

TALLINNA REAALKOOL

MIA MARLEEN RAHE

12. KLASS, REAAL-PROGRAMMEERIMISE ÕPPESUUND

ERINEVATE KAPSIIDIVALKUDEGA PAKITUD ADENOASSOTSIEERITUD VIIRUSVEKTORITE NAKATUMISVÕIME MÕÕTMINE KOEKULTUURIDES

JUHENDAJAD ILLAR PATA (IVEX LAB OÜ), ÕP KERSTI VESKIMETS

SISSEJUHATUS

Arvatakse, et geenivigadest on mõjutatud ligikaudu 80% teadaolevast rohkem kui 7000 haigusest (Pupo *et al.*, 2022). Nende ravimiseks on võimalik kasutada geeniteraapiat. Geeniteraapia on ravi, mille eesmärk 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 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 eesmärk 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 erinevaid rakuliine koekultuuris. Määrates rakku sisenenud ning seal ekspresseerunud AAV-ga kantava geneetilise materjali hulka, loodetakse saada vastus töö peamisele uurimisküsimusele – kui hästi arendatav AAV-de modifitseerimisplatvorm toimib ja kas seda on mugav kasutada.

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 transduktsioonivõimet rakkudes, mida määratakse rakkudest eraldunud valgusvoo intensiivsuse mõõtmisega.

Uurimistöö geeniteraapia teoreetiline alus tugineb suures osas M. Ramamoorthi ja A. Narvekari artiklile „Non Viral Vectors in Gene Therapy – An Overview“. Adenoassotseeritud viiruste ülevaade põhineb peamiselt R. J. Samulski tööühma artiklil „AAV vectors: The Rubik’s cube of human gene therapy“ ning „AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes“.

Uurimistöö koostaja tänab töö valmimisele kaasa aidanud juhendajaid PhD Illar Patat ja õpetaja Kersti Veskimetsa ning kõiki teisi, kes panustasid töö edukale valmimisele.

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	1
LÜHENDITE LOETELU	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Geeniteraapia üldisloomustus	7
1.1.1. Geeniteraapia ajaloost	7
1.1.2. Mitteviruslikud geenide rakku viimise viisid	7
1.1.3. Viirusvektorid geeniteraapias.....	9
1.1.4. Kasutusel olevad ravid	10
1.2. Adenoassotsieeritud viirus	10
1.2.1. Viiruse genoom	10
1.2.2. Viiruse kapsiid	12
1.2.3. Adenoassotsieeritud viiruse paljunemine.....	13
1.2.4. Viiruse serotüübid.....	15
1.2.5. AAV kasutamine geeniteraapias.....	17
1.2.6. AAV kapsiidide modifitseerimine peptiididega	18
1.3. Golden Gate kloneerimine.....	19
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	22
2.1. Töö eesmärk	22
2.2. Materjalid ja meetodika	22
2.2.1. Töös kasutatud plasmiidid	22
2.2.2. Töös kasutatud peptiidide ja oligonukleotiidpraimerite järjestused	22
2.2.3. Ligeerimine ja transformeerimine	24
2.2.4. Plasmiidse DNA eraldamine aluselise lüüsi meetodil.....	24
2.2.5. DNA restriksioon, geelelektroforees ja fragmentide puhastamine	25
2.2.6. Golden Gate kloneerimine	25
2.2.7. Koekultuuri rakkude kasvatamine AAV viirusvektorite tootmiseks	26
2.2.8. AAV viirusvektorite tootmine ja puhastamine	26
2.2.9. AAV preparaate tiitri määramine qPCR meetodil	27
2.2.10. AAV nakatamisvõime mõõtmine koekultuurirakkudes	27
2.3. TULEMUSED	29
2.3.2. Fragmentide kloneerimine <i>pGGA_Kan_LacZα</i> vektorisse	30
2.3.3. Golden Gate kloneerimine	32
2.3.5. Tõhusamate Golden Gate aktseptorplasmiidide konstrueerimine	35
2.3.6. Määramata tiitriga AAV transduktsiooni võime mõõtmine koekultuuri rakkudes..	35
2.3.7. Toodetud AAV preparaate tiitrid.....	36

2.4. Arutelu	39
KOKKUVÕTE	41
RESÜMEE	43
Erinevate kapsiidivalkudega pakitud adenoassotsieeritud viirusvektorite nakatumisvõime mõõtmise koekultuurides	43
ABSTRACT	44
Measuring the infectivity of adeno-associated virus vectors packaged with different capsid proteins in tissue cultures.....	44
KASUTATUD MATERJALID	45
LISA 1. Modifitseeritud kapsiidivariantidega viiruste suhteline nakatamise võime võrdluses metsiktüüpi viirusega rakuliinis A431	51
LISA 2. Modifitseeritud kapsiidivariantidega viiruste suhteline nakatamise võime võrdluses metsiktüüpi viirusega rakuliinis HepG2	52
LISA 3. Modifitseeritud kapsiidivariantidega viiruste suhteline nakatamise võime võrdluses metsiktüüpi viirusega rakuliinis Huh7	53
LISA 4. Modifitseeritud kapsiidivariantidega viiruste suhteline nakatamise võime võrdluses metsiktüüpi viirusega rakuliinis IHH.....	54
LISA 5. Modifitseeritud kapsiidivariantidega viiruste suhteline nakatamise võime võrdluses metsiktüüpi viirusega rakuliinis PC3.....	55
LISA 6. (NCBI andmebaas) Metsiktüüpi AAV-de kapsiidivalkude aminohappelised järjestused	56

LÜHENDITE LOETELU

Lühend	Tähendus inglise keeles	Tähendus eesti keeles
AADC	aromatic L-amino acid decarboxylase	aromaatne L-aminohappe dekarboksülaas
AAP	assembly-activating protein	assambleerumist aktiveeriv valk
AAV	adeno-associated virus	adenoassotsieeritud viirus
AAVR	adeno-associated virus receptor	adenoassotsieeritud viiruse retseptor
AAVS1	adeno-associated virus integration site 1	adenoassotsieeritud viiruse integratsioonisaat 1
ADA-SCID	adenosine deaminasedeficient severe combined immunodeficiency	adenosiini deaminaasi raske kombineeritud immuunpuudulikkus
ADV	aleutian disease virus	aleuudi haiguse viirus
A431	human squamous carcinoma cell line A431	inimese lamerakk-kartsinoomi rakuliin A431
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'i sööde
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	etüleendiamiintetraädikhape
EGFR	epidermal growth factor receptor	epidermaalse kasvufaktori retseptor
EMEM	Eagle's minimum essential medium	minimaalne Eagle'i sööde
FBS	fetal bovine serum	veise loote seerum
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	fibroblasti kasvufaktori retseptor 1
GPR108	G protein-coupled receptor 108	G-valguga seotud retseptor 108
HEK293	human embryonic kidney cell line 293	inimese embrüonaalse neerurakkude liin 293
HEK293FT	human embryonic kidney cell line 293FT	inimese embrüonaalse neerurakkude liin 293FT
HepG2	human hepatoma cell line HepG2	inimese hepatoomi rakuliin HepG2
HGFR	hepatocyte growth factor receptor	hepatotsüütide kasvufaktori retseptor
HSPG	heparan sulfate proteoglycan	heparaansulfaat proteoglükaan
Huh7	human hepatoma cell line Huh7	inimese hepatoomi rakuliin Huh7
IHH	human hepatocyte cell line IHH	inimese hepatotsüütide rakuliin IHH
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	metakromaatiline leukodüstroofia
MM	multiple myeloma	hulgimüeloom
OTCD	ornithine transcarbamylase deficiency	ornitiini transkarbamülaasi puudulikkus
PBS	phosphate-buffered saline	fosfaatpuhverdatud soollahus
PCR	polymerase chain reaction	polümeraasi ahelreaktsioon
PC3	human prostate cancer cell line PC3	inimese eesnäärmevähi rakuliin PC3
PDGFR	platelet-derived growth factor receptors	trombotsüütidest pärinev kasvufaktori retseptor
PEST	penicillin G and streptomycin solution	G-pensilliini ja streptomütsiini lahus
PMBCL	primary mediastinal large B-cell lymphoma	primaane mediastiinumi B-suurrakklümfoom
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon
RLU	relative light unit	suhteline valguse ühik
RP	retinitis pigmentosa	pigmenditoosne retiniit
rpm	revolutions per minute	pööret minutis
SCID	severe combined immunodeficiency	raske kombineeritud immuunpuudulikkus
SMA	spinal muscular atrophy	spinaalne lihasatroofia
TAE	tris acetate EDTA	tris-atsetaat EDTA
TM9SF2	transmembrane 9 superfamily member 2 protein	transmembraan 9 superperekonna 2 valk
vg	viral genome	viiruse genoom
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

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Geeniteraapia üldiseloostus

1.1.1. Geeniteraapia ajaloost

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

1989. aastal kiitis Ameerika Ühendriikide riiklik terviseinstituut (NIH) heaks esimese raviprotokoli, mis hõlmas endas võõra geeni 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 DNA koopia sisestumisel 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 tollal nelja-aastane Ashanthi de Silva, kes on tänu saanud 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. Pärast 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 raviviisi (National Institutes of Health).

1.1.2. Mitteviiruslikud geenide rakku viimise viisid

Geenide rakku viimiseks on mitu võimalust. Selleks on kasutusel nii keemilised mitteviiruslikud vektorid kui ka füüsikalised meetodid. Mitteviiruslike meetodite tööpõhimõte on lihtne, kuid nende rakendamine praktikas hõlmab endas mitmeid väljakutseid. Peale rakusiseste ja -väliste membraanide läbimise tekitab raskusi ka seda tüüpi vektorite tootmine, formuleerimine ja hoiustamine. (Ramamoorth, Narvekar, 2015)

Füüsikalised meetodid on kõige lihtsamad geneetilise materjali rakku viimise viisid. 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, millega geeniteraapiaks vajalikku DNAd rakku viia. (*ibid.*)

Üks lihtsamaid viise geneetilise materjali huvipakkuvasse rakku viimiseks on rakke mikronõelaga süstida. Selles protsessis läbistatakse rakumembraan nõela abil. (*ibid.*)

Võimalik on ka niinimetatud geenipüssi meetod, mis põhineb DNA-ga kaetud raskemetalliosakeste „tulistamisel“ huvipakkuva koe rakku. Seda meetodit arendatakse eelkõige munasarjavähi raviks. (*ibid.*)

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. (*ibid.*)

Sonoporatsioon seisneb ultrahelilainete abil rakumembraani ajutiselt DNA-le läbitavaks muutmises. (*ibid.*)

Fotoporatsiooni käigus tekitatakse rakumembraani laserimpulsiga ajutised poorid, mille kaudu saab DNA rakku siseneda. (*ibid.*)

Veel on võimalik siduda geneetiline materjal magnetilise nanoosakesega ning see magnetvälja tekitamise abil rakku transportida. (*ibid.*)

Hüdroporatsiooniks ehk hüdrodünaamiliseks geeniülekaneks 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 ajutisi membraanidefekte ning laseb koesse süstitud plasmiidsetel DNA-l maksarakkudesse siseneda. (Liu *et al.*, 2004)

Keemilised kandjad liigitatakse anorgaanilisteks, lipiidi-, polümeeri- ja peptiidipõhisteks. Anorgaaniliste osakeste all mõeldakse üldiselt nanoosakesi. Neid saab konstrueerida erineva suuruse, kuju ja poorsusega ning nanoosakeste eesmärk on kaitsta neile kinnitatud molekuli fagotsütoosi ja lagunemise eest. Anorgaanilistest osakestest on kõige uuritumad kaltsiumsulfaat, ränidioksiid, kuld, magnetilised ühendid, kvanttäpid, fullereenid (ainult süsiniku aatomitest koosnevad kera-, ellipsoidi- või torukujulised molekulid, (Cambridge Dictionary s.v. fullerene)) ning supramolekulaarkompleksid (omavahel mittekovalentsete sidemetega seotud

molekulid (New World Encyclopedia s.v. Supramolecular chemistry)). (Ramamoorth, Narvekar 2015)

Katioonsete lipiidide põhistel kandjatel on positiivselt laetud pearühm seondunud nukleiinhapetes negatiivselt laetud fosfaatrühmaga ehk on moodustunud nn lipopleks. Geneetilist materjali ümbritsevad positiivselt laetud lipiidid aitavad seda kaitsta rakusiseste ja -välise nukleaaaside eest. Samuti on neil 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 eelis on selle suurem stabiilsus. Tahked lipiidsed nanoosakesed on valmistatud lipiididest, mis on nii toa- kui ka kehatemperatuuril tahked. Nendel on nii katioonsete lipiidide kui ka lipiidse nanoemulsiooni eelised. (*ibid.*)

Peptiidipõhiste vektorite eelis teiste mitteviiruslike vektorite ees on kompaktsus, tõhus DNA kaitse ja võimalus neid sellisel viisil konstrueerida, et vektorid seonduksid peamiselt spetsiifiliste retseptoritega sihtrakkude pinnal. Peptiidiligande kinnitatakse ka polüplekside ja lipoplekside külge, et muuta neid rakuspetsiifiliseks. (*ibid.*)

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. (*ibid.*)

1.1.3. Viirusvektorid geeniteraapias

Geeniteraapias viiakse kõige sagedamini geneetiline materjal rakkudesse viirusvektorite abil, kuna neil on mitteviiruslike vektoritega võrreldes parem geenide kohaletoimetamise võime (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 replikatsiooni jaoks vajalikud järjestused on nende genoomist arenduse käigus eemaldatud. 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 ehk organismi viidud võõra geeni ekspressiooni, samas kui krooniliste haiguste puhul on vaja pikaajalist, elukestvat transgeeni ekspressiooni.

Viirusvektorite peamine puudus on aga nende immuunreaktsiooni esilekutsumise kõrge tõenäosus ning tsütotoksilisus (Ramamoorth, Narvekar, 2015). Väljakutset pakub ka transgeeni ekspressiooni reguleerimine ja lõpetamine. Lisaks nõuab viirusvektorite tootmine viiruse leviku ohu tõttu kõrgemat bioohutuse taset võrreldes mitteviiruslike vektoritega. (Lundstrom, 2023)

1.1.4. Kasutusel olevad ravid

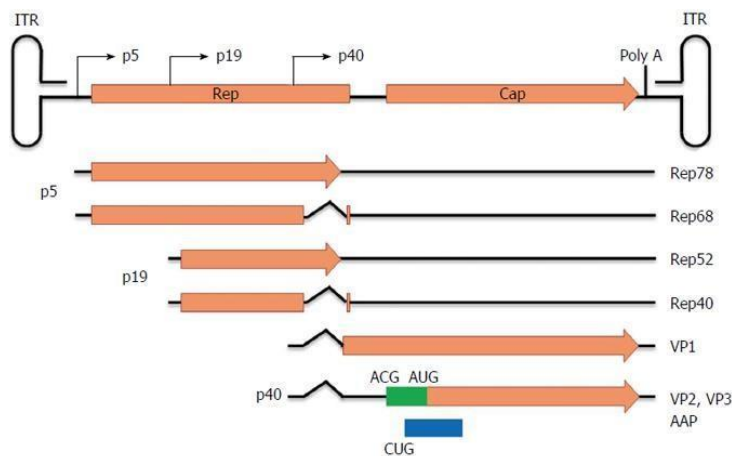
Euroopa Liidus on praeguseks müügiloo saanud ligi 20 geeniteraapiaravimit, millest mitu on viirusvektoritega muudetud rakud. Hetkel ravitakse Euroopa Liidus rakupõhise geeniteraapiaga ehk *ex vivo* ehk kehavälise geeniteraapiaga B-rakulist ägedat lümfoidset leukeemiat (B-ALL), difuusset B-suurrakklümfoomi (DLBCL), primaarset mediastiinumi B-suurrakklümfoomi (PMBCL), hulgimüeloomi (MM) ja rasket kombineeritud immuunpuudulikkust (SCID), beeta-talasseemiat ja sirprakulist aneemiat. *In vivo* ehk kehasiseses geeniteraapiaga on võimalik ravida melanoomi metastaase, spinaalset lihasatroofiat (SMA), pigmentooset retiniiti (RP) ja Leberi kaasasündinud amauroosi (LCA) ning nii A kui ka B hemofiiliat. (Ravimiameti veebileht)

Praegu kasutusel olevate geeniteraapiate peamine probleem on nende kallidus, 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. Sellegipoolest jäävad mitme geeniteraapia 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)

