0501(23)00186-9), 23.03.2024.

Sibbald, B. (2001) Death but one unintended consequence of gene-therapy trial. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC81135/>, 11.03.2024.

- Sikkema, A. P., Tabatabaei, S. K., Lee, Y.-J., Lund, S., Lohman, G. J. S. (2023) High-Complexity One-Pot Golden Gate Assembly. Loetud: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpz1.882>, 26.02.2024.
- Simón-Gracia, L., Scodeller, P., Fuentes, S. S., Vallejo, V. G., Ríos, X., Sebastián, E. S., Sidorenko, V., Silvio, D. D., Suck, M., Lorenzi, F. D., Rizzo, L. Y., Stillfried, S. von, Kilk, K., Lammers, T., Moya, S. E., Teesalu, T. (2018) Application of polymersomes engineered to target p32 protein for detection of small breast tumors in mice. Loetud: <https://www.oncotarget.com/article/24588/text/>, 29.02.2024.
- Song, R., Pekrun, K., Khan, T. A., Zhang, F., Paşca, S. P., Kay, M. A. (2022) Selection of rAAV vectors that cross the human blood-brain barrier and target the central nervous system using a transwell model. Loetud: [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/methods/fulltext/S2329-0501\(22\)00127-9](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/methods/fulltext/S2329-0501(22)00127-9), 17.02.2024.
- Sorida, M., Bonasio, R. (2023) An efficient cloning method to expand vector and restriction site compatibility of Golden Gate Assembly. Loetud: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667237523002084>, 26.02.2024.
- Zhao, Z., Anselmo, A. C., Mitragotri, S. (2021) Viral vector-based gene therapies in the clinic. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8780015/>, 11.03.2024.
- Ullmann, A., Jacob, F., Monod, J. (1967) *Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the -galactosidase structural gene of Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology, nr 24 (2).
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J. (1999) Essentials of Glycobiology. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20693/>, 02.01.2024.
- Wang, C., Pan, C., Yong, H., Wang, F., Bo, T., Zhao, Y., Ma, B., He, W., Li, M. (2023) Emerging non-viral vectors for gene delivery. Loetud: <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-023-02044-5>, 11.03.2024.
- Wang, D., Tai, P. W. L., Gao, G. (2019) Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6927556/>, 01.01.2024.
- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., Marillonnet, S. (2011) A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3041749/>, 12.03.2024.
- Wivel, N. A., Wilson, J. M. (1998) METHODS OF GENE DELIVERY. Loetud: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889858805700046>, 21.11.2023.

World Health Organisation. International Clinical Trials Registry Platform Search Portal. Loetud: <https://trialsearch.who.int/Default.aspx>, 01.01.2024.

Wörner, T. P., Bennett, A., Habka, S., Snijder, J., Friese, O., Powers, T., Agbandje-McKenna, M., Heck, A. J. R. (2021) Adeno-associated virus capsid assembly is divergent and stochastic. Loetud: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-21935-5>, 26.02.2024.

Xiao, W., Chirmule, N., Berta, S. C., McCullough, B., Gao, G., Wilson, J. M. (1999) Gene Therapy Vectors Based on Adeno-Associated Virus Type 1. Loetud: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC104178/>, 17.02.2024.

Lisa 1 Metsiktüüpi AAV-de kapsiidivalkude aminohappelised järjestused

Serotüüp	Aminohapped 1-70
AAV1	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADA
AAV2	MAADGYLPDWLEDNLSEGIQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNEADA
AAV3	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNEADA
AAV4	-MTDGYLPDWLEDNLSEGVREWWALQPGAPKPKANQQKQDDNARGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADA
AAV5	MSFVDHPPDWLEE-VGEGLREFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPFGNLDKGEPVNRAD
AAV6	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADA
AAV7	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDNARGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADA
AAV8	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADA
AAVrh.8	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADA
AAV9	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDNARGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADA
AAV10	MAADGYLPDWLEDNLSEGIQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNEADA
AAVrh.10	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADA
AAV11	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADA
AAV12	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDNARGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNEADA
AAV13	-MTDGYLPDWLEDNLSEGVREWWALQPGAPKPKANQQKQDDNARGLVLPGYKYLGPFGNLDKGEPVNAADA

