

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ÕPPETOOL MOLEKULAARBIOLOOGIA

**Kilgi halvatus viiruse 3C proteaasi lõikesaiti sisaldava valgu konstrueerimine,
puhastamine ja lõikamine *in vitro***

Bakalaureusetöö

12 EAP

Ade Sild

Juhendaja PhD Kristina Mäemets-Allas

TARTU 2026

INFOLEHT

Kilgi halvatuse viiruse 3C proteaasi lõikesaiti sisaldava valgu konstrueerimine, puhastamine ja lõikamine in vitro

Viirused sünteesivad proteaasi, mis toetab viiruse replikatsiooni ning valgusünteesi. Proteaas lõikab viiruse polüproteiini ning muudab viirusvalgud funktsionaalselt aktiivseks. Lisaks takistavad osade viiruste proteaasid rakkude viirusvastaseid kaitsemehhanisme ning häirivad rakulisi protsesse, et soodustada viiruse infektsiooni. Käesolevas töös konstrueeriti kilgi halvatuse viiruse 3C tsüsteiini proteaasi lõikesaiti sisaldav pDnaK_3C_RdRp plasmiid. Plasmiid ekspresseeriti *Escherichia coli* BL21(DE3) rakkudes ning puhastati kolonnkromatograafia ja dialüüsi meetodil. Puhastatud valk viidi reaktsiooni 3C tsüsteiini proteaasiga ning konkreetse lõikesaidiga proteaasi lõikeaktiivsust testida SDS-PAGE meetodil.

Märksõnad: viiruslik proteaas, proteaasi lõikesait, valgu ekspressioon, proteolüüs

CERCS kood: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees.

Construction, purification and *in vitro* cleavage of Cricket Paralysis Virus 3C protease substrate protein

Viruses synthesize an enzyme called protease that facilitates the virus during replication and translation. Protease cleaves the virus polyprotein and thus makes viral proteins functionally active. Furthermore, some viral proteases inhibit cellular antiviral mechanisms and repress cellular processes to promote virus infection. In this study, a plasmid pDnaK_3C_RdRp containing Cricket Paralysis Virus 3C cysteine protease was constructed. The plasmid was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells and purified using column chromatography and dialysis methods. The proteolytic activity of the 3C cysteine protease was tested by incubating the purified protease with substrate proteins containing specific cleavage site, and the cleavage products were analyzed by SDS-PAGE.

Keywords: viral protease, protease cleavage site, protein expression, proteolysis

CERCS code: P320 nucleic acids, protein synthesis.

Sisukord

Kasutatud lühendid	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Kilgi halvatuse viirus	7
1.1.1. Kilgi halvatuse viiruse infektsioon	7
1.1.2. Kilgi halvatuse viiruse genoom	9
1.2. Viiruslikud proteaasid	10
1.2.1. Viiruslike proteaaside struktuur ja klassifikatsioon.....	11
1.2.2. Tsüsteiini proteaasi lõikemehhanism	13
1.2.3. Kilgi halvatuse viiruse 3C tsüsteiini proteaas	14
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	17
2.1. Töö eesmärgid	17
2.2. Materjal ja meetoodika	17
2.2.1. Töös kasutatud bakteritüved ja nende kasvusöötmel	17
2.2.2. Plasmiidide konstrueerimine.....	18
2.2.3. Plasmiidide transformatsioon <i>E. coli</i> DH5- α rakkudesse	21
2.2.4. Kompetentsete rakkude valmistamine ning plasmiidide transformatsioon <i>E. coli</i> BL21 (DE3) rakkudesse	21
2.2.5. CrPV 3C proteaasi substraadi ekspressioon	22
2.2.6. CrPV 3C proteaasi lõikesaiti sisaldava valgu puhastamine	23
2.2.7. CrPV 3C proteaasi ja substraadi lõikereaktsioon.....	24
2.3. Tulemused	25
2.3.1. CrPV 3C proteaasi lõikesaiti sisaldava plasmidi konstrueerimine	25
2.3.2. CrPV 3C proteaasi substraadi ekspressioon	29
2.3.3. CrPV 3C proteaasi substraadi puhastamine	32
2.3.4. CrPV 3C proteaasi substraadi lõigatavuse testimine <i>in vitro</i>	35
2.3. Arutelu	37
KOKKUVÕTE.....	39
Summary.....	41
Tänu sõnad	43
Kasutatud kirjandus	44

Kasutatud veebiaadressid.....	49
Lisad	50
Lisa 1	50
Lihtlitsents.....	51

Kasutatud lühendid

BamHI	restriktsiooni endonukleas
CrPV	kilgi halvatuse viirus (<i>Cripavirus grylli</i>)
DCV	äädikakärbse C viirus (<i>Cripavirus drosophilae</i>)
DnaK	<i>P. putida</i> tšaperonvalk
IRES	sisemine ribosoomi seondumise järjestus (ingl <i>internal ribosome entry site</i>)
KpnI	restriktsiooni endonukleas
LB 2YT	2x pärmieksrakti ja trüptooni sööde
LB	Luria-Bertani täissööde (ingl <i>lysogeny broth</i>)
PABP	polü(A) järjestusega seonduv valk (ingl <i>poly(A) binding protein</i>)
RdRp	RNA sõltuv RNA polümeraas (ingl <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
VPg	genoomiga seonduv viiruse valk (ingl <i>viral protein genome-linked</i>)

SISSEJUHATUS

Viiruste elutegevuse peamine eesmärk on paljuneda ning nakatada organisme nii ulatuslikult kui võimalik. Viirused kasutavad oma eesmärgi täitmiseks ensüümi nimega proteaas, mille ülesanne on lõigata nii viiruse valke kui ka peremeesorganismi rakukomponente. Rakuliste elementide lõikamise kaudu soodustavad viirused oma valkude sünteesi ning kaitsevad end raku viirusvastaste mehhanismide eest (Zephyr *et al.*, 2021). Polüproteiini lõikamisega aktiveeritakse viirusvalgud, mis aitavad teostada viiruse replikatsiooni ja moodustada virioni (Chen *et al.*, 2019). Oma olulisuse tõttu on proteaas viirusele ka nõrkuseks, mida meditsiin ära kasutab. Viirusevastases ravis on proteaas tihti sihtmärk, kuna selle represseerimine toob kaasa viiruse eluks vajaike protsesside häiringud (Pisano, Supuran, 2025).

Käesolev töö uuriti positiivse ahelaga ssRNA genoomiga kilgi halvatuse viirust, mis kuulub seltsi *Picornavirales*. Pärast rakku sisenemist seondub kilgi halvatuse viirusele omane IRES struktuur raku translatsiooniparaadiga ning sünteesib selle pealt ühe polüproteiinina viirusvalkude ahela. Valkudevahelisi peptiidsidemeid lõikab viiruse 3C tsüsteiini proteaas ning seeläbi muudab valgud funktsionaalseks. Varasemates teadustöödes on ennustatud kilgi halvatuse viiruse proteaasi võimalike lõikesaitide aminohappelisi järjestusi, kuid siiani pole praktiliselt testitud nende lõikesaitide lõigatavust.

Kilgi halvatuse viiruse proteaasi lõikesaitide spetsiifilisuse uurimine on oluline, kuna proteaasi teadaolevate järjestuste kaudu on võimalik tuvastada viiruse rakulised substraadid. See laiendab teadmisi kilgi halvatuse viiruse kui ka samast perekonnast (*Dicistroviridae*) pärit viiruste infektsioonitsükli mehhanismidest.

Antud töö eesmärk oli konstrueerida konkreetne kilgi halvatuse viiruse 3C tsüsteiini proteaasi ennustatud lõikesait pET_his_DnaK mudelsubstraati, ekspresseerida ja puhastada substraatvalk ning teostada substraadi ja 3C proteaasiga lõikereaktsioon.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Kilgi halvatuse viirus

Kilgi halvatuse viirus (CrPV) liiginimega *Cripavirus grylli* kuulub taksonoomiliselt seltsi *Picornavirales* ja sugukonda *Dicistroviridae* (NCBI, Taxonomy Browser). *Dicistroviridae* sugukonda kuuluvad viiruste perekonnad *Aparavirus*, *Triatovirus* ning *Cripavirus*, mille perekonna 5 liigi hulka kuulub ka kilgi halvatuse viirus (ICTV global, Current ICTV Taxonomy Release). CrPV avastati ja isoleeriti Carl Reinganumi poolt 1970. aastal, kui ta uuris kilikide liike *Teleogyllus oceanicus* ja *Teleogyllus commodus* (Reinganum *et al.*, 1970).

Võrreldes teiste *Dicistroviridae* sugukonda kuuluvate viirustega on kilgi halvatuse viirusel kõige mitmekesisem valik peremeesorganisme (Bonning, Miller, 2010). Peale kilikide nakatab CrPV ka putukaid seltsidest kahetiivalised, liblikalised, sihktiivalised, kiletiivalised ja lutikalised (Wilson *et al.*, 2000; King *et al.*, 2012). Kilgi halvatuse viirus põhjustab nakatunud putukate jalgade ja tiibade halvatust, mille tagajärjel kilgid surevad. Lisaks putukate otsesele mõjule põhjustab CrPV suuri probleeme kilgi-farmides, kus kasvatatakse valgurikkaid snäkke inimeste või loomatoidu tarbeks (Savannah *et al.*, 2018).

Teaduskirjanduses on korduvalt *Dicistroviridae* sugukonna viiruseid võrreldud *Picornaviridae* sugukonna viirustega. Kuigi mõlema sugukonna viirused nakatavad erinevaid organisme ning nende genoomid on erinevalt organiseeritud, siis geenide sisalduse poolest on need viirused väga sarnased (Woo *et al.*, 2012). Valgud, mida mõlema sugukonna viirused sünteesivad on RNA sõltuv RNA polümeraas (RdRp), kümotrüpsiini sarnane proteaas, superperekonna 3-helikaas ja genoomiga seonduvad valgud (VPg) (Woo *et al.*, 2012). *Dicistroviridae* ja *Picornaviridae* sugukonna viirused kuuluvad pikornaviiruse-laadsetest superperekonda, millest loodi ICTV poolt 2008. aastal eraldi selts *Picornavirales* (Gall *et al.*, 2008).

1.1.1. Kilgi halvatuse viiruse infektsioon

Tüüpiline viiruste infektsioonitsükkel algab peremeesorganismile seondumisega ning rakku sisenemisega (Ryu, 2016). Edasi paljundatakse rakkudes viiruse genoomi ning sünteesitakse viirusvalke, et moodustada virion ning lõpuks rakkudest väljuda (Ryu, 2016).

Kilgi halvatuse viiruse rakku sisenemise mehhanismi pole põhjalikult uuritud, kuid sel teemal on uuritud samast perekonnast pärit *Drosophila C* viirust (DCV). Kuigi DCV peremeesorganismi pinnaretseptorit pole veel tuvastatud, siis on teada, et viirus siseneb rakkudesse klatriini vahendatud endotsütoosi teel (Warsaba *et al.*, 2020; Cherry, Perrimon,

2004). Pärast rakku sisenemist laguneb viiruse kapsiid ning viiruslik genoom vabaneb tsütoplasmasse. Kuna CrPV omab positiivse ahelaga ssRNA genoomi, siis saab viirus alustada kohe selle pealt replikatsiooni ja translatsiooni (Warsaba *et al.*, 2020). Replikatsiooni jaoks on vajalik RNA sõltuv RNA polümeraas (RdRp), mis sünteesitakse viiruse genoomi pealt (Joonis 1).

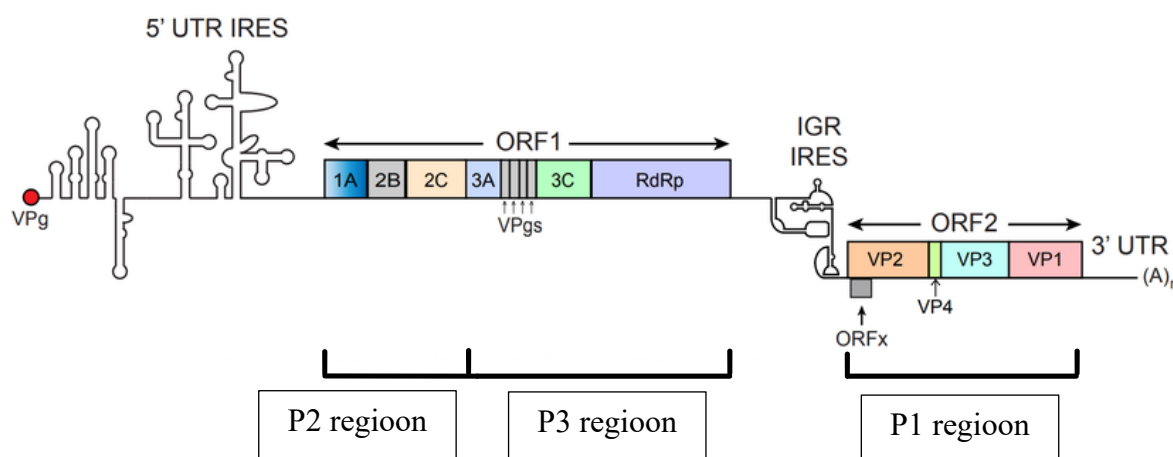
CrPV translatsiooni initsiatsiooni reguleerib ribosoomi sisemise seondumispirkonna RNA sekundaarstruktuur IRES, mis võimaldab viirusel nakatunud rakkudes seonduda otse ribosoomiga ning algetada *cap*-sõltumatu valgusüntees (Bonning, Miller, 2010; Salas *et al.*, 2018). *Cap*-sõltuv translatsioon on eukarüootidele omane transkriptsiooni järgne modifikatsioon, kui mRNA 5'otsa lisatakse 7-metüülguanosiin (m^7G) (Ramanathan, 2016). CrPV sisaldab genoomis kahte IRES elementi, mis on oma struktuurilt ja mehhanismilt erinevad – 5'UTR IRES ja geenidevaheline (IGR IRES) (Joonis 1). CrPV IGR IRES vahendatud translatsioon ei vaja initsiatsioonifaktoreid, AUG startkoodonit ega initsiaator tRNA'd, mis on vajalikud eukarüootide kanoonilise translatsiooni initsiatsiooniks (Pestova, Hellen, 2003; Wilson *et al.*, 2000). 5'UTR IRES struktuurilt sarnasem pikornaviiruste IRES'ga ning vajab ribosoomiga seondumiseks kahte abifaktorit eIF2 ja eIF3 (Gross *et al.*, 2017). CrPV genoomi pealt transleeritakse kaks polüproteiini, mis lõigatakse post-translatsiooniliselt viiruse 3C tsüsteiini proteaasi poolt funktsionaalseteks valkudeks (Seipelt *et al.*, 1999). Pärast CrPV valkude sünteesi moodustavad struktuursed valgud ümber CrPV genoomi viiruse kapsiidi, väljuvad rakust ning nakatavad järgmiseid rakke (Tate *et al.*, 1999).

Üldlevinud mehhanism viiruste maailmas on viirusvalkude sünteesi soodustamiseks ning rakkude viirusevastaste vastuse vältimiseks rakuliste protsesside (translatsioon, transkriptsioon) häirimine või RNA lagundamine (Shehata *et al.*, 2024; Gaucherand, Gaglia, 2022). Selle jaoks sünteesitakse osades viirustes valke, mis lõikavad peremeesorganismi mRNA'd või vajalike abifaktoreid. CrPV nakatab kultiveeritud äädikakärbse rakke ning selle põhjal on uuritud CrPV poolt tekitatud rakulist inhibitsiooni (Moore *et al.*, 1980; Garrey *et al.*, 2010). CrPV infektsioon põhjustab rakkudes eIF2 α fosforüleerimist ning eIF4E ja eIF4G seondumise häiringud, seega inhibeerib otseselt rakulist translatsiooni (Garrey *et al.*, 2010). Siiski on siiani veel täpselt teadmata CrPV rakulise inhibitsiooni mehhanism ja konkreetsed inhibitsiooni sihtmärgid.

1.1.2. Kilgi halvatuse viiruse genoom

Picornavirales seltsi viiruseid iseloomustab üheaheelalise positiivse polaarsusega 7000 – 12500 aluspaari pikk ssRNA genoom ning seda ümbritsev ikosaeedriline kapsiid (Gall *et al.*, 2008). Samasuguseid omadusi kannab *Picornavirales* seltsi *Dicistroviridae* sugukonda kuuluv kilgi halvatuse viirus, mille genoom on ligikaudu 9200 aluspaari pikk (Garrey *et al.*, 2010).

Kilgi halvatuse viirust eristab oma seltsi teiste sugukondade viirustest kahe IRES struktuuri ja kahe ORF'i esinemine genoomis (Joonis 1). Kui pikornaviirustes asub üks IRES struktuur genoomi 5' otsa mitte-transleeritavas alas (5'UTR), siis *Dicistroviridae* sugukonna viiruste on genoomis kaks IRES struktuuri – esimene asub 5'UTR alas ning teine asub kahe avatud lugemisraami (ORF) vahel (Salas *et al.*, 2018). IGR IRES poolitab *Dicistroviridae* sugukonna viirused kaheks transleeritavaks ORF'ks, mis teeb need viirused ainsateks bitsistroomseteks viirusteks *Picornavirales* seltsis (Gall *et al.*, 2008).



Joonis 1. Kilgi halvatuse viiruse (+)ssRNA genoomi ülesehitus. Genoomi 5'otsaga on seotud viiruslikud valgud (VPg). 5'UTR IRES struktuur initsieerib esimese avatud lugemisraami geenide (ORF1) translatsiooni. Lugemisraamide vahelise IGR IRES abil alustatakse ORF2 geenide translatsiooni. ORF1 sisaldab replikatsiooniks vajalike valkude geene ja ORF2 struktuursete valkude geene. Genoomi 3'ots on polüadenüleeritud. CrPV genoom jagatakse kolmeks prekursoriks – P1, P2, P3. (Kohandatud Warsaba *et al.*, 2020 järgi)

CrPV viiruse genoom kodeerib kahte polüproteiini – ORF1 transleeritakse 5'UTR IRES abil ja ORF2 transleeritakse IGR IRES abil (Joonis 1). CrPV genoomi ORF1 pealt sünteesitakse replikatsiooniks vajalike valke ning genoomi 5'otsaga kovalentselt seonduvaid viirusvalke (VPg). Genoomiga seotud VPg käitub kui praimer, mida tunneb ära RNA polümeraas (Warsaba *et al.*, 2022). Lisaks VPg geenidele asub esimeses lugemisraamis veel RNA interferentsi supressor 1A, 2C RNA helikaas, 3C tsüsteiini proteaas ja RNA sõltuv RNA polümeraas (RdRp) (Warsaba *et al.*, 2020). Valkude 2B ja 3A funktsioonideks arvatakse viiruse

replikatsioonikompleksi moodustumine ning membraani remodelleerimine (Warsaba *et al.*, 2020). CrPV genoomi ORF2 pealt sünteesitakse struktuurseid valke VP2, VP4, VP3, VP1, mis moodustavad T=3 sümmeetriaga viiruse kapsiidi (Liljas *et al.*, 2002). ORF2 alguses asub +1 avatud lugemisraam ORF_x, mille pealt alustab IGR IRES translatsiooni harvem kui 0 ORF2 lugemisraamilt (Au *et al.*, 2015). Sarnaselt pikornaviirustele jagatakse CrPV genoom kolmeks prekursoriks – P1, P2, P3 (Nakashima, Ishibashi, 2010). CrPV genoomi P1 regioonis on ORF2 viiruse kapsiidi geenid (VP), P2 regioonis on ORF1 geenid 1A, 2A ja 2B ning P3 regioonis on 3A, VPg, 3C ja RdRp geenid.

