

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
MIKROBIOLOOGIA JA VIROLOOGIA ÕPPETOOL

**Alfaviiruste replikaasi jagamine funktsionaalseteks komponentideks Sindbis,  
Chikungunya ja Ross River viiruste näitel**

Bakalaureuse töö  
12 EAP  
Laura Sandra Lello  
PhD Andres Merits, PhD Age Utt  
TARTU 2018

# INFOLEHT

Alfaviirused on *Togaviridae* sugukonda kuuluv positiivse polaarsusega RNA genoomsete viiruste perekond. Alfaviiruste genoom kodeerib mittestruktuurseid valke, mis sünteesitakse liitvalguna. Funktsionaalne replikaas moodustub liitvalgu lõikamise teel. Seni ei ole suudetud sellist kompleksi individuaalsetest komponentidest konstrueerida. See ajendas meie uurimisgrupi ning Antwerpeni Troopilise Meditsiini Instituudi teadlaseid uurima alfaviiruste replikaasi rekonstrueerimist valmis- ja liitvalkudest ning RNA maatriksist. Käesoleva töö eesmärgiks oli selleks vajalike töövahendite kavandamine, valmistamine ning katsetamine. Analüüsiti kahest ja kolmest komponendist moodustatud replikaaside funktsionaalsust. Lisaks määrati replikaasi kompleksi moodustavate komponentide optimaalsed vahekorrad ja uuriti, kas sellised replikaasid säilitavad oma bioloogilised omadused. See bakalaureuse töö näitab Ross River, Sindbis ja Chikungunya viiruste näidetel, et nende replikaase saab rekonstrueerida kahest- ja mõnel juhul ka kolmest komponendist ning rajab seega aluse alfaviiruste replikaasi moodustumise ja toimimise põhjalikuks uurimiseks.

Märksõnad: alfaviirused, RRV, SINV, CHIKV, replikaas, nsP4, transreplikatsiooni süsteem

Lõputöö CERCS kood on B230.

Alphaviruses are a group of arboviruses with a positive sense RNA genome belonging to the family *Togaviridae*. Some of them are serious pathogens (Chikungunya virus). The non-structural part of the genome encodes a replicase precursor. The functional replicase is formed by proteolytic processing of the precursor. As of now, no one has been able to construct such replicase from individual proteins. This motivated the scientists from our group and Institute of Tropical Medicine of Antwerpen to reconstruct the replicase from independent proteins, polyproteins and the RNA template. The aim of this study was to make the necessary constructs, to optimize their ratios and to test whether the replicases made this way preserve their natural biological features. This bachelor's thesis revealed the possibility to reconstruct functional alphavirus replicase from two or in some cases even three components using three alphaviruses (Ross River, Sindbis and Chikungunya viruses) as examples and established the base for further studies of biogenesis and functionality of the alphavirus replicase.

Keywords: alphaviruses, RRV, CHIKV, SINV, replicase, nsP4, *trans*-replication system

Research CERCS code is B230.

# SISUKORD

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INFOLEHT .....                                                                                            | 2  |
| SISUKORD .....                                                                                            | 3  |
| KASUTATUD LÜHENDID .....                                                                                  | 5  |
| SISSEJUHATUS .....                                                                                        | 6  |
| KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....                                                                                 | 7  |
| 1.1    ALFAVIIRUSED .....                                                                                 | 7  |
| 1.1.1    ÜLDISELOOMUSTUS .....                                                                            | 7  |
| 1.1.2    ALFAVIIRUSTE VIRION .....                                                                        | 8  |
| 1.1.3    GENOOMI ORGANISATSIOON .....                                                                     | 8  |
| 1.1.4    INFEKTSIOONITSÜKKEL .....                                                                        | 9  |
| 1.1.5    ALFAVIIRUSTE REPLIKATSIOON .....                                                                 | 10 |
| 1.1.6    ALFAVIIRUSTE NS VALGUD .....                                                                     | 11 |
| 1.1.7    ALFAVIIRUSTE STRUKTUURSED VALGUD .....                                                           | 13 |
| 1.1.8    TÖÖS KASUTATUD VIIRUSED .....                                                                    | 13 |
| 1.2    TRANSREPLIKATSIOONI SÜSTEEM .....                                                                  | 14 |
| 1.2.1    NÄITED TRANSREPLIKATSIOONI SÜSTEEMI KASUTAMISEST SFV<br>MOLEKULAARBIOLOOGIA UURIMISEL .....      | 15 |
| 1.2.2    CHIKV TRANSREPLIKATSIOONI SÜSTEEMI KASUTAMINE .....                                              | 16 |
| 1.3    RNA POLÜMERAAS I KASUTAMINE REPLITSEERUVA RNA MAATRITSI<br>TOOTMISEKS .....                        | 17 |
| 2.    EKSPERIMENTAALNE OSA .....                                                                          | 19 |
| 2.1    EESMÄRGID .....                                                                                    | 19 |
| 2.2    MATERJAL JA METOODIKA .....                                                                        | 20 |
| 2.2.1    SÖÖTMED JA LAHUSED .....                                                                         | 20 |
| 2.2.2    PLASMIIDIDE KONSTRUEERIMINE .....                                                                | 21 |
| 2.2.3    EKSPERIMENTIDE LÄBIVIIMINE KOEKULTUURIS .....                                                    | 24 |
| 2.3    TULEMUSED JA ARUTELU .....                                                                         | 26 |
| 2.3.1    EKSPERSSIOONIKONSTRUKTIDE KAVANDAMINE .....                                                      | 26 |
| 2.3.2    KAHEKOMPONENTSE P123+NSP4 NING P12 <sup>CA</sup> 3+NSP4 REPLIKAASIDE<br>AKTIIVSUSE ANALÜÜS ..... | 28 |

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.3 KAHE- JA ÜHEKOMPONENTSED REPLIKAASID OMAVAD SAMA<br>MAATRITS-SPETSIIFILISUST .....                                    | 37 |
| 2.3.4 KOLMEKOMPONENTNE REPLIKAAS ON FUNKTSIONAALNE SINV JA<br>CHIKV PUHUL, KUID RRV PUHUL OMAB MINIMAALSET AKTIIVSUST ..... | 40 |
| KOKKUVÕTE .....                                                                                                             | 45 |
| SUMMARY .....                                                                                                               | 46 |
| KIRJANDUSE LOETELU .....                                                                                                    | 48 |
| KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....                                                                                              | 51 |
| LISAD .....                                                                                                                 | 52 |
| LIHTLITSENTS .....                                                                                                          | 57 |

## KASUTATUD LÜHENDID

**CA** – mutatsioon, mis muudab Cys478 aminohappejäägialaniini jäägiks

**CHIKV** – Chikungunya viirus

**CMV** – Tsütomegaloviirus

**DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

**dsRNA** – kaheahelaline RNA

**ECSA** – *East/Central/South-African*, Ida-/Kesk-/Lõuna-Aafrika

**EGFP** – *Enhanced green fluorescent protein*, roheliselt fluorestseeruv valk

**FCS** – *fetal calf serum*, vasika loote seerum

**Fluc** – *Firefly* lutsiferaas, jaanimardika lutsiferaas

**Gluc** – *Gaussia* lutsiferaas

**HEK293** – inimese embrüonaalsed neerurakud

**IMDM** – *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

**IRES** – *internal ribosome entry site*, sisemine ribosoomi seondumissait

**LARII** – *luciferase assay reagent II*, lutsiferaasi mõõtmise reagent II

**MT/GT** – metüül-/guanüülültransferaas

**nsP1-4** – *non-structural proteins 1-4*, mittestruktuursed valgud 1-4

**PIPE** – *polymerase incomplete primer extension*, polümeraasi mittetäielik praimerekstensioon

**PLB** – *Passive Lysis Buffer*, lüüsipuhver

**qRT-PCR** – reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon

**RdRp** – RNA-sõltuv RNA-polümeraas

**RRV** – Ross River viirus

**SFV** – *Semliki Forest Virus*, Semliki Forest viirus

**SG** – subgenoomne

**SINV** – Sindbis viirus

**U2OS** – inimese luu osteosarkoomi epiteelkoe rakud

**ubi** – ubikvitineeritud

**UTR** – *untranslated region*, mittetransleeritav regioon

**WA** – *West African*, Lääne-Aafrika

**VEEV** – *Venezuelan equine encephalitis virus*, Venezuela hobuste entsefaliidi viirus

## SISSEJUHATUS

Viirused on kõige arvukamad bioloogilised objektid. Viirustel on olemas oma genoom, kuid neil puudub rakuline ehitus ja võime iseseisvalt paljuneda. Selleks vajavad nad peremeesraku abi ning on seetõttu obligatoorsed parasiidid. Viirused võivad nakatada kõiki elusorganisme.

Viiruse infektsioon kulgeb sageli sümptomiteta. Siiski põhjustavad viirused ka palju tõsiseid haiguseid, näiteks rõugeid (rõugeviirus) ning lastehalvatust (polioviirus). Neist esimene on õnnestunud vaktsiiniga likvideerida ja teise levikut oluliselt piirata. Paraku enamike viiruste jaoks vaktsiinid puuduvad, mistõttu on näiteks inimese immundefitsiidi ja C-hepatiidi viirused endiselt suureks probleemiks. Osa probleemseid viiruseid kuulub ka alfaviiruste perekonda, näiteks Chikungunya viirus (CHIKV), mille kahtlustatud juhtusid oli Maailma Tervise Organisatsiooni andmetel Ameerikates 2016. aastal ligi 350 000.

Erinevalt antibiootikumidest on viirus-vastased vahendid väga spetsiifilised, st. toimivad ühe või väikese arvu viiruste vastu. Selleks, et sellist ravimit (või vaktsiini) välja töötada, on kõigepealt vaja vastavaid viiruseid põhjalikult uurida, eelkõige teha kindlaks mehhanismid, mille abil nad paljunevad. Kuna viirused on äärmiselt mitmekesised, siis uurib enamusi viroloogiale spetsialiseerunud uurimisrühmi mingeid kindlaid viiruste gruppe. Alfaviiruste uurimisega tegeleb Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis tegutsev RNA viiruste uurimisgrupp, kus on läbi viidud ka käesolev uurimistöö.

See bakalaureuse töö on keskendunud alfaviiruste replikatiivse masinavärgi uurimisele. Alfaviiruste genoomi replitseerumise olulisimaks komponendiks on viiruse mittestruktuurne liitvalk. See liitvalk kujutab endast nelja replikaasi valgu eelvalku, millest igaüks on asendamatu viiruse replikatsiooni toimumiseks. Erinevate alfaviiruste replikaasi valgud on küllalt sarnased, viirused ise aga väga erinevad tekitades erinevaid haigusi ja levides erinevate putukate abil. See on tekitanud mitmeid küsimusi, mille hulka kuuluvad näiteks erinevate viiruste replikaasi komponentide ühilduvus ning ka maatriksi spetsiifilisus. Seni on neid küsimusi üritatud uurida kasutades hübriidseid viiruseid. Paraku on selline lähenemine väga töömahukas ja seotud paljude tehniliste ning viiruste omadustest tulenevate probleemidega. See bakalaureuse töö on keskendunud alternatiivse, efektiivse ja palju lihtsamini kasutatava lähenemise väljatöötamisele ja loodud töövahendite iseloomustamisele.

Käesolev töö on teostatud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi RNA viiruste uurimisgrupi ning Antwerpeni Troopilise Meditsiini Instituudi koostööprojekti raames. Sooviksin tänada professor Andres Meritsat ning doktor Age Utti juhendamise ja heade nõuannete eest. Lisaks soovin juhendamise ning meeldiva koostöö eest tänada ka Kevin Ariëni, Koen Bartholomeeusenit ning Sandra Coppensit Antwerpeni Troopilise Meditsiini Instituudist.

# KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 ALFAVIIRUSED

### 1.1.1 ÜLDISELOOMUSTUS

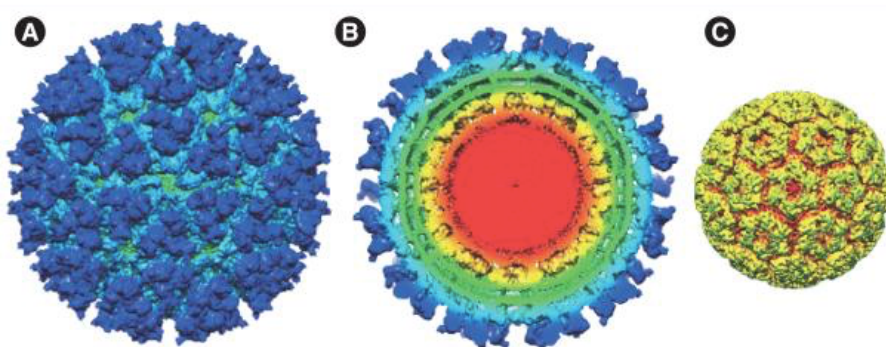
Viirused on väikesed bioloogilised objektid, mis suudavad paljuneda ainult elusrakkudes ning mida iseloomustab infektsioonilisus. Viiruseid on nii DNA genoomseid kui ka RNA genoomseid. Suurimaks tuntud viiruste grupiks on positiivse polaarsusega RNA genoomsed viirused. Selle grupi viirustele on iseloomulik suur mitmekesisus, samas omab iga siia kuuluv viirus sarnasusi ka teiste positiivse polaarsusega RNA genoomsete viirustega.

Alfaviirused kuuluvad koos rubiviirustega sugukonda *Togaviridae*. Enamik alfaviiruseid levivad lüljalgsete vektorite vahendusel ning nende hulka kuulub nii olulisi inimese kui ka loomade patogeene (Strauss & Strauss, 1994). Alfaviirused on levinud üle kõigi kuue kontinendi. Alfaviiruste vektoriteks on kõige sagedamini *Aedes* ja *Culex* perekondadesse kuuluvad moskiitod, kes levitavad neid erinevatele selgroogsetele, põhiliselt lindudele ja imetajatele. Viirus paljuneb ka vektori organismis, kes ise jääb aga sellest infektsioonist minimaalselt mõjutatuks. Osa alfaviiruseid kanduvad edasi ka muudesse perekondadesse kuuluvate moskiitodega (nagu näiteks *Anopheles*). Ka rubiviiruste perekonna ainus esindaja – punetiste viirus – on oluline inimese patogeen, kuid erinevalt alfaviirustest pole tal lüljalgsete vektorit ning ta levib piisknakkuse teel (Lambert, 2015).

Alfaviiruste genoomis on kaks kodeerivat ala (lähemalt vaata 1.1.3). Viiruse kodeeritud mittestruktuursete (ns) valkude aminohappeliste järjestuste alusel jagatakse soojaverelisi loomi nakatavad alfaviirused Uue- ja Vana Maailma viirusteks. Need viirused erinevad ka nende poolt põhjustatud haiguste poolest: Uue Maailma alfaviiruseid seostatakse entsefaliidi tekitamisega, samas kui Vana Maailma viirused põhjustavad polüartriiti. Uue Maailma alfaviiruste hulka kuulub näiteks VEEV (*Venezuelan equine encephalitis virus*), Vana Maailma viiruste hulka kuuluvad aga Chikungunya viirus (CHIKV), Ross River viirus (RRV) ja Sindbis viirus (SINV) (Strauss & Strauss, 1994), mille uurimisele ongi käesolevas töös keskendutud.

### 1.1.2 ALFAVIIRUSTE VIRION

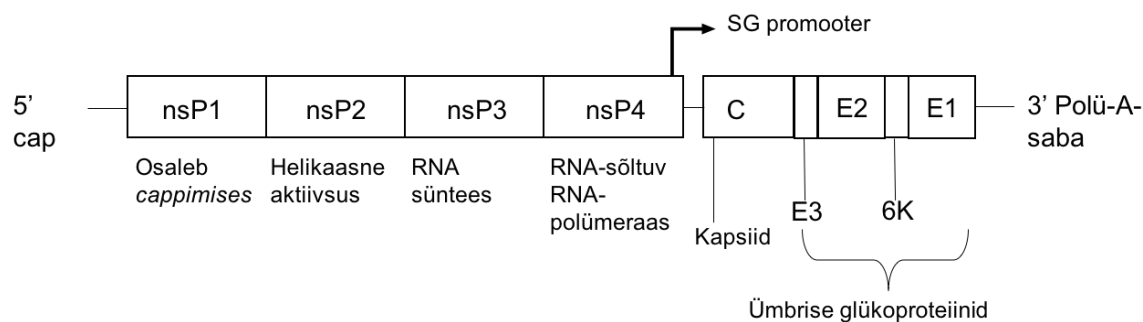
Alfaviiruste üheaahelaline RNA genoom on pakitud sfäärilistesse virionidesse, mille läbimõõt on umbes 70 nm (Joonis 1). Virionis paikneb 240-st kapsiidivalgu koopiast koosnev ikosaedriline T=4 sümmeetriaga kapsiid (Strauss & Strauss, 1994), milles asub viiruse RNA genoom ja mida katab rakulist päritolu lipiidne ümbris. Lipiidset ümbrist katab omakorda kiht, mille moodustavad membraani läbivad E1 ja E2 glükovaigud. E1 ja E2 moodustavad heterodimeerid, mis omakorda moodustavad trimeerid. Kokku kuulub virioni 80 sellist kompleksi (neid nimetatakse sageli ogadeks) (Cheng *et al.*, 1995).



**Joonis 1. Alfaviiruste virioni struktuur SINV näitel.** A. Virioni pealtvaatest on eristatavad valgulised ogastruktuurid. B. Virioni läbilõige. C. Nukleokapsiid. Glükovaigud on märgitud siniselt, lipiidne kaksikkiht roheliselt, kapsiidivalgud kollaselt ja RNA genoom punaselt. Joonis pärineb (Jose *et al.*, 2009).

### 1.1.3 GENOOMI ORGANISATSIOON

Alfaviiruste genoom on positiivse polaarsusega RNA, mille suurus jääb 11-12 kb vahele ning mille 5' otsas on *cap*-struktuur ning 3' otsas polü-A-saba (Joonis 2). Alfaviiruste genoom sisaldab kahte avatud lugemisraami. Genoomi 5' otsa poolne avatud lugemisraam kodeerib ns valke ja teine 3' otsa poolne struktuursete valke (Joonis 2). Ns osa vastutab viiruse genoomi replitseerumise eest, kodeerides replikaasi komponentide (nsP1-4) eelvalku - ns liitvalku P1234. Struktuurset osa kodeerib teist liitvalku, mille lõikamise tulemusena moodustuvad virioni kuuluvad valgud CP, E3, E2, 6K, TF ja E1 (Strauss & Strauss, 1994; Jose *et al.*, 2009).



**Joonis 2. Alfaviiruste genoomi ehitus.** Joonis on adapteeritud (Powers *et al.*, 2001).

Ns regioon transleeritakse otse genoomselt RNA-lt, samas, kui struktuursed valgud transleeritakse eraldi SG (subgenoomne) RNA-lt, mis sünteesitakse viiruse replikaasi poolt nakatatud rakus. Lisaks kodeerivatele järjestustele paiknevad genoomi 5' ning 3' otstes ka mittetransleeritavad järjestused (UTR, *untranslated regions*). Lugemisraame eraldab teineteisest lühike geenidevaheline ala (Strauss & Strauss, 1994).

### 1.1.4 INFEKTSIOONITSÜKKEL

Alfaviiruste infektsioonile selgroogsed peremehes on iseloomulik suur viiruse hulk veres (vireemia). See on vajalik selleks, et nakatada uuesti verd imevaid vektoreid, kes jällegi viirust uutele peremeestele edasi levitavad. Samas on kõrge tiitriga vireemia lühiajaline, mistõttu nakatunud selgroogne peremees on võimeline viirust moskiitodele levitama küllaltki lühikest aega. See lühiajalisus on põhjustatud peremehe sünnipärasest immuunvastusest, eelkõige tüüp-I interferoonide toimest (Weaver *et al.*, 2012). Selleks, et viirus üldse levimiseks vajalikku vireemiat tekitada suudaks peab tema infektsioon olema väga kiire ja efektiivne.

Esimeseks sammuks infektsioonitsükli on viiruse sisenemine organismi nakatunud moskiito vahendusel. Ülekantav viiruse hulk on väike, ilmselt suurusjärgus mõned kuni mõnisada infektsioonilist virioni. Infektsioon saab alguse hammustust ümbritsevates kudedes või lümfisõlmedes ja liigub sealt edasi teistesse kudedesse ja organitesse. Moskiito toitumise ajal vabastatakse virionid dermisesse ning selle kapillaaridesse. Moskiito sülgel arvatakse olevat olulisi omadusi tagamaks infektsiooni efektiivset algamist. Peale viiruse verre jõudmist saab see liikuda üle kogu organismi ning hakata mõjutama ülejäänud organeid (Pingen *et al.*, 2016).

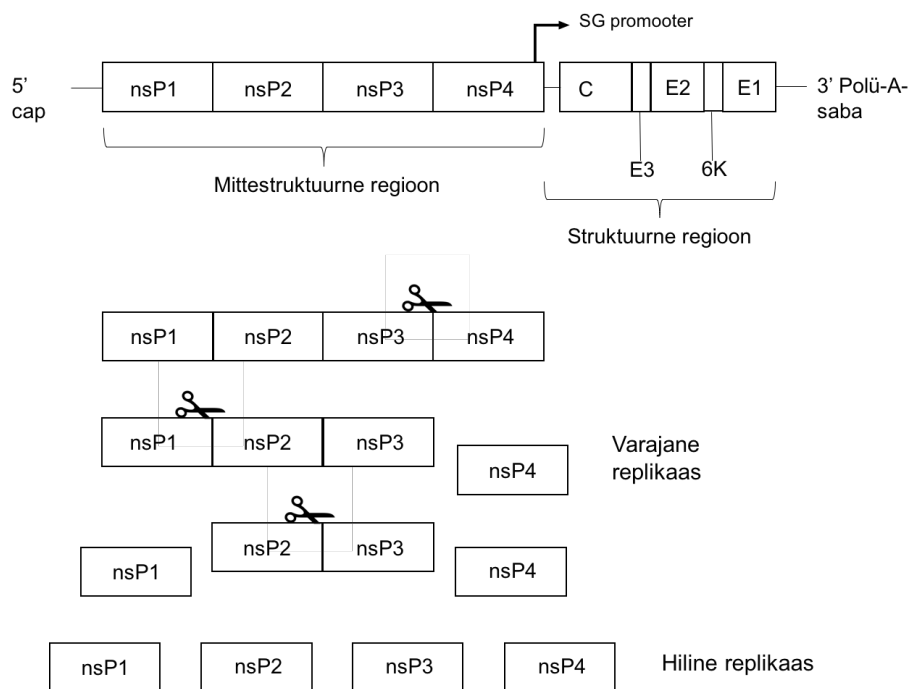
Selgroogse organismi raku infektsioon algab virionide seostumisega peremehe raku pinnal paiknevate retseptoritega, mis on veel enamasti tundmatud. Virionid sisenevad rakku endotsütoosi teel. Virioni ümbrise ning raku endosoomi membraani liitumine toimub madalal

pH-l, mis viib nukleokapsiidi vabanemiseni raku tsütosooli. Nukleokapsiid laguneb ribosoomide toimel ja sellele järgneb replikaasi valkude translatsioon. Replikaasi valgud seonduvad viiruse genoomile, seejärel transporditakse raku plasmamembraanile, kus moodustatakse replikatsioonikompleksid (sfäärulid), milles toimub viiruse RNA-de süntees. Muu hulgas sünteesitakse SG RNA-d, millelt transleeritakse struktuurne liitvalk. Selle lõikamise tulemusena moodustunud kapsiidivalgu ning genoomse RNA vaheliste interaktsioonide tagajärjel moodustuvad ikosaeedrilised nukleokapsiidid. Nukleokapsiidid liiguvad plasmamembraanile, kus nad seonduvad E2/E1 dimeeridega. Moodustuvad virionid väljuvad rakust pungumise teel. (Strauss & Strauss, 1994)

### **1.1.5 ALFAVIIRUSTE REPLIKATSIOON**

Viiruse RNA replikatsiooni eest vastutab genoomi ns osa. Sellelt transleeritakse liitvalk P1234, mis esialgsel kujul ei ole võimeline RNA-d sünteesima. See funktsioon omandatakse peale liitvalgu protsessimist, mille käigus kindlate vaheetappide kaudu moodustuvad neli eraldiseisvat replikatsioonivalku: nsP1, nsP2, nsP3 ja nsP4. Seda protsessimist viib läbi nsP2, mis lisaks proteaasele aktiivsusele omab ka RNA helikaaset aktiivsust (Gomez De Cedron *et al.*, 1999; Hardy & Strauss, 1989).

