

HET ANALYSEREN EN VERIFIËREN VAN DE TERTIAIRE RNA- STRUCTUUR VAN DE XRN1-STALLING SITE IN DE 3 'UTR VAN HET MODOC FLAVIVIRUS

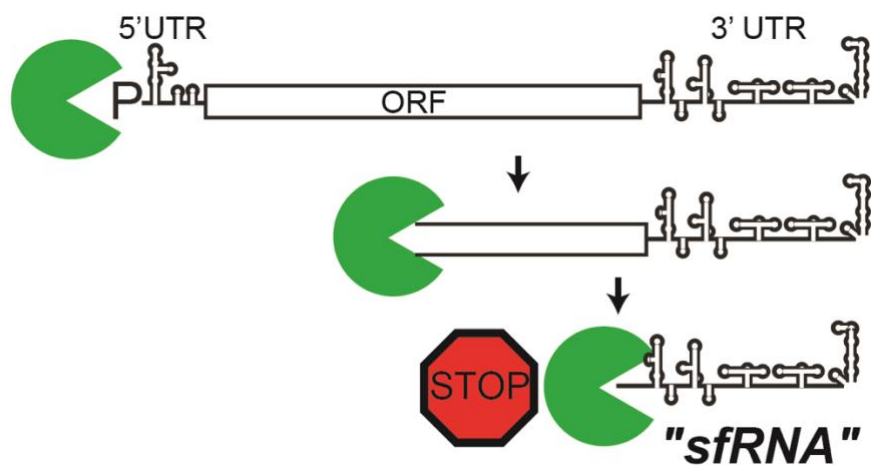
BACHELOR SCRIPTIE

ASSIA BOUABDA
2019 - 2020



HET ANALYSEREN EN VERIFIËREN VAN DE TERTIAIRE RNA-STRUCTUUR VAN DE XRN1-STALLING SITE IN DE 3' UTR VAN HET MODOC FLAVIVIRUS

BACHELOR SCRIPTIE



Assia Bouabda - s1100082

Afstudeerverslag, Tweede versie

23 juni 2020

Studie: Biologie en Medisch Laboratoriumonderzoek te Hogeschool Leiden

Locatie studie: Zernikedreef 11, 2333 CK Leiden

Eerste examiner: Ing. T Vos

Tweede examiner: Ing. J van Schie

Stagebegeleider: Dr. PJ Bredenbeek

Praktijkbegeleiders: Ing. T Dalebout, Dr. PJ Bredenbeek

Stageplek: Medische Microbiologie (Virologie) te Leids Universitair Medisch Centrum

Locatie stage: Albinusdreef 2, 2333 ZA Leiden

Stageperiode: 2 september 2019 – 2 juni 2020



INHOUDSOPGAVE

Lijst met afkortingen	4
Abstract.....	5
Inleiding	6
Proefopzet.....	9
Materiaal en methode	11
Algemene condities celkweek en virus	11
Mutagenese in een infectueuze MODV kloon	11
<i>In vitro</i> RNA transcriptie	12
RNA transfectie	12
Immunofluorescentie microscopie	12
Virus plaque assays	13
infectie van MODV en RNA isolatie	13
Northern blot analyse	13
Resultaten	14
Mutagenese in een infectueuze MODV kloon	14
Immunofluorescentie microscopie	15
Virus plaque assays	16
Northern Blot analyse	17
Discussie en conclusie	20
Mutagenese in een infectueuze MODV kloon	20
Immunofluorescentie microscopie	20
Virus PLaque assay	21
Northern blot analyse	21
Vervolgonderzoek	23
Conclusie	23
Literatuur	24
Bijlage 1- Geneious file MODV Literatuur	25
Bijlage 2- Constructen en gebruikte primers	26
Bijlage 3 – <i>In vitro</i> data.....	28

LIJST MET AFKORTINGEN

FV – Flavivirus

kb- Kilobase

kDa – kilo Dalton

RNA – Ribonucleïnezuur

DNA – Desoxyribonucleïnezuur

NKV – No known vector (Flavivirus met geen/ een onbekende vector)

cDNA – complement DNA

MODV – Modoc virus

APOIV – Apoi virus

RBV – Rio Bravo virus

MMLV - Murine leukemia virus

ORF – Open reading frame (open leesraam)

UTR – Untranslated region (niet vertaalde gebieden)

NS – Niet structureel eiwit

XRN1 – Exoribonuclease 1

gRNA – Genomisch RNA

sfRNA – Small flavivirus RNA (klein flaviviraal RNA)

xrRNA - XRN1 resistent RNA

mQ – MilliQ water

BHK- Baby Hamster Kidney Cell

MOI – Multiplicity of infection (Aantal virusdeeltjes per cel)

SD – Standaarddeviatie

siRNA - Small interfering RNA (klein interfererend RNA)

ABSTRACT

BACKGROUND Flaviviruses are enveloped, positive-stranded RNA viruses with a genome of 10–11 kb in length. Based on the route of transmission, flaviviruses can be divided into three groups; through mosquitoes, ticks or an no known vector. The third group includes the less well studied viruses, such as the Modoc virus.

Until a few years ago, it was thought that only three viral RNA forms could be found in cells infected by flaviviruses. However, a decade ago a fourth form, a small subgenomic RNA (sfRNA), was detected. These sfRNAs are formed by partial degradation of the viral RNA by 5'–3' host exoribonuclease, XRN1. XRN1 plays an important role in the breakdown of damaged/ foreign RNA molecules and plays an important role in the homeostasis of the host cell.

Computer models suggest a network of nucleotide interactions resulting in a pseudoknot which blocks the XRN1 activity, resulting in sfRNAs. sfRNAs have been implicated in cytopathicity and pathogenicity, thus they are directly related to disease symptoms and are potential therapeutic targets.

Previous research has shown that the Modoc virus has the ability to produce one sfRNA. To investigate sfRNA production in the Modoc virus, a three-dimensional model for the predicted XRN1 stalling site in the 3' untranslated region of Modoc virus is made.

OBJECTIVE Verify the predicted XRN1 stalling site model of the Modoc virus by introducing mutations targeted at nucleotides involved in the structural characteristics of the XRN1-resistant RNA structure.

METHODS Several mutations were made in the 3' untranslated region of an infectious MODV clone using mutagenesis. Some of these mutations are expected to disrupt the pseudoknot, which makes it possible for XRN1 to degrade the RNA completely. Other mutants are expected to restore the nucleotides, which may result in sfRNA. After making these mutants, virus stocks were grown and Baby Hamster Kidney cells were infected with the mutants and analyzed for sfRNA production by a Northern Blot analysis.

RESULTS The virus plaque assays and immunofluorescence microscopy images implicated that none of the mutations were lethal for the virus. Overall, the mutations causing a disruption of the helix structure did not show sfRNA, the mutations recovering the helix structure with new nucleotides did show sfRNA. Also, a possible second sfRNA is detected in some mutants.

CONCLUSION The mutagenesis studies using Modoc virus confirms the RNA structure model for the XRN1 stalling site in the Modoc virus.

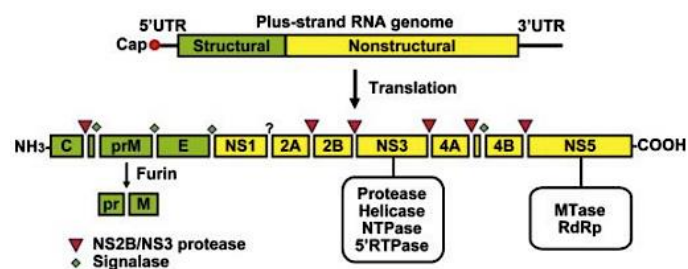
INLEIDING

Flaviridae zijn enkelstrengs, positieve RNA-virussen met genoom van 10–11 kb lang. De virusfamilie *Flaviridae* bestaat uit een viertal verschillende genera: flavi-, pesti-, hepaci- en pegivirussen.^[1]

Op basis van vector kunnen flavivirussen worden opgedeeld in drie groepen; besmetting/ transmissie via muggen (1), teken (2) en via geen of een onbekende vector (3). De eerste twee groepen omvatten voornamelijk pathogenen van de mens zoals het denguevirus, het gele koorts virus en het teken-encephalitis virus en zijn hierdoor relatief goed bestudeerd. De derde groep omvat de wat minder bestudeerde virussen, zoals het Modoc virus.^[1, 2]

Het Modoc virus (MODV) is een flavivirus met een onbekende vector (een NKV flavivirus). MODV werd in eerste instantie geïsoleerd uit witvoetmuizen (*Peromyscus maniculatis*) in Modoc County, Californië. Tot op heden is er geen enkele aanwijzing voor de betrokkenheid van een vector bij de verspreiding van het virus en wordt er gedacht dat verspreiding van dit virus zeer waarschijnlijk plaatsvindt door direct contact. Daarom behoort dit virus tot de onbekende vector flavivirussen.^[8] Een infectie van het Modoc virus bij muizen (*Mus musculus*) is neuro invasief en kan lijden tot dodelijke encefalitis en ernstig gecombineerde immuunstoornis (SCID).^[8]

Alhoewel infectie van mensen met dit virus nooit is vastgesteld, is er uit een studie in Alberta (Canada) middels een steekproef gebleken dat een gering deel van de inwoners van deze staat seropositief zijn voor MODV zonder dat dit met een ziektebeeld geassocieerd kan worden.^[8]



FIGUUR 1. ALGEMENE GENOOM ORGANISATIE VAN EEN FLAVIVIRUS, BESTAANDE UIT ÉÉN GROOT OPEN LEESRAAM GEFLANKEERD DOOR 5' EN 3' NIET-VERTAALDE GEBIEDEN. DE STRUCTURELE EIWITTEN OMVATTEN HET C, PRM EN E EIWIT EN DE NIET-STRUCTURELE EIWITTEN OMVATTEN NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B EN NS5.

De genoom organisatie van MODV komt sterk overeen met de algemene genoom organisatie van flavivirussen. Het omvat één groot open leesraam (ORF) dat codeert voor een polyproteïne van meer dan 3000 aminozuren. Splitsing van dit eiwit wordt bereikt door middel van cellulaire signalases van de gastheercel en het virale protease NS3 (niet-structureel eiwit 3) die gekliefd wordt in de functionele eiwitten (**figuur 1**). Het ORF wordt geflankeerd door 5' en 3' niet-vertaalde gebieden (5' en 3'-UTR). Het N-terminale gebied codeert voor de virale structurele eiwitten; het C (nucleocapside) eiwit, het E (envelope) eiwit en het prM/ M (membraan) eiwit. Deze eiwitten zijn hoofdzakelijk betrokken bij het binnendringen van het virus in de cel en virus assemblage.^[1, 2, 8]

Het C eiwit (nucleocapside eiwit) van +/- 11 kDa is een basisch eiwit dat het nucleocapside vormt waarin het virale genoom RNA wordt ingepakt. Dit nucleocapside wordt omgeven door een zogenaamde envelop die bestaat uit een lipide membraan welke afkomstig is van de gastheer en waarin zich de twee overige virale structurele eiwitten zich bevinden.^[1,20]

Het E eiwit is het meest prominent aanwezig op het oppervlak van een flavivirus. Het is het virale hemagglutinine, dat verantwoordelijk is voor receptorbinding en zuur-pH-afhankelijke fusieactiviteit bemiddelt na opname door receptor-gemedieerde endocytose. Daarnaast is het een belangrijk aangrijpingspunt van de humorale immuunrespons.^[1,20]

Het prM eiwit vormt met het E eiwit prM-E-heterodimeren op het envelop van nieuw gevormde, onrijpe virionen. Deze prM-E-interactie voorkomt door lage pH geïnduceerde conformatie veranderingen in het E-eiwit tijdens de doorvoer van de secretoire route. Het omzetten van onrijpe tot rijpe virionen vereist het klieven van het prM eiwit in pr en M door het furine protease van de gastheer.^[11, 20]

De C-terminals omvatten zeven niet-structurele (NS) eiwitten. Deze eiwitten zijn voornamelijk betrokken bij RNA-replicatie en immuun evasie. Deze NS eiwitten omvatten onder andere NS1 (een multifunctioneel glycoproteïne), NS2A (hydrofoob transmembraan eiwit), NS2B (cofactor voor de virale serine protease activiteit), NS3 (RNA helicase en nucleotide trifosfatase), NS4A/ NS4B en NS5, een goed geconserveerd eiwit dat verantwoordelijk is voor de RNA afhankelijke RNA polymerase.^[11, 20]

Tot een aantal jaren geleden werd er gedacht dat er in door flavivirus geïnfecteerde cellen slechts een drietal virale RNA-vormen konden worden aangetroffen; enkelstrengs genomisch RNA (gRNA), de dubbelstrengs replicatieve vorm en replicatieve tussenproducten.^[1, 2]

Echter, een tiental jaar geleden zijn er bij aantal door muggen overgedragen flavivirussen naast de drie genoemde virale RNA's ook nog een vierde klein (200 – 500 nucleotiden lang) RNA aangetroffen. Dit zogenaamde 'small-flavivirus' RNA (sRNA) is volledig co-lineair met het uiterste 3' uiteinde van het virale genoom. Het sRNA is dus afkomstig van de 3'-UTR van het genoom en bevat geen noemenswaardig ORF.^[3]

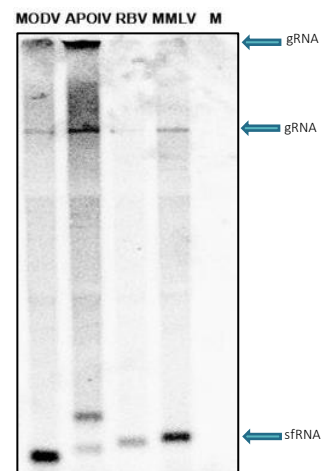
Een studie uitgevoerd door *Silva et al.* laat middels een Northern Blot zien dat ook bij NKV flavivirussen als het Modoc virus (MODV), het Apoi virus (APOIV), het Rio Bravo virus (RBV) en het Murine leukemia virus (MLLV) tenminste één sRNA kan worden gedetecteerd (**figuur 3**).^[9]

Deze sRNA's ontstaan door onvolledige afbraak van viraal genomisch RNA door het 5'→3' RNase XRN1 van de gastheercel, dat binnen het 3' onvertaalde gebied van het gRNA (3' UTR) stopt en sRNA's vormt.^[3]