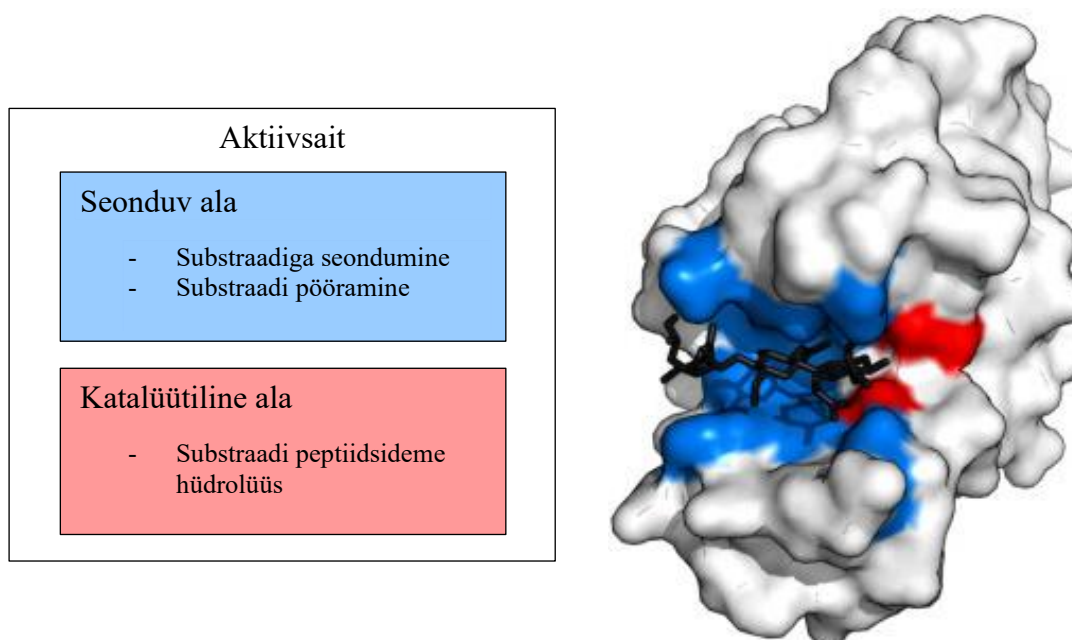
CrPV viiruse kahe ORF'i sünteesi regulatsioon ei ole samasugune. Viiruse kapsiidivalkude süntees ORF2 lugemisraamilt alustatakse nakatunud rakkudes ajaliselt hiljem kui ORF1 pealt (Moore *et al.*, 1980). Khong *et al.*, 2016 pakub välja, et IGR IRES indutseerija sünteesitakse ORF1 pealt, kuna ORF1 valgusüntees toimub läbivalt kogu infektsiooni ajal, kuid ORF2 geenide translatsiooni algab umbes 2 kuni 3 tundi pärast CrPV infektsiooni (Khong *et al.*, 2016). Khong'i teadustöö tõestab, et CrPV avatud lugemisraamide translatsioonide ajaline nihe ei ole põhjustatud rakuliste protsesside poolt (Khong *et al.*, 2016).

1.2. Viiruslikud proteaasid

Proteolüüs on peptiidsidemete hüdrolyüs, mille käigus lõhutakse substraat väiksemateks fragmentideks (Ehrmann, Clausen, 2004). Proteaasid on proteolüütilise aktiivsusega ensüümid, mis on rakkudes ja viirustes funktsionaalselt mitmekesised (Ehrmann, Clausen, 2004). Viirusliku proteaasi peamine ülesanne on lõigata viiruse mRNA pealt sünteesitud polüproteiini peptiidsidemeid, et aktiveerida viiruse valgud (Zephyr *et al.*, 2021). Seetõttu on proteaasid viirustele olulised ensüümid replikatsiooni toimumiseks ning kapsiidi moodustamiseks. Osad viirused kasutavad proteaasi ka selleks, et häirida peremeesorganismi geenide ekspressiooni inhibeerides rakulist transkriptsiooni ja translatsiooni (Chen *et al.*, 2019; Martinez *et al.*, 2003). Viiruse proteaas on hea sihtmärk viirusevastases ravis, kuna proteaasi inhibitsioon takistab viiruse eluks vajalike protsesside toimumist (Pisano, Supuran, 2025).

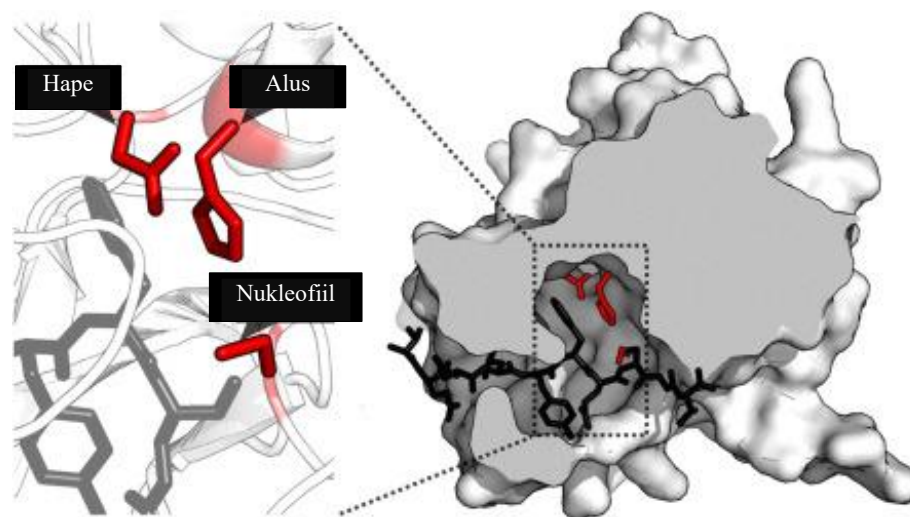
1.2.1. Viiruslike proteaaside struktuur ja klassifikatsioon

Proteaasi molekul sisaldab substraadiga seonduvat ala, mis seob substraadi ajutiselt proteaasiga kuni proteolüüs on teostatud, ja katalüütilist ala, kus toimub substraadi peptiidsideme hüdrolüüs (Joonis 2) (Sharma, Gupta, 2017). Proteaasi katalüütilise ala moodustavad katalüütilise tsentri aminohapped.



Joonis 2. Proteaasi struktuur. Sinisega on näidatud proteaasi substraadiga seondumise ala ja punasega on näidatud proteaasi katalüütiline tseenter. Must joon esindab proteaasiga seonduvat substraati. (Kohandatud Shafee, 2015 järgi)

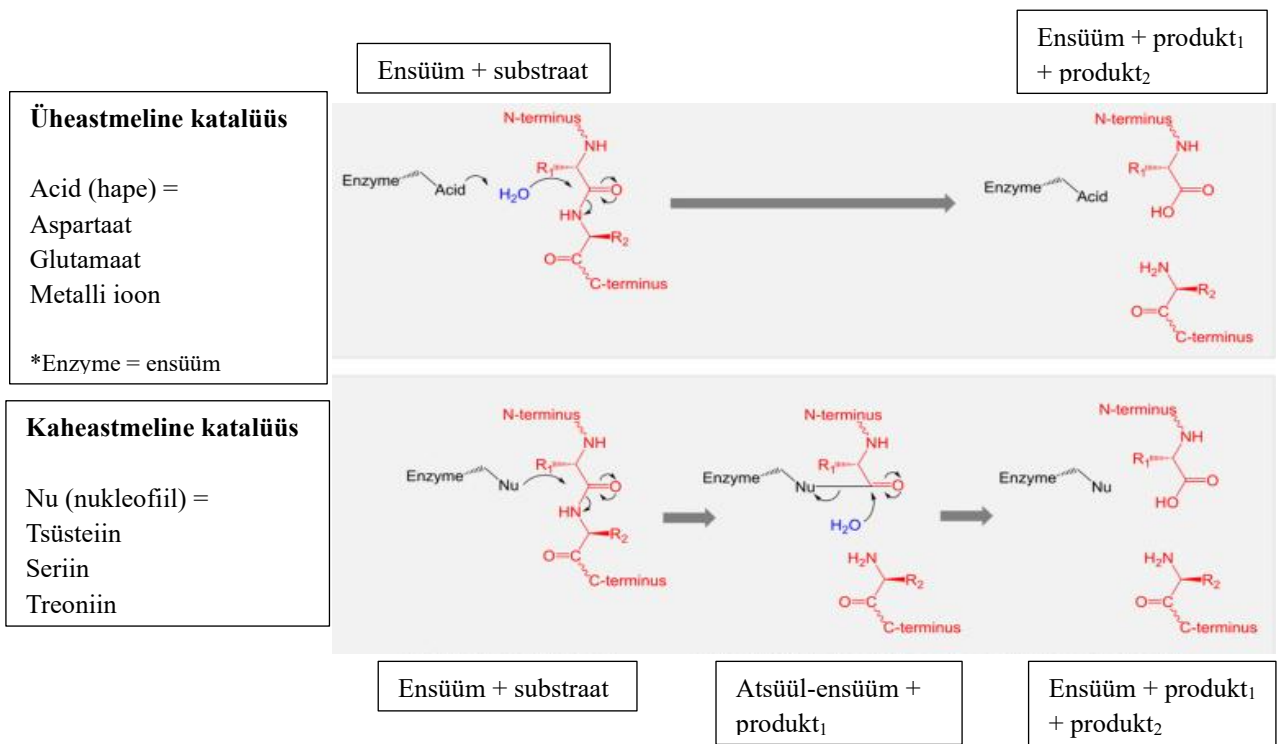
Tobacco etch viiruse proteaasi ja substraadi seondumise mudel joonisel 3 annab ettekujutuse, kuidas proteaasi katalüütilise tsentri aminohapped asetsevad substraadi suhtes. Punasega märgitud aminohapped moodustavad proteaasis katalüütilise tsentri, mis lõikavad peptiidsidet kui proteaasi substraadiga seonduv ala on substraadi keeranud õige nurga alla (Joonis 3).



Joonis 3. *Tobacco etch* viiruse seriini proteaasi katalüütiline triaad. Üldine joonis proteaasi ja substraadi seondumise kohta, milles punasega on märgitud proteaasi katalüütiline tsentri aminohapped ja mustaga substraadi peptiidahel. (Kohandatud Shafee, 2013 järgi)

Proteaasi substraadi eelistus sõltub proteaasi katalüütilisest tsestrist. Viiruste proteaasid erinevad omavahel katalüütilise tsentri aminohapete triaadist, kus on tavaliselt esindatud happeline, aluseline ja nukleofiilne aminohape (Rao *et al.*, 1998). Viiruste proteaasides esineb järgmiseid katalüütilise tsentri aminohapete kombinatsioone: Ser-His-Asp, Cys-His-Asp, Ser-His-His, Ser-Glu-Asp ja Ser-cisSer-Lys (Sharma, Gupta, 2017). Proteaasid jagatakse vastavalt aktiivsaidile klassidesse, millest tüüpilisemad klassid on seriini proteaasid, tsüsteiini proteaasid, treoniini proteaasid, asparagiinhappe proteaasid, metalloproteaasid (Dweh, Choudhury, 2023).

Viiruslikud proteaasid jaotuvad endo- ja eksopeptidaasideks. Endopeptidaasid teostavad proteolüüsi substraadi peptiidahela keskelt ning eksopeptidaasid peptiidahela otsast eraldades ahelast viimase aminohappe (Otín, Bond, 2008). Proteaasi katalüütilise tsentri aminohapped määravad ära, missugune on substraadi peptiidsideme lõikemehhanism – ühe- või kaheastmeline katalüüs (Sharma, Gupta, 2017). Üheastmelises katalüüsis aktiveeritakse vee molekul, mis nukleofiilina seondub substraadiga ja selle tulemusel eraldub aminohappe jääk (Joonis 3). Kaheastmeline katalüüs kasutab proteaasi katalüütilise tsentri nukleofiilset aminohapet, mis käitub sarnaselt vee molekulile üheastmelises katalüüsis (Joonis 4). Üheastmelist katalüüsi kasutavad asparagiinhappe, glutamaat ja metalloproteaasid ning kaheastmelist kasutavad katalüüsi kasutavad seriini, treoniini ja tsüsteiini proteaasid (Sharma, Gupta, 2017).



Joonis 4. Erineva katalüütilise tsentriga proteaaside lõikemehhanism – üheastmeline ja kaheastmeline katalüüs. (Kohandatud Shafee, 2013 järgi)

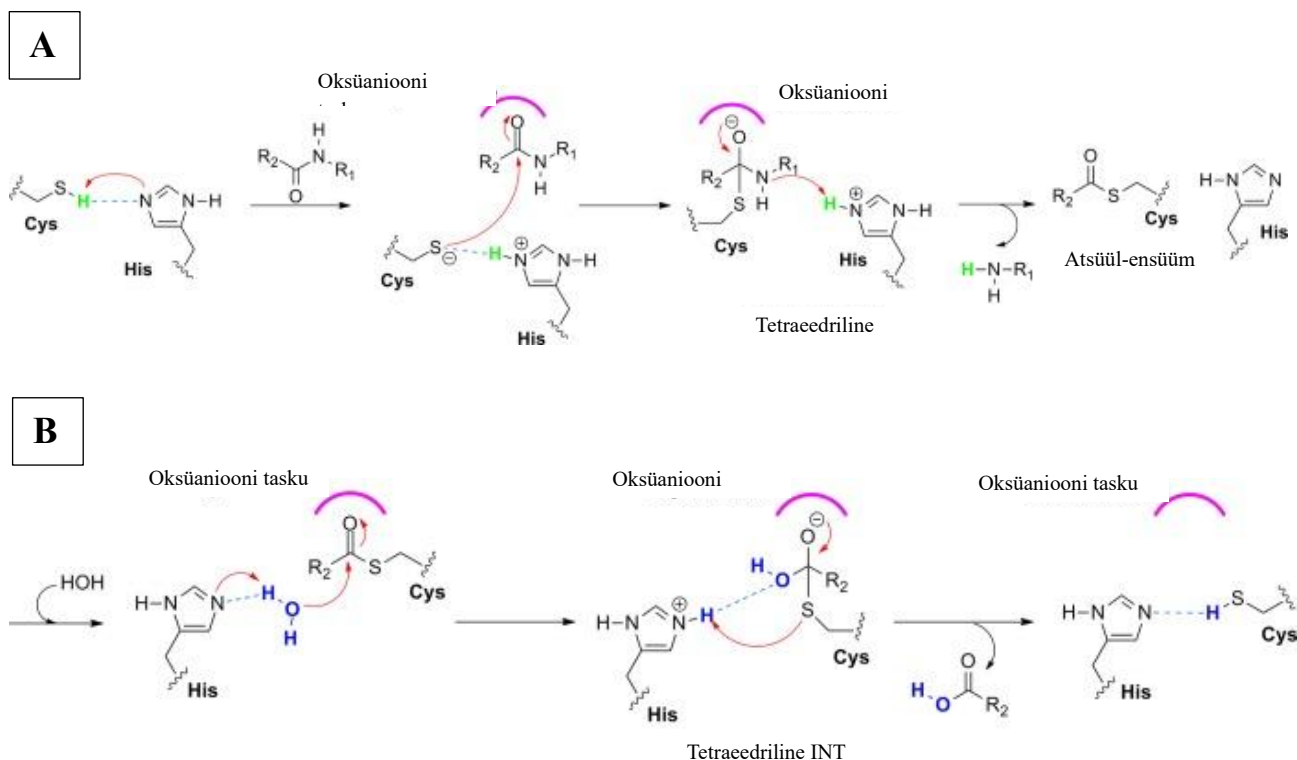
1.2.2. Tsüsteiini proteaasi lõikemehhanism

Tsüsteiini proteaasid on endonukleasid, mis kasutavad substraadi lõikamiseks kaheastmelist mehhanismi. Tsüsteiini proteaasi iseloomustab selle katalüütilises tsentris esinev tsüsteiin-histidiin-asparagiin (Cys-His-Asn) triaad (Verma, 2016). Katalüütilise tsentri aminohapped asuvad primaarstruktuuris üksteisest kaugel, kuid voltumise ja tertsiaarstruktuuri moodustumise käigus koonduvad katalüütilisse tsentrisse kokku (Sharma, Gupta, 2017).

Tsüsteiini proteaasi aminohapete kolmikus vastutab asparagiin (Asn) histidiini imidasooli rõnga orientatsiooni eest ning tsüsteiin (Cys) loovutab prootoni aluselisele histidiinile (His) (Grzonka *et al.*, 2007). Ilma vesinikuta on tsüsteiin nukleofiilne, mistõttu seondub substraadi peptiidisideme karbonüülse süsinikuga ning substraadi ja proteaasi vahel moodustub tetraeedriline struktuur (Joonis 5). Seejärel toimub prootonite ülekande ahelreaktsioon, mille tulemusel taastatakse algne histidiini jääk, üks substraadi fragment eraldub ning teine jääb seotuks tsüsteiiniga. Sellega lõpeb kaheastmelise lõikemehhanismi esimene etapp. Mehhanismi teine etapp kujutab endast vee molekuli interaktsiooni proteaasi histidiiniga ning tsüsteiiniga seotud substraadi jäägiga (Joonis 5). Sarnaselt eelmises etapis tsüsteiinile loovutab vee molekul histidiinile vesiniku ning seondub substraadi karbonüülse süsinikuga moodustades tetraeedrilise struktuuri. Histidiin loovutab vee molekulilt saadud vesiniku tsüsteiini jäägile

ning proteaasi küljest eraldub substraadi teine fragment. Tulemuseks on proteaasi taastunud struktuur ning fragmenteeritud substraat.