Liitvalgu töötlemine algab lõikamisest polüproteiini nsP3 ja nsP4 osade vahel. nsP4 - viiruse RNA-st sõltuva RNA polümeraasi - vabanemine liitvalgust on RNA sünteesi aktiveerimiseks absoluutselt vajalik. Lõikamise tulemusena moodustub P123 + nsP4 kompleks, mida nimetatakse ka varajaseks replikatsioonikompleksiks. See sünteesib genoomselt RNA-lt negatiivse ahela (Joonis 3). Sünteesitud negatiivne ahel moodustab positiivse ahelaga dsRNA (kaheaheelaline RNA) (De Groot *et al.*, 1990; Strauss & Strauss, 1994).



**Joonis 3. Alfaviiruste replikaasi eelvalgu lõikamise (protsessingu) skeem.** Üleval on toodud täielik genoom. Joonis on tõlgitud Age Utti doktoritööst (2016).

Järgmise sammuna lõigatakse P123 nsP1-ks ja P23-ks (Joonis 3). Moodustunud nsP1 + P23 + nsP4 replikaasi kompleks on võimeline sünteesima nii positiivseid kui ka negatiivseid RNA ahelaid. Samas on tegemist väga ebastabiilse kompleksiga, mis tõenäoliselt RNA-d sünteesida ei jõua, sest peaaegu koheselt peale nsP1 eemaldamist lõigatakse ka nsP2 ja nsP3 osade vahel. Moodustub hiline replikatsioonikompleks, kuhu kuuluvad neli valmis replikatsioonivalgu (Joonis 3) (Vasiljeva *et al.*, 2003; Lemm *et al.*, 1994). Kõik valmis replikatsioonivalgud ja ka P123 ning P23 vahevormid on RNA replikatsiooniks hädavajalikud (Spuul *et al.*, 2011; Vasiljeva *et al.*, 2003).

Alfaviiruste replikatsioon toimub ümbritsevast keskkonnast eraldatud membraansetes struktuurides. Nende diameeter on umbes 50 nm, nad on pirni kujulised ning nende sisemus on tsütoplasma ühendatud kitsaste kaelakujuliste ühenduste kaudu. Sfäärulid moodustuvad replikatsiooni varajases staadiumis plasmamembraanidest, sageli toimub see koos RNA negatiivse ahela sünteesiga. Sfäärulite suurus sõltub neis paikneva RNA molekuli pikkusest: mida lühem on maatriks, seda väiksem sfäärul (Kallio *et al.*, 2013).

### 1.1.6 ALFAVIIRUSTE NS VALGUD

**nsP1** (umbes 60 kDa) osaleb replikaasi kinnitumisel raku membraanidele, negatiivse RNA sünteesi initsieerimisel ja positiivsete RNA-de (genoomse ja SG RNA) 5' otsa *cap*-struktuuri

lisamisel. Seda *cap*-struktuuri lisamist võimaldavad nsP1 MT/GT (metüül/guanüülültransferaas) aktiivsused (Ahola *et al.*, 1997). Ka on avastatud, et alfaviiruste *capping* funktsioon ei ole absoluutne: varajases infektsioonis sünteesitakse ka mitte-*capit*ud positiivse polaarsusega viiruslikke RNA-sid (Ahola *et al.*, 1997; Sokoloski *et al.*, 2015). Mitte-*capit*ud RNA-de olulisus on küll teadmata, aga on kindel, et nsP1 *capping* aktiivsus on oluline infektsiooniks organismi tasemel (Sokoloski *et al.*, 2015).

**nsP2** (umbes 90 kDa) täidab vähemalt nelja olulist funktsiooni käitudes NTPaasina, RNA helikaasina, RNA trifosfataasina ja, nagu ülal mainitud, ka P1234 liitvalku lõikava proteaasina (Rikkonen, 1996; Kim *et al.*, 2004). nsP2 helikaasne aktiivsus lokaliseerub valguga N-terminaalses pooles (Rikkonen *et al.*, 1994). Helikaasse aktiivsuse jaoks on oluline ka nsP2 C-terminaalne regioon. Selles regioonis paikneb papaiin-tüüpi tsüsteiin proteaas, mis ülal kirjeldatud põhjustel (Joonis 3) on viiruse RNA replikatsiooniks hädavajalik (Hardy & Strauss, 1989).

**nsP3** (ligikaudu 60 kDa) on vajalik negatiivse RNA ahela sünteesi alustamiseks ja SG RNA sünteesiks. nsP3 C-terminaalne domeen ei oma fikseeritud ruumilist struktuuri ja seondub viiruse replikatsiooniks oluliste raku valkudega (Götte *et al.*, 2018).

**nsP4** (umbes 70 kDa) on RNA-sõltuv RNA-polümeraas (RdRp). Tegemist on alfaviiruste kõige rohkem konserveerunud valguga: peamiselt imetajaid või linde nakatavate alfaviiruste nsP4 järjestused on 71-91% ulatuses sarnased (Khan *et al.*, 2002). Selle valguga C-terminaalne regioon sisaldab viiruslikele RNA polümeraasidele iseloomulikku konserveerunud GDD motiivi (Kamer & Argos, 1984). nsP4 3D-struktuur ei ole teada. *E. coli*s ekspresseerimise ja puhastamise tulemusel on saadud SINV nsP4 valk, millel on P123 polüproteiini olemasolul võime sünteesida positiivse ahela järgi terve maatriksi pikkuseid negatiivseid ahelaid (Rubach *et al.*, 2009). Paraku on see valk väga ebastabiilne ja agregeerub kergesti. 97 aminohappe jäägi eemaldamine N-terminusest stabiliseerib nsP4 valku, kuid toob kaasa *de novo* sünteetilise aktiivsuse kadumise (Rubach *et al.*, 2009; Tomar *et al.*, 2006). Sellest võib järeldada, et RdRp katalüütilise aktiivsuse võti paikneb neis 97 aminohappe jäägis. Samas pole teada, mida see regioon teeb, sest selle järjestus on unikaalne (konserveerunud ainult alfaviiruste hulgas) ning tal võib puududa fikseeritud ruumiline struktuur. Siiski on teada, et see regioon on hädavajalik viiruse RNA replikatsiooniks ning interaktsioonideks teiste ns valkudega (Rupp *et al.*, 2011).

Nakatunud rakkudes leidub nsP4 valku (võrreldes teiste ns valkudega) võrdlemisi väikesel hulgal. Mõne viiruse puhul on vastav molaarne vahekord 1 : 100-le või väiksemgi. See on osaliselt põhjustatud terminaatorikoodonist, mis paljudel alfaviirustel paikneb nsP3 ja nsP4 valke kodeerivate alade vahel ja mis ületatakse translatsioonil 10-20% juhtudest (Strauss &

Strauss, 1994). Lisaks paikneb nsP4 N-otsas türosiini jääk, mis põhjustab nsP4 efektiivset lagundamist proteosoomide poolt. Replikatsioonikompleksis paiknevad nsP4 molekulid on sellise degradatsiooni eest kaitstud (De Groot *et al.*, 1991).

### 1.1.7 ALFAVIIRUSTE STRUKTUURSED VALGUD

Alfaviiruste genoomi teine avatud lugemisraam kodeerib viiruse struktuurseid valke (Joonis 3), mis transleeritakse SG RNA-lt C-E3-E2-6K-E1 liitvalguna, mida modifitseeritakse nii ko- kui ka posttranslatsiooniliselt. Kapsiidivalk sisaldab oma C-terminaalses otsas seriinproteas domeeni ning lõikab ise end polüproteiinist lahti. Seejärel seondub sünteesitav liitvalk endoplasmaatilise retiikulumi membraanidega, kus toimuvad liitvalgu modifikatsioonid ning selle lõikamise (raku proteaasid) tagajärjel moodustuvad p62, 6K ja E1 valgud. p62 on E2 ja E3 valkude eelvalguks ning moodustab E1 valguga heterodimeeri, mis transporditakse edasi Golgi kompleksi, kus ta protsessitakse valmis E2 ja E3 valkudeks. Moodustunud E2 ja E1 dimeerid transporditakse plasmamembraanile (Strauss & Strauss, 1994). E1 ja E2 kujutavad endast multifunktsionaalseid transmembraanseid glükovalke, mis viiruse infektsioonis toimivad retseptorit seondava valguna (E2) ja virioni ümbrise ning endosoomi membraanide liitumist vahendava valguna (E1) (Jose *et al.*, 2009).

### 1.1.8 TÖÖS KASUTATUD VIIRUSED

**CHIKV** isoleeriti esimest korda 1953-1954 aastatel Tansaania toimunud epideemia ajal. Inimesel põhjustab ta Chikungunya palavikku, mida iseloomustavad lööve ning artriit (Powers *et al.*, 2000). CHIKV on viimastel aastakümnetel põhjustanud mitmeid suuri puhanguid ja mõjutanud miljoneid inimesi. Suurimad nendest on Maailma Tervise Organisatsiooni andmete kohaselt aset leidnud India Ookeani regioonis aastatel 2005-2008 ning alates 2013 aastast Kariibi mere regioonis ja Ameerikates. CHIKV-l on teada kolm erinevat genotüüpi: ECSA (*East/Central/South-African*, Ida-/Kesk-/Lõuna-Aafrika) genotüüp, Aasia genotüüp ja WA (*West Africa*, Lääne-Aafrika) genotüüp (Powers *et al.*, 2000). Siin töös kasutatud CHIKV kuulub ECSA genotüüpi.

**RRV** infektsioon on kõige sagedasem arboviraalne haigus Austraalias. Esimene põhjalikumalt kirjeldatud epideemia esines juba 1928. aastal. Kuna RRV infektsiooni iseloomustavad palavik, lööve ja artriidi-tüüpi sümptomid (Mylonas, 2002) hakati seda Teise Maailmasõja ajal kutsuma epideemiliseks polüartriidiks (Harley *et al.*, 2001). Austraalia

Tervishoiu Ministeeriumi andmetel registreeriti aastatel 1991-2000 keskmiselt 4745 RRV infektsiooni juhtumit aastas, kusjuures 1996. aastal oli haigusjuhte lausa 7823.

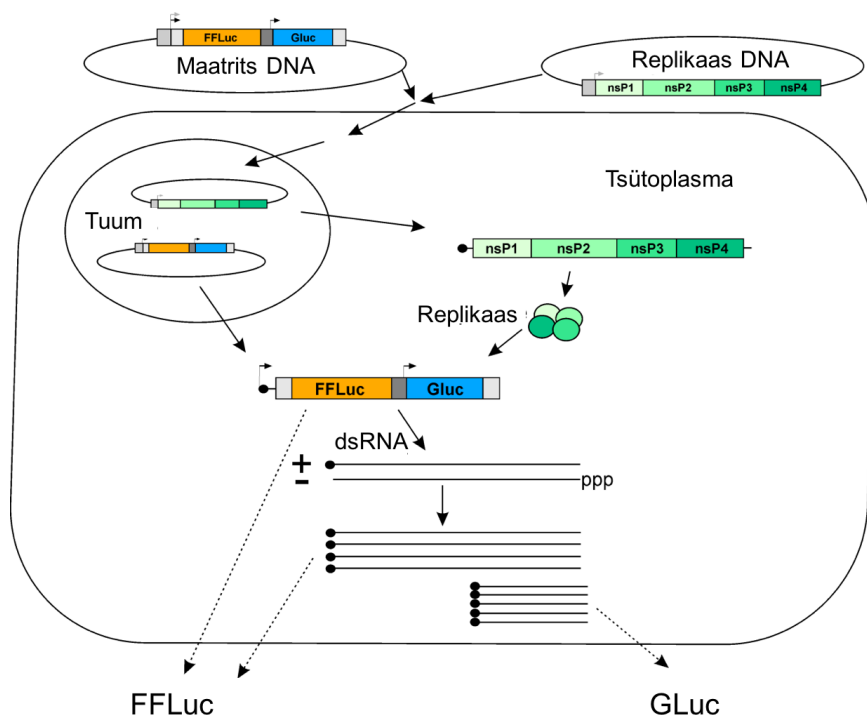
**SINV** vektorid kuuluvad perekondadesse *Culex* ja *Culiseta*. Viirus on laialt levinud Euroopas, Aafrikas, Austraalias ja Aasias, kuid sümptomaatilist infektsiooni põhjustab ta vaid Põhja-Euroopas (ka Eestis) ja Lõuna-Aafrikas. Vana Maailma alfaviirustele omaselt põhjustab ka SINV inimesel löövet ja artriidi-tüüpi sümptomeid. SINV põhjustatud haigust kutsutakse Soomes Pogosta haiguseks, Rootsis Ockelbo haiguseks ning Venemaal Karjala piirkonnas (ja ka Eestis) Karjala palavikuks (Kurkela *et al.*, 2005; 2008).

## 1.2 TRANSREPLIKATSIOONI SÜSTEEM

Alfaviiruste replikatsiooni käigus on viiruse ns valkude ekspressioon otseselt seotud RNA replikatsiooniga. Seetõttu muudavad mutatsioonid, mis mõjutavad RNA replikatsiooni, ka replikaasi tootmist. Sellised efektid on tavalised replikaasi valkudes ja/või replikatsioonis osalevates RNA järjestustes paiknevate mutatsioonide puhul. Sageli toob see kaasa selle, et viirus kas pöörab need mutatsioonid tagasi (reverteerub) või kompenseerib need uute mutatsioonidega. Paraku muudab viiruse selline käitumine võimatuks analüüsida konkreetsete mutatsioonide otsest mõju tema replikaasi aktiivsusele (Lulla *et al.*, 2012; 2013; Spuul *et al.*, 2007; Žusinaite *et al.*, 2007). Selleks, et taoliseid mutatsioone ja nende mõju uurida, peab replikaasi tootmine olema RNA replikatsioonist sõltumatu. Juhul, kui replikaas suudaks replitseerida vaid RNA-d, mille pealt ta ise transleeriti (st. oleks *cis*-aktiivne) oleks see võimatu. Õnneks on alfaviiruste replikaasid *trans*-aktiivsed, see tähendab, et nad suudavad replitseerida ja transkribeerida peale viiruse genoomi (oma mRNA) ka nakatunud rakkudes tekkivaid defektseid interfeerivaid RNA-sid või kunstlikult konstrueeritud RNA-sid, näiteks *helper*-RNA-sid (Lewis *et al.*, 1986; Liljeström & Garoff, 1991). See asjaolu on võimaldanud mitmete alfaviiruste, seal hulgas Semliki Forest viiruse (SFV), aga ka SINV ja CHIKV jaoks, konstrueerida transreplikatsiooni (*trans*-komplementatsiooni) süsteemid.

Replikatsiooni käivitamiseks on vaja ekspresseerida rakus viiruse replikaasi ja sellele sobivaid RNA maatrikse. Kuna replikaasi poolt äratuntavad järjestused enamasti ei kattu viiruse genoomi valke kodeerivate aladega (v.a. nsP1 valku kodeeriva ala algus ja nsP4 valku kodeeriva ala lõpp) saab neid asendada markervalke kodeerivate järjestustega (Joonis 4). See on transreplikatsiooni süsteemi suureks eeliseks: markergeenide produktide aktiivsuse mõõtmine on oluliselt tundlikum (aga ka lihtsam ja odavam), kui replitseeruva RNA hulga otsene mõõtmine Northern blot või qRT-PCR (reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni) abil. Nii võimaldab transreplikatsiooni süsteemide kasutamine suuremat eksperimentaalset vabadust,

kui seda annab täispikkade genoomide kasutamine (Spuul *et al.*, 2011), aga ka suuremat tundlikust ja kasutamise mugavust.



**Joonis 4. Alfaviiruse transreplikatsiooni süsteemi toimimise põhimõte.** Rakke transfitseeritakse plasmiididega, milles üks kodeerib P1234 liitvalku ja teine replikatsiooniks sobilikku RNA maatriksit, millesse on lisatud markervalke kodeerivad järjestused. Kui replikaas hakkab sellist RNA-d replitseerima, sünteesitakse palju koopiaid täispikka maatriksit ning ka SG RNA-d. Joonisel toodud näitel saab täispika maatriksi replikatsiooni hinnata Fluc (*Firefly luciferase*, jaanimardika lutsiferaas) ning SG RNA sünteesi Gluc (*Gaussia luciferase*; *Gaussia* lutsiferaas) aktiivsuste mõõtmise kaudu. Joonis on tõlgitud Age Utti doktoritööst (2016).

## 1.2.1 NÄITED TRANSREPLIKATSIOONI SÜSTEEMI KASUTAMISEST SFV MOLEKULAARBIOLOOGIA UURIMISEL

Siiani on transreplikatsiooni süsteeme enim kasutatud SFV puhul. Sellist süsteemi kasutati uurimaks viiruse replikatsioonikomplekside moodustumist ja ns valkude lokaliseerimist rakus (Spuul *et al.*, 2011). Selles töös kasutati bakteriofaag T7 RNA polümeraasi promooteri kontrolli alla paigutatud ning IRES (*internal ribosome entry site*, sisemine ribosoomi seondumissait) elemendi lisamisega võimendatud (see on oluline, sest T7 polümeraas sünteesib ainult *capereimata* RNA-sid) metsiktüüpi P1234 replikaasi või kahekomponentset P123 + ubi4 (ubikvitineeritud nsP4 valk) replikaasi kodeerivaid järjestusi. Lisaks märgistati mõned sellise konstruktide kodeeritud valgud *ZsGreen* markeriga. Maatriks RNA-le vastav järjestus oli samuti paigutatud T7 promooteri kontrolli alla. Selles sisaldasid erinevalt paigutatud markervalke kodeerivad järjestused. Näiteks *Renilla* lutsiferaasi kodeeriv järjestus

oli paigutatud kas SG promooteri ette või taha. Kasutati ka keerulisema ehitusega maatriitseid, kus lisaks *Renilla* lutsiferaasi järjestustele paiknesid ka *dtTomato* markerit ja/või *LacZ* markerit kodeerivad järjestused (Spuul *et al.*, 2011). Seetõttu varieerusid kasutatud maatriitsite pikkused 1500 nukleotiidist enam kui 7000 nukleotiidini. Hiljem võimaldas see kindlaks teha, et SFV replikatsioonikompleksite suurus sõltub otseselt replitseeruva RNA molekuli pikkusest (Kallio *et al.*, 2013). SFV transreplikaasi käivitamiseks on kasutatud ka inimese CMV (tsütomegaloviirus) promooterit. Sellise transreplikaasi kasutamine võimaldas kindlaks teha, et RNA replikatsiooni käigus sünteesib SFV replikaas interferoone indutseerivaid RNA-sid. Üllatuslikult selgus, et replikatsiooniks sobiva RNA maatriitsi olemasolu ei ole selleks vajalik ja et SFV replikaas genereerib interferoone indutseerivaid RNA-sid, kasutades maatriitsina raku mitte-polüadenüleeritud RNA-sid (Nikonov *et al.*, 2013).

## 1.2.2 CHIKV TRANSREPLIKATSIOONI SÜSTEEMI KASUTAMINE

CHIKV transreplikatsioonisüsteemi esialgne variant kavandati ja konstrueeriti meie uurimisgrupis (Utt *et al.*, 2016). Ka CHIKV transreplikatsiooni süsteemi puhul olid selle komponentideks replikaasi ekspressiooni ja RNA maatriitsi sünteesi tagavad plasmiidid. Üks kasutatud lähenemistest oli sama, mis ülal kirjeldatud SFV transreplikaasi puhul: replikaasi ja RNA maatriitsi toodeti T7 promooteri ja vastava polümeraasi abil. Lisaks sellele kasutati plasmiididelt RNA-de tootmiseks ka CMV varajast promooterit. Mõlemal juhul võimendati replikaasi tootmist seda kodeeriva järjestuse koodon-optimeerimisega ning CMV promooteri kasutamise puhul lisaks ka tavaohatise viiruse TK geeni liider järjestuse ja kunstliku introni lisamisega ekspressioonikonstrukti. Kasutatatud maatriitsite üldist ehitust on näidatud joonisel 4: maatriitsi ns (replikaasi) osasse lisati Fluc ja struktuursesse (SG promooteri järgi asuvasse) osasse Gluc markervalke kodeerivad järjestused (Utt *et al.*, 2016).

Neid vektoreid kasutades näidati, et CHIKV transreplikatsiooni süsteem on usaldusväärne, tundlik ning stabiilne meetod uurimaks viiruse RNA replikatsiooni. Muu hulgas kasutati seda süsteemi, et leida võimalusi CHIKV ns valkude fluorestsentsseks ja immunoloogiliseks märgistamiseks. Nii konstrueeriti replikaasid, mille koosseisu kuuluv nsP1 sisaldab EGFP-d (roheline fluorestseeruv valk) või kus nsP4 C-terminusse on lisatud peptiid-märke (FLAG-tag). Selliselt märgistatud transreplikaasid osalesid efektiivselt sfäärulite moodustamisel, mis kinnitas, et kõik olulised sammud replikatsioonikomplekside moodustumisel olid transreplikatsiooni süsteemis esindatud ja märgiste lisamine neid ei mõjutanud. Seega on CHIKV transreplikatsiooni süsteem suurepärane vahend uurimaks CHIKV ns valkude, replikaasi komplekside funktsioone ja viirus-peremehe vahelisi interaktsioone.

Järgnevalt kasutati CHIKV transreplikaasi koostööprojekti Antwerpeni Troopilise Meditsiini Instituudi teadlastega (Bartholomeeusen *et al.*, 2018). Selle projekti raames uuriti replikaasi valkudesse sisse viidud mutatsioonide mõju replikatsioonile erinevates imetaja- ja vektorputuka (*Aedes albopictus* ja *Aedes aegypti*) rakkudes. Viimase läbiviimiseks vahetati nii replikaasi kui RNA maatriksit ekspresseerivates plasmiidides CMV promooter *Aedes aegypti* polüubikvitiini geeni promooteri vastu. Süsteem osutus efektiivseks ja võimaldas läbi viia 17-ne erineva replikaasi valkude mutatsiooni analüüsi moskiito rakkudes. Ettearvatult selgus, et replikaasid, milles on nsP1, nsP2 või nsP4 ensümaatilisi aktiivsuseid inaktiveerivad mutatsioonid, ei tööta ei imetajate ega ka putukarakkudes. Mõlemas peremehe tüübis omasid sarnast efekti ka EGFP insertsioonid nsP1, nsP2 ja nsP3 valkudesse ja nsP2 valgu tsütotoksilisust vähendavad mutatsioonid. Ootamatult selgus aga, et mutatsioonidel, mis aeglustavad P1234 lõikamist (ja koos sellega replikaasi valmimist) on erinevates peremeestes radikaalselt erinevad efektid. Imetajate rakkudes olid need mutatsioonid neutraalsed või inhibeerisid replikatsiooni toimumist, putukate rakkudes oli neil aga replikatsiooni efektiivsust võimendav mõju. Need andmed näitavad selgelt, et alfaviiruste replikaasikompleksi moodustamine imetaja- ja putukarakkudes ei toimu ühte moodi. Seetõttu on tervikliku pildi saamiseks vaja replikatsiooni (ja seda mõjutavaid mutatsioone) uurida mõlemas peremeesraku tüübis (Bartholomeeusen *et al.*, 2018).