1.2. Adenoassotsieeritud viirus

1.2.1. Viiruse genoom

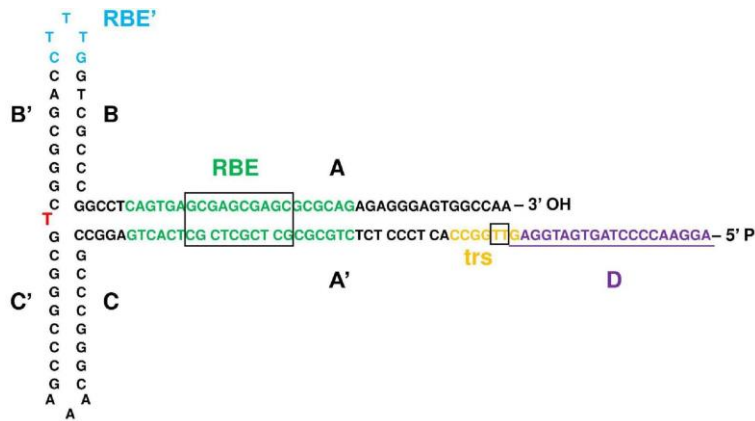
Adenoassotsieeritud viirused on üheaahelalised DNA-viirused, mille genoom on ligikaudu 4700 aluspaari pikk (Pupo *et al.*, 2022). AAV genoom võib olla kas pluss- või miinusahelaline, kusjuures mõlemad DNA variante pakitakse kapsiididesse sama efektiivsusega. (Gonçalves, 2005) Plussahelaline DNA on mRNA-ga samasuunaline, miinusahelaline DNA aga komplementaarne vajaliku mRNA-ga. (Oxford Reference)



Joonis 1. AAV genoomi skeem (Chen, 2015)

Viiruse genoom koosneb kolmest avatud lugemisraamist, mis kodeerivad kaheksat kolmelt promootorilt ekspresseeritud valku (joonis 1). Rep lugemisraam kodeerib nelja replikatsioonis osalevat 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. Alternatiivne splaissimine seisneb ühest ja samast pre-mRNA-st erinevate järjestuste väljalõikamises, nii et moodustunud küpsed mRNA-d on erinevad. Sel viisil moodustunud VP1, VP2 ja VP3 ühine osa on vajalik viiruse ikosaeedrilise kapsiidi moodustamiseks. VP1 toimib ka ensüüm fosfolipaasina (fosfolipaas A2) ning VP1 ja VP2 ühisosas sisalduvad peremeesraku tuuma liikumiseks vajalikud järjestused. AAP hõlbustab peamise kapsiidi valguga VP3 rakutuuma sisenemist ning soodustab kapsiidi kokkupanemist ja valmimist, kuid küpses kapsiidis AAP-d ei esine. (Samulski, Muzyczka 2014; Wörner *et al.*, 2021)

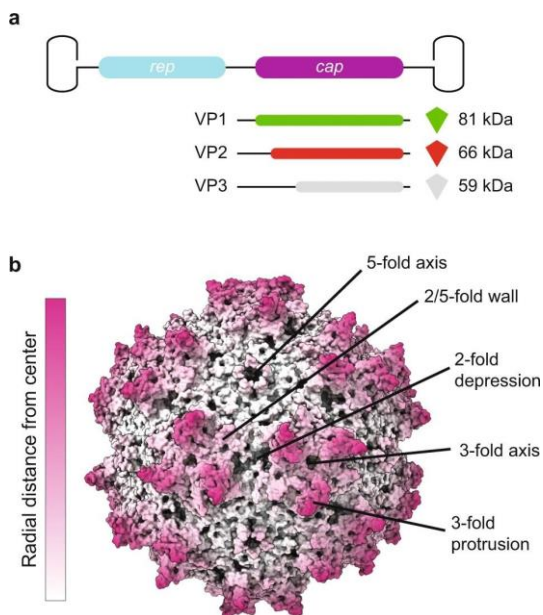


Joonis 2. AAV otsmine pöördkordusjärjestus (Shitik *et al.*, 2023)

AAV genoomi otstes asuvad 145 nukleotiidi pikkused otsmised pöördkordusjärjestused ehk ITR-d (ingl *inverted terminal repeats*, joonis 2). ITR-dest algab AAV DNA replikatsioon, samuti on neil ka esmane DNA pakkesignaali funktsioon. Lisaks on ITR-d vajalikud AAV pärilikkusaine integreerumiseks peremeesraku genoomi (Shitik *et al.*, 2023). ITR-d 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-valkude juuresolekul transkriptsiooni, on Rep-valkude puudumisel minimaalne geeniekspressiooni reguleeriv roll. Seega peavad AAV vektorisse sisestatud transgeenid olema konstrueeritud sobivate geeniekspressiooni võimendavate transkriptsioonifaktorite, seostumissaitide, promootori, polü(A) ja splaissimissignaallidega, et tagada õige geeniekspressioon. (Samulski, Muzyczka, 2014)

1.2.2. Viiruse kapsiid

Adenoassotsieeritud viirusel on väike, kõigest 25 nm diameetriga ikosaeedriline kapsiid (joonis 3), mis koosneb 60 molekulist. (Samulski, Muzyczka, 2014). Võrdluseks võib öelda, et tavaliselt on viiruste läbimõõt ~100 nm. Ikosaeedrilisel kapsiidil on 20 kolmnurkset külge, AAV puhul koosneb iga kolmnurk kolmest alaosast. (Louten, 2016) Selline kapsiidi ehitus muudab viirusosakese väga stabiilseks: see suudab taluda nii lühiajalist kuumust, happelist keskkonda kui ka kokkupuudet valku lagundavate ensüümide ehk proteaasidega. Ikosaeedrilise AAV-osakese viiekiirelise sümmeetriatleje tipus on 8,5 Å läbimõõduga poor, mis peetakse viiruse DNA sisenemise kohaks. (Samulski, Muzyczka, 2014)



Joonis 3. AAV kapsiidi ehitus (Wörner *et al.*, 2021)

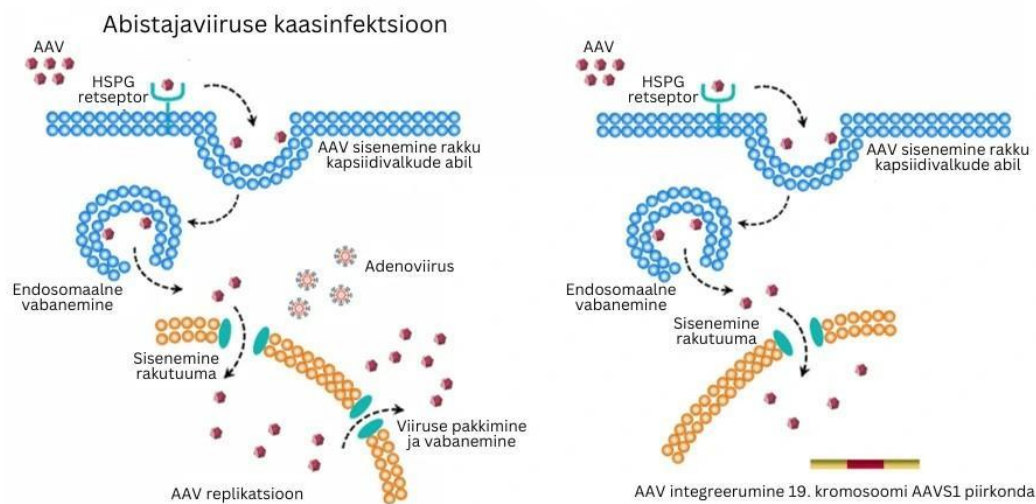
Viiruse kapsiid koosneb kolmest erinevast viirusvalgust (VP), mis erinevad vaid oma N-otsade poolest. Kapsiid koosneb viirusvalkudest VP1, VP2 ja VP3 hinnanguliselt proportsioonis 1 : 1 : 10. Kapsiidi moodustamiseks ei ole VP1 ja VP2 ilmtüüpimata vaja, vaid terapeutilise geeni kohaleviimiseks vajaliku vektori moodustamiseks piisab ka ainuüksi VP3st. Siiski tõstab VP1 ja VP2 olemasolu kapsiidi koostises toodetud viirusvektorite hulka ja nende nakatamisvõimet. Seda seetõttu, et VP1-l ja VP2-l on oluline roll viiruse rakku sisenemisel endotsütoosi teel, viriooni vabanemisel endosomaalsest 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 ehk põhiretseptoriga, milleks on proteoglükaanides leiduvad suhkrud, nagu siaalhape, galaktoos või heparaansulfaat (Samulski, Muzyczka, 2014). Viiruse laia tropismi ehk võimet nakatada paljude eri kudede rakke selgitabki seandumine peaaegu kõikides rakkudes toodetavate proteoglükaanidega (Varki *et al.*, 1999). Rakku sisenemiseks peab viirus seostuma ka sekundaarse retseptoriga ehk koretseptoriga. Üks tähtsamaid selliseid retseptoreid on AAVR, mida on varasemalt tuntud ka KIAA0319L nime all ning mis on enamiku 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) Seondunud rakupinnal olevate retseptoritega, siseneb viirus endotsütoosi teel klatriiniga kaetud vesiikulis rakku (Samulski, Muzyczka, 2014). Klatriin on kuuest polüpeptiidahelast koosnev valk, mis vahendab vesiikuli eraldumist rakumembraanist ja endosoomi moodustumist (Royle, 2006).

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

Jõudnud peremeesraku tuuma, võib AAV elutsüklil jätkuda kas lüütiliselt või lüsogeenselt. Lüütiline tsüklil tähendab peremeesraku lüüsi ehk surma, lüsogeenne tsüklil tähendab seda, et viirus jääb rakku inaktiivses olekus (joonis 4).



Joonis 4. AAV lüütiline ja lüsogeene tsüklil (Genemedi)

Elutsüklil jätkub lüütiliselt, kui rakus leidub abistajana toimiv teine viirus (nn abistajaviirus), milleks on kas adenoviirus või herpesviirus. Abistajaviiruse puudumisel lülitub viirus lüsogeensesse tsükklisse ja sel juhul on viiruse geeniekspressioon takistatud. Peiteajal sisestub ehk integreerub viiruse genoom eelistatult inimese 19. kromosoomi pikema õla ligikaudu 4 kb pikkusesse piirkonda AAVS1 (*Adeno-associated virus integration site 1*) ning kandub nii rakujagunemisel tütarakkudesse edasi. AAVS1 asub geeni *MBS85* 5' otsapoolses osas ning see paikneb lihasspetsiifiliste geenide *TNNT1* ja *TNNI3* 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 DNAsse sisestumises 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 tsükliksse, mille käigus pääseb peremeesraku kromosoomi integreerunud viiruse DNA sealt välja ning sellelt aktiveeritakse AAV geeniekspressioon. Seejärel viiruse genoom replitseerub ehk kordistub, hakatakse tootma kapsiidivalke, mis pakitakse terviklikuks viriooniks ehk viirusosakeseks. Rakust väljumiseks lüüsib abistajaviirus peremeesraku, mille tulemusel vabanevad ka valminud AAV virioonid. Adenoviiruse geenide hulka, mis on abiks AAV geeniekspressioonil, kuuluvad *E1a*, *E1b*, *E2a*, *E4* ja *VA RNA* (viirusega seotud RNA geen). Herpesviirus aitab AAV geeni ekspressioonile kaasa oma DNA polümeraasi ja helikaasiga. AAV võib ka ilma abistajaviirusega oma elutsükli lüütilisse faasi siseneda, kuigi sel juhul on efektiivsus madalam. Abistajaviirusega suudab AAV DNA peremeesraku kromosoomist väljuda üksnes siis, kui peremeesrakku mõjutavad raku ainevahetust aeglustavad ained või genotoksilised ühendid. (Daya, Berns, 2008)

1.2.4. Viiruse serotüübid

Viiruse serotüübid erinevad üksteisest 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. Tegelikuses leidub aga looduses sadu erinevaid AAV kapsiidi variante. Sõltuvalt kapsiidivalkudest on AAV serotüüpidel erinevate kudede osas erinev tropism ehk võime nakatada eelistatult teatud koe rakke. (Pupo *et al.*, 2022) Järgnevalt kirjeldatud AAV-de kapsiidivalkude aminohappelised järjestused ning nende erinevused on toodud lisas 6.

AAV1 serotüübi täpne päritolu pole teada, aga ilmselt pärineb see primaatidelt. AAV1 põhiretseptoriks on N-atsetüülitud siaalhape ning koretseptoriteks AAVR, GPR108, TM9SF2. Nende retseptorite tõttu seondub AAV1 koospetsiifiliselt vööt-, sile- ja südamelihaskoe, kesknärvisüsteemi, kopsu, silma võrkkesta, kõhunäärme ja maksa rakkudega. AAV1 on võrreldes teiste AAV looduslike serotüüpidega vöötlihaskoe nakatamiseks kõige efektiivsem. (*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 seropositiivsed ehk selle viirusega nakatunud. Selle peamiseks retseptoriks on heparaansulfaat-proteoglükaan (HSPG). Koretseptoriteks on AAVR, GPR108, TM9SF2, LamR, $\alpha V\beta 5$ integriin, $\alpha 5\beta 1$ integriin, FGFR1, CD9 ja HGFR. AAV2-l on tugevam tropism vöötlihaskoe, kesknärvisüsteemi, maksa, neeru, võrkkesta, kopsu ja kõhre rakkude suhtes. (Pupo *et al.*, 2022; Issa *et al.*, 2023)

AAV3 pärineb samuti inimpopulatsioonist. Sarnaselt AAV2-le on selle peamine retseptor HSPG. Koretseptoriteks on AAV3 puhul AAVR, GPR108, LamR, FGFR1 c-MET ja HGFR.

Kuna esialgsetes uuringutes oli AAV3 nakatamisvõime madal, jäeti see alguses geeniteraapiaks sobilike viirusvektorite kandidaatide hulgast välja. Hiljem avastati aga, et AAV3-l on tugev tropism inimese maksakasvaja rakkude suhtes. Lisaks nakatab AAV3 võotlihaskoe, kesknärvisüsteemi ja sisekõrvas paiknevaid kuulmerakke. (Pupo *et al.*, 2022; Issa *et al.*, 2023)

AAV4 kapsiidivalkude järjestused erinevad teiste AAV-de kapsiidivalkude järjestustest keskmiselt suuremal määral, sarnanedes AAV2-le kõigest 58% ulatuses. AAV4 pärineb primaatidelt, arvatavasti Aafrika rohepärdikutelt. AAV4 kapsiidi pinna struktuur sarnaneb üllataval kombel naaritsate aleuudi haiguse viiruse (ADV) ja inimese parvoviiruse B19-ga, mis kuuluvad AAV-ga samasse perekonda. AAV4 põhiretseptoriks on O-atsetüülitud siaalhape ning koretseptoriks GPR108. AAV4-l on tugevam tropism kesknärvisüsteemi, silma võrkkesta, kopsu, neeru ja südamelihaskoe rakkude suhtes. (Padron *et al.*, 2005; Pupo *et al.*, 2022; Issa *et al.*, 2023)

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

AAV6 on homoloogiliselt väga sarnane AAV serotüüpidega 1 ja 2, olles nendega eri piirkondades peaaegu identne. Seetõttu arvatakse, et AAV6 on tekkinud nende kahe viiruse serotüübi homoloogilise rekombinatsiooni käigus (Xiao *et al.*, 1999). See AAV serotüüp on pärit inimeselt ning selle peamised retseptorid on HSPG ja N-atsetüülitud siaalhape. Teisesteks retseptoriteks on AAV6-l AAVR, GPR108, TM9SF2 ja EGFR. AAV6-l on kõrgem tropism võotlihaskoe, südamelihaskoe, maksa, kesknärvisüsteemi, silma võrkkesta, kopsu ja teiste hingamiselundkonna rakkude suhtes. (Pupo *et al.*, 2022; Issa *et al.*, 2023)

AAV7 avastati reesusmakaakidelt. Selle serotüübi rakule kinnitumise ja rakku sisenemise viis pole täpselt teada, küll aga teatakse, et AAV7 ei kasuta rakule kinnitumiseks HSPG-d (Mietzsch *et al.*, 2014). Koretseptoriteks on AAV7-l GPR108 ja TM9SF2. AAV7 nakatab eeskätt võotlihaskoe, kesknärvisüsteemi, silma võrkkesta ja maksa rakke. (Pupo *et al.*, 2022; Issa *et al.*, 2023)

AAV8 leiti samuti reesusmakaakidelt ning nagu AAV7-l, ei ole ka selle serotüübi põhiretseptor teada. AAV8 koretseptoriteks on AAVR, GPR108, TM9SF2 ja LamR.

AAV8 nakatab maksa, vöotlihaskoe, kesknärvisüsteemi, vörkkesta, kõhunäärme, südamelihaskoe, neerude ja rasvkoe rakke. AAV8-le 91% ulatuses sarnanev reesusmakaakidelt pärinev AAVrh.8 suudab erinevalt teistest eelpool mainitud AAV serotüüpidest ületada vere-aju barjääri (Halder *et al.*, 2015). AAVrh.8 leitud koretseptoriks on GPR108 ning sellel on kõrgem tropism 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 närvirakkudele suudab AAV9 ajus nakatada närvirakkude tööks hädavajalikke astrotsüüte (Song *et al.*, 2022). AAV9 põhiretseptoriks on N-atsetüülglakoktosiin. Koretseptoriteks on AAV9 puhul AAVR, GPR108, TM9SF2 ja LamR. See serotüüp nakatab eelistatult maksa, kopsu, kõhunäärme, kesknärvisüsteemi, vörkkesta, 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 vajalikud retseptorid on teadmata. AAV10 seondub eelistatult südamelihaskoe, kopsu, maksa, neeru ja emaka rakkudega. AAVrh.10 pärineb reesusmakaakidelt ning suudab sarnaselt AAV9-le ületada vere-aju barjääri ja nakatada astrotsüüte (Song *et al.*, 2022). Selle serotüübi koretseptoriteks on GPR108 ja LamR. AAVrh.10 nakatab eeskätt maksa, neeru, kopsu, kõhunäärme, kesknärvisüsteemi, vörkkesta, vööt- ja südamelihaskoe 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 südamelihaskoe rakke. AAV12 ja AAV13 pärinevad mõlemad primaatidelt ning nende rakku sisenemise mehhanismid on teadmata. AAV12-l on kõrgem tropism 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 see juba inimkudedest (Wang, Tai *et al.*, 2019). Nüüdseks on rekombinantse AAV kasutamine 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 protokoll (World Health Organisation). 2025. aasta augusti seisuga on Euroopa Liidus müügiluba kuus AAV põhist geeniravi: Luxturna, Zolgensma, Upstaza, Roctavian, Hemgenix ja Beqvez.