Joonis 5. Tsüsteiini proteaasi kaheastmeline lõikemehhanism. (A) Esimeses etapis eraldub

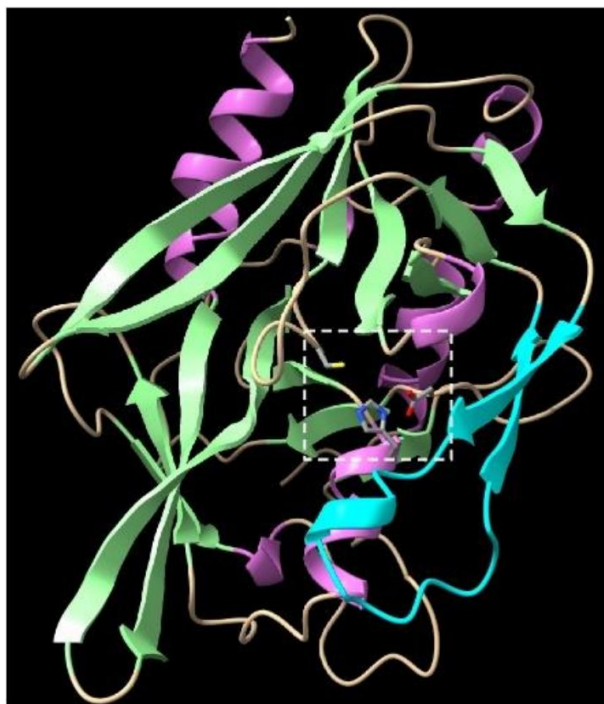


substraadi üks fragmet ja (B) teises eraldub teine fragment. Lühendid Cys on tsüsteiin ja His on histidiin. Oksüaniooni tasku stabiliseerib negatiivse laenguga hapniku. INT on *intermediate* ehk vaheetapp. (Kohandatud Grzonka *et al.*, 2007 järgi)

1.2.3. Kilgi halvatuse viiruse 3C tsüsteiini proteaas

Kilgi halvatuse viiruse 3C sarnane proteaasi geen asub viiruse genoomis esimeses avatud lugemisraamis (ORF1) *VPg* ja *RdRp* geenide vahel ning transleeritakse 5'UTR IRES vahendusel (Joonis 1). Kuna *Picornaviridae* sugukonna viiruste ensüüm kannab 3C proteaasi nime, siis sellega homologset *Dicistroviridae* viiruste proteaasi on teadusartiklites läbivalt nimetatud 3C sarnaneks proteaasiks (siin edaspidi kui 3C proteaas).

Kümotrüpsiini sarnast CrPV 3C proteaasi struktuuri on ennustatud Yuan, Kadowaki, 2022 töös *AlphaFold2* abil (Joonis 6). Viiruse 3C proteaasi katalüütilise tsentri aminohapped on näidatud 3D struktuuris punktiirjoonega tähistatud kasti sees – sinisega on tähistatud histidiin, punasega asparagiin ja kollasega tsüsteiin (Joonis 6).



Joonis 6. Kilgi halvatuse viiruse 3C proteaasi struktuur. Roosa värv tähistab α -heelikseid, heleroheline β -lehti, helesinine β juukesnõela ja beež linnu regioonid. Proteaasi katalüütiline tsenter on joonisel punktiinjoonega tähistatud kasti sees. (Yuan, Kadowaki, 2022)

Dicistroviridae viiruste, sealhulgas CrPV ORF1 aminohappeliste järjestuste joondusest on järeldatud, et 3C proteaasi katalüütilise tsentri tsüsteiini motiiv on GXCG (Nakashima, Nakamura, 2008). 3C proteaasi motiivis tähistab X täpsustamata aminohapet, kuna selle positsiooni aminohape varieerub joondatud viirustes ning tähed G ja C on oma positsioonis konserveerunud aminohappeid vastavalt glütsiin ja tsüsteiin. Motiivi tsüsteiin on 3C proteaasi katalüütilise tsentri nukleofiil (Nakashima, Nakamura, 2008).

3C proteaas hüdrolüüsib CrPV polüproteiini spetsiifiliste aminohapete vahelisi peptiidsidemeid ning muudab seeläbi viirusvalgud funktsionaalseteks. Lisaks teiste viirusvalkude välja lõikamisele lõikab 3C proteaas ka omaenda järjestuse polüproteiinist välja, kuna omab autoproteolüütilist aktiivsust (Nakashima, Nakamura, 2008). CrPV 3C proteaasi potentsiaalsete lõikesaitide järjestused on toodud tabelis 1 (Veeremaa, 2024).

Tabel 1. CrPV genoomi P2 ja P3 regiooni 3C proteaasi ennustatud lõikesaidid ja nende aminohappelised järjestused. Lõikamise koht on valgusjärjestustes tähistatud kaldkriipsuga „/“. (Kohandatud Veeremaa, 2024 järgi)

Positsioonid, substraadid	Järjestus (P6-P6')	Viide
VP2/VP4	ARIYAQ/AAKELK	(Nakashima & Nakamura, 2008)
VP3/VP1	SRIVAQ/VMGEDQ	(Nakashima & Nakamura, 2008)
2B/2C	KIPGKQ/DWDNYI	(Brito, 2018)
2C/3A	SRTVAQ/GGSETS	(Nakashima & Nakamura, 2008)
VPg/3C	KEAETQ/GCSDPA	(Brito, 2018)
3C/RdRp	NNITVQ/CCFEPP	(Nakashima & Nakamura, 2008)

Dicistroviridae liikide polüproteiinide aminohappelise joodnuse põhjal on ennustatud viiruse proteaasi lõikesaite (Brito, 2018; Nakashima, Nakamura, 2008). Nobuhiko Nakashima eestvedamisel on kaardistatud *Dicistroviridae* viiruste viirusvalkude (VPg) lõikesaidid (Nakashima, Shibuya, 2006), P3 regiooni valkude lõikesaidid (Nakashima, Nakamura, 2008) ning P2 regiooni valkude lõikesaidid (Nakashima, Ishibashi, 2010). Lisaks Nakashima töödele on CrPV 3C proteaasi substraadi spetsiifilisust uuritud ka R. N. Brito ning A. Veeremaa magistritöös.

Käesolevas töös on fookuse all CrPV 3C proteaasi autoproteolüütiline lõikesait 3C/RdRp. Proteaasi (3C) ja polümeraasi (RdRp) vaheline lõikesait viidi mudelsubstraati ning proteaasi ja substraadi valguga teostati lõikereaktsioon.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Uurimistöö raames sooviti testida, kas kilgi halvatus viiruse 3C proteaas lõikab varasemalt ennustatud viiruse genoomi lõikesaiti. Lõikereaktsioonis kasutatud proteaas puhastati Veeremaa, 2024 magistritöös.

Käesoleva töö eesmärgid olid järgmised:

- konstrueerida CrPV 3C proteaasi 3C_RdRp lõikesaiti sisaldav plasmiid;
- ekspresseerida ja puhastada CrPV 3C proteaasi mudelsubstraat;
- testida mudelsubstraadi CrPV 3C proteaasi lõikesaidi lõigatavust 3C proteaasi poolt.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Töös kasutatud bakteritüved ja nende kasvusöötmed

Töös kasutatud *E. coli* DH5- α ja *E. coli* BL21 (DE3) bakteritüvede genotüübid on välja toodud tabelis 2.

Tabel 2. Töös kasutatud *E. coli* tüved. (Veeremaa, 2024)

Tüve nimi	Genotüüp
<i>E. coli</i> DH5- α	Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK +) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F -ompT gal dcm hsdSB(rB-, mB-) λ (DE3[lacI lacUV5T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λ S)

Bakterirakke kasvatati LB ja 2xYT söötmetes, mis sisaldasid antibiootikumi ampitsilliin kontsentratsioonis 100 μ g/ml. 2xYT erineb tavalisest LB söötmetest selle poolest, et sisaldab rohkem trüptooni ja vähem soola – 1% pärmiekstrakti, 1,6% trüptooni, 0,5% NaCl. Tardsöötme valmistamiseks lisati vedelsöötmele 1,5% agarit. Tardsööde tahenes toatemperatuuril Petri tassil ning seda säilitati kuni edasise kasutamiseni 4 °C juures. Bakterikolooniate saamiseks plaaditi rakulahus tardsöötmele ning inkubeeriti üleöö 37 °C juures. Vedelsöötmes kasvatati *E. coli* DH5- α rakke 37 °C juures ning BL21 (DE3) rakke 37 °C või 30 °C juures loksutil kiirusega 180 rpm/min.

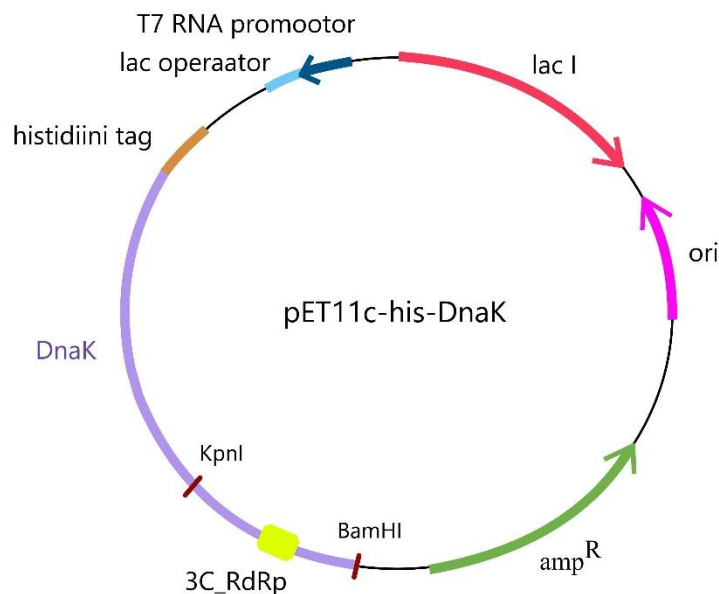
2.2.2. Plasmiidide konstrueerimine

Kõik töös kasutatud praimerid ja plasmiidid on välja tootud tabelis 3.

Tabel 3. Töös kasutatud praimerid ja plasmiidid

Praimeri nimi	Praimeri järjestus 5' - 3'
3C_RdRp_Forw	TCA CCG TCC AGT GCT GCT TCG AGC CGC CTT CGG ACG AAG AGA TCG AGC GTA TGG
3C_RdRp_Rev	TCG AAG CAG CAC TGG ACG GTG ATG TTG TTC AGA CCG GAG TTG GCC TTG ATC
3C_RdRp_MUT_Forw	TCA CCG CCG AGC CTT GCT TCG AGC CGC CTT CGG ACG AAG AGA TCG AGC GTA TGG
3C_RdRp_MUT_Rev	TCG AAG CAA GGC TCG GCG GTG ATG TTG TTC AGA CCG GAG TTG GCC TTG ATC
DnaK_KpnI_Forw	GTTTATGACCTGGGTGGTGGTACCTTCGACGTTTCG
DnaK_BamHI_Rev	GTTAGCAGCCGGATCCCCCGGGATTACTGCTTGTTG
Plasmidi nimi	Päritolu
pET_his_DnaK	(Ainelo <i>et al.</i> , 2016)
pDnaK_3C_RdRp_wt	Selles töös valmistatud
pDnaK_3C_RdRp_mut	Selles töös valmistatud

CrPV 3C proteaasi lõikesaite ekspresseerivate plasmiidide pDnaK_3C_RdRp_wt ja pDnaK_3C_RdRp_mut (Joonis 7) valmistamiseks kloneeriti lõikesaitide järjestused ekspressiooniplasmidi pET-hisDnaK (Ainelo *et al.*, 2016). pET-hisDnaK plasmiid on saadud vektorist pET11c, millesse on sisse viidud *P. putida* tsäperonvalgu geeni DnaK järjestus ning N-terminaalsesse otsa on kloneeritud heksahistidiini geen. Lisaks sisaldab pET11c vektor ampitsilliini resistentsusgeeni ja T7 promootoriga *lac* operoni süsteemi.



Joonis 7. Käesolevas töös konstrueeritud pDnaK_3C_RdRp plasmiid. Kilgi halvatus viiruse 3C proteaasi metsiktüüpi ja mutantne lõikesait sisestati pET-his-DnaK vektorisse T7 RNA promootori alla restriksioonisaitide KpnI ja BamHI vahele. pET vektor sisaldab ampitsilliini selektsioonimarkerit, *lac* operoni süsteemi repressorgeeni *lacI* ja *lac* operaatorit.

Plasmiidi kloonimiseks sobiv CrPV 3C proteaasi lõikesaidi *3C_RdRp* järjestus loodi *overlap extension* PCR meetodil. Esimeses etapis PCR meetodil paljundatudprodukte kasutati järgmise PCR reaktsiooni maatriksina (Joonis 9). Metsiktüüpi järjestuse loomiseks kasutati praimereid 3C_RdRp_Forw, 3C_RdRp_Rev, DnaK_KpnI_Forw, DnaK_BamHI_Rev ning mutantse järjestuse loomiseks kasutati praimereid 3C_RdRp_MUT_Forw, 3C_RdRp_MUT_Rev, DnaK_KpnI_Forw, DnaK_BamHI_Rev (Tabel 3). Lõikesaitide aminohappelised järjestused olid TVQCCF (metsiktüüpi lõikesait) ja TAEPFCF (mutantne lõikesait).

PCR reaktsioonisegu proteaasi lõikesaiti sisaldavate järjestuste loomisel oli koostiselt järgmine – sünteesitavale lõigule vastavad praimerid, 3C proteaasi DNA järjestus, nukleaasi-vaba vesi, 5xPhusion GC enhanser ja 2xPhusion Plus Green Master Mix (*Thermo Scientific*). DH5- α rakkudes plasmiidide paljundamise kontrollimiseks oli PCR reaktsioonisegu sisalduselt järgmine - 5x Firepol Master Mix (*Solis Biodyne*), rakkudest eraldatud plasmiidne DNA, nukleaasi-vaba vesi, praimerid DnaK_KpnI_Forw ja 3C_RdRp_REV. PCR katsetes kasutati standardprogrammi, mille kohandamisel sõltus DNA ahela sünteesi etapp sünteesitava DNA ahela pikkusest.

PCR standardprogramm:

95 °C	30 sek	DNA ahelate denaturatsioon
95 °C	20 sek	DNA ahelate denaturatsioon
55 °C	20 sek	praimerite seondumine
72 °C	30 sek	DNA ahela süntees
72 °C	5 min	lõplik DNA ahela süntees
4 °C	-	säilitamine (pole ajaliselt piiratud)

PCR reaktsioonides saadud DNA lõike analüüsiti agarose geel-elektroforeesi meetodil. 1%- või 2%-line agarosegeeli valmistamiseks lahustati agarosepulber 1x TBE puhvris (100 mM Tris, 100 mM boorhape, 2 mM EDTA). DNA visualiseerimiseks UV-kiirguse all lisati geelile etiidiumbromiidi (0.5 ug/mL). DNA pikkuseid hinnati 100 bp või 1 kb markeri abil (*Thermo Scientific*). Geel-elektroforees toimus tingimustel 100–120 V ligikaudu 40 min. Geelist lõigati välja sobiva suurusega DNA lõik, mis puhastati *FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit*-iga järgides tootjapoolset protokollit (*FavorPrep*). Plasmiidne DNA puhastati rakkudest kas *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit* (*FavorPrep*) või *Gene JET Plasmid Maxiprep Kit* (*Thermo Scientific*) tootjapoolse protokollit alusel.

CrPV 3C proteaasi lõikesaiti sisaldava täispika järjestuse otsad lõigati restriktiooniensüümidega *BamHI* ja *KpnI*. Restriktatsioon viidi samade ensüümidega läbi ka pET-his-DnaK vektoriga, et insert-DNA otsad sobituksid plasmidi otstega. Restriktiooni reaktsioonisegu sisaldas järgmisi komponente – 1x*BamHI* puhver (10%), restriktiooniensüümid *BamHI* (0.25U/ul) ja *KpnI* (0.25U/ul) (*Thermo Scientific*), lõigatav DNA molekul (8 ng/ul) ja dH₂O. Plasmidi restriktioonil lisati segusse 300 ng pET-his-DnaK. Restriktioonireaktsioon kestusega 3 tundi viidi läbi 37 °C juures. Plasmidi restriktioonisegule lisati 3 tunni möödudes 1 ul FastAP ensüümi (*Thermo Scientific*) DNA 5' otste defosforüleerimiseks, mille järgselt inkubeeriti reaktsioonisegu veel 30 min 37 °C juures.

CrPV 3C proteaasi metsiktüüpi ja mutantse lõikesaidi järjestused ligeeriti pET-his-DnaK vektorisse. Ligatsiooni reaktsioonisegu sisaldas järgmisi komponente – T4 ligaasi puhver (10%), T4 DNA ligaas (0.5U/ul), restriktasidiga lõigatud pET-his-DnaK vektor (37.2 ng/ul), restriktasidiga lõigatud 3C proteaasi lõikesaidiga DNA järjestus. Kontroll-reaktsiooni lisati küll restriktasiga lõigatud pET-his-DnaK vektor, kuid inserdi asemel lisati segusse vesi. Ligatsioonisegusid inkubeeriti 2 tundi 20 °C juures. Ligatsioonireaktsiooni produktideks olid plasmiidid pDnaK_3C_RdRp_wt ja pDnaK_3C_RdRp_mut.

2.2.3. Plasmiidide transformatsioon *E. coli* DH5- α rakkudesse

Plasmiidide paljundamiseks ja selekteerimiseks transformeeriti pDnaK_3C_RdRp_wt ja pDnaK_3C_RdRp_mut plasmiidid *E. coli* DH5- α rakkudesse. Transformatsiooniks segati kokku 5 μ l plasmiidi (100 ng) 50 μ l DH5- α bakterirakkudega. Pärast 30 min jääl hoidmist tekitati rakkudele kuumašokk (1,5 min 42 °C) ning rakud asetati 3 minutiks taas jääle. Rakulahusele lisati 500 μ l LB söödet ning kasvatati 37 °C segajal 1 h loksutuskiirusel 1000 rpm. Rakud tsentrifuugiti tuubide põhja 1 min toatemperatuuril loksutuskiirusel 5000 rpm. Seejärel eemaldati 400 μ l lahust, allesjäänud sade ja sööde (umbes 100 μ l) suspendeeriti ning plaaditi ampitsilliini (100 μ g/ml) sisaldavatele LB tardsöötmele. Rakke inkubeeriti üleöö (12-16 h) 37 °C juures.