Deze gastheercel exoribonuclease XRN1 is een goed geconserveerd eiwit onder eukaryoten en speelt een belangrijke rol in 5'-3' degradatie van mRNA. XRN1 speelt een belangrijke rol bij de afbraak van beschadigde dan wel ongewenste RNA moleculen en speelt zodanig een belangrijke rol in de homeostase van de gastheercel. XRN1 werkt op een procesmatige manier door RNA te hydrolyseren van 5'-fosfaatgroepen tot 5'-mononucleotiden. Daarnaast heeft XRN1 een antivirale werking door de exonuclease activiteit, het dient als surpressor van virale recombinante RNA's.^[4]

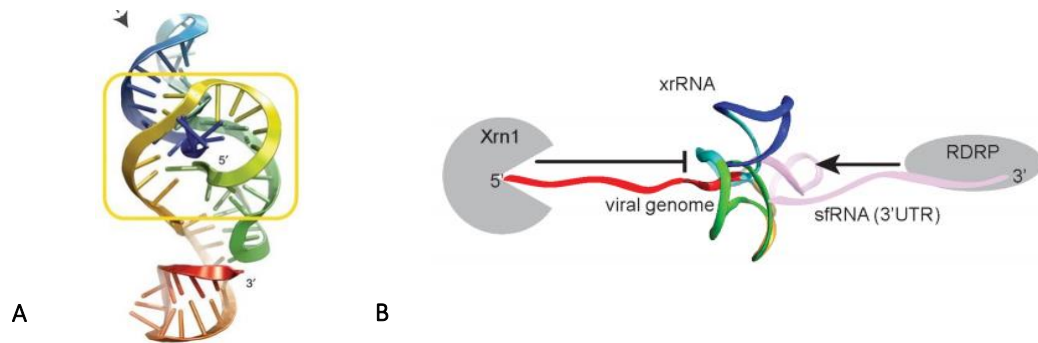
Eerdere studies hebben aangetoond dat de werking van XRN1 geblokkeerd kan worden door stabiele RNA structuren.^[4] Met behulp van computer simulaties van RNA vouwingen, RNA röntgen diffractie en bio informatica zijn er sterke aanwijzingen verkregen dat alle flavivirussen een XRN1-resistent RNA (xrRNA) produceren. Biochemische studies suggereren dat een complex onafhankelijk gevouwen RNA-structuur verantwoordelijk is voor deze XRN1-resistentie; het op structuur gebaseerde mechanisme is tot op heden nog onbekend.^[4, 13]

Uitlijning van deze vermeende xrRNA-sequenties en de kristalstructuur suggereren meerdere helix structuren in de vorm van klassieke basepaar interactie (stem-loop structuren), RNA pseudokopen en een cruciale interactie tussen drie basen i.p.v. twee via waterstofbruggen (een tripel knooppunt). Dit tripel knooppunt kenmerkt zich door een "G" residu dat waterstof bruggen vormt met twee onafhankelijke "C" residuen. Deze unieke, complexe structuur resulteert als het ware in een korte



FIGUUR 2. AANWEZIGHEID VAN XRRNA BIJ NKV FLAVIVIRUSSEN. VAN LINKS NAAR RECHTS IS HET MODOC VIRUS, HET APOI VIRUS, HET RIO BRAVO VIRUS, HET MURINE LEUKEMIA VIRUS EN DE NEGATIEVE CONTROLE TE ZIEN. ELK VIRUS LIJKT 1 SFRNA BANDJE TE VERTONEN, BEHALVE HET APOI VIRUS, IN DEZE LAAN ZIJN TWEE SFRNA BANDJES TE ZIEN. (SILVA ET AL., 2010)

RNA buis structuur waar de 5' kant van het RNA vanuit de achterkant door heen steekt (**figuur 2A**). De diameter van deze buis is echter dusdanig klein dat XRN1 er niet door heen kan. De nucleotiden die deze blokkade vormen zijn onbereikbaar voor XRN1, waardoor de degraderende activiteit geblokkeerd wordt wat dus resulteert in sfRNA's (**figuur 2B**). [5, 6, 13]

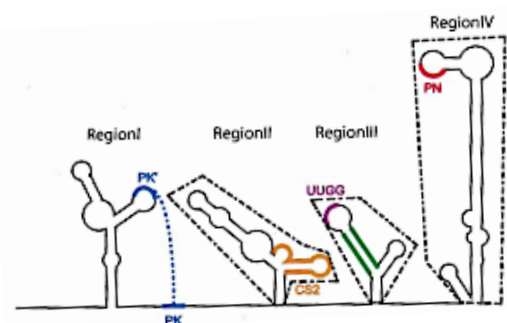


FIGUUR 3. (A) 3D WEERGAVE VAN DE XRN1 BLOKKADE SITE IN HET 3'UTR VAN HET ZIKA VIRUS. **(B)** SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN BLOKKADE VAN XRN1 DOOR EEN STALLINGSITE IN HET 3' UTR VAN EEN FLAVIVIRUS. DE PSEUDOKNOOP DIE DE BLOKKADE VERORZAAKT WORDT HIER WEERGEGEVEN ALS XRNA (XRN1 RESISTENT RNA). DE PAARSE STRENG AAN DE 3' KANT VERTEGENWOORDIGD HET SFRNA. [18]

Deze sfRNA's accumuleren tot hoge niveaus en gaan interacties aan met vele cellulaire eiwitten om processen te beïnvloeden zoals RNA-interferentie, cellulair RNA-veral, de interferon respons, en het overdrachtsproces tussen de vector en gastheer. [6]

Computer geassisteerde sequentie analyses en RNA vouwing van MODV voorspellen de aanwezigheid van vier regio's in de distale kant van het 3' onvertaalde regio wat blijkt geconserveerd te zijn als een RNA structuur (**figuur 4**). Bij MODV wordt regio I voorspeld verantwoordelijk te zijn voor de blokkade van de XRN1 activiteit. [10, 11, 13]

Zo wordt er bij regio I een lange haarspeld gesuggereerd met een vertakte stem loop. De boog sequentie in deze structuur lijkt een interactie aan te gaan met nucleotiden verder in de sequentie. Het vormen van deze exacte pseudokoop blijkt essentieel te zijn bij het blokkeren van de XRN1 activiteit, en dus essentieel voor het ontstaan van sfRNA. Regio I wordt dus voorspeld te dienen als een zogenoemde XRN1 stalling site. [9, 10, 11]



FIGUUR 4. 2D WEERGAVE VAN HET VOORSPELDE 3'UTR VAN HET MODOC VIRUS. DE GEKLEURDE GEBIEDEN GEVEN DELEN AAN DIE ZIJN GECONSERVEERD IN ALLE NKV FLAVIVIRUSSEN. BIJ REGIO I IS DE HAARPELD STRUCTUUR TE ZIEN, BIJ REGIO II EEN HALTER STRUCTUUR EN BIJ REGIO III EEN 'Y' VORMIGE STRUCTUUR. DE STRUCTUUR VAN REGIO I LIJKT VERANTWOORDELIJK TE ZIJN BIJ HET BLOKKEREN VAN DE XRN1 ACTIVITEIT. [8]

Verder zou regio II een halter structuur vormen die geconserveerd is binnen NKV flavivirussen. Het bevat CS2 sequentie die goed geconserveerd zou zijn binnen NKV flavivirussen (oranje, **figuur 4**). Regio III zou een en 'Y' gevormde structuur vormen, bestaande uit twee bogen. Ten slotte wordt er bij regio IV een lange haarspeld gesuggereerd. [8, 9, 10]

Deze voorspelde structuren van onbekende vector flavivirussen zijn in het verleden echter weinig bestudeerd/bevestigd doordat er geen infectueuze complemente DNA (cDNA) kloon beschikbaar was. Inmiddels is dit veranderd en is er een stabiele infectueuze cDNA kloon van het Modoc virus beschikbaar, dit is dan ook de reden dat dit virus is uitgekozen voor het bevestigen van de 3' UTR regio I. [9, 10, 11]

Er is reeds aangetoond dat sfRNA's van invloed zijn op *ex vivo* cytopathiciteit en pathogeniteit in foetale muizen. [8] Hieruit kan er gezegd worden dat deze sfRNA's direct van invloed zijn op symptomen

en een belangrijk aangrijpingspunt kunnen zijn bij het ontwikkelen van een therapie. Verder zijn er studies die suggereren dat sfRNA een rol speelt in het onderdrukken van RNA interferentie in zowel zoogdier als insecten cellen, en dat het sfRNA een grote rol speelt bij het passeren van de midden darm barrière bij muggen. [7, 8]

Het doel van deze studie is niet alleen om het model van de XRN1 stalling site voor MODV te verifiëren, maar ook om vast stellen in hoeverre er variaties zijn in de structuur van de XRN1 stalling sites binnen het genus flavivirussen. Alhoewel het hier duidelijk om fundamenteel onderzoek gaat, kan niet uitgesloten worden dat genetisch gemodificeerde flavivirussen die niet langer een sfRNA kunnen produceren wellicht hun toepassing kunnen vinden in vernieuwde flavivirus vaccins, gegeven de duidelijke associatie van sfRNA productie en pathogeniciteit. Dit maakt het belangrijk meer te weten te komen over de RNA structuur en hoe deze verstoord kan worden.

Als hypothese wordt er uitgegaan van het bestaande model van regio 1 (**figuur 5**) gemaakt door René Olsthoorn.

PROEFOPZET

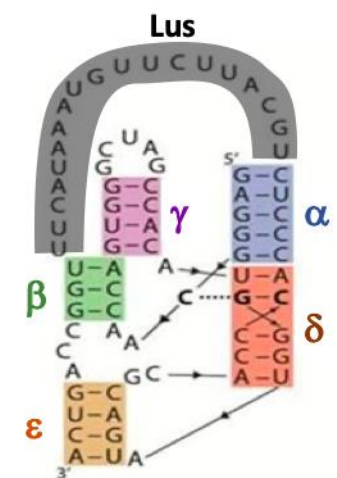
Uit eerder onderzoek is gebleken dat niet alleen de “vector-borne” flavivirussen , maar ook de NKV- en insecten flavivirussen minimaal één sfRNA produceren.^[9] In samenwerking met de groep van Dr. Olsthoorn (Chemie, Universiteit Leiden) is er op basis van primaire en secundaire conservering en computer gestuurde RNA structuur voorspellingen een driedimensionaal model voor de XRN1 stalling site in het genoom van MODV (regio I) opgesteld (**figuur 5**). Deze structuur analyse ondersteunt de hypothese betreffende de aanwezigheid van een dergelijke XRN1 stalling site in de 3’UTR van dit virus.

Om dit RNA model te verifiëren, zullen er met behulp van *ex vivo* mutagenese 10 mutanten worden gemaakt met mutaties in regio I van het 3’ UTR van het Modoc virus (**bijlage 2** voor alle mutanten).

De eerste mutatie omvat een deletie van de lus (grijs gebied, **figuur 5**). Verder worden er drie mutanten in het bèta (β-gebied (groen gebied, **figuur 5**) gemaakt en nog eens 3 mutanten van het epsilon (ε-gebied (geel gebied, **figuur 5**). De hypothese is dat per gebied twee van deze mutanten helix structuur zullen verstoren waardoor er geen sfRNA meer zal ontstaan en één mutant de structuur weer zou moeten herstellen, met nieuwe nucleotiden. Ten slotte zullen er drie mutaties worden aangebracht in het tripel knooppunt structuur (dik gedrukte nucleotiden, **figuur 5**). Naar verwachting zal één mutant (tripel 1 mutant) zal het knooppunt verstoren, waar de andere twee mutaties het knooppunt naar verwachten zullen herstellen wat zou kunnen leiden tot de aanwezigheid van sfRNA.

Het werkschema van alle experimenten is weergegeven in **figuur 6**. De mutaties worden aangebracht middels Quikchange site directed mutagenesis. Met deze techniek worden mutaties aangebracht middels een PCR reactie met primers die de gewenste mutatie bevatten. Zo worden er kopieën gemaakt van het plasmide die de gewenste mutaties bevatten. Voorafgaande aan deze studie zal er al een deel van het NS5 en het gehele 3’ UTR uit het MODV genoom worden geknipt met *KasI* en *XhoI* en ingebracht worden in een kleiner plasmide, ‘pBluescript’. Dit plasmide zal gebruikt worden voor het aanbrengen van de mutaties.

Na het maken van deze mutanten zal het gemuteerde 3’UTR uit het pBluescript worden geknipt en in de volledige MODV kloon (**bijlage 1**) geligeerd worden. Het DNA hiervan zal worden geïsoleerd en



FIGUUR 5. 2D WEERGAVE VAN DE TERTIAIRE STRUCTUUR IN REGIO I VAN HET 3’UTR UITEINDE VAN MODV (DR. OLSSTHOORN).

IN HET GRIJZE GEBIED IS DE LUS SEQUENTIE TE ZIEN, IN HET GROEN HET BETA GEBIED EN IN HET GEEL HET EPSILON GEBIED. DE NUCLEOTIDEN DIE BETROKKEN ZIJN BIJ HET TRIPEL KNOOPPUNT ZIJN AANGEGEVEN MET DIKGEDRUKTE NUCLEOTIDEN

gelineariseerd. Hiermee zullen er *in vitro* RNA transcripten worden gemaakt.

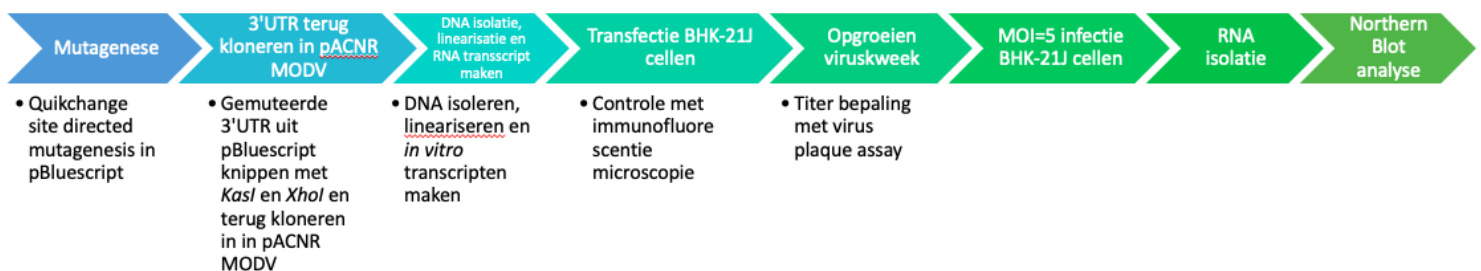
Deze transcripten worden vervolgens in 'Baby Hamster Kidney' cellen (BHK-21J) getransfecteerd, hiervan zal er een virusweek worden opgegroeid. Deze cellijn wordt gebruikt omdat MODV staat is deze cellijn te infecteren en CPE te veroorzaken.^[8] Deze virusweek zal geoogst worden na het waarnemen van een cytopathogeen effect. Ter controle van de transfectie zal er immunofluorescentie microscopie worden toegepast.