### **1.3 RNA POLÜMERAAS I KASUTAMINE REPLITSEERUVA RNA MAATRITSI TOOTMISEKS**

CHIKV transreplikaasi uurimine näitas muu hulgas selgelt, et seni kasutatud replitseeruva RNA-maatriksi ekspressiooniks kasutatavad süsteemid omavad teatud puuduseid:

- T7 promooteril põhinev süsteem on kõrge tundlikkusega, kuid on rakendatav vaid kunstlikes rakuliinides, mis ekspresseerivad bakteriofaag T7 RNA polümeraasi. Paraku on selliseid liine vähe ja need ei kata kaugeltki alfaviiruste peremeesrakkude mitmekesisust.
- Raku RNA polümeraas II promooteril (nii CMV kui pUbi) põhinevad süsteemid on küll kasutatavad kõigis rakkudes, kus vastav promooter on aktiivne, kuid on T7 promooteril põhinevast süsteemist väiksema tundlikkusega. See tähendab seda, et markerite ekspressiooni aktiveerimine CHIKV replikaasi poolt on seal väiksem kui T7 süsteemis. SG (Gluc, Joonis 4) induktsioon jäi sõltuvalt rakutüübist 1000-5000 kordseks, mis on analüüsiks piisav. Paraku oli genoomse (Fluc, Joonis 4) markeri induktsioon madal (mõned korrad) või puudus üldse (Utt *et al.*, 2016).

Polümeraas II promooteril põhineva süsteemi väiksem tundlikkus ei tulenenud markerite madalamast ekspressioonitasemest, vaid hoopis kõrgemast foonist. Fooniks on siin markervalgu ekspressioonitase rakkudes, mida on transfitseeritud replitseeruvat RNA-d ekspresseeriva plasmidi ja inaktiivset replikaasi (nsP4 GDD motiiv vahetatud GAA vastu ekspresseeriva plasmidiga (Tomar *et al.*, 2006; Utt *et al.*, 2016). Jooniselt 4 on ka arusaadav, miks erinevad süsteemid ja erinevad markerid niiviisi käituvad:

- Gluc ekspressioon toimub eranditult replikaasi genereeritud SG RNA-delt, seepärast on aktiivse replikaasi puudumisel selle markeri aktiivsus väga madal.
- Fluc saab ekspresseeruda nii T7 või raku RNA polümeraas II sünteesitud RNA-delt kui ka viiruse replikaasi poolt juurde sünteesitud “genoomsetelt” RNA-delt. Järjestuselt on need RNA-d küll identsed, kuid T7 polümeraasi valmistatud RNA-d on *capeerimata* ja nende translatsioon rakkudes seetõttu ebaefektiivne (Fluc foon on madal). RNA polümeraas II sünteesitud transkriptid on *capeeritud* ja neid transleeritakse aktiivselt (tulemuseks on Fluc kõrge foon). Viiruse replikaas sünteesib *capeeritud* RNA-sid, mille translatsioon on oluliselt efektiivsem T7 polümeraasi transkriptide omast, kuid on sarnane RNA polümeraas II sünteesitud transkriptide omale. Sellest järeldubki, et T7 süsteemi puhul näeme peamiselt viiruse replikaasi poolt toodetud mRNA-delt toimuvat translatsiooni (st. kõrge Fluc tase on peamiselt replikaasi töö tulemus). RNA polümeraas II puhul on raku ja viiruse ensüümi toodetud mRNA-de translatsioon sarnane ja selle tulemuseks on replikaasi juuresolekul (erandiks on olukord, kui viiruse replikaas toodab RNA-sid oluliselt rohkem kui raku ensüüm) kas märkamatu või tagasihoidlik Fluc aktiivsuse tõus (Utt *et al.*, 2016).

Ülal toodust järeldub, et transreplikatsiooni süsteemi aktiivsust saab suurendada kui DNA plasmiidilt sünteesitavad ja hiljem viirus replikaasi poolt amplifitseeritavad RNA-maatritsid on *capeerimata* ja seetõttu halvasti transleeritavad. Selliseid RNA-sid saab rakus sünteesida RNA polümeraas I (ensüümi, mis sünteesib normaalselt ribosomaalseid RNA-sid) abil. See idee on alfaviiruse transreplikatsiooni süsteemi jaoks uudne, kuid on varem laialdast kasutust leidnud nii negatiivsete RNA genoomsete viiruste pöördgeneetikas kui ka nende viiruste põhise “*mini-replicon assay*” (põhimõtteliselt kujutab endast transreplikatsiooni süsteemi rakendatuna näiteks gripiviirusele) väljatöötamisel (Lee, 2014). Sellise süsteemi olemasolu oli alfaviiruse jaoks RNA polümeraas I põhineva süsteemi kavandamisel suureks abiks, sest võimaldas kasutada läbi proovitud promooter- ja terminaator elemente.

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 EESMÄRGID

Käesolev lõputöö on seotud meie laboris läbi viidava suuremahulise uurimisprojektiga, mille oluliseks osaks on alfaviiruste replikatsiooni uurimine putuka- ja selgroogsete peremeeste rakkudes. See võimaldas antud töö kavandamiseks kasutada varasemalt meie laboris läbi viidud katsete tulemusi ja kavandatud katsete teostamiseks varasemalt valmistatud töövahendeid ja optimeeritud katseprotokolle. Ka uurimiseks kasutatud viiruste valik põhines varasematel andmetel, mis näitasid, et CHIKV ja RRV on omavahel suhteliselt sarnased, samal ajal, kui SINV erineb nendest oluliselt. Nii oli teada, et RRV ja CHIKV replikaasid suudavad efektiivselt kasutada nii iseenda maatriitsit kui ka SINV maatriitsit ning et selline maatriitsite riskasutus ei ole retsiprookne, st. SINV replikaas ei suuda RRV ega CHIKV maatriitseid nii hästi kasutada. Ka oli teada, et nii CHIKV kui ka RRV replikaasid eelistavad kasutada oma maatriitsit, kuid suudavad mõnevõrra väiksema efektiivsusega kasutada “sugulasviiruse” oma. Sellised andmed tekitavad arvukalt küsimusi, näiteks milline viiruse replikaasi osa on vastutav SINV puhul täheldatud “ühesuunalise” käitumise eest? Mis osa viiruse ns liitvalgust määrab ära viiruse võime ära tunda ning kasutada erinevaid maatriitseid? Milline osa maatriitsist klappib kokku millise osaga replikaasist? Laboritingimustes võimaldab sellistele küsimustele vastuseid leida “*mix and match*” strateegia. Selle kasutamise eelduseks on aga võimalus lahutada replikaasid mitmeks funktsionaalseks osaks nii, et nad jääksid aktiivseks ja säilitaksid oma esialgsed omadused.

Sellest lähtuvalt olid käesoleva töö eesmärkideks:

1. Konstrueerida kõrge tundlikkusega maatriitsid, mille abil uurida erinevate alfaviiruste (CHIKV, SINV ja RRV) replikaaside aktiivsuseid.
2. Jagada alfaviiruste replikaasi ekspresseriv järjestus kaheks (P123 + nsP4) või kolmeks (nsP1 + P23 + nsP4) komponendiks ja uurida “mitmekomponentsete replikaaside” aktiivsuseid ja optimeerida nende kasutamine.
3. Uurida, kas mitmeks komponendiks jagatud replikaas omab sarnast maatriits-eelistust jagamata (ühe P1234 eelvalgu kujul ekspresseeritud) replikaasiga, st. kas jagatud replikaas säilitab oma maatriitsi-eelistuse või mitte.

Tööks vajalikud positiivsed kontrollid olid varem konstrueeritud CMV-P1234 plasmiidide näol olemas, samuti olid olemas negatiivsed kontrollid CMV-P1234<sup>GAA</sup> konstruktidele näol (Utt et al., 2016). Lisaks neile konstrueerisin iga viiruse kohta seitse täiendavat konstrukti.

## 2.2 MATERJAL JA METOODIKA

Käesolev bakalaureuse töö on valminud osana Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi ja Antwerpeni Troopilise Meditsiini Instituudi koostööprojektist. Töö on läbi viidud kahes laboris: rekombinantsete DNA-de konstrueerimise viisin läbi Tartus, valminud konstruktide esmase katsetamise, mille hulka kuulus töötavate kombinatsioonide leidmine ja nende toimimise optimeerimine, viisin läbi Antwerpenis. Valitud tulemused kontrollisin üle taas Tartus. Peale vajaliku kogemuse omandamise, tagas selline tööde jagamine ka seda, et kõik saadud tulemused on korratavad, st. efektid ei sõltu katse formaadist (Tartus kasutasin 12- ja Antwerpenis 96-auguse plaadi formaati) ja läbiviimise kohast. See on antud projekti jaoks äärmiselt oluline, sest siin kirjeldatud tulemustele ehitatakse ülesse järgnevate katsete plaanid. Siinkohal on vaja mainida, et läbiviidud töö oli eksperimentaalne ning selle käigus kasutasin kümneid standardseid ja originaalseid (meie laboris välja töötatud) meetodeid ning mitmeid variatsioone nendest. Lisaks, kuna kavandatud töö eesmärgiks oli uudsete töövahendite väljatöötamine ja nende kasutamise optimeerimine, kuuluvad mitmed minu poolt optimeeritud meetodid töö tulemuste hulka ja neid on seetõttu kirjeldatud vastavas alapunktis.

### 2.2.1 SÖÖTMED JA LAHUSED

Järgnevalt on väljatoodud erinevate koekultuuris kasutatud söötmete nimetused ja koostised:

- DMEM sööde: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium – low glucose*), 10% FCS (*Fetal calf serum*, vasika loote seerum),
- IMDM sööde: IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*), 10% FCS,
- Opti-MEM: Opti-MEM *Reduced Serum Media*, modifitseeritud variant *Eagle's Minimum Essential Media*'st

Lisaks nimetatud söötmetele kasutasin koekultuuris töötamisel ja sealt pärinevate materjalide analüüsil veel mitmeid lahuseid, puhvreid ja reagente mille toon välja järgnevalt:

- PLB: *Passive Lysis Buffer (Dual Luciferase Reporter Assay System*, Promega)
- *Stop and Glow* puhver (*Dual Luciferase Reporter Assay System*, Promega)
- LARII (*Dual Luciferase Reporter Assay System*, Promega)
- *50x Stop and Glow* substraat (*Dual Luciferase Reporter Assay System*, Promega)
- Lipofectamine LTX ja PLUS reagentid (Invitrogen)
- FuGENE reagent (FuGENE 6 reagent, Promega)

## 2.2.2 PLASMIIDIDE KONSTRUEERIMINE

Transreplikatsiooni süsteemi kasutamine on meie laboris üks peamiseid uurimismeetode, mistõttu olid minu töö alustamise hetkeks juba valminud RRV, CHIKV ja SINV metsiktüüpi jagamata replikaaside ekspressiooniplasmiidid (CMV-P1234-CHIKV, CMV-P1234-RRV ja CMV-P1234-SINV) ning vastavad kontrollid (CMV-P1234<sup>GAA</sup>-CHIKV, CMV-P1234<sup>GAA</sup>-RRV ja CMV-P1234<sup>GAA</sup>-SINV). Täiendavalt oli vaja konstrueerida kolme viiruse jaoks kokku 21 plasmiidi. Siin on lühidalt kirjeldatud erinevate plasmiidide konstrueerimise strateegiaid.

**P123 ekspressioonikonstruktide** konstrueerimisel kasutasin algplasmiididena CMV-P1234-CHIKV, CMV-P1234-RRV ja CMV-P1234-SINV plasmiide, millest eemaldasin PCR põhise mutageneesi ja subkloneerimise teel nsP4 valku kodeerivad järjestused. Saadud plasmiide nimetasin CMV-P123-CHIKV, CMV-P123-RRV ja CMV-P123-SINV.

**nsP1 ekspressioonikonstruktide** konstrueerimisel kasutasin algplasmiididena CMV-P1234-CHIKV, CMV-P1234-RRV ja CMV-P1234-SINV plasmiide, millest eemaldasin PCR põhise mutageneesi ja subkloneerimise teel nsP2, nsP3 ja nsP4 valke kodeerivad järjestused. Saadud plasmiide nimetasin CMV-nsP1-CHIKV, CMV-nsP1-RRV ja CMV-nsP1-SINV.

**P12<sup>CA</sup>3 ekspressioonikonstruktide** konstrueerimisel kasutasin algplasmiididena CMV-P123-CHIKV, CMV-P123-RRV ja CMV-P123-SINV plasmiide. Mutatsiooni, mis muudab nsP2 katalüütilise Cys478 jäägi Ala-jäägiks (CA), viisin nendest plasmiididest välja lõigatud fragmentidesse sisse PIPE-mutageneesi (*polymerase incomplete primer extension, polümeraasi mittetäielik primerekstensiooni mutageneesi*) kasutades. CA mutatsiooni sisaldava fragmendi viisin algplasmiidi sisse restriksiooni-põhise klonereimise teel. Saadud plasmiide nimetasin CMV-P12<sup>CA</sup>3-CHIKV, CMV-P12<sup>CA</sup>3-RRV ja CMV-P12<sup>CA</sup>3-SINV.

**P2<sup>CA</sup>3 ekspressioonikonstruktide** konstrueerimisel kasutasin algplasmiididena CMV-P12<sup>CA</sup>3-CHIKV, CMV-P12<sup>CA</sup>3-RRV ja CMV-P12<sup>CA</sup>3-SINV plasmiide, milles asendasin nsP1 valku kodeeriva ala ubikvitiini kodeeriva järjestusega kasutades selleks vastavaid sünteetilisi DNA fragmente (Genscript). Saadud plasmiide nimetasin CMV-ubiP2<sup>CA</sup>3-CHIKV, CMV-ubiP2<sup>CA</sup>3-RRV ja CMV-ubiP2<sup>CA</sup>3-SINV.

**nsP4 ekspressioonikonstruktide** konstrueerimisel kasutasin algplasmiididena CMV-P1234-CHIKV, CMV-P1234-RRV ja CMV-P1234-SINV plasmiide, milles asendasin nsP1, nsP2 ja nsP3 valke kodeeriva ala ubikvitiini kodeeriva järjestusega kasutades selleks vastavaid sünteetilisi DNA fragmente (Genscript). Saadud plasmiide nimetasin CMV-ubinsP4-CHIKV, CMV-ubinsP4-RRV ja CMV-ubinsP4-SINV.

**nsP4<sup>GAA</sup> ekspressioonikonstruktide** konstrueerimisel kasutasin algplasmiididena CMV-P1234<sup>GAA</sup>-CHIKV, CMV-P1234<sup>GAA</sup>-RRV ja CMV-P1234<sup>GAA</sup>-SINV plasmide, milles asendasin nsP1, nsP2 ja nsP3 valke kodeeriva ala ubikvitiini kodeeriva järjestusega kasutades selleks vastavaid sünteetilisi DNA fragmente (Genscript). Saadud plasmide nimetasin CMV-ubinsP4<sup>GAA</sup>-CHIKV, CMV-ubinsP4<sup>GAA</sup>-RRV ja CMV-ubinsP4<sup>GAA</sup>-SINV.

**RRV, CHIKV ja SINV replikaaside jaoks sobivate replitseeritavate RNA-de ekspresseerimiseks vajalikud plasmiidid konstrueerisin järgnevalt.** Järjestused, mis sisaldasid replikatsiooniks olulisi *cis*-elemente (viiruse genoomi otsad, SG promooter) eraldati üksteisest kahest restriksiooniensüümi äratundmise saidist koosnevate linker-regioonidega. Viirus-spetsiifilise järjestuse ette paigutati inimese RNA polümeraas I promooteri järjestus ja viirus-spetsiifilise järjestuse järgi 60-st A jäägist koosnev järjestus, hepatiit delta viiruse negatiivse ahela ribosüümi järjestus ning inimese RNA polümeraas I terminaatori järjestus. Kogu kassett (pikkus umbse 1000 aluspaari) telliti sünteetilise DNA-na, mis oli kloneeritud pUC57Kan plasmidi (Genscript). Nendesse plasmiididesse lisasin Fluc markerit kodeeriva ala (viiruse genoomi 5' regiooni ja SG promooteri vahele) ja Gluc markerit kodeeriva ala (SG promooteri ja viiruse genoomi 3'-regiooni vahele) kasutades selleks plasmiidist CMV-Fluc-Gluc välja lõigatud markervalkudele vastavaid DNA fragmente ja restriksiooni põhiste kloneerimist. Saadud plasmiidid nimetasin pUC57-Kan-Pol1HS-CHIKV-TempFG, pUC57-Kan-Pol1HS-RRV-TempFG ja pUC57-Kan-Pol1HS-SINV-TempFG.

### **PIPE mutageneesi**

CA mutatsiooni sisseviimiseks P123 ekspressioonikonstrukti kasutasin PIPE mutageneesi. Kuna ekspressiooniplasmiidid on ligikaudu 13 kbp pikkused, siis kombineerisin PIPE mutageneesi subkloneerimisega. Esimese sammuna kloneerisin P123 kodeerivad järjestused Bluescript KS (Stratagen) vektorisse. Selleks lõikasin CMV-P123-CHIKV, CMV-P123-RRV ja CMV-P123-SINV plasmide samade ensüümidega, millega Bluescript KS-vektorit kasutades 1 µl restriksiooniensüüme (*FastDigest*, Thermo Fisher Scientific) 1 µg DNA kohta. Seejärel kandsin P123 restriksiooniproduktid 0,8% agarosgeelile ning teostasin geelelektroforeesi. Geelelektroforeesi lõppedes lõikasin agarosgeelist välja õige pikkusega fragmendid ning puhastasin need Zymogen *Gel DNA Purification Kit*-ga. KS-vektorile lisasin peale restriksiooni ensüümide veel 1 µl FastAP-i (aluseline fosfataas), et vältida vektori iseeneslikku tagasiligeerumist. Sellisel viisil töödeldud DNA puhastasin Zymogen PCR *Clean Kit*-ga. Seejärel ligeerisin vektori ja inserdi kokku kasutades T4 ligaasi (Invitrogen). Reaktsioon toimus toatemperatuuril 2 tunni jooksul. Ligatsioonisegu kasutasin *E. coli* XL-10 rakkude transformeerimiseks kuumašoki meetodil. Üleskasvanud kolooniatest kasvasin DNA eraldamiseks miniprepid, mida puhastasin FavorPrep *Plasmid Extraction Mini Kit*-ga.

Edasi kasutasin saadud KS-P123 konstrukte maatriksina PIPE PCR reaktsioonil. Ensüümiks oli Thermo Fisher Scientific Phusion polümeraas. Reaktsioonisegu sisaldas vastavat puhvrit (HF + 5% DMSO) dNTP substraate ning praimereid. Praimerid olid kavandatud nii, et nende sulamistemperatuur jäi vahemikku 72-80 °C ning praimerite 5' otsad, mis sisaldasid muteeritavat koodonit, kattusid omavahel 15 nukleotiidi võrra. Kasutasin järgmiseid reaktsioonitingimusi:

1. Denaturatsioon: 98 °C, 1 minut
2. Denaturatsioon: 98 °C, 15 sekundit
3. Praimerite seondumine: 66 – 72 °C, 15 sekundit
4. Süntees: 72 °C, 2 minutit ja 30 sekundit

Etappe 2-4 korrati 5 korda

5. Denaturatsioon: 98 °C, 15 sekundit
6. Praimerite seondumine: 70 – 72 °C, 15 sekundit
7. Süntees: 72 °C, 2 minutit ja 30 sekundit

Seda tsüklit korrati 20 korda.

Kuna praimerite seondumiseks oli vaja kasutada temperatuuri gradienti, siis viidi iga PIPE reaktsioon läbi kaheksas järjestikuses tuubis. Soovitud PCR produkti olemasolu kontrolliti agaros-geelelektroforeesil, positiivsete proovide (kus oli näha oodatud PCR produkt ja puudusid täiendavad DNA fragmendid) DNA puhastati Zymogen PCR *Clean and Concentration Kit*-ga, töödeldi *Dpn I* ensüümiga, puhastati uuesti ning kasutati koheselt (ilma ligatsioonita) bakterite transformeerimiseks. Soovitud mutatsioone sisaldavad fragmendid, milles puudusid täiendavad mutatsioonid, viisin taasi esialgsesse ekspressiooniplasmiidi.

### **Bakterirakkude transformeerimine kuumašoki meetodil**

Rakutüvena oli kasutusel *Escherichia coli* tüvi XL-10. Rakkude transformeerimiseks kasutasin kuumašoki meetodit:

1. Tuubid, mis sisaldasid kompetentseid rakke, paigutasin 15 minutiks jääle.
2. Lisasin ligatsioonisegule (või PIPE PCR produktile) 120 µl kompetentseid rakke, inkubeerisin segu jääs 30 minutit.
3. Teostasin kuumašoki hoides transformatsioonisegu 120 sekundit 42 °C juures.
4. Inkubeerisin segu jääs 2 minutit.
5. Lisasin rakkudele taastumiseks 800 µl SOC (SOB + 40% glükoos, suhe 1 ml :10 µl) söödet ja inkubeerisin proove 45 minutit 37 °C juures.
6. Kandsin rakud sobivat antibiootikumi sisaldavatele SOY-agar plaatidele.
7. Plaatide inkubeerisin 37 °C juures üleöö.

## Plasmiidide puhastamine

Saadud plaatidelt valisin sobiva arvu kolooniaid, mille külvasin välja vastavat antibiootikumi sisaldavasse SOY söötmesse (3 ml). Vedelkultuure kasvasin loksutil üleöö 37 °C juures. Seejärel puhastasin plasmiidse DNA FavorGen *Plasmid Extraction Mini Kit*-ga ja kontrollisin proovide õigsust restriksiooniga. Kui proovid olid restriksiooni analüüsi järgi õiged, saatsin nad vajaduse korral ka sekveneerimisele Eesti Biokeskuse Tuumiklaborisse. Õiget plasmidi sisaldavatest bakteritest kasvasin üleöö kultuurid kasutades 50 ml SOY söödet. Nendest puhastasin plasmiidse DNA kasutades Machery Nagel *Endo-free Midipreps Kit*-i. Kõik puhastatud DNA lahustasin *endo-free* vees. Plasmiidide kontsentratsioonid mõõtsin NanoDrop spektrofotomeetri abil ning saadud DNA kvaliteeti hindasin agaros-gellelektroforeesi abil.

### 2.2.3 EKSPERIMENTIDE LÄBIVIIMINE KOEKULTUURIS

Eksperimendid koekultuuris viisin läbi kasutades U2OS (inimese osteosarkoomi epiteelkoe päritolu rakud) ja HEK293 (inimese embrüonaalsed neerurakud) rakke ja erinevaid lipiidseid transfektsioonireagente. Täpsemalt, 12-augusel plaadil kasvavaid U2OS rakke transfekteerisin Lipofectamine LTX reagenti abil. Selleks, et oleks võimalik korraga analüüsida suuremat arvu maatriitse ja replikaaside kombinatsioone, viisin katsed Antwerpenis läbi ka mikrotiiter-plaadil HEK293 rakkude ning FuGENE reagentiga.