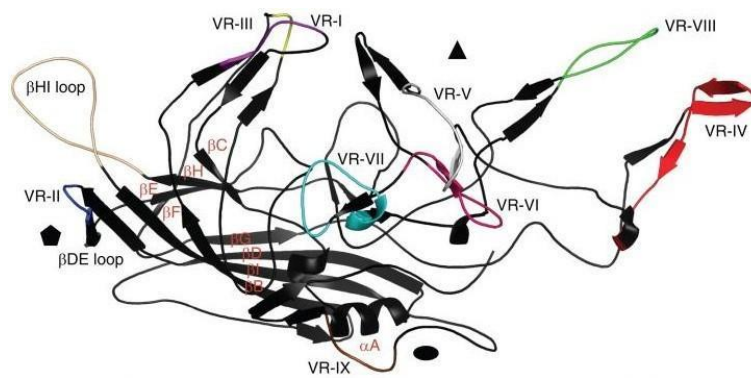
Need ravivad vastavalt RPE65 puudulikkusest põhjustatud retinaalset düstroofiat ja spinaalset lihasatroofiat, aromaatses L-aminohappe dekarboksülaasi (AADC) puudulikkust ning A- ja B-hemofiiliat (Ravimiamet).

AAV senisel edul geeniteraapias on mitu põhjust. Üheks on AAV võrdlemisi madal immunogeensus ehk immuunvastuse esilekutsumise tõenäosus (Pupo *et al.*, 2022). Samuti ei põhjusta AAV-d inimestes teadaolevalt mitte ühtegi haigust, mis muudab nendega töötamise tunduvalt ohutumaks. Bioohutust tõstab veelgi viiruse enda geneetilise materjali eemaldamine viirusvektorist. (Wang, Tai *et al.*, 2019) AAV laialdase kasutamise põhjuseks on ka viiruse lai tropism, mis võimaldab AAV vektoritega nakatada 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, kuid 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 esmased uuringud n-ö metsiktüüpi AAV-dega ehk looduslike AAV serotüüpidega on andnud edukaid tulemusi, on kliinilistes katsetes ehk inimuuringutes selgunud, et metsiktüüpi AAV serotüübid ei ole geeniteraapia ravimitena tihti efektiivsed, sest sageli on täiskasvanud patsientidel nende serotüüpide vastu juba väljakujunenud immuunsus. Näiteks hiljuti USA ravimiameti FDA müügiloa saanud geeniteraapia ravim Elevidys Duchenne'i lihasdüstroofia raviks põhineb reesusmakaagi AAV serotüübil rh74, kuid isegi selle haruldase serotüübi puhul peetakse vajalikuks teha suunatud mutatsioone, mis olemasolevat immuunsust väldiks. (Shoti *et al.*, 2023) Seetõttu pööratakse viimasel ajal rohkem tähelepanu rekombinantsete AAV viirusvektorite arendamisele. Loodusliku AAV serotüübi tropismi muutmiseks või selle võimendamiseks saab luua kombineeritud ehk kimäärseid AAV-sid, mille kapsiid koosneb mitme erineva serotüübi valgufragmentidest. Neid on võimalik luua, sisestades peptiide (lühikesi valgujärjestusi) või isegi terveid valke kodeerivaid DNA-järjestusi kapsiidi geeni kindlatesse piirkondadesse (Pupo *et al.*, 2022).

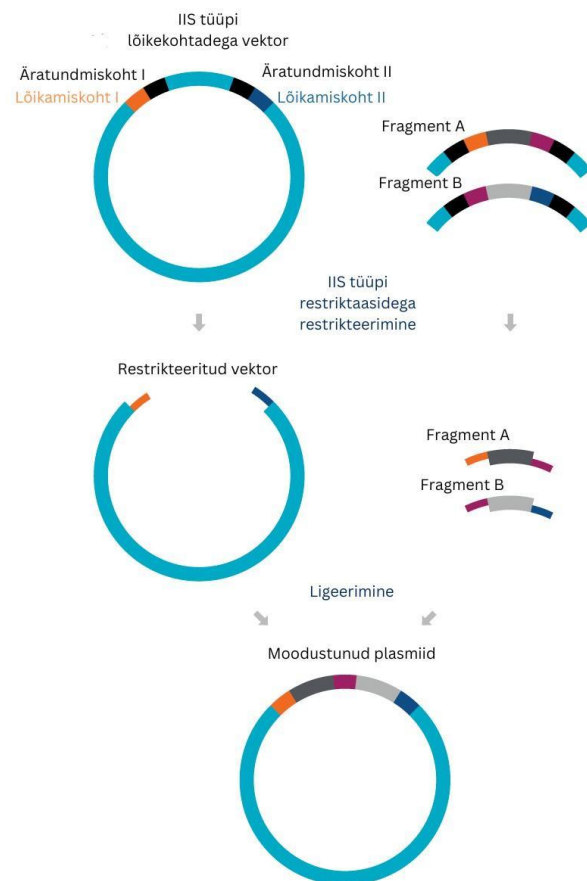


Joonis 5. VP3 monomeer üheksa muutuva piirkonnaga (VR) (Drouin, Agbandje-McKenna, 2013)

AAV kapsiidi pinnavalgus VP3 leiduvates β -ahelate ühenduskohtades ehk pinnasilmustes esinevad struktuurselt varieeruvad piirkonnad (VR-id) (joonis 5). Need pinnasilmused kleepuvad kokku, tekitades kapsiidi pinnastruktuuris variatsioone. Eeldatakse, et erinevustest VR-ide kokkuhaakumises sõltub rakuline tropism ja kudede nakatamise efektiivsus. (DiMattia *et al.*, 2012) AAV kapsiidi pinnal saab eristada üheksat muutuvat piirkonda (Drouin, AgbandjeMcKenna 2013). VR-IV, VR-V ja VR-VIII moodustavad eendite ülaosas silmuseid, samas kui VR-VI ja VR-VII asuvad eendite alaosas. Kuna need varieeruvad piirkonnad pole kapsiidi struktuuri moodustamiseks vajalikud, kuid on seda retseptoriga seostumisel, on VR-d ideaalsed kapsiidide modifitseerimiseks ja neisse peptiidide sisestamiseks. (Büning, Srivastava 2019)

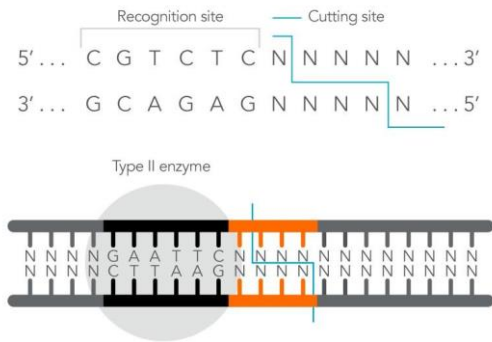
1.3. Golden Gate kloneerimine

Molekulaarne kloneerimine on protsess, mille käigus kombineeritakse mitu DNA fragmenti üheks plasmiidiks, mida saab seejärel bakterites paljundada (tavaliselt soolekepikeses ehk *Escherichia coli*'s). Tavaliselt tuleb selleks esmalt olemasolevaid DNA lõike restrikteerida ehk lõigata neist välja vajaminevad DNA-fragmendid. Seejärel eraldatakse saadud DNA-fragmendid üksteisest geelelektroforeesi teel, millele järgneb nende geelist väljapuhastamine. Viimane etapp on saadud fragmentide kokku liimimine ehk ligeerimine. Selline viis rekombinantse DNA saamiseks on aga töö- ja ajamahukas protsess, mis hõlmab endas mitmeid etappe, mis võivad ebaõnnestuda. (Sorida, Bonasio, 2023)



Joonis 6. Golden Gate kloneerimine (Bode, 2023)

Mõnevõrra lihtsam molekulaarse kloneerimise meetod on nn Golden Gate kloneerimine. Golden Gate kloneerimise meetod erineb tavapärasest DNA rekombineerimisest selle poolest, et see võimaldab korraga ühes reaktsioonisegus DNAd nii restrikteerida kui ka ligeerida, 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 restriktasid e DNAd lõikavate ensüümide äratundmisjärjestust. Golden Gate kloneerimisel kasutatakse ainult teatud tüüpi (IIS) restriktase (*BbsI*, *BsaI*, *Esp3I* ja *SapI*), mis tekitavad nelja nukleotiidi suurusi 5' üleulatuvaid otsi, mis võivad olla ükskõik, millise järjestusega. See võimaldabki Golden Gate meetodikat rakendada paljude DNA fragmentide sisestamiseks ühte vektorisse kindlas järjekorras, kuna teoreetiliselt on võimalik disainida 256 erinevat üleulatuvat 5' otsa. (Weber *et al.*, 2011)



Joonis 7. Restrikteerimine IIS tüüpi restriктаasiga (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' üleulatuva otsi (joonis 7) (Pingoud, Jeltsch, 2001). Kuna restriктаasi äratundmis- ja lõikamiskoht ei ole samad, siis võib üleulatuva otsa nukleotiidijärjestus olla ükskõik milline. Seega saab vastavalt vajadusele luua kindlate järjestustega fragmentide otsad (Bode, 2023). Seejärel ligeeritakse erinevate DNA fragmentide üleulatuva otsad omavahel T4 DNA ligaasi abil kokku. Seda võimaldavad sama restriктаasi kasutamisel tekkinud ühepikkused üleulatuva otsad ning plasmiidide konstrueerimine selliselt, et vajaminevad DNA fragmendid ei sisaldaks ühtegi IIS restriктаasi äratundmiskohta. Lõpptulemusena moodustub ainult korrektne DNA plasmiid ja n-ö üle jäänud DNA lõigud kogunevad puhverlahusesse. (Sorida, Bonasio 2023; Bird *et al.*, 2022)

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärk

Töö eesmärgid on:

- 1) luua sobilik platvorm AAV kapsiidide modifitseerimiseks Golden Gate kloneerimismeetodil;
- 2) eeldatavalt kopsukoe ja vähkkasvaja spetsiifiliste peptiidide sisestamine AAV2 ja AAV8 kapsiididesse;
- 3) uute kapsiidivariantidega viiruste tootmine ja testimine.

2.2. Materjalid ja metoodika

2.2.1. Töös kasutatud plasmiidid

Töös on kasutatud olemasolevaid AAV vektorite valke kodeerivaid plasmide: *pHelper*, *pRC2* (Takara Bio), *pAAV2/8* (Addgene, plasmiid 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 ehk sisestati kompetentsetesse bakterirakkudesse (*Escherichia coli* tüvi DH5 α) kuumašoki meetodil ning kasvanud kolooniatest eraldati aluselise lüüsi meetodil FavorGen FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kiti ja tootja protokollil abil plasmiidne DNA. Eraldatud DNA-d lõigati 1–2 μ g *EcoRI* ja *HindIII* restriктаasidega ning tekkinud fragmendid lahutati üksteisest elektroforeesiga 1,5% TAE-agarosgeelil. Õiged DNA fragmendid lõigati geelist välja ning puhastati geelist 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.

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 AKRGARSTA (Simón-Gracia *et al.*, 2018). LuS7A järjestus on APWHLSAQYSRT (McCandless *et al.*, 2021). LuVG järjestus on KDNTPGR (Goertsen *et al.*, 2022). Peptiidide uEdbTncC ja $\alpha\beta 3$ -Int-NRP1 järjestused on vastavalt PPRRGLIALKTSSAGGSVA ja RGDSGSGATWLPPR, mis pärinevad Tambet Teesalu patendist EP3921329A1. Lisaks kasutati ettevõttes IVEX Lab OÜ disainitud peptiidi IVEX1, mille järjestus on hetkel kaetud ärisaladusega.

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'.

Viiruse tiitri qPCR meetodil määramiseks vajalikud praimerid:

CMVpr-qR: 5'-GCC AGT AAG CAG TGG GTT CTC-3';

CMVpr-qF: 5'-TCG TAA CAA CTC CGC CCC AT-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

10 µl kogumahu ligeerimisegu valmistamiseks segati kokku ~5 µl vajaminevat DNA-d, 0,6 µl T4 DNA ligaasi, 1 µl 10 X T4 DNA ligaasi puhvrit ning lahjendati destilleeritud veega 10 µl-ni. Seejärel jäeti ligeerimisegu tavaliselt üle öö toatemperatuurile ligeerima.

Transformeerimiseks segati ~10 µl ligeerimisegu kokku ~70 µl –80 °C hoiustatud bakterirakkudega (*Escherichia coli* tüvi DH5α). Segu inkubeeriti jääl 45 minutit, millele järgnes kuumašokk – 1 minut 42 °C juures. Peale kuumašokki pandi transformatsioonisegu paariks minutiks tagasi jääle. Kui bakterisse viidi ampitsilliiniresistentsusega plasmiid, külvati segu seejärel otse Petri tassil olevasse LB-tardsöötmesse, mis sisaldas 100 µg/ml ampitsilliini. Kanamütsiiniresistentsusega plasmidi puhul lisati transformatsioonisegule 800 µl LB-vedelsöödet ning inkubeeriti saadud segu 45 minutit 37 °C juures ja loksutades 180 pööret minutis (rpm). Bakteriloksutist võetud segust kanti 100 µl Petri tassil olevasse LB-tardsöötmele, mis sisaldas 50 µg/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 eraldamiseks külvati Petri tassidel kasvanud bakterikolooniad katseklaasi, mis sisaldas 4 ml LB-vedelsöödet ja vastavalt konkreetsetes plasmiidis olevale antibiootikumiresistentsusgeenile kas 100 µg/ml ampitsilliini või 50 µg/ml kanamütsiini. Inokuleeritud katseklaase ehk katseklaase, kuhu oli viidud bakterid, inkubeeriti üle öö 37 °C juures loksutil kiirusega 180 rpm.

Bakteritest plasmiidse DNA eraldamiseks aluselise lüüsi meetodil kasutati FavorGen FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kiti ja tootja protokoll. 2 ml eppendorfi valati katseklaasist bakterisegu ning tsentrifuugiti 30 s 11000 g juures, bakterirakud kogunesid katsetuubi põhja ning ülejäänud bakterisööde kallati ära, protsessi korrati veel ühe korra. Seejärel lisati bakteritele 240 µl FAPD1 puhvrit ning suspendeeriti need selles täielikult. Lüüsimiseks lisati katsetuubidesse 240 µl FAPD2 puhvrit, loksutati neid ~10 korda ning inkubeeriti toatemperatuuril ~4 minutit. Neutraliseerimiseks lisati lahustele 360 µl FAPD3 puhvrit, loksutati neid ~10 korda ning tsentrifuugiti 5 minutit 16100 g juures. DNAd sisaldav lüsaat kanti katsetuubi paigutatud kolonni ning tsentrifuugiti 30 s 11000 g juures. Läbivoolanud vedelikust vabaneti ning kolonni lisati 400 µl WP puhvrit, tsentrifuugiti 30 s 11000 g juures, läbivoolanud puhvrist vabaneti ning kolonni lisati 700 µl Wash puhvrit, mida tsentrifuugiti samuti 30 s 11000 g juures ning millest seejärel vabaneti. Kolonnid tsentrifuugiti 3 minuti jooksul 16100 g juures kuivaks ning asetati uutesse kogumistuubidesse (katsetuubidesse). Elueerimiseks ehk kolonni membraansesse filtrisse jäänud plasmiidse DNA vabastamiseks lisati kolonni

membraanile 100 µl elueerimispuhvrit ning lasti ~3 minutit seista, misjärel tsentrifuugiti tuube minut aega 16100 g juures. Läbivalgunud vedelik sisaldaski plasmiidset DNA-d ning see säilitati katsetuubides –20 °C juures.

2.2.5. DNA restriksioon, geelelektroforees ja fragmentide puhastamine

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

Geelelektroforeesiks segati 150 ng DNAd 8 µl ühekordse broomfenoosinise 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 DNA suurusmarkerid. Fragmendid eraldati üksteisest 120 V pinge juures.