Na het opgroeien van de virusweek zal er per mutant een virustiter worden bepaald met behulp van virus plaque assays.

Na het titreren van de gemaakte mutanten zullen BHK-21J cellen worden geïnfecteerd met een MOI=5 (5 virusdeeltjes per cel). Uit deze cellen zal RNA worden geïsoleerd, dit RNA zal vervolgens chemisch worden gelabeld en met behulp van een Northern Blot worden geanalyseerd op de aanwezigheid van sfRNA. Er wordt hierbij verwacht een genoom band (13 kb) en één eventueel sfRNA bandje (300 bp) te detecteren (afhankelijk van de mutatie). Aanwezigheid van sfRNA's duidt op een intacte xrRNA structuur.

Omdat het sfRNA colinear is met het 3'UTR is het niet mogelijk de productie hiervan te detecteren met een qPCR. Met behulp van een Northern Blot kan daarentegen wel de eventuele sfRNA productie worden waargenomen.

Gedurende de experimenten zal er als positieve controle 'wildtype MODV' worden meegenomen. Aan dit plasmide zullen geen mutaties worden aangebracht, maar het doorloopt wel hetzelfde proces als de mutanten.



FIGUUR 6. STROOMSCHEMA VAN ALLE EXPERIMENTEN MET BETREKKING TOT DE *EX VIVO* DATA.

MATERIAAL EN METHODE

De experimenten beschreven in dit hoofdstuk hebben enkel betrekking tot de *ex vivo* data (*ex vivo* mutagenese).

De *in vitro* data van Ivar Dilweg en René Olsthoorn is weergegeven in **bijlage 3**, deze data zal in de discussie besproken worden.

ALGEMENE CONDITIES CELKWEK EN VIRUS

Baby Hamster Kidney cellen (BHK-21J) werden gegroeid in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza) met 8% foetaal kalfsserum (FCS, Bondico), 1,1% niet-essentiële aminozuren (NEAA, Lonza), 100 IU/ ml penicilline (Lonza) en 100 µg/ml streptomycine (Lonza). De cellen zijn gedurende experimenten geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂.

De MODV virusstam M455 (GenBank AJ242984) verkregen van Prof. J. Neyts (Leuven, België) tijdens een eerdere samenwerking en is oorspronkelijk afkomstig van de American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VS).

Viruskweken van de MODV M544 stam waren bij aanvang van deze studie al beschikbaar en zijn geproduceerd als eerder beschreven (Jiang *et al.*, 2013).^[10]

MUTAGENESE IN EEN INFECTIEUZE MODV KLOON

Tenzij anders aangegeven is er tijdens deze studie gebruik gemaakt van standaard recombinant DNA technieken voor het isoleren van DNA, restrictie enzym digesties, gel electroforese en DNA ligaties^[11]. Voor het kloneren werden chemisch competente *Escherichia coli* DH5α bacteriën gebruikt als gastheer (Inoue *et al.* 1990).^[17] Modoc nucleotidenummering is volgens GenBank-toegangsnummer (AJ242984).

Bij de aanvang van deze studie waren er een tweetal plasmiden beschikbaar: pANCR-MODV61 en pBluescript-MODV₉₆₅₁₋₁₀₆₀₅. Het eerst genoemde plasmide bevat een volledig cDNA van het MODV genoom dat aan de 5' kant is gefuseerd aan een T7 promotor en aan de 3' kant een unieke knip plaats voor het restrictie enzym *Afl* II bevat (**bijlage 1**). De pBluescript-MODV₉₆₅₁₋₁₀₆₀₅ is als tijdelijke vector gebruikt. Dit plasmide bevat naast een klein deel van het gen dat codeert MODV NS5, het gehele 3'UTR van het virus en dus ook de XRN1 stalling site. De mutaties zijn dus aangebracht in pBluescript-MODV₉₆₅₁₋₁₀₆₀₅.

Er is gebruik gemaakt van Quikchange site directed mutagenesis (Stratagene) om deleties/puntmutaties aan te brengen in pANCR-MODV6. Zo zijn er middels een PCR reactie tien mutanten gemaakt, zie bijlage 2 (**figuur 2.1**) voor een 2D weergave van de constructen. In bijlage 2, tabel 2.1 zijn de bijbehorende primers weergegeven. Ongeveer 10 ng pBluescript-MODV₉₆₅₁₋₁₀₆₀₅ werd gebruikt als een template in een PCR met een forward en reverse primer welke de gewenste mutatie bevatten. Als DNA polymerase voor de PCR werd gebruikt gemaakt van het "high fidelity" Accuzyme (Bioline). De PCR omvatte 20 cycli waarbij een elongatie temperatuur van 72°C en een van extensie tijd van 8 minuten per cyclus werd aangehouden. De originele plasmiden zijn na de PCR reactie stuk geknipt door DpnI (10U/ µl).

Vervolgens zijn competente *Escherichia coli* DH5α cellen getransformeerd middels een heatshock voor 60 sec. bij 55°C, dit is uitgeplaat op een 'Lysogeny Broth' (LB) agar plaat met ampicilline. Dit is overnacht geïncubeerd bij 37°C. De volgende dag is er één kolonie aangeent en hiervan is overnacht een bacteriekweek in LB medium met ampicilline gegroeid bij 37°C. Hieruit is DNA geïsoleerd met behulp van een Nucleospin Minprep Kit (Machery-Nagel), de concentratie en kwaliteit is bepaald middels een Nanodrop. Om te controleren of dit DNA de gewenste mutatie bevat is er Sanger Sequencing toegepast.

Om het insert terug te kloneren in de pANCR-MODV61 is deze uit het pBluescript-MODV₉₆₅₁₋₁₀₆₀₅ geknipt met de restrictie enzymen *Kas*I en *Xho*I. Middels een gel electroforese op een 0,8% agarose gel zijn de

insert bandjes en de vector MODV complete sequence gescheiden, de fragmenten zijn uit de gel geïsoleerd met een Isolate II PCR kit (Bioline), vervolgens zijn de geïsoleerde fragmenten met elkaar geligeerd.

De ligatie werd uitgevoerd in een reactie volume van 25 µl met T4 ligase volgens de aanbevelingen van de leverancier (New England Biolabs). Na een ligatie van > 2 uur werd 10 µl van deze reactie gebruikt voor het transformeren van competente DH5 *α E. coli* bacteriën zoals eerder beschreven. Hieruit is DNA geïsoleerd middels een maxiprep (Invitrogen). De concentraties en kwaliteit (A260/280) van het geïsoleerde DNA zijn bepaald met behulp van een Nanodrop. Ook dit DNA is gecontroleerd middels Sanger sequencing van enkel het gemuteerde fragment.

IN VITRO RNA TRANSCRIPTIE

Het gezuiverde DNA van pANCR-MODV61 en de mutanten werd gelineariseerd met *AflIII* en opgezuiverd door een fenol/ chloroformextractie gevolgd door een ethanol precipitatie. De kwaliteit is bepaald met behulp van gel elektroforese op een 0,8% agarose gel.

Vervolgens werd 1-2 µg lineair gemaakt plasmide-DNA gebruikt als template voor T7 RNA-polymerase-transcriptie met behulp van de Ampliscribe™ T7 high-yield transcription kit (Epicentre, Madison, VS). Na transcriptie werd het reactiemengsel behandeld met DNase I en werd het RNA gezuiverd door precipitatie met lithiumchloride. De concentratie van het RNA werd bepaald met behulp van een Nanodrop en de kwaliteit is bepaald met behulp van een gel elektroforese op een 0,8% agarose gel.

RNA TRANSFECTIE

Vervolgens zijn BHK-21J cellen zijn getransfecteerd middels electroporatie met 5 µg van de full-length MODV RNA. Hierbij werd 5 µg *in vitro* RNA met 100 µl Nucleotransfection medium T (met daarin +/- $2 \cdot 10^6$ cellen) getransfecteerd m.b.v. een Amaxa Nucleofector™ Device (programma A-031). Specificatie van dit programma zijn fabrieksgeheim en dus onbekend. De celsuspensie werd hierna geresuspendeerd in 10 ml DMEM (Lonza) met 2% FCS. Hiervan werd 500 µl celsuspensie 10 X verdund en van deze verdunning werd 2 ml (ongeveer 1.5×10^6 cellen) uitgezaaid in een 10 cm² plaat met daarin een aantal dekglasjes voor immunofluorescentie microscopie. De rest van de celsuspensie werd uitgezaaid in een T75 fles (Greiner, Bio-One). De schaaltes voor de microscopie werden na 24 uur gefixeerd met 4% paraformaldehyde (zie vervolg onder 'immunofluorescentie microscopie').

De T75 werd verder geïncubeerd. Dit medium is geoogst na het zien van een cytopathogeen effect ten gevolge van een voortschrijdende virusinfectie. Dit was doorgaans 60-72 uur post electroporatie. Het oogsten van het medium is gedaan door het medium uit de fles te verzamelen en vervolgens 10 minuten af te draaien met een snelheid van 1500 RPM bij 4°C. Het supernatant is verzameld en is bij -80°C bewaard. Dit werd als virusweek gebruikt.

IMMUNOFLUORESCENTIE MICROSCOPIE

Om het een schatting te kunnen maken van het aantal cellen dat met de virale RNA transcripten zijn getransfecteerd werd er immunofluorescentie toegepast. Hiertoe werden de geëlectroporeerde en gepermeabiliseerde cellen in de 10 cm² schaal (zie kopje 'RNA transfectie') gewassen met PBS met 10 mM glycine.

Hierna werden de cellen gepermeabiliseerd met 0.1% Triton X-100 in PBS. Een indirecte immunokleuring is uitgevoerd met als primair antilichaam anti MODV hyperimuun serum in een 1:1000 verdunning in PBS/ 5% FCS.

Als secundair antilichaam is Alexa Fluor © 488 goat-anti-mouse igG (Invitrogen) gebruikt in een 1:500 verdunning. Als kernkleuring is er HOECHTS gebruikt in een 1:100 verdunning in PBS/ 5% FCS. Deze glasjes zijn vervolgens geanalyseerd met een fluorescentie microscoop bij een 10x vergroting en een blootstellingstijd van 1200 ms.

VIRUS PLAQUE ASSAYS

Voor de infectie zijn BHK-21J uitgezaaid in een 6-wells cluster (2 ml per well) en opgegroeid tot een monolaag met 80-90% confluentie. Voor de plaque assays zijn de cellen eenmaal met PBS gewassen en vervolgens geïnnoculeerd met 250 µl van de 10^{-1} tot 10^{-6} verdunningen van de viruskweken. Na een 1 uur incubatie bij 37°C is het inoculum afgezogen en is er medium in 1,2% Avicell overlay op de cellen aangebracht.

Na vier dagen incubatie bij 37°C is de Avicell overlay afgezogen en zijn de cellen gefixeerd met 2,5 ml 3.5% formaldehyde voor >1 uur bij kamertemperatuur. Vervolgens zijn de welletjes 10-15 minuten gekleurd met 2 ml kristalviolet per well waarna de plaques werden geteld voor het bepalen van de virustiter (reguliere virus plaque assay).

Voor de immuno plaque assays zijn de cellen na fixatie met 3.5% formaldehyde drie keer gewassen met PBS-glycine (10mM) en gepermeabiliseerd door een 15 minuten incubatie met 0,5% Triton X-100 in PBS. Na drie was stappen met PBS zijn de welletjes 1 uur geïncubeerd met 500 µl van een 1:500 verdunning van het primaire antilichaam; MODV hyperimmuun serum in PBS/ 10% FCS/ 0,05% Tween-80. Vervolgens is er nog een incubatiestap van 1 uur gedaan met het secundaire antilichaam, Goat-anti-Mouse-HRP (Dako, Glostrup, Denemarken) die 1:1000 verdunt is in PBS/ 10% FCS/ 0,05% Tween-80. Na drie was stappen met PBS/ 0,05% Tween en een korte was stap met 0.1 M Sodium acetaat buffer (pH 5.0) zijn de cellen 30 minuten in het donker geïncubeerd met 3-amino-9-ethylcarbazole als substraat. Deze peroxidase reactie is gestopt door de welletjes wassen met milliQ. Deze plaque assays zijn in duplo uitgevoerd.

INFECTIE VAN MODV EN RNA ISOLATIE

BHK-21J cellen zijn uitgezaaid in een 6 wells cluster en opgegroeid tot 90% confluentie onder reguliere omstandigheden. De cellen zijn vervolgens geïnfecteerd met de virusweek van zowel wildtype MODV als de mutanten. De cellen zijn geïnfecteerd met een MOI=5 (multiplicity of infection). 24 uur post infectie werd het medium van de cellen afgezogen en werden de cellen gewassen met PBS.

Vervolgens werden de cellen gelyseerd door toevoeging van 1 ml Tripure (Roche, Mannheim, Duitsland). De verkregen cellysaten in Tripure werden vervolgens gebruikt voor de isolatie van totaal intracellulair RNA zoals beschreven door de fabrikant. De RNA concentratie en kwaliteit werden bepaald met behulp van een Nanodrop.

NORTHERN BLOT ANALYSE

Voor analyse op de aanwezigheid van het MODV sfRNA werd er een Northern Blot uitgevoerd. Hiertoe werden samples met 10 µg totaal intracellulair RNA van de geïnfecteerde cellen gedenateerd met behulp van formaldehyde en formamide en vervolgens op grootte gescheiden met gel electroforese in een formaldehyde bevattende 1,5% agarose gel (*Silva et al., 2010*).^[10] Na electroforese werden de RNAs volgens klassieke, capillaire Northern blotting^[19] gedurende minimaal 24 uur overgeblot op een Hybond-N⁺ membraan (GE Healthcare, UK). Hierna werden de RNAs covalent aan de membraan gebonden door de membraan in een incubator gedurende 2 uur bij 80°C te incuberen. Toen werd het membraan gebruikt voor hybridisatie met een 5'- ³²P radioactief gelabeld oligonucleotide, NKV40 (**zie bijlage 2, tabel 2.2**), als label. Het labelen van de NKV40 werd uitgevoerd met behulp van T4 kinase (*Silva et al, 2010*). De hybridisatie werd uitgevoerd in 5X SSPE, 5X Denhardt, 1% homomix en 0,1% SDS bij 55°C (*Meinkoth et al., 1984*).^[19] Na afloop van de hybridisatie werd de membraan twee keer 10 minuten gewassen bij 55°C in 5X SSPE + 0,1% SDS.