LB tardsöötmeelt kogutud rakukolooniad pandi kasvama 2 ml 2xYT vedelsöötmesse, millele oli lisatud ampitsilliini (100 μ g/ml). Rakkude kasvatamine toimus üleöö 37 °C juures loksutuskiirusel 180 rpm. Plasmiidid pDnaK_3C_RdRp_wt ja pDnaK_3C_RdRp_mut puhastati DH5- α rakkudest välja kasutades *Plasmid Extraction Mini Kit* tootjapoolset protokoll (FavorPrep). *Thermo Scientific NanoDrop* spektrofotomeetriaga mõõdeti proovide DNA kontsentratsioon lainepikkusel 260 nm. Eraldatud plasmiidid paljundati PCR meetodil standardtingimustel praimeritega DnaK_KpnI_Forw ja 3C_RdRp_REV. PCR proovid analüüsiti agarose geleelektroforees meetodil ning kioneeritud järjestuste korrektsuse kontrollimiseks sekveneeriti plasmiidid Tartu Ülikooli genoomikainstituudi tuumiklaboris.

Geelianalüüside ja sekveneerimistulemuste põhjal valiti välja proov, mis taaskord transformeeriti *E. coli* DH5- α rakkudesse. Seekord kasvatati LB-Amp tardsöötmeelt valitud kolooniaid 35 ml 2YT-Amp vedelsöötmes üleöö 37 °C juures loksutuskiirusel 180 rpm. Järgmine päev tsentrifuugiti lahuseid 5 min 4500 rpm, lahustuv fraktsioon eemaldati ning rakusademest eraldati plasmiidne DNA *GeneJET Plasmid Maxiprep Kit* tootjapoolse protokoll alusel (*Thermo Scientific*). Tulemuseks saadi suurema kontsentratsiooniga plasmiidide pDnaK_3C_RdRp_wt ja pDnaK_3C_RdRp_mut lahused.

2.2.4. Kompetentsete rakkude valmistamine ning plasmiidide transformatsioon *E. coli* BL21 (DE3) rakkudesse

Valkude ekspressiooni jaoks transformeeriti pDnaK_3C_RdRp_wt ja pDnaK_3C_RdRp_mut plasmiidid *E. coli* BL21 (DE3) rakkudesse. Transformatsiooniks kompetentsete rakkude loomiseks segati rakud kokku 2 ml LB vedelsöötme ja 20 μ l MgSO₄ (1M) lahusega. Rakke kasvatati 2 h 37 °C juures loksutil kiirusega 180 rpm. Tsentrifugimisel (5 min, 4 °C, 2500 rpm)

kogutud rakud pesti esmalt 500 µl CaCl₂ lahusega (100 mM) ning seejärel 250 µl CaCl₂ lahusega (100 mM). Plasmiidse DNA transformatsiooniks bakterirakkudesse suspendeeriti kokku 100 ng kloneeritud plasmidi ja 50 µl BL21 (DE3) kompetentseid bakterirakke. Transformatsiooni jaoks plasmiidilahuse koguse arvutamiseks mõõdeti DNA kontsentratsioon *Thermo Scientific NanoDrop* spektrofotomeetriaga. Uuritavate plasmiidide transformatsioon BL21 (DE3) rakkudesse oli sama meetodikaga nagu eespool kirjeldatud DH5-α rakkudesse ning lõppes rakulahuse plaatimisega LB-Amp Petri tassile.

2.2.5. CrPV 3C proteaasi substraadi ekspressioon

pDnaK_3C_RdRp_wt ja pDnaK_3C_RdRp_mut plasmiididega transformeeritud *E. coli* BL21 (DE3) rakke kasvatati 20 ml LB-Amp söötmes (100 µg/ml ampitsilliini) üleöö 37 °C juures loksutuskiiirusega 180 rpm. Järgmisel päeval tehti rakkudest 200 ml LB-Amp söötmesse 100x lahjendus ning neid kasvatati 30 °C juures loksutil kiirusega 180 rpm kuni lahuse optiline tihedus oli OD₆₀₀=0,6. Rakkudele lisati IPTG ehk isopropüül-beeta-D-tiogalaktopüranosiid (0,5 mM) ning lahust indutseeriti 3 h 30 °C juures. Lahustest eraldati geelianalüüsi jaoks proovid enne IPTG indutseerimist ja pärast IPTG indutseerimist. Indutseerimisest allesjäänud lahused tsentrifuugiti 15 min 4 °C juures kiirusega 4000 rpm. Lahustuv fraktsioon eemaldati ja rakusade suspendeeriti külmas 40 ml autoklaavitud *Milli Q* vees. Rakusegu valati ümber suurde 50 ml tuubi ning tsentrifuugiti 10 min 4 °C juures kiirusega 4000 rpm. Fuugitopsidest eemaldati lahustuv fraktsioon ning allesjäänud rakusade säilitati vedellämmastiku töötluste järgselt -80 °C kapis.

Jää peal üles sulanud rakusade suspendeeriti külmas 4 °C 40 ml lüüsipuhvril (50 mM Tris pH 8,0; 0,5 M NaCl; 10 mM imidasool; *Milli Q*), millele oli lisatud 4 mg/ml lüsotsüümi (*AppliChem*). Rakud ja lüüsipuhver segati *vortexil* ning hoiti 20 min jääl. Rakulahus jagati 20 ml kaupa tuubidesse. Rakususpensioon sonikeeriti 5 korda 10-sekundilise tsükliga 60%-lisel võimsusel (*Bandelin Sonopuls*). Sonikeeritud lahused valati fuugitopsidesse, vajadusel tasakaalustati külma lüüsipuhvriga ning tsentrifuugiti SS34 RC5 rootoriga (*Sorvall RC-5B Plus*) 20 min 4 °C juures kiirusega 10 000 rpm. Lahustuv fraktsioon pipeteeriti üle teise tsentrifuugi topi ja rakusade suspendeeriti üles külma lüüsipuhvriga, lahjendati ning sellest eraldati geelianalüüsi jaoks proov. Lahustuv fraktsioon tsentrifuugiti uuesti 20 min 4 °C juures kiirusega 10 000 rpm SS34 RC5 rootoriga. Sonikeeritud lahused filtreeriti 0,45 µm filtriga suurde (50 ml) tuubi ning filtreeritud lahusest eraldati analüüsiks proov "lahustuv fraktsioon".

SDS-PAGE (naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiid geelelektroforees) geeliga analüüsiti lahuste valgusisaldusi molekulmassi järgi. SDS geeli jaoks valmistati standardse labori protokollil kaks lahust: 12% lahutav (30% bisakrüülamiid; Tris puhver pH 8,8 (1,5 M); 10% SDS; 10% naatriumpersulfaat; TEMED ja *Milli Q*) ja 5% konsentreeriv lahus (30% bisakrüülamiid; Tris puhver pH 6,8 (1,0 M); 10% SDS; 10% naatriumpersulfaat; TEMED ja *Milli Q*). Lahutava lahuse peale pipeteeriti 1 ml *Milli Q* vesi, et geelidevaheline pind jääks sile. Kui lahutava lahuse kiht oli tahenenud, siis eemaldati vesi ning pipeteeriti selle peale kontsentreeriv lahus, mille järgselt lisati kohe geelipesasid tekitav sakkidega “kamm”. Tahenenud geel asetatati püstiselt elektroforeesi vanni, mis täideti 10%-lise puhvriga (Tris 25mM, glütsiin 192mM, SDS 0,1%). SDS polüakrüülamiid-geeli jaoks lisati proovidele 4x Laemmli laadimisvärvi seejärel kuumutati proove 5 min 95 °C juures ning tsentrifuugiti 5 min kiirusel 13 000 rpm. Valkude pikkuse määramiseks kasutati geelil valkude suurusmarkerit *PAGEruler, Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)*. Elektroforeesi järgselt värviti geelid *Coomassie InstantBlue (Thermo Scientific)* lahuses 20 min ning geelipildid jäädvustati FireReader V10 süsteemis UVITEC-1D tarkvaraga (*UVITEC Cambridge*).

2.2.6. CrPV 3C proteaasi lõikesaiti sisaldava valgu puhastamine

CrPV 3C proteaasi lõikesaitidega valkude puhastamine teostati kõrgsurve kromatograafia ÄKTATMpurifier (*GE Healthcare Life Sciences*) süsteemis kolonniga HisTrap FF, 1ml (*GE Healthcare Life Sciences*), mis kalibreeriti lüüsipuhvriga. Valgud puhastati puhvriga A (50 mM Tris pH 8, 0.5 M NaCl, 50 mM imidasool, *Milli Q*) ja puhvriga B (50 mM Tris pH 8, 0.5 M NaCl, 600 mM imidasool, *Milli Q*). Filtreeritud 40 ml valgulahuse elueerimise ajal enne fraktsioneerimist eraldati proov, mida hiljem analüüsiti SDS geelelektroforeesi meetodil. Kolonnile kinnitunud valk elueeriti lineaarselt alates imidasooli kontsentratsioonist 50 mM kuni 600 mM-ni 0,5 ml fraktsioonidena kiirusega 1 ml/min.

SDS-PAGE meetodil analüüsiti CrPV 3C proteaasi substraadi proove, mis koguti enne ja pärast indutseerimist, pärast indutseerimist rakusademest ja lahustuvast fraktsioonist, enne fraktsioneerimist valgulahuse esmasest läbivoolust ning fraktsioonidest. Kõiki proove koguti 10 ul, millele lisati 4x Laemmli puhvrit. Proove kuumutati 5 min 95 °C juures ning tsentrifuugiti 5 min 13 000 rpm juures. Proovid analüüsiti 10%-lisel SDS-PAGE geel-elektroforeesil ning valgu pikkuste määramiseks kasutati *Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)* valgumarkerit. Tulemuste visualiseerimiseks värviti geel *Coomassie InstantBlue (Thermo Scientific)* värviga. Geelipiltide põhjal valiti välja fraktsioonid, mille radadel oli kõige tugevam

valgu signaal ehk kõige suurem uuritava valgu kontsentratsioon ning need fraktsioonid puhastati dialüüsi meetodil.

Välja valitud fraktsioonid pipeteeriti 15 kDa läbilaskvusega dialüüsimembraani vahele (*Spectrum laboratories*). Dialüüsimembraan puhastati eelnevalt autoklaavitud *Milli Q* veega ning loputati dialüüsipuhvriga ning membraaniklambrid keedeti enne kasutamist *Milli Q* vees. Puhastatud valgud dialüüsiti 2 h 1,5 liitris ensüümi säilituspuhvril (20 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, *Milli Q*) segajal. Membraan tõsteti ümber sama koostisega värskesse 1,8 l puhvrisse ning hoiti 4 °C juures üleöö segajal.

Pärast dialüüsi mõõdeti *Bradford*'i meetodil CrPV 3C proteaasi lõikesaite sisaldavate valkude kontsentratsioon. Valkude kontsentratsioon määrati veise seerumi albumiini (BSA) kaliibergraafiku põhjal. Kokku segati BSA kontsentreeritud lahus, dialüüsipuhver ja 600 ul BSA reagent (*Coomassie Protein Assay Reagent; Thermo Scientific*). BSA kontsentreeritud lahus ja dialüüsipuhver kokku moodustasid lahusest 300 ul. Loodi 11 erineva BSA kontsentratsiooniga proovi, mille neelduvus mõõdeti spektrofotomeetriga 590 nm juures. Lahuste neelduvuse põhjal loodi graafik, mille lineaarvõrrandiga arvutati uuritavate valkude kontsentratsioon. Uuritavate valkude neelduvuse mõõtmiseks 590 nm juures segati kokku 290 ul dialüüsipuhvrit 10 ul uuritavat valku ja 600 ul BSA reagenti. Ülejäänud dialüüsitud valgulahus allikvooditi, külmutati vedellämmastikus ja säilitati temperatuuril -80 °C.

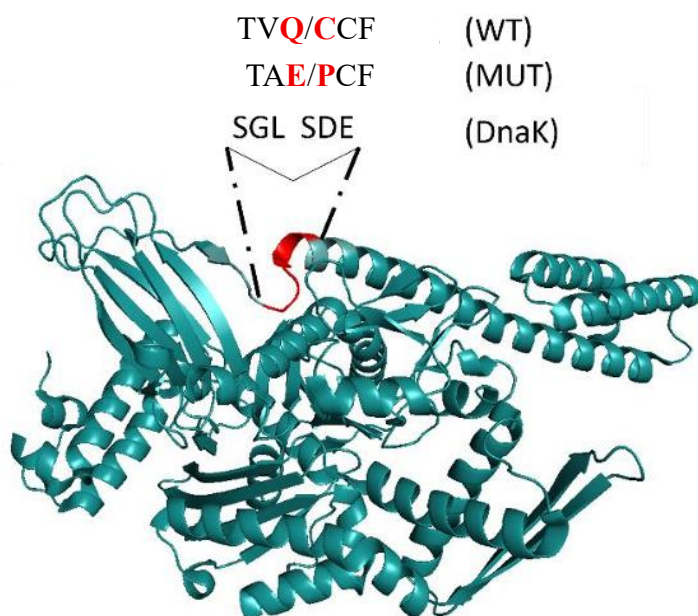
2.2.7. CrPV 3C proteaasi ja substraadi lõikereaktsioon

Lõikereaktsioonis segati kokku 0,1 ug CrPV 3C proteaas ja 1 ug substraat. Reaktsioonipuhver sisaldas järgmisi komponente – 20 mM HEPES-KOH pH 7,5; 100 mM NaCl; 2 mM DTT; *Milli Q*. Lõikereaktsioon inkubeeriti 30 °C juures 1 h. Proovidele lisati 5x SDS-PAGE laadimisvärvi, inkubeeriti 5 min 95 °C ning tsentrifuugiti 5 min kiirusel 13 000 rpm. Lõikereaktsioon analüüsiti 12%-lisel SDS-PAGE geelelektroforeesil. Valkude visualiseerimiseks värviti geelid *Coomassie InstantBlue*'ga (Thermo Scientific) ning pikkused määrati *Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) markeri alusel.

2.3. Tulemused

2.3.1. CrPV 3C proteaasi lõikesaiti sisaldava plasmidi konstrueerimine

Nagu eelnevalt mainitud, siis lõikab kilgi halvatuse viiruse 3C tsüsteiini proteaas viiruse polüproteiini funktsionaalseteks valkudeks (Seipelt *et al.*, 1999). Käesolevas töös uuritakse CrPV genoomis 3C proteaasi ja viiruse polümeraasi (RdRp) geenide vahelist lõikesaiti, mis on aminohappelise järjestusega TVQCCF (Tabel 1). Nimetatud järjestus on metsiktüüpi järjestus, mille kõrvale loodi laborikatsete kontrollimiseks mutantne järjestus aminohappelise järjestusega TAEPCF. Peptiidsideme hüdrolüüs toimub 3C_RdRp uuritavas järjestuses glutamiin (Q) ja tsüsteiin (C) vahel. Mutantses lõikesaidis oli võrreldes metsiktüüpi järjestusega välja vahetatud kolm aminohapet: valiin (V) asendatialaniiniga (A); glutamiin (Q) asendati glutamaadiga (E); proteaasi lõikekoha tsüsteiin (C) asendati proliiniga (P). CrPV 3C proteaasi lõikesaidi testimiseks disainiti mudelsubstraat, mis sisaldas 3C_RdRp geenide vahelist lõikesaidi nukleotiidset järjestust ehk konstrueeriti plasmiidid pDnaK_3C_RdRp_wt ja pDnaK_3C_RdRp_mut.



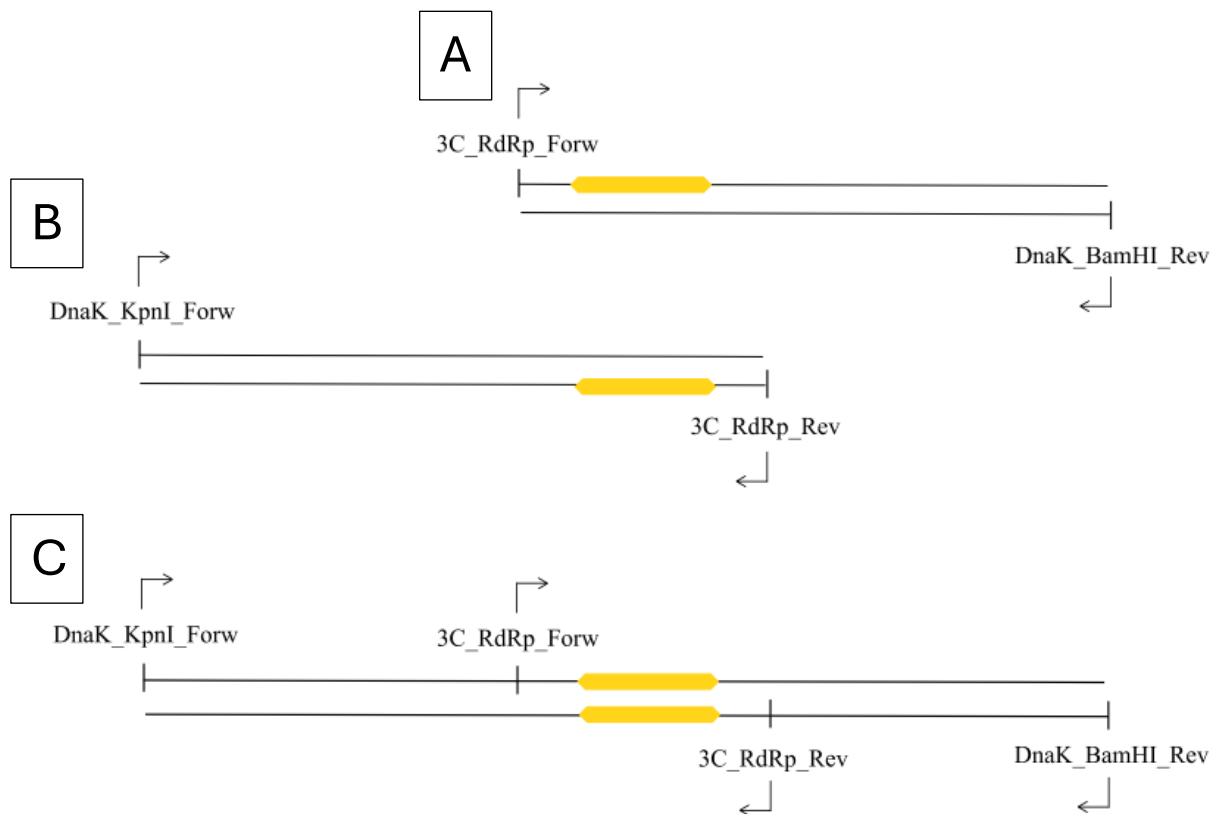
Joonis 8. Kilgi halvatuse viiruse 3C proteaasi metsiktüüpi (TVQ/CCF) ja mutantse (TAE/PCF) lõikesaidi asukoht DnaK mudelsubstraadis. Joonisel tähistab WT metsiktüüpi ja MUT mutantset lõikesaiti. (Kohandatud Veeremaa, 2024 järgi)