Geelelektroforeesil eraldunud sobivad fragmendid lõigati UV-lambi all geelist välja ning puhastati FavorGen FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kiti ja tootja protokollil abil. Geelitükid asetati katsetuubi, millele lisati 500 µl FADF puhvrit. Segu segati, misjärel inkubeeriti seda aeg-ajalt segades 10 minutit 55 °C juures. Segul lasti maha jahtuda ning kanti seejärel katsetuubi asetatud olevasse kolonni ning tsentrifuugiti 30 s 11000 g juures, läbivoolanud puhvrist vabaneti, kolonni lisati 750 µl Wash puhvrit, mida tsentrifuugiti samuti 30 s 11000 g juures ning millest seejärel vabaneti. Kolonnid tsentrifuugiti 3 minutit 16100 g juures kuivaks ning asetati uutesse katsetuubidesse. Kolonni membraanile lisati 100 µl elueerimispuhvrit ning lasti ~3 minutit seista, misjärel tsentrifuugiti tuube minut aega 16100 g juures. Saadud plasmiidset DNAd hoiustati –20 °C juures.

2.2.6. Golden Gate kloneerimine

Uute kapsiidivalkude DNA valmistamiseks Golden Gate kloneerimise meetodil segati PCR tuubis kokku 20 µl reaktsioonisegu, mis sisaldas vektorit, vastava kapsiidivalgu muutuva piirkonna paremat ja vasakut õlga ning sinna sisestatava peptiidi järjestust määravat DNAd.

Vajaminevad DNA kogused arvutati valemiga
$$\frac{20 \text{ (fmol)} \times \text{suurus (bp)}}{\text{kontsentratsioon} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) \times 1520}$$

Lisaks DNA fragmentidele sisaldas reaktsioonisegu veel 2 µl 10 x T4 DNA ligaasi puhvrit, 1 µl T4 DNA ligaasi, 1 µl IIs tüüpi *Bpi*I restriктаasi ning destilleeritud vett, et tuubis oleva segu kogumaht oleks kokku 20 µl. Üheaegne ligeerimine ja restrikteerimine viidi läbi PCR masinas 50-tsüklilise programmiga: 2 minutit 37 °C (restriksioon) ja 5 minutit

16 °C (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

AAV viirusvektorite tootmiseks kasutati rakuliini HEK293FT. Rakke kasvatati 10 cm läbimõõduga Petri tassidel Dulbecco muudetud Eagle'i söötmes, mis sisaldas 4,5 mg/ml L-glükoosi, L-glutamiini ja naatriumpüruvaati (DMEM 4,5 g Glucose, Corning). Söötmesse lisati veel ruumala järgi 10% veise loote seerumit (FBS, PAN Biotech), 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini sisaldavat lahust (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 0,53mM EDTA lahust, lastes sellel rakkudel mõjuda 1–2 minutit 37 °C juures. Seejärel lisati tassile 1 ml söödet ja kanti 1/8 kuni 1/4 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 AAV plasmiididega transientselt, mis tähendab, et rakkudesse viidud nukleiinhape jääb sinna piiratud ajaks ning ei pärandu tütarakkudesse. Selleks kasutati IVEX Lab OÜ-s väljatöötatud transfectsiooniprotokolli ja reagente. 8 tundi enne transfecteerimist külvati rakud hõredalt 10 cm läbimõõduga söötmetassile. 30 minutit enne transfectsiooni lisati rakkudele 4 ml 37 °C juures soojendatud söödet. Seejärel valmistati 1,5 ml eppendorfis transfectsioonisegu, mis sisaldas 3 µg genoomset AAV reporterplasmidi, 4 µg abi-plasmidi *pHelper*, 3 µg *pRepCap* plasmidi ja 1 ml eFFECT lahustit (IVEX Lab). Segu segati õrnalt ning seejärel fuugiti. Siis lisati segule 40 µl eFFECT transfectsioonireagenti (IVEX Lab), segati 10 sekundit, fuugiti õrnalt ning jäeti 15–20 minutiks toatemperatuurile. Seejärel ühtlustati transfectsioonisegu seda õrnalt pipetiga segades ning kanti tilkhaaval rakkudel olevasse söötmesse. Transfectsioonisegu ühtlase jaotumise tagamiseks loksutati Petri tasse õrnalt laua pinnal. Nakatatud rakud viidi tagasi 37 °C ja 5% CO₂ inkubaatorisse ning iga 12–24 tunni tagant vahetati nende söödet. Viirusosakestel lasti moodustuda ja rakkudesse akumuldeeruda neli ööpäeva.

Viirusosakesi sisaldavate rakkude kokku kogumiseks 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 lahus eemaldati. Rakkude kasvatamiseks kasutatud söötmetassi täielikuks puhastamiseks pesti seda 10 ml PBS-i lahusega ning vabanenud rakud koguti tuubi. Tuubi tsentrifuugiti taaskord 10 minutit 3000 g juures

ning rakkude peale kogunenud supernatant eemaldati. Siis suspendeeriti tuubi kogutud rakud 1 ml PBS-s ning säilitati -80°C juures.

Rakkudest viiruse väljapuhastamiseks inkubeeriti külmutatud rakke 37°C veevannis ligikaudu 5 minutit kuni rakud olid täielikult sulanud. Seejärel segati neid lahuse ühtlustamiseks 10–20 sekundit, misjärel külmutati rakud taaskord vedelas lämmastikus, milleks kulub ~5 minutit. Vesivannil soojendamist, segamist ja vedelas lämmastikus külmutamist korrati viis korda, et rakud katki läheks e lüüsuks ja viirusosakesed neist vabaneks. Siis tsentrifuugiti lüüsitud rakke 10 minutit 4500 g juures, et rakujäänused põhja koguda. Rakujäänuste peale kogunenud AAV vektoreid sisaldav lahus viidi uude tuubi ja säilitati -80°C juures.

2.2.9. AAV preparaate tiitri määramine qPCR meetodil

Rakkudes toodetud AAV viirusosakeste ehk vektorite hulk ehk tiiter määrati qPCR meetodil. Vektorite ettevalmistamiseks lisati $2,5\text{ }\mu\text{l}$ AAV vektorile $2,5\text{ }\mu\text{l}$ $10\times$ DNAas I puhvrit (Ambition), $19,5\text{ }\mu\text{l}$ destilleeritud vett ning $0,5\text{ }\mu\text{l}$ DNAas I ($0,5\text{ mg/ml}$, SigmaAldrich). Sel viisil saadud reaktsioonisegu kogumaht oli $25\text{ }\mu\text{l}$. Segu inkubeeriti 30 minutit 37°C juures, misjärel lisati sellele proteinaas K (20 mg/ml , SigmaAldrich) lõpp-kontsentratsiooniga $0,5\text{ mg/ml}$. Reaktsioonisegu inkubeeriti veel 15 minutit temperatuuril 55°C , seejärel inaktiveeriti see 10-minutilise kuumutamisega 98°C juures. Reaktsioonisegu analüüsiti qPCR meetodil seadmega LightCycler 480 (Roche LifeScience).

2.2.10. AAV nakatamisvõime mõõtmine koekultuurirakkudes

Viirusvektorite võimet rakke nakatada uuriti järgmistes rakuliinides: A431, HEK293, HepG2, Huh7, IHH ja PC3. Selleks külvati esmalt vastav rakuliin 96-kannulisele läbipaistmatule koekultuuriplaadile. Igasse kannu külvati 10000 rakku ning neid kasvatati $100\text{ }\mu\text{l}$ vastavale rakuliinile sobivas söötmes. HEK293 ja HepG2 rakuliine kasvatati Eagle'i minimaalsöötmes, mis sisaldas $1,5\text{ g/l}$ naatriumvesinikkarbonaati, asendatavaid aminohappeid, L-glutamiini ja naatriumpüruvaati (EMEM, Corning). A431 ja Huh7 rakuliine kasvatati Dulbecco muudetud Eagle'i söötmes, mis sisaldas $4,5\text{ mg/ml}$ L-glükoosi, L-glutamiini ja naatrium-püruvaati (DMEM $4,5\text{ g}$ Glucose, Corning). PC3 rakke kasvatati L-glutamiiniga Kaighn'i muudetud Ham's F-12 söötmes (F-12K, Corning). Kõik söötmed sisaldasid veel ruumala järgi 10% veise loote seerumit (FBS, PAN Biotech), 100 U/ml penitsilliini ja $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ streptomütsiini sisaldavat lahust (PEST, Corning). 24 tunni möödudes lisati valmistatud viirusvektorid rakkudele neljakordsete lahjendustena ja iga lahjendus kolmes korduses.

Tiitrimata viirust lisati kannudesse vastavalt $4\text{ }\mu\text{l}$, $1\text{ }\mu\text{l}$, $0,25\text{ }\mu\text{l}$, $0,0625\text{ }\mu\text{l}$, $0,0156\text{ }\mu\text{l}$ ja $0,0039\text{ }\mu\text{l}$ viirusvektori lahust $20\text{ }\mu\text{l}$ söötmes. 48 tundi pärast viirusvektorite rakkude

kasvukeskkonda kandmist lisati igasse kannu 120 µl värsket söödet. Viiruspreparaate, millel oli qPCR-ga tiiter määratud, lisati rakkude söötmesse samamoodi neljakordsete lahjendustena, arvestusega igasse kannu vastavalt 10^6 , $2,5 \times 10^5$, $6,25 \times 10^4$ ja $1,56 \times 10^4$ vg (viiruse genoomi) koopiat 100 µl söötmes.

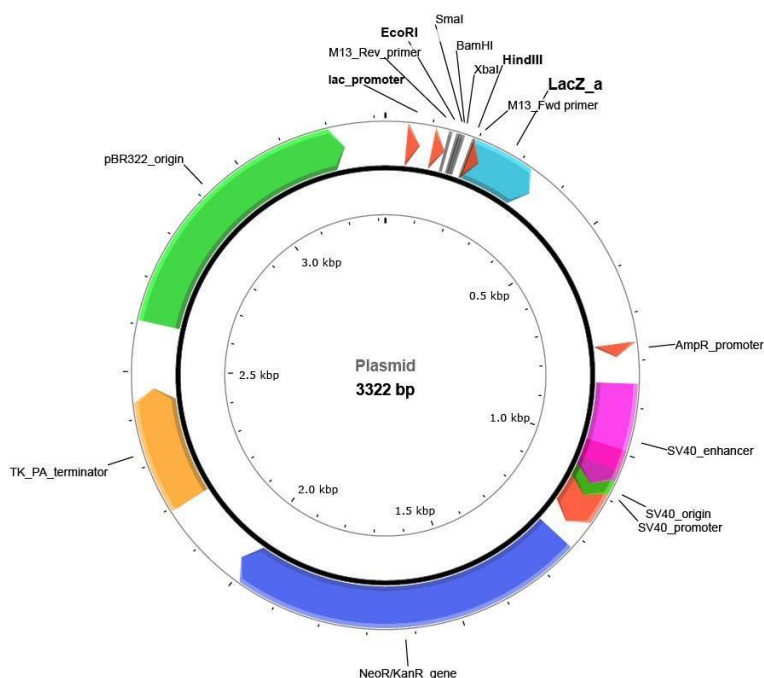
Lutsiferaasi aktiivsust mõõdeti vastavalt tootja protokollile (IVEX Lab). Viis ööpäeva pärast viirusvektore rakkudele lisamist eemaldati plaatidel kasvavatelt rakkudelt sööde ning lüüsi need algul 10–15 minuti jooksul lüüsipuhvris (50 µl kannu kohta), rakuplaati samal ajal 200 pööret minutis loksutades. 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 luminometriga (Tecan).

2.3. TULEMUSED

2.3.1. Kanamütsiini resistentsse sinivalget selektsiooni võimaldava Golden Gate vektori (*pGGA_Kan_LacZα*) konstrueerimine

Golden Gate (GG) meetodil kloneerimine on eriti efektiivne sel juhul, kui GG aktseptorplasmidi antibiootikumiresistentsust kodeeriv geen erineb doonorplasmiidide omast. Kuna käesolevas projektis on GG aktseptorid ehk kapsidivalkude geene sisaldavad plasmiidid ampitsilliin- 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 värvitus X-gal substraadist sinine pigment. Inserdi sisestamine plasmidi rikub enamasti α -peptiidi lugemisraami ning seetõttu jäävad kolooniad valgeks. (Ullmann *et al.*, 1967)

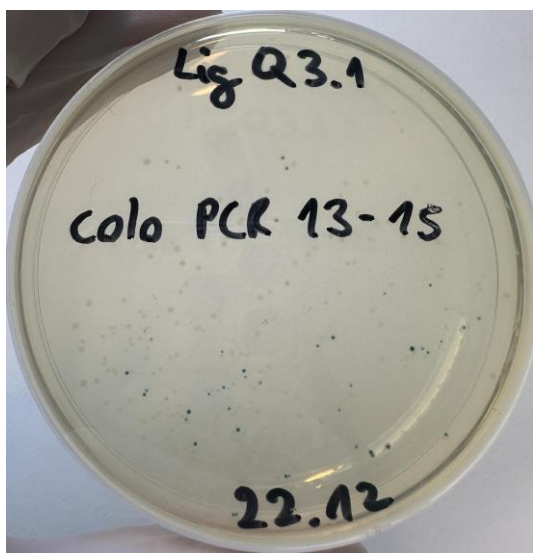
Kuna sellist plasmidi ei olnud projekti selles etapis saada, konstrueeriti see ise. Selleks kasutati kanamütsiini resistentsusgeeni kodeerivat plasmidi *pFA-CMV*, mida lõigati restriктаasidega *Vspl* ja *Adel*. *LacZα* järjestust sisaldavat plasmidi *pUC18* paljundati PCR reaktsioonis praimeritega *BR322oriF* ja *LacZα-3Ade* ning saadud produkti restrikteeriti samuti restriктаasidega *Vspl* ja *Adel*-ga. 450 nukleotiidi pikkune fragment ligeeriti ettevalmistatud vektorisse ja transformeeriti *Escherichia coli* tüvve DH5α. Positiivsed kolooniad värvusid siniseks, neist eraldati plasmiidne DNA. Eraldatud plasmiidse DNA nukleotiidset järjestust kontrolliti sekveneerimisega ja tulemus osutus soovituks. Nii saadi sinivalget selektsiooni võimaldav kanamütsiiniresistentsust kodeeriv plasmiid, mis sisaldas ka sobivaid *EcoRI* ja *HindIII* restriksioonisaite (edaspidi nimetatud kui *pGGA_Kan_LacZα*) (joonis 8).



Joonis 8. *pGGA_Kan_LacZa* (siin ja edaspidi põhinevad joonised autori andmetel)

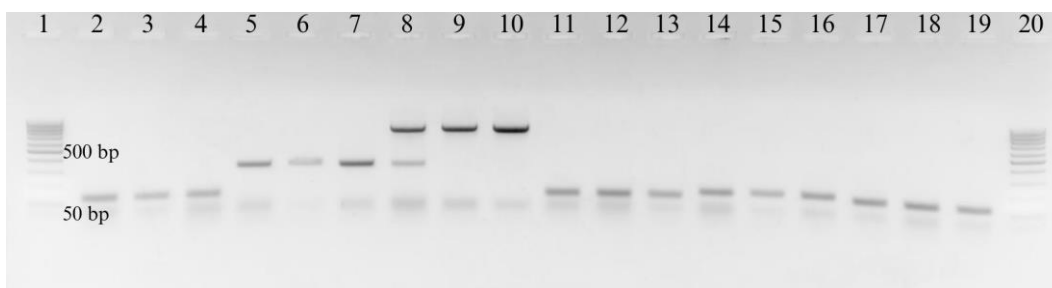
2.3.2. Fragmentide kloneerimine *pGGA_Kan_LacZa* vektorisse

Süntetiliselt DNA plasmiidid Q1–Q8 transformeeriti kompetentsetesse bakterirakkudesse (*Escherichia coli* tüvi DH5 α) ning kasvanud kolooniatest eraldati plasmiidne DNA. Plasmide lõigati 1–2 μ l restriktasidga *Eco*RI ja *Hind*III ning tekkinud fragmendid lahutati üksteisest 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. Plasmidi *pGGA_Kan_LacZa* lõigati samuti restriktasidga *Eco*RI ja *Hind*III, tekkinud fragmendid lahutati geelelektroforeesil ning vektori 3,3 kb suurune DNA fragment puhastati. Vektori DNA-ga ligeeriti eraldi reaktsioonides kõik inserdid, saadud ligeerimissegud transformeeriti *E. coli* tüve DH5 α . Negatiivseks kontrolliks kasutati samuti *Eco*RI–*Hind*III restriktasiga lõigatud *pGGA_Kan_LacZa* plasmidi, mis ligeeriti ning transformeeriti ilma peptiidi kodeeriva DNA fragmendita.