Voor het visualiseren van het membraan werd er gebruik gemaakt van een Typhoon™ fosfo-imager en bijbehorende schermen en cassettes.

RESULTATEN

MUTAGENESE IN EEN INFECTUEUZE MODV KLOON

Er is gebruik gemaakt van Quikchange site directed mutagenesis (Stratagene) om deleties/puntmutaties te introduceren in een infectueuze MODV kloon. De mutaties zijn aangebracht middels een PCR reactie met primers die de gewenste mutatie bevatten. Zo zijn er succesvol 10 mutanten gemaakt (**bijlage 2**). De plasmiden zijn middels Sanger Sequencing gecontroleerd op de aanwezigheid van de gewenste mutatie.

De eerste mutatie die gemaakt is, is de lus mutant. Hierbij is er een deletie gemaakt van de bovenste 'boog' sequentie in de tertiaire structuur (grijs, **figuur 5**).

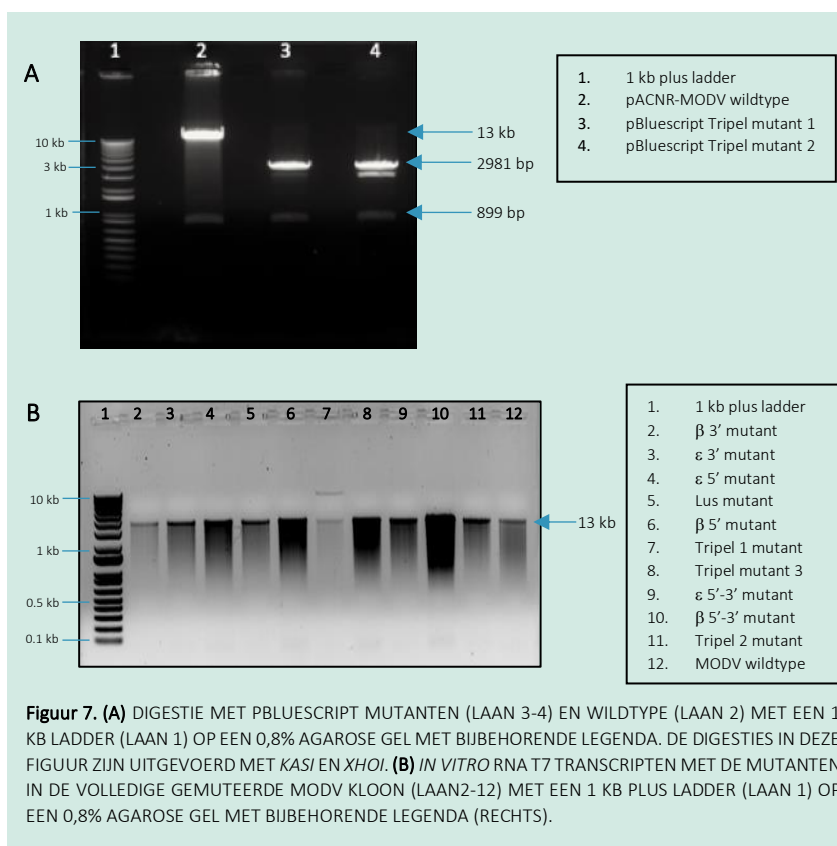
Er zijn tevens 3 mutanten gemaakt in de RNA helixstructuur van het ϵ -gebied en 3 mutanten in het β -gebied.

In het bèta gebied zijn de β 3'-mutant en de β 5'-mutant gemaakt, deze bevatten een verstoring van de helix structuur wat naar verwachting zal leiden tot de afwezigheid van sRNA. Ook is er een β 5'-3' mutant gemaakt, deze bevat herstelde nucleotiden die de helix structuur zou moeten herstellen. Vervolgens zijn er ook 3 mutanten gemaakt met mutaties in het epsilon gebied (geel, **figuur 5**). Ook hier is er een ϵ 3'-mutant en de ϵ 5'-mutant die een verstoring bevatten die leidt tot de afwezigheid van sRNA en de ϵ 5'-3' mutant bevat herstelde nucleotiden die de helix structuur herstellen.

Tot slot zijn er ook mutaties aangebracht in het tripel knooppunt (dikgedrukte nucleotiden, **figuur 5**). Bij de tripel 1 mutant is er een verstoring aangebracht waarvan verwacht wordt dat dit zal leiden tot de afwezigheid van het sRNA. De tripel 2 mutant en de tripel mutant 3 bevat herstelde basen wat mogelijk zou kunnen leiden tot sRNA (indien variatie van nucleotiden mogelijk is in dit gebied). Door het aanbrengen van deze mutaties die dus resulteren in een nieuwe nucleotidenvolgorde kan er worden vastgesteld in hoeverre er variaties zijn in de structuur van de XRN1 stalling sites binnen het genus flavivirussen.

Na het aanbrengen van de mutaties werd het NS5 en het gemuteerde 3'UTR uit de pBluescript -MODV geknipt om vervolgens geïntroduceerd te worden in de volledige pACNR MODV kloon. In **figuur 7A** is het NS5 met het 3'UTR (899 bp) gescheiden van de pBluescript (2981 bp). Het fragment is uit pBluescript geknipt middels *KasI* en *XhoI*. Ook is de vector te zien, waarbij het hetzelfde fragment (899 bp) uit het plasmide (13 kb) is geknipt. Deze figuur laat enkel het resultaat van de tripel 1 en tripel 2 mutant zien, maar is representatief voor de overige 8 mutanten. Het fragment (899 bp) van de mutanten is vervolgens geligeerd met de genoomband (13 kb) van het pACNR MODV.

Na het ligeren van het fragmenten in de volledige MODV kloon is er een bacteriekweek opgegroeid. Hieruit is DNA geïsoleerd en dit is gelineariseerd.



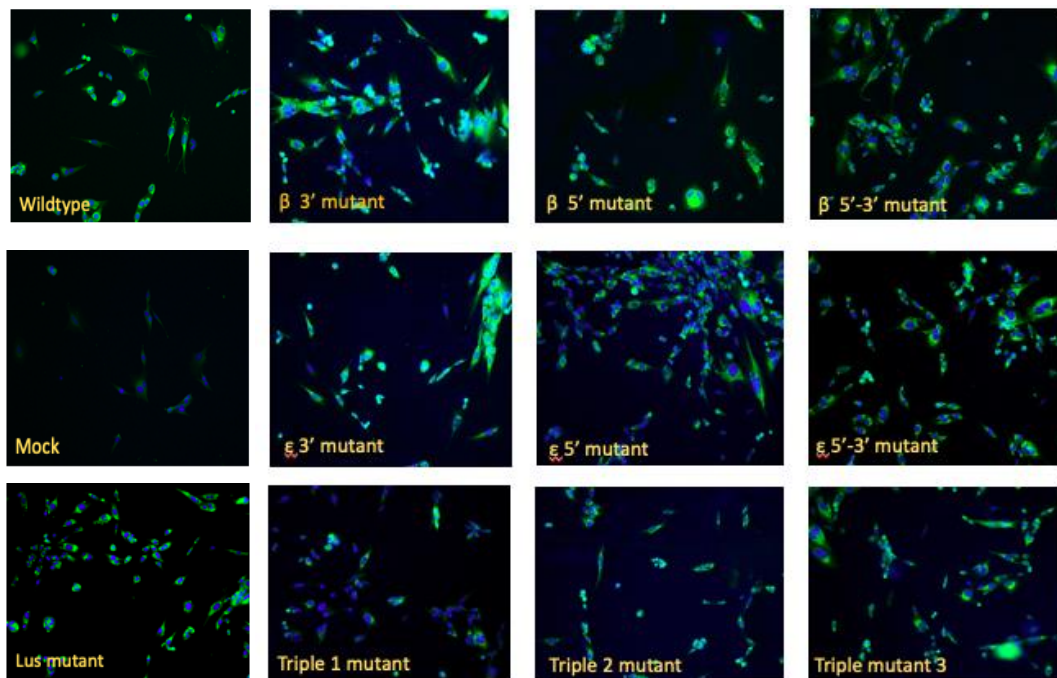
Hiervan zijn *in vitro* transcripten gemaakt. De *in vitro* transcripten van alle verkregen mutanten zijn **figuur 7B** te zien. Er is bij elke mutant een duidelijke band te zien, wat aangeeft dat de *in vitro* transcriptie naar behoren is verlopen. De RNA transcripten zijn 13 kb, maar doordat RNA sneller migreert dan de DNA marker wordt de indruk gewekt dat de fragmenten kleiner zijn.

IMMUNOFLUORESCENTIE MICROSCOPIE

Om te controleren of de BHK-21J cellen succesvol zijn geëlectroporeerd werd er immunofluorescentie microscopie met een MODV specifiek antilichaam uitgevoerd.

Cellen geëlectroporeerd met wildtype MODV RNA transcript werden meegenomen als positieve controle, terwijl cellen die dezelfde procedure ondergingen, maar dan zonder RNA als negatieve controle (mock) dienden. Met dit experiment konden de cellen worden gecontroleerd op MODV antigeen expressie.

In figuur 8 zijn de kernen van de cellen te zien in het blauw. Een succesvolle electroporatie is te zien aan de felgroene kleuringen rondom de kern. Dit geeft MODV antigeen productie in de cellen aan. Verder is er te zien dat vrijwel elke cel van elke mutant MODV antigeen productie vertoont. Op de mock afbeelding zijn er enkel blauwe kernen te zien, er zijn geen felgroene kleuringen zichtbaar, wat duidt op de afwezigheid van MODV antigeen productie.



FIGUUR 8. IMMUNOFLUORESCENTIE MICROSCOPIE PLAATJES. ALS PRIMAIR ANTILICHAAM IS ER MODV HYPERIMMUUN SERUM (1:1000) GEBRUIKT EN ALS TWEEDE ANTILICHAAM GOAMOALEXA488 (1:300). ALS KERNKLEURING IS ER HOECHST (1:100) GEBRUIKT. DE AFBEELDINGEN ZIJN GEMAAKT MET EEN BLOOTSTELLINGSTIJD VAN 1200 MS EN EEN 10X VERGROTING.

Ongeveer >80% van de cellen lijken succesvol geëlectroporeerd met het MODV RNA. De enige uitzondering van deze mutanten is de triple 1 mutant, daar is te zien dat het merendeel van de cellen echter geen MODV antigeen productie vertonen, wat duidt op een minder succesvolle replicatie van het virus. Deze mutant vertoonde tevens ook geen CPE tijdens het opgroeien van de virusweek. Ook zijn er in de afbeelding van de ϵ 5' mutant nog veel cellen zichtbaar die geen MODV antigeen expressie vertonen, ook deze mutant vertoonde geen CPE tijdens het opgroeien van de virusweek.

VIRUS PLAQUE ASSAYS

De virus titers van de geogste viruskweken van de geëlectroporeerde cellen werden bepaald met een virus plaques assay. Voor MODV mutanten die 72 uur na electroporatie nog geen duidelijke cytopathogeen effect vertoonde werd naast de kristal violet gekleurde plaque assay een zogenaamde immuno plaque assay uitgevoerd. Daar waar de klassieke plaque assay afhankelijk is van een cytopathogeen effect voor het bepalen van de virus titer kan de immuno-plaque assay ook geïnfecteerde cel clusters detecteren zonder dat er sprake is van een cytopathogeen effect.

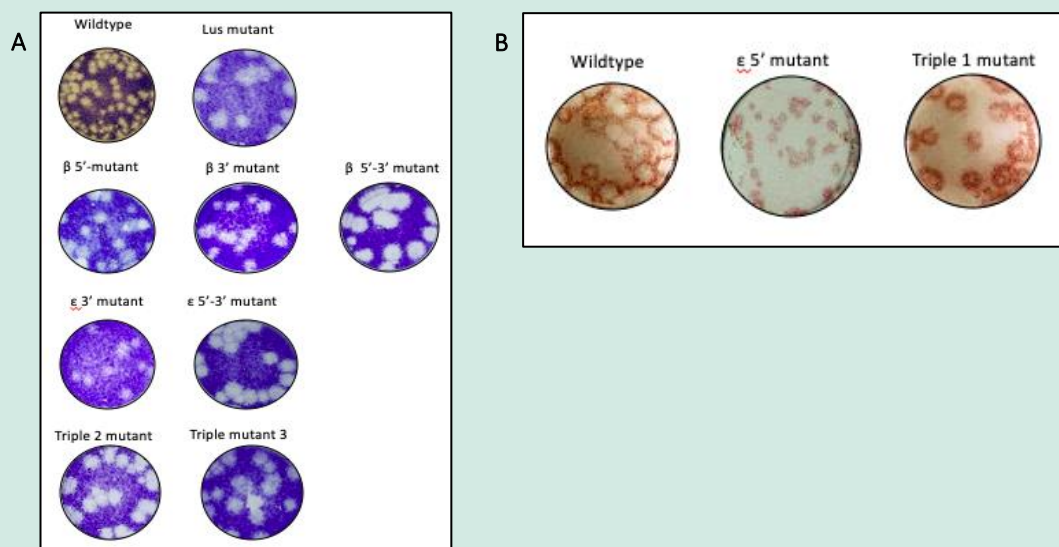
Een plaque vertegenwoordigd de lysis van een met virus geïnfecteerde cel. Doordat kristalviolet in staat is enkel levende cellen te kleuren, is er een contrast te zien tussen dode (geïnfecteerde) cellen en levende, niet geïnfecteerde cellen.

Op de tripel 1 mutant en de ϵ 3' mutant na, lieten alle mutanten duidelijke plaques (en CPE) zien bij gebruik van BHK-21J cellen (**figuur 9**). De niet-geïnfecteerde cellen zijn paars aangekleurd. De virus titers zijn die zijn bepaald aan de hand van deze plaque assays te zien in **figuur 10**. De virus titer is bepaald in duplo.