#### Transfektsioon Lipofectamine LTX reagentiga 12-augusel plaadil

U2OS rakke kultiveerisin IMDM söötmes. Transfektsiooni protokoll oli järgmine:

- Kõigepealt eemaldas rakkudelt vana söötme ning lisas 800 µl värsket IMDM söödet.
- Järgnevalt oli vaja kokku segada rakkudesse viidavad DNA-d. Selleks võtsin 1 µg igat konstrukti ning viisin selle mahu veega 10 µl-ni. Ekspressiooni tingimuste optimeerimisel DNA kogused muutusid, kuid kasutatud mahud jäid samaks.
- Edasi lisas 60 µl Opti-MEM söötmele 10 µl DNA-d ja 1 µl PLUS reagenti (Invitrogen).
- Eraldi tuubis segasin kokku segu, kus iga proovi kohta oli arvestatud 60 µl Opti-MEM'i ja 3,5 µl Lipofectamine LTX reagenti (Invitrogen).
- Lisas segust (Opti-MEM + Lipofectamine reagent) 63,5 µl kaupa segu DNA + Opti-MEM + PLUS reagent segule. Segasin hoolikalt ja inkubeerisin proove 5 minutit toatemperatuuril.
- Tilgutasin reaktsioonisegud rakkudele ning inkubeerisin rakke 16-18 h 37 °C juures.

### **Transfektsioon FuGENE reagentiga 96-augusel plaadil**

96-augusel plaadil kasvavate HEK293 rakkude transfektsiooniks kasutasin FuGENE reagenti (Promega). Kõik transfektsioonid viisin alati läbi kolmes paralleelis. Lähtuvalt koostööpartnerite varasemast kogemusest võtsin 3 µl FuGENE reagenti 1 µg DNA kohta. Sellest vahekorras lähtudes arvutasin igale transfektsioonile sobivad FuGENE kogused. Transfektsiooni protokoll (tooduna ühe proovi kohta) nägi välja järgmine:

- Segasin kokku vajalikud DNA-d (algselt 50 ng iga plasmidi transfektsiooni kohta, optimeerimise käigus kogused varieerusid) ning viisin reaktsioonisegu mahu Opti-MEM-iga 100 µl-ni.
- Teise tuubi lisasin vajaliku koguse FuGENE reagenti ning viisin mahu Opti-MEM-iga 100 µl-ni.
- Segasin DNA ja Opti-MEM segu kokku FuGENE + Opti-MEM seguga.
- Inkubeerisin 15 minutit, misjärel lisasin reaktsioonisegule 200 µl söödet, segasin.
- Eemaldas rakkudelt söötme ning tõstin valmistatud reaktsioonisegust (400 µl) kolme auku igaühete 100 µl segu.
- Inkubeerisin transfitseeritud rakke 37 °C juures 16-18 tundi.

### **Lutsiferaaside aktiivsuse mõõtmine.**

Kõik siin töös kasutatud RNA maatriksid sisaldasid Fluc ja Gluc reportergeene. Gluc on sekreteeritav valk ja seega saab selle aktiivsust mõõta ka otse rakkude söötmest. Siiski osutus praktilisemaks Fluc ja Gluc aktiivsuste järjestikune mõõtmine rakkude lüsaadist kasutades *Dual-Luciferase Reporter Assay System kit-i* (Promega), sama firma toodetud luminomeetrit ja alljärgnevat protokollit.

- Eemaldas rakkudelt söötme, pesin rakke fosfaatpuhverdatud soolalahusega, panin peale lüüsipuhvri (1x PLB) ja loksutasin plaati 15 minutit.
- Tegin valmis vajaliku koguse Stop & Glow reagenti: Stop & Glow puhver + vajalik kogus 50x substraati
- Võtsin 4 µl rakkude lüsaati, lisasin 20 µl LARII lahust ja mõõtsin Fluc aktiivsuse.
- Lisasin proovile 20 µl Stop & Glow lahust ja mõõtsin Gluc aktiivsuse.

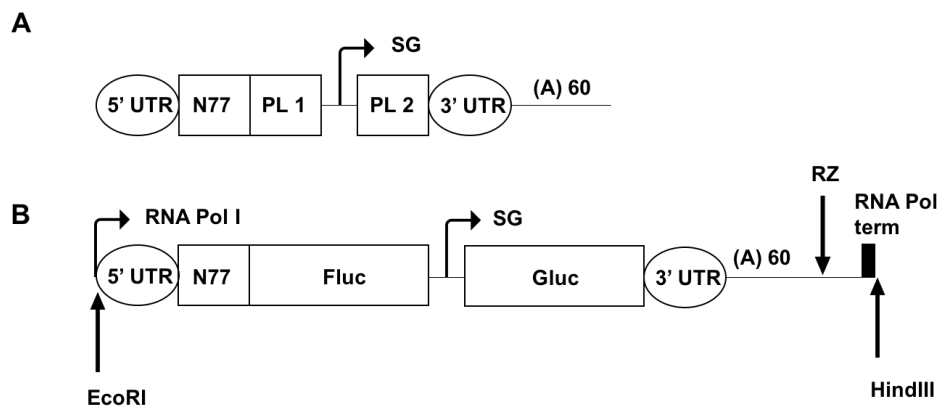
## 2.3 TULEMUSED JA ARUTELU

### 2.3.1 EKSPERSSIOONIKONSTRUKTIDE KAVANDAMINE

#### Replikatsiooni-kompetentse RNA maatriksi ekspressiooniplasmiidi kavandamine.

Lähtudes varem kasutatud CHIKV transreplikaasi maatriksi ehitusest (Joonis 4) ja CHIKV genoomi 5' otsa sekundaarstruktuurist (Andrew Tuplin, laboritevaheline suhtlus) pandi replitseeruvad RNA maatriksid kokku järgnevatest elementidest (Joonis 5):

1. 307 nukleotiidi genoomi 5' otsast (RRV ja CHIKV) või 401 nukleotiidi genoomi 5'-otsast (SINV). Selle lõigu erinev pikkus erinevatel viirustel tuleneb konserveerunud juuksenõela struktuuride erinevast paiknemisest. Sellesse järjestusse kuulub kogu 5' UTR ja nsP1 valku kodeeriva regiooni algus (CHIKV puhul esimesed 77 koodonit).
2. Polül linker 1, koosneb kahest restriktsoonienäsi äratundmissaidist (*ApaI* ja *PacI*).
3. SG promooter ja geenidevaheline mittekodeeriv ala (CHIKV puhul ulatab see järjestus positsioonist -78 kuni +69 SG RNA stardisaidi suhtes).
4. Polül linker 2, koosneb kahest restriktsoonienäsi äratundmissaidist (*NotI* ja *BglII*).
5. Viiruse 3' UTR-i viimased 110 nukleotiidi,
6. 60 järjestikkust A jääki,



**Joonis 5. A:** maatriksi toorik (kassett). N77: nsP1 valku kodeeriva regiooni esimesed 77 koodonit; PL – polül linker; A(60): 60 järjestikkust A jääki. **B:** RNA polümeraas I promooteri ja terminaatori kontrolli alla pandud RNA maatriksit ekspresseeriv kassett. Fluc: *Firefly* lutsiferaasi reportergeen; Gluc: *Gaussia* lutsiferaasi reportergeen; RZ: hepatiit delta viiruse ribosüüm. Järjestuse alguses ning lõpus on vastavalt unikaalselt *EcoRI* ja *HindIII* restriktsoonisaidid.

Nendest järjestustest koosnev kassett paigutati inimese RNA polümeraas I promooteri kontrolli alla nii, et viiruse genoomi esimene nukleotiid paikneb promooteri stardisaidis (Joonis 5). Selle tulemusena läks promooterist kaduma stardisaidist allpool paiknev järjestus, samas on gripiviiruse pöördgeneetika süsteemis seesugust lähenemist edukalt kasutatud. Kasseti järgi paigutati hepatiit delta viiruse negatiivse ahela ribosüüm nii, et selle poolt

katalüüsitud lõikamine toimuks polü(A) järjestuse viimase nukleotiidi järgi. Ribosüümist 3' suunda paigutati inimese RNA polümeraas I terminaatori järjestus. Vastavalt eelnevalt meetodite osas välja toodule kloneeriti polülinter 1 järjestusse Fluc markerit kodeeriv regioon. Kloneerimine viidi läbi nii, et nsP1 N-terminaalne ots ja Fluc ekspresseeruksid ühe liitvalguna. Polülinterisse 2 kloneeriti Gluc markerit kodeeriv järjestus. Kogu kasseti ette paigutati unikaalne restriksiooniensüümi äratundmise sait (*Eco* RI), teine unikaalne restriksiooniensüümi äratundmise sait paigutati kasseti järele (*Hind* III). Sellise kavandamise tulemusena koosnesid kõik loodud konstruktid kolmest moodulist:

- I. Promooter - 5' regioon - Fluc
- II. SG promooter - Gluc
- III. 3' UTR- polü(A)-ribosüüm - terminaator.

Seejuures on mooduleid eraldavad restriksiooniensüümide äratundmise saidid kõikides konstruktidest samad ja unikaalsed. Selline modulaarne ülesehitus võimaldab tulevikus hübriidsete maatriksite (näiteks maatriks, kus esimene moodul pärineb SINV-lt ja kaks ülejäänut CHIKV-lt) konstrueerimist restriksioonipõhise kloneerimise abil.

#### **nsP4 ja P2<sup>CA</sup>3 ubikvitiin-*fusion*ite kavandamine**

Alfaviiruste nsP2, nsP3 ja nsP4 ei moodustu individuaalsete initsieerimiste, vaid liitvalgu proteolüütilise protsessimise tulemusena. Seega ei alga need valgud metioniini jäägist: CHIKV puhul on nsP2 esimeseks aminohappe jäägiks Gly, nsP3 puhul Ala ja nsP4 puhul Tyr jääk. Nende asendamine muude aminohappe jääkidega või täiendava N-terminaalse aminohappe jäägi lisamine (näiteks initsiaatorsest koodonist tuleneva Met lisamine) muudab drastiliselt viiruse valkude funktsioone (Das *et al.*, 2014). Lihtsaim viis ekspresseerida autentse N-otsaga valke on kasutada ubikvitiin-*fusion* tehnoloogiat. Selleks liidetakse ekspresseeritava valgu N-terminusse ubikvitiini järjestus (76 aminohappe jääki) ja ekspresseeritakse see *fusion*-valgu, näiteks ubi-nsP4 kujul. Raku ensüümid tunnevad valgu N-otsas paikneva ubikvitiini ära ja eemaldavad selle. Protsess on äärmiselt kiire ja täpne (eemaldamine toimub ubikvitiini viimase aminohappe jäägi järel toimuva lõikamise tulemusena) ja sellisel moel saadakse autentse N-otsaga alfaviiruse valk.

#### **Cys478 vahetamine Ala vastu nsP2 valgus**

Cys478 on nsP2 proteaasi aktiivtsentris paiknev katalüütiline aminohappe jääk, selle asendamine Ala jäägiga blokeerib täielikult ensüümi proteaasse aktiivsuse. Selline mutatsioon viiduna P1234 liitvalgu välistab nsP4 vabanemise ja replikatsioonikompleksi moodustumise (Rausalu *et al.*, 2016). Viies mutatsiooni P123 valgu on selle toime sama (blokeerib P123 lõikamise), kuid efekt replikatsioonile teistsugune. Nimelt, kui nsP4 valgu toota eraldi konstruktilt, saavad P12<sup>CA</sup>3 ja nsP4 moodustada funktsionaalse varajase replikaasi kompleksi.

See sünteesib küll eelistatult negatiivseid RNA-sid, kuid on võimeline sünteesima ka positiivseid ahelaid. Kolmekomponentses replikaasis on CA mutatsioon P23 liitvalgus absoluutselt vajalik. Nimelt kontrollib nsP1 valk P123 stabiilsust ja koos sellega ka replikatsioonikomplekside moodustamist, täpsemalt selle P123 küljest lahti lõikamise kiirust. See on suhteliselt aeglane protsess ja on näidatud, et selline viivitus on alfaviirusele absoluutselt vajalik (Lulla *et al.*, 2018; Vasiljeva *et al.*, 2003). P23 (millel nsP1 osa puudub) on aga äärmiselt ebastabiilne ja see lõigatakse koheselt valmis nsP2 ja nsP3 valkudeks. Seega on nsP1+P23+nsP4 ko-ekspressioon samaväärne nelja valmis nsP valgu ekspressiooniga. Hästi on teada, et sellisel juhul need neli valku funktsionaalset replikaasi ei moodusta (Vasiljeva *et al.*, 2003). Küll aga on näidatud, et nsP1+P2<sup>CA</sup>3+nsP4 ko-ekspressioon käivitab sfäärulite moodustumise ja RNA sünteesi (Hellström *et al.*, 2017). Sellest ja eelmises peatükis kirjeldatust järeldub, et kolmest komponendist koosnev replikaasi ekspressiooniks on vaja nsP1, ubiP2<sup>CA</sup>3 ning ubi-nsP4 valke tootvaid plasmide.

### 2.3.2 KAHEKOMPONENTSE P123+NSP4 NING P12<sup>CA</sup>3+NSP4 REPLIKAASIDE AKTIIVSUSE ANALÜÜS

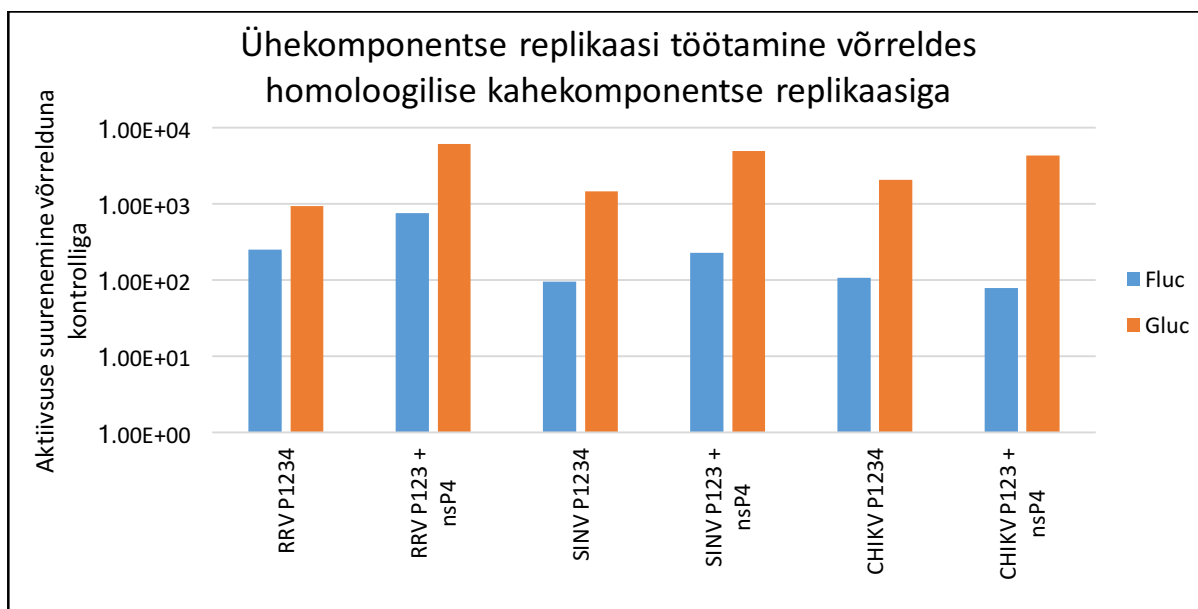
Kuigi katsed viidi läbi ekspressiooniplasmiididega on lihtsuse mõttes siin ja edaspidi kasutatud ainult nende plasmiidide produktide (valgud, RNA maatriks) nimetusi. Peale konstruktide valmistamist oli esimese sammuna vaja kontrollida, kas kõik konstruktid töötavad. Selleks koostasın katseplaani, mis sisaldas homoloogilisi kombinatsioone P123 ja nsP4 valkudest (Tabel 1) ja võrdlesin selliste kombinatsioonide tekitatud aktiivsust jagamata P1234 liitvalgust moodustuva (edaspidi: ühekomponentne) replikaasi omaga.

**Tabel 1. Kasutatud homoloogiliste maatriksite ning replikaaside kombinatsioonid.**

| RNA maatriks        | Replikaas                                 | Katse tüüp            |
|---------------------|-------------------------------------------|-----------------------|
| SINV, CHIKV või RRV | P1234                                     | Positiivne kontroll   |
|                     | P1234 <sup>GAA</sup>                      | Negatiivne kontroll 0 |
|                     | P123 + ubi-nsP4                           | Katse 1               |
|                     | P123 + ubi-nsP4 <sup>GAA</sup>            | Negatiivne kontroll 1 |
|                     | P12 <sup>CA</sup> 3 + nsP4                | Katse 2               |
|                     | P12 <sup>CA</sup> 3 + nsP4 <sup>GAA</sup> | Negatiivne kontroll 2 |

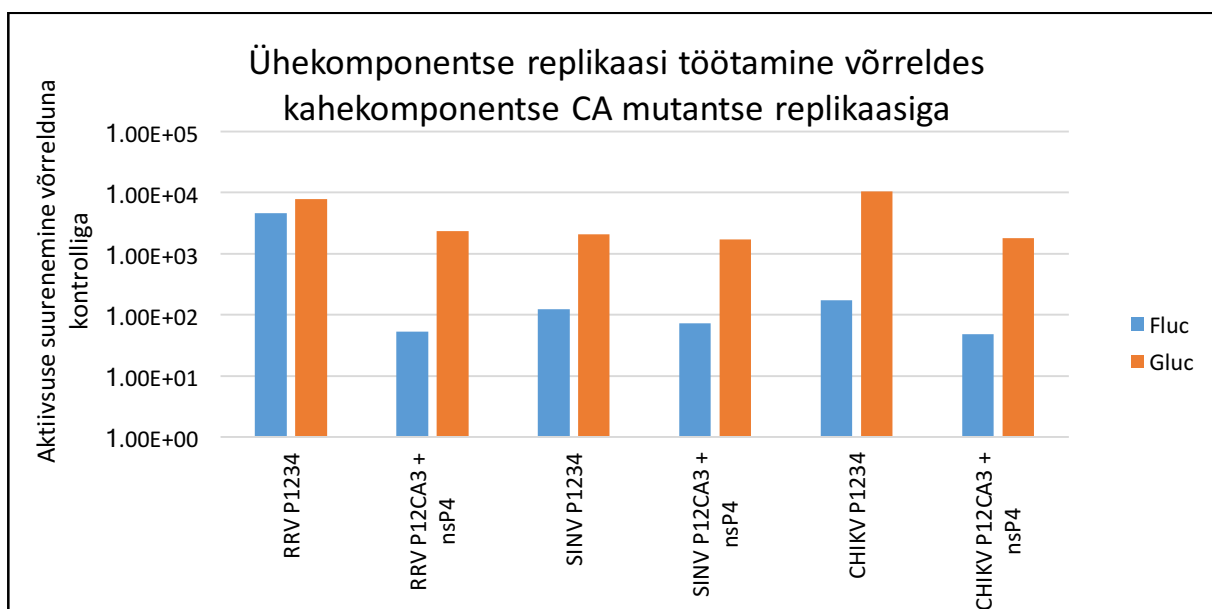
Esimese kontrollkatse viisin läbi 12-auguses formaadis kasutades U2OS rakke. Valik U2OS rakkude kasuks põhines sellel, et CHIKV transreplikaas on neis rakkudes väga aktiivne (Utt *et*

al., 2016), lisaks on neid rakke nende kiire poolestusaja tõttu lihtne kasutada. Saadud tulemused näitasid, et kahe eraldi komponendina ekspresseeritud (edaspidi: kahekomponentne) P123 + nsP4 replikaas omab ligikaudu sama suurt aktiivsust kui vastav ühekomponentne replikaas (Joonis 6). Seega võib loodud süsteemi pidada efektiivseks ja usaldusväärseks.

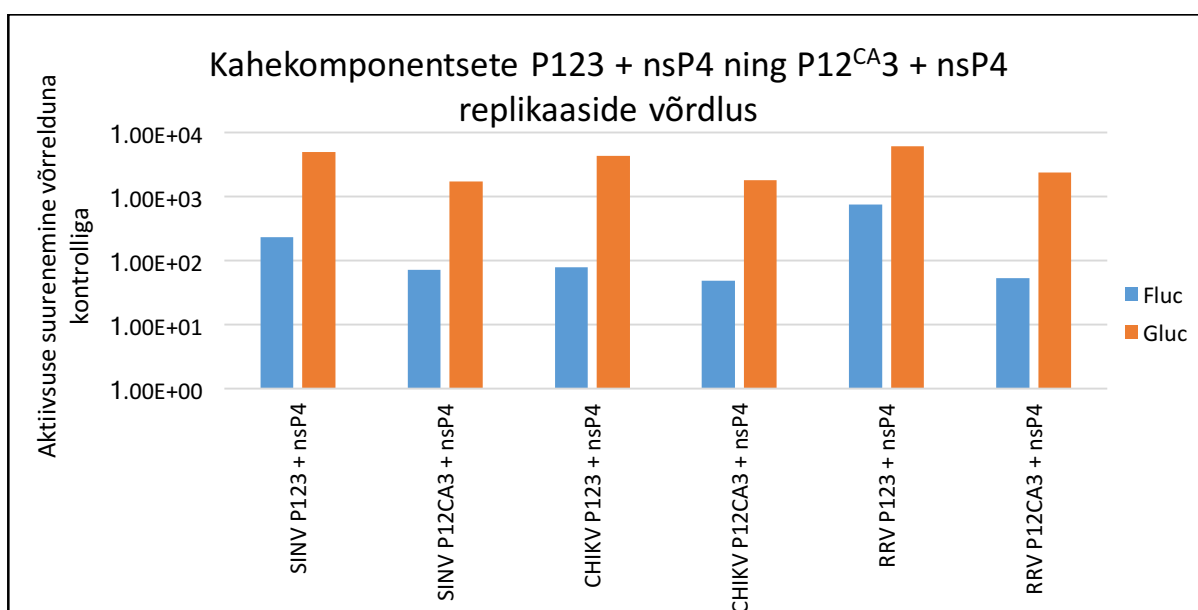


**Joonis 6.** Kolme alfaviiruse ühekomponentse replikaasi efektiivsus võrrelduna sama viiruse kahekomponentse replikaasi (homoloogilised replikaasi ja RNA maatriksi kombinatsioonid) aktiivsusega. Katses on kasutatud võrdsetes kogustes plasmide. Fluc ja Gluc aktiivsused on normaliseeritud vastavatele kontrollidele (P1234<sup>GAA</sup> ühekomponentse ja P123+nsP4<sup>GAA</sup> kahekomponentse replikaasi tarvis).