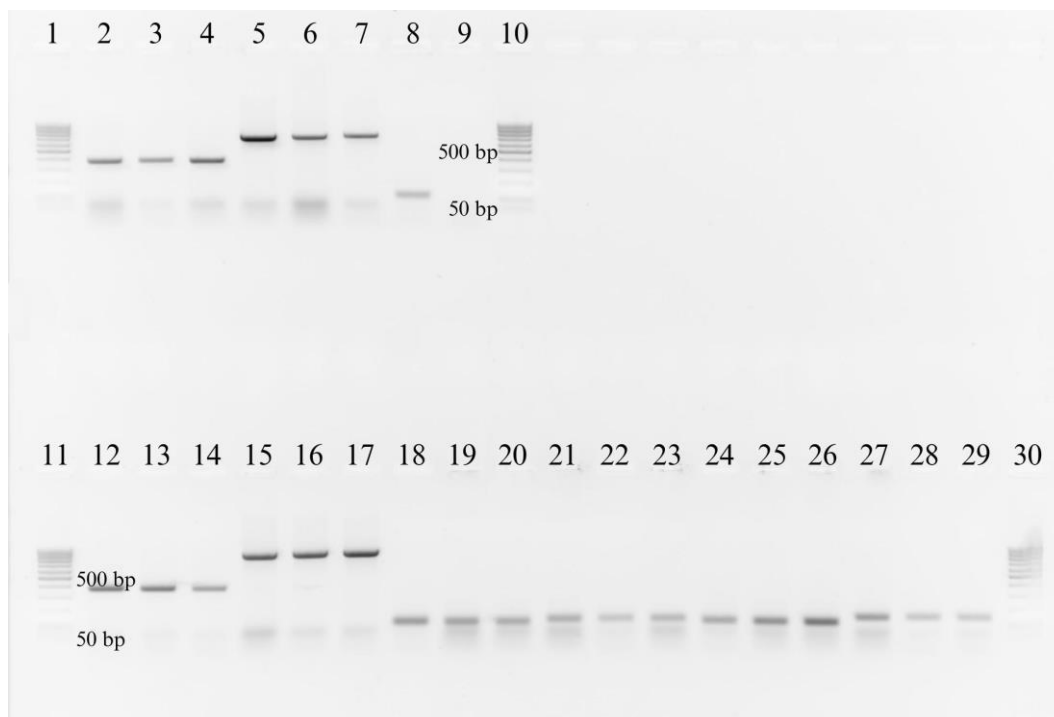
Joonis 9. Sinised ja valged bakterikolooniad Petri tassil

Tassidel, kus kasvasid inserdiga plasmidi sisaldavad bakterid, kasvas üles rohkem kui sada bakterikolooniat, negatiivsel kontrollil aga ainult paar. Üleskasvanud kolooniatest olid osa valged ja osa sinised (joonis 9). Huvitav on märkida, et paljud õnnestunud ligeerimised andsid tulemuseks sinised kolooniad. Igalt tassilt analüüsiti PCR-ga kolm bakterikolooniat. PCR-i saadudprodukte analüüsiti geelelektroforeesiga, mille abil kontrolliti inserdi suurust (joonised 10 ja 11). Sobivatest bakterikolooniatest eraldati plasmidne DNA, mis seejärel sekveneeriti. Sekveneerimisel saadud DNA nukleotiidne järjestus osutus kõikide uuritud plasmiidide puhul ootuspäraseks, seega oldi saadud kõikide fragmentide jaoks *Bpi*I restriksioonisaitega varustatud plasmiidse DNA konstruktid.



Joonis 10. Bakterikolooniast tehtud PCR-i produktide analüüs geelelektroforeesil

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 $\alpha\beta$ 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 PCRprodukte analüüsiti radadel 2, 5, 10, 11, 14 ja 17.



Joonis 11. Bakterikolooniast tehtud PCR-i produktide analüüs geelelektroforeesil

Joonisel 11 on radadel 1, 10, 11 ja 30 50 aluspaari pikkune DNA-marker (GeneON). Rajal 8 on positiivseks kontrolliks 50 aluspaari 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 analüüsiiti radadel 2, 5, 12, 15, 18, 21, 24 ja 27.

2.3.3. Golden Gate kloneerimine

Edasi kloneeriti lühendatud AAV2 ja AAV8 kapsiidivalke kodeerivatesse plasmiididesse eeldatavalt kopsukoe ja vähkkasvaja spetsiifilised peptiidid, kasutades Golden Gate meetodikat. Kokku kloneeriti AAV lühendatud kapsiidivalke kodeerivad plasmiidid, muutuvpiirkondade vasakut ja paremat õlga kodeerivad plasmiidid ning sisestatavat peptiidi kodeeriv plasmiid. Kokku valmis 20 erinevat lühendatud AAV kapsiidivalku kodeerivat plasmidi (tabel 1).

Tabel 1. Golden Gate meetodil kloneeritud fragmendid

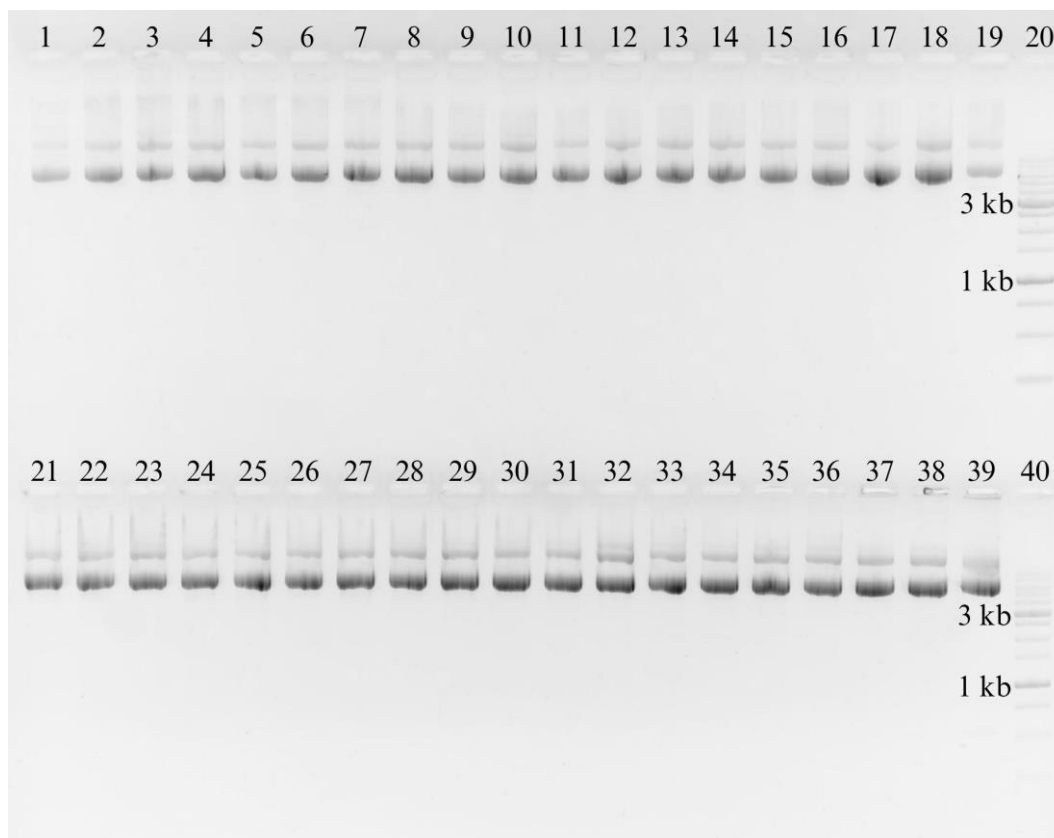
Aktseptor	Sisestuskoht	Peptiid
Cap2	VR-IV	uCendR $\alpha\beta$ 3-Int-NRP1 XBB1.5 IVEX1 LinTT1 LuS7A LuVG uEdbTncC
	VR-VIII	uCendR $\alpha\beta$ 3-Int-NRP1 XBB1.5 IVEX1 LinTT1 LuS7A LuVG uEdbTncC
Cap8	VR-IV	uCendR XBB1.5
	VR-VIII	uCendR XBB1.5

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

2.3.4. Peptiididega modifitseeritud täispikkade *pRepCap* plasmiidide konstrueerimine

Golden Gate kloneerimise tulemusena saadi plasmiidid, mis sisaldasid küll peptiididega modifitseeritud kapsiide kodeerivaid järjestusi, kuid kapsiidivalgud ise olid lühendatud. Edasi kloneeriti need täispikka kapsiidi kodeerivasse plasmidi: Cap2 järjestused

kloneeriti plasmidi *pRC2* ja Cap8 järjestused plasmidi *pAAV2/8*. Selleks lõigati Cap2 plasmide restriktasidega *Pfl23II* ja *NheI* ning Cap8 plasmide restriktasidega *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

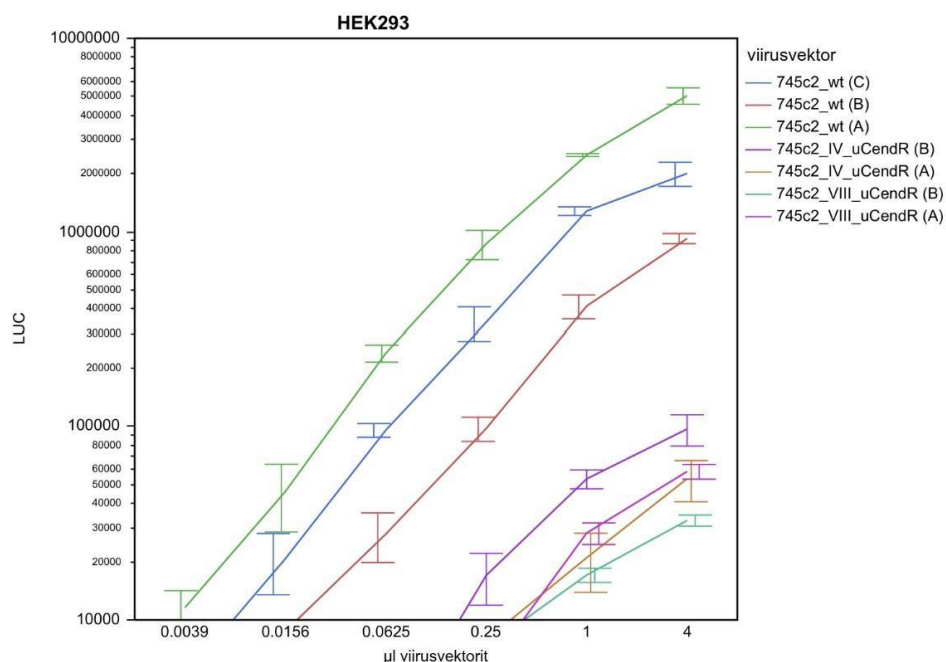
Joonisel 12 on radadel 20 ja 40 1 kb DNA-marker (Solis BioDyne). Rajal 19 on võrdluseks inserdita *pAAV2/8* ja rajal 39 inserdita *pRC2*. Radadel 1–10, 23–24 ja 37–38 on *pRC2*, milles on inserdiks Cap2_VR-VIII, millesse on sisestatud peptiidid. Radadel 1 ja 2 on peptiidiks uEdbTncC, 3 ja 4 $\alpha\beta3$ -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 $\alpha\beta3$ -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 kapsiidivalkude DNA variantide viimine täispikkadesse plasmiididesse läks ootuspäraselt.

2.3.5. Tõhusamate Golden Gate aktseptorplasmiidide konstrueerimine

Golden Gate meetodika edaspidiseks hõlpsamaks rakendamiseks asendati aktseptorfragmendid plasmiididega, kus sobivad üleulatuvad otsad tekivad restriктаas *BpiI* lõikamise tulemusena. Sellisel juhul pole vaja aktseptorfragmente eraldi plasmiididest puhastada, mis on äärmiselt töömahukas. Selle asemel piisab vaid õigete Golden Gate plasmiidide kokkusegamisest. Uue meetodi rakendamiseks disainiti kapsiidspetsiifilised oligonukleotiidpraimerid sobivate *BpiI* restriksioonisaitidega, nendega paljundati PCR-i käigus lühendatud kapsiidiplasmiide. Lisaks sisaldasid praimerid 5' otsas *HindIII* restriksioonisaiti, mille abil sai tekkinud PCR-i produktid esmalt *HindIII*-ga restrikteerida ja seejärel mugavalt plasmiidirõngaks kokku lüüa. Saadud plasmiidide järjestused kontrolliti sekveneerimisega ja need osutusid ootuspäraseks. Uus meetod võeti seega edukalt kasutusele.

2.3.6. Määramata tiitriga AAV transduktsiooni võime mõõtmine koekultuuri rakkudes

AAV viirusvektori tootmise esmaseks testimiseks valiti kapsiidid AAV2_IV-uCendR ja AAV2_VIII-uCendR ning kontrolliks kasutati metsiktüüpi AAV2 kapsiidi. Nn genoomseks ehk transgeeni plasmiidiks kasutati jaanimardika lutsiferaasi püsivalt ekspresseerivat AAV konstrukti (IVEX Lab, plasmiid nr 745). Viirusvektori tootmisprotsessi käigus ei olnud rakukultuuris märgata erinevusi metsiktüüpi ja uCendR peptiide kandvate kapsiidide vahel. Edasi nakatati HEK293 rakke puhastatud viirusvektoritega, kasutades viirusvektori neljakordset lahjenduste rida, alates 0,004 µl kuni 4 µl viirusvektorit ühe kannu kohta 96 kannulises koekultuuriplaadis. Kuna esialgu viiruspreparaatide tiitrit ei määratud, võrreldi katses erinevate viiruste preparaate ja hinnati üldisemalt, kui suuri viiruse koguseid on optimaalne kasutada.



Joonis 13. Lutsiferaasi (LUC) aktiivsus (mõõdetuna luminesentsi ühikutes) rakuliinis HEK293 erinevate kapsiidivariantide puhul

Viis päeva hiljem mõõdeti rakkudes lutsiferaasi aktiivsus ehk luminesents. Tulemused on esitatud joonisel 13. A, B ja C märgised vektorite juures tähistavad sama vektori tootmise kordusi ehk erinevaid partiisid. Kapsiidivalgus uCendR peptiidijärjestust omavad viirusvektoritega mõjutatud rakud andsid 50–100 korda madalamad luminesentsi väärtused kui metsiktüüpi AAV2 kontrollviirused, mis võib olla põhjustatud kas uCendR-viiruste madalamast nakatamisvõimest HEK293 rakkudes või nende viiruste madalamast saagisest tootmises.

2.3.7. Toodetud AAV preparaate tiitrid

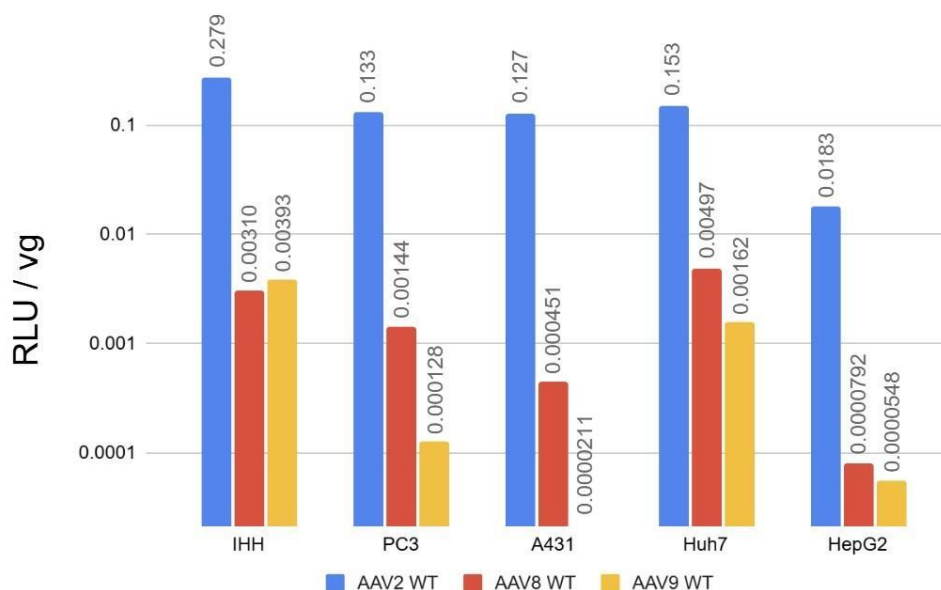
Toodetud viirusvektorite tiitrite kvantitatiivse PCR meetodiga mõõdetud tulemused on esitatud tabelis 2. Kõige kõrgemad tiitrid olid metsiktüüpi AAV8 ja AAV9 kapsiididega viirusvektoritel, nende tiitrid olid metsiktüüpi AAV2 kapsiidiga viirusvektoriga võrreldes lausa kümme korda kõrgemad. Modifitseeritud kapsiidivariantidest olid kõrgeima tiitriga viirused, mille kapsiidi oli sisestatud peptiid LuVG. Võib ka märkida, et nende viirusvektorite tiitrid oli veidi kõrgemad metsiktüüpi viirusvektori tiitrist. Samuti saab täheldada, et VR-IV sisestatud peptiidid vähendasid viirusvektorite tiitrit keskmiselt rohkem kui VR-VII sisestatud peptiidid.