Voor de ϵ 5' mutant en de tripel 1 mutant was het dus noodzakelijk een immuno plaque assay uit te voeren, omdat ze bij de reguliere plaque assays gekleurd met kristalviolet geen plaques vertoonden. Deze constructen waren niet in staat een zichtbaar CPE te veroorzaken in de cellen

Opvallend is het verschil in plaque grootte, deze wisselt enigszins tussen de mutanten. Door de experimenten heen wisselde de plaque morfologie en was geen enkele mutant die telkens dezelfde plaque morfologie vertoonde. De plaques van wildtype lijken vele malen kleiner dan bijvoorbeeld de plaques die te zien zijn bij de β 5'-3' mutant (**figuur 9A**).

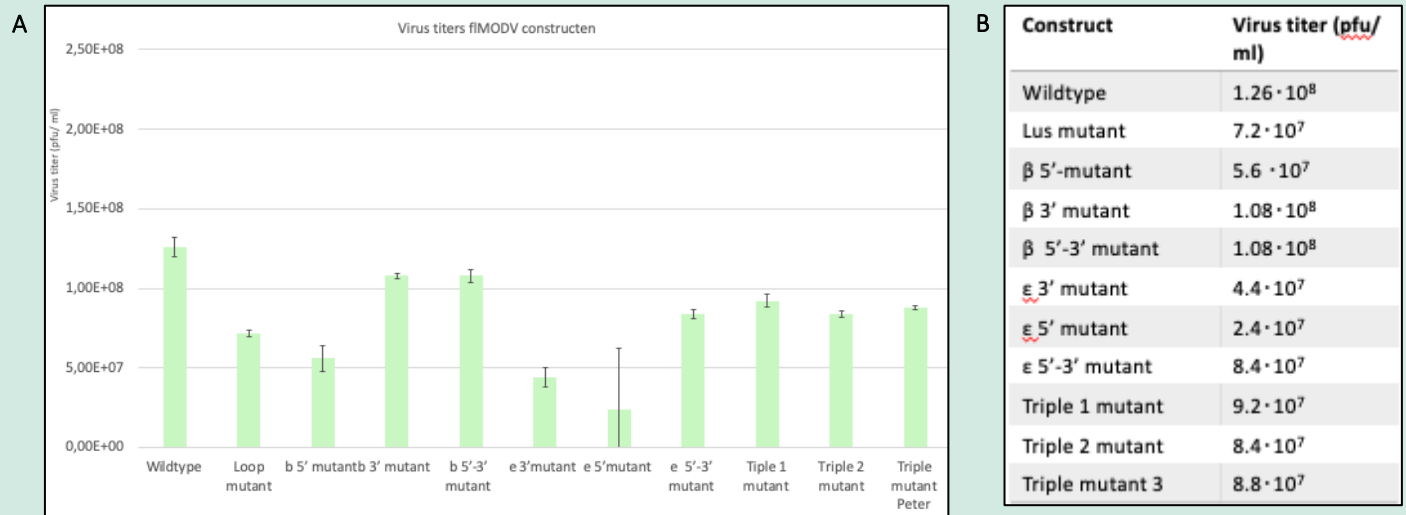
Daarnaast is het opvallend dat de immuno plaque assay van wildtype en de tripel 1 mutant ronde plaque assays met een gekleurde ring vertonen en bij de ϵ 5' mutant plaques te zien zijn die volledig gekleurd zijn.



FIGUUR 9.

A. PLAQUE ASSAYS GEKLEURD MET KRISTALVIOLET DIE VERKREGEN ZIJN BIJ DE VERSCHILLENDE CONSTRUCTEN. ALLE PLAQUE ASSAYS ZIJN GEKLEURD MET KRISTALVIOLET. ELKE PLAQUE (ONGEKLEURDE CIRKEL) VERTEGENWOORDIGT DE LYSIS VAN EEN MET VIRUS GEÏNFECTEERDE CEL.

B. IMMUNO PLAQUE ASSAY VAN WILDTYPE, ϵ 5'-MUTANT EN DE TRIPEL 1 MUTANT MET ALS PRIMAIR ANTILICHAAM MODV HYPERIMMUUN SERUM EN ALS SECUNDAIR ANTILICHAAM GOAT-ANTI-MOUSE-HRP.



FIGUUR 10.

A. BEPAALDE TITERS AAN DE HAND VAN DE PLAQUE ASSAYS OP FIGUUR 7. DE STAAF VERTEGENWOORDIGT DE TITER IN PFU/ ML BEPAALD AAN DE HAND VAN TWEE PLAQUE ASSAYS. DE FOUTBALKEN VERTEGENWOORDIGEN DE STANDAARDDEVIAATIE DIE DE SPREIDING VAN DE VIRUSTITER PER CONSTRUCT LATEN ZIEN.

B. LEGENDA BIJBEHOORENDE BIJ DE STAAFDIAGRAM. DE VIRUS TITER IS WEERGEGEVEN IN PFU/ ML EN GEEFT HET GEMIDDELDE WEER MET EEN DUPLO.

In **figuur 10** zijn de bepaalde virus titers te zien. Deze zijn bepaald aan de hand van twee plaque assays (duplo bepaling). De foutbalken in het staafdiagram representeren de standaarddeviatie van de bepaling in duplo.

In het staafdiagram is te zien dat wildtype de hoogste virustiter geeft (1.26×10^8 pfu/ ml). De ϵ 5' mutant geeft de laagste titer (2.4×10^7 pfu/ ml), ook heeft deze mutant de hoogste standaarddeviatie (SD). Deze mutant had een gemiddelde van 2.4×10^7 pfu/ ml en een SD van 4.85×10^7 pfu/ ml. Dit betekent dat deze mutant de grootste variatie heeft binnen de waargenomen virus titers.

NORTHERN BLOT ANALYSE

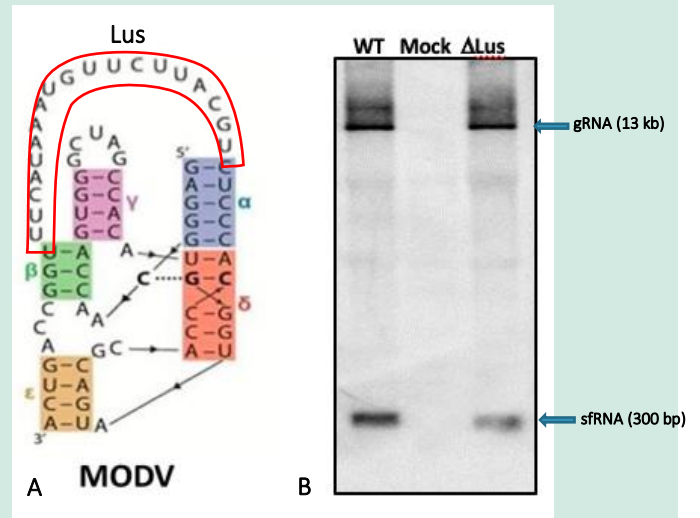
Om het computer RNA structuur model van het 3' UTR van het MODV te verifiëren, zijn er 10 mutaties aangebracht in de XRN1 stallingsite (regio I) van het 3' UTR van het MODV. Deze mutaties waren met name gericht op de beide helix structuren (β -gebied en ϵ -gebied), in de zogenoemde lus structuur en op de interactie rond de unieke tripel base knooppunt waarbij 3 in plaats van de gebruikelijke 2 nucleotiden betrokken zijn.

Er werd verwacht dat de mutanten die een mismatch bevatten niet meer in staat zouden zijn om de XRN1 activiteit te blokkeren en dus niet in staat zijn om sRNA te produceren. Bij de mutanten die herstelde nucleotiden bevatten werd er verwacht sRNA te zien.

Voor de analyse is er gebruik gemaakt van een ^{32}P -gelabelde oligonucleotide gericht tegen het 3'UTR van het genoom.

Bij de blots op **figuur 11-14** is er in de wildtype laan een genoomband (13 kb) boven in de blot te zien, de drie replicatieve intermediären en een sRNA band (300 bp) onder in de blot. Verder is er te zien dat de negatieve controle (de 'mock' laan) in alle blots leeg is, dit sluit aspecifieke binding van de oligonucleotide uit. Dit betekent dat de oligonucleotide specifiek gebonden heeft aan MODV, dit draagt bij aan de betrouwbaarheid van de blots.

In **figuur 11** is het resultaat van de analyse van de sfrRNA productie van de zogenoemde “lus” mutant te zien. Er is een sfrRNA bandje te zien in de baan met de lus mutant ter hoogte van 300 bp. Uit deze analyse bleek dus dat de nucleotiden, welke de zogenaamde lus in de structuur van de stalling site vormen, niet essentieel zijn voor de blokkering van XRN1. De “lus” mutant bleek ondanks de deletie significante hoeveelheden sfrRNA te maken.

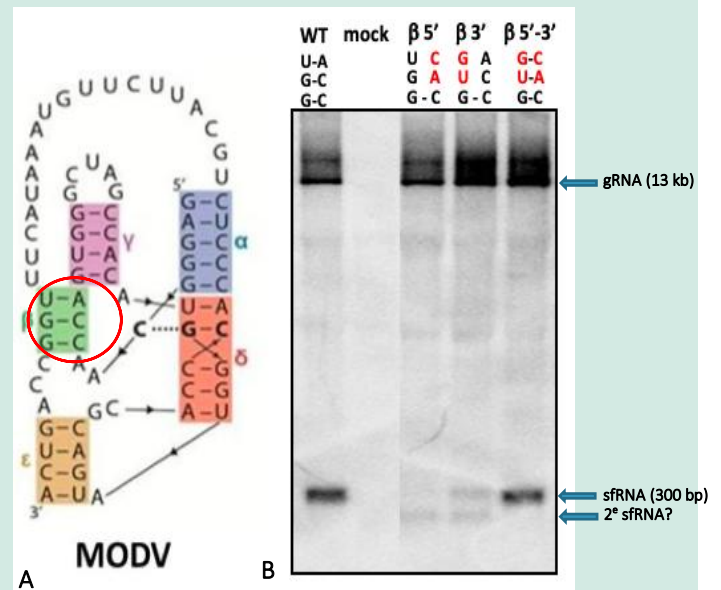


FIGUUR 11. (A) EEN SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN REGIO I VAN HET 3'UTR VAN MODV MET HET LUS GEBIED IN HET ROOD OMCIRKELD. (B) DE ANALYSE VAN SFRNA OP EEN NORTHERN BLOT. VAN LINKS NAAR RECHTS IS DE WILDTYPE (WT) TE ZIEN IN, DE NEGATIEVE CONTROLE (MOCK) EN DE MODV LUS MUTANT (δ LUS). HET RNA IS GEÏSOLEERD, GELABELD EN GEANALYSEERD ALS BESCHREVEN. BIJ WILDTYPE IS 1 GENOOMBAND (13 KB) EN EEN SFRNA BAND (90) BP TE ZIEN. DE LAAN MET DE NEGATIEVE CONTROLE IS LEEG.

In **figuur 12** zijn de mutaties te zien aangebracht in het β -gebied. Het is verwacht dat dit gebied essentieel zou zijn bij het vormen van de pseudoknoop, omdat hier twee sets van baseparen een interactie aangaan met elkaar om zo een helix structuur te vormen.

Er is te zien dat de β 5'-mutant geen sfrRNA bandje vertoont, wat suggereert dat deze mutatie de pseudoknoop dusdanig verstoort dat het blokkeren van XRN1 niet meer mogelijk is. Bij de β 3' mutant is er een vaag sfrRNA bandje te detecteren. Bij de β 5'-3' mutant is er een duidelijke sfrRNA band te zien, wat betekent dat deze mutatie de pseudoknoop inderdaad heeft hersteld. Dit maakt het blokkeren van de XRN1 activiteit mogelijk.

Opvallend is, is dat er bij de β 5'-mutant en de β 3'-mutant nog een vaag, kleiner bandje onder de sfrRNA band te detecteren is. Dit bandje lijkt te co migreren met het sfrRNA bandje die normaal gesproken bij de eerste stallingsite te zien zou zijn.



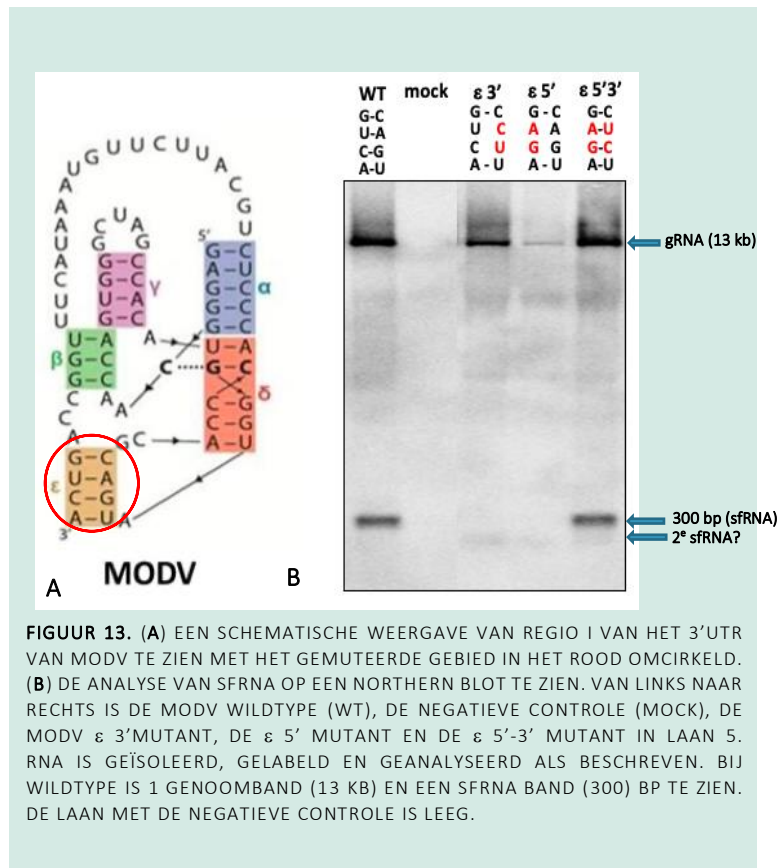
FIGUUR 12. (A) IS EEN SCHEMATISCHE WEERGAVE VAN REGIO I VAN HET 3'UTR VAN MODV TE ZIEN MET HET GEMUTEERDE GEBIED IN HET ROOD OMCIRKELD. (B) DE ANALYSE VAN SFRNA OP EEN NORTHERN BLOT. VAN LINKS NAAR RECHTS IS DE MODV WILDTYPE (WT), DE NEGATIEVE CONTROLE ('MOCK'), DE MODV β 5' MUTANT, DE β 3' MUTANT EN DE β 5'-3' MUTANT WEERGEGEVEN. RNA IS GEÏSOLEERD, GELABELD EN GEANALYSEERD ALS BESCHREVEN. BIJ WILDTYPE IS 1 GENOOMBAND (13 KB) EN EEN SFRNA BAND (90) BP TE ZIEN. DE LAAN MET DE NEGATIEVE CONTROLE IS LEEG.