CrPV 3C proteaasi lõikesaidid kloonitati ekspressiooniplasmidi pET-his-DnaK, mille aluseks on pET11c vektor (Joonis 7). pET vektor sisaldab ampitsilliini (amp) resistentsusgeeni, mis aitab LB-Amp söötmel rakkudel ellu jääda ning selekteerib välja rakud, mis uuritavat plasmidi ei sisalda. Antud töös kasutati Ainelot *et al.*, 2016 teadustöös loodud ja Veeremaa, 2024

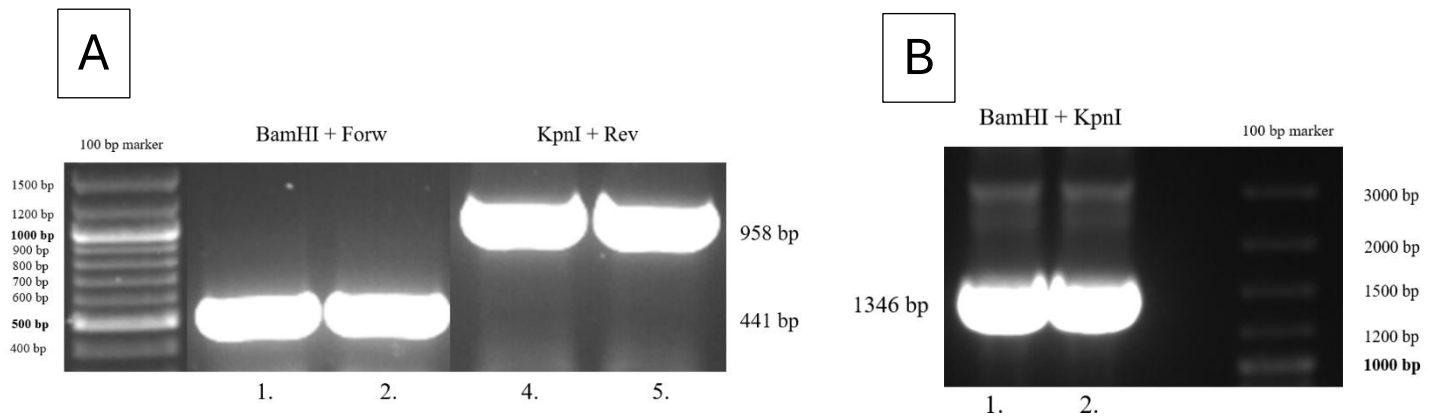
magistritöös kirjeldatud pET-his-DnaK mudelsubstraadi ekspressiooni süsteemi. Veeremaa töös otsiti CrPV 3C proteaasi ennustatud lõikesaitide järjestusi ribosoomide r-alkude pealt. Uuritav järjestus kloneeriti mainitud töös pET-his-DnaK plasmidi selle põhjal, et järjestus ekspresseeruks DnaK solvendipoolses lingu regioonis. Proteaasi ja substraadi lõikereaktsioonis on oluline, et substraadi lõikesait oleks proteaasile ligipääsetav. CrPV 3C_RdRp geenide vaheline lõikesait ekspresseeriti antud töös samal põhimõttel (Joonis 8).

Käesolevas töös kasutatud mudelsubstraadi põhiosa moodustab *P. putida* kuumašoki valk DnaK, mille geeni järjestuse sisse kloneeriti 3C proteaasi lõikesaidi järjestus. DnaK valku ekspresseeritakse *E. coli* rakkudes kõrgel tasemel, seega ekspresseeriti plasmiidid *E. coli* BL21 DE3 rakutüves (Ainelo *et al.*, 2016). Pärast lahuse tsentrifuugimist tekivad lahustuv ja lahustumatu fraktsioon, millest lahustuv on vedelikufaas ja lahustumatu on sade. DnaK valk jääb lahustuvasse fraktsiooni, mis võimaldab uuritava lõikesaidiga DnaK valku rakkudest välja puhastada. DnaK molekulmass on suurem CrPV 3C proteaasi molekulmassist, et saaks SDS geelelektroforeesi lõikereaktsiooni analüüsil eristada mudelsubstraati proteaasist. Lisaks DnaK valgule sisaldab pET vektor heksahistidiini järjestust, mille abil puhastatai kolonnkromatograafia meetodil uuritav valk lahusest välja.

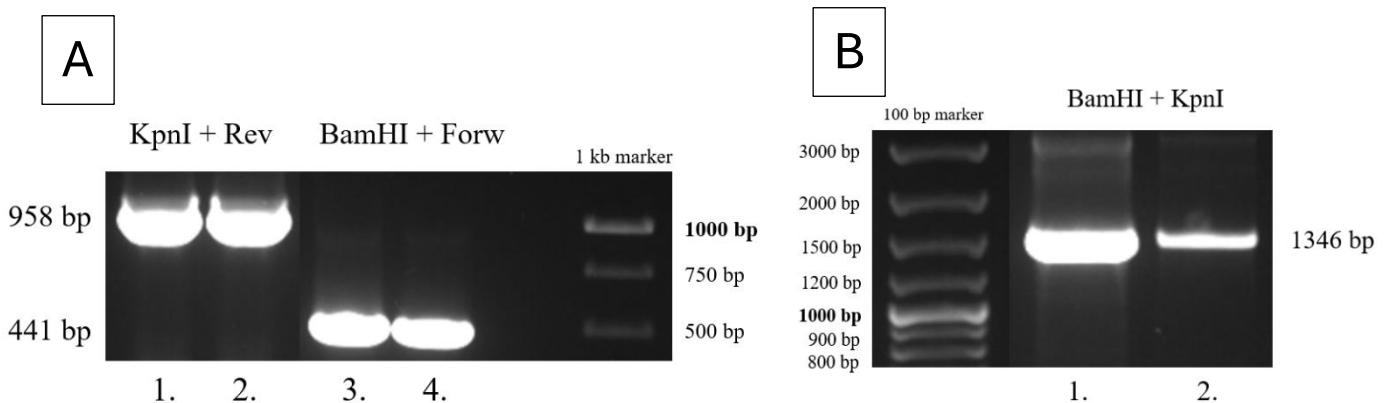
Plasmidi kloneerimise *overlap extension* PRC meetodi skeem on näidatud joonisel 9. Soovitud järjestuse saamiseks paljundati PCR meetodil üles kaks fragmenti, mida kasutati järgmise PCR reaktsioonil alus-järjestusena. Esimene fragment paljundati üles praimeritega *KpnI* ja *Rev* (*reverse*) ning teine fragment paljudati praeimeritega *BamHI* ja *Forw* (*forward*). Fragmentid jagasid järjestuses kattuvat ala, mida on joonisel 9 näha praimeri seondumiskohtade *Forw* ja *Rev* vahel. Tänu ühisele kattuvale alale moodustasid fragmendid šabloon vormi järgmise PCR reaktsiooni jaoks, mis viidi läbi praimeritega *KpnI* ja *BamHI* ning mille tulemuseks oli plasmidi kloneeritav terviklik järjestus. Joonisel 9 on kollasega ära märgitud lõikesaitide järjestuse asukoht, ülejäänud „joonest“, mis pole kollane, on DnaK geeni järjestus.



Joonis 9. Kilgi halvatuse viiruse 3C proteaasi 3C_RdRp_wt lõikesaidi täispika järjestuse loomine DnaK_BamHI_Rev (BamHI), DnaK_KpnI_Forw (KpnI) ja 3C_RdRp_Forw (Forw), 3C_RdRp_Rev (Rev) praimeritega. Kollase alaga on märgitud 3C_RdRp lõikesaidi järjestus ning nooltega praimerite sünteesi suund. (A) Kõigepealt sünteesiti kogu järjestusest pool fragmenti, (B) seejärel teine pool ning (C) joonisel A ja B fragmentide paljundamisel ühes PCR reaktsioonis moodustust tänu kattuvale alale täispikk järjestus, mida oli võimalik plasmidi kloneerida. Mutantne lõikesait paljundati samamoodi, kuid sisemisteks praimeriteks kasutati 3C_RdRp_MUT_Forw (Forw) ja 3C_RdRp_MUT_Rev (Rev).



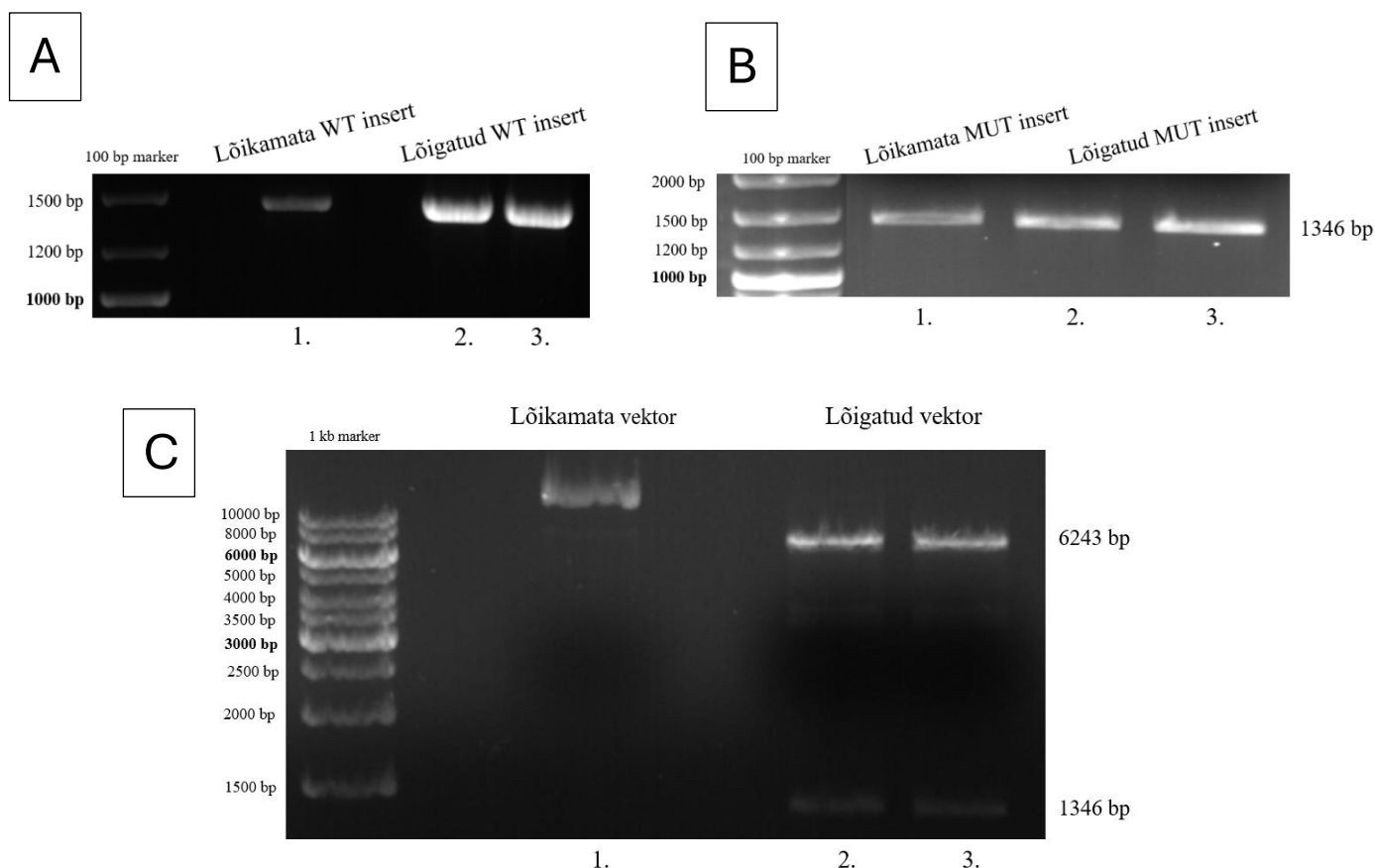
Joonis 10. Metsiktüüpi 3C proteaasi lõikesaidi järjestuse sünteesimine. (A) Radadel 1 ja 2 on CrPV järjestus sünteesitud praimeritega DnaK_BamHI_Rev ja 3C_RdRp_Forw ning radadel 3 ja 4 praimeritega DnaK_KpnI_Forw ja 3C_RdRp_Rev. (B) Joonise A fragmente on kasutatud alusjärjestusena praimeritega DnaK_BamHI_Rev ja DnaK_KpnI_Forw täispika (1346 bp) fragmendi sünteesimiseks.



Joonis 11. Mutantse 3C proteaasi lõikesaidi järjestuse sünteesimine. (A) Radadel 1 ja 2 on CrPV järjestus sünteesitud praimeritega DnaK_BamHI_Rev ja 3C_RdRp_MUT_Forw ning radadel 3 ja 4 praimeritega DnaK_KpnI_Forw ja 3C_RdRp_MUT_Rev. (B) Joonise A fragmente on kasutatud alusjärjestusena praimeritega DnaK_BamHI_Rev ja DnaK_KpnI_Forw täispika (1346 bp) fragmendi sünteesimiseks.

CrPV 3C proteaasi metsiktüüpi ja mutantse substraadi täispikad järjestused, mis selles töös PCR meetodil loodi, olid mõlemad pikkusega 1346 bp (Joonised 10b ja 11b). CrPV 3C proteaasi lõikesaitide sisestamiseks vektorisse lõigati lõikesaitide järjestusi ja vektorit restriктаasidega *KpnI* ja *BamHI*, mis lõikasid vektori kaheks 6243 bp ja 1346 bp pikkusega lõiguks (Joonis 12). Restriктаasidega töödeldud vektor ja lõikesaidi järjestus ligeeriti kokku T4 DNA ligaasiga ning plasmiidid pDnaK_3C_RdRp_wt ja pDnaK_3C_RdRp_mut transformeeriti rakkudesse.

Plasmiidid paljundati üles ning selekteeriti välja kõrge transformatsiooni efektiivsusega *E. coli* DH5- α rakkudest (*Thermo Scientific*) (Lisa 1).



Joonis 12. CrPV 3C proteaasi lõikesaite kodeerivate järjestuste ja pET-his-DnaK vektori restriksioon restriktasididega *KpnI* ja *BamHI*. Reaktsioon kestis 3 h 37 °C juures. Joonistel MUT vastab mutantsele tüvele, WT metsiktüüpi tüvele ja insert on vektorisse sisestatud CrPV 3C *RdRp* geeni järjestus.

2.3.2. CrPV 3C proteaasi substraadi ekspressioon

CrPV 3C proteaasi lõikesaitidega plasmiidid (pDnaK_3C_RdRp_wt ja pDnaK_3C_RdRp_mut) transformeeriti *E. coli* BL21 (DE3) bakterirakkudesse.

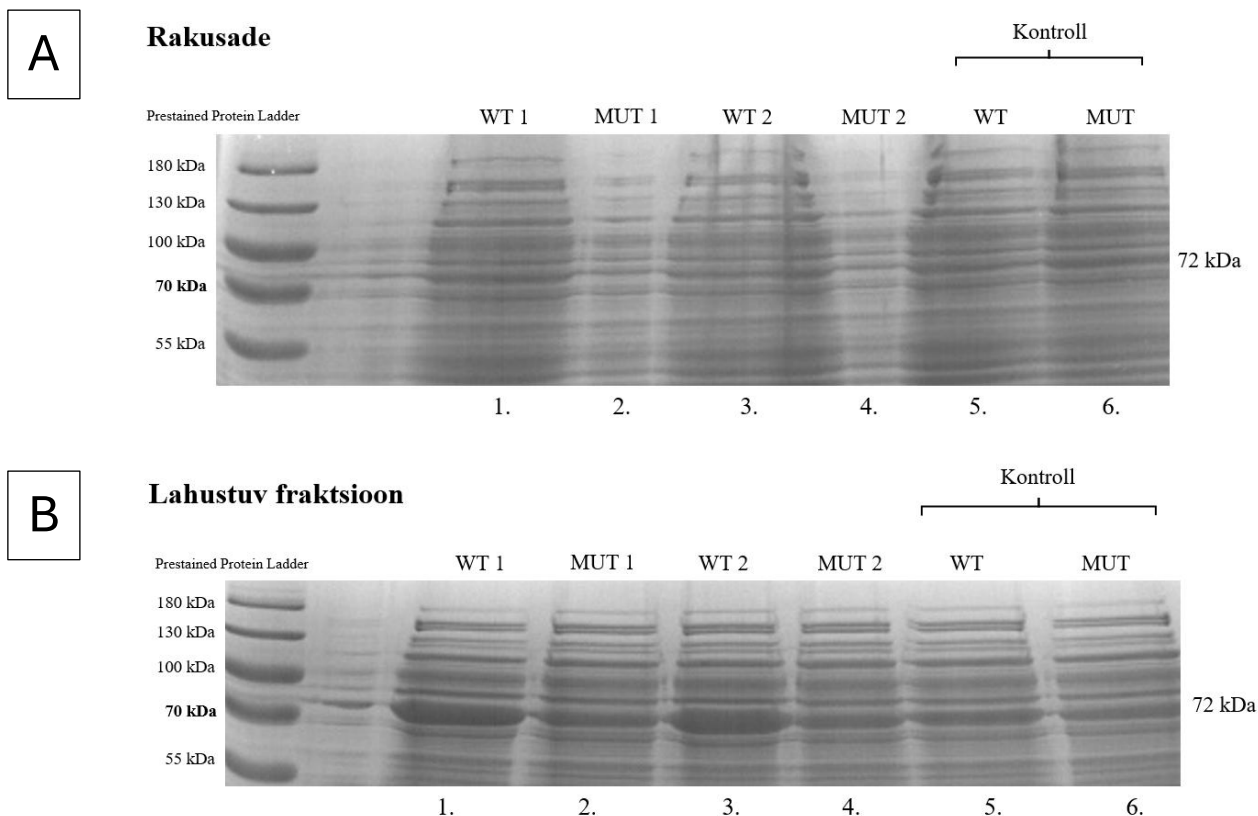
Geneetilise materjali viimine rakkudesse toimub horisontaalse geeniülekanne teel näiteks transformatsiooniga, mille käigus siseneb vaba DNA retsipient-rakkudesse (Chen et al., 2014). Transformatsiooni jaoks vaja luua kompetentsed rakud, mis on vastuvõtlikud ekstratsellulaarsele DNA-le. Kompetentsete rakkude valmistamiseks on erinevaid meetodeid: elektroporatsioon, CaCl₂ töötlus, Hanahan meetod, Inoue meetod (Yang et al., 2022). Kõikide meetodite põhiidee on muuta rakumembraan ajutiselt läbilaskvaks, et vaba DNA saaks rakkudesse siseneda. Antud töös loodi rakukompetendid CaCl₂ töötlusel ning sellele järgnes

kuumašokk, mille ajal lahusesse lisatud DNA (siinkohal plasmiidne DNA) sisenes BL21 (DE3) rakkudesse.