Tabel 2. Toodetud AAV viirusvektorite tiitrid (vg/ml)

Kapsiid	Sisestuskoht	Peptiid	Tiiter (vg/ml)
Cap2	VR-IV	$\alpha\beta 3$ -Int-NRP1	$1.55 \cdot 10^9$
		XBB1.5	$6.01 \cdot 10^8$
		IVEX1	$2.14 \cdot 10^9$
		LinTT1	$5.95 \cdot 10^8$
		LuS7A	$6.97 \cdot 10^8$
		LuVG	$5.14 \cdot 10^9$
		uEdbTncC	$1.79 \cdot 10^9$
	VR-VIII	$\alpha\beta 3$ -Int-NRP1	$2.18 \cdot 10^9$
		XBB1.5	$1.33 \cdot 10^9$
		IVEX1	$1.54 \cdot 10^9$
		LinTT1	$9.26 \cdot 10^8$
		LuS7A	$1.79 \cdot 10^9$
		LuVG	$5.52 \cdot 10^9$
		uEdbTncC	$1.81 \cdot 10^9$
Cap2	Metsiktüüpi viirusvektor		$4.52 \cdot 10^9$
Cap8			$3.42 \cdot 10^{10}$
Cap9			$9.71 \cdot 10^{10}$

2.3.8. Määratud tiitriga AAV nakatamisvõime mõõtmine koekultuuri rakkudes

Edaspidistes katsetes toodeti erinevate kapsiidivariantidega viirusvektorid, kuid kõikidesse pakiti sama lutsiferaasi ekspresseeriv AAV genoom. Samuti määrati iga viiruse preparaadi tiiter ehk AAV koopiate arv mahuühikus (vg/ml) kvantitatiivse PCR-ga ning rakke nakatati 96-kannulises koekultuuriplaadis kindla hulga viiruspartiklitega: 10^6 , $2,5 \cdot 10^5$, $6,25 \cdot 10^4$ ja $1,56 \cdot 10^4$ vg koopiat ühe kannu kohta. Sellisel meetodil moodustus samuti viirusvektori neljakordsete lahjenduste rida.



Joonis 14. LUC-i aktiivsus ühe viiruse partikli kohta metsiktüüpi AAV2, AAV8 ja AAV9-ga erinevaid rakuliine nakatades. RLU – suhteline luminesentsi ühik

Uurides metsiktüüpi AAV2, AAV8 ja AAV9 nakatamise võimet erinevates rakuliinides selgus, et kuigi AAV8 ja AAV9 saagised olid viiruste tootmisel kõrged, siis nende nakatamise võime jäi uuritud rakuliinides AAV2-le 100–1000 korda alla (joonis 14). Seetõttu keskenduti just modifitseeritud AAV2 kapsiidide uurimisele. Edaspidistes katsetes kasutatavatest rakuliinidest esindas IHH inimese mittekasvajalist päritolu rakke ning A431, HepG2, Huh7 ja PC3 kasvajatest pärit rakke. Kõiki rakke nakatati 15 erineva viirusvektoriga, metsiktüüpi AAV2-ga ning AAV2-ga, mille VR-IV ja VR-VIII oli sisestatud peptiidid $\alpha\beta 3$ -Int-NRP1, XBB1.5, IVEX1, LinTT1, LuS7A, LuVG ja uEdbTncC. Katsete tulemused on esitatud lisades 1–5.

Katsetest selgus, et enamus modifitseeritud kapsiididega viirusvektorite nakatamise efektiivsus jääb valitud rakuliinides tunduvalt alla metsiktüüpi kapsiidiga viirusvektori nakatamise efektiivsusele. Siiski leidis ka modifitseeritud kapsiidivariante, mille nakatamise efektiivsus oli võrreldavas suurusjärgus metsiktüüpi kapsiidiga viirusvektori efektiivsusega. Kõige suurema efektiivsusega modifitseeritud kapsiidiks osutus AAV2, mille VR-IV oli sisestatud peptiid LuVG. Selle peptiidiga kapsiid oli kõikides uuritud rakuliinides kõrge efektiivsusega. VR-VIII sisestatud LuVG ei olnud nii efektiivne kui VR-IV sisestatud LuVG, kuid see oli siiski enamikest teistest modifitseeritud kapsiididest efektiivsem. Keskmisest efektiivsemad olid kõikides rakuliinides ka kapsiid, mille VR-IV oli sisestatud peptiid uEdbTncC, ja kapsiid, mille VR-VIII oli sisestatud peptiid $\alpha\beta 3$ Int-NRP1. Huvitaval kombel nakatas rakuliinis A431 efektiivselt rakke lisaks metsiktüüpi AAV2-le, vaid viirusvektor, mille VR-IV oli sisestatud peptiid LuVG (lisa 1). Modifitseeritud kapsiidiga viirusvektor, mille VR-VIII piirkonda oli sisestatud peptiid uEdbTncC, osutus efektiivseks vaid rakuliinis HepG2, kus see oli kõige efektiivsem

modifitseeritud kapsiidiga viirusvektor (lisa 2). Samuti oli see viirusvektor HepG2 rakuliinis 20–40 korda efektiivsem kui üheski teises kasutatud rakuliinis. Seega tundub see viirusvektor omavat teatud rakuspetsiifikat, kuid kindlamate järelduste tegemiseks, tuleks katseid läbi viia rohkematest kudedest saadud rakuliinides.

2.4. Arutelu

Käesoleva töö raames valminud Golden Gate doonorvektor *pGGD_Kan_LacZα* osutus tõhusaks kloneerimisvektoriks – kõikide fragmentide kloneerimisel tekkis selle vektoriga ligeerimisega 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 *LacZα* ekspressioonikasseti, mis võimaldab sinivalget selektsiooni. Varem on samas projektis esinenud suuri probleeme insertide sisestamisega kanamütsiini resistentsusgeeni ekspresseerivasse vektorisse. Uue Golden Gate doonorvektoriga on need mured lahendatud. Huvitav on märkida, et mitmel juhul värvusid ka positiivsed kolooniad siniseks, justkui oleksid need olnud inserdita plasmiidid. See on mõisteta, kuna suur osa kloneeritavatest fragmentidest olid lühikesi peptiide kodeerivad järjestused, mille lisamine *EcoRI–HindIII* sisestuskohtadesse ei põhjustanud stoppkoodoni teket ja *LacZα* inaktivatsiooni. Kuna kloneerimine toimus kõrge efektiivsusega, siis sinivalge selektsioon ei osutunud kriitiliseks.

Ka Golden Gate meetodika rakendamine oli edukas: plasmiidid, mis koosnesid õigesti ühinenud fragmentidest, moodustasid üle 95% isoleeritud kolooniatest. Valitud konstruktid, mida sekveneeriti, olid ilma mutatsioonideta ehk korrektsed. Seega õnnestus kõik peptiidid soovitud kapsiidipiirkondadesse sisestada ning modifitseeritud kapsiidivalgud on ka kloneeritud täispikkadesse *pRepCap* plasmiididesse. Kokku on selle uurimistöö raames valminud 20 uut peptiidiinsertsiooniga AAV viiruste serotüüpi, 16 neist on modifitseeritud AAV2 kapsiidid ja neli modifitseeritud AAV8 kapsiidid. Seega võib väita, et selle uurimistöö raames on valminud mugav ja kergesti laiendatav AAV kapsiidide modifitseerimise platvorm, sest edaspidi on sellele võimalik lisada üha uusi komponente. Komponente omavahel kombineerides saame mahuka modifitseeritud AAV kapsiidivariantide raamatukogu.

Antud katsetes kasutati Golden Gate aktseptorplasmiidina tavapärasel meetodil lõigatud ja geelist puhastatud DNA fragmente, mis pärinesid AAV2 ja AAV8 lühendatud kapsiidivalgu kodeerivatest plasmiididest. Töö käigus leiti, et mugavam oleks ka aktseptorplasmiidid Golden Gate platvormile viia, nii tekivad ka aktseptorvektori üleulatuvad otsad IIS tüüpi restriktasidega lõikamise tulemusel. AAV2, AAV5, AAV8 ja

AAV9 kapsiidivalke kodeerivatele plasmiididele lisati PCR-i abil vastavad *Bp*il lõikamiskohad ning nüüd saab Golden Gate reaktsiooni tegemiseks lihtsalt kokku segada kõik vajalikud plasmiidid DNA-d ja ensüümid, ilma eelneva vektorifragmendi puhastamiseta.

Lisaks metsiktüüpi AAV2, AAV8 ja AAV9-le toodeti viirusvektoreid kõikide töös esitletud peptiididega, kasutades modifitseeritud AAV2 kapsiide. Rakkudes ei ilmnenud tootmisel metsiktüüpi AAV2 kapsiidi ja peptiide sisaldavate kapsiidide koguste vahel erinevusi. Seega võib järeldada, et peptiidijärjestuste lisamine ei mõju vähemalt uuritud kapsiidi sisestuskohtades üldiselt rakkudele toksiliselt. See on oluline teave, vastasel juhul oleks neid viirusvektoreid rakkudes keerukas toota. Saadud viiruspreparaatide nakatamise võime testimisel rakuliinides ilmnes aga, et paljud peptiidid vähendasid AAV võimet rakke nakatada, kusjuures juba käesoleva valimi juures ilmnesid peptiidide, kapsiidide sisestuskohtade ja rakuliinide vahel selged erinevused. Peptiidide kapsiidivalkudesse sisestamise täpsema mõju väljaselgitamiseks tuleks katseid läbi viia rohkemate peptiididega ja rohkematest kudedest pärit rakuliinides. Kuna katseid on plaanis samas formaadis korrata, saab kõik andmed omavahel integreerida ja seega kujuneb kapsiidide erinevatest modifikatsioonidest ja rakuliinide tulemustest ühtne andmebaas. Viirusvektoreid on plaanis testida ka loomkatses, kus hiire haigusmudelid hinnatakse viirusvektori nakatamisvõimet ja võimalikku terapeutilist efekti.

KOKKUVÕTE

Uurimistöö eesmärk oli anda ülevaade adenoassotsieeritud viiruste kasutamisest geeniteraapias ning uurida nende modifitseerimist peptiididega. 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 erinevates rakuliinides. Praktiline osa viidi läbi osana IVEX Lab OÜ teadus- ja arendustegevusest.

Töö teoreetiline osa jaotus 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 keskendus adenoassotsieeritud viirustele. Kirjeldati viiruse genoomi, kapsiidi ehitust, viiruse paljunemist ning tuntumaid AAV serotüüpe ja nende eelistust raku- ja koetüüpide suhtes. Samuti anti ülevaade AAVde kasutamisest geeniteraapias ja nende kapsiidivalkude modifitseerimisest peptiididega efektiivsemate ja rakuspetsiifilisemate viiruste loomiseks. Kirjanduse ülevaate viimane osa seletas lahti töö seisukohast äärmiselt olulise Golden Gate kloneerimise meetodi.

Töö praktilises osas loodi Golden Gate kloneerimiseks sobilik platvorm, mis võimaldab AAV kapsiidide mugavat modifitseerimist. Loodud sinivalget selektsiooni võimaldavas Golden Gate vektorisse kloneeriti lühendatud AAV kapsiidi moodustamiseks vajalikud fragmendid, milleks olid viiruse muutuvpiirkonna paremat ja vasakut õlga ning peptiide kodeerivad järjestused. Samuti viidi lühendatud kapsiidi aktseptorplasmiididesse PCR-iga vajalikud sisestuskohad. Saadud plasmiididest moodustati Golden Gate kloneerimise teel ühtsed lühendatud AAV kapsiidiplasmiidid, kokku valmistati kakskümmend uut AAV kapsiidivarianti. Lühendatud plasmiidid kloneeriti edasi täispikkadesse viiruse kapsiidiplasmiididesse. Valmistatud kapsiidiplasmiidide põhjal toodeti HEK293FT rakkudes viirusvektoreid, millega transdutseeriti erinevaid inimese rakuliine, võrdluseks kasutati metsiktüüpi AAV2, AAV8 ja AAV9 viiruseid. Katsete tulemusel selgus, et toodetud uued viirusvektorid andsid reeglina madalama tiitri ja ekspressiooniväärtuse kui metsiktüüpi AAV2 kontrollviirus.

Leiti, et peptiidid mõjutasid viirusvektori nakatamise võimet eri rakuliinides erineval määral.

Antud uurimistöö on osa suuremast projektist, kus uuritakse peptiidide mõju viirusvektorite rakuspetsiifilisusele. Uurimistöö põhiväärtus antud projektis seisneb mugava Golden Gate kloneerimisplatvormi loomises, mis on suureks abiks

modifitseeritud AAV-de kiiremaks tootmiseks. Ühtlasi on läbi proovitud kogu modifitseeritud kapsiididega AAV-de uurimise tööahel.

RESÜMEE

Erinevate kapsiidivalkudega pakitud adenoassotsieeritud viirusvektorite nakatumisvõime mõõtmine koekultuurides

Geenivead on seotud ligikaudu 80% teadaolevate haigustega, mistõttu on geeniteraapia suure potentsiaaliga valdkond. Adenoassotsieeritud viirused on kujunemas perspektiivikateks geeniteraapia teostamise vahenditeks. Samas on AAV-del äärmiselt lai tropism. Raku ja koespetsiifiliste AAV-de loomine võimaldaks parandada geeniteraapia efektiivsust, mis omakorda muudaks geeniteraapia ohutumaks ja kättesaadavamaks. Eksperimentaalses osas oli eesmärk luua sobilik Golden Gate kloneerimisplatvorm AAV kapsiidide modifitseerimiseks, sisestada AAV2 ja AAV8 kapsiididesse kopsu- ja vähispetsiifilised peptiidid ning toota ja testida uute kapsiidivariantidega viiruseid rakukultuuris. Esimeseks etapiks oli kanamütsiini resistentsusgeeni sisaldava 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 kapsiidivalgu ekspresseerivasse plasmidi. Saadud plasmiididega toodeti lutsiferaasi ekspresseerivad AAV vektorid, millega nakatati rakukultuuris erinevaid inimese rakuliine ja mille nakatamise efektiivsus määrati rakkudel lutsiferaasi võimaldatud bioluminestsentsi tugevuse järgi. Lumineestsentsiandmed koguti standardiseeritud viisil, mis võimaldas omavahel võrrelda erinevate kapsiidide mõju erinevates rakuliinides. Tööga loodi AAV-de uurimise tööahel, alates kapsiidide muutmisest kuni nende rakkudele avaldatava mõju testimiseni välja. See tööahel sisaldab i) Golden Gate kloneerimisplatvormi, ii) uute kapsiidide tootmist, iii) AAV viirusvektorite tootmise ja tiitri määramist, iv) AAV transduktsioonivõime mõõtmist erinevates rakuliinides. Platvorm on kergesti laiendatav hõlmama uusi kapsiidivariante ja uusi rakuliinide andmeid ning moodustab kasvava andmebaasi, mis on kasulik kõrgema efektiivsusega ja parema raku- ja koespetsiifilisusega geeniülekanne vektorite loomiseks. Uurimistöö on osa suuremast projektist, mille käigus uuritakse, kuidas peptiidide lisamine AAV-de kapsiididesse muudab nende rakuspetsiifilisust ja transduktsioonivõimet.

ABSTRACT

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

Defective genes account for 80enormous potential. Adeno-associated viruses are emerging as promising tools for gene therapy. However, AAVs have an extremely broad tropism. The 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 a 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 the luciferase reporter gene were produced, which were then used to infect various cultured human cell lines. To determine the efficiency of viral transduction, bioluminescence signal conferred by the viral luciferase in the cells was measured. The data were collected in a standardized format, enabling to compare effects of different capsids across different cell lines. Hence, an AAV pipeline starting with vector modification to testing of its properties in the cell culture was successfully established. The pipeline contains the following steps: i) Golden Gate-based platform, ii) generation of novel peptide-containing capsid variants, iii) production and titering of AAV viral preparations, iv) determination of transduction efficiencies of individual AAV vectors in cell culture. The platform is scalable to accommodate both novel capsids as well as novel cell line data, and will eventually form a growing database useful for developing more efficient gene transfer vectors with better cell- and tissue-specificity. This research forms part of a larger project studying how adding peptides to the AAV capsids changes their cell specificity and transduction efficiency.

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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9680027/> (26.02.2024).

Bode, N. 2023. Cloning Strategies: Golden Gate cloning. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6378346/> (24.02.2024).

Cambridge Dictionary. Fullerene. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4993104/> (12.03.2024).

Chen, H. 2015. Adeno-associated virus vectors for human gene therapy. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3921901/> (05.03.2024).

Müügiloaga uudsed ravimid Euroopa Liidus. Kättesaadav: <https://ravimiamet.ee/verirakud-koed-elundid-uudne-ravim/uudsed-ravimid/muugiloaga-uudsed-ravimid-euroopa-liidus> (13.08.2025).

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

Food and Drug Administration. Approved Cellular and Gene Therapy Products. Kättesaadav: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approvedcellular-and-gene-therapy-products> (11.03.2024).

Genemedi. Life Cycle of AAV Virus-From Infection To Regeneration. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2329050122001024> (29.02.2024).

Gonçalves, M. A. 2005. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525001603004052> (13.11.2023).

Louten, J. 2016. Virus Structure and Classification. Kättesaadav: <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? Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10059137/> (11.03.2024).

Marks, L. 2018. *Gene therapy*. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3958061/> (17.02.2024).

National Institutes of Health. Clinical trials. Kättesaadav: <https://clinicaltrials.gov/search?intr=gene%20therapy> (11.03.2024).