Teises kontrollkatses analüüsisin mutantse kahekomponentse P12<sup>CA3</sup> + nsP4 replikaasi aktiivsust. Katse tulemustest selgus, et ka P12<sup>CA3</sup> + nsP4 replikaas on funktsionaalne (Joonis 7). Kui P123 + nsP4 kahekomponentse replikaasi puhul (Joonis 6) oli näha, et kahekomponentne replikaas töötas enamikel juhtudel isegi paremini kui ühekomponentne, siis P12<sup>CA3</sup> + nsP4 replikaaside puhul olid saadud tulemused natuke teistsugused (Joonis 7): kuigi sellised replikaasid töötavad hästi, on nende aktiivsused madalamad kui ühekomponentsetel replikaasidel. Seda vahet on paremini näha joonisel 8. Seega näitavad saadud tulemused, et P12<sup>CA3</sup> replikaasi komponent on funktsionaalne. Sellest järeldasin, et CA mutatsiooni on võimalik kasutada nsP1, nsP4 ja P2<sup>CA3</sup> valkude kujul ekspresseeritava (edaspidi : kolmekomponentse) replikaasi loomiseks.



**Joonis 7.** Kolme alfaviiruse kahekomponentsete P12<sup>CA3</sup> + nsP4 replikaaside efektiivsused võrrelduna vastavate ühekomponentsete P1234 replikaaside efektiivsustega. Katsed on läbi viidud sarnaselt joonisel 6 kujutatud katsetele.



**Joonis 8.** P123 + nsP4 ning P12<sup>CA3</sup> + nsP4 replikaaside aktiivsuste võrdlus. Fluc ja Gluc aktiivsused on normaliseeritud P123 + nsP4 puhul P123 + nsP4<sup>GAA</sup> ning P12<sup>CA3</sup> + nsP4 puhul P12<sup>CA3</sup> + nsP4<sup>GAA</sup> suhtes.

Kokkuvõtlikult näitas läbiviidud analüüs, et kahekomponentne replikaas omab head aktiivsust nii P123 kui ka P12<sup>CA3</sup> konstruktide kasutamise puhul. Olulisi erinevusi erinevate viiruste vahel ei täheldatud ja kõik analüüsitud konstruktid on sobivad töövahendid edaspidiseks kasutamiseks.

### Kahekomponentse replikaasi koostisosade optimaalse vahekorra määramine

P1234 protsessingul moodustuvad P123 ja nsP4 kindlas vahekorras. Kuna need on ühe ja sama liitvalgu lõikamise produktid, siis moodustavad nad omavahelise kompleksi suhteliselt

kergesti. On selge, et kahekomponentse replikaasi puhul toimub interaktsioon P123 ja nsP4 vahel *in trans*. Lisaks võimaldab see süsteem replikaasi komponentide omavahelise vahekorra muutmist. Sellest tulenevalt esitasime küsimused: milline on kahekomponentse replikaasi puhul P123 ja ubi-nsP4 valke ekspresseerivate plasmiidide optimaalne vahekord? Milline komponent neist kahest on kriitiline? Nendele küsimustele vastuse leidmiseks teostasin komponentide “sisse-titreerimise” katse.

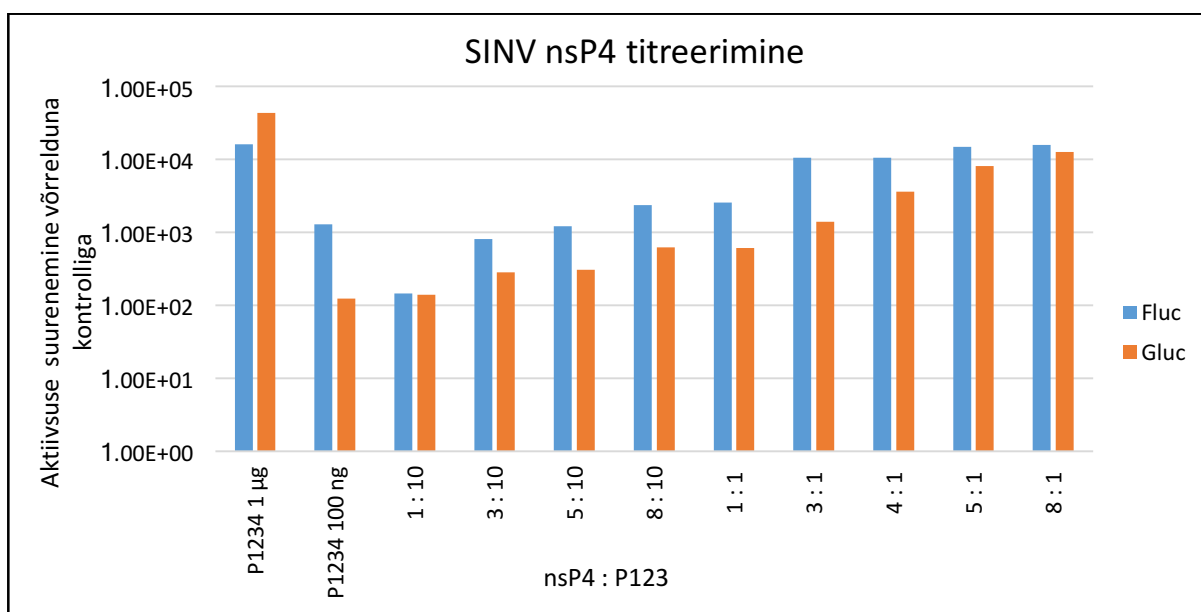
Alfaviiruste infektsioonitsükklis on nsP4 valgu hulk teiste ns valkude omast oluliselt väiksem. Sellest lähtudes alustasin neid katseid nsP4 sisse-titreerimisest ehk siis hoidsin maatriksi ning P123 hulga konstantse ja katsetasin süsteemi töötamist suurendades nsP4 hulka. Kuna viisin nsP4 koguse üsnagi kõrgele (nsP4 : P123 plasmiidide vahekord oli kuni 8 : 1), siis pidin rakkude kahjustamise vältimiseks vähendama kasutatud plasmiidide koguseid (Tabel 2).

**Tabel 2. nsP4 titreerimiskatses kasutatud nsP4 : P123 suhted.** Kasutatud plasmiidide kogused on toodud ng transfektsiooni kohta. Molaarse vahekorra määramisel on arvestatud CMV-P123 ja CMV-ubinsP4 erinevaid molekulaarmasse.

| nsP4 : P123 (100 ng) molaarne vahekord | CMV-ubinsP4 ekspressiooniplasmiidi hulk transfektsiooni kohta |
|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 1 : 10                                 | 7 ng                                                          |
| 3 : 10                                 | 31 ng                                                         |
| 5 : 10                                 | 54 ng                                                         |
| 8 : 10                                 | 78 ng                                                         |
| 1 : 1                                  | 100 ng                                                        |
| 3 : 1                                  | 259 ng                                                        |
| 4 : 1                                  | 418 ng                                                        |
| 5 : 1                                  | 576 ng                                                        |
| 8 : 1                                  | 735 ng                                                        |

Taas olid katse tulemused kõigi kolme viiruse puhul praktiliselt identsed ja seetõttu on siin näitena ära toodud SINV puhul saadud tulemused (Joonis 9). RRV ja CHIKV jaoks saadud tulemused on toodud kui Lisad 1 ja 2. Saadud tulemused näitavad selgesti, et kahekomponentse replikaasi aktiivsus suureneb nsP4 hulga suurenedes. On tõenäoline, et üks hetk võib nsP4 hulk saavutada taseme, millest edasi replikatsiooni efektiivsus enam ei tõuse. Samas peaks see vahekord olema suurem kui P123 : nsP4 vahekord 1 : 8, mis oli siin kasutatud vahekordadest suurim. On huvitav märkida, et 100 ng P123 komponenti + 735 ng nsP4 komponenti annab praktiliselt sama aktiivsuse, mis saavutati 1 µg P1234 kasutamisel.

Neid tulemusi võib pidada loogiliseks, kui võtta arvesse, et nsP4 on ebastabiilne valk ja et selle suurem kogus kompenseerib valgus osalist degradeerumist. Samuti on nsP4 replikaasi katalüütiline subühik, seega võib eeldada, et sünteesitud RNA hulk on proportsioonis nsP4 hulgaga.



**Joonis 9. Sindbis viiruse nsP4 titreerimine kahekomponentse replikaasi süsteemis.** Positiivseks kontrolliks on P1234 (1 µg ja 100 ng). Negatiivseks kontrolliks on P1234<sup>GAA</sup>, mille suhtes on teised tulemused normaliseeritud.

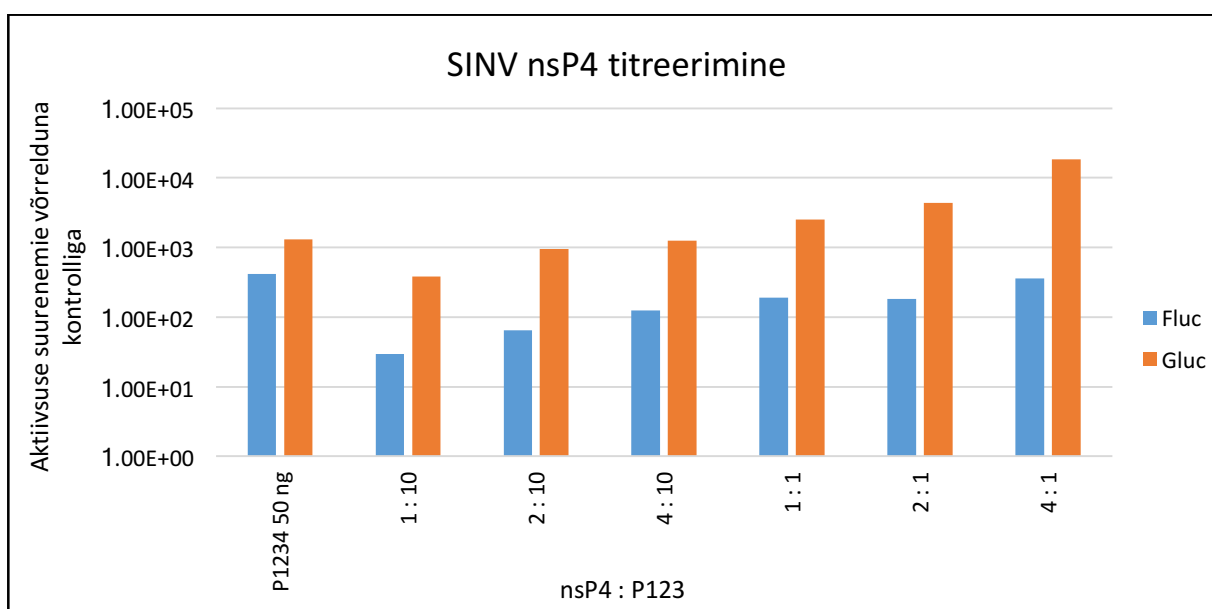
Järgnevalt kordasime sama katse HEK293 rakkudel, mida kasvasin ja analüüsisin mikrotiiter formaadis. Selleks katseks kasutatud plasmiidide kogused (plaadi ühe augu kohta) ja P123 : nsP4 suhted on välja toodud Tabelis 3. Nagu ka 12-augusel plaadil tehtud katses, olid ka siin P123 ning RNA maatriksi kogused konstantsed (50 ng kumbagi plasmidi 96-augusel plaadi iga augu kohta).

**Tabel 3. 96-augusel plaadil kasutatud plasmiidide ja FuGENE reagenti kogused.** Vasakpoolses veerus on toodud nsP4 : P123 suhe ning nsP4 ekspresiooniplasmidi kogus. Keskmisses veerus on toodud kogu katses kasutatud DNA hulk (maatriks 50 ng + P123 50 ng + nsP4 x ng) ja parempoolses veerus kasutatud FuGENE reagenti hulk.

| nsP4 (ng) : P123 (konst. 50 ng)                           | DNA hulk ühe augu kohta | FuGENE  |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------|---------|
| Pos. kontroll: temp (50 ng)+ P1234 (50 ng)                | 100 ng                  | 0,3 µl  |
| Neg. kontroll: temp (50 ng)+ P1234 <sup>GAA</sup> (50 ng) | 100 ng                  | 0,3 µl  |
| 1 (5 ng) : 10                                             | 105 ng                  | 0,32 µl |

|                |        |         |
|----------------|--------|---------|
| 2 (10 ng) : 10 | 110 ng | 0,33 µl |
| 4 (20 ng) : 10 | 120 ng | 0,36 µl |
| 1 (50 ng) : 1  | 150 ng | 0,45 µl |
| 2 (100 ng) : 1 | 200 ng | 0,6 µl  |
| 4 (200 ng) : 1 | 300 ng | 0,9 µl  |

Nagu võis eeldada, andis mikrotiiter formaadis läbiviidud SINV nsP4 titreerimine eelneva katsega sarnased tulemused (võrdle Joonis 9, 10). Taas olid CHIKV ning RRV puhul saadud tulemused sarnased SINV jaoks saadutega ja on seetõttu ära toodud lisades (vastavalt Lisad 3 ja 4).



**Joonis 10. Sindbis viiruse nsP4 koguse optimeerimine P123 suhtes mikrotiiter formaadis.** Selles katses on positiivseks kontrolliks 50 ng P1234 ekspressiooniplasmiidi.

Seega, võttes arvesse kõiki nsP4 titreerimisel saadud tulemusi, tuleb järeldada, et alfaviiruse RNA sünteesi aktiivsust limiteerivaks faktoriks on nsP4 kogus: kõik minu poolt läbi viidud katsed näitasid üheselt, et mida kõrgem on nsP4 kontsentratsioon transfektsioonisegus, seda kõrgema lutsiferaaside signaali (replikatsiooni efektiivsuse) saame. Tuleb ka arvestada, et eelpool kirjeldatud katsetes olid P123 ning RNA maatriksi kontsentratsioonid konstantsed. Seega ei saa ma välistada võimalust, et kõrgem P123 kontsentratsioon võiks ühes kõrgema nsP4 kontsentratsiooniga anda veelgi suurema replikatsiooni efektiivsuse, st. võttes rohkem kõiki komponente saame suurema aktiivsuse. Üsna tõenäoliselt see nii ongi. Samas ei ole see praktikas kuigi hästi kasutatav lahendus, sest rakud ei talu sisse viidava plasmiidse DNA hulga olulist suurendamist. Seega sunnivad saadud tulemused pigem minema veelgi rohkem

süvitsi kahekomponentse replikaasi kasutamise optimeerimisega. Seetõttu viisingi järgnevalt läbi P123 hulga optimeerimise katsed. Esialgu on need teostatud vaid 12-auguse plaadi formaadil.

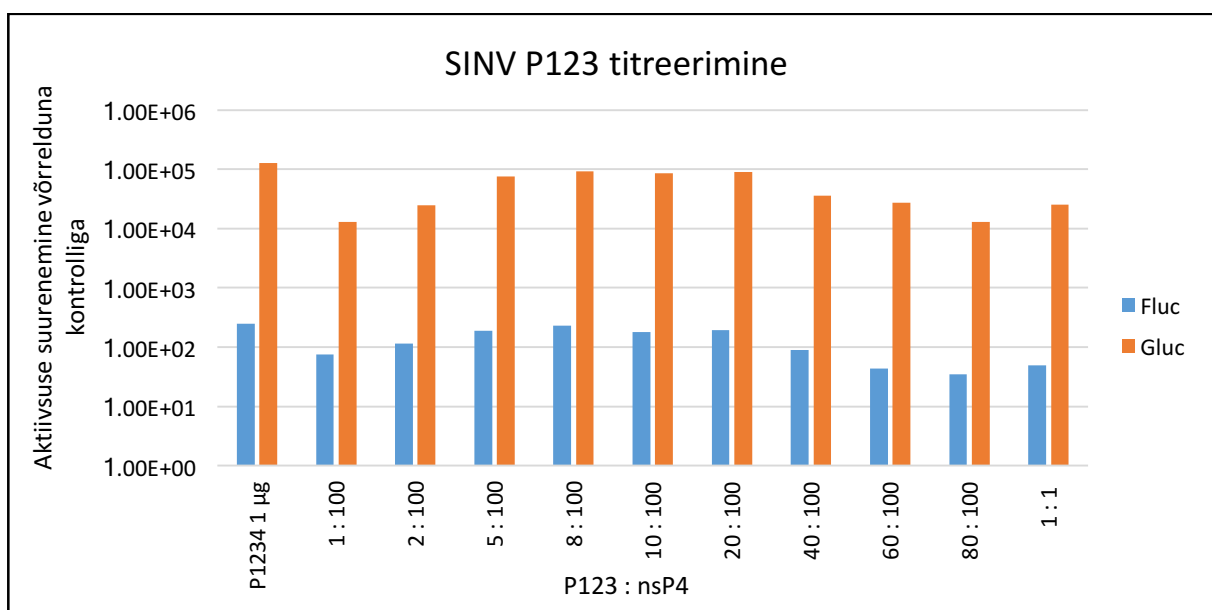
Nagu ka nsP4 optimeerimise puhul valisin hulga erinevaid P123 : nsP4 plasmiidide omavahelisi suhteid alates 0,1 : 10 kuni 1 : 1. Suhtest 1 : 1 ma edasi ei läinud, sest mitmed sellised vahekorrad olid eelmistes katsetes (Joonis 9, 10) juba läbi proovitud. Tabelis 4 on välja toodud optimeerimiskatses kasutatud P123 : nsP4 ekspressiooniplasmiidide vahekorrad ning neile vastavad P123 kogused.

**Tabel 4. P123 titreerimiskatses kasutatud P123 : nsP4 ekspressiooniplasmiidide suhted (vasakpoolne veerg).** Parempoolses veerus on toodud vastava suhte saavutamiseks kasutatud P123 plasmidi kogus ng-des. RNA maatriksit kodeeriva plasmidi hulk hoiti konstantsena (1 µg iga 12-augulise plaadi augu kohta).

| P123 : nsP4 suhe | P123 kogus (ng) 1 µg nsP4 kohta |
|------------------|---------------------------------|
| 0,1 : 10         | 10 ng                           |
| 0,2 : 10         | 20 ng                           |
| 0,5 : 10         | 50 ng                           |
| 0,8 : 10         | 80 ng                           |
| 1 : 10           | 100 ng                          |
| 2 : 10           | 200 ng                          |
| 4 : 10           | 400 ng                          |
| 6 : 10           | 600 ng                          |
| 8 : 10           | 800 ng                          |
| 1 : 1            | 1000 ng                         |

Valitud plasmiidide kogused (võrdle Tabel 2) olid selles katses suuremad kui nsP4 plasmidi tiitrimise puhul. See tulenes sellest, et me ei soovinud, et katsetes tekiks nsP4 puudujääk (eelnevast oli juba teada, et see mõjutab oluliselt replikatsiooni efektiivsust, joonised 9 ja 10). P123 optimeerimisel pidasin silmas ka seda, et ehkki P123 koostisesse kuuluvatele valkudele kuulub küll palju olulisi ja asendamatu ülesandeid, on need seotud RNA sünteesi ettevalmistamise (initsieerimine) ja RNA-de modifitseerimisega (*capeerimine*), kuid mitte sünteesi enda läbiviimisega. Samuti on P123 produktid nsP4-ga võrrelduna oluliselt stabiilsemad (Varjak *et al.*, 2010; Kiiver *et al.*, 2008).

SINV P123 titreerimisel saadud tulemused on toodud joonisel 11. Kuna CHIKV ja RRV P123 titreerimisel saadud tulemused on väga sarnased on need ära toodud Lisades 5 ja 6.



**Joonis 11. SINV P123 titreerimise tulemused.** Kõik tulemused on normaliseeritud P1234<sup>GAA</sup> suhtes. Antud katses on positiivse kontrollina kasutatud 1 µg SINV P1234 ekspressiooniplasmiidi.

Võrreldes jooniseid 9, 10 ja 11 on näha, et P123 koguse suurendamisel tekib võrreldes nsP4 koguse suurendamisega hoopis teistsugune pilt. Esiteks, puudub selge korrelatsioon P123 koguse ja replikatsiooni aktiivsuse vahel. Pigem on näha “kellakujulist” (*bell-shaped*) kõverat. Kahekomponentse replikaasi aktiivsus saavutab maksimaalse, kontrolliga (P1234 1 µg) võrdse taseme kui P123 ja nsP4 suhe on 0,8 : 10 (80 ng P123 plasmiidi + 1 µg nsP4 plasmiidi). Põhimõtteliselt võib väita, et alates suhtest 0,5 : 10 kuni suhteni 2 : 10 on replikatsiooni efektiivsus väga sarnane, kuid hakkab alates suhtest 4 : 10 vähenema. See tähendab, P123 suurem hulk hakkab RNA sünteesi takistama: nähtus, mida nsP4 hulga suurendamisel ei ilmnenud. Kui neid tulemusi vaadata nsP4 poolt on nad tegelikult eelmistele katsetele väga sarnased: replikatsiooni efektiivsus on maksimaalne tasemel, kus nsP4 ja P123 suhe on 5-20 kordselt nsP4 kasuks. Täpsemalt, kombineerides erinevate optimeerimise katsete tulemused võin järeldada, et replikatsiooni signaali tugevuse alusel on optimaalne P123 : nsP4 suhe 1 : 10. Samas pole see ilmtingimata edasiste katsete läbiviimiseks ideaalne, sest, nagu näha joonistelt 8 ja 9, ületab sellise vahekorraga kombinatsiooni efektiivsus võrreldava koguse positiivse kontrolli oma. Kindlasti on olukordi, kus maksimaalse efektiivsuse kasutamine võib tulemuse saamiseks olla kriitiline (näiteks juhtudel, kui aktiivsused jäävad katse tundlikkuse piirimaile). Samas võib süsteemi liigne aktiveerimine omada soovimatuid kõrvalmõjusid. Sellest lähtuvalt võib järgnevate katsete algpunktiks kasutada komponentide (RNA maatriksi, nsP4 ja P123) loomulikku 1 : 1 : 1 vahekorda (SINV ja CHIKV) ning kahekordselt suurendatud nsP4 hulga 1 : 1 : 2 vahekorda

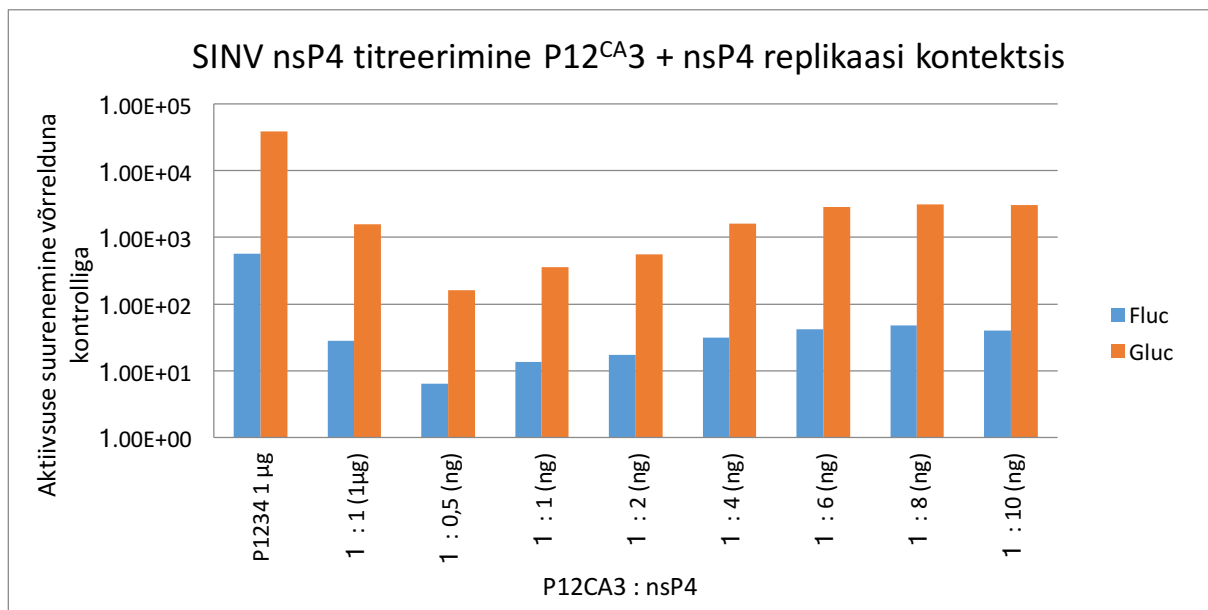
(RRV), mis tagab ühekomponentsele replikaasile sarnase aktiivsuse. nsP4 plasmidi hulka võib suurendada vaid juhtudel, kui katse tundlikkus peaks olema ebapiisav.

