TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Barmah Forest viiruse mutantide iseloomustamine *in vitro* ja *in vivo*

Magistritöö

30 EAP

Ailar Omler

Juhendajad

prof. Andres Merits, PhD

Margit Mutso, PhD

TARTU 2020

INFOLEHT

Barmah Forest viiruse mutantide iseloomustamine *in vitro* ja *in vivo*

Barmah forest viirus (BFV) on Austraalias ulatuslikult leviv artriite põhjustav alfaviirus, mis põhjustab igal aastal ligikaudu 1000 registreeritud haigusjuhtu. Käesolevas töös kirjeldati lähemalt BFV nsP3 tuumalokalisatsiooni ja näidati, et see sõltub C-terminaalses domeenis paiknevast tuumalokalisatsiooni signaalist. Näidati ka seda, et nsP3 lokalisatsioon rakutuuma leiab aset imetajarakkude nakatamisel, kuid mitte putukarakkudes. Samuti ei mõjutanud selle omaduse puudumine viiruse replikatsioonikineetikat putukarakkudes. nsP3 tuumalokalisatsiooni signaali häirimine põhjustas BFV atenueerimist tüüp I IFN kompetentsete rakkude nakatamisel ning madalamaid viiruse tiitreid nakatatud C57BL/6 hiirte kudedes. Sellest järeldati, et BFV nsP3 lokalisatsioon rakutuuma võib mõjutada peremeesraku geenieksрessiooni ja/või tüüp I IFN süsteemi kaudset viirusvastase oleku kujunemist. Lisaks iseloomustati kahe nsP2 ja nsP4 järjestuses paikneva mutatsiooni mõju BFV replikatsioonile ning nende positsioonide olulisust seostati tüüp I IFN vastuse allareguleerimisega peremeesrakus.

Märksõnad: alfaviirused, Barmah Forest viirus, nsP3

CERCS kood: B230

Characterizing Barmah Forest virus mutants *in vitro* and *in vivo*

BFV is an arthritogenic alphavirus that causes widespread human infection in Australia where around 1000 cases of BFV infection are reported annually. In this study, the BFV nsP3 nuclear localization was further analysed as it was shown that the C-terminal domain of nsP3 possesses a nuclear localization signal. It was demonstrated that nsP3 nuclear localization occurs only in mammalian cells as such localization was not apparent when infecting mosquito cells. Furthermore, the lack of nsP3 nuclear localization did not affect BFV replication in insect cells. The disruption of the nuclear localization signal caused BFV attenuation in type I IFN competent cells and lower viral titres in infected C57BL/6 mice. It was thus proposed that the BFV nsP3 nuclear localization may affect host gene expression and/or the type I IFN mediated regulation of the antiviral state. It was also demonstrated that two mutations in the nsP2 and nsP4 coding region cause attenuation in BFV infection and that these amino acid positions may be important in the virus mediated regulation of the type I IFN response.

Keywords: alphaviruses, Barmah Forest virus, nsP3

CERCS code: B230

SISUKORD

INFOLEHT 2
SISUKORD 3
KASUTATUD LÜHENDID 5
SISSEJUHATUS 7
1. Kirjanduse ülevaade 8
1.1. Alfaviirused 8
1.2. Alfaviiruste virion 10
1.3. Alfaviiruste genoom 11
1.4. Alfaviiruste mittestruktuursed valgud nsP1-nsP4 13
1.4.1. nsP1 13
1.4.2. nsP2 15
1.4.3. nsP3 16
1.4.4. nsP4 19
1.5. Alfaviiruste struktuursed valgud 20
1.6. Alfaviiruste infektsioonitsükkel 22
1.7. Tüüp I interferoonide vastus alfaviiruste infektsioonil 25
1.8. Barmah Forest viirus 26
2. Eksperimentaalosa 28
2.1. Töö eesmärgid 28
2.2. Materjal ja metoodika 29
2.2.1. Töös kasutatud viirused 29
2.2.2. Kasutatud rakuliinid ja söötmed 31
2.2.3. Individuaalse BFV^{K1651D} EGFP-nsP3 ekspressioonikonstrukti kloneerimine 32
2.2.4. IVT, RNA transfektsioon, viirusvarude kogumine ja tiiterdamine 33
2.2.5. Mitme-astmelised kasvukõverad 34
2.2.6. Rakkude nakatamine, transfekteerimine, mikroskoopiapreparaatide valmistamine ja konfokaalmikroskoopia 35
2.2.7. Viirusvarude kontsentreerimine ja puhastamine ultratsentrifuugimisega 35
2.2.8. Loomkatsed 36
2.2.9. Statistiline analüüs 37
2.3. Tulemused ja arutelu 37
2.3.1. BFV2193 ja BFV-WT fenotüüpide võrdlus *in vitro* ning *in vivo* 37
2.3.2. BFV^{T1325P} ja $BFV^{T1325P+V1911D}$ *in vitro* atenueeritud fenotüüp 40
2.3.3. BFV nsP3 lokalisatsiooni rakutuuma määrab NLS 44
2.3.4. BFV nsP3 tuumalokalisatsiooni puudumise mõju viiruse fenotüübile *in vitro* ja *in vivo* 46

Kokkuvõte....53
Résumé....54
Tänusõnad....56
Kasutatud kirjandus....57
Kasutatud veebiaadressid....69
Lisad....70
Lisa 1....70
Lihtlitsents....72

KASUTATUD LÜHENDID

AUD – alfaviiruste unikaalne domeen (*alphavirus unique domain*)

BFV – Barmah Forest viirus

CHIKV – Chikungunya viirus

CMC – karboksümetüültselluloos (*carboxy methyl cellulose*)

CMV – tsütomegaloviirus (*cytomegalovirus*)

CPE – tsütopaatiline efekt (*cytopathic effect*)

DAPI – 4,6-diamino-2-denüülindool

DPBS – Dulbecco PBS

dsRNA – kaheahelaline RNA (*double stranded* RNA)

EEEV – ida hobuste entsefaliidi viirus (*eastern equine encephalitis virus*)

EILV – Eilat viirus

FBS – veise loote seerum (*foetal bovine serum*)

FXR – *Fragile-X-related protein*

G3BP – Ras-GTPaase aktiveerivaid valke seondav valk *(Ras-GTPase activating protein binding protein*)

HVD – hüpervariaabel domeen (*hypervariable domain*)

icDNA – infektsioonilise klooni DNA (*infectious clone* DNA)

IFN – interferoon

IFNAR – IFNα retseptor

IRF – *interferon regulatory factor*

IVT – *in vitro* transkriptsioon

m^7GTP, m^7GMP – 7-metüül-GTP, 7-metüül-GMP

MAYV – Mayaro viirus

MDA5 – *melanoma differentation associated protein 5*

MEF – hiire embrüonaalne fibroblast (*mouse embryonic fibroblast*)

MOI – infektsioonilisuse kordaja (*multiplicity of infection*)

MyD88 – *myeloid differentation primary response* 88

NGS – teise põlvkonna sekveneerimine (*next generation sequencing*)

NLS – tuumalokalisatsiooni signaal (*nuclear localization signal*)

nsP – mittestruktuurne valk (*non-structural protein*)

ONNV – O'nyong nyong viirus

ORF – avatud lugemisraam (*open reading frame*)

PAMP – patogeenidega seotud molekulaarsed mustrid (*pathogen-associated molecular patterns*)

PARP – polü-ADP-riboosi polümeraas (*poly-ADP-ribose polymerase*)

PBS – fosfaat-puhverdatud füsioloogiline lahus (*phosphate-buffered saline*)

PFA – paraformaalaldehüüd

PFU – lüüsilaike moodustav ühik (*plaque forming unit*)

RdRp – RNA-sõltuv RNA polümeraas (*RNA dependent RNA polymerase*)

RIG-I – *retinoic acid inducible gene 1*

Rpb1 – RNA polümeraas II katalüütiline subühik

RRV – Ross River viirus

SESV – lõuna-lonthüljeste viirus (*southern elephant seal virus*)

SFV – Semliki Forest viirus

sg – subgenoomne

SINV – Sindbis viirus

SPDV – lõheliste kõhunäärme viirus (*salmonid pancreatic disease virus*)

ZBD – tsinki siduv domeen (*zinc binding domain*)

TLR – *Toll-like receptor*

TPB – trüptoos-fosfaat puljong (*tryptose phosphate broth*)

TRIF – TIR-*domain containing adapter-inducing interferon*-β

UNAV – Una viirus

UTR – mittekodeeriv piirkond (*untranslated region*)

WEEV - lääne hobuste entsefaliidi viirus (*western equine encephalitis virus*)

VEEV – Venetsueela hobuste entsefaliidi viirus (*Venezuelan eqine encephalitis virus*)

WT – metsiktüüp (*wild type*)

SISSEJUHATUS

Perekond *Alphavirus* on rühm positiivse polaarsusega RNA genoomseid viiruseid. Enamik alfaviiruseid nakatavad selgroogseid peremehi ja arboviirustena on nende edasikandmisel vektoriteks erinevad lülijalgsed, valdavalt sääsed. Mitmed alfaviirused nakatavad ka inimesi ning põhjustavad seejuures raskeid haigusnähtusi ja patoloogia alusel on neid jaotatud entsefaliiti või artriite põhjustavateks alfaviirusteks. Ühegi alfaviiruse vastast vaktsiini tänaseks loodud ei ole ning nende poolt põhjustatud haiguste ravimisel lähtutakse sümptomite leevendamisest. Seetõttu pälvib jätkuvalt see perekond viiruseid viroloogide laia tähelepanu. Alfaviiruste molekulaarbioloogia uurimine on võimaldanud kirjeldada viiruste infektsiooni käigus rakendatavaid mehhanisme ja interaktsioone peremeesrakus, mis on oluliselt kaasa aidanud viirusvastaste ravimi- ja vaktsiinikandidaatide väljatöötamisele.

Käesolevas magistritöös on uurimisobjektiks Barmah Forest viirus (BFV), mis inimeste nakatamisel põhjustab artriite, nahalöövet, palavikku ja lihasvalusid. Tegu on Austraalias ulatuslikult levinud alfaviirusega, mis on viimase kümne aasta jooksul põhjustanud ligikaudu 1000 registreeritud haigusjuhtumit aastas. Pikalt peeti BFV-d Austraaliale endeemseks patogeeniks, kuid hiljuti kirjeldati kohalikku päritolu haigusjuhtumit ka Paapua Uus-Guineas ning on võimalik, et BFV levik on veelgi laiem.

Käesolevas uurimuses analüüsiti meie töörühmas loodud BFV infektsioonilise klooni patogeneesi, võrreldes seda BFV loodusliku isolaadiga koekultuuri tingimustel *in vitro* ning hiiremudelis *in vivo*. Infektsioonilise klooni konstrueerimisel omandati ka mutantsed BFV kloonid, mille replikatsioonikineetika leidis siin kirjeldamist erinevates rakuliinides. Lähemalt iseloomustati minu bakalaureusetöös kirjeldatud BFV mittestruktuurse valgu nsP3 unikaalset omadust lokaliseeruda imetajaraku tuuma ja meile teadaolevalt pole sellist omadust varem ühegi alfaviiruse nsP3 valgu suhtes näidatud. Töö käigus kirjeldati BFV nsP3 valgujärjestuses funktsionaalse tuumalokalisatsiooni signaali olemasolu ja iseloomustati BFV nsP3 tuumalokalisatsiooni puudumise mõju viiruse replikatsioonile erinevates rakuliinides *in vitro* ning hiiremudelis *in vivo*.

Üks osa tööst teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi RNA viiruste uurimisrühmas, kus professor Andres Meritsa ja Margit Mutso juhendamisel viidi läbi valdav osa koekultuuri katsetest. Loomkatsed viidi läbi Austraalias Griffithi Ülikoolis Glükoomika Instituudis (Griffith University, Institute for Glycomics, Queensland, Austraalia) arboviiruste uurimisrühmas professor Suresh Mahalingami juhendamisel.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Alfaviirused

Perekonda *Alphavirus* on tänaseks määratud 31 viiruste liiki, kusjuures perekond on tänase seisuga sugukonna *Togaviridae* ainus liige. Sugukond *Togaviridae* kuulub viiruste taksonoomias määratletud kõrgeima ühiku, valdkonna (inglise keeles *realm*) *Riboviria*, koosseisu (Chen *et al.*, 2018). *Riboviria* koondab eeldatavalt monofüleetilist RNA-genoomsete viiruste klaadi, mille ühiseks nimetajaks muuseas on omadus kodeerida RNA-sõltuvat RNA polümeraasi (RdRp, RNA *dependant* RNA *polymerase*) (Walker *et al.*, 2019).

Perekonnasiseselt jaotatakse alfaviiruseid nende geograafilise leviku, iseloomuliku patoloogia, fülogeneesi ja peremeesringi põhjal eristuvatesse rühmadesse. Geograafiliselt on kirjeldatud alfaviiruste levikut ülemaailmsena (kui Antarktika välja arvata) ja sõltuvalt laiemast levialast on neid jaotatud Uue ja Vana Maailma alfaviirusteks (Griffin, 2013). Uue Maailma alfaviiruste hulka on määratud näiteks ida hobuste entsefaliidi viirus (e*astern equine encephalitis virus*, EEEV), lääne hobuste entsefaliidi viirus (*western equine encephalitis virus*, WEEV) ja Venetsueela hobuste entsefaliidi viirus (*Venezuelan equine encephalitis virus*, VEEV). Vana Maailma alfaviiruseid esindavad näiteks Chikungunya viirus (CHIKV), Ross River viirus (RRV), Barmah Forest viirus (BFV), Semliki Forest viirus (SFV) ja alfaviiruste tüüpliik Sindbis viirus (SINV), samas kuulub oma omaduste poolest siia ka Ameerikast pärinev Mayaro viirus (MAYV) (Powers *et al.*, 2001). Sellisest geograafilisest jaotusest eraldiseisvana käsitletakse alfaviiruseid, mille peremeesorganismid on veelise eluviisiga, näiteks lõheliste kõhunäärme tõve viirus (*salmon pancreatic disease virus*, SPDV) ja lõuna-lonthüljeste viirus (*southern elephant seal virus*, SESV) ning ka alfaviirused, mis nakatavad sääski ja kellel puudub selgroogne peremees, näiteks Eilat viirus (EILV) (Forrester *et al.*, 2012; Nasar *et al.*, 2012).

Alfaviiruseid on ajalooliselt rühmitatud antigeense ristreaktiivsuse alusel seroloogilistesse kompleksidesse (Strauss ja Strauss, 1994). Selliselt määratud alfaviiruste kompleksid on ka tänapäevaste järjestuspõhiste fülogeneetiliste analüüside lisandumisel suuresti püsima jäänud, kuigi uute alfaviiruste avastamine ja genoomide sekveneerimine on põhjustanud teatud ümberkorraldusi. Konsensus esineb kaheksa seroloogilise kompleksi määratlusel, kus enim liikmeid on VEEV, EEEV, WEEV ja SFV kompleksides. Omanimeliste komplekside ainuliikmed on BFV, Ndumu viirus ja Middelburg viirus. (Forrester *et al.*, 2012) Eraldiseisvana käsitletakse EILV kompleksi, mille liikmeks on pakutud ka klassifitseerimist ootav Taï Forest alfaviirus (Nasar *et al.*, 2012; Hermanns *et al.*, 2017). Loetletud kompleksidesse ei kuulu

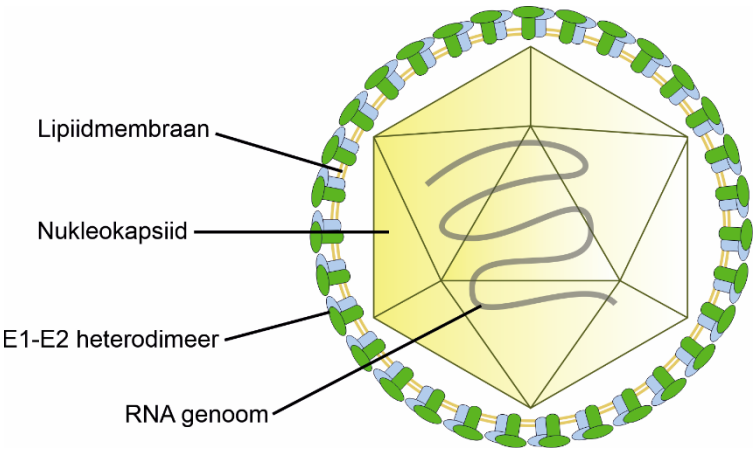
Trocara viirus ning SPDV ja SESV, mis eeldatavalt esindavad individuaalseid komplekse (Chen *et al.*, 2018). Lähedasem fülogeneetiline sugulus peegeldub ka viiruste levialade geograafilises läheduses, kus VEEV, EEEV ja WEEV komplekside liikmed on esindatud eelkõige Ameerika maailmajaos (Powers *et al.*, 2001). Erandiks on WEEV kompleksi kuuluv SINV, mis on viiruspuhanguid põhjustanud Aafrikas, Põhja-Euroopas, Austraalias, Venemaal ning mitmes Aasia piirkonnas ja mida leidub ka Eestis (Wesula Olivia *et al.*, 2015). SFV kompleksi kuuluvad peamiselt inimestel artriiti põhjustavad Vana Maailma alfaviirused, näiteks CHIKV, O'nyong nyong viirus (ONNV) ja RRV, aga ka siin on erandeid, näiteks on SFV kompleksi klassifitseeritud ka Uuest Maailmast pärinevad alfaviirused MAYV ning Una viirus (UNAV) (Powers *et al.*, 2001).