Valkude ekspressiooniks kasutatav *E. coli* BL21 (DE3) on rakutüvi, mis disainiti aastal 1986 selleks, et ekspresseerida pET vektorisse kloonitud geenidelt rekombinantseid valke (Studier, Moffatt, 1986). BL21 (DE3) rakud sünteesivad T7 RNA polümeraasi, mis algatab pET vektorisse T7 promootori järele kloonitud geenide transkriptsiooni (Du *et al.*, 2021). Kui rakk T7 RNA polümeraasi ei sünteesi, siis ei transkribeerita ka vektorilt uuritavat geeni. T7 RNA polümeraasi sünteesitakse rakus lac promootorilt ning reguleeritakse lac operon süsteemi poolt, mis tähendab, et allolaktoosi puudumisel on polümeraasi süntees inaktiivses olekus. Allolaktoosi analoogina käitub IPTG (Simas *et al.*, 2023), mis lisatakse lahusesse rakkude eksponentsiaalses faasis ning takistab lac operaatoriga seondunud repressorit. BL21 (DE3) on *E. coli* B tüvi, millele on iseloomulik lon ja ompT proteaaside puudumine – see suurendab valgu ekspressiooni tõhusust ning tagab, et valke lagundatakse vähem (Jeong *et al.*, 2015). Seetõttu on käesolevas töös kasutatud ekspressiooniplasmiidiks pET plasmiidi ja valkude ekspresseerimiseks *E. coli* BL21 (DE3) rakke.

Esmalt teostati meetodi kontrollimiseks IPTG induktsioon ja sonikeerimine väikemas LB söötme koguses (30 ml) üles kasvanud *E. coli* BL21 (DE3) rakkudes, millesse oli transformeeritud pDnaK_3C_RdRp_wt või pDnaK_3C_RdRp_mut plasmiid. Kui geelianalüüs kinnitas, et meetod töötab, siis viidi katse läbi suuremas LB söötme koguses (200 ml) üles kasvanud *E. coli* BL21 (DE3) rakkudega. Suuremas LB koguses üles kasvanud rakkudest saadud CrPV 3C substraadi valkudega teostati CrPV 3C proteaasiga (Veeremaa, 2024) lõikereaktsioon.

CrPV 3C proteaasi substraadi valkude ekspressiooniks kasvatati pDnaK_3C_RdRp_wt ja pDnaK_3C_RdRp_mut plasmiide sisaldavaid *E. coli* BL21 (DE3) rakke 30 °C juures. Kui rakkude tihedus oli jõudnud OD₆₀₀=0.6-ni, indutseeriti rakke kolm tundi IPTG-ga. Tsentrifugeerimisel kogutud rakkudest tehti sonikeerimisel lüsaat, mida analüüsiti SDS geelelektroforeesi meetodil (Joonis 14). Ekspressiooni kontrollimiseks koguti rakulahusest proovid enne indutseerimist, pärast indutseerimist ning pärast indutseerimist tsentrifuugitud lahustumatust ja lahustuvast fraktsioonist. IPTG lisamine eemaldas repressorivalgu lac operon süsteemilt, millega reguleeriti T7 RNA polümeraasi ekspressiooni. BL21 (DE3) raku genoomis sünteesitud T7 RNA polümeraas käivitas vektoris T7 RNA polümeraasi promootori alla viidud his-DnaK ja CrPV 3C proteaasi lõikesaidi sünteesi (Joonis 15 ja 16).



Joonis 13. *E. coli* BL21 (DE3) rakkudes ekspresseeritud CrPV 3C proteaasi mudelsubstraatide rakulüsaadi analüüs. Rakud kasvatati 30 ml LB-Amp vedelsöötmes 30 °C juures loksutuskiiirusel 180 rpm kuni lahuse optiline tihedus mõõdeti $OD_{600}=0.6$. Rakke indutseeriti 3 h IPTG'ga, mille järel eraldati lahustuv fraktsioon ning rakusade lüüsi. Rakulüsaat sonikeeriti [10sek, 5 tsüklit, 60%] ning sellest koguti proovid „rakusade“ ja „lahustuv fraktsioon“, midas analüüsiti 12% SDS-PAGE meetodil. CrPV 3C proteaasi substraatvalgu signaal tuvastati molekulmassi 72 kDa juures. Kontrollradadel (rajad 5 ja 6) on Veermaa, 2024 töös konstrueeritud plasmiididest ekspresseeritud valgud. Joonistel MUT vastab mutantsele ja WT metsiktüüpi mudelsubstraadile.

CrPV 3C proteaasi lõikesaitidega valgud on eeldatavalt suurusega ligikaudu 72 kDa (Joonis 14). Sonikeerimise tulemusena lõhuti rakud katki, rakukesta tükid tsentrifuugiti tuubi põhja ja lüüsipuhvris lahustunud valgud jäid lahustuvasse fraktsiooni. Seetõttu on tugevamaid uuritava valgu *band*'e geelil näha just lahustuva fraktsiooni radadel (Joonis 14b). Lahustumatut fraktsiooni ehk rakusademe proove (Joonis 14a) analüüsiti selleks, et saada kinnitust, et suurem osa uuritavast valgust lahustus vedelikufaasi. Kuna lahustuv fraktsioon sisaldas lisaks uuritavale CrPV 3C proteaasi lõikesaitidega valgule ka muid valke, siis oli vaja valgulahust edasi puhastada, et lahti saada teistest valkudest.

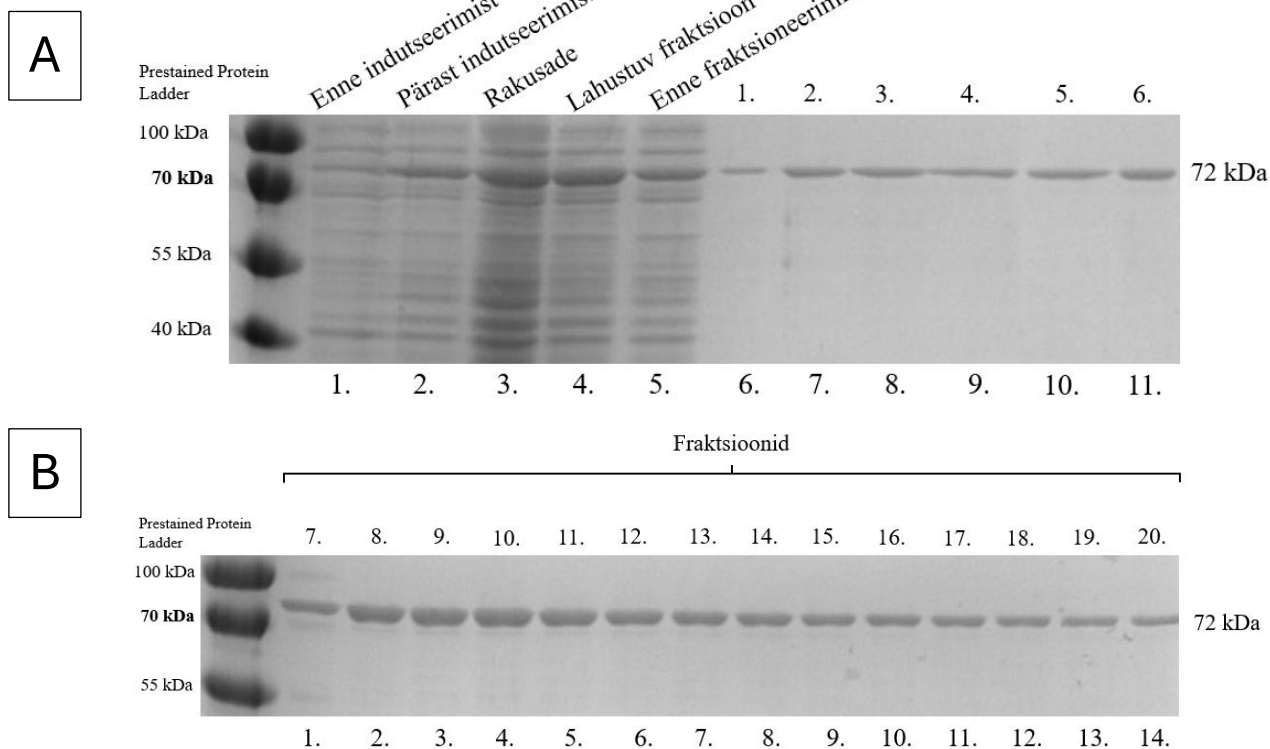
2.3.3. CrPV 3C proteaasi substraadi puhastamine

Selleks, et oleks võimalik testida 3C proteaasi poolt mudelsubstraadi lõikamist *in vitro* tingimustes, on vaja nii puhastatud 3C proteaasi kui substraadi valku. Nagu eelnevalt öeldud oli 3C proteaas juba puhastatud kujul olemas (A. Veeremaa magistritöö). Käesolevas töös puhastati DnaK valk, millesse oli sisestatud kas metsiktüüpi või mutantne 3C proteaasi lõikesait.

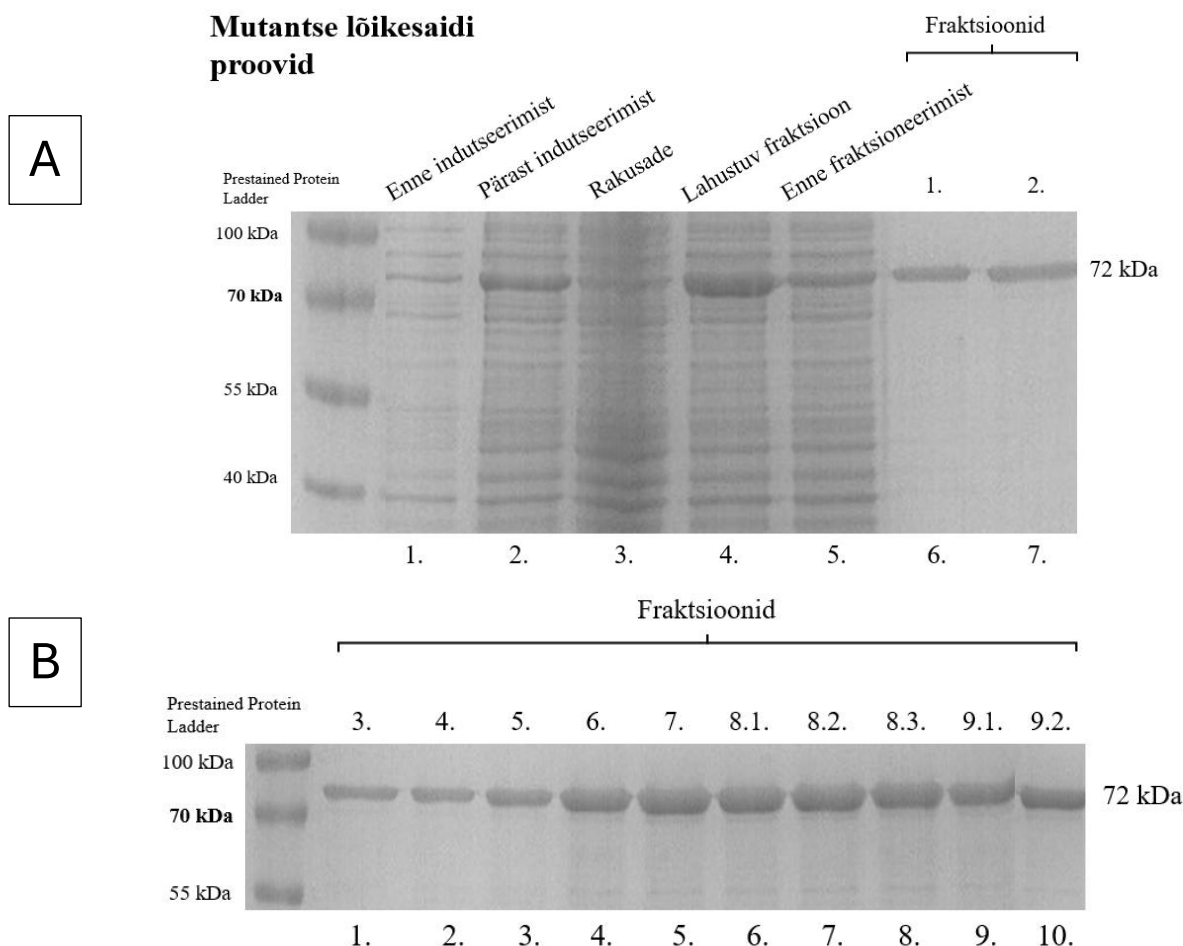
CrPV 3C proteaasi lõikesaitidega valgud puhastati lahusest ÄKTA afiinsuskromatograafia abil, kus uuritav valk jääb kolonni külge ning ülejäänud rakulüsaat voolutatakse läbi kolonni. Selleks oli DnaK valgu otsa lisatud kuus histidiini jääki. Histidiin seob aminohapetest kõige tugevamini immobiliseeritud Ni^{2+} ioone ning tavaliselt on kuus histidiini optimaalne kogus, et histidiini sisaldava valgu seondumine kolonnile oleks piisavalt tugev (Bornhorst, Falke, 2010). Kõigepealt voolutatati kogu rakulüsaat läbi kromatograafia süsteemi, kus kolonnil seondusid histidiini jäägiga valgud Ni^{2+} ionidega ning ülejäänud valgulahus eemaldati süsteemist. Kolonn pesti 50mM kontsentratsiooniga imidasooli puhvriga, mis aitas vabaneda kolonnile mittespetsiifiliselt seondunud valkudest. Seejärel hakati koguma uuritava valgu fraktsioone suurendades lineaarselt imidasooli kontsentratsiooni puhverlahuses alates 50mM-st kuni 600 mM imidasooli kontsentratsioonini. Mida kõrgem oli imidasooli sisaldus puhvril, seda rohkem histidiini jäägiga valku vabanes kolonnilt Ni^{2+} küljest lahti kuni piirini, mil fraktsioonidesse kogutud valkude sisaldus hakkas langema, kuna kolonnile seondunud valku jäi järjest vähemaks. Enamus uuritavast valgust voolutati välja keskmistesse fraktsioonidesse (Joonis 15 rajad 8-11). Kromatograafia käigus koguti 20 fraktsiooni metsiktüüpi valku ning 29 fraktsiooni mutantset valku. Üldiselt koguti fraktsioone 1.5 ml kaupa, kuid mutantse lõikesaidiga CrPV 3C proteaasi substraadi keskmised 12 fraktsiooni koguti 0.2 ml kaupa, et suurendada võimalust eraldada katsutisse rohkem puhast valku.

Puhastatud valgu fraktsioonid on toodud joonistel 15 ja 16. Lisaks puhastatud fraktsioonidele on geelipildil näha CrPV 3C proteaasi substraadi proovid enne ja pärast rakkude indutseerimist IPTG-ga ning indutseerimise järgselt kogutud lahustumatu ja lahustuv fraktsioon ehk rakusade. Dialüüsamiseks valiti geelianalüüsi põhjal välja kõige suurema valgu kontsentratsiooniga proovid: metsiktüüpi proteaasi lõikesaidiga substraadi analüüsis valiti välja fraktsioonid 9 ja 10 ning mutantse lõikesaidiga substraadis valiti fraktsioonid 7, 8.1, 8.2, 8.3, 9.1, 9.2.

Metsiktüüpi lõikesaidi proovid



Joonis 14. CrPV 3C proteaasi metsiktüüpi substraadi valkude analüüs. 10% SDS-PAGE meetodil analüüsti enne ja pärast IPTG induksiooni kogutud proove, pärast sonikeerimist kogutud rakusadet ja lahustuvat fraktsiooni ning kolonnkromatograafial kogutud fraktsioone. CrPV 3C proteaasi substraatvalgu signaal tuvastati molekulmassi 72 kDa juures. (B) Edasiseks dialüüsiks valiti valguproovid radadel 3 ja 4.

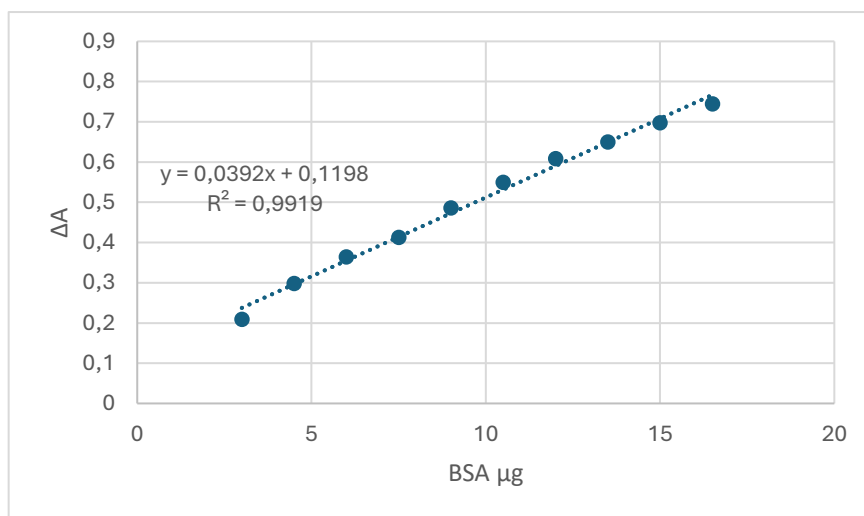


Joonis 15. CrPV 3C proteaasi mutantse substraadi valkude analüüs. 10% SDS-PAGE meetodil analüüsti enne ja pärast IPTG induktsiooni kogutud proove, pärast sonikeerimist kogutud rakusadet ja lahustuvat fraktsiooni ning kolonnkromatograafial kogutud fraktsioone. CrPV 3C proteaasi substraatvalgu signaal tuvastati molekulmassi 72 kDa juures. (B) Edasiseks dialüüsiks valiti valguproovid radadel 5-10.

Dialüüs on meetod, millega saab vahetada uuritava lahuse puhvrit ning eraldada lahusest väiksema molekulmassiga osakesi saades veel puhtama valgulahuse kui afiinsuskromatograafial. Afiinsuskromatograafia fraktsioonide geelianalüüsil valiti välja kõige kõrgema valgusisaldusega CrPV 3C proteaasi substraadi fraktsioonid, mis pipeteeriti 15 kDa pool-läbilaskvale dialüüsi membraanile. See tähendab seda, et kõik molekulid ja valgud, mis olid väiksema molekulmassiga kui 15 kDa, väljusid dialüüsil membraani pooride kaudu dialüüsipuhvrissi. Membraan uuritava lahusega jäeti kaheks tunniks 1.5 liitrisse dialüüsipuhvrissi ning pärast puhvrivahetust üleöö 1.8 liitrisse puhvrissi loksuma.