Lisaks “metsikut tüüpi” P123 ja nsP4 suhte optimeerimisele viisin analoogse katse läbi ka P12<sup>CA3</sup> mutantseid liitvalke kasutades. Siin lähtusin eeldusest, et P123 + nsP4 replikaasile on ka siin replikatsiooni efektiivust limiteerivaks faktoriks nsP4 ja kavandasin vastavalt katses kasutatavate komponentide kogused (Tabel 5).

**Tabel 5. nsP4 titreerimiskatses kasutatud nsP4 : P12<sup>CA3</sup> suhted.** Kasutatud plasmiidide kogused on toodud ng-des transfektsiooni kohta. CMV-P12<sup>CA3</sup> kogus transfektsiooni kohta oli 100 ng välja arvatud \* märgistatud proovis, kus see oli 1 µg. Molaarse vahekorra määramisel on arvestatud CMV-P12<sup>CA3</sup> ja CMV-ubinsP4 erinevaid molekulaarmasse.

| <b>P12<sup>CA3</sup> (konst) : nsP4 molaarne vahekord</b> | <b>CMV-ubinsP4 ekspressiooniplasmidi hulk transfektsiooni kohta</b> |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 1* : 1 (mikrogramm-skaalal)                               | 1 µg                                                                |
| 1 : 0,5 (nanogramm-skaalal)                               | 50 ng                                                               |
| 1 : 1                                                     | 100 ng                                                              |
| 1 : 2                                                     | 200 ng                                                              |
| 1 : 4                                                     | 400 ng                                                              |
| 1 : 6                                                     | 600 ng                                                              |
| 1 : 8                                                     | 800 ng                                                              |
| 1 : 10                                                    | 1000 ng                                                             |

Taas sain kõigile kolmele viirusele sarnased tulemused (Joonis 12, Lisad 7 ja 8). Nagu näha jooniselt 12, avaldub ka mutantset P12<sup>CA3</sup> komponenti sisaldava replikaasi puhul sarnane pilt nagu P123 sisaldava replikaasi puhul. Jällegi annab nsP4 hulga suurendamine kõrgema aktiivsuse. Alates suhtest 1 : 4 nsP4 hulga suurendamine olulist täiendavat efekti enam ei anna. P12<sup>CA3</sup> + nsP4 optimeerimise tulemusi silmas pidades jõudsin järeldusele, et ka neid plasmide kasutaksin edaspidi samades vahekordades nagu ka P123 ja nsP4 plasmide, milleks on (maatriks : P12<sup>CA3</sup> : nsP4) 1 : 1 : 1. Maksimaalse efektiivsuse saamiseks on sobivaks vahekorraks 1 : 1 : 6.



**Joonis 12. Sindbis viiruse nsP4 titreerimine kahekomponentse replikaasi süsteemis P12<sup>CA3</sup> komponendi suhtes.** Positiivseks kontrolliks on P1234 (1 µg ja 100 ng). Negatiivne kontroll on P1234<sup>GAA</sup>, mille suhtes on teised tulemused normaliseeritud.

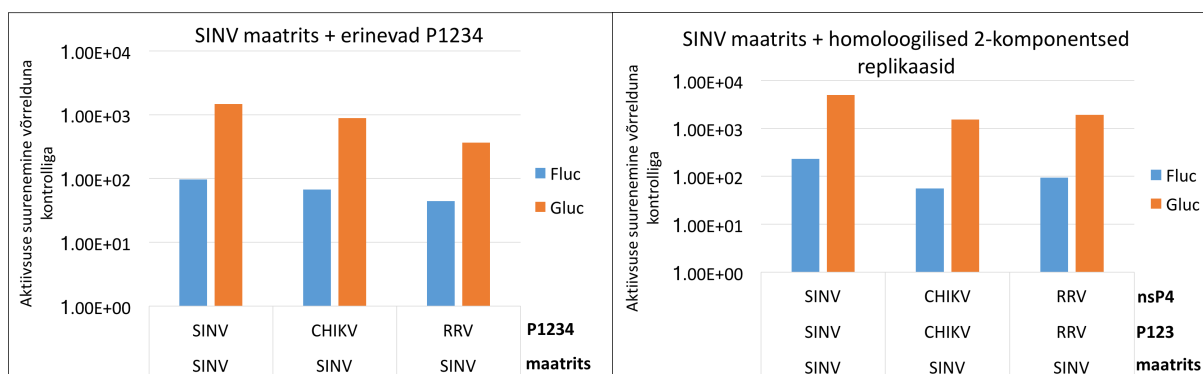
### 2.3.3 KAHE- JA ÜHEKOMPONENTSED REPLIKAASID OMAVAD SAMA MAATRITS-SPETSIIFILISUST

Järgmiseks eesmärgiks oli kontrollida, kas kahekomponentne replikaas omab samasugust RNA maatriks-eelistust nagu ühekomponentne replikaas. Nagu on ülal näidatud (Joonis 6), kasutavad jagatud replikaasid efektiivselt oma maatriksit, kuid kas on säilinud ka maatriksite “ühesuunaline ristkasutamine”? Selle uurimiseks kasutasin maatriks : nsP4 : P123 komponente vahekorras 1 : 1 : 1 (RRV puhul 1 : 2 : 1) ja viisin vastavad katsed läbi mikrotiiter-plaadi formaadis kolmes korduses. Tulemuseks võtsin kolmikkatse keskmise (*average* Excel’is) ning katseid kordasin kahel korral.

Tulemuste korduvuse tagamiseks tegin kõigepealt segud P123 + nsP4 kombinatsioonidest. Eraldi tuubi lisasin maatriksi, millele lisasin Opti-MEM söödet, kuni segu kogumaht oli 100 µl ning siis pipeteerisin sinna vajaliku koguse P123 + nsP4 segu. Kõik kogused olid arvestatud nii, et igasse mikrotiiter plaadi auku läks 50 ng maatriksit, 50 ng P123 ning 50 ng (CHIKV ja SINV) või 100 ng (RRV) nsP4 ekspressiooniplasmiidi. Ühekomponentse replikaasiga teostatud kontrollkatsetes kasutasin 50 ng RNA-maatriks- ja 50 ng P1234 ekspressiooniplasmiidi augu kohta.

## CHIKV ja RRV ühe- ja kahekomponentsed replikaasid kasutavad SINV maatriitsit

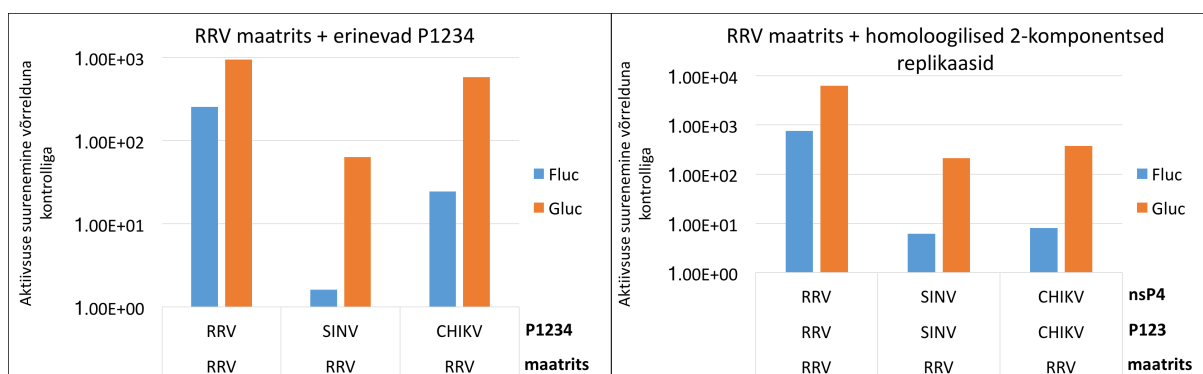
Paljude alfaviiruste replikaasid suudavad kasutada SINV RNA maatriitsit (meie labori avaldamata andmed). Minu poolt läbi viidud kontrollkatse ühekomponentse replikaasiga kinnitas seda tulemust (Joonis 13, vasak paneel). Väga sarnased tulemused sain ka kahekomponentseid replikaase kasutades (Joonis 13, parempoolne paneel). Ehkki SINV replikaas on nii ühe- kui ka kahekomponentse variandi puhul kõige efektiivsem, suudavad ka CHIKV ja RRV replikaasid aktiveerida SINV maatriitsi replikatsiooni (Fluc ekspressiooni) kuni 100-kordselt ning transkriptsiooni (Gluc ekspressioonis) isegi 1000- ja enam kordselt (Joonis 13). Taas näitas see katse ka seda, et optimeeritud kahekomponentsete replikaaside efektiivsus on ühekomponentse replikaasiga võrreldav (Joonisel 13 toodud näitel isegi parem).



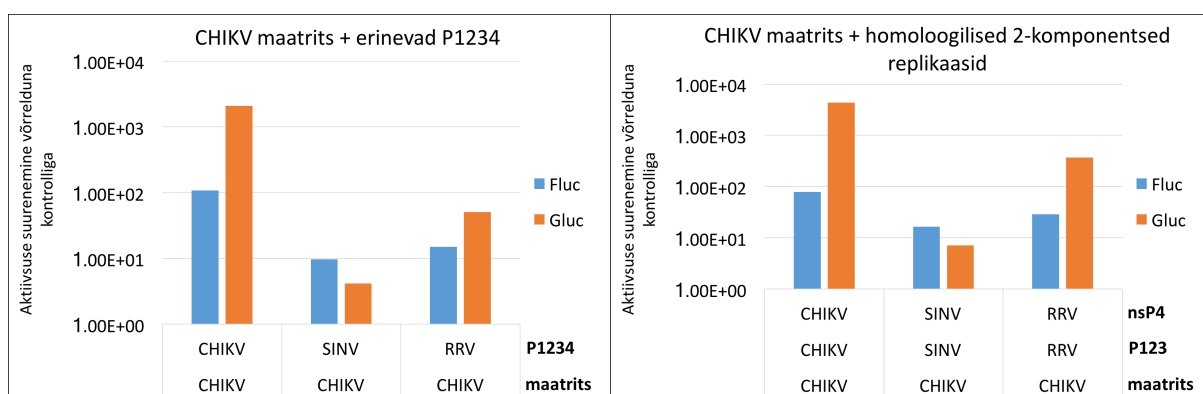
**Joonis 13. SINV, CHIKV ja RRV ühe- (vasak paneel) ja kahekomponentsed (parem paneel) replikaasid kasutavad efektiivselt SINV maatriitsi.** Tulemused normaliseeritud vastavate P1234<sup>GAA</sup> replikaaside suhtes.

## SINV ühe- ja kahekomponentsed replikaasid kasutavad CHIKV ja RRV maatriitseid ebaefektiivselt

Järgnevalt analüüsisin ühe- ja kahekomponentsete replikaaside võimet kasutada RRV maatriitsit. Ka siin on näha, et kahekomponentsed replikaasid suudavad RRV maatriitsit kasutada sama hästi kui ühekomponentsed (Joonis 14). Selgeks erinevuseks on, et kui SINV maatriitsi puhul suutsid kõigi kolme viiruse replikaasid seda efektiivselt kasutada, siis RRV maatriitsil on näha, et SINV replikaas nii hästi RRV maatriitsit ei kasuta. Välja võib tuua ka asjaolu, et nii ühe- kui kahekomponentne SINV replikaas annab RRV maatriitsi puhul äärmiselt madala Fluc signaali (genoomne RNA), mis näitab, et täispikkade genoomsete RNA-de süntees on eriti ebaefektiivne. Kahtluseta võib öelda, et kõige paremini kasutab RRV maatriitsit RRV enda replikaas. CHIKV replikaas jääb efektiivsusest kahe eelpool nimetatud vahele (Joonis 14). Väga sarnane on olukord ka CHIKV maatriitsi puhul, ainus erinevus seisneb selles, et siin on maatriitsi kasutamise efektiivsus kõige suurem CHIKV replikaasil, seejärel RRV ning viimaks SINV replikaasil (Joonis 15).



**Joonis 14. RRV maatriksi kasutamine RRV, SINV ja CHIKV ühe- (vasak paneel) ja kahekomponentsete (parem paneel) replikaaside poolt.** Tulemused normaliseeritud vastavate P1234<sup>GAA</sup> replikaaside suhtes.



**Joonis 15. CHIKV maatriksi kasutamine CHIKV, SINV ja RRV ühe- (vasak paneel) ja kahekomponentsete (parem paneel) replikaaside poolt.** Tulemused normaliseeritud vastavate P1234<sup>GAA</sup> replikaaside suhtes.

Kokkuvõtlikult näitavad saadud tulemused selgelt, et kõigi uuritud viiruste ühe- ja kahekomponentsed replikaasid kasutavad efektiivselt “oma” RNA maatriksit. Teadmata põhjusel on SINV RNA maatriks sobilik ka CHIKV ja RRV replikaasidele, samal ajal, kui SINV replikaas kasutab nende viiruste RNA maatrikse ebaefektiivselt. Küll aga suudavad CHIKV ning RRV replikaasid kasutada arvestatava efektiivsusega teineteise RNA maatrikse. Kuna CHIKV ning RRV on omavahel lähedamalt suguluses, kui seda on SINV ja RRV või SINV ja CHIKV, siis võib sellest järeldada, et lähedamalt suguluses olevad viirused suudavad üksteise maatrikseid paremini kasutada. Nagu on selgesti näha joonistel 13-15 toodud andmetest, ei muuda SINV, RRV ega CHIKV replikaaside lahutamine kaheks komponendiks nende maatriks-spetsiifilisust. See näitab, et kahekomponentne replikaas on edaspidistes uurimustes sobiv töövahend. Muu hulgas võimaldab see uurida ning mõista nii iseseisvate kui ka liitvalkude koostisesse kuuluvate replikaasi valkude funktsioone ning seeläbi saada ka üldisem pilt replikaasi liitvalgu kui terviku ülesannetest. Osa küsimusi, millele saame neid töövahendeid kasutades vastuseid leida, tulenevad otseselt ülal kirjeldatud tulemustest.

Näiteks saame me nüüd uurida, kas funktsionaalset replikaasi on võimalik kokku panna erinevatelt viirustelt pärinevatest komponentidest (näiteks SINV P123 + CHIKV nsP4) ja kui see osutub võimalikuks, siis kindlaks teha kas maatriks-spetsiifilisuse määrab ära replikaasi P123 või nsP4 osa või on mõlemad võrdselt olulised.

#### 2.3.4 KOLMEKOMPONENTNE REPLIKAAS ON FUNKTSIONAALNE SINV JA CHIKV PUHUL, KUID RRV PUHUL OMAB MINIMAALSET AKTIIVSUST

Kahekomponentne replikaas omab sama suurt aktiivsust kui ühekomponentne ning et replikaasi ekspressioonivektorite jagamine P123 (või  $P12^{CA3}$ ) ning nsP4 valke ekspresseerivateks osadeks ei oma mõju replikaasi maatriks-spetsiifikale. Seega oli töö järgmiseks loogiliseks etapiks jagada P123 nsP1 +  $P2^{CA3}$  osadeks ning kontrollida sellise kolmekomponentse replikaasi töötamist. Vastava katse viisin läbi U2OS rakkudes 12-auguse plaadi formaati kasutades. Selles katses kasutatud konstruktid ja kontrollid toon välja Tabelis 6.

**Tabel 6. Kolmekomponentse replikaasi kontrollkatses kasutatud komponendid.** Vasakpoolses veerus on toodud katse skeem, keskmises kasutatud maatriks(id) ning parempoolses replikaas või replikaasi komponendid. Positiivse ja negatiivse kontrolli puhul kasutasin vastavalt P1234 või  $P1234^{GAA}$  replikaase (maatriks : replikaas suhtes 1 : 1). Kõikides katsetes võeti iga komponenti 1 µg.

|                           | Maatriks         | Replikaas                      |
|---------------------------|------------------|--------------------------------|
| Positiivne kontroll (1:1) | SINV, CHIKV, RRV | SINV, CHIKV, RRV P1234         |
| Negatiivne kontroll (1:1) | SINV, CHIKV, RRV | SINV, CHIKV, RRV $P1234^{GAA}$ |
| SINV (1:1:1:1)            | SINV             | SINV nsP1 + $P2^{CA3}$ + nsP4  |
| CHIKV (1:1:1:1)           | CHIKV            | CHIKV nsP1 + $P2^{CA3}$ + nsP4 |
| RRV (1:1:1:1)             | RRV              | RRV nsP1 + $P2^{CA3}$ + nsP4   |

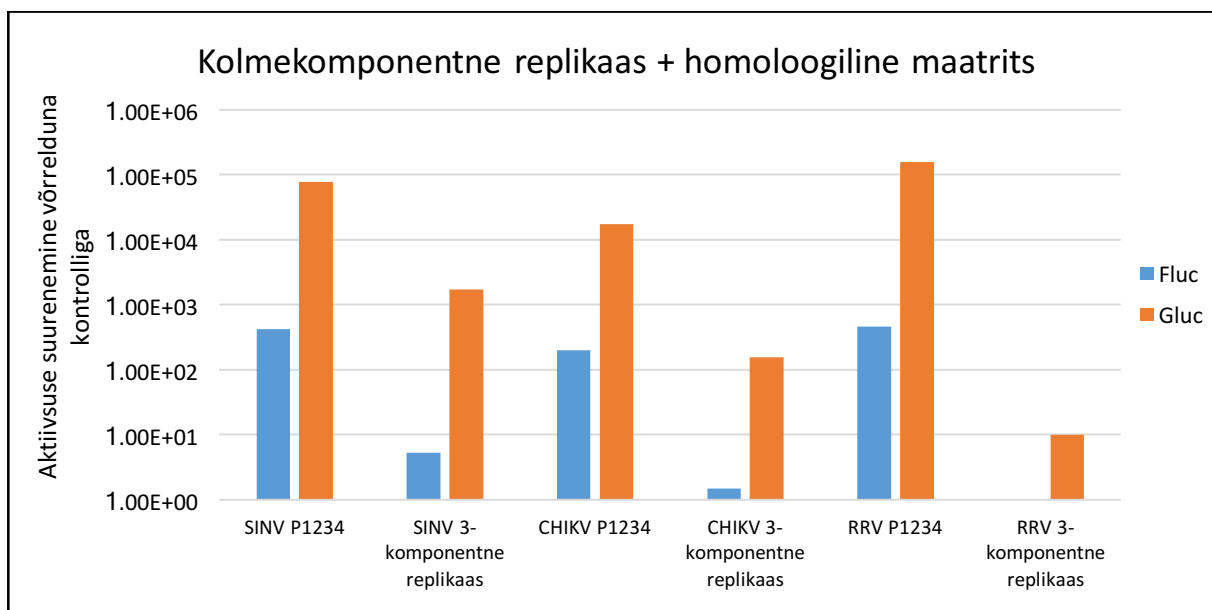
Jooniselt 16 on näha, et kahel juhul kolmest on kolmekomponentne replikaas töövõimeline. Täpsemalt:

- SINV kolmekomponentne replikaas omab küll ühekomponentsest replikaasist mõnevõrra madalamat aktiivsust, kuid on ikkagi suure aktiivsusega.
- CHIKV puhul on kolmekomponentse replikaasi aktiivsus selgelt madalam kui SINV puhul. Osalt võib CHIKV kolmekomponentse replikaasi väiksem (SINV replikaasiga

võrreldes) aktiivsus tuleneda sellest, et ka SINV ühekomponentne replikaas on CHIKV omast aktiivsem (Joonis 16).

- Ehkki RRV ühekomponentne replikaas on SINV omast isegi aktiivsem, omab RRV kolmekomponentne replikaas vaid minimaalset aktiivsust.

Kuna samad tulemused saadi ka korduskatses on ilmne, et erinevalt kahekomponentsetest replikaasidest, mis on kõigil kolmel viirusel sarnaste omadustega, on nende kõigi kolmekomponentsed replikaasid selgelt erinevate aktiivsustega.



**Joonis 16. Alfaviiruste kolmekomponentsete replikaaside efektiivsused erinevad oluliselt üksteisest.** Positiivne kontroll on iga viiruse jaoks ühekomponentne replikaas. Kõik tulemused on normaliseeritud vastava viiruse negatiivse kontrolli (P1234<sup>GAA</sup>) suhtes.

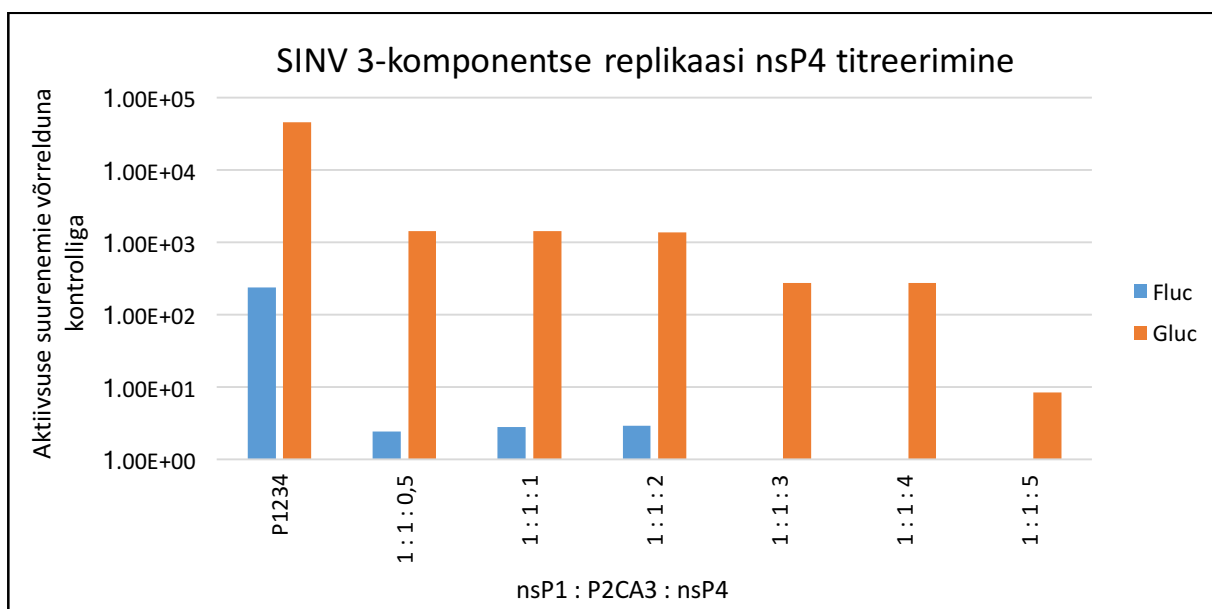
### Kolmekomponentse replikaasi optimeerimine

Jooniselt 16 on näha, et replikatsiooni (Fluc ekspressiooni) aktiveerimine kolmekomponentse replikaasi poolt on kas väga madal või puudub hoopis. Ka transkriptsiooni aktivatsioon on CHIKV puhul tagasihoidlik ja RRV-l sellest veelgi madalam. Arvestades asjaolu, et kahekomponentse replikaasi aktiivsust oli võimalik nsP4 valguga suurendamisega ligi 100-kordselt tõsta (Joonis 9, 10) ei lugenud ma ei Fluc aktiivsuse mõõtmisi ega RRV kolmekomponentse replikaasi kasutamist perspektiivituks. Seetõttu oli järgmiseks sammuks kolmekomponentse replikaasi kasutamise optimeerimine. Siin lähtusin kahekomponentse replikaasi optimeerimisel saadud tulemustest, mis selgelt näitasid, et replikaasi aktiivsust limiteerib nsP4 hulk. Sellest lähtudes kokkupanud katse skeem on välja toodud Tabelis 7.