In **figuur 13** zijn de mutanten te zien met mutaties gemaakt in het ϵ -gebied.

Bij de ϵ 5' mutant zijn de genoomband en de replicatieve intermediären niet duidelijk zichtbaar zijn, dit maakt het lastig een definitieve conclusie te trekken betreft de aanwezigheid van sfRNA.

Er is te zien dat de ϵ 3'-mutant geen sfRNA bandje vertoont, dit duidt erop dat deze mutatie de helix structuur dusdanig verstoord dat het blokkeren van de XRN1 activiteit niet mogelijk is.

Bij de ϵ 5'-3' mutant is er 1 duidelijke sfRNA band te zien, wat betekent dat deze mutatie heeft geleid tot het herstel van de pseudoknoop met de mogelijkheid de XRN1 activiteit te verhinderen. De intensiteit van dit sfRNA bandje lijkt vrijwel gelijk aan wildtype, suggererend dat deze mutatie in tot net zo efficiënte blokkade leidt als wildtype.



Op **figuur 14** zijn de mutanten te zien met mutaties in het tripel basen knooppunt van het 3'UTR. Dit deel vormt het knooppunt van de pseudoknoop en geeft de mogelijk tot het vormen van een ringstructuur, dus wordt dit verwacht een essentieel deel van de pseudoknoop te zijn. Daarnaast hebben deze basen de unieke mogelijkheid om naast de klassieke A-U, G-C baseparen ook bijvoorbeeld een G-U basepaar te vormen. Deze structuur kenmerkt zich door het vermogen voor een "G" residu dat waterstofbruggen vormt met twee onafhankelijke 'C' residuen.

Bij de tripel 1 mutant (laan 3) is geen sfRNA band te zien, suggererend dat verstoring van dit knooppunt de pseudoknoop dusdanig verstoord dat blokkade van XRN1 niet mogelijk is. De tripel 2 mutant vertoont een sterke sfRNA band, wat aangeeft dat deze herstelde nucleotiden de XRN1 activiteit net zo goed, dan wel niet beter, kunnen verhinderen dan wildtype.

Ten slotte vertoont de tripel mutant 3 een zwakke sfRNA band. Bij alle drie de constructen is er een kleiner bandje onder de sfRNA band te detecteren.



DISCUSSIE EN CONCLUSIE

Infectie met MODV resulteert in amplificatie van niet alleen het genomische RNA (gRNA), maar ook in amplificatie van niet-coderende subgenomische flavivirale RNA's (sfRNA's).^[3]

Met behulp van computer simulaties van RNA vouwingen zijn er sterke aanwijzingen verkregen dat MODV een XRN1-resistente RNA (xrRNA) structuur heeft. In samenwerking met de groep van Dr. Olsthoorn is er een computer gestuurde driedimensionaal RNA model van de XRN1 stalling site in het genoom van MODV opgesteld (**figuur 5**).

Het doel van deze studie is om het model van de XRN1 stalling site voor MODV te verifiëren en om vast stellen in hoeverre er variaties zijn in de structuur van de XRN1 stalling sites binnen het genus flavivirussen. Dit is gedaan door 10 mutanten te maken die mutaties bevatten in het 3'UTR van het MODV.

Als controles zijn er tijdens deze studie ook MODV wildtype (construct zonder mutatie) en een 'mock' (negatieve controle) meegenomen.

MUTAGENESE IN EEN INFECTIEUZE MODV KLOON

Voordat er mutaties werden aangebracht, werd een deel van het NS5 en het 3'UTR van het MODV in een tijdelijk plasmide, pBluescript, geplaatst. Na het succesvol introduceren van de mutaties in regio I van het 3' UTR, zijn de gemuteerde fragmenten terug gekloneerd in de volledige pACNR MODV kloon. Hiertoe is het gemuteerde fragment uit het pBluescript geknipt met *KasI* en *XhoI* en gescheiden op een 0,8% agarose gel. De 0,8% agarose gel met daarop de digestie laat zien dat het NS5 met 3'UTR fragment (899 bp) is gescheiden van het pBluescript genoom (2981 bp). Het genoom bandje van pBluescript lijkt partieel geknipt, maar aangezien enkel het fragment van 899 bp uit de gel is geïsoleerd (die duidelijk gescheiden is van de rest van het plasmide) heeft dit geen effect voor het vervolg. Wanneer er naar de *in vitro* transcripten op gel wordt gekeken, is er enigszins afbraak te zien, maar de transcripten zijn voornamelijk van goede kwaliteit, de RNA band is duidelijk zichtbaar bij elke mutant. De tripel 1 mutant vertoont een zwakkere RNA band, maar de concentratie lijkt net voldoende voor de electroporatie van de BHK-21J cellen. De grootte van de RNA bandjes lijkt af te wijken van de verwachte 13 kb, maar aangezien het RNA transcripten zijn migreren deze sneller door de gel dan de 1 kb DNA marker. Daarnaast is er gebruik gemaakt van een 0,8% agarose gel, deze percentage gel heeft doorgaans een minder goed scheidend vermogen op grootte.

IMMUNOFLUORESCENTIE MICROSCOPIE

Om te controleren of de BHK-21J cellen succesvol zijn geëlectroporeerd met de *in vitro* transcripten, werd er immunofluorescentie microscopie uitgevoerd. Zo konden de BHK-21J cellen worden gecontroleerd op MODV antigeen expressie.

De afbeelding met de negatieve controle (de 'mock') vertoont vage groene vazen wat duidt op enige aspecifieke binding van het antilichaam. Echter, wanneer de afbeelding vergeleken wordt met wildtype is er te zien dat de MODV antigeen productie gemarkeerd wordt door intense felgroene kleuringen rondom de nucleus. Het was beter geweest om ook een controle mee te nemen bij de mock/ wildtype door te kleuren met enkel het secundaire antilichaam. Zo kon aspecifieke binding van het antilichaam worden uitgesloten.

Uit de immunofluorescentie afbeeldingen kan worden geconcludeerd dat geen van de aangebrachte mutaties lethaal was voor het MODV virus. Elke afbeelding laat zien dat er MODV antigeen expressie aanwezig was bij de getransfecteerde BHK-21J cellen. Dit resultaat wil niet perse zeggen dat alle MODV mutanten even goed repliceren. Een kritische beschouwing van de immunofluorescentie afbeeldingen laat verschillen zien.

Zo lijkt de MODV antigeen expressie van de BHK-21J cellen bij de tripel 1 mutant en de ϵ 5' mutant minder het geval te zijn, op de afbeelding zijn er nog veel blauwe kernen zichtbaar. Dit duidt op de

afwezigheid van MODV antigeen productie bij veel cellen. De tripel 1 mutant laat tevens een zwakke *in vitro* RNA transcript band zien. Dit zou de oorzaak kunnen zijn voor de minder efficiënte electroporatie van het transcript in de cellen.

VIRUS PLAQUE ASSAY

De virus titers van de opgegroeide virus kweek van de geëlectroporeerde cellen werden bepaald met een virus plaques assay. Voor de mutanten die geen CPE vertoonden tijdens het opgroeien van de viruskweek is er een immuno plaque assay uitgevoerd. Zowel de tripel mutant 1 als de ϵ 5' mutant vertoonden geen CPE, bij deze mutanten is er voor gekozen een immuno plaque assay uit te voeren. Elke mutant is opgegroeid tot een redelijke titer. De titers waren hoog genoeg om de BHK-21J cellen met een MOI=5 te infecteren voor de RNA analyse, daarnaast waren de verschillen in virus titers marginaal.

Echter, bij het herhalen van de plaque assays was de plaque morfologie verschillend, de plaques waren vele malen kleiner. De virustiter kwam bij elk construct echter wel overeen. De reden van deze wisselende plaque morfologie is lastig te verklaren. Een verklaring zou kunnen zijn dat bij de eerste keer bij het uitvoeren van de plaque assays de wells platen tijdens incubatiestap met het virus innoculum niet op de rollerbank in de incubator zijn gelegd. Er is echter om de 15 minuten handmatig gezwenkt. Dit zou kunnen leiden tot minder gelijke distributie van het virus over de cel laag waardoor er meer plaatselijke (dus grotere) plaques ontstonden.

Opvallend is de variatie die de ϵ 5' mutant vertoont. Deze mutant had de hoogste SD, er waren dus grote variaties binnen de waargenomen titers te zien. Ook hier was er een wisselende plaque morfologie zien. Een verklaring van dit onregelmatige groeipatroon zou kunnen zijn doordat deze mutatie resulteert in een mogelijke verandering in de sequentie wat de mogelijkheid geeft voor de nucleotiden om ergens eerder in het MODV genoom een binding aan te gaan. Dit zou bijvoorbeeld binding kunnen zijn in een gebied dat wel essentieel is bij virusrelicatie. Om dit verder uit te zoeken zouden er groeicurves moeten worden gemaakt om de groei van de mutant te monitoren.

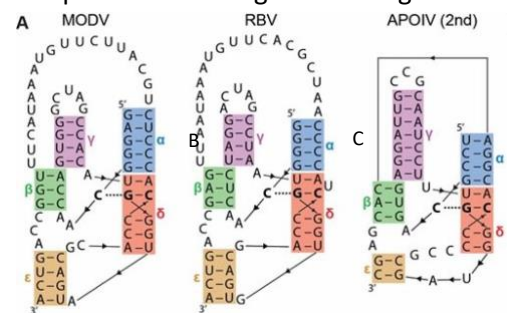
NORTHERN BLOT ANALYSE

Om te kijken of de aangebrachte mutaties resulteren in sRNA, is er een Northern Blot analyse uitgevoerd. Omdat de cellen zijn geïnfecteerd met een MOI=5, werd er verwacht dat 99.3% cellen zijn geïnfecteerd. Deze Northern Blot analyse is twee maal uitgevoerd en beide pogingen resulteerde in exact dezelfde data. Daarnaast is er met dezelfde mutanten een *in vitro* experiment uitgevoerd waar XRN1 werd toegevoegd aan een deel van het NS5 en het 3'UTR van het MODV, dit dient als ondersteuning van de verkregen *ex vivo* data (**bijlage 3**).

Bij elke blot is er te zien dat de laan met de negatieve controle ('mock') leeg is. De negatieve controle bevat enkel totaal RNA van de BHK-21J cellen die hetzelfde proces hebben doorlopen als de andere cellen, alleen hier zijn de cellen niet geïnfecteerd. Doordat deze mock laan geen genoomband/ replicatieve intermediären of sRNA band vertoont kan aspecifieke binding van de oligonucleotide worden uitgesloten.

Bij wildtype is zowel de genoomband, de replicatieve intermediären en de sRNA band zichtbaar. Hieruit kan worden gesuggereerd dat de oligonucleotiden zou moeten werken op alle andere constructen.

Bij de lus mutant is er een sRNA bandje zien, dit is ook het resultaat van de *in vitro* data (**bijlage 3, figuur 3.1**). Dit geeft aan dat bij een deletie van de lus de XRN1 activiteit nog steeds geblokkeerd kan worden. Hieruit kan gesuggereerd worden dat de lus structuur in de pseudoknot niet essentieel is bij het ontstaan van de



FIGUUR 15. RNA MODEL MET DE 2D WEERGAVE VAN DE VOORSPELDE TERTIAIRE STRUCTUREN VAN FLAVIVIRUSSEN MET EEN ONBEKENDE VECTOR. MODC VIRUS (A), RIO BRAVO VIRUS (B) EN HET APOI VIRUS (C). (DR. OLSTHOORN).

xRNA structuur. De lus structuur is niet in alle flavivirussen met een onbekende vector geconserveerd, zo heeft de XRN1 stallingsite van APOIV geen dergelijke structuur (**figuur 15**). (Dr. Olsthoorn)

Bij de mutanten gemaakt in het β -gebied van het 3'UTR is er te zien dat de β 5'-mutant geen sRNA bandje vertoont, dit is ook te zien in de *in vitro* data (**bijlage 3, figuur 3.2**). Bij de β 3' mutant is er wel een vaag, sRNA bandje te zien, bij de *in vitro* data is er een duidelijke sRNA band te zien. Dit zou kunnen betekenen dat het β -gebied wellicht niet zo belangrijk is bij het blokkeren van de XRN1 activiteit als dat de blot doet vermoeden.

Bij beide mutanten is er tevens een vaag bandje onder de verwachte hoogte van het sRNA bandje (300 bp) te detecteren dat co-migreert met het tweede kleinere sRNA van de β 5' mutant. Dit is tegen de verwachting in, de studie uitgevoerd door *Silva, et al.* wees uit dat er bij het MODV maar één sRNA kan worden waargenomen. Het feit dat dit tweede, doorgaans zwakkere sRNA wel gedetecteerd wordt, doet vermoeden dat de mutaties in de β 3' mutant en β 5' mutant de normaal gebruikte XRN1 stalling site inactiveren, wat mogelijk leidt tot een instabiele tweede stallingsite. Gezien de intensiteit van het bandje ten opzichte van de grotere sRNA band en de genoomband wekt dit de indruk dat deze stallingsite zwakker (en instabiel) is.