Mõneti on seotud omavahel ka viiruste geograafilised levialad ning patoloogia iseloom. Uue Maailma alfaviirused, näiteks EEEV, VEEV ja WEEV, põhjustavad entsefaliiti ning Vana Maailma alfaviirused, näiteks CHIKV, RRV, BFV ja SINV, põhjustavad polüartriiti, lihasvalusid, palavikku ja löövet (Strauss ja Strauss, 1994). Selline määratlus pole aga täielikult kattuv, kuna näiteks Lõuna-Ameerikas levinud MAYV põhjustab liigesvalusid, löövet ja palavikku ning on fülogeneetilistele analüüsidele toetudes paigutatud Semliki Forest seroloogilisse kompleksi ning on oma bioloogiliste omaduste poolest tüüpiline Vana Maailma alfaviirus (Acosta-Ampudia *et al.*, 2018). On võimalik, et osalt tuleneb see nähtus viiruste levikust maailmajagude vahel. Nii on tänaseks CHIKV levinud Kariibi mere piirkonda ning nii Lõuna- kui ka Põhja-Ameerikasse ja põhjustanud sealseid viiruspuhanguid, mille eelduseks on olnud sobilike vektorsääseliste kohalik levik ning viiruse ookeanide ülest rännet soodustanud kõrge vireemia nakatunud isikutes (Cassadou *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2015). Ajalooliselt võisid sellised ränded toimuda lindude vahendusel, keda ka paljud alfaviirused nakatavad (Griffin, 2013).

Alfaviirused levivad lülijalgsete vektorite vahendusel selgroogsete peremeeste vahel, ehk tegu on arboviirustega ning mille peamisteks vektoriteks on erinevat liiki sääselised peamiselt perekondadest *Aedes* ja *Culex* (Griffin, 2013). CHIKV vektoritena on kirjeldatud näiteks *Aedes albopictus* ja *Aedes aegypti*, Austraalias levinud BFV ja RRV kanduvad edasi tänu *Aedes vigilax, Aedes notoscriptus* ja *Culex annulirostris* sääskedele, Aafrikas põhjustab ONNV puhanguid perekonda *Anopheles* kuuluvate sääskede vahendusel (Jacups *et al.*, 2008; Burt *et al.*, 2017; Rezza *et al.*, 2017). Seos viiruse ja vektori vahel pole aga absoluutne, kuna on kirjeldatud ka mutatsioone, mis võimaldavad uut tüüpi vektorputukate kasutamist (Tsetsarkin *et al.*, 2007).

1.2. Alfaviiruste virion

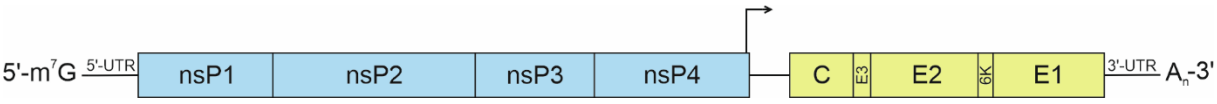
Alfaviiruste küps infektsiooniline virion on ikosaeedrilise sümmeetriaga osake, mille läbimõõt on 70 nm ja mille koostisesse kuuluvad viiruse poolt kodeeritud struktuursed valgud E1 ja E2 (*envelope*, ümbrisvalk), C (*capsid*, kapsiidivalk), 6K ja TF (valk *TransFrame*), viiruse RNA genoomi üks koopia ning peremeesraku päritolu lipiidne membraan (Kuhn, 2013) (joonis 1). 240 kapsiidivalgu koopiast kapsiid katab viiruse genoomi, et moodustada nukleokapsiid, mis paigutub virioni südamikku (Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Nukleokapsiidi ümbritsevasse membraani on ankurdatud virioni välimist valgulist kihti moodustavad glükoproteiinid – E1 ja E2 valgud. Virionis esinevad E1 ja E2 240 heterodimeerina, mis omakorda on koondunud trimeerideks, mis on virioni struktuuris nähtavad kui 80 iseloomulikku ogalaadset struktuuri või piiki (Voss *et al.*, 2010). Need valgud omavad transmembraanseid domeene ning regioone, mis ulatuvad teisele poole membraani, ehk paiknevad virioni sisemuses. Sisemine peptiidne saba on pikem E2 valgul ja see regioon võimaldab interaktsioone kapsiidivalguga. On näidatud, et üks E2 subühik on seondunud ühe C-valgu koopiaga (Tang *et al.*, 2011). Virioni välimise kihi valkudena on alfaviiruste E-valkudel esmatähtis roll viirusosakese seondumisel rakule ning infektsiooni alustamisel – nimelt on E2 alfaviiruste antiretseptoriks ning E1 on oluline endotsütoosi järgse membraanide ühtesulandumise toimumiseks, vabastamaks nukleokapsiid tsütoplasmasse (Hunt *et al.*, 2010; Gibbons *et al.*, 2004). Väikestes kogustes on alfaviiruste virionides esindatud ka valgud 6K ning TF, mille funktsiooni on eelkõige kirjeldatud olulisena viiruse edukama pungumise tagamisel, kuigi koekultuuri tingimustel pole tegu viirusele eluliselt tarvilike valkudega (Ramsey ja Mukhopadhyay, 2017). Kõik alfaviirused kodeerivad ka väikest kolmandat membraanvalku E3, mis mõnel alfaviirusel kuulub virionide koosseisu, aga kõigil mitte (Strauss ja Strauss, 1994).



Joonis 1. Alfaviiruste virioni skemaatiline kujutis. Virioni südamikus paikneb 240 C-valgu koopiast ja ühest koopiast RNA genoomist (hall) nukleokapsiid (kollane). Nukleokapsiidi katab raku päritolu lipiidmembraan (oranž), millesse on kinnitunud ümbrisvalkude E1-E2 240 heterodimeeri (helesinine ja roheline), mis moodustavad 80 ogalaadset struktuuri virioni välispinnal.

1.3. Alfaviiruste genoom

Alfaviiruste genoom on positiivse polaarsusega segmenteerumata RNA molekul, mille pikkus jääb vahemikku 11–12 kb. Genoomi 5’-otsas paikneb 7-metüülguanosiin (m^7G) *cap*-struktuur ja 3’-otsas polüadenüleeritud (polüA) saba, millega viiruse genoom jäljendab peremeesraku mRNA molekulide olulisi elemente. Virioni pakitud genoomi sarnasus mRNA molekulidega on oluline, kuna esimene sünteesisündmus genoomi tsütoplasmasse vabanemise järgselt on translatsioon (Strauss ja Strauss, 1994). Alfaviiruste genoomis on kaks avatud lugemisraami (ORF, *open reading frame*), millest esimene hõivab genoomi 5’-otsast ligikaudu 2/3 ning teine 3’-otsa poolse kolmandiku viiruse genoomist (Kuhn, 2013). (Joonis 2)



Joonis 2. Alfaviiruste genoomi ülesehitus. Genoomi 5’-otsas on *cap*-struktuur ja 3’-otsas polüA saba. Sinisega on kujutatud mittestruktuursete valkude ORF ja kollasega struktuursete valkude ORF. Valkude pikkuste kujutamisel vastavates polüproteiinides on aluseks võetud BFV kodeeritud valgud. ORF-ide otstes on 5’-UTR, 3’-UTR ja kahe ORF-i vahele jääv UTR. Noolega on tähistatud subgenoomse promooteri ligikaudne asukoht.

Otse genoomselt RNA-lt transleeritakse vaid esimene ORF ja selle tulemusena saadakse mittestruktuurne polüproteiin (liit- ehk eelvalk), mis on eellasmolekuliks protsessingu vaheproduktidele ning individuaalsetele mittestruktuursetele valkudele nsP1 (*non-structural protein* 1), nsP2, nsP3 ja nsP4 (Rupp *et al.*, 2015). Mittestruktuurne polüproteiin sünteesitakse reeglina kahes variandis: lühem P123 ja pikem P1234, mis on võimalik, kuna mitmete alfaviiruste nsP3 ja nsP4 jätkupiirkonnas paikneb opaal-stoppkoodon (UGA) (Strauss *et al.*, 1983). Selle juhusliku ülelugemise tulemusena on võimalik transleerida ka väiksemas koguses P1234 valku, mis SINV puhul *in vitro* leiab aset ligikaudu 20% juhtudest (Strauss *et al.*, 1983; Li ja Rice, 1989; de Groot *et al.*, 1990). Ka BFV nsP3 ja nsP4 üleminekualas paikneb stoppkoodon (Lee *et al.*, 1997). On võimalik, et terminaatorjärjestus ja selle ülelugemine mõjutavad viiruse bioloogilisi omadusi. Nii asendab mõnede ONNV ja SFV tüvede puhul stoppkoodonit arginiini koodon, mistõttu sünteesitakse nende viiruste infektsiooni puhul üksnes P1234 polüproteiine, kusjuures SFV tüvi A7(74), mille nsP3 ja nsP4 üleminekualas on just stoppkoodon, põhjustab hiirtel oluliselt leebemaid kliinilisi sümptomeid, kui L10/SFV6 tüved, millel stoppkoodon puudub (Lanciotti *et al.*, 1998; Tuittila *et al.*, 2000; Saul *et al.*, 2015).

Alfaviiruste genoomi teise lugemisraami ehk struktuursete valkude ORF-i ekspressiooniks on eelnevalt vajalikud vahepealsed RNA sünteesiprotsessid – struktuurne polüproteiin transleeritakse nakatatud rakus sünteesitud subgenoomselt RNA-lt (sgRNA). Viimase süntees toimub järgneval: genoomne RNA on matriitsiks esmalt mittestruktuursetele eellasvalkudele,

millega moodustatakse kompleks, mis sünteesib komplementaarse negatiivse polaarsusega RNA molekuli. See moodustab genoomse RNA-ga kaheahelalise RNA (dsRNA) dupleksi ja toimib matriitsina nii uute genoomide kui ka nendest lühemate sgRNA-de sünteesil. Alfaviiruste sgRNA on oma sadestumiskoefitsiendi alusel nimetud ka viiruse 26S mRNA-ks ning sarnaselt alfaviiruste genoomile, on iga sellise molekuli 5'-otsas *cap*-struktuur ning 3'-otsas polüA saba (Strauss ja Strauss, 1994). Subgenoomne promootor ja selle asukoht on alfaviiruste genoomis tugevalt konserveerunud ning selle positsioon kattub mittestruktuurse ORF-i 3'-otsa poolse lõiguga, mis kodeerib nsP4 C-terminaalset otsa (Ou *et al.*, 1982). Struktuursed valgud sünteesitakse samuti esmalt polüproteiinina, kus liitvalgus on individuaalsete liikmete järjekord järgmine: C-PE2(E3+E2)-6K/TF-E1. Peremeesraku ning viiruse kodeeritud ensüümid töötlevad seda polüproteiini etapiviisiliselt eraldiseisvateks C, E1, E2, E3, 6K ja TF valkudeks (Kuhn, 2013).

ORF-e ümbritsevad genoomi mittekodeerivad piirkonnad (UTR, *untranslated region*) ehk otsmised 5'-UTR ja 3'-UTR ning üks UTR kahe lugemisraami vahelises alas (joonis 2). Alfaviiruste UTR-d pole täies ulatuses konserveerunud ning nende pikkus erineb alfaviiruste perekonna lõikes märkimisväärselt: 5'-UTR pikkused jäävad vahemikku 27 nt (SPDV) kuni 85 nt (SFV) ning 3'UTR pikkused vahemikku 87 nt (SPDV) kuni 896 nt (CHIKV) (Hyde *et al.*, 2015; Stapleford *et al.*, 2016). Alfaviiruste UTR-d sisaldavad olulisi promootorjärjestusi genoomi replitseerimiseks, sgRNA sünteesimiseks ja alfaviiruste valkude translatsiooniks vajalikke järjestusi (Hyde *et al.*, 2015). 5'-UTR sisaldab promootorjärjestust, mis on vajalik viiruse genoomi paljundamiseks, kuid otse genoomselt RNA-lt see ei toimu: 5'-UTR-s paiknev järjestus toimib negatiivses ahelas paikneva komplementaarse elemendi kujul (Frolov *et al.*, 2001). Viiruse genoomi efektiivseks replikatsiooniks on absoluutselt vajalik 5'-UTR-s otsmine AU dinukleotiid, mis on alfaviiruste perekonnas tugevalt konserveerunud (Kulasegaran-Shylini *et al.*, 2009). 5'-UTR lähedusse nsP1 kodeerivasse piirkonda paigutub ka genoomi efektiivseks replikatsiooniks oluline 51 nt pikkune konserveerunud enhaanserpiirkond, mille mõju avaldub samuti komplementaarse negatiivse RNA ahela koosseisus. Mutatsioonid selles piirkonnas põhjustavad RNA replikatsioonitaseme langust. See efekt sõltub permeesraku tüübist (selgroogsed või selgrootud) ja seda võivad kompenseerida nsP2 ja nsP3 valkudesse tekkivad mutatsioonid, mis ilmselt taastavad replikatsioonikompleksi valkude efektiivse seondumise enhaanserile (Fayzulin ja Frolov, 2004).

3'-UTR-s on kirjeldatud 19 nt pikkust konserveerunud promootorjärjestust, mis paikneb polüA saba vahetus läheduses ja on absoluutselt vajalik genoomile komplementaarse negatiivse polaarsusega RNA sünteesil. Oluline on ka mõlema UTR piirkonna omavaheline sobivus, sest

5’-UTR käitub negatiivse ahela sünteesil kui distaalne *cis*-element. Tõenäoliselt on erinevates RNA molekuli otstes paiknevate järjestuste ühilduvus vajalik selleks, et ühiselt seondada peremeesraku translatsioonifaktorite abil viiruse genoomile viiruslik replikatsioonikompleks. On näidatud, et SINV replikatsioonikompleks ei suuda kasutada kimäärseid matriitse, mille 5’-UTR pärineb SFV-lt või CHIKV-lt (Frolov *et al.*, 2001; Lello *et al.*, 2020). Viiruse negatiivse polaarsusega RNA sünteesil on määrav ka polüA saba pikkus, mis peab efektiivseks sünteesiks olema vähemalt 11 nt pikkune, ning oluline on selle vahetu järgnemine 19 nt pikkusele konserveerunud järjestusele 3-UTR-s. Tõenäoliselt on see seotud sellega, et replikatsioonikomplekside edukaks seondumiseks on vajalik selle järjestuse interaktsioon raku valguga PABP (*polyA binding protein*) (Hardy ja Rice, 2005).

Subgenoomse 26S RNA promootorjärjestus kattub suures osas alfaviiruste genoomi esimese ORF-i lõpuga (joonis 2). Ka see järjestus toimib komplementaarse negatiivse polaarsusega RNA vahemolekuli koosseisus. Subgenoomse promootori minimaalseks pikkuseks on katseliselt määratud 24 nt ja see võimaldab viirusliku mRNA sünteesi algatamist matriitsahela sisemiselt järjestuselt (Levis *et al.*, 1990). Sellise transkriptsiooni tulemuseks on eraldiseisev genoomist lühem sgRNA, millel on genoomiga identne 3’-ots ning 5’-*cap*, aga unikaalne 5’-UTR, ning mis sisaldab üksnes struktuursete valkude ORF-i (Strauss ja Strauss, 1994).