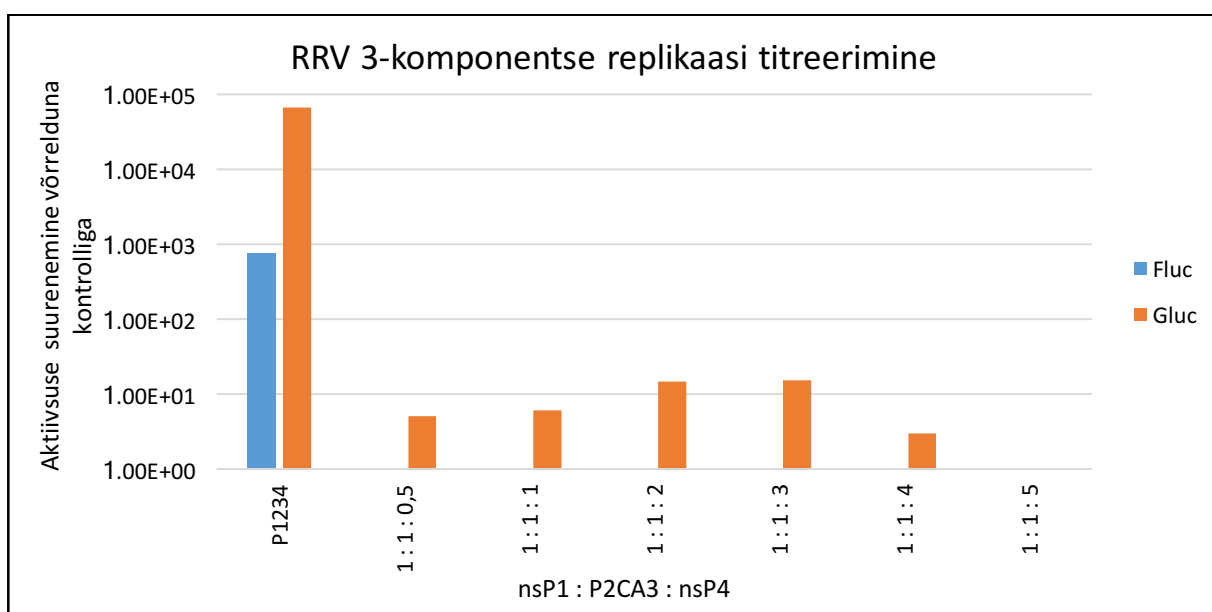
**Tabel 7. Kolmekomponentse replikaasi optimeerimine.** Positiivse kontrollina kasutasin alati vastavat ühekomponentset replikaasi ning negatiivse kontrollina P1234<sup>GAA</sup> replikaasi. RNA maatriksi, nsP1 ja P2<sup>CA</sup>3 hulk oli läbi katse alati konstantselt 1 µg.

|                     | nsP1 : P2 <sup>CA</sup> 3 : nsP4 | nsP4 kogus |
|---------------------|----------------------------------|------------|
| Positiivne kontroll | P1234 (1 µg)                     | -          |
| Negatiivne kontroll | P1234 <sup>GAA</sup> (1 µg)      | -          |
| SINV, CHIKV, RRV    | 1 : 1 : 0,5                      | 0,5 µg     |
|                     | 1 : 1 : 1                        | 1 µg       |
|                     | 1 : 1 : 2                        | 2 µg       |
|                     | 1 : 1 : 3                        | 3 µg       |
|                     | 1 : 1 : 4                        | 4 µg       |
|                     | 1 : 1 : 5                        | 5 µg       |

Katse viisin läbi 12-augusel plaadil U2OS rakkudes. Katse tulemused olid kõigi kolme viiruse puhul väga sarnased ja näitasid, et erinevalt kahekomponentsest replikaasist annab kolmekomponentse replikaasi optimeerimine vaid vähest, kui üldse, efekti. Nii näitas SINV kolmekomponentse replikaasi titreerimine, et nsP4 hulga suurendamine ei avalda replikaasi aktiivsusele mingit positiivset mõju (Joonis 17). Veelgi enam, alates nsP4 kolmekordsest üle hulgast replikaasi aktiivsused hoopis langesid. Siiski tuleb siin märkida, et tõenäoliselt oli see põhjustatud liiga suure DNA hulga toksilisest mõjust rakkudele. Selline pilt avaldus ka CHIKV kolmekomponentse replikaasi titreerimisel, välja arvatud asjaolu, et siin täheldasin nsP4 kahekordse üle hulga puhul replikaasi efektiivuse mõningast suurenemist (Lisa 9). Sama oli märgata ka RRV kolmekomponentse replikaasi puhul. Vahe oli ainult selles, et suurima aktiivsuse saavutasin nsP4 kolmekordse üle hulga puhul ja ka siis jäi RRV kolmekomponentse replikaasi aktiivsus liiga madalaks (Joonis 18).



**Joonis 17. SINV kolmekomponentse replikaasi nsP4 titreerimine.** Positiivne kontroll on ühekomponentne P1234 replikaas, kõik tulemused on normaliseeritud P1234<sup>GAA</sup> suhtes.



**Joonis 18. RRV kolmekomponentse replikaasi nsP4 titreerimine.** Positiivne kontroll on ühekomponentne P1234 replikaas, kõik tulemused on normaliseeritud P1234<sup>GAA</sup> suhtes.

Kokkuvõtlikult saab neist tulemustest järeldada järgmist:

1. On selge, et kolmekomponentsed replikaasid töötavad. Nende töötamise efektiivsus sõltub selgesti viirusest. Millised viirus-spetsiifilised faktorid seda põhjustavad, annab ainek järgmiseks uurimistööks.
2. Teiseks, erinevalt kahekomponentsest replikaasist ei ole nsP4 hulk kolmekomponentse replikaasi aktiivsust limiteerivaks faktoriks. See ei tähenda seda, et nsP4 hulk oluline ei ole – kahtlemata on see tähtis. Pigem tähendab see seda, et mingi muu faktor (või

faktorid) on veelgi olulisemad. Taas pole teada, mis faktori (või faktoritega) on tegemist. Seda saab uurida juba järgnevates uurimistöödes.

3. Siiski ei tähenda CHIKV ja RRV kolmekomponentsete replikaaside mõõdukas/madal aktiivsus seda, et neid ei saaks edaspidises uurimistöös kasutada. Vastupidi, madal foon muudab sellised katsed väga tundlikuks. Nii on erinevaid maatriks / nsP1 / P2<sup>CA3</sup> / nsP4 kombinatsioone kasutades võimalik kindlaks teha, millisest komponendist vastavate kolmekomponentsete replikaaside madalad aktiivsused tulenevad.

## KOKKUVÕTE

Alfaviirused on laialt levinud positiivse polaarsusega RNA genoomsed viirused. Nad levivad lülijalgsete vektorite abil ja nende hulka kuulub mitmeid olulisi patogeene. Käesolev töö on pühendatud kolme alfaviiruse, Ross River viiruse (RRV), Chikungunya viiruse (CHIKV) ning Sindbis viiruse (SINV) RNA replikatsiooni uurimisele. Töö otsesteks eesmärkideks oli nende viiruste kodeeritud replikaasi järjestuse jagamine kahe- ja kolme ekspressioonikonstrukti vahel, uurida saadud konstruktide toodetud replikaasi efektiivsust, optimeerida selle süsteemi kasutamine ning analüüsida replikaaside maatriks-spetsiifilisust.

Töö käigus kavandasin ja konstrueerisin uudsed plasmiidid CHIKV, RRV ning SINV replikaasidele sobivate RNA maatriksite ekspressiooniks. Kõigi kolme viiruse jaoks konstrueerisin kahekomponentsed P123 + nsP4 replikaasid ja nende mutantsed variandid, milles nsP2 proteaas on inaktiveeritud (P12<sup>CA3</sup> + nsP4). Analüüsid näitasid, et ühe- ja kahekomponentsetel replikaasidel on sarnased efektiivsused ja et kahekomponentsete replikaaside aktiivsust on võimalik oluliselt suurendada muutes P123 ja nsP4 komponentide suhet 1 : 1-lt 1 : 10-le. Sellest järeldub, et alfaviiruse replikatsiooni efektiivsust limiteerivaks komponendiks on nsP4. Optimeerimiste tulemusel valisin edasisteks katseteks välja efektiivsuselt “metsiktüüpi” replikaasile lähedased maatriks : P123 : nsP4 kombinatsioonid suhetega 1 : 1 : 1 (CHIKV, SINV) või 1 : 1 : 2 (RRV). Selliseid kombinatsioone kasutades näitasin, et kõik kahekomponentsed replikaasid suudavad kasutada peale omaenda RNA maatriksi ka SINV RNA maatriksit. RRV ja CHIKV replikaasid suutsid, ehkki väiksema efektiivsusega, kasutada ka teineteise maatrikse. Need andmed on vastavuses ühekomponentset replikaasi kasutades saadud andmetega ja näitavad, et replikaasi jagamine ei muuda selle maatriks-spetsiifilisust.

Järgnevalt konstrueerisin kõigile kolmele viirusele konstruktid, milles replikaas oli jagatud nsP1, P2<sup>CA3</sup> ja nsP4 osadeks. SINV replikaas säilitas selle jagamise käigus oma aktiivsuse, CHIKV puhul täheldasin aktiivsuse olulist vähenemist ja RRV kolmekomponente replikaas omas vaid minimaalset aktiivsust. nsP4 hulga suurendamine ei avaldanud kolmekomponentse replikaasi aktiivsusele olulist mõju. Arvatavasti tulenevad need efektid mingitest seni tundmatu(te)st erinevuse(te)st nende viiruste RNA replikatsioonisüsteemis.

Kokkuvõtteks, uurimustöö kinnitas, et funktsionaalse alfaviiruse replikaasi saab moodustada kahest, mõne viiruse puhul ka kolmest, eraldi komponendist. See võimaldab edaspidi erinevaid replikaasi komponentide ja RNA maatriksite kombinatsioone kasutades analüüsida erinevate viiruste valkude omavahelist kokku sobivust ning teha kindlaks viiruse maatriks-spetsiifilisuse eest vastutavad valgud ja järjestused.

# **Splitting of the alphavirus replicase into functional components on the example of Sindbis, Chikungunya and Ross River viruses**

**Laura Sandra Lello**

## **SUMMARY**

Alphaviruses are a group of widely spread viruses with a positive sense RNA genome. Alphaviruses are arboviruses and many of them are important pathogens. This thesis focuses on studying the RNA replication of Ross River virus (RRV), Chikungunya virus (CHIKV) and Sindbis virus (SINV). The primary goals of this thesis were, firstly, to divide the alphavirus replicase into two- and three-component replicases. Secondly, to study their functionality. Thirdly, to optimize the new multi-component replicase system and analyse the template specificity of the replicases.

For this thesis I constructed new plasmids for CHIKV, RRV and SINV replicases and tested them against respective templates. I constructed two-component P123 + nsP4 replicases, and also their mutant variations, where nsP2 protease is inactivated (P12<sup>CA3</sup> + nsP4). Analyses concluded that one- and two-component replicases are almost equally effective. We also know now that it is possible to increase the replicase activity by bringing the P123 : nsP4 ratios from 1 : 1 to 1 : 10. This infers that the rate limiting component of alphavirus replicase is most definitely nsP4. Based on the results of optimization experiments I chose to continue with template : P123 : nsP4 ratios that were the closest to “wild-type” activity – 1 : 1 : 1 (CHIKV, SINV) and 1 : 1 : 2 (RRV). Using these combinations, I was able to show that all of the two-component replicases can, in addition to their own RNA template, use SINV RNA template. RRV and CHIKV replicases can also use eachother's templates. This data is in correlation with the data that represents the activities of the one-component replicases and proves that dividing the alphavirus replicase into more than one component has no effect on it's template specificity.

To follow, I constructed three-component (nsP1, P2<sup>CA3</sup>, nsP4) replicases for all three viruses. SINV replicase maintained its activities even in the three-component form. CHIKV suffered a substantial loss of activity and RRV did not work at all. Increasing the amount of nsP4 did not have any good effects on the three-component replicase. These effects are probably related to unknown (at least to this day) differences in the replicatory systems of these viruses.

To conclude, my thesis proves that a functional alphavirus replicase can, in fact, be formed from two or, in some cases, also from three separate components. From now on, this allows scientists to study the replicase compartibility by forming new replicases from diferent

components and also to study template specificity by combining parts of templates from different viruses.

## KIRJANDUSE LOETELU

1. Ahola T., Laakkonen P., Vihinen H., Kääriäinen L. (1997), Critical residues of Semliki Forest virus RNA capping enzyme involved in methyltransferase and guanylyltransferase-like activities. *Journal of Virology*, 71: 392-397
2. Bartholomeeusen K., Utt A., Coppens S., Vereecken K., Ariën K. K., Merits A. (2018), *Journal of Virology*, trükis
3. Cheng R. H., Kuhn R. J., Olson N. H., Rossmann M. G., Choi H. K., Smith T. J., Baker T. S. (1995), Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. *Cell*, 80: 621-630
4. Das P. K., Merits A., Lulla A. (2014), Functional cross-talk between distant domains of chikungunya virus non-structural protein 2 is decisive for its RNA-modulating activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 289: 5635-5653
5. De Groot R. J., Hardy W. R., Shirako Y., Strauss J. H. (1990), Cleavage-site preferences of Sindbis virus polyproteins containing the non-structural proteinase. Evidence for temporal regulation of polyprotein processing in vivo. *The EMBO Journal*, 9: 26381-2638
6. De Groot R. J., Rümenapf T., Kuhn R. J., Strauss E. G., Strauss J. H. (1991), Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 8967-8971
7. Götte B., Liu L., McInerney G. M. (2018), The Enigmatic Alphavirus Non-Structural Protein 3 (nsP3) Revealing Its Secrets at Last. *Viruses*, 10: 105
8. Hardy W. R., Strauss J. H. (1989), Processing the nonstructural polyproteins of sindbis virus: nonstructural proteinase is in the C-terminal half of nsP2 and functions both in cis and in trans. *Journal of Virology*, 63: 4653-4664
9. Harley D., Sleigh A., Ritchie S. (2001), Ross River virus transmission, infection, and disease: a cross-disciplinary review. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 909-932
10. Jose J., Snyder J. E., Kuhn R. J. (2009), A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiology*, 4: 837-856
11. Kallio K., Hellström K., Balisteri G., Spuul P., Jokitalo E., Ahola T. (2013), Template RNA Length Determines the Size of Replication Complex Spherules for Semliki Forest Virus. *Journal of Virology*, 87: 9125-9134
12. Kamer G., Argos P. (1984), Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nuclear Acids Research*, 12: 7269-7282

13. Khan A. H., Morita K., Parquet Md Mdel C., Hasebe F., Mathenge E. G., Igarashi A. (2002), *The Journal of General Virology*, 83: 3075-3084
14. Kiiver K., Tagen I., Žusinaite E., Tamber N., Fazakerley J. K., Merits A. (2008), Properties of non-structural protein 1 of Semliki Forest virus and its interference with virus replication. *Journal of General Virology*, 89: 1457-1466
15. Kim, K. H., Rümenapf T., Strauss E. G., Strauss J. H. (2004), Regulation of Semliki Forest virus RNA replication: a model for the control of alphaviruspathogenesis in invertebrate hosts. 323: 153-163
16. Kurkela S., Helve T., Vaheri A., Vapalahti O. (2008), Arthritis and arthralgia three years after Sindbis virus infection: clinical follow-up of a cohort of 49 patients. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 40: 167-173
17. Kurkela S., Manni T., Myllynen J., Vaheri A., Vapalahti O. (2005), Clinical and Laboratory Manifestations of Sindbis Virus Infection: Prospective Study, Finland, 2002–2003. *The Journal of Infectious Diseases*, 191: 1820-1829
18. Lambert N., Strebel P., Orenstein W., Icenogle J., Poland G. A. (2015), Rubella. *Lancet*, 385: 2297-2307
19. Lee C. W. (2014), Reverse Genetics of Influenza Virus. *Methods in Molecular Biology*, 1161: 37-50
20. Lemm J. A., Rümenapf T., Strauss E. G., Strauss J. H., Charles M. R. (1994), Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *The EMBO Journal*, 13: 2925 - 2934
21. Lewis R., Weiss B. G., Tsiang M., Huang H., Schlesinger S. (1986), Deletion mapping of Sindbis virus DI RNAs derived from cDNAs defines the sequences essential for replication and packaging. *Cell*, 44: 137-145
22. Liljeström P., Garoff H. (1991), A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 9: 1356-1361
23. Lulla A., Lulla V., Merits A. (2012), Macromolecular Assembly-Driven Processing of the 2/3 Cleavage Site in the Alphavirus Replicase Polyprotein. *Journal of Virology*, 86: 553-565
24. Lulla V., Karo-Astover L., Rausalu K., Merits A., Lulla A. (2013), Presentation Overrides Specificity: Probing the Plasticity of Alphaviral Proteolytic Activity through Mutational Analysis. *Journal of Virology*, 87: 10207-10220

25. Lulla V., Karo-Astover L., Rausalu K., Saul S., Merits A., Lulla A. (2018), Timeliness of proteolytic events is prerequisite for efficient functioning of the alphaviral replicase. *Journal of Virology*, trükis
26. Mylonas A. D., Brown A. M., Carthew T. L., ... de Looze F. J., (2002), Natural history of Ross River virus-induced epidemic polyarthritits. *The Medical Journal of Australia*, 177: 356-360
27. Nikonov A., Mölder T., Sikut R., Kiiver K., Männik A., Toots U., Lulla A., Lulla V., Merits A., Ustav M. (2013), RIG-I and MDA-5 detection of viral RNA-dependent RNA polymerase activity restricts positive-strand RNA virus replication. *PLoS pathogens*, 9
28. Pinggen M., Bryden S. R., Pondeville E., Schnettler E., Kohl A., Merits A., Fazakerley J. K., Graham G. J., McKimmie C. S. (2016), Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. *Immunity*, 44: 1455-1469
29. Powers A. M., Brault A. C., Shirako Y., Strauss E. G., Kang W., Strauss J. H., Weaver S. C., (2001). Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *Journal of Virology*, 75:10118-10131
30. Powers A. M., Brault A. C., Tesh R. B., Weaver S. C. (2000), Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *Journal of General Virology*, 81: 471-479
31. Rausalu K., Utt A., Quirin T., Varghese F. S., Žusinaite E., Das P. K., Ahola T., Merits A. (2016), Chikungunya virus infectivity, RNA replication and non-structural polyprotein processing depend on the nsP2 protease's active site cysteine residue. *Scientific Reports*, 6: 37124
32. Rikkinen M. (1996), Functional Significance of the Nuclear-Targeting and NTP-Binding Motifs of Semliki Forest Virus Nonstructural Protein nsP2. *Virology*, 218: 352-361
33. Rikkinen M., Peränen J., Kääriäinen L. (1994), ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Journal of Virology*, 68: 5804-5810
34. Rubach J. K., Wasik B. R., Rupp J. C., Kuhn R. J., Hardy R. W., Smith J. L. (2009), Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro. *Virology*, 384: 201-208
35. Rupp J. C., Jundt N., Hardy R. W. (2011), Requirement for the Amino-Terminal Domain of Sindbis Virus nsP4 during Virus Infection. *Journal of Virology*, 85: 3449-3460
36. Sokoloski K. J., Haist K. C., Morrison T. E., Mukhopadhyay S., Hardy R. W. (2015), Noncapped Alphavirus Genomic and Their Role during Infection RNAs. *Journal of Virology*, 89: 6080-6092

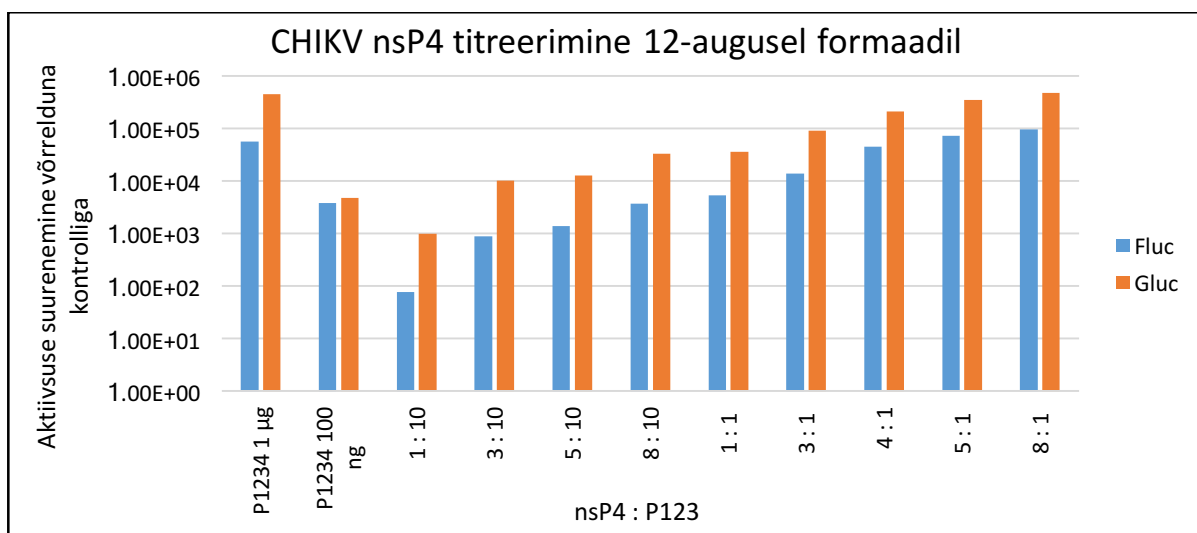
37. Spuul P., Balisteri G., Hellström K., Golubtsov A. V., Jokitalo E., Ahola T. (2011), Assembly of Alphavirus Replication Complexes from RNA and Protein Components in a Novel *trans*-Replication System in Mammalian Cells. *Journal of Virology*, 85: 4793-4751
38. Spuul P., Salonen A., Merits A., Jokitalo E., Kääriäinen L., Ahola T. (2007), Role of the Amphipathic Peptide of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP1 in Membrane Association and Virus Replication. *Journal of Virology*, 81: 872-883
39. Strauss J. H., Strauss E. G. (1994), The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. *Microbiological Reviews*, 491-562
40. Žusinaite E., Tints K., Kiiver K., Spuul P., Karo-Astover L., Merits A., Sarand I. (2007), Mutations at the palmitoylation site of non-structural protein nsP1 of Semliki Forest virus attenuate virus replication and cause accumulation of compensatory mutations. *Journal of General Virology*, 88: 1977-1985
41. Tomar S., Hardy R.W., Smith J. L., Kuhn R. J. (2006), Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsP4 possesses terminal adenylyltransferase activity. *Journal of Virology*, 80: 9962-9969
42. Utt A., Quirin T., Saul S., Hellström K., Ahola T., Merits A. (2016), Versatile Trans-Replication Systems for Chikungunya Virus Allow Functional Analysis and Tagging of Every Replicase Protein. *PLoS One*, 11(3)
43. Varjak M., Žusinaite E., Merits A. 2010, Novel functions of the alphavirus nonstructural protein nsP3 C-terminal region. *Journal of Virology*, 84: 2352-2364
44. Vasiljeva L., Merits A., Golubtsov A., Sizemskaja V., Kääriäinen L., Ahola T. (2003), Regulation of the sequential processing of Semliki Forest virus replicase polyprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 41636-41645
45. Weaver S. C., Osorio J. E., Livengood J. A., Chen R., Stinchcomb D. T. (2012), Chikungunya virus and prospects for a vaccine. *Expert Review of Vaccines*, 11: 1087-1101