Bij de β 5'-3' mutant is er 1 duidelijke sRNA band te zien, wat overeen stemt met de *in vitro* data. Dit suggereert dat er variatie mogelijk is in het bèta gebied wat vooralsnog de mogelijkheid heeft de XRN1 activiteit te blokkeren. Ook dit was te verwachten, de nucleotiden in het bèta gebied zijn niet geconserveerd in alle NKV flavivirussen, zo bevatten het RBV virus en het APOIV andere nucleotiden op die plek. (Dr. Olsthoorn)

Doordat de sequentie (bij mutanten ' ϵ ') baseparen vormen in het PK' gebied wordt er gesuggereerd dat deze belangrijk zijn bij de vorming van de RNA structuur (*Xiaohong et al., 2013*). Er werd dus verwacht bij de mutanten met een mismatch geen sRNA te zien en bij de herstelde mutant wel. Op de blot is er te zien dat bij de ϵ 5' mutant de genoomband niet erg duidelijk te zien is, dit maakt het moeilijk een conclusie te trekken. De *in vitro* data (**bijlage 3, figuur 3.3**) laat echter geen sRNA band zien bij deze mutant. Dit is dezelfde mutant die geen CPE vertoonden en telkens erg wisselende titers gaf. Ook wanneer de blot opnieuw is uitgevoerd met meer RNA, resulteerde dit vooralsnog alsnog in hetzelfde resultaat. Het onregelmatige groeipatroon van deze ϵ 5' mutant als eerder genoemd zou hiervoor een verklaring kunnen zijn. Ook wees de immunofluorescentie microscopie op een minder efficiënte electroporatie. Een reden voor de slechte genoomband zou dus een mislukte infectie kunnen zijn.

Bij de RNA analyse is er te zien dat de ϵ 3'-mutant geen sRNA bandje vertoont, dit stemt niet helemaal overeen met de *in vitro* data (**bijlage 3, figuur 3.3**). Bij de *in vitro* data is er een instabiel sRNA bandje zichtbaar.

Bij zowel de ϵ 3'-mutant als de ϵ 5'-mutant is weer een zwakker, kleiner bandje te zien dat co migreert met de sRNA band.

Bij de ϵ 5'-3' mutant is er 1 duidelijke sRNA band te zien, dit is ook zichtbaar in de *in vitro* data. De *in vitro* data laat echter wel een zwakker bandje te zien, echter, de intensiteit van het bandje zonder XRN1 is ook zwak.

De constructen met mutaties in het tripel knooppunt van het 3'UTR laat de tripel 1 mutant geen sRNA band te zien, wat ook het geval is bij de *in vitro* data (**bijlage 3, figuur 3.4**). De tripel 2 mutant vertoont een sterke sRNA band. En de tripel mutant 3 vertoont een zwakke sRNA band. Alle drie de mutanten lijken een instabiele, vage, tweede stallingsite te hebben.

Dit suggereert dat het bestaande knooppunt een belangrijke structuur is voor het blokkeren van XRN1 activiteit. De *in vitro* data (**bijlage 3, figuur 3.4**) laat bij de tripel 1 mutant wel een sRNA band zien, in

tegenstelling tot figuur 13. Wel is er ook een bandje te zien bij de tripel 2 mutant. Van de *in vitro* data is er geen resultaat beschikbaar van de tripel mutant 3.

VERVOLGONDERZOEK

Ook al is de exacte functie van de sfRNA's in de virus levenscyclus nog niet helder, is er wel aangetoond dat ze een belangrijke rol spelen voor de pathogeniciteit van het virus.^[6] Het feit dat sfRNA productie geconserveerd is in vrijwel alle flavivirussen suggereert dat sfRNA's een grote rol spelen in de succesvolle overleving van flavivirussen. Dit hoeft niet te betekenen dat sfRNA's bij elke flavivirussen dezelfde functie hebben.

Er zijn vele studies die verschillende mogelijke functies van sfRNA's suggereren. Zo is er een studie van Schnettler die suggereert dat sfRNA's dienen als een soort RNA silencing onderdrukker.^[14] De immuunrespons van de gastheer op een infectie met een flavivirus is gewoonlijk het maken van siRNA tegen een RNA virus. Deze siRNA productie van de gastheer wordt echter geblokkeerd door het West Nijl virus en het Dengue virus.^[14]

Werk van Scheussler *et al.* bewees eerder dat sfRNA's een bijdrage leveren aan de ontwikkeling van de door interferon I gemedieerde immuunrespons door het blokkeren van interferon factor 3. Bovendien toonden Moon en collega's aan dat XRN1 werd feitelijk afgezonderd tot het 5'-uiteinde van het flavivirus sfRNA en daarom niet langer of op zijn minst schaarser beschikbaar om zijn normale functie uit te voeren in 5 'tot 3' RNA-verval, resulterend in een up-regulering van verschillende transcripten vanwege de verminderde RNA-omzet. Zoals gespeculeerd door Moon, kan dit de juiste antivirale signalering met de geïnfecteerde cellen verstoren. Het is duidelijk dat er meer onderzoek nodig is om de rol van deze kleine virus specifieke RNA's op te helderen in levenscyclus van flavivirussen.^[15] Het bepalen van de rol die sfRNA's spelen in flavivirussen met verschillende virus-gastheer systemen en het leggen van een link tussen sfRNA productie en virale pathogeniciteit is een interessant onderwerp voor in de toekomst.

Zo kan er worden gekeken naar het effect van sfRNA op eiwitten die betrokken zijn bij de immuunrespons van de gastheer (bijvoorbeeld interferonen). Als vergelijking kan er een mutant worden gebruikt waarbij er geen sfRNA vrij komt. Zo kan aanwezigheid of up/ down regulatie van een eiwit bekeken worden middels een Western Blot analyse.

Tevens blijft de ϵ 5' mutant ook interessant om verder te onderzoeken. Er kan eerst een groeicurve worden gemaakt om op te helderen of de mutatie invloed heeft op replicatie van het virus. Tijdens deze studie kon dit niet worden gedaan wegens de SARS-CoV-2 uitbraak.

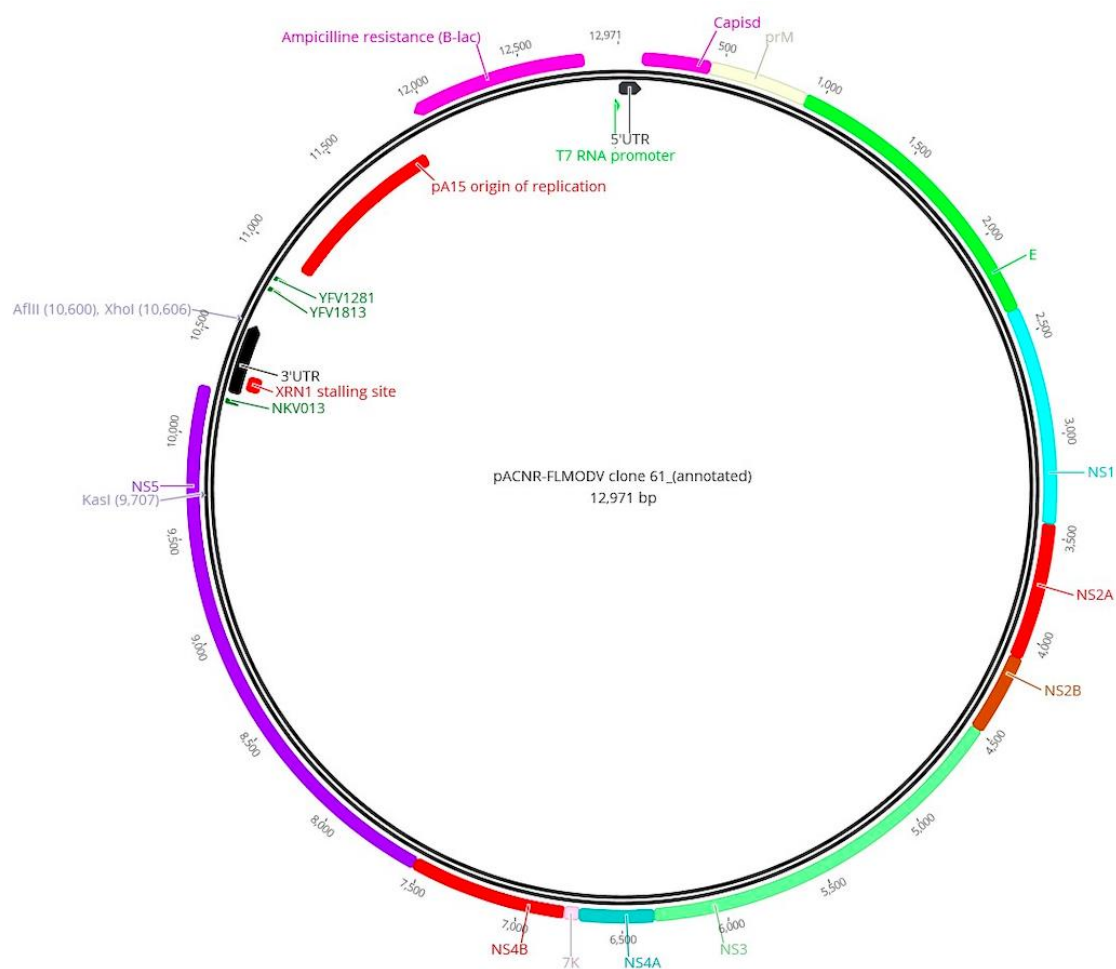
CONCLUSIE

Uit deze studie kan worden geconcludeerd dat de verkregen data uit de *ex vivo* mutagenese RNA analyse de bestaande RNA structuur model grotendeels lijkt te ondersteunen.

LITERATUUR

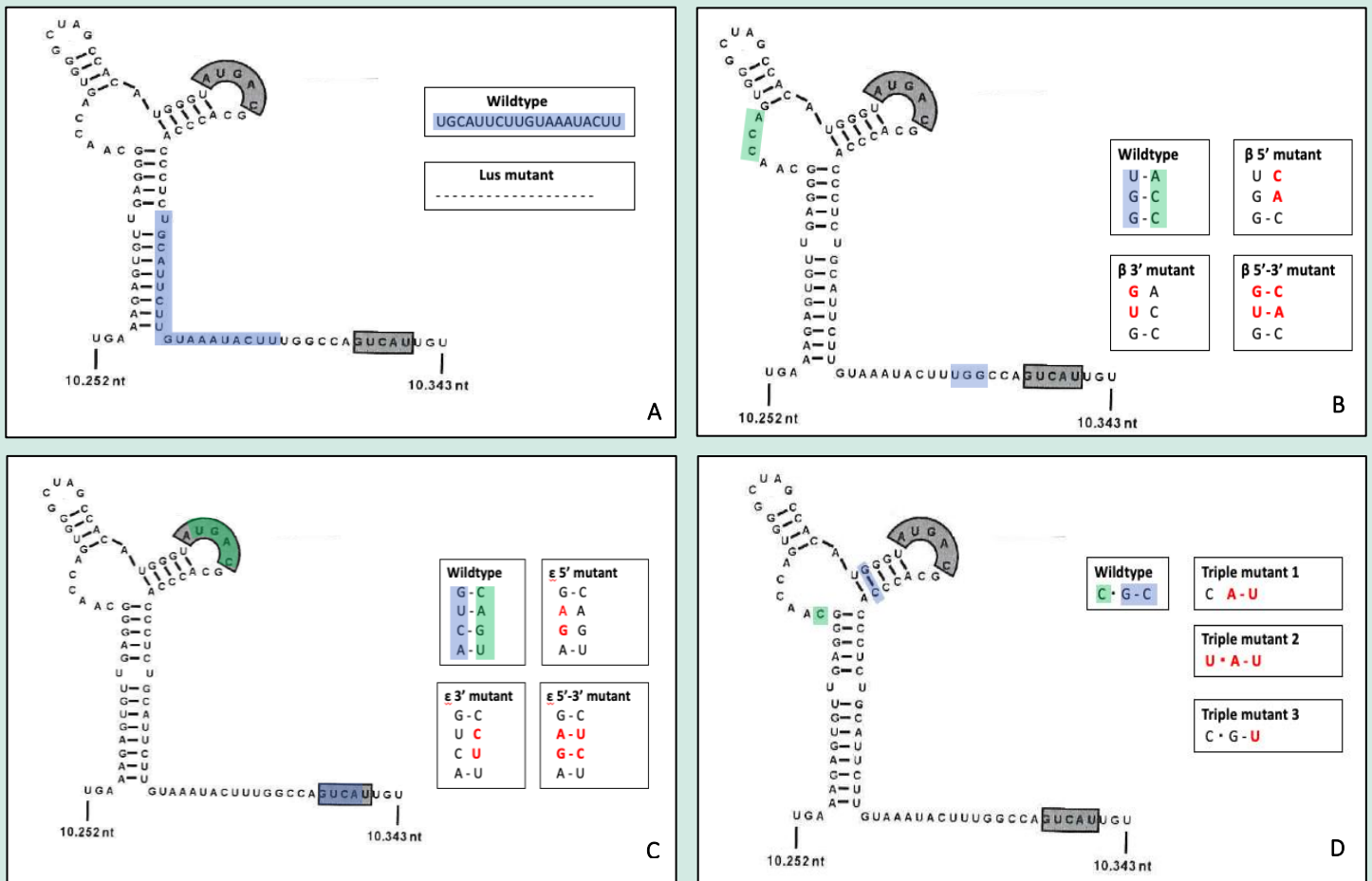
1. Acheson, N. 'Fundamentals of molecular virology'. Hoboken: Wiley. 2011.
2. Bredenbeek PJ, Kooi EA, Lindenbach B, Huijckman N, Rice CM & Spaan W.J M. 'A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication'. *J Gen Virol*. 2003; Vol.84: p1261-1268.
3. Lin KC, Chang HL, Chang RY. 'Accumulation of a 3'-terminal genome fragment in Japanese encephalitis virus-infected mammalian and mosquito cells'. *J Vir*. 2004; Vol.78: p5133-5138.
4. MacFadden A, O'Donoghue Z, Silva PAGC, Chapman EG, Olsthoorn RC, Sterken MG, Pijlman GP, Bredenbeek PJ, Kieft JS. 'Mechanism and structural diversity of exoribonuclease-resistant RNA structures in flaviviral RNAs'. *Nat Commun*. 2018; Vol.9.
5. Akiyama BM, Laurence HM, Massey AR, Costantino DA, Xie X, Yang Y, Shi PY, Nix JC, Beckham JD, Kieft JS. 'Zika Virus Produces Noncoding RNAs Using a Multi-Pseudoknot Structure That Confounds a Cellular Exonuclease'. *Science*. 2016; Vol.354: p1148-1152.
6. Chapman EG, Costantino DA, Rabe JL, Moon SL, Wilusz J, Nix JC, Kieft JS. 'The Structural Basis of Pathogenic Subgenomic Flavivirus RNA (sfRNA) Production'. *Science*. 2014; Vol.344: p307-310.
7. GP Göertz, JJ Fros, P Miesen, CBF Vogels, ML van der Bent, C Geertsema, CJM Koenraadt, RP van Rij, MM van Oers, GP Pijlman. 'Noncoding Subgenomic Flavivirus RNA Is Processed by the Mosquito RNA Interference Machinery and Determines West Nile Virus Transmission by Culex Pipiens Mosquitoes'. *J Vir*. 2016; Vol. 90: p10145-10159.
8. Charlier N, Molenkamp R, Leyssen P, Paeshuyse J, Drosten C, Panning M, De Clercq E, Bredenbeek PJ, Neyts J. 'Exchanging the yellow fever virus envelope proteins with Modoc virus prM and E proteins results in a chimeric virus that is neuroinvasive in SCID mice'. *J Virol*. 2004; Vol.78; p7418-7426.
9. Silva PA, Daleout TJ, Gulyaev Ap, Olsthoorn RC, Bredenbeek PJ. 'Characterization of the sfRNAs that are produced in cells infected with no known vector and cell fusing agent'. Unpublished. 2010.
10. Silva PA, Pereira CF, Dalebout TJ, Spaan WJ, Bredenbeek PJ. 'An RNA pseudoknot is required for production of yellow fever subgenomic RNA by the host nuclease XRN1'. *J Virol*. 2010; Vol.84(21); p11395-406.
11. Jiang X, Silva PA, Dalebout TJ, Rice CM, Bredenbeek PJ. 'An infectious Modoc virus cDNA as a tool to study conserved 3'-UTR RNA elements in flaviviruses with no known vector'. Unpublished. 2013.
12. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 'Molecular cloning: A laboratory manual'. 656 Second edition. 1989.
13. Pijlman GP, Funk A, Kondratieva N, et al. 'A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity'. *Cell Host Microbe*. 2008; Dec 11;4(6): p579-91.
14. Schnettler, E. et al. 'Non-coding flavivirus RNA displays RNAi suppressor activity in insect and mammalian cells'. 2013; Vol.86; p13486-13500.
15. Chang, R.-Y. et al. 'Japanese encephalitis virus non-coding RNA inhibits activation of interferon by blocking nuclear translocation of interferon regulatory factor 3'. *Vet. Microbiol*. 2013; Vol.166; p11-21.
16. Moon, S. L. et al. 'A noncoding RNA produced by arthropod-borne flaviviruses inhibits the cellular exoribonuclease XRN1 and alters host mRNA stability'. *RNA*. 2012; Vol. 18; p2029-2040.
17. Inoue H, Nojima H, Okayama H. 'High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids'. *Gene*. 1990; Nov 30;96(1) p23-8.
18. Chapman E, Costantino DA, Rabe JL, Moon SL, Wil J. 'The structural basis of pathogenic subgenomic flavivirus RNA (sfRNA) production'. *Science*. 2014; Apr 344; p307-310.
19. Meinkoth J, Wahl G, Huang F. 'Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports'. *Anal Biochem*. 1984; May 1;138(2): p267-84.
20. Lindenbach B, Rice CM. 'Flaviviridae: The Viruses and Their Replication'. *Fields virology*. 2007; p991-1042.