1.4. Alfaviiruste mittestruktuursed valgud nsP1-nsP4

Alfaviiruste mittestruktuursed valgud nsP1–4 moodustavad viiruse replikatsiooni masinavärgi ehk replikaasi, kus iga komponendi olemasolu on absoluutselt vajalik viiruste edukaks paljundamiseks peremeesrakus. nsP-d sünteesitakse rakus esmalt P123 (nsP1, nsP2, nsP3) ja/või P1234 (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) polüproteiinina, sõltuvalt konkreetsest alfaviirusest või selle tüvest (Kuhn, 2013). Mittestruktuursed polüproteiinid lõigatakse järk-järgult lühemateks liitvalkudeks ning eraldiseisvateks nsP-deks. See võimaldab nende valkude funktsioonide avaldumist nii liitvalkudena kui ka individuaalsete komponentidena (Strauss ja Strauss, 1994).

1.4.1. nsP1

nsP1 (~60 kDa) täidab infektsiooni käigus mitut funktsiooni, nagu ka alfaviiruste ülejäänud mittestruktuursed valgud. Kuna alfaviirused on RNA-genoomsed viirused, mille genoomi paljundamine ja sgRNA süntees leiab aset just raku tsütoplasmas, siis peavad alfaviirused ise kandma hoolt selle eest, et neile transkriptidele lisatakse ka vajalik 5’-*cap*, mille eest vastutab suuresti nsP1. Ensümaatiliselt on nsP1-l kirjeldatud kahte funktsionaalsust, mis on mõlemad seotud viiruse genoomsele ja sgRNA-le korrektse *cap*-struktuuri lisamisega (Kuhn, 2013). nsP1

on viiruse kodeeritud metüültransferaas, mis vahendab metüülrühma lisamist 5'-*cap* sünteesil, viies läbi reaktsiooni GTP metüleerimiseks positsioonist N7, kus metüülrühma doonoriks on S-adenosüülmetioniin ning reaktsiooniproduktiks on 7-metüül-GTP (m^7GTP) (Laakkonen *et al.*, 1994). Seejärel leiab aset m^7GTP reaktsioon nsP1-ga, kus moodustub kompleks m^7GMP-nsP1, kusjuures metüleerimisreaktsioon on eelduseks m^7GMP-nsP1 kompleksi moodustumisele. Sellele järgnevalt saab nsP1 täita oma teist ensümaatilist funktsiooni guanülüültransferaasina, et kanda nüüd *cap*-struktuur üle vastsünteesitud viiruslikele mRNA-dele (Ahola ja Kääriäinen, 1995). Kovalentse sideme süntees moodustamaks m^7GMP-nsP1 kompleksi toimub üle konserveerunud histidiini jäägi, mis SFV nsP1-s on aminohappejääk H38. Selle aminohappejäägi muteerimisel on nsP1 guanülüültransferaasina jõetu, kuid metüültransferaasne aktiivsus säilib, mis viitab asjaolule, et nsP1-s on need ensümaatilised aktiivsused üksteisest struktuurselt lahus (Ahola *et al.*, 1997). Vastsünteesitud genoomse RNA ja sgRNA 5'-otsad vajavad eelnevalt ühe fosfaatrühma, γ-fosfaadi, eemaldamist, mille eest vastutab viiruse kodeeritud RNA trifosfataas nsP2 ja sellega saab nsP1 lõpule viia 5'-*cap* lisamise viiruse RNA-dele (Vasiljeva *et al.*, 2000).

Alfaviiruste RNA süntees toimub membraanidel paiknevate replikatsioonikomplekside vahendusel, kus nsP1 rolliks on mobiliseerida replikaasi komponendid raku membraanidele (Rupp *et al.*, 2015). Membraanidega seondumine arvatakse olevat vahedatud amfipaatse α-heeliksi poolt, mis paikneb nsP1 primaarjärjestuse keskosas. SFV puhul on seda heeliksit määravaks kogum positiivse laenguga ning hüdrofoobseid aminohappeid, mis jäävad aminohappejääkide 245 ning 264 vahele (Spuul *et al.*, 2007). nsP1 hüdrofoobne iseloom on tagatud ka valgu post-translatsioonilise modifitseerimisega, kus SFV puhul palmitüleeritakse positsioonides 418–420 paiknevaid tsüsteiini jääke (Laakkonen *et al.*, 1996). SFV palmitüleerimissaitide eemaldamisel asendusmutatsioonidega (tsüsteiinide asendamisel alaniinidega) on nsP1 jätkuvalt membraanidele seonduv, kuigi interaktsioon membraanidega on nõrgem (Ahola *et al.*, 1999). On näidatud, et sellised viirused pseudoreverteeruvad, ehk nsP1-s tekivad täiendavad, kompenseerivad mutatsioonid, mis taastavad viiruse RNA replikatsiooni (Žusinaite *et al.*, 2007). Selliste palmitüleerimise suhtes puudulike SFV mutantide infektsioon hiiremudelis on, vastupidiselt letaalsele metsiktüüpi viirusele, väga leebe ning samuti ei nakata mutantne viirus ajukude (Ahola *et al.*, 2000). Palmitüleerimise tähtsus pole siiski kõikidel alfaviirustel ühesugune – SINV puhul ei põhjusta see olulist replikatsioonidefekti, aga samas on CHIKV puhul palmitüleerimist blokeerivad mutatsioonid viirusele letaalsed (Žusinaite *et al.*, 2007; Utt *et al.*, 2019).

1.4.2. nsP2

nsP2 (~90 kDa) on suurim alfaviiruste kodeeritud mittestruktuurne valk, millel on ka enim ensümaatilisi funktsioone (Kuhn, 2013). Ülal on mainitud nsP2 funktsioon RNA trifosfataasina, mis on vajalik viiruslike mRNA-de ettevalmistamiseks enne 5'-*cap*-struktuuri lisamist ja see aktiivsus paikneb nsP2 N-otsa poolses piirkonnas. Selleks, et viiruse sünteesitavatele mRNA-dele lisataks 5'-*cap* struktuur, hüdrolüüsib nsP2 vastsünteesitud viiruse genoomse RNA ning sgRNA 5'-otsas γ- ja β-fosfaatide vahelise sideme, millega on need molekulid ette valmistatud substraatideks m^7GMP-nsP1 kompleksile (Vasiljeva *et al.*, 2000). nsP2 RNA helikaasne aktiivsus ning viimast energeetiliselt käivitav nukleosiid-trifosfataasne funktsioon paiknevad samuti valgu N-terminaalses domeenis (Rikkonen *et al.*, 1994a; Gomez de Cedrón *et al.*, 1999). Eeldatavalt on helikaasi funktsiooniks lahti harutada viiruse RNA replikatsiooni järgselt moodustuvaid sekundaarstruktuure ning kaheahelaliseid RNA (dsRNA) vahevorme (Das *et al.*, 2014). nsP2 RNA helikaasne domeen seondab RNA-d järjestusspetsiifiliselt. Selles sidumises on oluline roll hüdrofoobsetel *stacking*-interaktsioonidel RNA aluste ja nsP2 aromaatsete aminohappejääkide vahel (Law *et al.*, 2019).

nsP2 C-terminaalne domeen sisaldab polüproteiini protsessimise eest vastutavat proteaasi (Hardy ja Strauss, 1989). nsP2 lõikab polüproteiine nsP-de üleminekupiirkondades spetsiifilistest lõikesaitidest, kus proteaas toimib lõikesaidist sõltuvalt kas *in cis* või/ja *in trans*. Esmalt eraldatakse P1234 polüproteiinist nsP4, et käivitada alfaviiruste replikaasi RNA-sid sünteesiv potentsiaal, kus P123+nsP4 kompleks sünteesib genoomile komplementaarseid negatiivse polaarsusega RNA-sid, see lõikamine leiab aset *in cis* (Hardy ja Strauss, 1989). nsP1-nsP2 vahelise lõikesaidi protsessimine toimub samuti *in cis*, kuid P23 lõikamine leiab aset üksnes *in trans*. nsP1 lõikamisel polüproteiinist vabaneb nsP2 N-terminus ja see aktiveerib nsP2 võime P23 liitvalgu lõikamiseks (Vasiljeva *et al.*, 2003). VEEV nsP2 ning SINV P23 liitvalgu kristallstruktuuride määramine ning analüüs näitas, et P23 lõikesait on proteaasi domeenile ja aktiivsaidile *in cis* lõikamiseks steeriliselt kättesaamatu (Russo *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2012).

nsP2 kristallstruktuuri määramisel kirjeldati C-terminaalses piirkonnas ka metüültransferaasi laadse domeeni olemasolu, mille puhul aga puuduvad vastavate ensüümide aktiivsaitidele omased aminohappejäägid ning metüültransferaasset aktiivsust pole ka nsP2 puhul kirjeldatud (Russo *et al.*, 2006; Rupp *et al.*, 2015). Küll aga on näidatud selle domeeni osalust ja olulisust negatiivse polaarsusega RNA-de sünteesil ning peremeesraku translatsiooni allasurumisel (Mayuri *et al.*, 2008). Seda domeeni on kirjeldatud väga aluselisena ning seetõttu on oletatud, et antud domeen vastutab ka viiruse RNA-le seondumise eest (Das *et al.*, 2014).

Infektsiooni käigus lokaliseerub nsP2 esmalt tsütoplasmaatiliselt. Siiski on replikatsioonikompleksidega seotud vaid väike osa nsP2 üldhulgast, kuna osa valgust jääb difuusselt tsütoplasmasse ja ligikaudu 50% rakus leiduvast nsP2-st liigub rakutuuma. Seda võimaldab nsP2-s paiknev tuumalokalisatsiooni signaal (*nuclear loclization signal*, NLS) (Peränen *et al.*, 1990; Rikkonen *et al.*, 1994b). Vana Maailma alfaviiruste nsP2 lokalisatsioon rakutuumas on osa viiruse taktikast maha suruda peremeesrakus transkriptsioon ja sellega organismi esmane vastus viiruse sissetungile, ühtlasi on nsP2 alfaviiruste peamine determinant tsütotoksilisuseks (Garmashova *et al.*, 2006). nsP2 ümberlokaliseerumisel rakutuuma lagundatakse seal RNA polümeraas II katalüütiline subühik Rpb1. Huvitaval kombel ei osale selles nsP2 enda proteolüütiline domeen, selle asemel indutseerib nsP2 seondumine Rpb1-le viimase ubikvitüleerimist ning lagundamist rakuliste proteasoomide poolt. Rpb1 lagundamine nsP2 osalusel toimub nii viiruse infektsiooni kontekstis kui ka nsP2 individuaalsel ekspresseerimisel selgroogsete rakkudes (Akhrymuk *et al.*, 2012). Märkimisväärne on ka see, et sääseliste rakuliinide nakatamisel transporditakse nsP2 samuti rakutuuma, kuid sellele ei järgne Rpb1 degradeerimist ning viiruse infektsioon neis rakkudes ei ole tsütopaatiline, vaid hoopis persistentne (Akhrymuk *et al.*, 2012).

1.4.3. nsP3

nsP3 (~60 kDa) ülesehituses on kirjeldatud kolme domeeni: N-terminaalne makrodomeen, keskmine alfaviiruste unikaalne domeen (*alphavirus unique domain*, AUD) ning C-terminaalne hüpervariaabel domeen (*hypervariable domain*, HVD) (joonis 9A) (Rupp *et al.*, 2015).

nsP3 ainsaks teadaolevaks ensümaatiliseks aktiivsuseks on ADP-riboos hüdrolaasne aktiivsus, mis paikneb valgu makrodomeenis ja eemaldab mono-ADP-ribosüleeritud valkudelt ADP-riboose. Viimase olulisust on näidatud CHIKV infektsiooni korral, kus nsP3 ADP-hüdrolaasse aktiivsuse maha surumisel on hiirte nakatamisel häiritud neurovirulentsus ning koekultuuri tingimustel on pärsitud viiruse replikatsioon hiire ajukoe päritolu rakukultuuris (McPherson *et al.*, 2017). Sama domeeni kaudu seob nsP3 ka RNA-d ning ADP-riboose (Malet *et al.*, 2009). Viimased on substraadiks rakulistele polü-ADP-riboosi polümeraasidele (*poly*-ADP-*ribose polymerase*, PARP), mis modifitseerivad post-translatsiooniliselt mitmeid valke. Nende aktiivsusest sõltub osalt peremeesrakkude võimekus indutseerida tüüp-I interferoonide (IFN) ülest vastust viiruse infektsioonile ning nende omadus suruda alla peremeesrakus translatsiooni, millest sõltub ka alfaviiruste valgusüntees ning seega ka viiruse replikatsioon. Seega on võimalik, et alfaviiruste nsP3 toimib ADP-ribooside seondamisega vastu PARP-de viirusvastasele toimele (Atasheva *et al.*, 2014).

nsP3 keskmine domeen AUD on alfaviiruste perekonnas tugevalt konserveerunud, kuid väljaspool alfaviiruste perekonda sellist järjestust leitud pole ja see asjaolu on andnud domeenile ka vastava nime (Rupp *et al.*, 2015). Liitvalgu P23 osalise kristallstruktuuri määramisel näidati, et antud valgujärjestus nsP3-s seondab tsinkioone üle konserveerunud tsüsteiini jääkidest koosneva piirkonna, mistõttu nimetatakse AUD-d kirjanduses ka tsinki siduvaks domeeniks või ZBD-ks (*zinc binding domain*) (Shin *et al.*, 2012; Rupp *et al.*, 2015). SINV põhisel mutatsioonanalüüsil, kus vastavad tsüsteiini jäägid vahetati välja alaniinide vastu, täheldati viiruse mittestruktuurse polüproteiini ekspressiooni puudulikkust, mistõttu ei saa ka toimuda viiruse replikatsiooni, kuid antud omadus pole täpsemat kirjeldamist leidnud (Shin *et al.*, 2012). AUD on vajalik replikatsiooniks nii selgroogsete rakkudes kui ka putukarakkudes ning seondab spetsiifiliselt ja mittespetsiifiliselt viiruse RNA-d (Gao *et al.*, 2019).

Alfaviiruste nsP3 valgud on küllaltki erinevate pikkustega. Kuna makrodomeeni ja AUD järjestused ja pikkused on konserveerunud, tulenevad need erinevused viiruste nsP3 valkude C-terminaalse domeeni madalast konserveeritusest: nii HVD järjestused kui ka pikkused varieeruvad üsna suurel hulgal, millest ka domeeni nimetus. Näiteks on ONNV nsP3 pikkuseks 570 aminohappejääki, aga BFV nsP3 pikkuseks 469 aminohappejääki (Götte *et al.*, 2018). Et HVD-l puudub konkreetne ruumiline struktuur, siis on antud domeen üsna vastuvõtlik deletsioonidele ning suurematele insertsioonidele, võimaldades nsP3 C-terminaalse piirkonna vahendusel luua markervalke ekspresseerivaid alfaviiruseid. Sellised viirused võimaldavad visuaalselt hinnata infektsioonilise viiruse olemasolu eksperimentide läbiviimisel ning analüüsida nsP3 (ko)lokalisatsioone rakkudes (Gorchakov *et al.*, 2008b; Frolova *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2016; Frolov *et al.*, 2017; Liang ja Li, 2005).

nsP3 on post-translatsiooniliselt modifitseeritud valk, mille HVD-s paiknevad seriini ja treoniini jäägid on substraadiks peremeesraku kinaasidele. Eksperimentaalne kinnitus nsP3 fosforüleerimisele on leitud SFV ja SINV korral, aga ka ONNV ja CHIKV puhul, mistõttu võib eeldada, et see on alfaviiruste perekonnas üldlevinud modifikatsioon (Peranen *et al.*, 1988; Vihinen ja Saarinen, 2000; Dé *et al.*, 2003; Teppor *et al.*, 2020, käsikiri retsenseerimisel). SFV ja SINV mutatsioonanalüüsidega näidati, et nsP3 fosforüleerimine pole nende viiruste replikatsiooniks absoluutselt vajalik: mutantsete viiruste kasvukineetika oli tagasihoidlikum vaid varajastes ajapunktides ja fosforüleerituse puudumise tagajärjeks oli ka negatiivse polaarsusega RNA-de madalam sünteesitase (Vihinen *et al.*, 2001; Dé *et al.*, 2003). Samas on näidatud meie laboris läbiviidud uurimuses, et see pole nii kõikide alfaviiruste puhul, kuna fosforüleerimissaitide eemaldamine muudab CHIKV genoomi mitteinfektsiooniliseks (Teppor *et al.*, 2020, käsikiri retsenseerimisel).