Serotüüp	Aminohapped 71-140
AAV1	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
AAV2	AALHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAP
AAV3	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAP
AAV4	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEQAGETAP
AAV5	VAREHDI SYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
AAV6	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
AAV7	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
AAV8	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
AAVrh.8	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
AAV9	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAP
AAV10	AALHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAP
AAVrh.10	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
AAV11	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
AAV12	AALHDKAYDKQLEQGDNPYLKYNHADADEFQERLATDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEGVKTAP
AAV13	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAP

Serotüüp	Aminohapped 141-210
AAV1	GKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGK-----TGQQPAKKRLNFGQTGDSSESVDP-PQPLGEPPATPAAV
AAV2	GKKRPVEHSPV-EPDSSSGTGK-----AGQQPARKRLNFGQTGDADSVDP-PQPLGQPPAAPSGL
AAV3	GKKGAVDQSPQ-EPDSSSGVGK-----SGKQPAKKRLNFGQTGDSSESVDP-PQPLGEPPAAPSTSL
AAV4	GKKRPLIESPQ-QPDSSTGIGK-----KGKQPAKKKLVEFEDETGAGDG---PPEGSTSGAMS--
AAV5	TGKRIDDHFKRKKARTEEDSK-----PS-----TSSDAEAGPSGSQQLQIPAPASSL
AAV6	GKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGK-----TGQQPAKKRLNFGQTGDSSESVDP-PQPLGEPPATPAAV
AAV7	AKKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGK-----KGQQPARKRLNFGQTGDSSESVDP-PQPLGEPPAAPSSV
AAV8	GKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGK-----TGQQPAKKRLNFGQTGDSSESVDP-PQPLGEPPAAPSGV
AAVrh.8	GKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGK-----TGQQPAKKRLNFGQTGDSSESVDP-PQPLGEPPAAPSGL
AAV9	GKKRPVEQSPQ-EPDSSSAGIGK-----SGAQPAKKRLNFGQTGDTESVDP-PQPIGEPPAAPSGV
AAV10	GKKRPVEHSPA-EPDSSSGTGK-----AGQQPARKRLNFGQTGDADSVDP-PQPLGQPPAAPSGL
AAVrh.10	GKKRPVEPSPQRSPPDSSTGIGK-----KGQQPAKKRLNFGQTGDSSESVDP-PQPIGEPPAGPSGL
AAV11	GKKRPLESPQE--PDSSSGIGK-----K-----GKQPAKKRLNFEEDTGAGDG---PPEGSDTSAMS--
AAV12	GKKRPLEKTPN--RPTNPDSGKAPAKKKQKDGEPADSAARRTLDF-EDSGAGDG---PPEGSSSGEMS--
AAV13	GKKRPVEQSPA-EPDSSSGIGK-----SGQQPARKRLNFGQTGDTESVDP-PQPLGQPPAAPSGV

Serotüüp	Aminohapped 211-280
AAV1	GPTTMA SGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSAS-TGA
AAV2	GTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ--SGA
AAV3	GSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ--SGA
AAV4	DDSEMRAAAGGA AVEGGQADGVGNASGDWHCDSTWSEGHVTTTSTRTWVLPPTYNNHLYKRLGE-----S
AAV5	GADTMSAGGGGPLGDNNQADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSSYNNHLYKREIKSGSVD-G
AAV6	GPTTMA SGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSAS-TGA
AAV7	SGSTVAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSET-AGS
AAV8	GPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGA
AAVrh.8	GPNTMA SGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGS
AAV9	GS L TMA SGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGS
AAV10	GTNTMASGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ--SGA
AAVrh.10	SGSTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGS
AAV11	SDIEMRAAPGGNAVDAGQGS DGVGNASGDWHCDSTWSEGVTTTSTRTWVLPPTYNNHLYLRLGT-----T
AAV12	HDAEMRAAPGGNAVEAGQADGVGNASGDWHCDSTWSEGRVTTTSTRTWVLPPTYNNHLYLRLGT-----T
AAV13	GSTTMA SGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ--SGA