BIJLAGE 1- GENEIOUS FILE MODV LITERATUUR



FIGUUR 1.1 . SCHEMATISCH OVERZICHT VAN DE VOLLEDIGE PLASMIDE PACNR MODV 61. AAN DE WEERSZIJDE VAN HET 3'UTR ZIJN IS DE UNIEKE KNIPSITE VAN AFLII TE ZIEN EN AAN DE WEERSZIJDE VAN HET GEBRUIKTE INSERT DE ENZYMEN KASI EN XHOI. HET PLASMIDE IS AMPICILLINE RESISTENT, TE ZIEN AAN HET β -LACTAMASE IN HET GENOOM.

BIJLAGE 2- CONSTRUCTEN EN GEBRUIKTE PRIMERS



FIGUUR 2.1 . DE VERKREGEN CONSTRUCTEN IN EEN 2D WEERGAVE VAN REGIO I VAN HET 3'UTR VAN MODV.

A: IS DE 'LUS MUTANT' TE ZIEN, DEZE MUTATIE OMVAT EEN DELETIE VAN 19 NUCLEOTIDEN DIE NORMAAL GESPOKEN DE BOOG VORMEN.

B: HIER IS HET BÈTA GEBIED VAN HET 3' UTR GEMUTEERD WAARBIJ TWEE MUTANTEN (DE 3' MUTANT EN 5' MUTANT) EEN MISMATCH VEROOZAKEN MET EEN PUNT MUTATIE VAN TWEE NUCLEOTIDEN. DE 5'-3' MUTANT BEVAT HERSTELDE NUCLEOTIDEN.

C: HIER IS HET EPSILON GEBIED GEMUTEERD, DE 3' MUTANT EN 5' MUTANT VEROOZAKEN EEN MISMATCH DOOR EEN PUNT MUTATIE VAN TWEE

Mutant	Functie	Primers
Lus mutant	Deletie	<u>FWD:</u> GGGTATGACGCACCCACCCTCCTTTGGCCAGTCATTGTAAATAGGTTAGGG <u>REV:</u> ACCTATTTACAATGACTGGCCAAAGGAGGGTGGGTGCGTCATACCCATGTGG
β 3' mutant	Puntmutatie (mismatch)	<u>FWD:</u> GCAACCAGTGGGCTAGCACCATGGGTATGACGCACC <u>REV:</u> GCGTCATACCCATGGTCTAGCCCACTGGTTGCCCT
β 5' mutant	Puntmutatie (mismatch)	<u>FWD:</u> GAGGGCAACCAGGTGGCTAGCCACATGGGTATGA <u>REV:</u> CCCATGTGGCTAGCCACCTGGTTGCCCTCAACACT
β 5'-3' mutant (β 5' mutant als template)	Puntmutatie (herstellen)	<u>FWD:</u> GCAACCAGGTGGCTAGCACCATGGGTATGACGCACC <u>REV:</u> GCGTCATACCCATGGTCTAGCCCACTGGTTGCCCT
ε 3' mutant	Puntmutatie (verstoring)	<u>FWD:</u> GTAAATACTTTGGCCAGAGATTGTAAATAGGTTAGGGA <u>REV:</u> CTAACCTATTTACAATCTCTGGCCAAAGTATTTACAAGAATG
ε 5' mutant	Puntmutatie (verstoring)	<u>FWD:</u> CTAGCCACATGGGTATCTCGCACCCACCCTCTGCATTC <u>REV:</u> CAGAGGGTGGGTGCGAGATACCCATGTGGCTAGCCC
ε 5'-3' mutant (ε 3' mutant als template)	Puntmutatie (herstellen)	<u>FWD:</u> CTAGCCACATGGGTATCTCGCACCCACCCTCTGCATTC <u>REV:</u> CAGAGGGTGGGTGCGAGATACCCATGTGGCTAGCCC
Tripel mutant 1	Puntmutatie	<u>FWD:</u> GGGCTAGCCACATAGGTATGACGCACCTACCCTCTGCATTCTTGT <u>REV:</u> AGAATGCAGAGGGTAGGTGCGTCATACCTATGTGGCTAGCCCACTGGT
Tripel mutant 2	Puntmutatie	<u>FWD:</u> GAAAGAGTGTTGAGGGTAACCAAGTGGGCTAGCC <u>REV:</u> CTAGCCCACTGGTTACCCTCAACACTCTTTCATT
Tripel mutant 3	Puntmutatie	<u>FWD:</u> GGGCTAGCCACATAGGTATGACGCACCTACCCTCTGCATTCTTGT <u>REV:</u> AGAATGCAGAGGGTAGGTGCGTCATACCTATGTGGCTAGCCCACTGGT

TABEL 2.1. GEBRUIKTE PRIMERS IN DE QUIKCHANGE SITE DIRECTED MUTAGENESIS PCR-REACTIE VOOR HET INTRODUCEREN VAN MUTATIES. DE AANGEBRACHTE MUTATIES ZIJN ROOD GEMARKEERD.

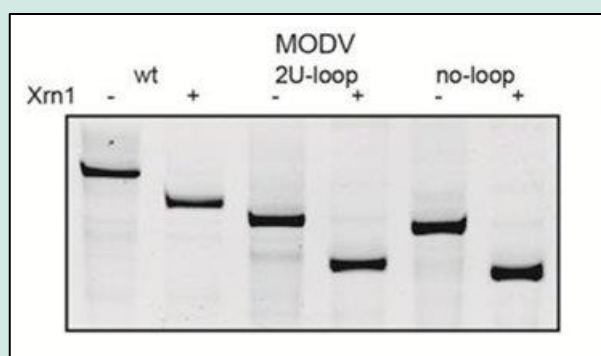
Naam	Sequentie	Positie
NKV40	AGCGCTTAAGCGGAGGTCATATTCATGACCACACAG	10600-10573

TABEL 2.2. ³²P-GELABELDE OLIGONUCLEOTIDE DIE GEBRUIKT IS VOOR NORTHERN BLOTTING

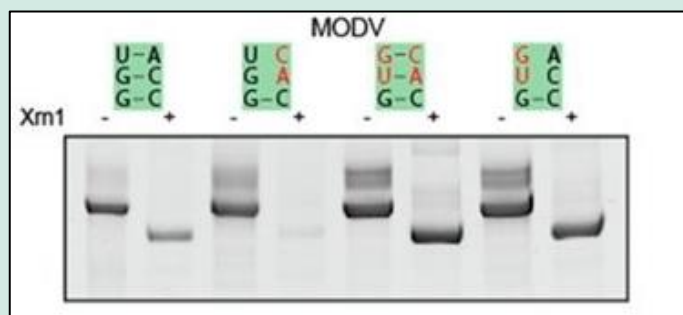
BIJLAGE 3 – *IN VITRO* DATA

Deze bijlage bevat een *in vitro* experiment (Dr. Oslthoorn en I Dilweg) waar handmatig XRN1 werd toegevoegd, dit dient als ondersteuning van de verkregen data tijdens deze studie. Hier is geen gebruik gemaakt van een cellijn.

Deze *in vitro* data is uitgevoerd met dezelfde mutanten. Hier is XRN1 los toegevoegd aan een RNA sample van de constructen. Het gebruikte plasmide bevat naast een klein deel van het gen dat codeert MODV NS5, het gehele 3'UTR van het virus en dus ook de XRN1 stalling site. Daarom zijn de sfRNA's wanneer deze zichtbaar zijn, kleiner dan het fragment zonder de toegevoegde XRN1, hier is het deel voor de pseudoknoop namelijk wel gedegradéerd.



FIGUUR 3.1. *IN VITRO* DATA VAN DE LOOP MUTANT. DEZE DATA IS VERKREGEN DOOR *IN VITRO* XRN1 TOE TE VOEGEN AAN EEN RNA SAMPLE VAN HET CONSTRUCT. DE (-) LAANTJES REPRESENTEREN HET 3'UTR MET DAARVOOR EEN KLEIN STUKJE VAN HET N-TERMINALE GEBIED. DE (+) LAANTJES REPRESENTEREN DIT ZELFDE DEEL MET XRN1. OP DEZE AFBEELDING IS OOK DE 2U LOOP MUTANT TE ZIEN, HIER IS OOK DE LOOP VERWIJDERT MET UITZONDERING VAN DE "UU" IN DE SEQUENTIE



FIGUUR 3.2. *IN VITRO* DATA ANALYSE VAN SFRNA SYNTHESE OP EEN NORTHERN BLOT. MODV WILDTYPE (LAAN 1-2), MODV β 5'MUTANT (LAAN 3-4), β 3' MUTANT (LAAN 7-8) EN DE β 5'-3' MUTANT (LAAN 5-6). DEZE DATA IS VERKREGEN DOOR *IN VITRO* XRN1 TOE TE VOEGEN AAN EEN RNA SAMPLE VAN HET CONSTRUCT. DE (-) LAANTJES REPRESENTEREN HET 3'UTR MET DAARVOOR EEN KLEIN STUKJE VAN HET N-TERMINALE GEBIED. DE (+) LAANTJES REPRESENTEREN DIT ZELFDE DEEL MET XRN1.



FIGUUR 3.3. *IN VITRO* DATA ANALYSE VAN SFRNA SYNTHESI OP EEN NORTHERN BLOT. MODV WILDTYPE (LAAN 1-2), MODV ϵ 5'MUTANT (LAAN 3-4), ϵ 3' MUTANT (LAAN 7-8) EN DE ϵ 5'-3' MUTANT (LAAN 5-6). DEZE DATA IS VERKREGEN DOOR *IN VITRO* XRN1 TOE TE VOEGEN AAN EEN RNA SAMPLE VAN HET CONSTRUCT. DE (-) LAANTJES REPRESENTEREN HET 3'UTR MET DAARVOOR EEN KLEIN STUKJE VAN HET N-TERMINALE GEBIED. DE (+) LAANTJES REPRESENTEREN DIT ZELFDE DEEL MET XRN1.

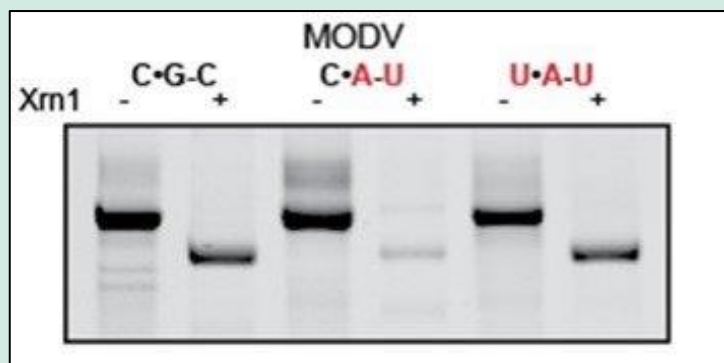


FIGURE 3.4. *IN VITRO* DATA ANALYSE VAN SFRNA SYNTHESI OP EEN NORTHERN BLOT. MODV WILDTYPE (LAAN 1-2), MODV TRIPEL 1 MUTANT (LAAN 3-4), TRIPEL 2 MUTANT (LAAN 4-6). DEZE DATA IS VERKREGEN DOOR *IN VITRO* XRN1 TOE TE VOEGEN AAN EEN RNA SAMPLE VAN HET CONSTRUCT. DE (-) LAANTJES REPRESENTEREN HET 3'UTR MET DAARVOOR EEN KLEIN STUKJE VAN HET N-TERMINALE GEBIED. DE (+) LAANTJES REPRESENTEREN DIT ZELFDE DEEL MET XRN1.