nsP3 mitte-ensümaatilistest funktsioonidest ja nende tähtsusest rakus on rohkem teada. Lisaks mainitud fosforüleerimisele on teada, et nsP3 HVD interakteerub mitmete permeesraku valkudega (Götte *et al.*, 2018). Enam on uuritud näiteks Vana Maailma alfaviiruste HVD interaktsioon Ras-GTPaase aktiveerivaid valke seondavate valkudega (Ras-GTP*ase-activating protein binding proteins*, G3BP), mis vahendavad rakkudes keskkonnast tulenevate stressivastuste või ka viiruse infektsiooni korral stressigraanulite moodustumist, mis takistavad translatsiooni toimumist (Tourrière *et al.*, 2003; Panas *et al.*, 2014). nsP3 seondumine G3BP valkudele lagundab stressigraanuleid ning takistab G3BP kaasatust stressigraanulite moodustumisel ning seega translatsiooni mahasurumisel, millel on oma kasu viiruse valgusünteesil ning replikatsioonil (Panas *et al.*, 2012). Kuigi nsP3 toimib eelmainitud funktsiooni suhtes G3BP antagonistina, siis G3BP seondumise puudumisel on CHIKV replikatsioonile tugevalt negatiivne mõju. Sellest saab järeldada, et G3BP-l on osalus viiruse replikatsioonikomplekside koosseisus, ning seda on ka näidatud SFV ja CHIKV infektsioonil (Panas *et al.*, 2012; Scholte *et al.*, 2015). Entsefaliiti põhjustava Uue Maailma alfaviiruse VEEV nsP3 HVD interakteerub G3BP asemel teiste stressigraanulite moodustumisel oluliste valkudega FXR (*Fragile-X-related proteins*). Sellel interaktsioonil on analoogne efekt replikatsioonikompleksi moodustumisele ning RNA replikatsioonile (Kim *et al.*, 2016). EEEV nsP3 HVD seondub huvitaval kombel nii FXR kui ka G3BP valkudega, eeldatavasti on selle taktika eesmärgiks peremeesrakkude ringi laiendamine (Frolov *et al.*, 2017). Teine peremeesraku valk, millega HVD seondub ja mis on mõne alfaviiruse (CHIKV, ONNV) replikatsiooniks absoluutselt vajalik, on FHL1 (Meertens *et al.*, 2019). Lisaks nimetatutele, seondub nsP3 üle HVD veel väga mitmete peremeesraku valkudega, näiteks amfifüsiinidega (*amphifysin*), YBX1-ga, Hsc70-ga, Hsp90-ga, IKKβ-ga jt., kasutamaks neid replikatsioonikomplekside stabiliseerimisel või mõjutades rakkude viirusvastaste protsesside toimet (Götte *et al.*, 2018; Lark *et al.*, 2018). Erinevalt G3BP ja FHL1 valkudest on nende faktorite mõju alfaviiruse infektsioonile tavaliselt väike. Käesolevaga sai mainitud vaid väga väike osa pikast (ja ilmselt täienevast) nimekirjast valkudest, millega nsP3 interakteerub ja mis toimub suuresti üle HVD. See illustreerib praegust arusaama alfaviiruste nsP3 olulisusest kui laialdasest interaktsioonide vahendajast viiruse replikaasi ning peremeesraku valkude vahel (Götte *et al.*, 2018; Lark *et al.*, 2018).

nsP3 lokalisatsiooni rakus on kirjeldatud tsütoplasmaatilisena. Osa nsP3 valgust lokaliseerub replikatsioonikompleksides ja on koos muude replikaasi kompleksi valkudega seotud erinevate membraansete struktuuridega (Peränen *et al.*, 1988; Pietilä *et al.*, 2018). Lisaks sellele moodustab nsP3 ka üsna suuri tsütoplasmaatilisi fookuseid, milles puuduvad membraanid ja

viiruse ülejäänud replikaasi valgud. Selliste agregaatide moodustamist on seostatud interaktsioonidega rakuliste valkudega (Peränen *et al.*, 1988; Vihinen *et al.*, 2001; Gorchakov *et al.*, 2008b; Panas *et al.*, 2012; Liang ja Li, 2005). Minu bakalaureusetöö raames kirjeldasime alfaviiruste perekonnas seni teadaolevalt ainulaadset BFV nsP3 omadust ümberlokaliseeruda rakutuuma, mis on tähelepanu all ka käesolevas magistritöös (Omler, 2017).

1.4.4. nsP4

Kuigi kõik nsP-d on vajalikud funktsionaalsete replikatsioonikomplekside moodustamiseks, siis nsP4 (~70 kDa), millel on RdRp aktiivsus, vastutab kompleksis otseselt viiruse RNA-de sünteesimise eest (Kuhn, 2013). nsP4 on alfaviiruste mittestruktuursete valkude seas kõige tugevamalt konserveerunud (Khan *et al.*, 2002). nsP4 suurem C-terminaalne domeen on järjestuselt sarnane teiste viiruste RdRp-dega, kuid lühemat N-terminaalset domeeni on kirjeldatud vaid alfaviiruste perekonnas (Kamer ja Argos, 1984; Rupp *et al.*, 2011).

nsP4 N-terminuses paikneb konserveerunud türosiini jääk, mis destabiliseerib nsP4 valku. Selle tulemusena lagundatakse rakus väljaspool replikatsioonikompleksi paiknev nsP4 proteasoomide poolt ja sellisel viisil reguleeritakse nsP4 vaba hulka rakus (de Groot *et al.*, 1991). Teine mehhanism vähendamaks nsP4 hulka on juba eelnevalt mainitud UGA stoppkoodoni paiknemine nsP3-nsP4 üleminekualas. Nende mehhanismide tõttu on nakatatud rakkudes nsP4 vähem, kui teisi mittestruktuurseid valke (Strauss *et al.*, 1983; Li ja Rice, 1989). N-terminaalse domeeni kaudu interakteerub nsP4 ülejäänud replikatsioonikompleksi komponentidega. Ka ei ole N-terminaalne nsP4 deletsioonimutant võimeline alustama RNA sünteesi, aga samas täispikk nsP4 sünteesib P123 juuresolekul negatiivse polaarsusega RNA-sid (Tomar *et al.*, 2006; Rubach *et al.*, 2009). Sellest eeldati, et P123+nsP4 kompleksil on roll lisaks nsP4 stabiliseerimisele ka viimase koordineerimisel UTR-dele ning neis paiknevatele promootorelementidele (Tomar *et al.*, 2006; Rubach *et al.*, 2009).

Lisaks nsP4 omadusele sünteesida RNA-d tsütoplasmas omab nsP4 ka teist viirusele vajalikku ensümaatilist aktiivsust, mis peremeesrakkudes on üksnes rakutuumas toimuv. nsP4 on terminaalne adenülüültransferaas, mis vastutab viiruse genoomile ning sgRNA-le polüA saba lisamise eest. See on vajalik sellepärast, et viiruse negatiivse RNA sünteesi alguspunkt paikneb vahetult polüA järjestuse ees, ehk seetõttu puudub negatiivse polaarsusega RNA komplemendis polüA sabale vastav polüU järjestus (Tomar *et al.*, 2006).

1.5. Alfaviiruste struktuursed valgud

Alfaviiruste struktuursed valgud ekspresseeritakse sgRNA-lt liitvalguna, milles on valkude järjestuseks C-PE2(E3+E2)-6K-E1 ja mille sünteesile järgneb proteolüütiline protsessimine lühemateks liitvalkudeks ning eraldiseisvateks valkudeks (Kuhn, 2013).

Kapsiidivalgu (C) C-terminaalne domeen omab proteaasset aktiivsust. Tegemist on ühekordselt toimiva seriinproteaasina, mis lõikab kotranslatsiooniliselt sünteesitavat liitvalku. Lõikamine toimub C-valgu järjestuse järel ning *in cis*, lõikamise järgselt proteaasne aktiivsus inaktiveeritakse (Choi *et al.*, 1991). C-valgu N-terminaalne domeen vahendab kapsiidi seondumist RNA-ga. See on vajalik nukleokapsiidi moodustumiseks ja enamikel alfaviirustel tagab viiruse genoomi pakkimiseks vajaliku spetsiifilisuse pakkimissignaali äratundmine. Sõltuvalt viirusest paikneb pakkimissignaal alfaviiruste nsP1 või nsP2 valke kodeerivates piirkondades (Weiss *et al.*, 1989; Owen ja Kuhn, 1996; Frolova *et al.*, 1997). Nukleokapsiidi koosseisu kuulub 240 koopiat C valku. Nukleokapsiidi moodustumiseks ja stabiilsuseks on olulised ka C-valkude omavahelised interaktsioonid. Üheks selliseks on C-valgu dimeriseerimine, mida vahendab N-terminaalne domeen (Hong *et al.*, 2006). Kapsiidivalk täidab ka muid funktsioone. Näiteks täidab Uue Maailma alfaviiruste C-valk sarnast funktsiooni Vana Maailma alfaviiruste nsP2-le, inhibeerides peremeesraku transkriptsiooni (Garmashova *et al.*, 2007a). Uue Maailma alfaviiruste C-valk lokaliseerub samuti rakutuuma, kuid ei põhjusta seal RbpI lagundamisele suunamist. Selle asemel seondub kapsiidivalk tuumaporiini kompleksile takistades valkude ning mRNA-de transporti rakutuuma ja tsütoplasma vahel (Garmashova *et al.*, 2007a, 2007b). Seda võimaldavad VEEV kapsiidivalgu N-terminaalses domeenis paiknevad tuumseks ekspordiks ja impordiks vajalikud signaaljärjestused, mis käivitavad erinevatesse suundadesse toimuva transpordi, mis lõppkokkuvõttes ei vii kuhugi ja tagatakse C-valgu püsimine tuumapoorides (Atasheva *et al.*, 2010a).

E1 ja E2 on alfaviiruste glükoproteiinid, mis moodustavad virioni välimise kihi või ümbrise. Nagu on kirjeldatud ka ülal virioni struktuuri kirjeldavas alapeatükis, moodustavad 240 E1-E2 heterodimeeri 80 trimeerset ogalaadset struktuuri (Strauss ja Strauss, 1994). Ehkki tegemist on membraanvalkudega, paiknevad nad tihedalt teineteise kõrval moodustades katkematu valgukihi, mille all paiknev membraan ei ole seetõttu eksponeeritud väliskeskkonda (Strauss ja Strauss, 1994). E2 on virioni pinnal kaugemale ulatuv ning selle ektodomeen vahendab peremeesraku retseptoritele seondumist (Dubuisson ja Rice, 1993; Mukhopadhyay *et al.*, 2006). E1, mille ektodomeenis paikneb sulandumispeptiid (*fusion peptide*), vahendab viiruse ning nakatatava raku membraanide ühte sulandumist. Selle funktsiooni käivitabki sulandusmipeptiidi eksponeerimine virioni pinnale, mis leiab aset peale viiruse sisenemist

rakku endosomaalsetes vesiikulites. Nagu ka paljude muude viiruste membraanvalkude puhul on ka E1 valgu struktuurseks ümberkorraldamiseks oluline ümbritseva keskkonna pH taseme langemine (Wahlberg *et al.*, 1992; Mukhopadhyay *et al.*, 2006). Viiruse membraani on E1 ja E2 ankurdatud transmembraansete heeliksitega nii, et mõlema valgu C-terminaalne saba paikneb membraani sisemisel küljel. SINV E1 valgu C-terminaalne saba on kõigest kuue aminohappejäägi pikkune ja selle puudumine ei pärsi virionide komplekteerimist (Barth *et al.*, 1992). SINV E2 C-terminaalne 33 aminohappejäägi pikkune saba seondub aga virioni sisemuses nukleokapsiidiga ning on seega terviklike virionide moodustumiseks oluline (Hernandez *et al.*, 2005). E1 ja E2 glükosüleeritakse ja palmitüleeritakse tsütoplasmavõrgustikus (ER). Glükosüleeritud aminohappejäägid paiknevad ümbrisvalkude ektodomeenides, kus need modifikatsioonid on olulised efektiivseks retseptori seondamiseks ning membraanide ühte sulamisel oluliste konformatsiooniliste muutuste koordineerimiseks. Glükosüleerimise suhtes puudulikud SINV mutandid on vähem neurovirulentsed ning nende replikatsioon on koekultuuri tingimustel oluliselt aeglasem (Knight *et al.*, 2009). Lisaks glükosüleerimisele toimub ka E1 ja E2 valkude palmitüleerimine. Palmitüleerimissaidid paiknevad transmembraansete heeliksite läheduses ning eeldatavalt aitavad siduda ümbrisvalke lipiidsetele membraanidele (Schmidt, 1982; Strauss ja Strauss, 1994).

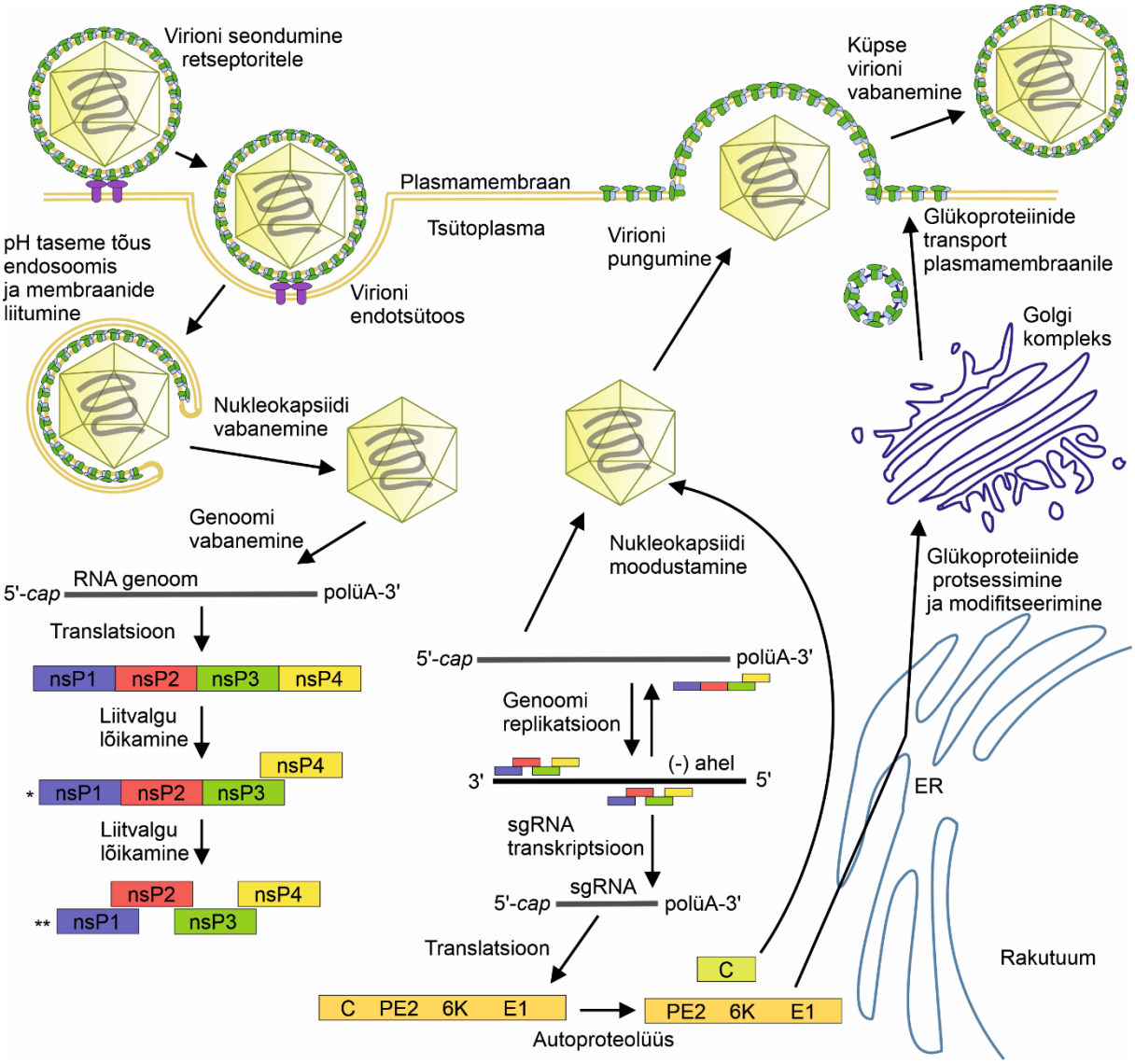
Enamus struktuurse liitvalgu protsessingu vaheprodukte on suhteliselt ebastabiilsed. Erandiks on PE2 (tuntud ka kui p62), mis vastab valmis E3 ja E2 valkudele. PE2-E1 kompleksi proteolüütilisel töötlemisel küpseks ümbrisvalkude kompleksiks vabaneb peale E2 valgu ka lühike ~65 aminohappejäägist koosnev valk E3 (Snyder ja Mukhopadhyay, 2012). Tegu pole virionide koosseisus tingimata vajaliku komponendiga ning kõikide alfaviiruste virionides seda valku ka pole, näiteks on E3 olemas SFV virionides, kuid SINV virionides mitte (Strauss ja Strauss, 1994). E3 roll seisneb hoopis virionide korrektses komplekteerimises. Nimelt stabiliseerib E3 PE2-E1 komplekse nende transpordil ER-st Golgi kompleksi ning aitab vältida ümbrisvalkude komplekside enneaegset trimeriseerumist (Snyder ja Mukhopadhyay, 2012).