National Institutes of Health. PPP1R12C protein phosphatase 1 regulatory subunit 12C [Homo sapiens (human)]. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=54776> (18.02.2024).

National Center for Biotechnology Information. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>

Nature 2023. The gene-therapy revolution risks stalling if we don't talk about drug pricing. Kättesaadav: <https://www.nature.com/articles/d41586-023-01389-z> (11.03.2024).

New World Encyclopedia. Supramolecular chemistry. Kättesaadav: https://www.newworldencyclopedia.org/entry/Supramolecular_chemistry (18.03.2024).

Oxford Reference. plus (+) and minus (-) viral strands. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: [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).

Ramamoorthi, M., Narvekar, A. 2015. Non Viral Vectors in Gene Therapy - An Overview. Kättesaadav: [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. Kättesaadav: <https://ravimiamet.ee/veri-rakud-koed-elundid-uudne-ravim/uudsed-ravimid/muugiloaga-uudsed-ravimideuroopa-liidus> (01.01.2024).

Royle, S. J. 2006. The cellular functions of clathrin. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurevvirol-031413-085355> (16.11.2023).

Scheller, E., Krebsbach, P. 2009. Gene therapy: design and prospects for craniofacial regeneration. Kättesaadav: <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]. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: [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. Kättesaadav: <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. HighComplexity One-Pot Golden Gate Assembly. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: [https://www.cell.com/molecular-therapyfamily/methods/fulltext/S2329-0501\(22\)00127-9](https://www.cell.com/molecular-therapyfamily/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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <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. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3041749/> (12.03.2024).

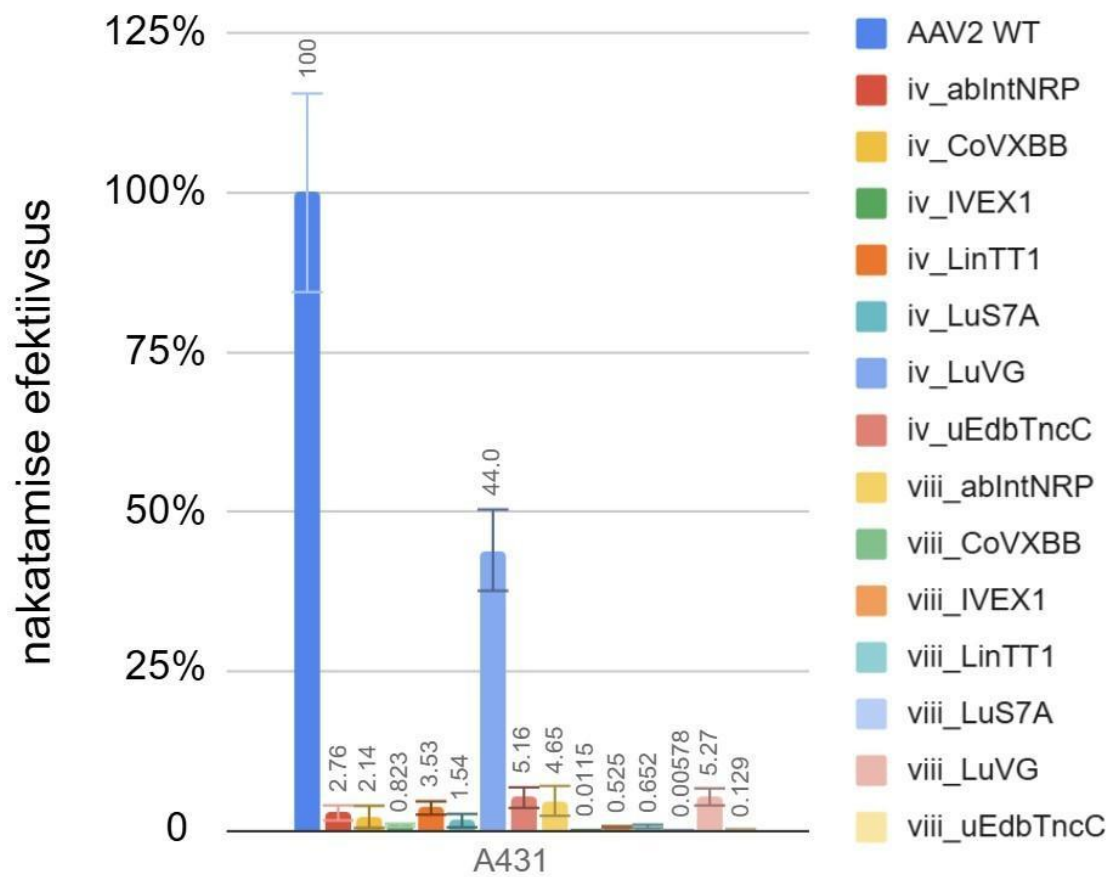
Wivel, N. A., Wilson, J. M. 1998. METHODS OF GENE DELIVERY. Kättesaadav: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889858805700046> (21.11.2023).

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

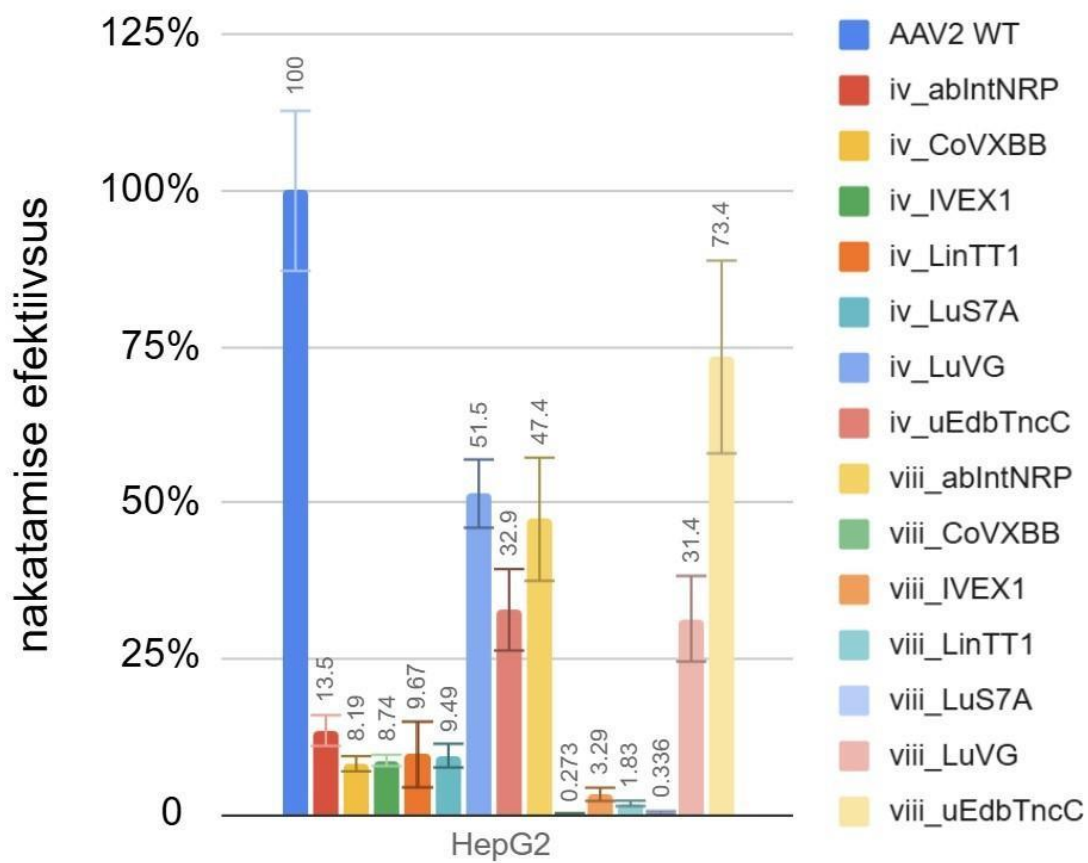
Wörner, T. P., Bennett, A., Habka, S., Snijder, J., Frieze, O., Powers, T., AgbandjeMcKenna, M., Heck, A. J. R. 2021. Adeno-associated virus capsid assembly is divergent and stochastic. Kättesaadav: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-21935-5> (26.02.2024).

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. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC104178/> (17.02.2024).

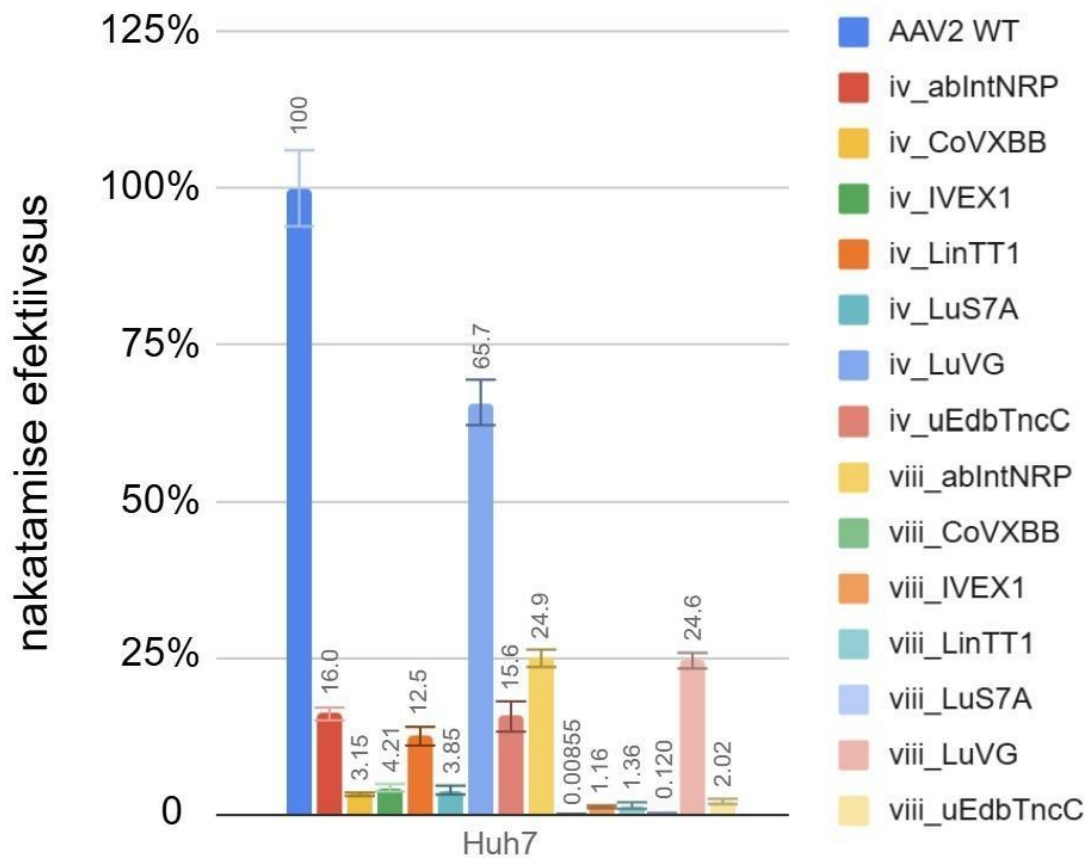
LISA 1. Modifitseeritud kapsiidivariantidega viiruste suhteline nakatamise võime võrdluses metsiktüüpi viirusega rakuliinis A431



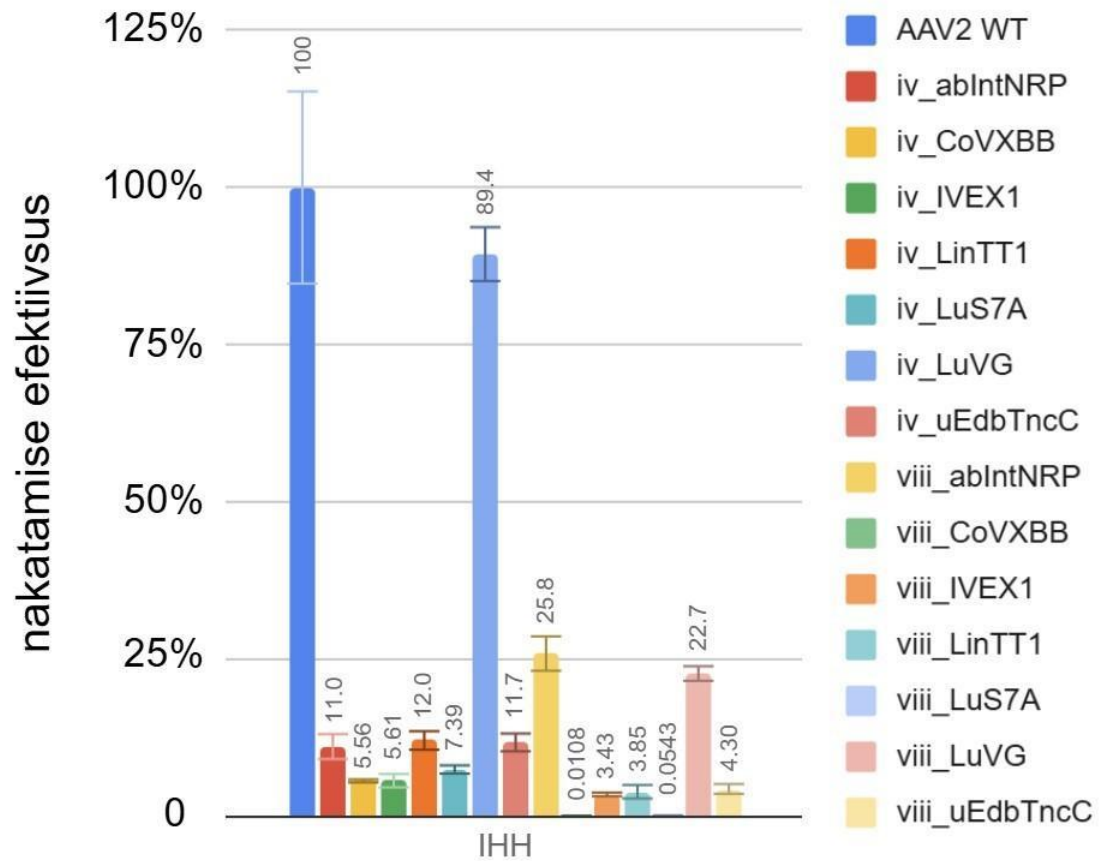
LISA 2. Modifitseeritud kapsiidivariantidega viiruste suhteline nakatamise võime võrdluses metsiktüüpi viirusega rakuliinis HepG2



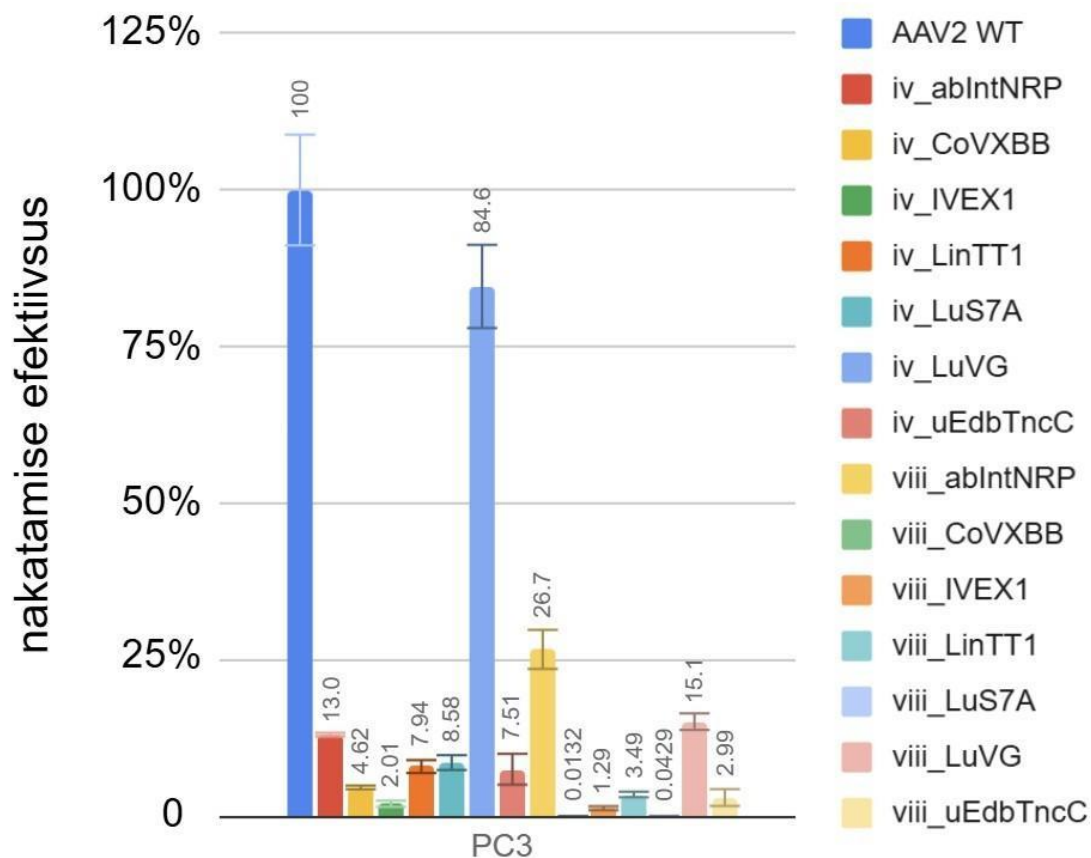
LISA 3. Modifitseeritud kapsiidivariantidega viiruste suhteline nakatamise võime võrdluses metsiktüüpi viirusega rakuliinis Huh7