## KASUTATUD VEEBIAADRESSID

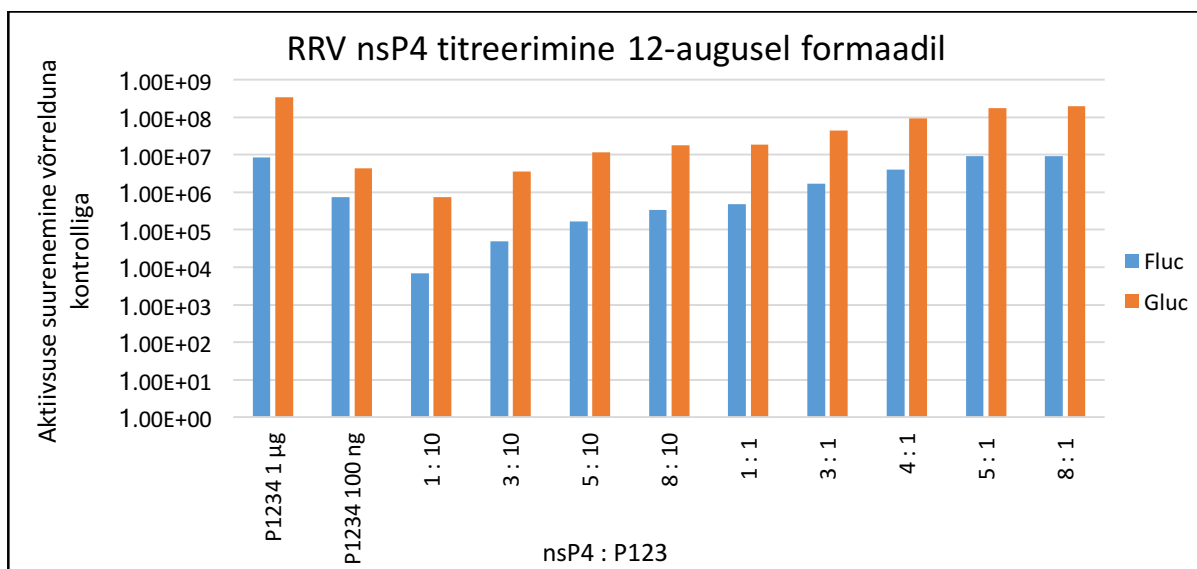
1. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya> (külastatud 16.05.18, kell 22.04)
2. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya> (külastatud 24.05.18, kell 22.40)
3. <http://cmr.asm.org/content/14/4/909.long> (külastatud 24.05.18, kell 14.44)

## LISAD

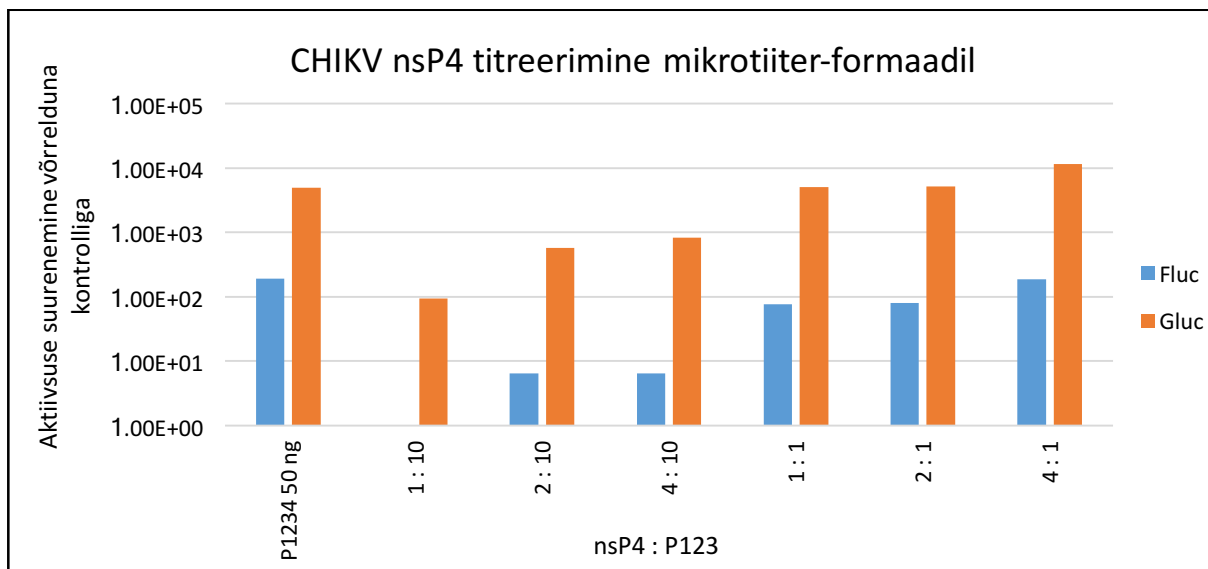
**Lisa 1. CHIKV kahekomponentse P123 + nsP4 replikaasi optimeerimine (nsP4 titreerimine) 12-augusel formaadil.** Positiivne kontroll on CMV-P1234-CHIKV ekspressiooniplasmiid; negatiivne kontroll, mille vastu on tulemused normaliseeritud, on CMV-P1234<sup>GAA</sup>-CHIKV. RNA maatriksi ning P123 ekspressiooniplasmiidide kogused jäid läbi katse konstantselt 100 ng juurde.



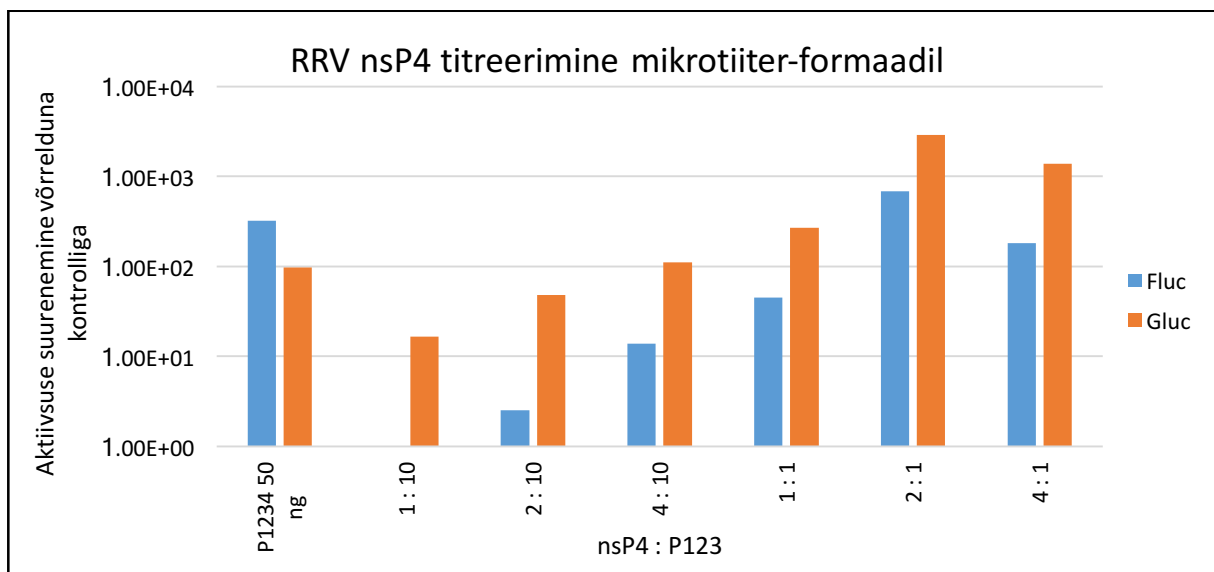
**Lisa 2. RRV kahekomponentse P123 + nsP4 replikaasi optimeerimine (nsP4 titreerimine) 12-augusel formaadil.** Positiivne kontroll on CMV-P1234-RRV; negatiivne kontroll, mille vastu on ka tulemused normaliseeritud, on CMV-P1234<sup>GAA</sup>-RRV. RNA maatriksi ning P123 ekspressiooniplasmiidide kogused jäid läbi katse konstantselt 100 ng juurde.



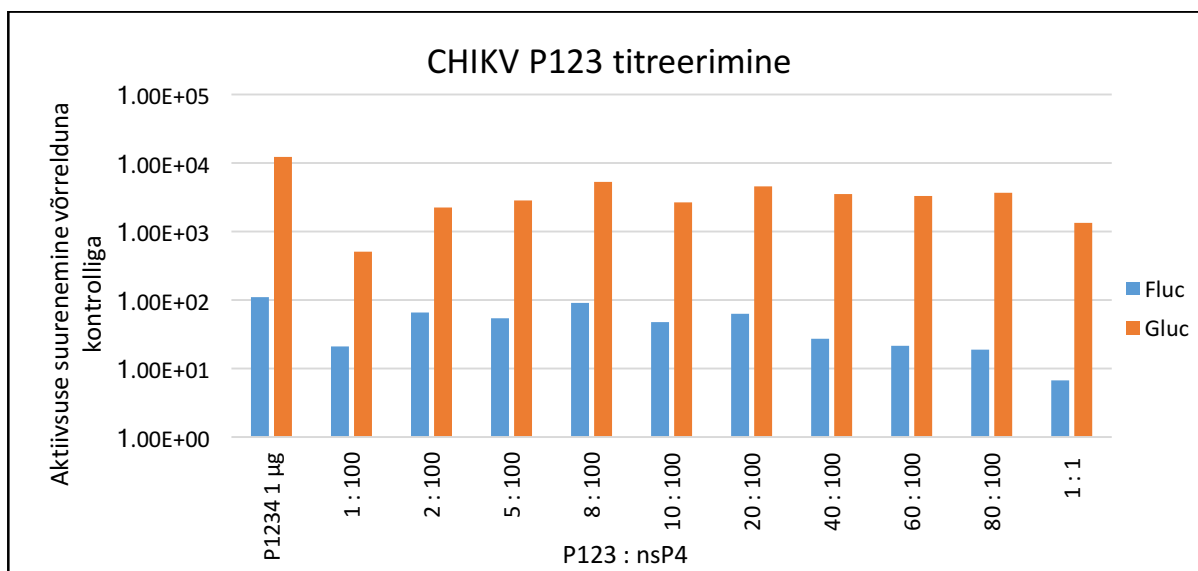
**Lisa 3. CHIKV kahekomponentse P123 + nsP4 replikaasi optimeerimine (nsP4 titreerimine) mikrotiiter-plaadi formaadis.** Positiivne kontroll on CMV-P1234-CHIKV; tulemused on normaliseeritud negatiivse kontrolli (CMV-P1234<sup>GAA</sup>-CHIKV) suhtes. RNA maatriksi ning P123 ekspressiooniplasmiidide kogused olid läbi katse konstantselt 50 ng.



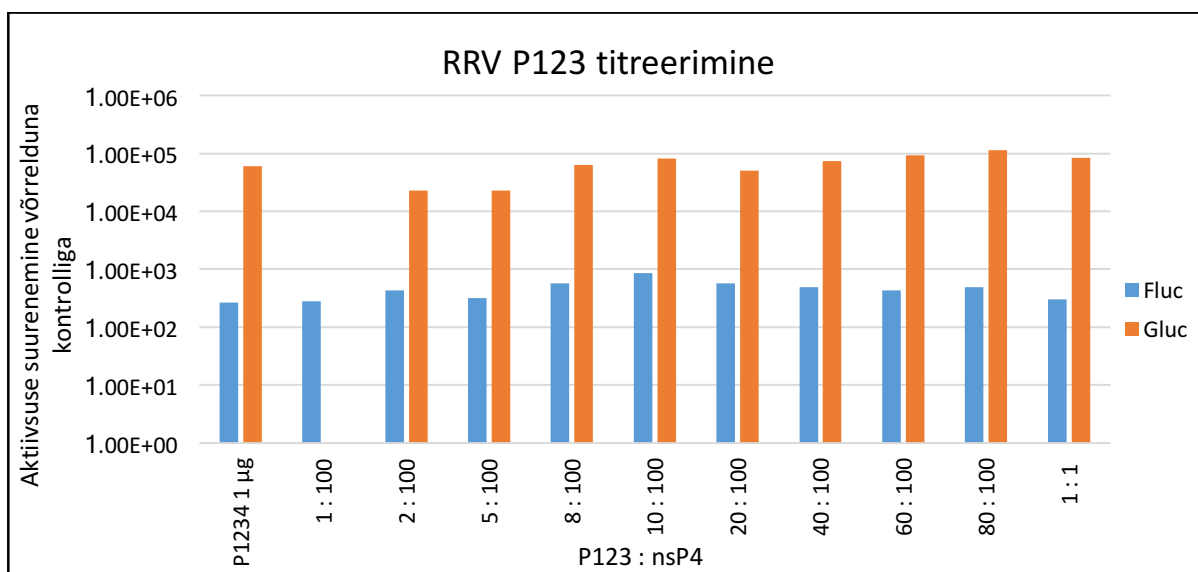
**Lisa 4. RRV kahekomponentse P123 + nsP4 replikaasi optimeerimine (nsP4 titreerimine) mikrotiiter-plaadi formaadis.** Positiivne kontroll on CMV-P1234-RRV; tulemused on normaliseeritud negatiivse kontrolli (CMV-P1234<sup>GAA</sup>-RRV) suhtes. RNA maatriksi ning P123 ekspressiooniplasmiidide kogused olid läbi katse konstantselt 50 ng.



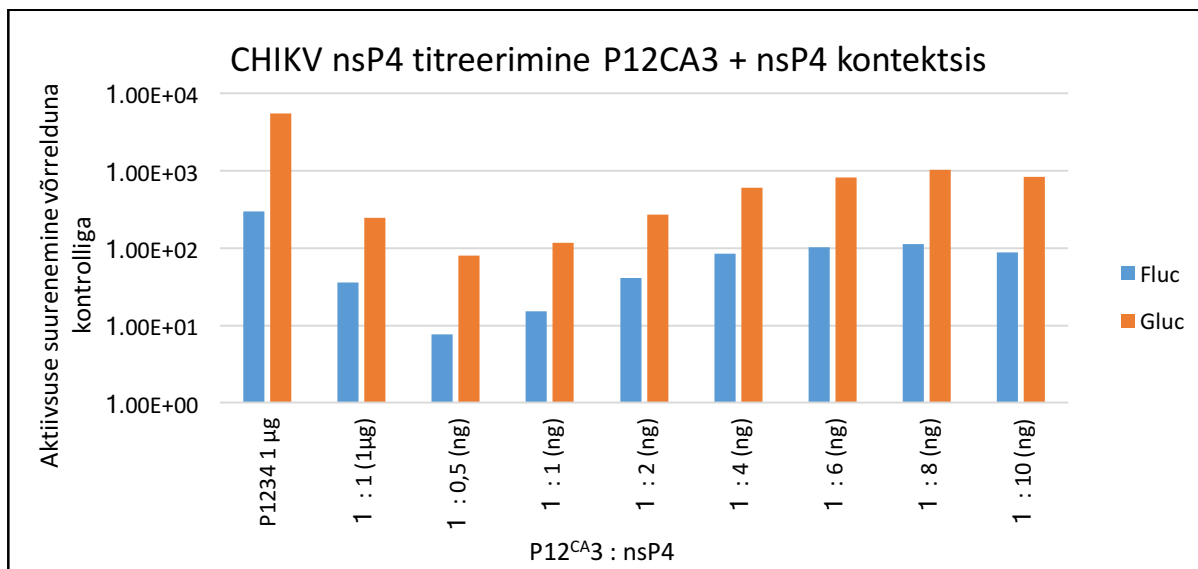
**Lisa 5. CHIKV kahekomponentse replikaasi P123 + nsP4 aktiivsuse optimeerimine (P123 titreerimine).** Positiivne kontroll on CMV-P1234-CHIKV ekspressiooniplasmiid; tulemused on normaliseeritud negatiivse kontroll (CMV-P1234<sup>GAA</sup>-CHIKV) suhtes. RNA maatriksi ning nsP4 ekspressiooniplasmiidide kogused jäid läbi katse 1 µg juurde.



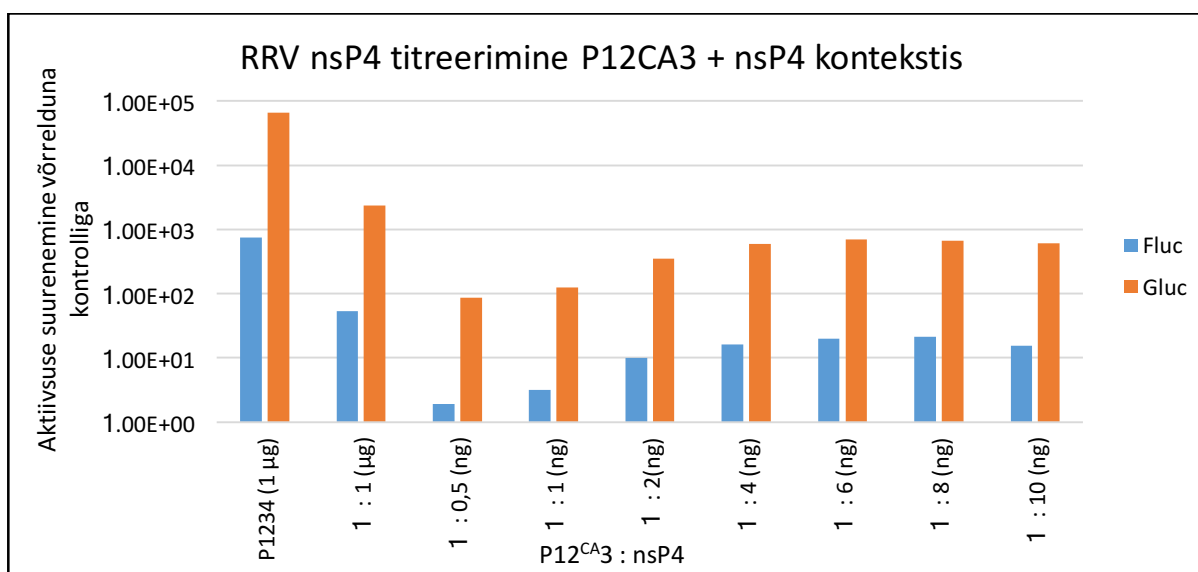
**Lisa 6. RRV kahekomponentse replikaasi P123 + nsP4 aktiivsuse optimeerimine (P123 titreerimine).** Positiivne kontroll on CMV-P1234-RRV ekspressiooniplasmiid; tulemused on normaliseeritud negatiivse kontroll (CMV-P1234<sup>GAA</sup>-RRV) suhtes. RNA maatriksi ning nsP4 ekspressiooniplasmiidide kogused jäid läbi katse 1 µg juurde.



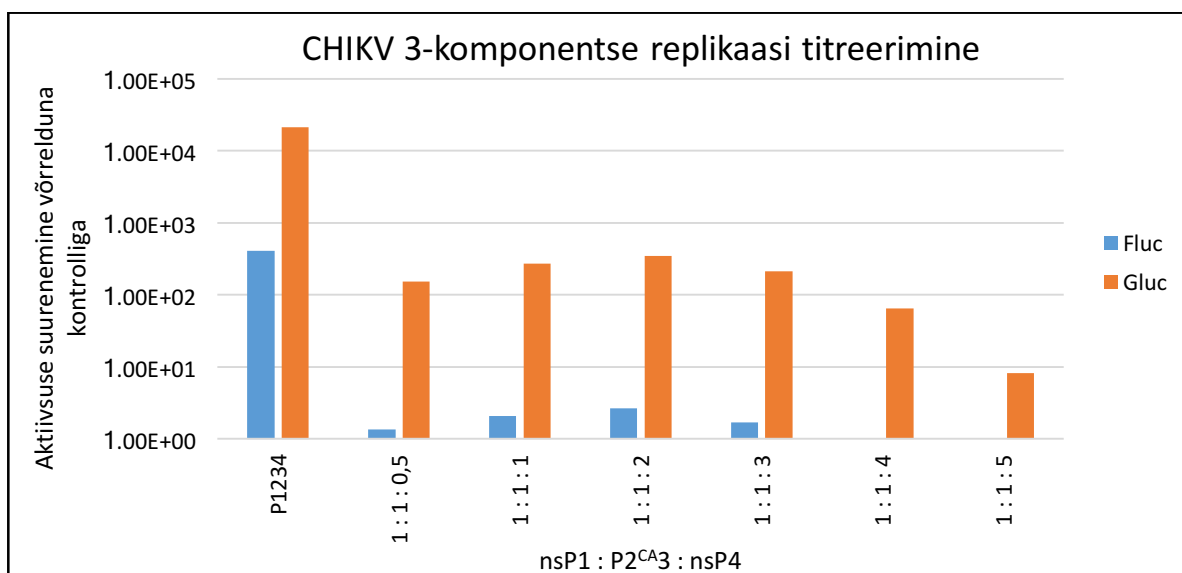
**Lisa 7. CHIKV P12<sup>CA3</sup> + nsP4 kahekomponentse replikaasi optimeerimine (nsP4 titreerimine) 12-augusel formaadil.** Positiivne kontroll on CMV-P1234-CHIKV ekspressiooniplasmiid; tulemused on normaliseeritud negatiivse kontrolli (CMV-P1234<sup>GAA</sup>-CHIKV) suhtes. RNA maatriksi ning nsP4 ekspressiooniplasmiidide kogused jäid läbi katse konstantseks 100 ng juurde.



**Lisa 8. RRV P12<sup>CA3</sup>+nsP4 kahekomponentse replikaasi optimeerimine (nsP4 titreerimine) 12-augusel formaadil.** Positiivne kontroll on CMV-P1234-RRV ekspressiooniplasmiid; tulemused on normaliseeritud negatiivse kontrolli (CMV-P1234<sup>GAA</sup>-RRV) suhtes. RNA maatriksi ning nsP4 ekspressiooniplasmiidide kogused jäid läbi katse konstantseks 100 ng juurde



**Lisa 9. CHIKV 3-komponentse replikaasi (nsP1+P2<sup>CA3</sup>+nsP4) optimeerimine (nsP4 titreerumine) 12 auguse plaadi formaadis.** Positiivne kontroll on CMV-P1234-CHIKV ekspressiooniplasmiid; tulemused on normaliseeritud CMV-P1234<sup>GAA</sup>-CHIKV (negatiivne kontroll) suhtes. RNA maatriksi, nsP1 ja P2<sup>CA3</sup> ekspressiooniplasmiide kogused jäid läbi katse konstantseks 1 µg juurde.



# LIHTLITSENTS

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina , Laura Sandra Lello

(sünnikuupäev: 26.07.1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

**Alfaviiruste replikaasi jagamine funktsionaalseteks komponentideks Sindbis, Chikungunya ja Ross River viiruste näitel,**

mille juhendajad on Andres Merits ja Age Utt,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **31.12.2021** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2018