Lühikesed valgud 6K ning TF on alfaviiruste virionides esindatud väiksemates kogustes (Kuhn, 2013). Mõlema valgu süntees struktuurse polüproteiini koosseisu algab ühelt ja samalt järjestuselt, ehk oma N-terminaalses osas on 6K ja TF identsed. Küll aga erinevad nende valkude C-terminaalsed osad. Seda põhjustab translatsiooni käigus umbes 15% juhtudel toimuv -1 ribosomaalne raaminihe, mille korral sünteesitakse C-otsast pikem valk TF (Firth *et al.*, 2008). Need väikesed valgud pole virioni struktuuri jaoks määrava tähtsusega ja nende funktsioonid pole selged. Näidatud on, et 6K/TF kodeeriva piirkonna deleteerimisel genoomist on viiruste replikatsioonitase oluliselt madalam metsiktüüpi viiruste omast. Ka on näidatud

6K/TF valkude olulisust virionide pungumise efektiivse toimumise jaoks (Ramsey ja Mukhopadhyay, 2017).

1.6. Alfaviiruste infektsioonitsükkel

Alfaviiruste infektsioonitsüklit on kokkuvõtvalt kujutatud joonisel 3. Nagu ka teistel viirustel, algab infektsioon sobivate retseptorite sidumisega. Alfaviiruste retseptoreid on iseloomustatud mitmeid, aga mitte ühtki neist pole kirjeldatud universaalsetena kogu perekonna lõikes (Kuhn, 2013). Laminiinide retseptorite vahendatud seondumist imetajarakkudele on näidatud SINV puhul ning seondumist putukarakkudele VEEV puhul (Wang *et al.*, 1992; Ludwig *et al.*, 1996). EEEV ja SINV puhul on kirjeldatud ka heparaansulfaatide osalust virionide seondumisel peremeesraku välispinnale (Smit *et al.*, 2002; Gardner *et al.*, 2011). See interaktsioonilt soodustab üksnes virionide tugevamat seondumist peremeesraku plasmamembraanidele, kuid ei kutsu esile viiruse rakku sisenemiseks tarvilikke konformatsioonilisi muutusi ümbrisvalkudes (Kuhn, 2013). Infektsiooni alustamiseks putuka- ja imetajarakkudes SINV seondub ka NRAMP (*natural resistance-associated macrophage protein*) valkudele (Rose et al., 2011). Hiljuti tuvastati Mxra8 (*matrix remodeling associated* 8) roll mitmete alfaviiruste retseptorina. Mxra8 on retseptoriks CHIKV, RRV, MAYV, ONNV ja BFV puhul, mille rakkude nakatamise efektiivsus oli Mxra8-st sõltuv. Samas ei mõjutanud Mxra8 olemasolu või puudumine SFV, UNAV ja MIDV infektsiooni (Zhang *et al.*, 2018).



Joonis 3. Alfaviiruste infektsioonitsükkel. Infektsioon algab virioni seondumisega peremeesraku retseptoritele. Järgneb virioni sisenemine rakku klatriin-sõltuva endotsütoosiga ja endosomaalse keskkonna pH langedes eksponeeritakse virioni pinnal sulandumispeptiid, et saaks toimuda viiruse ja endosoomi membraanide liitumine ja nukleokapsiidi vabanemine tsütoplasmasse. Nukleokapsiidi lagundamisega vabaneb tsütoplasmasse viiruse RNA genoom, millelt transleeritakse mittestruktuurne polüproteiin P1234. P1234 liitvalku lõigatakse esmalt *****varajaseks replikatsioonikompleksiks (P123+nsP4), mis sünteesib negatiivse polaarsusega genoomi komplemente [(-) ahel]. Infektsiooni kulgedes lõigatakse polüproteiinid individuaalseteks nsP-deks, et panna alus ******hilisele replikatsioonikompleksile (nsP1+nsP2+nsP3+nsP4), mis sünteesib negatiivse polaarsusega matriitsahelalt genoomset ja sgRNA-d. sgRNA-lt transleeritakse struktuurne liitvalk, millest C-valk lõigatakse autoproteolüütiliselt ning mis koos vastsünteesitud genoomse RNA-ga moodustavad nukleokapsiidi. Glükoproteiinid lõigatakse ja protsessitakse liitvalkude transpordil läbi ER ja Golgi kompleksi. Golgi kompleksist transporditakse küpsed protsessitud E1-E2 heterodimeerid, mis moodustavad omakorda trimeere, plasmamembraanile. Moodustunud nukleokapsiid seondub plasmamembraanil glükoproteiinidega, et viia läbi virioni pungumine ja vabanemine rakust.

Alfaviiruste virionid sisenevad rakku klatriin-sõltuva endotsütoosiga ja selle protsessi tulemusena paigutub virion esmalt endosomaalsetesse vesiikulitesse (DeTulleo ja Kirchhausen, 1998). Endosoomide keskkonna hapestumine põhjustab E1 hüdrofoobse sulandumispeptiidi

eksponeerimise, millele järgneb vesiikuli membraanis avade moodustumine ning nukleokapsiidi vabanemine tsütoplasmasse (Hammar *et al.*, 2003). (Wahlberg *et al.*, 1992; Kielian ja Rey, 2006). Nukleokapsiidi lagundamisel seovad ribosoomid kapsiidivalke ning see interaktsioon nõrgestab sidemed C-valkude ja viiruse genoomse RNA vahel ning päädib viimase vabanemisega tsütoplasmasse (Singh ja Helenius, 1992).

Alfaviiruste RNA süntees toimub membraanseoseliselt: infektsiooni varajastes etappides plasmamembraanil ning hiljem modifitseeritud endosoomidel ja lüsosoomidel, mida ühiselt nimetatakse tsütopaatilisteks vesiikuliteks (*cytopathic vesicle*, CPV) (Grimley *et al.*, 1972). Viiruse replikatsioonikompleksid kujutavad endast väikeseid, ligikaudu 50 nm läbimõõduga membraanseid sfääruleid (Froshauer *et al.*, 1988; Peränen *et al.*, 1995). Sfäärulid on algselt sopistunud plasmamembraani välisküljele ja hiljem CPV-de sisemusse (Spuul *et al.*, 2010). Sfääruli sisemust, milles paikneb replikatiivne dsRNA vahevorm, ühendab tsütoplasmaga kaela struktuur, mis vahendab nukleotiidide ja RNA-de transporti sfääruli õõnsuse ning tsütoplasma vahel ning kaelapiirkonnas paiknevas avauses on viiruse replikaasi valgud (Frolova *et al.*, 2010; Spuul *et al.*, 2010).

Alfaviiruste erinevat laadi RNA-de süntees (negatiivse polaarsusega genoomse RNA komplement, sgRNA ja genoomne RNA) ei toimu üheaegselt, vaid teatud ajalises järjestuses. Selle taga on asjaolu, et kindlat tüüpi RNA-sid sünteesivad erineva koostisega replikatsioonikompleksid, milles on vahelduvateks komponentideks mittestruktuursed liitvalgud ning eraldiseisvad nsP-d. Selle ajatelje kujunemisel ja reguleerimisel on keskne roll mittestruktuurse polüproteiini protsessimisel (Rupp *et al.*, 2015). Viiruse genoomilt transleeritakse esmalt polüproteiin P1234. Selle protsessimise tulemusel moodustuv varajane replikatsioonikompleks P123+nsP4 sünteesib negatiivse polaarsusega genoomse RNA komplementi, mis seondudes genoomse RNA-ga moodustab dsRNA vahevormi (Shirako ja Strauss, 1994; Gorchakov *et al.*, 2008b). Järgnevalt moodustub väga lühiajaliselt püsiv kompleks nsP1+P23+nsP4 ja sellest omakorda stabiilne hiline replikatsioonikompleks, mis sünteesib viiruse genoomset ja sgRNA-d (Dé *et al.*, 1996; Vasiljeva *et al.*, 2003; Lulla *et al.*, 2012; Pietilä *et al.*, 2017). Infektsiooni käigus negatiivse polaarsusega RNA-de sünteesi tase väheneb ja 4–6 tundi peale infektsiooni algust see lõppeb. Selle põhjuseks on eraldiseisva nsP2 kogunemine rakus. Selle proteaasne aktiivsus lõikab P1234 polüproteiine *in trans* nsP2 ja nsP3 vahelisest lõikesaidist, mistõttu ei ole enam võimalik moodustada varajasi replikatsioonikomplekse (Vasiljeva *et al.*, 2003). Infektsiooni hilises faasis toodetakse seega liitvalke P12 ning P34, mis enamasti protsessitakse ka individuaalseteks nsP-deks, mis aga

replikatsioonikomplekside moodustumisesse enam ei panusta. Individuaalsed nsP-d täidavad nende valkude muid funktsioone, mida on kirjeldatud ülal (Vasiljeva *et al.*, 2003).

Hiliste replikatsioonikomplekside moodustumisega saab alguse ka sgRNA-de süntees ja struktuursete liitvalkude süntees (Strauss ja Strauss, 1994). Kapsiidivalgu C eemaldamine liitvalgust eksponeerib PE2 N-terminuses paikneva signaalpeptiidi, mis tagab sünteesitava liitvalgu transpordi ER-i (Garoff *et al.*, 1990; Hahn ja Strauss, 1990). ER-s leiab aset struktuurse polüproteiini glükosüleerimine, palmitüleerimine ning lõikamine rakuliste proteaaside poolt (Sefton, 1977; Ivanova ja Schlesinger, 1993). Moodustuvad PE2-E1 trimeerid transporditakse läbi Golgi kompleksi plasmamembraanile, transpordi käigus lõikab rakuline proteaas furiin PE2 valmis E3 ja E2 valkudeks (Zhang *et al.*, 2003). Nukleokapsiidi kokkupanek toimub replikatsioonikomplekside juures, kus sünteesitud genoomide pakkimissignaali tuvastanud ning sellega seondunud C-valgud moodustavad esmalt dimeere ning seejärel oligomeere (Weiss *et al.*, 1994; Owen ja Kuhn, 1996; Tellinghuisen *et al.*, 2001). Nukleokapsiidi liidetud C-valgud seonduvad spetsiifiliselt plasmamembraaniga seotud E2 tsütoplasmaatilise domeeniga. See interaktsioon käivitab virionide pungumise ning mille käigus omandab virion peremeesraku plasmamembraanist pärineva ümbrise (Jose *et al.*, 2012).

1.7. Tüüp I interferoonide vastus alfaviiruste infektsioonil

Tüüp I IFN geenide aktivatsioon on osa esmasest immuunvastusest, mis käivitatakse viiruste tuvastamisel peremeesrakkudes. Tüüp I IFN-d on sekreteeritavad valgud, mis kutsuvad läbi auto- ja parakriinse signaliseerimise esile viirusvastase oleku, millega takistatakse viiruse rakku sisenemist, replikatsiooni, virioni pakkimist ning pungumist (MacMicking, 2012). Tüüp I IFN (IFNα ja IFNβ) toime avaldub nende seondumisel transmembraansele IFNα retseptorile (IFNAR), mis käivitab üle JAK/STAT signaaliradade interferoonide stimuleeritud geenide ekspressiooni ja rakkude viirusvastase seisundi (Levy ja Darnell, 2002).

Rakusiseselt aktiveeritakse tüüp I IFN geenide ekspressioon patogeenidega seotud molekulaarsete mustrite (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) tuvastamisel membraanis paiknevate ja tsütoplasmaatiliste retseptorite poolt. Alfaviiruste replikatsiooni käigus moodustuvad PAMPid on näiteks dsRNA. Kuna see paigutub sfäärulite õõnsusesse, siis on oletatud, et nende struktuuride üheks rolliks on „peita“ viiruse infektsiooni käigus tekkivaid dsRNA-sid raku PAMP retseptorite eest (Frolova *et al.*, 2010). Lisaks on PAMP-id ka infektsiooni käigus sünteesitavad ilma 5’-*cap* struktuurita ssRNA-d. Peamised raku retseptorid, mis tuvastad alfaviiruse replikatsioonil tekkivaid PAMP-e on tsütoplasmas paiknevad RIG-1 (*retinoic acid-inducible gene* 1) ja MDA5 (*melanoma differentation-associated protein* 5) ning

selles võivad osaleda ka membraanides paiknevad TLR3 (*Toll-like receptor* 3), TLR7, (Sokoloski *et al.*, 2015; Carpentier ja Morrison, 2018). TLR3 ja TLR7 kannavad vastavalt signaali edasi valkudele TRIF (TIR-*domain containing adapter-inducing interferon*-β) ja MyD88 (*myeloid differentation primary response* 88) ning RIG-I ja MDA5 kannavad signaali MAVS valgule, mille kaudu aktiveeritakse transkriptsioonifaktorid IRF3 (*interferon regulatory factor* 3) ja IRF7, mis rakutuumas aktiveerivad tüüp I IFN geenide ekspressiooni (Carpentier ja Morrison, 2018). Nende signaaliradade komponentide mõju alfaviiruste infektsioonile on kirjeldatud vastavate geenide *knockout* rakuliinides ning katseloomades, eeskätt hiirtes. MyD88 ning TLR7 geenieksрessiooni *knockout* hiirtega (vastavalt MyD88$^{-/-}$ ja TLR7$^{-/-}$) näidati nende osalust tüüp I IFN signaaliraja oluliste efektoritena RRV infektsiooni korral, kus MyD88$^{-/-}$ ja TLR7$^{-/-}$ hiirte nakatamisel kirjeldati kudede ulatuslikumat kahjustumist, kõrgemat viiruse tiitrit kudedes ning kõrgemat suremust (Neighbours *et al.*, 2012). TRIF$^{-/-}$ ja MAVS$^{-/-}$ hiirte puhul on näiteks täheldatud CHIKV nakkuse korral kõrgemat vireemiat ning põletikulisust (Schilte *et al.*, 2010; Rudd *et al.*, 2012). Koekultuuri tingimustel on kirjeldatud RIG-I ning MDA5 olulisust SINV ja VEEV infektsioonil tekkivate PAMP RNA-de tuvastamisel ning tüüp I IFN vastuse tekkel, kusjuures interferoonide ekspressioon käivitatakse nii RIG-I kui MDA5 vahendusel. Ühtlasi näidati, et dsRNA tuvastamisel osaleb eelkõige MDA5 ning 5'-*cap* struktuurita ssRNA-d tuvastab RIG-I (Akhrymuk *et al.*, 2016). IFNAR$^{-/-}$ rakukultuuride ning katseloomadega on võimalik kirjeldada tüüp I IFN süsteemi üldisemat mõju viiruste replikatsioonile ning patogeneesile ja iseloomustada seejuures viiruse genoomi viidud mutatsioonide mõju interferoonide kaudu toimuvale immuunvastusele (Liu *et al.*, 2018). Käesolevas töös on kasutatud metsiktüüpi hiire embrüonaalsete fibroblastide (*mouse embryonic fibroblast*, MEF) ja MEF IFNAR$^{-/-}$ rakuliine erinevate BFV kloonide ja mutantide kasvukineetikate võrdluses.

Alfaviirused töötavad aga omakorda tüüp I IFN aktiveerimisele vastu, osa vastavaid strateegiad (C-valgu ja/või nsP2 vahendatud raku geenieksрessiooni mahasurumine, dsRNA-de „peitmine" sfäärulite õõnsuses) on ülal ka kirjeldatud. Teisalt inhibeerivad alfaviirused peremeesrakkude transkriptsiooni ka spetsiifiliselt, surudes alla tüüp I IFN geeni ekspressiooni ja toimet (Breakwell *et al.*, 2007). Selleks kasutatakse mitmeid mehhanisme, näiteks takistatakse STAT1 valgu transporti rakutuuma (Fros *et al.*, 2010).