Serotüüp	Aminohapped 281-350
AAV1	SNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNL
AAV2	SNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
AAV3	SNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKKLSFKLFNIQVRGVTQNDGTTTIANNL
AAV4	LQSN TYNGFSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGM RPKAMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANNL
AAV5	SNANAYFGYSTPWGYFDNRFHSHWS PRDWQRL INNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVDSTTTIANNL
AAV6	SNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNL
AAV7	TNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKKLRFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNL
AAV8	TNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNL
AAVrh.8	TNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNEGTKTIANNL
AAV9	SNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNL
AAV10	SNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
AAVrh.10	TNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNL
AAV11	SSSNTYNGFSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGLRPKAMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANNL
AAV12	ANSNTYNGFSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGLRPKSMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANNL
AAV13	TNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL

Serotüüp	Aminohapped 351-420
AAV1	TSTVQVFS DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSSFYCLEYFPSQML
AAV2	TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSSFYCLEYFPSQML
AAV3	TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSSFYCLEYFPSQML
AAV4	TSTVQIFADSSYELPYVMDAGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGLVTGNTSQQQTDRNAFYCLEYFPSQML
AAV5	TSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPQPQVFTLPQYGYATLNRDNT-ENPTERS SFFCLEYFPSKML
AAV6	TSTVQVFS DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSSFYCLEYFPSQML
AAV7	TSTIQVFS DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG---SQSVGRSSSFYCLEYFPSQML
AAV8	TSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSSFYCLEYFPSQML
AAVrh.8	TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG---SQALGRSSSFYCLEYFPSQML
AAV9	TSTVQVFTDS DYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDG---SQAVGRSSSFYCLEYFPSQML
AAV10	TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSSFYCLEYFPSQML
AAVrh.10	TSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSSFYCLEYFPSQML
AAV11	TSTVQIFADSSYELPYVMDAGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGIVTGEN-QNQTDRNAFYCLEYFPSQML
AAV12	TSTVQIFADSTYELPYVMDAGQEGSFPPFPNDVFMVPQYGYCGVVTGKN-QNQTDRNAFYCLEYFPSQML
AAV13	TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSSFYCLEYFPSQML

Serotüüp	Aminohapped 421-490
AAV1	RTGNNFTFSYTFEEVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQN-QSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSV
AAV2	RTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTN-TPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRD
AAV3	RTGNNFQFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQGTTSGTNQSRLQFSQAGPQSMSL
AAV4	RTGNNFEITYSFEKVPFHSMYAHSQSLDRLMNPLIDQYLWGLQSTTTGTTLNAGTATTNFTKLRPTNFSN
AAV5	RTGNNFEFTYNFEEVPPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNT-----GGVQFNKNLAGRYAN
AAV6	RTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQN-QSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSV
AAV7	RTGNNFEFSYSFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLARTQSNPGGTAGNRELQFYQGGPSTMAE
AAV8	RTGNNFQFTYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQT-TGGTANTQTLGFSQGGPNTMAN
AAVrh.8	RTGNNFQFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLVRTQT-TG-TGGTQTLAFSQAGPSSMAN
AAV9	RTGNNFQFSYEFENVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGS--GQNQQTLLKFSVAGPSNMAV
AAV10	RTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTN-TPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRD
AAVrh.10	RTGNNFEFSYQFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQS-TGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSA
AAV11	RTGNNFEMAYNFEKVPFHSMYAHSQSLDRLMNPLLDQYLWHLQSTTSGETLNQGNAATTFGKIRSGDFAF
AAV12	RTGNNFEVSYQFEKVPFHSMYAHSQSLDRMMNPLLDQYLWHLQSTTTGNSLNQGTATTTYGKITTGDFAY
AAV13	RTGNNFQFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQTA--SGTQQSRLQFSQAGPTSMSL