Dialüüsi käigus kogutud valgulahuste ja BSA kaliiber proovide lahjenduste optiline tihedus (OD) mõõdeti 590 nm juures. Saadud neelduvusetega arvutati Bradford meetodil BSA kaliibervõrrandi alusel tegelik 3C proteaasi substraadi valgu kontsentratsioon lahuses (Joonis 17). Metsiktüüpi lõikesaidiga substraadi neelduvus oli 0.610 ning joonisel 17 lineaarvõrrandi

alusel arvutati valgulahuse kontsentratsiooniks 0.140 ug/ul. Mutantse lõikesaidiga substraadi neelduvus oli 0.616 ning selle põhjal arvutatud kontsentratsioon 0.215 ug/ul.



Joonis 16. Bradford'i meetodil loodud BSA kaliibergraafik koos lineaarvõrrandiga, mida kasutati viiruse 3C proteaasi substraadi valgulahuse kontsentratsiooni leidmiseks. Graafikul kajastab x-telg (BSA ug) BSA kaliibri lahjenduste kontsentratsioone ning y-telg (ΔA) BSA lahjenduste proovidest mõõdetud valguse neelduvust, millelt on maha lahutatud taustneelduvus. Võrrandis vastab „y“ puhastatud valgulahuse optilisele tihedusele ning „x“ otsitavale kontsentratsioonile.

2.3.4. CrPV 3C proteaasi substraadi lõigatavuse testimine *in vitro*

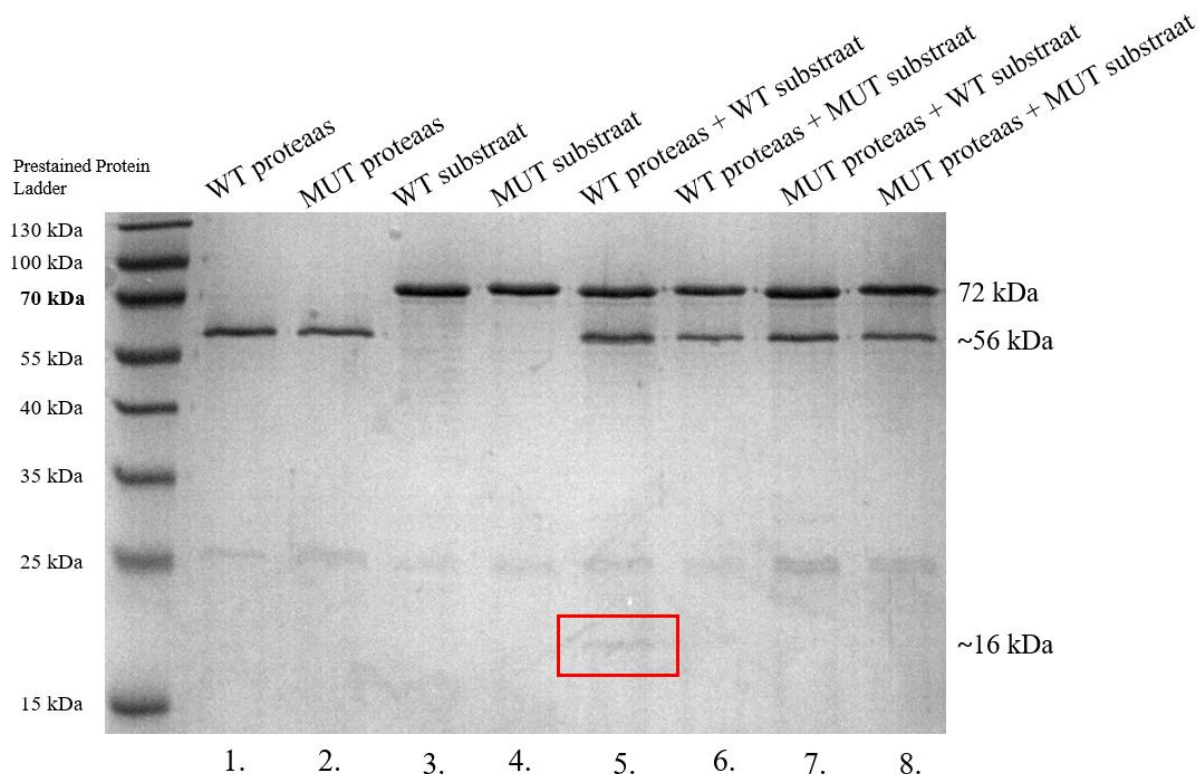
Mudelsubstraadi puhastamise järel testiti selle lõigatavust CrPV 3C proteaasi poolt (puhastatud A.Veeremaa poolt). Kui 3C proteaas lõikaks substraadi TVQCCF metsiktüüpi järjestust, siis peaks täispikast mudelsubstraadist (688 aminohapet pikk) tekkima 519 ja 148 aminohappe pikkused fragmendid. Kontrolliks kasutatud mutantse lõikesaidiga (TAEPCF) valku proteaas lõigata ei tohiks.

Tabel 4. CrPV 3C proteaasi ja substraadi kogused radadel ja lõikereaktsioonides.

	Lõikereaktsioon wt 3C + wt SUB	Kontroll 1. wt 3C + mut SUB	Kontroll 2. mut 3C + wt SUB	Kontroll 3. mut 3C + mut SUB
Proteaas	4 ul	4 ul	4 ul	4 ul
Substraat	7,2 ul	4,7 ul	7,2 ul	4,7 ul
Puhver	0,8 ul	3,3 ul	0,8 ul	3,3 ul

Lisaks metsiktüüpi proteaasi ja metsiktüüpi mudelsubstraadi reaktsioonile tehti kolm kontroll-lõikereaktsiooni, milleks segati kokku proteaasi ja substraadi mutantne vorm, metsiktüüpi proteaas ja mutantne substraat ning mutantne proteaas ja metsiktüüpi substraat (Tabel 4).

Lühendid tabelis 4 tähendavad järgmist: wt – metsiktüüp, mut – mutantne, 3C – proteaas ja SUB – substraat. CrPV 3C proteaasi proovidest tehti enne lõikereaktsiooni vajalikud lahjendused lõppkontsentratsiooniga 0,025 ug/ul. CrPV 3C substraadi proovid lahjendamist ei vajanud, kuna olid piisavalt madala valgu kontsentratsiooniga – metsiktüüpi substraat 0.140 ug/ul ja mutantne substraat 0.215 ug/ul. Lõikereaktsiooni lisati 0.1 ug proteaasi ja 1 ug substraati.



Joonis 17. Kilgi halvatus viiruse 3C proteaasi ja käesolevas töös puhastatud 3C proteaasi lõikesaiti sisaldava mudelsubstraadi lõikereaktsioon. Lõikereaktsiooniks segati kokku CrPV 3C proteaas või selle mutaatne variant ja CrPV valkude 3C ja RdRp vahelist lõikesaiti sisaldav mudelsubstraat või selle mutaatne variant. Radadel 1-4 on proteaasi ja substraadi valkude üksikanalüüsid. Rada 5 kujutab osaliselt lõigatud substraati ning rajad 6-8 on negatiivsed kontrollid. Reaktsioonid sisaldasid 0.1 ug proteaasi ja 1 ug substraati ning reaktsioon viidi läbi 30 °C juures 1 h jooksul. Reaktsioone analüüsiti 12%-lisel SDS-PAGE geelil kasutades võrdluseks *Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) markerit. Valkude visualiseerimiseks värviti SDS-geelid *Coomassie InstantBlue* ga (Thermo Scientific).

CrPV 3C proteaasi ja substraadi lõikereaktsiooni korrati kolm korda ning saadud tulemused kattusid. SDS geelianalüüsil tuvastati CrPV 3C proteaasi ja substraadi lõikereaktsiooni rajal lõigatud fragment ~16 kDa (Joonis 18, rada 5). Teine substraadi fragment (~56 kDa) kattus molekulmassilt 3C proteaasi valguribaga, seda pole võimalik geelipildil eristada. Fragmendisuurused olid ootuspärased ning koos moodustuvad umbes 70 kDa molekulmassiga

täispika substraatvalgu. Kontroll-radadel ei esinenud substraadi lõikamist kinnitanud valgusignaale (Joonis 18, rajad 6-8).

2.3. Arutelu

Kilgi halvatus viiruse (*Cripavirus grylli*) valkude süntees toimub peremeesorganismi ribosoomide abil, mille tulemusel sünteesitakse viiruse polüpeptiid. Polüpeptiidis on viiruse valgud sünteesitud järjest ühe ahelana, kuid sellises vormis on valgud inaktiivsed. Viirusvalkude aktiveerimiseks lõikab autoproteolüütiline CrPV proteaas valkude vahelisi peptiidsideid. Varasemalt on ennustatud CrPV 3C proteaasi lõikesaite genoomi P2 ja P3 regioonis (Tabel 1) kui ka P1 regioonis (Brito, 2018; Nakashima, Nakamura, 2008).

Käesolevas töös uuriti kilgi halvatus viiruse 3C proteaasi ja RNA sõltuva RNA polümeraasi geenidevahelist järjestust (NNITVQ/CCFEPP), mida lõikab viiruse 3C tsüsteiini proteaas. Lõikesaidi järjestus sisestati pET_his_DnaK plasmidi ja ekspresseeriti *E. coli* BL21 (DE3) rakkudes DnaK valgu koosseisus. CrPV 3C proteaasi lõikesaidiga valgud puhastati kolonnkromatograafia ja dialüüsi meetodil ning valkude lõigatavust analüüsiti 3C proteaasi poolt.

Lõikereaktsiooni analüüsimisel tuvastati väga õrn CrPV 3C proteaasi poolt lõigatud substraatvalgu fragment. Proteaasi lõikeaktiivsus oli reaktsioonis seega väga madal. Antud töös uuritud lõikesait on viiruse jaoks oluline, sest selle abil lõikab viiruse 3C proteaas autoproteolüütiliselt ennast polüpeptiidist välja. Seega on selle lõikesaidi hüdroolüüs oluline nii proteaasi kui ka replikatsiooni korrektseks toimimiseks. Kui viiruse proteaas pole funktsionaalne ning toodetakse defektiga, siis jääb ülejäänud polüproteiin lahti lõikamata ning viirusvalgud ei muutu funktsionaalseks. Teisisõnu viirus sureb, kuna ei suuda korralikult oma elutsükliks vajalikke protsesse läbi viia.

Põhjuseid, miks käesolevas töös puhastatud substraati proteaas täielikult ei lõiganud, võib olla mitmeid. Kõigepealt, et saada kinnitust käesolevas töö saadud tulemustele, tuleks katsed korrata – see annaks kinnitust või lükkaks ümber antud töös saadud tulemused. Mõnikord vajavad viiruslikud proteaasid *in vivo* keskkonnas kofaktoreid. Näiteks Hepatiit C viiruse proteaasi aktiivsus sõltub tugevalt NS4A kofaktorist ning Ortoflaviviiruste proteaasid on NS2B kofaktorita inaktiivsed (Zephyr *et al.*, 2021). Käesolevas töös *in vitro* läbi viidud lõikamisreaktsioonis kofaktoreid ei kasutatud. Kuna sellist katsesüsteemi on CrPV 3C proteaasi ja teiste mudelsubstraatidega eelnevalt edukalt kasutatud (Veeremaa, 2024), siis on vähetõenäoline, et kofaktorite puudus oli madala lõikeaktiivsuse põhjus.

Oluline on CrPV 3C proteaasi lõikesaiti sisaldava valgu struktuuri korrektne moodustumine, mida konstrueeritud mudelsubstraadis ei saa ette ennustada. Substraadiks kasutati lühikest lõikesaidi järjestust, mida ekspresseeriti võõra valgu koosseisus. Seega ei ole valgu voltumine ja post-translatsioonilised modifikatsioonid *in vivo* keskkonnas sünteesitud CrPV valguga võrreldavad. Substraadi lõigatavus sõltub selle kolmemõõtmelisest voltumisest, ruumilisest kättesaadavusest ning spetsiifiliste aminohapete äratundmisjärjestustest. Selleks, et substraat oleks CrPV 3C proteaasile ligipääsetav, on proteaasi lõikesait mudelsubstraadis sünteesitud valgu solvendipoolsel pinnal (Ainelo *et al.*, 2016). Hoolimata sellest, et sama süsteemi on varasemalt edukalt testitud, ei tähenda see, et kasutatud katsesüsteem on sobiv ka konkreetse lõikesaidi proteolüüsiks CrPV 3C proteaasi poolt. Võib juhtuda, et selline lõikesait vajab veel mingeid kindlaid aminohappeid mingites positsioonides, et olla paremini ligipääsetav ja lõigatav.

Antud töös oli fookuses CrPV valgu 3C_RdRp vaheline lõikesait, kuid samal teemal saaks edasi uurida teisi CrPV lõikesaite, et tuvastada, missuguse efektiivsusega lõikab CrPV 3C proteaas samas katsesüsteemis teisi lõikesaite. Võib juhtuda, et CrPV 3C proteaas hüdrolüüsib struktuursete ja mittestruktuursete valkude lõikesaite erineva efektiivsusega, kuna suurem kogus struktuursete valke on vajalik viirusele kapsiidi moodustamiseks ning mittestruktuursete replikatsiooniensüüme vajab viirus väiksemas koguses.

Siiani on täpselt teadmata, kuidas toimub *Dicistroviridae* viiruste poolt suunatud rakulise translatsiooni maha surumine. Kuna osadel *Picornavirales* viiruste proteaasidel on peremeesorganismi mehhanisme represseeriv funktsioon, siis on alust arvata, et ka kilgi halvatuse viiruses on 3C tsüsteiinil sarnane roll (Sun *et al.*, 2016). Kui CrPV 3C proteaas tõesti lõikab genoomil ennustatud lõikesaite (Tabel 1), siis on võimalik lõikesaitide aminohappelisi järjestusi otsides ennustada potentsiaalseid sihtmärke peremeesorganismi valkudes ning selgitada kilgi halvatuse viiruse poolt suunatud rakuliste protsesside represseerimise mehhanisme. Sellist teadmist on võimalik rakendada viirusvastaste ravimite väljatöötamisel.

KOKKUVÕTE

Osad viirused sünteesivad nakatunud rakkudes proteaasi, mis omab kesket rolli viirusvalkude aktiveerimisel ning osadel viirustel ka rakuliste protsesside häirimisel. Ka *Picornavirales* seltsi esindaja kilgi halvatus viirus (CrPV) sünteesib oma genoomilt 3C tsüsteiini proteaasi. Varasemalt on ennustatud CrPV lõikesaitide võimalikud järjestused, kuid siiani on kinnitamata kas ja mis aktiivsusega 3C proteaas neid lõikesaite lõikab. Antud töös on uuritud ühte konkreetset lõikesaiti polüproteiinis 3C proteaasi valgu ja RNA sõltuva RNA polümeraasi valgu vahel.

Kilgi halvatus viiruse 3C proteaasi 3C_RdRp lõikesaidi järjestuse loomiseks kasutati *overlap extension* PCR meetodit. Järjestus kloonitati pET_his_DnaK plasmidi, mis paljundati *E. coli* DH5- α rakutüves ning ekspresseeriti *E. coli* BL21 (DE3) rakutüves.

Töös konstrueeritud plasmidi sisaldavate BL21 (DE3) rakkude ekspressiooni indutseeriti IPTG lisamisega ning sonikeeriti lüsaadiks. IPTG induktsioonile eelneva rakulahuse ja induktsiooni järel kogutud rakkude võrdlusest tuvastati geelipildil induktsiooni järgselt suurenenud mudelsubstraadi valkude tootmine, mis tõestas IPTG võimendatud mõju ekspressioonile. Sonikeerimise järgselt kogutud lahustuva fraktsiooni ja rakusademe proove analüüsivate geelipiltide pealt tuvastati suurem uuritava valgu sisaldus lahustuvast fraktsioonist, mis kinnitas his_DnaK_3C_RdRp valgu lahustuvust.

CrPV 3C proteaasi substraadi valgulahus puhastati kolonnkromatograafial (HisTrap FF, 1ml) ning dialüüsi meetodil. Pärast dialüüsi mõõdeti CrPV 3C proteaasi mudelsubstraadi optiline tihedus (590 nm), millest arvutati BSA kaliibervõrrandi alusel valgusisaldus: metsiktüüpi lõikesaidiga valgu kontsentratsioon oli 0.140 ug/ul ja mutantse lõikesaidiga valgul oli 0.215 ug/ul. Kontsentratsioonide põhjal arvutati CrPV 3C proteaasi ja substraadi kogused lõikereaktsiooni jaoks. CrPV 3C proteaasi ja selle substraadi lõikereaktsiooni analüüsil tuvastati SDS-PAGE geelil lõigatud fragment molekulmassi ~16 kDa juures. Teine fragment molekulmassiga ~56 kDa kattus proteaasi signaaliga, seega polnud geelil silmaga eristatav. CrPV 3C proteaas lõikas antud töös puhastatud 3C_RdRp lõikesaitiga substraati madala aktiivsusega. Tõenäoliselt polnud mudelsubstraadi lõikesait CrPV 3C proteaasile ligipääsetav. Tulemuste kinnitamiseks on vaja katset korrata.

Varasemad uuringud on küll teoreetiliselt ennustanud CrPV 3C tsüsteiini proteaasi lõikesaite, kuid nende lõikesaitide tegelik lõigatavus proteaasi poolt on tõestmata. Kilgi halvatus viiruse uurimise jätkamine on oluline, et avardada teadmisi positiivse ahelaga ssRNA viiruste kohta, eriti veel *Dicistroviridae* perekonna viiruste kohta. Pikemas perspektiivis toovad uued

teadmised edu kilgi halvatuse viirusevastaste vahendite tootmises, mis toob otsest kasu näiteks kilgi-farmidele. Kui CrPV 3C proteaasi lõigatavad lõikesaidid on kinnitatud, siis saab kasutatud katsesüsteemi alusel uurida ka teiste viiruste proteaaside teadmata lõikesaite.

Construction, purification and *in vitro* cleavage of Cricket Paralysis Virus 3C protease substrate protein

Ade Sild

Summary

Some viruses synthesize a protease in infected cells that activates viral proteins and disrupts cellular processes. Cricket Paralysis Virus (CrPV), a member of the order Picornavirales, encodes a 3C cysteine protease. Recent studies have predicted possible cleavage site sequences for the CrPV 3C protease. However, it remains unclear whether the 3C protease actually cleaves these putative sites *in vitro*. Therefore, the objective of this study was to determine whether the 3C protease cleaves a specific cleavage site located between the 3C protease domain and the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) domain.

To generate the 3C_RdRp fusion construct for cloning, overlap extension PCR was employed. The target sequences were amplified using the following primers: 3C_RdRp_Forw, 3C_RdRp_Rev, DnaK_KpnI_Forw, and DnaK_BamHI_Rev. The amplified 3C_RdRp construct was first cloned and propagated in *Escherichia coli* DH5 α competent cells. The resulting plasmid was subsequently transferred to *Escherichia coli* BL21(DE3) cells for protein expression.