1.8. Barmah Forest viirus

BFV isoleeriti 1974. aastal Lõuna-Austraalias Murray oru piirkonnas *Culex annulirostris* moskiitodest. BFV vektoritena on kirjeldatud veel näiteks liike *Aedes vigilax*, *Aedes notoscriptus* ja *Aedes normanensis* (Jacups *et al.*, 2008). Pikaajaliselt peeti BFV levilaks vaid

Austraaliat, aga hiljuti kirjeldati kohalikku BFV nakkusjuhtu ka Paapua Uus-Guineas (Marshall *et al.*, 1982; Jacups *et al.*, 2008; Caly *et al.*, 2019).

Esmane klassifikatsioon, mis tehti neutraliseerivate antikehade ristreaktiivsuste põhjal, paigutas BFV ekslikult sugukonda *Bunyaviridae* (Marshall *et al.*, 1982). Hilisemad kirjeldused, mis põhinesid BFV virioni morfoloogial ja replikatsioonil, viisid muudatusteni klassifikatsioonis (Dalgarno *et al.*, 1984). Lõplikult kinnitasid BFV kuulumise perekonda *Alphavirus* prototüüptüve BH2193 (käesolevas töös nimetatud BFV2193-ks) järjestuse sekveneerimine ning krüo-elektronmikroskoopia ülesvõtted BFV virionist (Lee *et al.*, 1997; Kostyuchenko *et al.*, 2011). Järjestusanalüüside põhjal on BFV-le fülogeneetiliselt kõige lähedasemad SFV ja RRV, kuid erinevused on siiski piisavalt ulatuslikud, mistõttu on BFV paigutatud eraldiseisva omanimelise serokompleksi (ainu)liikmeks (Lee *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2018). BFV genoomi sekveneerimine tõi välja ka mitmeid erinevusi teistest alfaviirustest. Nii on näiteks on BFV nsP3 (täpsemat selle HVD) alfaviiruste seas kõige lühem ning BFV E2 ei sisalda glükosüleerimissaite (Lee *et al.*, 1997). BFV infektsiooni eripäraks osutus ka nsP3 lokalisatsioon rakutuuma, mis on alfaviiruste seas seni teadaolevalt unikaalne (Omler, 2017).

BFV võimet nakatada inimesi kirjeldati esmalt 1986. aastal (Vale *et al.*, 1986). BFV võib inimestel põhjustada palavikku, nahalöövet, lihas- ja liigesvalusid, kaasaarvatud kroonilist polüartriiti, mis on väga sarnased teise Austraalias ulatuslikult levinud alfaviiruse, RRV, põhjustatud sümptomitega (Flexman *et al.*, 1998). Siiski on nende kahe viiruse infektsioonide vahel ka mõningad erisused, näiteks on BFV infektsiooni korral tihedamini kirjeldatud löövet, aga RRV puhul on sagedamad liigesvalud. Sellele vaatamata on RRV ja BFV eristamine sümptomite põhjal keeruline ja tihtilugu viib see eksitavate tulemusteni (Flexman *et al.*, 1998). Viimase kümne aasta jooksul on BFV poolt põhjustatavat haigust registreeritud keskmiselt ligikaudu 1000 korral aastas. Samas on kirjeldatud ka suuremaid puhanguid, näiteks registreeriti 2013. aastal 4236 haigusjuhtu (http://www9.health.gov.au/cda/source/cda-index.cfm, Australian Department of Health, Notifiable Diseases Surveillance System, Austraalia, 2020).

BFV põhjustatud patogeneesi kirjeldamiseks katseloomades on välja töötatud hiire mudel, mis põhineb varasemalt RRV patogeneesi iseloomustamisel kasutatud C57BL/6 hiireliinil ja protokollil (Morrison *et al.*, 2006; Herrero *et al.*, 2014). Katsed mitmete BFV looduslike isolaatidega näitasid, et kõige virulentsem nende hulgas on prototüüptüvi BFV2193. Samas uurimuses näitas võrdlus RRV-ga, et BFV ei põhjusta hiirtel niivõrd raskeid sümptomeid kui RRV ning et BFV nakatab lihaskude oluliselt vähem kui seda teeb RRV (Herrero *et al.*, 2014). Käesolevas töös läbiviidud loomkatsed on teostatud sama C57BL/6 hiiremudeli alusel. Töös

kasutatavate erinevate BFV kloonidega on katseloomi nakatatud süstides viirust rinnakupiirkonna nahaalusesse koesse ning on jälgitud haiguse kulgu ja viiruste paljunemist erinevates kudedes (Herrero *et al.*, 2014).

2. Eksperimentaalosa

2.1. Töö eesmärgid

Töö üldiseks eesmärgiks oli kirjeldada mutantsete BFV kloonide patogeneesi *in vivo* hiirmudelis ning koekultuuri tingimustel. Selleks kasutati meie töörühmas konstrueeritud BFV infektsioonilisi DNA kloone (*infectious clone*, icDNA), mis erinesid metsiktüüpi BFV-st ühe või kahe mittesünonüümse mutatsiooni suhtes. Töös kasutatud viiruseid on kirjeldatud alapeatükis 2.2.1 ning kujutatud skemaatiliselt joonisel 4.

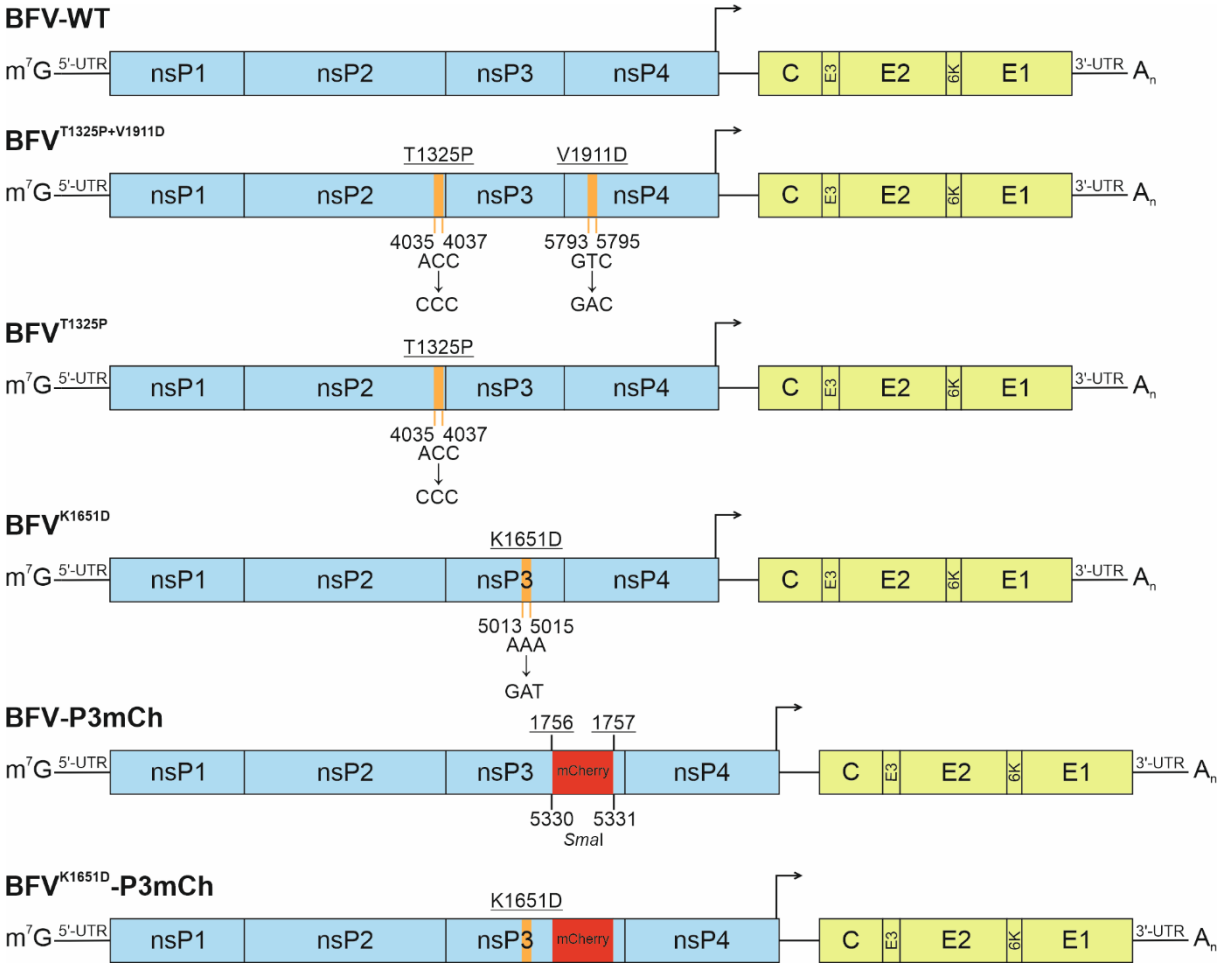
Töös püstitatud eesmärgid:

1. Iseloomustada meie töörühmas loodud BFV icDNA klooni (BFV-WT) kasvukineetikat koekultuuris imetajarakkudes ning patogeneesi *in vivo* hiiremudelis võrdluses BFV2193 loodusliku isolaadiga;
2. kirjeldada mutantsete $BFV^{T1325P+V1911D}$ ning BFV^{T1325P} kloonidega vastavate mutatsioonide mõju viiruse replikatsioonikineetikale koekultuuris imetaja- ja putukarakkudes ning analüüsida nende mutatsioonide võimalikku seost tüüp I IFN vastusega;
3. analüüsida BFV nsP3 järjestuses tuvastatud NLS-i funktsionaalsust, võrreldes BFV WT nsP3-mCherry ning BFV^{K1651D} nsP3-mCherry lokalisatsiooni imetaja- ja putukarakkudes, kasutades lokalisatsiooni tuvastamiseks fluorestsentsanalüüsil põhinevat konfokaalmikroskoopiat;
4. eelmises punktis kirjeldatud omaduse analüüsimine individuaalselt ekspresseeritud BFV WT nsP3 ja BFV^{K1651D} nsP3 lokalisatsiooni võrdluses imetajarakkudes, kus nsP3 ekspresseeritakse EGFP liitvalkudena ning lokalisatsioon tuvastatakse fluorestsentsanalüüsil põhineva konfokaalmikroskoopiaga;
5. analüüsida BFV nsP3 NLS-i häirimise mõju viiruse kasvukineetikale imetaja- ja putukarakkudes koekultuuri tingimustel ning *in vivo* hiiremudelis, samuti uurida võimalikku seost BFV nsP3 tuumalokalisatsiooni ning tüüp I IFN vastuse vahel.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Töös kasutatud viirused

Enamik käesolevas magistritöös kasutatud viiruseid on eelnevalt konstrueeritud TÜTI RNA viiruste töörühmas minu kolleegide poolt. Erandiks on kasutatud BFV2193 looduslik isolaat, millega viisin läbi eksperimente Austraalias Griffithi Ülikooli Glükoomika Instituudis (Griffith University, Institute for Glycomics, Queenslandi osariik, Austraalia). Selles alapeatükis kirjeldan meie töörühmas loodud ja siinses töös kasutatud BFV icDNA kloone ning nende saamislugu, seejuures rõhutan, et viiruse kloonide konstrueerimisel enamjaolt mina isiklikult ei osalenud. Kõik töös kasutatud icDNA-del põhinevad viirused on kujutatud joonisel 4.



Joonis 4. Töös kasutatud viirused. Sinisega on tähistatud mittestruktuurne ORF ning kollasega struktuurne ORF, genoomi 5’ otsas paikneb *cap*-struktuur ning 3’ otsas polüA saba (A_n). ORF-ide otstes on 5’- ja 3’-UTR ning nende vahelmine UTR. Mittestruktuurse ORF-i lõpus paiknev nool tähistab sgRNA promooteri asukohta. Oranžiga on tähistatud mutatsioonide ligikaudsed asukohad viiruste genoomis, mille kohal on allajoonitult märgitud vastavad aminohappelised muudatused. Nende all on toodud vastavate nukleotiidide kolmikud ja positsioonid täispikas genoomis, kus noolega on näidatud vastavate aminohappeliste muudatusteni viinud mutatsioonid täisgenoomis. Punasega on tähistatud nsP3 järjestusse sisestatud mCherry kodeeriva järjestuse ligikaudne asukoht ning selle kohal on allajoonitult märgitud aminohappejäägid mittestruktuurses polüproteiinis, mille vahele sisestati markervalgu järjestus. mCherry positsiooni all on tähistatud nukleotiidsed positsioonid viiruse täisgenoomis, mis lõigati *Sma*I-ga, et sisestada mCherry kodeeriv järjestus (Omler, 2017).

BFV-WT icDNA kloon pandi kokku sünteetilistest DNA fragmentidest, mille aluseks võeti varasemalt publitseeritud BFV prototüüptüve BFV2193 genoomi järjestus (GenBank kood: U73745.1) (Lee *et al.*, 1997). Täispikk BFV-WT icDNA kloneeriti pUC57-Kan plasmiidi, kus infektsioonilise RNA *in vitro* sünteesimiseks sisestati viiruse genoomi 5' järjestuse ette SP6 promootorjärjestus ning plasmiidi lineariseerimiseks enne *in vitro* transkriptsiooni (IVT) sisestati viiruse genoomi 3' polüA järjestusele vahetult järgnevaks restriktaasi AvrII lõikamissait. Kasutades aluseks sama BFV-WT icDNA klooni, konstrueerisin plasmiidi, millesse sisestasin nsP3 HVD-sse markervalgu mCherry kodeeriva järjestuse, et visuaalselt hinnata viiruse infektsiooni toimumist ning analüüsida nsP3 lokalisatsiooni peremeesrakus. Viimasena mainitud kloneerimist on kirjeldatud minu bakalaureusetöös (Omler, 2017).

Nende viiruste kogumine oli edukas ning võimaldas meil kirjeldada BFV nsP3 lokalisatsiooni (Omler, 2017). Kuid üheks tähelepanekuks viiruse kogumisel oli asjaolu, et *in vitro* transkribeeritud viiruse RNA elektroporatsiooni järgne inkubatsiooniperiood oli kuni viiruse põhjustatud tsütopaatilise efekti (CPE) ja fluorestsentssignaali ilmnemiseni tavalisest oluliselt pikem ning transkriptid olid madala infektsioonilisusega. Kogutud viiruse sekveneerimisel ilmnes, et nsP2 kodeerivas piirkonnas on punktmutatsioon, mille mõju oli mitte-sünonüümne: mittestruktuurse polüproteiini järjestuses 1325. treoniin oli asendunud proliiniga (mutatsioon T1325P). Kuna sellise viiruse kogumine oli tavalisest ajakulukam protseduur, siis oli alust kahtlustada ka mõne muu mitte-sünonüümse erinevuse olemasolu publitseeritud genoomijärjestuses. Seetõttu viisid kolleegid läbi teise põlvkonna sekveneerimise (NGS, *next generation sequencing*) BFV2193 isolaadile, millega tuvastati mittesünonüümne erinevus nsP4 kodeerivas piirkonnas: NGS tulemus näitas mittestruktuurse polüproteiini 1911. positsioonis valiini, mis publitseeritud järjestuses vastas aspartaadile (edaspidi mutatsioon V1911D). Järeldasime, et T1325P mutatsioon oli viiruse infektsioonil indutseeritud kompenseeriv mutatsioon V1911D mõjule, kuna üksnes viimase mutatsiooniga BFV-d koguda ei õnnestunud. NGS analüüsil tuvastati lisaks kaks mitte-sünonüümset erinevust E2 ning E1 kodeerivates piirkondades. Uurimaks, kas need erinevused mõjutavad BFV icDNA klooni fenotüüpi, siis võrreldi käesolevas töös ka konstrueeritud BFV-WT ja BFV2193 *in vitro* ja *in vivo*.

Loomaks tegelikku BFV WT icDNA klooni, teostati vastavad muudatused esialgses infektsioonilises kloonis, mille nimetasime käesolevas töös pSP6-BFV-WT, markervalku kandva klooni pSP6-BFV-P3mCh. T1325P ja V1911D mutatsioonide edasiseks uurimiseks konstrueeriti ka neid kandvad üksik- ja topeltmutantsed icDNA-d, mille töös nimetasime pSP6-BFV^{T1325P} ning pSP6-BFV$^{T1325P+V1911D}$.

BFV nsP3 potentsiaalse NLS-i leidmiseks kasutati veebipõhist tarkvaraplatvormi NLStradamus (Nguyen Ba *et al.*, 2009). Tuvastatud järjestuses otsustati välja vahetada lüsiin aspartaadi vastu (mutatsioon K1651D) (joonis 9A), kuna mitmete NLS-de koosseisus on iseloomustatud lüsiini ja arginiini jääkide olulisust (Kosugi *et al.*, 2009). Antud konstrukti nimetasime pSP6-BFV^{K1651D} ning sellel põhineva mCherry markervalku kandva klooni pSP6-BFV^{K1651D}-P3mCh.