Serotüüp	Aminohapped 491-560
AAV1	QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSN-----FTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDDEDKFFPMS
AAV2	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSE-----YSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQS
AAV3	QARNWLPGPCYRQQRVSKTANDNNNSN-----FPWTAASKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPMH
AAV4	FKKNWLPGPSIKKQGFSKTANQNYKIPATGSDSLIKYETHSTLDGRWSALTGPPMATAGPADSKFS-NS
AAV5	TYKNWFGPGMGRTQGWNLGSGVNRASV-----SAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALE
AAV6	QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSN-----FTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDDKKFFPMS
AAV7	QAKNWLPGPCFRQQRVSKTLDQNNNSN-----FAWTGATKYHLNGRNSLVNPGVAMATHKDDDEDFFPSS
AAV8	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSN-----FAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDDEERFFPSS
AAVrh.8	QARNWVPGPCYRQQRVSTTTNQNNSN-----FAWTGAAKFKLNGRDSLMPNGVAMASHKDDDDRRFFPSS
AAV9	QGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSE-----FAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLS
AAV10	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSE-----YSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQS
AAVrh.10	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTSQNNNSN-----FAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDDEERFFPSS
AAV11	YRKNWLPGPCVKQQRFSKTASQNYKIPASGGNALLKYDTHYTLNNRWSNIAPGPPMATAGPSDGDIFS-NA
AAV12	YRKNWLPGACIKQKFSKNANQNYKIPASGGDALLKYDTHHTLNGRWSNMAPGPPMATAGAGDSDFS-NS
AAV13	QAKNWLPGPCYRQQRVSKQANDNNNSN-----FPWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDKEKFFPMH

Serotüüp	Aminohapped 561-630
AAV1	GVMIFGKESAG---ASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQSSSTDPATGDVHAMGALPGM
AAV2	GVLIFGKQGSE---KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGM
AAV3	GNLIFGKEGTT---ASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLQSSNTAPTGTGNHQQALPGM
AAV4	QLIFAGPKQNG---NTATVPGTLIFTSEEEAATNATDITDMWGNLPGGDQSSNSNLPTVDRLTALGAVPGM
AAV5	NTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEI VPGS
AAV6	GVMIFGKESAG---ASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQSSSTDPATGDVHVMGALPGM
AAV7	GVLIFGKGTGAT---NK-TTLENVLMTNEEEIRPTNPVATEEYGI VSSNLQAANTAQTQVNNQGALPGM
AAV8	GILIFGKQNA---RDNADYSDVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGI VADNLQQQNTAPQIGTVNSQGALPGM
AAVrh.8	GVLIFGKQGAG---NDGVDYSQVLI TDEEEIKATNPVATEEYGAVAI NNQAANTQAQTGLVHNQGVIPGM
AAV9	GSLIFGKQGTG---RDNVDAKVMITNEEEIKTTNPVATESYGVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGM
AAV10	GVLIFGKQGSE---KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQGGNTQAATADVNTQGVLPGM
AAVrh.10	GVLMFQKQGAG---KDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGM
AAV11	QLIFPGPSVTG---NTTTSANNLLFTSEEEIAATNPRDITDMFGQIADNNQNATTAPITGNVTAMGVLPGM
AAV12	QLIFAGPNPSG---NTTTSANNLLFTSEEEIATNPRDITDMFGQIADNNQNATTAPHIANLDAMGIVPGM
AAV13	GTLIFGKEGTN---ANNADLENVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVSNNLQNSNAGPTTGTGNHQQALPGM