BL21(DE3) cells containing the recombinant plasmid were induced with isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and subsequently lysed by sonication to prepare the cell lysate. Protein samples were collected at multiple time points: before and after IPTG induction, from the cell pellet and supernatant following sonication, and prior to chromatographic purification. SDS-PAGE analysis comparing samples before and after IPTG induction revealed enhanced protein expression in the post-induction lane, confirming the IPTG-mediated induction of recombinant protein synthesis. Following cell lysis by sonication, the cell pellet and supernatant fractions were analyzed to determine protein localization. SDS-PAGE analysis demonstrated that the recombinant his_DnaK_3C_RdRp fusion protein was predominantly detected in the supernatant fraction, indicating that the target protein was expressed as a soluble protein and did not form inclusion bodies in the cell pellet.

The recombinant CrPV 3C protease substrate was purified using immobilized metal affinity chromatography (HisTrap FF, 1 mL column) followed by dialysis. Following dialysis, the protein concentration was determined by measuring the optical density at 590 nm and

calculated using the Bradford assay. The wildtype cleavage site variant had a protein concentration of 0.140 ug/uL, while the mutant variant had a concentration of 0.215 ug/uL. Based on these concentrations, the appropriate substrate quantities were calculated for the protease-substrate cleavage reaction. SDS-PAGE analysis of the cleavage reaction revealed a single visible substrate fragment with an apparent molecular weight of approximately 16 kDa. The complementary fragment, predicted to have a molecular weight of approximately 56 kDa, was not clearly visible on the gel. This was likely due to co-migration with the 3C protease, which has a similar molecular weight. These results demonstrate that cleavage of the 3C protease substrate occurred; however, the proteolytic activity was relatively low. The observed low cleavage efficiency may be attributed to several factors. One possibility is that the cleavage site within the substrate construct was not readily accessible to the 3C protease, potentially due to substrate secondary structure or suboptimal reaction conditions. To confirm and further characterize the cleavage reaction, the experiment should be repeated.

Previous studies have theoretically predicted the cleavage sites of CrPV 3C protease however, the proteolytic activity of these predicted sites has not been experimentally validated. Investigation of Cricket Paralysis Virus protease function is important for expanding our understanding of positive-sense ssRNA viruses, particularly members of the genus *Dicistroviridae*. In the long term, increased knowledge of CrPV protease mechanisms may facilitate the development of antiviral agents applicable to cricket farms. Furthermore, the experimental system established in this study can serve as a platform for investigating cleavage site specificity in proteases from other viruses of the *Picornavirales* order, thus accelerating research into viral proteolysis across multiple viral families.

Tänuõnad

Ma soovin siiralt tänada Kristina Mäemets-Allast toetava ning põhjaliku juhendamise eest.

Samuti olen väga tänulik Analiis Veeremaale, kes õpetas mulle valkude puhastamist kolonnkromatograafia ja dialüüsi meetoditel.

Soovin veel eraldi tänada kogu molekulaarbioloogia uurimisgruppi, kelle toetav ja lõbus suhtumine tegi laboritöö nii meeldivaks.

Kasutatud kirjandus

- Brito R.N. (2018). Characterization of the cricket paralysis virus 3C protease and its substrate specificity. <https://dx.doi.org/10.14288/1.0375837> [Magistritöö, University of British Columbia]
- Shafee, T. (2013). Evolvability of a viral protease: experimental evolution of catalysis, robustness and specificity. <https://doi.org/10.17863/CAM.16528> [Dokoritöö, University of Cambridge]
- Veeremaa A. (2024). Viiruste poolt kasutatavad strateegiad translatsiooni reguleerimiseks. <https://hdl.handle.net/10062/99654> [Magistritöö, Tartu Ülikool]
- Ainelo A., Tamman H., Leppik M., Remme J., Hõrak R. (2016). The toxin GraT inhibits ribosome biogenesis. *Molecular Microbiology* 100(4): 719-734. <https://doi.org/10.1111/mmi.13344>
- Au H.H., Cornilescu G., Mouzakis K.D., Ren Q., Burke J.E., Lee S., Butcher S.E. (2015). Global shape mimicry of tRNA within a viral internal ribosome entry site mediates translational reading frame selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(47): E6446-E6455. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512088112>
- Bonning B.C., Miller W.A. (2010). Dicistroviruses. *Annu Rev Entomol* 55: 129-50. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085457>
- Bornhorst J. A., Falke J. J. (2010) [16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol* 326:245–254. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)26058-8)
- Chen I., Christie P.J., Dubnau D. (2014). The Ins and Outs of DNA Transfer in Bacteria. *Science* 310(5753): 1456-1460. <https://doi.org/10.1126/science.1114021>
- Chen J., Wang D., Sun Z., Gao L., Zhu X., Guo J., Xu S., Fang L., Li K., Xiao S. (2019). Arterivirus Nsp4 Antagonizes Interferon Beta Production by Proteolytically Cleaving NEMO at Multiple Sites. *J Virol* 93: e00385-19. <https://doi.org/10.1128/jvi.00385-19>
- Cherry S., Perrimon N. (2004). Entry is a rate-limiting step for viral infection in a *Drosophila melanogaster* model of pathogenesis. *Nature Immunology* 5: 81–87. <https://doi.org/10.1038/ni1019>
- Du F., Liu Y. Q., Xu Y. S., Li Z. J., Wang Y. Z., Zang Z. X., Sun X. M. (2021). Regulating the T7 RNA polymerase expression in *E. coli* BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microb Cell Fact* 20:189. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01680-6>
- Dweh T.J., Choudhury N. (2023). Understanding the Molecular Mechanisms of Proteases in Bioprocessing: A Review on the Future of the Food Industry. *Research & Reviews A Journal of Biotechnology* 12(4). [https://doi.org/10.37591/\(rrjobt\).v13i2.1460](https://doi.org/10.37591/(rrjobt).v13i2.1460)

- Ehrmann M., Clausen T. (2004). Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu Rev Genet* 38: 709-24. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.093416>
- Gall O.L., Christian P., Fauquet C.M., King A.M.Q., Knowles N.J., Nakashima N., Stanway G., Gorbalenya A.E. (2008). Picornavirales, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T = 3 virion architecture. *Archives of Virology* 153: 715-727. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0041-x>
- Garrey J.L., Lee Y.Y., Au H.T., Bushell M., Jan E. (2010). Host and Viral Translational Mechanisms during Cricket Paralysis Virus Infection. *Journal of Virology* 84(2). <https://doi.org/10.1128/jvi.02006-09>
- Gaucherand L., Gaglia M.M. (2022). The Role of Viral RNA Degrading Factors in Shutoff of Host Gene Expression. *Annual Review of Virology* 9: 213-238. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100120-012345>
- Gross L., Vicens Q., Einhorn E., Noireterre A., Schaeffer L., Kuhn L., Imler J.L., Eriani G., Meignin C., Martin F. (2017). The IRES5'UTR of the dicistrovirus cricket paralysis virus is a type III IRES containing an essential pseudoknot structure. *Nucleic Acids Research* 45(15): 8993–9004. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx622>
- Grzonka Z., Kasprzykowski F., Wiczak W. (2007). Cysteine Proteases. *Industrial Enzymes* 181–195. https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0_11
- Jeong H., Kim H.J., Lee S.J. (2015). Complete Genome Sequence of Escherichia coli Strain BL21. *Genome Announc* 3(2): e00134-15. <https://doi.org/10.1128/genomea.00134-15>
- Khong A., Boudieroff J.M., Spriggs R.V., Tammper E., Kerr C.H., Jackson T.J., Willis A.E., Jan E. (2016). Temporal Regulation of Distinct Internal Ribosome Entry Sites of the Dicistroviridae Cricket Paralysis Virus. *Viruses* 8(1): 25. <https://doi.org/10.3390/v8010025>
- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (2012). Family – Dicistroviridae. *Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* 840-845. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00071-9>
- Liljas L., Tate J., Lin T., Christian P., Johnson J.E. (2002). Evolutionary and taxonomic implications of conserved structural motifs between picornaviruses and insect picorna-like viruses. *Archives of Virology* 147: 59-84. <https://doi.org/10.1007/s705-002-8303-1>
- Martinez N.M., Eden M.E.V., Younan P., Lloyd R.E. (2003). Cleavage of Poly(A)-Binding Protein by Poliovirus 3C Protease Inhibits Host Cell Translation: a Novel Mechanism for Host Translation Shutoff. *Molecular and Cellular Biology* 24(4): 1779-1790. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.4.1779-1790.2004>
- Moore N.F., Kearns A., Pullin J.S.K. (1980). Characterization of Cricket Paralysis Virus-Induced Polypeptides in Drosophila Cells. *J Virol* 33. <https://doi.org/10.1128/jvi.33.1.1-9.1980>

- Nakashima N., Ishibashi J. (2010). Identification of the 3C-protease-mediated 2A/2B and 2B/2C cleavage sites in the nonstructural polyprotein precursor of a dicistrovirus lacking the NPGP motif. *Archives of Virology* 155: 1477-1482. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0723-z>
- Nakashima N., Nakamura Y. (2008). Cleavage sites of the "P3 region" in the nonstructural polyprotein precursor of a dicistrovirus. *Arch Virol* 153: 1955-1960. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0208-5>
- Nakashima N., Shibuya N. (2006). Multiple coding sequences for the genome-linked virus protein (VPg) in dicistroviruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 92(2): 100-104. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.03.003>
- Otín C.L., Bond J.S. (2008). Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *J Biol Chem* 283(45): 30433–30437. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800035200>
- Pestova T.V., Hellen C.U.T. (2003). Translation elongation after assembly of ribosomes on the Cricket paralysis virus internal ribosomal entry site without initiation factors or initiator tRNA. *Genes & Dev* 17: 181-186. <https://doi.org/10.1101/gad.1040803>
- Pisano L., Supuran C.T. (2025). Viral proteases as targets for antiviral drugs. *The Enzymes* 58: 1-18. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2025.06.002>
- Ramanathan A., Robb G.B., Chan S.H. (2016). mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res* 44(16): 7511–7526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw551>
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(3): 597–635. <https://doi.org/10.1128/mmbr.62.3.597-635.1998>
- Reinganum C., O'Loughlin G.T., Hogan T.W. (1970). A nonoccluded virus of the field crickets *Teleogryllus oceanicus* and *T. commodus* (Orthoptera: Gryllidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 16(2): 214-220. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(70\)90062-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(70)90062-5)
- Ryu W.S. (2016). *Virus Life Cycle*. Academic Press 31-45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800838-6.00003-5>
- Salas E.M., Velilla R.F., Chamorro J.F., Embarek A.M. (2018). Insights into Structural and Mechanistic Features of Viral IRES Elements. *Front Microbiol* 8: 2629. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02629>
- Savannah P., Jeremy M., Shahideh N. (2018). Cricket Paralysis Virus Threatens Cricket Farm Business. Kansas State University, Entomology Student Research. <http://hdl.handle.net/2097/40117>
- Scotti P.D. (2008). Cricket Paralysis Virus Replicates in Cultured *Drosophila* Cells. *Intervirology* 6(6): 333–342. <https://doi.org/10.1159/000149489>

- Seipelt J., Guarné A., Bergmann E., James M., Sommergruber W., Fita I., Skern T. (1999). The structures of picornaviral proteinases. 62(2): 159-168. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(99\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(99)00043-X)
- Sharma A., Gupta S.P. (2017). Fundamentals of Viruses and Their Proteases. Viral Proteases and Their Inhibitors 1–24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809712-0.00001-0>
- Shehata S.I., Watkins J.M., Burke J.M., Parker R. (2024). Mechanisms and consequences of mRNA destabilization during viral infections. *Virology Journal* 21. <https://doi.org/10.1186/s12985-024-02305-1>
- Simas R.G., Junior A.P., Long P.F. (2023). Mechanistic aspects of IPTG (isopropylthio- β -galactoside) transport across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*—a rate limiting step in the induction of recombinant protein expression. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 50(1). <https://doi.org/10.1093/jimb/kuad034>
- Studier F.W., Moffatt B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* 189(1): 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Sun, D., Chen S., Cheng A., Wang M. (2016). Roles of the Picornaviral 3C Proteinase in the Viral Life Cycle and Host Cells. *Viruses* 8(3):82. <https://doi.org/10.3390/v8030082>
- Zephyr J., Yilmaz N.K., Schiffer C.A. (2021). Viral proteases: Structure, mechanism and inhibition. *Enzymes* 50: 301–333. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2021.09.004>
- Tate J., Liljas L., Scotti P., Christian P., Lin T., Johnson J.E. (1999). The crystal structure of cricket paralysis virus: the first view of a new virus family. *Nature Structural Biology* 6: 765–774. <https://doi.org/10.1038/11543>
- Valles S.M., Chen Y., Firth A.E., Guérin D.M.A., Hashimoto Y., Herrero S., Miranda J.R., Ryabov E., ICTV Report Consortium (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Dicistroviridae. 98(3). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000756>
- Warsaba R., Sadasivan J., Jan E. (2020). Dicistrovirus-Host Molecular Interactions. *Curr. Issues Mol. Biol.* 34(1): 83-112. <https://doi.org/10.21775/cimb.034.083>
- Warsaba R., Stoynov N., Moon K.M., Flibotte S., Foster L., Jan E. (2022). Multiple Viral Protein Genome-Linked Proteins Compensate for Viral Translation in a Positive-Sense Single-Stranded RNA Virus Infection. *J Virol* 96(17). <https://doi.org/10.1128/jvi.00699-22>
- Verma S., Dixit R., Pandey K.C. (2016). Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Pharmacol* 7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00107>
- Wilson J.E., Pestova T., Hellen C.U.T., Sarnow P. (2000). Initiation of Protein Synthesis from the A Site of the Ribosome. *Cell* 102(4): 511-520. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00055-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00055-6)

Wilson J.E., Powell M.J., Hoover S.E., Sarnow P. (2000). Naturally Occurring Dicistronic Cricket Paralysis Virus RNA Is Regulated by Two Internal Ribosome Entry Sites. *Mol Cell Biol* 20(14): 4990-4999. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.14.4990-4999.2000>

Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Choi G.K.Y., ... Yuen K.Y. (2012). Natural Occurrence and Characterization of Two Internal Ribosome Entry Site Elements in a Novel Virus, Canine Picodistrovirus, in the Picornavirus-Like Superfamily. *J Virol* 86(5): 2797-2808. <https://doi.org/10.1128/JVI.05481-11>

Yang Y., Liu M., Wang T., Wang Q., Liu H., Xun L., Xia Y. (2022). An Optimized Transformation Protocol for *Escherichia coli* BW3KD with Supreme DNA Assembly Efficiency. *Microbiology Spectrum* 10(6): e02497-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02497-22>

Yuan X., Kadowaki T. (2022). DWV 3C Protease Uncovers the Diverse Catalytic Triad in Insect RNA Viruses. *Virology* 10: e00068-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00068-22>

Kasutatud veebiaadressid

pET-11c plasmid. SnapGene.

[https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_\(novagen\)/pET-11c](https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pET-11c)

NCBI, Taxonomy Browser. (18.05.2026)

<https://ictv.global/taxonomy>

Cricket paralysis virus. ICTV global, Current ICTV Taxonomy Release. (18.05.2026)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=12136>

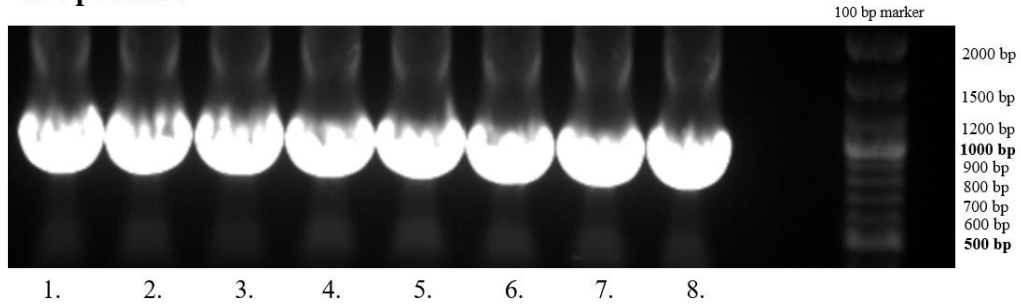
Protease structure. Shafee (2015). Wikimedia Commons.

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=45801894>

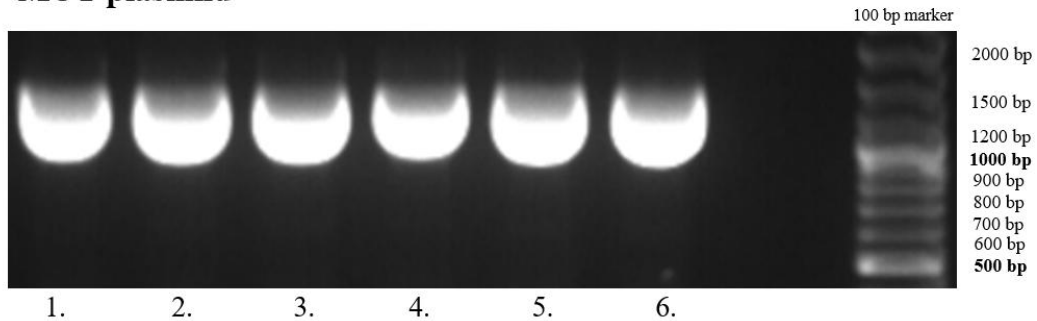
Lisad

Lisa 1

WT plasmiid



MUT plasmiid



CrPV 3C proteaasi lõikesaidiga plasmiidid transformeeriti *E. coli* DH5- α rakkudesse. LB-Amp tardsöötmel üleöö kasvanud ampitsilliiniga (1 mg/ml) selekteeritud rakukolooniaid kasvatati 2 ml LB-Amp vedelsöötmes 37 °C juures üleöö loksutuskiiirusel 180 rpm. Rakkudest eraldati plasmiidid järgides *Plasmid Extraction Mini Kit* tootjapoolset protokollit (*FavorPrep*). Plasmiidid paljundati PCR meetodil praimeritega DnaK_KpnI_Forw ja 3C_RdRp_Rev ning analüüsiti agarose geleelektroforeesil. Rakukolooniatest eraldatud plasmiididest valiti valgu ekspresseerimise jaoks välja proovid, mida kujutab metsiktüüpi (WT) kui ka mutantsete (MUT) plasmiidide geelidel rada 2.

Lihtlitsents

Mina, Ade Sild,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Kilgi halvatuse viiruse 3C proteaasi lõikesaiti sisaldava valgu konstrueerimine, puhastamine ja lõikamine *in vitro*“, mille juhendaja on PhD Kristina Mäemets-Allas, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Ade Sild

25.05.2026