2.2.2. Kasutatud rakuliinid ja söötmed

Imetajarakud:

- Vero rakuliini (rohemakaagi neeruepiteeli rakud), WT MEF ja IFNAR$^{-/-}$ MEF rakuliine kasvatati DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) söötmes (Sigma-Aldrich), millesse oli lisatud 10% lõppmahus FBS-i (*foetal bovine serum*, veise loote seerum) (Gibco);
- U2OS rakuliini (inimese osteosarkoomi rakud) kasvatati L-glutamiini sisaldavas IMDM (*Iscove's modified Eagle's medium*) söötmes (Corning), millesse lisati 10% lõppmahus FBS-i (Gibco);
- imetajarakke kasvatati kõrge niiskustasemega inkubaatorites temperatuuril 37 °C 5% CO_2 sisaldusega keskkonnas.

Putukarakud:

- C6/36 rakuliini (*Aedes albopictus* vastsete rakud) kasvatati L-15 söötmes (Corning), millesse oli lisatud 10% lõppmahus FBS-i (Gibco) ja 10% TPB-d (*tryptose phosphate broth*, trüptoos-fosfaat puljong);
- AF319 rakuliini (*Aedes aegypti* vastse rakud) (Varjak *et al.*, 2017) kasvatati L-15 söötmes (Corning), millesse lisati 20% lõppmahus FBS-i (Gibco), 10% TPB-d ja 1x lahjendusena asendatavaid aminohappeid (Sigma-Aldrich);
- putukarakke kasvatati kõrge niiskustasemega inkubaatorites temperatuuril 28 °C CO_2 puudulikus keskkonnas.

Teisi kasutatud söötmeid:

- DMEM nakatussööde: DMEM (Sigma-Aldrich) seerumvaba sööde:
- 2% DMEM viiruse kogumissööde: DMEM (Sigma-Aldrich), millesse oli lisatud 2% lõppmahuga FBS-i (Gibco);
- L-15 nakatussööde putukarakkudele: L-15 (Corning) seerumvaba ning ilma teiste lisanditeta sööde;

- DMEM-CMC (karboksümetüültselluloos, *carboxy methyl cellulose*) viiruse tiiterdamise pooltardsööde: 2:3 suhtes oli segatud vastavalt 2% CMC lahus ning 2% DMEM viiruse kogumissööde;
- Opti-Mem® sööde (Gibco) transfektsioonisegude ettevalmisteks.

2.2.3. Individuaalse BFV^{K1651D} EGFP-nsP3 ekspressioonikonstrukti kloneerimine

BFV^{K1651D} EGFP-nsP3 ekspressioonikonstrukti loomine pcDNA4/TO-HA-EGFP vektorisse on teostatud sama protokolli alusel, mida kirjeldasin oma bakalaureusetöös BFV individuaalsete EGFP-nsP-de, sealjuures käesolevas töös kasutatud BFV-WT EGFP-nsP3, ekspressioonikonstruktide loomisel (Omler, 2017). BFV^{K1651D} nsP3 järjestuse paljundamiseks kasutati PCR-l matriitsina pSP6-BFV^{K1651D} konstrukti, kus praimerite paariga (Tabel 1) lisati nsP3 DNA järjestuste 5’ ja 3’ otstesse vastavalt *BamH*I ning *Not*I restriktsioonisaidid. PCR viidi läbi *Phusion High-Fidelity Polymerase* komplektiga (Thermo Scientific) ning reaktsioonisegude inkubeerimisel kasutati termotsüklerit Biometra TProfessional. Reaktsioonisegu segamisel (lõppmahus 50 µl) ja termotsükleri programmi koostamisel lähtuti *Phusion* polümeraasi komplekti tootjapoolsest protokollist. PCR-i järgselt lisati reaktsioonisegule restriktsioonensüümi *Dpn*I, et lagundada segus matriitsina kasutatud icDNA. Agaroos-geelelektroforeesiga kontrolliti PCR reaktsiooni saagist.

Tabel 1. BFV^{K1651D} nsP3 järjestuse PCR paljundamisel kasutatud praimerid. Jämedas kirjas on esile toodud restriktaaside *BamH*I (BFV_P3_Fw) ja *Not*I (BFV_P3_Rev) äratundmisjärjestused ning allajoonitult on märgitud stopp-koodon (BFV_P3_Rev).

Praimeri nimi	Praimeri järjestus
BFV_P3_Fw	5’GATCT**GGATCC**GCACCGGCGTACAG 3’
BFV_P3_Rev	5’ TTAT**GCGGCCGC**TCACCCGCCGGCTCT 3’

Amplifitseeritud fragment ligeeriti pJET1.2/blunt vektorisse (*CloneJET PCR Cloning Kit*, Thermo Fisher) vastavalt tootja protokollile. Ligatsiooniseguga transformeeriti kompetentseid *E. coli* tüve XL-10 rakke kuumašoki meetodiga ning plaaditi ampitsilliini (Amp) sisaldavatele tardsöötmega petri tassidele, mille protokolli on kirjeldatud minu bakalaureusetöös (Omler, 2017). Plasmiidid puhastati FavorPrep® *Plasmid DNA Extraction Mini Kit* (FavorGen) komplektiga, analüüsiti restriktsioonanalüüsiga, geelelektroforeesiga ning konstruktide õigsust kontrolliti Sanger sekveneerimisega.

pcDNA4/TO_HA_EGFP vektorit ning BFV^{K1651D} nsP3 sisaldavat pJET1.2 konstrukti lõigati *BamH*I ning *Not*I restriktaasidega. Seejärel teostati geelelektroforees ja õige suurusega DNA fragmendid lõigati geelist ning puhastati Zymoclean^{TM} *Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research) komplektiga. BFV^{K1651D} nsP3 järjestus ligeeriti lõigatud pcDNA4/TO_HA_EGFP vektorisse CMV (tsütomegaloviirus, *cytomegalovirus*) promootori järjestuse järele üle spetsiifiliste *BamH*I ja *Not*I kleepuvate otstega lõikesaitide, kasutades T4 DNA ligaasi (Invitrogen^{TM}). Ligatsioonisegusid inkubeeriti 16 °C juures üleöö ning transformeeriti kuumašoki meetodil XL-10 rakkudesse. Suurema kontsentratsiooniga plasmiidivaru tootmisel kasutati NucleoBond® Xtra Midi EF (Macherey-Nagel) komplekti, puhastatud DNA-de kontsentratsioonid mõeti NanoDrop^{TM} 2000c spektrofotomeetriga (Thermo Scientific^{TM}) ning konstruktide järjestust kontrolliti Sanger sekveneerimisega. Seda kloneerimist on detailsemalt kirjeldatud minu bakalaureusetöös (Omler, 2017). Kloneerimise tulemuseks loodi konstrukt pcDNA4/TO_HA_EGFP_nsP3^{K1651D}.

2.2.4. IVT, RNA transfektsioon, viirusvarude kogumine ja tiiterdamine

Viiruse infektsiooniliste RNA-de sünteesimise eelselt lineariseeriti 5 µg pSP6-BFV-WT, pSP6-BFV^{K1651D}, pSP6-BFV^{T1325P}, pSP6-BFV$^{T1325P+V1911D}$, pSP6-BFV-P3mCh, pSP6-BFV^{K1651D}-P3mCh konstrukte lõigates neid *Avr*II restriktsioonensüümiga. IVT-ks kasutati mMESSAGE mMACHINE^{TM} SP6 (Invitrogen^{TM}) transkriptsiooni komplekti, mille kasutamise protokolli kirjeldasin bakalaureusetöös (Omler, 2017).

Viirusvarude tootmiseks kasvatati Vero rakke 10 cm läbimõõduga koekultuuri tassidel ~70–80% konfluentsuseni. RNA transfektsiooniks kasutati Lipofectamine® 2000 reagenti (Invitrogen^{TM}). 750 µl Opti-MEM söötmesse lisati eraldi tuubides IVT saagis ning transfektsioonireagent, viimast lahust inkubeeriti toatemperatuuril 5 min. Seejärel segati RNA ja transfektsioonireagendi lahused ning segu inkubeeriti toatemperatuuril 20 min. Rakutassidelt eemaldati täissööde ning pesti PBS-ga (*phosphate buffered saline*, fosfaat-puhverdatud füsioloogiline lahus), mille järel kanti rakkudele 1,5 ml Opti-MEM söötmes lahjendatud RNA ning tranfektsioonireagendi lahust. Rakutassidele lisati 5 ml 2% DMEM viiruse kogumissöödet ning rakke inkubeeriti 5 h kõrge niiskustasemega inkubaatorites temperatuuril 37 °C 5% CO_2 keskkonnas. Seejärel aspireeriti sööde rakkudelt ning asendati 6 ml 2% DMEM viiruse kogumissöötmega ning inkubeeriti eelmainitud tingimustel. CPE täheldamisel (~30–48 h peale nakatamist) koguti esmane viirusvaru (*passage* 0, P0), seda tsentrifuugiti 4000 rpm 10 min temperatuuril 4 °C, supernatandist (sisaldab viirusosakesi) koguti alikvoodid ning tõsteti pikaajaliseks säilitamiseks -80 °C külmkappi.

P0 viirusvaru kasutati P1 viirusvaru tootmiseks. Selleks nakatati ~70–80% konfluentsusega Vero rakke 10 cm koekultuuri tassil 1,5 ml mahus ettevalmistatud P0 viirusvaru lahjendusega ning DMEM nakatussöötme lahusega ja tasse inkubeeriti vastavatel tingimustel 1 h, kus iga 10–15 min järel kallutati rakutasse, et tagada viiruse ühtlasem jaotus rakkudele ning vältida viimaste kuivamist. Seejärel lisati nakatatud rakkudele 5 ml 2% DMEM viiruse kogumissöödet ning inkubeeriti rakuliinile vastavatel tingimustel kuni CPE oli hästi täheldatav (~30–48h peale nakatamist) ja koguti P1 viirusvaru alikvoodid, mida säilitati temperatuuril -80 °C.

Viirusvarude tiiterdamiseks kasutati lüüsilaikude moodustumise meetodit. Selleks valmistati Vero rakkudega ette 24-augulised koekultuuri plaadid, milles nakatamise alustamisel oli rakkude konfluentsuseks ~90%. Kogutud viirusvarudest moodustati kümnekordsete vahelahjenduste rida DMEM nakatussöötmes. Rakkudelt eemaldati täissööde ja neid pesti PBS-ga ning peale kanti viirusvarude lahjendatud lahused mahus 100 µl iga plaadi augu kohta. Plaadid tõsteti 37 °C 5% CO_2 inkubaatorisse, kus 1 h nakatamise vältel kallutati tasse iga 10–15 min tagant. Seejärel eemaldati rakkudelt viiruste lahused ning rakud kaeti DMEM-CMC pooltardsöötmega. Järgnes nelja päeva pikkune inkubatsiooniperiood eelmainitud tingimustel, mille käigus moodustusid rakuplaatidel tardsöötme poolt immobiliseeritud nakkusfookused. DMEM-CMC pooltardsööde aspireeriti ning rakkudele kanti fikseerimis- ja visualiseerimislahust, mis sisaldas 4% PFA-d (paraformaalaldehüüd) ning kristallvioletti, milles inkubeeriti rakke 30 min. Seejärel pesti plaadid voolava vee all üleliigsest lahusest ning moodustunud lüüsilaigud loeti plaadi aukudes, milles oli ~10–40 plaagi. Loenduste alusel arvutati viirusvarude tiitrid ühikutes PFU/ml (*plaque forming units per millilitre*, lüüsilaike moodustavad ühikud ühe milliliitri kohta) või kudede tiiterdamise puhul PFU/g (lüüsilaike moodustavad ühikud ühe grammi koe kohta).

2.2.5. Mitme-astmelised kasvukõverad

Vero, WT MEF ja IFNAR$^{-/-}$ MEF rakke kasvatati 24-augulistel koekultuuri plaatidel ~80–90% konfluentsuseni nakatamiseks viirustega BFV-WT, BFV^{K1651D}, BFV^{T1325P}, BFV$^{T1325P+V1911D}$ ja BFV2193 ning sama moodi valmistati ette C6/36 ja AF319 rakud nakatamiseks viirustega BFV-WT, BFV^{K1651D}, BFV^{T1325P} ja BFV$^{T1325P+V1911D}$ MOI 0,1-ga (*multiplicity of infection*, infektsioonikordaja). Viirusvarude lahjendused valmistati rakuliinidele vastavates nakatussöötmetes, mida kirjeldati alapeatükis 2.2.2.. Nakatamisele järgnes 1 h pikkune inkubatsioon, kus plaate aeg-ajalt kallutati. Seejärel eemaldati rakkudelt infektsiooniline sööde, rakke pesti vastavate seerumvabade söötmetega ning peale kanti rakuliinidele vastavad täissöötmed mahus 400 µl (vt alapeatükk 2.2.2.). Seejärel koguti sööde 0 h ajapunkti jaoks ning asendati värske täissöötmega. Selliselt koguti viiruseid veel

ajapunktides 3, 6, 9, 12, 24 ja 48 h peale infektsiooni algust. Iga nakatamine teostati kolmes paralleelis ning katset viidi läbi kahel korral. Viiruste tiitrid määrati ülalkirjeldatud lüüsilaikude moodustumise meetodil.

2.2.6. Rakkude nakatamine, transfekteerimine, mikroskoopiapreparaatide valmistamine ja konfokaalmikroskoopia

Vero, C6/36 ja AF319 rakud kasvatati 6-augulistel koekultuuri plaatidel, mille põhja oli tõstetud ümarad katteklaasid, ~50% konfluentsuseni ning nakatati viirustega BFV-P3mCh ja BFV^{K1651D}-P3mCh ülalkirjeldatud nakatamisprotokolli alusel MOI 1-ga. 24 h peale nakatamist pesti rakke DPBS-ga (Dulbecco PBS) ning fikseeriti 4% PFA lahusega 15 min jooksul. Seejärel pesti fikseeritud rakke DPBS-i ning destilleeritud veega ja katteklaasid rakkudega tõsteti õhu kätte kuivama. Preparaatide valmistamiseks pipeteeriti alusklaasidele SlowFade™ Antifade Gold sulundusvedelikku (Invitrogen™), millele oli lisatud rakutuumade värvinguks DAPI-t (4,6-diamidino-2-fenüülindool).

U2OS rakke transfekteeriti individuaalsete EGFP-nsP3 liitvalkude ekspresseerimiseks pcDNA4/TO_HA_EGFP_nsP3 ja pcDNA4/TO_HA_EGFP_nsP3^{K1651D} plasmiididega. DNA konstruktide transfektsiooniks kasutati Lipofectamine® LTX ja Plus™ reagente (Invitrogen™). 100 µl Opti-MEM söötmesse lisati 7 µl LTX reagenti ning eraldi 100 µl Opti-MEM söötmes lahjendati 2 µl Plus reagenti ning 2 µg DNA-d. Reagentide ja DNA lahjendused seejärel segati ning inkubeeriti 5 min toatemperatuuril. Rakkudelt aspireeriti sööde, pesti PBS-ga ning transfektsioonireagentide ja DNA segu pipeteeriti rakkudele. Igasse plaadi auku lisati 1,5 ml IMDM täissöödet ning 24 h peale transfekteerimist rakud fikseeriti preparaatide valmistamiseks vastavalt ülalkirjeldatule.

mCherry ja EGFP fluorestseeruvate nsP3 liitvalkude lokalisatsiooni rakkudes analüüsiti Zeiss LSM 710 konfokaalmikroskoobiga ning omandatud pildimaterjaliga toimetamisel kasutati tarkvara Zen Blue 2.6 (Zeiss).

2.2.7. Viirusvarude kontsentreerimine ja puhastamine ultratsentrifuugimisega

C57BL/6 hiirte nakatamiseks BFV2193, BFV-WT ja BFV^{K1651D} viirustega oli vajalik valmistada nende lahused steriilses PBS-s 50 µl annustena, kus üks doos sisaldas 10^4 PFU-d viirust. Selleks koguti eelnevalt ~30 ml söötmes viirusvarud, mida filtreeriti läbi 0,22 µm avasuurusega süstalfiltrite, et vabaneda võimalikult paljust rakusodist. Viirusvarud tõsteti ultratsentrifuugimise tuubidesse ja seejärel pipeteeriti klaaspipetiga tuubide põhja, viirusvaru lahuse alla, 3 ml 20% sahharoosilahuse kiht. Viirusosakeste sadestamine teostati Beckman Coulter Optima™ L-seeria ultratsentrifuugiga kasutades rootorit SW 32.1, kus proove

tsentrifuugiti 3 h kiirusel 140 000 x g temperatuuril 4 °C. Seejärel vedelik aspireeriti ning tuubi põhjas olev sade resuspendeeriti steriilses PBS-s. Kontsentreeritud viirusvarude tiiter määrati ülalkirjeldatud lüüsilaikude moodustumise meetodiga.