LISA 4. Modifitseeritud kapsiidivariantidega viiruste suhteline nakatamise võime võrdluses metsiktüüpi viirusega rakuliinis IHH



LISA 5. Modifitseeritud kapsiidivariantidega viiruste suhteline nakatamise võime võrdluses metsiktüüpi viirusega rakuliinis PC3



LISA 6. (NCBI andmebaas) Metsiktüüpi AAV-de kapsiidivalkude aminohappelised järjestused

Serotüüp	Aminohapped 1-70
AAV1	MAADGYLPDWLEDNLS EGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AAV2	MAADGYLPDWLEDNLS EGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNEADA
AAV3	MAADGYLPDWLEDNLS EGIREWWALKPGVPPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNEADA
AAV4	-MTDGYLPDWLEDNLS EGVREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AAV5	MSFVDHPPDWLEE - VGEGLREFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPFGNGLDRGEPVNRAD
AAV6	MAADGYLPDWLEDNLS EGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AAV7	MAADGYLPDWLEDNLS EGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AAV8	MAADGYLPDWLEDNLS EGIREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AAVrh.8	MAADGYLPDWLEDNLS EGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AAV9	MAADGYLPDWLEDNLS EGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AAV10	MAADGYLPDWLEDNLS EGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNEADA
AAVrh.10	MAADGYLPDWLEDNLS EGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AAV11	MAADGYLPDWLEDNLS EGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA
AAV12	MAADGYLPDWLEDNLS EGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNEADA
AAV13	-MTDGYLPDWLEDNLS EGVREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNAADA

Serotüüp	Aminohapped 71-140
AAV1	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
AAV2	AALHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADA EFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAP
AAV3	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAP
AAV4	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEQAGETAP
AAV5	VAREHDI SYNEQLEAGDNPYLKYNHADA EFQEKLADDTSGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGGLVEEGAKTAP
AAV6	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGGLVEEGAKTAP
AAV7	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
AAV8	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
AAVrh.8	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
AAV9	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADA EFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAP
AAV10	AALHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADA EFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAP
AAVrh.10	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
AAV11	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
AAV12	AALHDKAYDKQLEQGDNPYLKYNHADA EFQERLATDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEGVKTAP
AAV13	AALHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADA EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAP

Serotüüp	Aminohapped 141-210
AAV1	GKKRPVEQSPQ - EPDSSSGIGK - - - - - TGQQPAKKRLNFGQTGDSSESVDP - PQPLGEPPATPAAV
AAV2	GKKRPVEHSPV - EPDSSSGTGK - - - - - AGQQPARKRLNFGQTGDADSVDP - PQPLGQPPAAPSGL
AAV3	GKKGAVDQSPQ - EPDSSSGVGK - - - - - SGKQPARKRLNFGQTGDSSESVDP - PQPLGEPPAAPSTSL
AAV4	GKKRPLIESPQ - QPDSSSGIGK - - - - - KGKQPAKKKLVEFEDTGAGDG - - - PPEGSTSGAMS - -
AAV5	TGKRIDDHFPKRKKARTEEDSK - - - - - PS - - - - - TSSDAEAGPSGSGQLQIPAQPASSL
AAV6	GKKRPVEQSPQ - EPDSSSGIGK - - - - - TGQQPAKKRLNFGQTGDSSESVDP - PQPLGEPPATPAAV
AAV7	AKKRPVEPSQRSPPDSSTGIGK - - - - - KGQQPARKRLNFGQTGDSSESVDP - PQPLGEPPAAPSSV
AAV8	GKKRPVEPSQRSPPDSSTGIGK - - - - - KGQQPARKRLNFGQTGDSSESVDP - PQPLGEPPAAPSGV
AAVrh.8	GKKRPVEQSPQ - EPDSSSGIGK - - - - - TGQQPAKKRLNFGQTGDSSESVDP - PQPLGEPPAAPSGL
AAV9	GKKRPVEQSPQ - EPDSSAGIGK - - - - - SGAQPAKKRLNFGQTGDTESVDP - PQPIGEPPAAPSGV
AAV10	GKKRPVEHSPA - EPDSSSGTGK - - - - - AGQQPARKRLNFGQTGDADSVDP - PQPLGQPPAAPSGL
AAVrh.10	GKKRPVEPSQRSPPDSSTGIGK - - - - - KGQQPARKRLNFGQTGDSSESVDP - PQPIGEPPAGPSGL
AAV11	GKKRPLESPQE - - PDSSSGIGK - - - - - K - - - - - GKQPARKRLNFEEDTGAGDG - - - PPEGSDTSAMS - -
AAV12	GKKRPLEKTPN - - RPTNPDSGKAPAKKKQKDGEPADSARRTLDF - - EDSGAGDG - - - PPEGSSSGEMS - -
AAV13	GKKRPVEQSPA - EPDSSSGIGK - - - - - SGQQPARKRLNFGQTGDTESVDP - PQPLGQPPAAPSGV

Serotüüp	Aminohapped 211-280
AAV1	GPTTMA SGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSAS--TGA
AAV2	GTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ--SGA
AAV3	GSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ--SGA
AAV4	DDSEMRAAAGGA AVEGGQADGVGNASGDWHCDSTWSEGHVTTTSTRTWLPTYNNHLYKRLGE-----S
AAV5	GADTMSAGGGGPLGDNNQADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWLPSYNNHLYKQREIKSGSVD-G
AAV6	GPTTMA SGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSAS--TGA
AAV7	GSGTVAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSSET-AGS
AAV8	GPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGA
AAVrh.8	GPLTMA SGGGAPVADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGS
AAV9	GSNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ--SGA
AAV10	GTNTMASGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ--SGA
AAVrh.10	GSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGS
AAV11	SDIEMRAAPGGNAVDAGQGS DGVGNASGDWHCDSTWSEGVVTTTSTRTWLPTYNNHLYLRLGT-----T
AAV12	HDAEMRAAPGGNAVEAGQADGVGNASGDWHCDSTWSEGRVTTTSTRTWLPTYNNHLYLRLGT-----T
AAV13	GSTTMA SGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRIITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQ--SGA

Serotüüp	Aminohapped 281-350
AAV1	SNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNL
AAV2	SNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANL
AAV3	SNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKKLSFKLFNIQVRGVTTQNDGTTTIANL
AAV4	LQSN TYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGMRPKAMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANL
AAV5	SNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQDSTTTIANL
AAV6	SNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANL
AAV7	TNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKKLRFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANL
AAV8	TNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTTIANL
AAVrh.8	TNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTNEGTTIANL
AAV9	SNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANL
AAV10	SNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANL
AAVrh.10	TNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTTIANL
AAV11	SSSN TYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGLRPKAMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANL
AAV12	ANSNTYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGLRPKSMRVKIFNIQVKEVTTSNGETTVANL
AAV13	TNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS PRDWQRL INNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANL

Serotüüp	Aminohapped 351-420
AAV1	TSTVQVFS DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFPSQML
AAV2	TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFPSQML
AAV3	TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFPSQML
AAV4	TSTVQIFADSSYELPYVMDAGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGLVTGNTSQQTDRNAFYCLEYFPSQML
AAV5	TSTVQVFTDDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPQPQVFTLPQYGYATLNRDNT-ENPTERRSSFFCLEYFPSKML
AAV6	TSTVQVFS DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFPSQML
AAV7	TSTIQVFS DSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG---SQSVGRSSFYCLEYFPSQML
AAV8	TSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFPSQML
AAVrh.8	TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG---SQALGRSSFYCLEYFPSQML
AAV9	TSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDG---SQAVGRSSFYCLEYFPSQML
AAV10	TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFPSQML
AAVrh.10	TSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFPSQML
AAV11	TSTVQIFADSSYELPYVMDAGQEGSLPPFPNDVFMVPQYGYCGIVTGEN-QNQTDNRNAFYCLEYFPSQML
AAV12	TSTVQIFADSTYELPYVMDAGQEGSFPPFPNDVFMVPQYGYCGVVTGKN-QNQTDNRNAFYCLEYFPSQML
AAV13	TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNG---SQAVGRSSFYCLEYFPSQML

✓

Serotüüp	Aminohapped 421-490
AAV1	RTGNNFTFSYTFEEVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQN-QSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSV
AAV2	RTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTN-TPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRD
AAV3	RTGNNFQFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQGTTSGTTNQSRLLSQAGPQSMSL
AAV4	RTGNNFEITYSFEKVPFHSMYAHSQSLDRLMNPLIDQYLWGLQSTTTGTTLNAGTATTNFTKLRPTNFSN
AAV5	RTGNNFEFTYNFEEVPPFHSSFAPSQNLFLKLANPLVDQYLYRFVSTNNT-----GGVQFNKNLAGRYAN
AAV6	RTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQN-QSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSV
AAV7	RTGNNFEFSYSFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLARTQSNPGGTAGNRELQFYQGGPSTMAE
AAV8	RTGNNFQFTYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQT-TGGTANTQTLGFSQGGPNTMAN
AAVrh.8	RTGNNFQFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLVRTQT-TG-TGGTQTLAFSQAGPSSMAN
AAV9	RTGNNFQFSYEFENVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGS--GQNQQLTKFSVAGPSNMAV
AAV10	RTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTN-TPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRD
AAVrh.10	RTGNNFEFSYQFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQS-TGGTAGTQQLLSQAGPNNMSA
AAV11	RTGNNFEMAYNFEKVPFHSMYAHSQSLDRLMNPLLDQYLWHLQSTTSGETLNQGAATTFGKIRSGDFAF
AAV12	RTGNNFEVSYQFEKVPFHSMYAHSQSLDRMMNPLLDQYLWHLQSTTTGNSLNQGTATTTYGKITTGDFAY
AAV13	RTGNNFQFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQTA--SGTQQSRLLSQAGPTSMSL

Serotüüp	Aminohapped 491-560
AAV1	QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSN-----FTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDDEDKFFPMS
AAV2	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNS-----YSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDDEEKFFPQS
AAV3	QARNWLPGPCYRQQRLSKTANDNNNSN-----FPWTAASKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDDEEKFFPMH
AAV4	FKKNWLPGPSIKKQGFSKTANQNYKIPATGSDSLIKYETHSTLDGRWSALTPGPPMATAGPADSKFS-NS
AAV5	TYKNWFPGPMGRQTQGNLGSQVNRASV-----SAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALE
AAV6	QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSN-----FTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDDKKFFPMS
AAV7	QAKNWLPGPCFRQQRVSKTLDQNNNSN-----FAWTGATKYHLNGRNSLVNPGVAMATHKDDDEDKFFPSS
AAV8	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSN-----FAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDDEERFFPNS
AAVrh.8	QARNWVPGPCYRQQRVSTTTNQNNNSN-----FAWTGAAKFKLNGRDSLMPNGVAMASHKDDDDKFFPSS
AAV9	QGRNYIPGPSYRQQRVSTTTVQNNNS-----FAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDKFFPLS
AAV10	QSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNS-----YSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDDEEKFFPQS
AAVrh.10	QAKNWLPGPCYRQQRVSTTTSQNNNSN-----FAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDDEERFFPSS
AAV11	YRKNWLPGPCVKQQRFSKTASQNYKIPASGGNALLKYDTHYTLNNRWSNIAPGPPMATAGPSDGDIFS-NA
AAV12	YRKNWLPGACIKQKFSKNANQNYKIPASGGDALLKYDHTTLNGRWSNMAPGPPMATAGAGDSDFS-NS
AAV13	QAKNWLPGPCYRQQRLSKQANDNNNSN-----FPWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDKEKFFPMH

Serotüüp	Aminohapped 561-630
AAV1	GVMIFGKESAG--ASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQSSSTDPATGDVHAMGALPGM
AAV2	GVLIFGKQGSE--KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGM
AAV3	GNLIFGKEGTT--ASNAELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANLQSSNTAPTGTGVNHQALPGM
AAV4	QLIFAGPKQNG--NTATVPGTLIFTSEEEAATNATDMDWGNLPGGDQSNNSNLPTVDRLTALGAVPGM
AAV5	NTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEI VPGS
AAV6	GVMIFGKESAG--ASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQSSSTDPATGDVHVMGALPGM
AAV7	GVLIFGKTGAT--NK-TTLENVLMTNEEEIRPTNPVATEEYGI VSSNLQAANTAAQTQVVNNQGALPGM
AAV8	GILIFGKQNA--RDNADYS DVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGI VADNLQQQNTAPQIGTVNSQGALPGM
AAVrh.8	GVLIFGKQGAG--NDGVDYSQVLTDEEEIKATNPVATEEYGA VINNQAANTQAQGTGLVHNQGVIPGM
AAV9	GSILIFGKQGTG--RDNVDAKVMITNEEEIKTTNPVATESYGGQVATNHQSAQAQAQGTGWVQNQGI LPGM
AAV10	GVLIFGKQGSE--KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQGGNTQAATADVNTQGVLPGM
AAVrh.10	GVLIFGKQGAG--KDNVDYS SVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGM
AAV11	QLIFPGPSVTG--NTTTSANNLLFTSEEEIAATNPRDMDMFGQIADNNQNATTAPITGNVTAMGVLPGM
AAV12	QLIFAGPNPSG--NTTTSNNLLFTSEEEIATTNPRDMDMFGQIADNNQNATTAPHIANLDAMGIVPGM
AAV13	GTLIFGKEGTN--ANNADLENVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVSNNLQNSNAGPTTGTGVNHQALPGM

Serotüüp	Aminohapped 631-700
AAV1	VWQDRDYYLQGP IWAKI PHTDGHFHPS PLMGGFGLKKNPPQILIKNTVPVPANPPAEFSATKFASFITQYS
AAV2	VWQDRDYYLQGP IWAKI PHTDGHFHPS PLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPVPANPSTTFSAAKFASFITQYS
AAV3	VWQDRDYYLQGP IWAKI PHTDGHFHPS PLMGGFGLKHPPPQIMIKNTVPVPANPPTTFSPAKFASFITQYS
AAV4	VWQNRDIYYQGP IWAKI PHTDGHFHPS PLIGGFGLKHPPPQIFIKNTVPVPANPATTFSSTPVNSFITQYS
AAV5	VWMERDYYLQGP IWAKI PETGAHFHPS PAMGGFGLKHPPPMMLIKNTVPVPGNI-TSFSDFVSSFITQYS
AAV6	VWQDRDYYLQGP IWAKI PHTDGHFHPS PLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPVPANPPAEFSATKFASFITQYS
AAV7	VWQNRDYYLQGP IWAKI PHTDGNFHPS PLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPVPANPPEVFTPAKFASFITQYS
AAV8	VWQNRDYYLQGP IWAKI PHTDGNFHPS PLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPVPADPPTTFNQSKLNSFITQYS
AAVrh.8	VWQNRDYYLQGP IWAKI PHTDGNFHPS PLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPVPADPPLTFNQAKLNSFITQYS
AAV9	VWQDRDYYLQGP IWAKI PHTDGNFHPS PLMGGFGMKHPPPQILIKNTVPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYS
AAV10	VWQDRDYYLQGP IWAKI PHTDGHFHPS PLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPVPANPSTTFSAAKFASFITQYS
AAVrh.10	VWQNRDYYLQGP IWAKI PHTDGNFHPS PLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPVPADPPTTFSQAKLASFITQYS
AAV11	VWQNRDIYYQGP IWAKI PHADGHFHPS PLIGGFGLKHPPPQIFIKNTVPVPANPATTFTAARVDSFITQYS
AAV12	VWQNRDIYYQGP IWAKV PHTDGHFHPS PLMGGFGLKHPPPQIFIKNTVPVPANPNTTFSAAKINSFLTQYS
AAV13	VWQDRDYYLQGP IWAKI PHTDGHFHPS PLMGGFGLKHPPPQIMIKNTVPVPANPPTNFSAAKFASFITQYS

Serotüüp	Aminohapped 701-761
AAV1	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKS ANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL
AAV2	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDNNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
AAV3	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDNNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
AAV4	TGQVSVDWEIQKERS KRWNPEVQFTSNYQQNS LLWAPDAAGKYTEPRAIGTRYLTHHL
AAV5	TGQVTVEMEWELKKENS KRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTRTRPIGTRYLTRPL
AAV6	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYAKS ANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL
AAV7	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNFEKQTGVDFAVDSQGVYSEPRPIGTRYLTRNL
AAV8	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
AAVrh.8	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
AAV9	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL
AAV10	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDNNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
AAVrh.10	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTDGTYSERPRPIGTRYLTRNL
AAV11	TGQVAVQIEWEIEKERS KRWNPEVQFTSNYGNQSSMLWAPDGTGKYTEPRVIGSRYLTNHL
AAV12	TGQVAVQIDWEIQKEHS KRWNPEVQFTSNYGTQNSMLWAPDNAGNYHELRAIGSRFLTHHL
AAV13	TGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDNNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

Legend

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