Serotüüp	Aminohapped 631-700
AAV1	VWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFHPS PLMGGFGLKNPPPQILIKNTVPVPANPPAEFSATKFASFITQYS
AAV2	VWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFHPS PLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPVPANPSTTFSAAKFASFITQYS
AAV3	VWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFHPS PLMGGFGLKHPPPQIMIKNTVPVPANPPTTFSAPKFASFITQYS
AAV4	VWQNRDIYYQGP IWAKI PHTDGHFHPS PLIGGFGLKHPPPQIFIKNTVPVPANPATTFSSTPVNSFITQYS
AAV5	VWMERDVYLQGP IWAKI PETGAHFHPS PAMGGFGLKHPPPMMLIKNTVPVPGNI-TSFS DVPVSSFITQYS
AAV6	VWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFHPS PLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPVPANPPAEFSATKFASFITQYS
AAV7	VWQNRDVYLQGP IWAKI PHTDGNFHPS PLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPVPANPPEVFTPAKFASFITQYS
AAV8	VWQNRDVYLQGP IWAKI PHTDGNFHPS PLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPVPADPPTTFSQAKLASFITQYS
AAVrh.8	VWQNRDVYLQGP IWAKI PHTDGNFHPS PLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPVPADPPLTFNQAKLNSFITQYS
AAV9	VWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGNFHPS PLMGGFGMKHPPPQILIKNTVPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYS
AAV10	VWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFHPS PLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPVPANPSTTFSAAKFASFITQYS
AAVrh.10	VWQNRDVYLQGP IWAKI PHTDGNFHPS PLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPVPADPPTTFSQAKLASFITQYS
AAV11	VWQNRDIYYQGP IWAKI PHADGHFHPS PLIGGFGLKHPPPQIFIKNTVPVPANPATTFTAARVDSFITQYS
AAV12	VWQNRDIYYQGP IWAKVPHTDGHFHPS PLMGGFGLKHPPPQIFIKNTVPVPANPNTTFSAAARINSFLTQYS
AAV13	VWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFHPS PLMGGFGLKHPPPQIMIKNTVPVPANPPTNFSAAKFASFITQYS

Serotüüp	Aminohapped 701-761
AAV1	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKS ANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL
AAV2	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
AAV3	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
AAV4	TGQVSVDWEIQKERS KRWNPEVQFTSNYGGQNSLLWAPDAAGKYTEPRAIGTRYLTHHL
AAV5	TGQVTVMEWELKKENS KRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL
AAV6	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKS ANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL
AAV7	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNFEKQTGVDFAVDSQGVYSEPRPIGTRYLTRNL
AAV8	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
AAVrh.8	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
AAV9	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
AAV10	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
AAVrh.10	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTDGTYSERPIGTRYLTRNL
AAV11	TGQVAVQIEWEIEKERS KRWNPEVQFTSNYGNQSSMLWAPDTTGKYTEPRVIGSRYLTHHL
AAV12	TGQVAVQIDWEIQKEHS KRWNPEVQFTSNYGTQNSMLWAPDNAGNYHELRAIGSRFLTHHL
AAV13	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

Legend

- hüdrofoobsed aminohapped
- positiivse laenguga aminohapped
- negatiivse laenguga aminohapped
- polaarsed aminohapped
- aromaatsed aminohapped
- tsüsteiinid
- glütsiinid
- proliinid

Resümee

Erinevate kapsiidivalkudega pakitud adenoassotsieeritud viirusvektorite nakatumisvõime mõõtmine koekultuurides

Geenivead põhjustavad ligikaudu 80% teadaolevatest haigustest, mistõttu on geeniteraapia suure potentsiaaliga valdkond. Adenoassotsieeritud viirused on kujunemas perspektiivika teks geeniteraapia teostamise vahenditeks. Samas on AAV-del äärmiselt lai tropism. Raku- ja koospetsiifiliste AAV-de loomine võimaldaks parandada geeniteraapia efektiivsust, mis omakorda muudaks geeniteraapia ohutumaks ja kättesaadavamaks.

Eksperimentaalses osas oli eesmärkideks luua sobilik Golden Gate kloneerimisplatvorm AAV kapsiidide modifitseerimiseks, sisestada AAV2 ja AAV8 kapsiididesse kopsu ja vähi spetsiifilised peptiidid ning toota ja testida uute kapsiidivariantidega viiruseid rakukultuuris. Esimeseks etapiks oli kanamütsiiniresistentse ja sinivalget selektsiooni võimaldava vektori konstrueerimine. Saadud vektorisse viidi Golden Gate kloneerimises kasutatavad fragmendid. Edasi sisestati kuni 8 erinevat peptiidijärjestust Golden Gate kloneerimisega AAV2 ja AAV8 kapsiididesse, ning lõpuks viidi muudetud järjestused täispikka kapsiidi ekspresseerivasse plasmidi. Saadud plasmiididega toodeti lutsiferaasi ekspresseerivad AAV vektorid, millega nakatati rakukultuuris HEK293FT rakke. Viiruse transduktsiooni efektiivsuse määramiseks mõõdeti rakkudel bioluminestsentsi tugevust.

Käesoleva tööga loodi AAV kapsiidide muutmise platvorm, lisaks saadi teada, et vähispetsiifilise lõikava peptiidi uCendR lisamine AAV2 kapsiidi alandab tunduvalt viirusvektorite transduktsioonivõimet valitud rakukultuurides. Uurimistöö on osa suuremast projektist, mille käigus uuritakse kuidas peptiidide lisamine AAV-de kapsiididesse muudab nende rakuspetsiifilisust ja transduktsioonivõimet, samuti loodetakse välja töötada raku- ja koospetsiifilisi AAV vektoreid, mis hõlbustaks AAV-de kasutamist geenivektorina. Seega on käesoleva töö tulemused olulised tõhusamate geenivektorite väljatöötamiseks.

Abstract

Measuring the infectivity of adeno-associated virus vectors packaged with different capsid proteins in tissue cultures

Defective genes account for 80% of known diseases, hence the field of gene therapy has an enormous potential. Adeno-associated viruses are emerging as promising tools for gene therapy. However, AAVs have an extremely broad tropism. Creation of cell- and tissue-specific AAVs would make gene therapy more effective, which in turn would make it safer and more accessible.

In the experimental part, the aims were to create a suitable Golden Gate cloning platform to modify AAV capsids, insert lung and cancer specific peptides into AAV2 and AAV8 capsids, and produce and test viruses with new capsid variants in cell culture. The first step was to construct a kanamycin resistant vector with blue-white selection system, to accept fragments used in Golden Gate cloning. Then, up to 8 different peptide sequences were inserted into the variable regions of AAV2 and AAV8 capsids with the Golden Gate cloning method, and finally the modified sequences were cloned into plasmids expressing the full-length capsids. With these capsids, AAV vectors expressing luciferase were produced, which were then used to infect HEK293FT cells in cell culture. To determine the efficiency of virus transduction, bioluminescence signal in cells was measured.

The Golden Gate-based platform to modify AAV capsids was successfully established. The study showed that insertion of the cancer-specific peptide uCendR to the AAV2 capsid significantly reduced the transduction efficiency of viral vectors in cell culture. This research project is a part of a larger study, which aims to understand how addition of peptides to the capsids of AAVs changes their cell specificity and transduction efficiency, in a hope to develop better cell- and tissue-specific AAV vectors for various gene therapy regimens. Thus, results of this work are important for the development of more efficient gene transfer vectors.

Kinnitusleht

Uurimistöö autorina kinnitan, et

- koostasin uurimistöö iseseisvalt ning kõigile töös kasutatud teiste autorite töödele ja andmeallikatele on viidatud;
- uurimistöö vastab Tallinna Reaalkooli uurimistöö juhendile;
- olen teadlik, et uurimistööd ei edastata teistele tulu teenimise eesmärgil ega jagata teadlikult plagieerimiseks.

.....

kuupäev / nimi / allkiri

Juhendajana kinnitan, et uurimistöö vastab Tallinna Reaalkooli uurimistöö juhendile ja lubatakse kaitsmisele.

Juhendaja

.....

kuupäev / nimi / allkiri