2.2.8. Loomkatsed

Loomkatsed viidi läbi Austraalias Griffithi Ülikoolis Glükoomika Instituudis. Katseloa number on GLY/12/18/AEC, mille on kinnitanud ja väljastanud Griffithi Ülikooli loomaeetika komitee (Griffith University Animal Ethics Committee). Austraalias on loomkatsete läbiviimiseks eelnevalt vaja läbida vastav koolitus selle õppeasutuse/instituudi juures, kus ka loomakatsed läbi viiakse ning katseluba kehtib üksnes selles asutuses. Euroopa Liidus väljastatud loomkatseluba seal ei nõuta. Läbisin vastava koolituse Glükoomika Instituudi vivaariumi peaspetsialisti juhendamisel. Tema poolt täidetud hindamise protokoll, millega lubati mul viia läbi loomkatseid hiiremudelis, on toodud lisas 1.

Katseprotokoll põhines varem publitseeritud BFV hiiremudelil (Herrero *et al.*, 2014). Katsetes kasutati 21-päeva vanuseid C57BL/6 hiiri, kes telliti Animal Resource Centre'st, Perth, Austraalia. Eksperimendites, kus jälgiti viiruste patogeneesi kulgu, kasutati igas katsegrupis ning kontrollgrupis 5 hiirt. Hiirtele süstiti 50 µl steriilses PBS-s lahustatud 10^4 PFU-d BFV2193, BFV-WT või BFV^{K1651D} rinnakupiirkonda nahaalusesse koesse, kontrollgrupi hiirtele süstiti sama moodi 50 µl steriilset PBS-i. Katseloomadel jälgiti igapäevaselt haiguse kulgu, mõõdeti kehakaalu ning sümptomeid iseloomustati ja registreeriti tabelis 2 kirjeldatud punktisüsteemi alusel. Iga eksperimendi lõpus surmati hiired suletud kambris CO^2-ga lämmatamise teel.

Tabel 2. BFV-ga nakatatud C57BL/6 hiirte haigussümptomite kirjeldamisel kasutatud punktisüsteem.

Hinnangu väärtus	**Sümptomite kirjeldus**
0	sümptomid puuduvad
1	esinevad karvkatte ebakorrapärasused
2	väga vähene tagumiste jäsemete nõrkus, mõningane letargia
3	mõningane tagumiste jäsemete nõrkus, kerged kõndimisraskused, letargia
4	tagumiste jäsemete nõrkus ja nende harvaesinev lohistamine, haardetugevuse vähenemine
5	ränk tagumiste jäsemete nõrkus ja nende lohistamine, madal kõndimisaktiivsus, tugev letargia
6	tagumiste jäsemete kasutamine liikumisel puudub

Katses, mille eesmärk oli määrata erinevate kudede tiitrid BFV2193 ja BFV^{K1651D} nakatatud hiirtes, kasutati katse- ja kontrollgruppides 4 looma iga kudede kogumise ajapunkti kohta. Katseloomade süstimine nakatamiseks viidi läbi ülalkirjeldatud meetodil. 1., 3., 6., ja 9. päeval peale hiirte nakatamist surmati vastavad neljaliikmelised katsegrupid eelnevalt kirjeldatud meetodil. Esmalt koguti vereproovid ning seejärel perfuseeriti hiired steriilse PBS-ga. Kudede tiiterdamiseks koguti hiirtelt tagumiste jäsemete pahkluud, tagumiste jäsemete reie nelipealihased, põrn ja lümfisõlmed steriilsesse PBS-i.

Vereproove tsentrifuugiti vereseerumi separaatortuubides MiniCollect® (Greiner Bio-One) pööretel 13 000 rpm 10 min temperatuuril 4°C, millega eraldati lahuse alumistesse kihtidesse vererakkude fraktsioon ning pealmine vereseerumi fraktsioon koguti edasiseks tiiterdamiseks. Koeproovidele steriilsetes PBS-s lisati roostevabast terasest kuulikesed kudede purustamiseks ning proovid homogeniseeriti Qiagen® TissueLyser II homogenisaatoriga. Homogeniseeritud proove tsentrifuugiti pööretel 13 000 rpm 10 min temperatuuril 4°C, millega sadestati purustatud kudede osised ning supernatant (sisaldas viirusosakesi) koguti edasiseks viiruse tiiterdamiseks. Kudede ja vereproovide tiiterdamine viidi läbi ülalkirjeldatud lüüsilaikude moodustumise meetodiga.

2.2.9. Statistiline analüüs

Viiruste kasvukineetika ja hiirte kaalukasvu andmeid analüüsiti statistilise olulisuse suhtes kahepoolse ANOVA testiga koos Bonferroni meetodiga. Sümptomite hinnangute andmestikku analüüsiti paardumata Student'i t-testiga koos Bonferroni meetodiga. Statistiliste analüüside läbiviimiseks kasutati GraphPad Prism tarkvara.

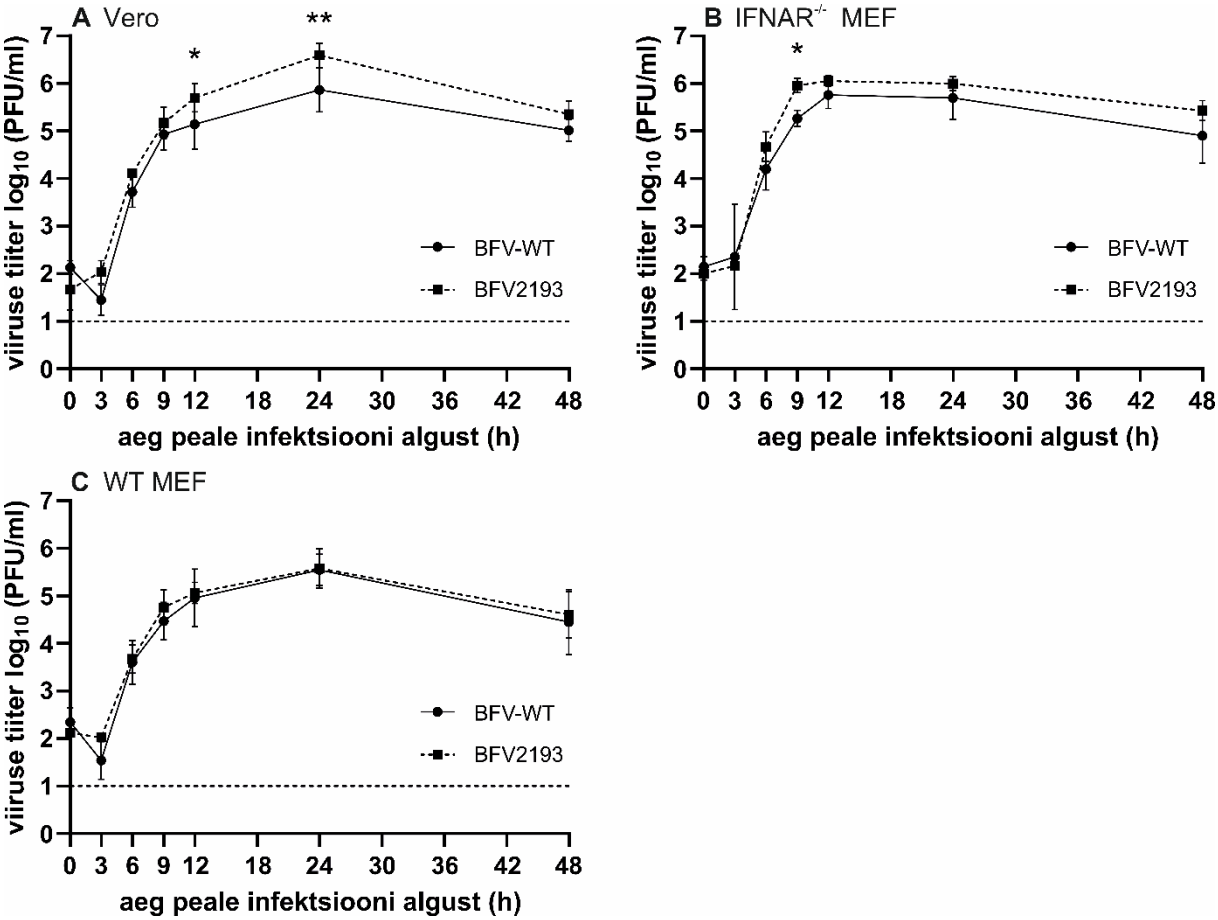
2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. BFV2193 ja BFV-WT fenotüüpide võrdlus *in vitro* ning *in vivo*

BFV-WT icDNA konstrueerimisel ja loodusliku isolaadi BFV2193 NGS analüüsil tuvastati alapeatükis 2.2.1. kirjeldatud mitte-sünonüümsed erinevused publitseeritud BFV2193 täisgenoomi järjestusest, mida pidasime esialgse sekveerimise vigadeks (GenBank kood: U73745.1) (Lee *et al.*, 1997). nsP4 kodeerivas järjestuses paiknenud erinevust, mis põhjustas polüproteiinis V1911D asenduse, muudeti tagasi valiini kodeerivaks. Kolleegide läbiviidud katsed näitasid, et sellega paranes ka oluliselt viiruse RNA infektsioonilisus: esialgu oli see ~100 PFU-d 1 µg RNA kohta, kuid valiini koodoniga ~$2x10^4$ PFU-d 1 µg RNA kohta. Et NGS analüüsil tuvastati ka mitte-sünonüümsed erinevused E2 ja E1 kodeerivates järjestustes, siis otsustasime omavahel võrrelda BFV2193 loodusliku isolaadi ja BFV-WT klooni

kasvukineetikat koekultuuris ning patogeneesi hiiremudelis *in vivo*, uurimaks nende erinevuste võimalikku mõju BFV fenotüübile.

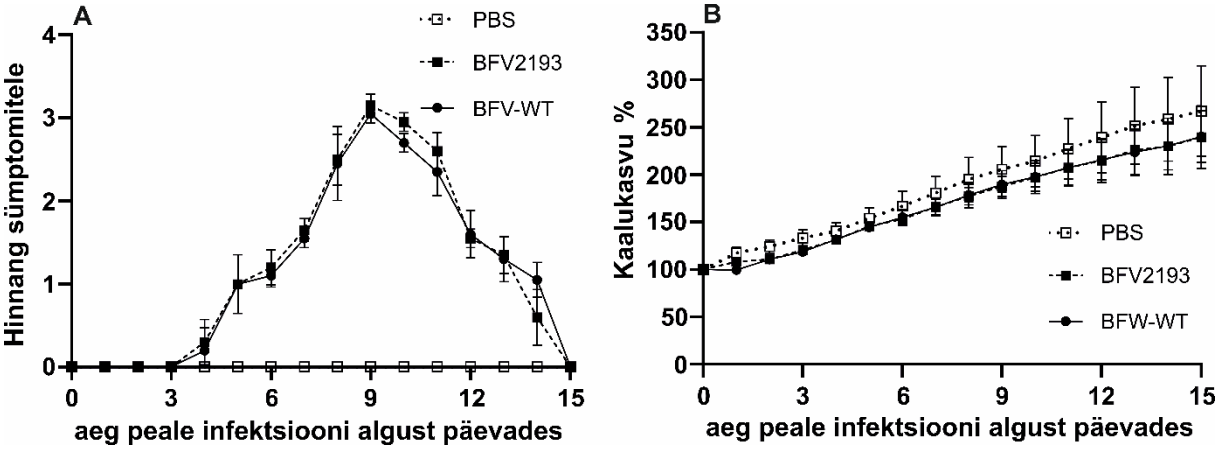
BFV-WT ja BFV2193 kasvukineetikat võrreldi imetajarakkudes mitme-astmelise kasvukõvera eksperimendiga. Selleks nakatati mõlema viirusega Vero, WT MEF ja IFNAR$^{-/-}$ MEF rakke MOI 0,1-ga ning rakkudelt koguti tiiterdamiseks viirusosakesi sisaldav sööde ajapunktides 0, 3, 6, 9, 12, 24 ja 48 h peale infektsiooni algust. Vero rakkudes, mis on tüüp I IFN süsteemi suhtes puudulikud, paljunesid mõlemad viirused kuni 9 h ajapunktini samal tasemel, kuid 12 h ja 24 h ajapunktides oli BFV2193-l statistiliselt oluline kasvueelis (Joonis 5A). IFNAR$^{-/-}$ MEF rakkude nakatamisel oli mõlema viiruse kasvukineetika peaaegu võrdne, kuid 9 h ajapunktis oli BFV2193 tiiter statistiliselt oluliselt kõrgem (Joonis 5B). WT MEF rakkudes, mis esindavad terviklikku tüüp I IFN süsteemi, olid mõlema viiruse kasvukõverad peaaegu identsed, üheski ajapunktis ei erinenud viiruse tiitrid statistiliselt olulisel määral (Joonis 5C).



Joonis 5. BFV2193 ja BFW-WT kasvukineetika imetajarakkudes. Mitme-astmeliste kasvukõverate koostamiseks nakatati **(A)** Vero, **(B)** IFNAR$^{-/-}$ MEF ja **(C)** WT MEF rakke kummagi viirusega MOI 0,1-ga ning rakkudelt koguti sööde ajapunktides 0, 3, 6, 9, 12, 24 ja 48 h peale infektsiooni algust. Viiruste tiitrid määrati lüüsilaikude moodustumise meetodil, mis arvutati ühikutes PFU/ml. Horisontaalne katkendjoon märgistab viiruse tuvastamise miinimumlävendit antud tiiterdamismeetodiga. Iga kujutatud andmepunkt koondab kolme nakatamisparalleeli ja nende kahe korduse aritmeetilist keskmist ning veajooned kujutavad andmepunktide ± standardhälvet. Statistilise olulisuse määramisel arvutati p-väärtused kahepoolse ANOVA testiga koos Bonferroni meetodiga, mis viiruste vahelisel võrdluses konkreetsetes ajapunktides on tähistatud tärnidega: *p<0,05 ja **p<0,01.

C57BL/6 hiiremudelis olid BFV2193 ja BFV-WT põhjustatud haigussümptomid samuti väga sarnased. Esmaseid haigussümptomeid täheldati mõlema viirusnakkuse korral alates neljandast päevast peale infektsiooni algust, üheksandal päeval täheldati haiguse haripunkti ning viieteistkümnendast päevast alates enam haigustunnuseid ei kirjeldatud (Joonis 6A). Haiguse kõrghetkel kirjeldati eksperimentaalgrupi hiirtel karvkatte ebakorrasust, küürus kõnnakut, mõningat tagumiste jäsemete nõrkust kõndimisel ning haaramisel ning mõningast letargiat. Kõrgeim hinnang sümptomitele oli veidi üle hinde 3 (Joonis 6A, tabel 2). Nakkuse käigus kaaluti hiiri igapäevaselt, et jälgida võimalikku haigusest tingitud kehakaalu langust või kaalu aeglasemat kasvu võrreldes kontrollgrupiga. BFV2193 ja BFV-WT infektsiooni korral kasvas hiirte kaal peaaegu võrdsel tasemel, mõningal määral vähem kui kontrollgrupi puhul,

kuid statistiliselt olulist erinevust eksperimentaalgruppide ja kontrollgrupi vahel ei olnud (Joonis 6B).



Joonis 6. BFV2193 ja BFV-WT fenotüüp nakatatud C57BL/6 hiirtes. C57BL/6 hiirtele süstiti rinnakupiirkonna nahaalusesse koesse 10^4 PFU-d viiruseid BFV2193 või BFV-WT ja kontrollgrupile süstiti selliselt 50 µl steriilset PBS-i, igas grupis oli 5 katselooma. Infektsiooni vältel hinnati iga päev punktisüsteemi alusel (tabel 2) haigussümptomeid **(A)** ning määrati loomade kehakaalud **(B)**. Statistilist olulisust võrreldi sümptomite hindamisel BFV2193 ja BFV-WT nakatatud gruppide vahel ning kaalukasvu protsentide hindamisel eksperimentaalgruppides omavahel ja ka kontrollgrupi vahel. Sümptomite hinnangu olulisuse arvutamisel kasutati Student'i t-testi koos Bonferroni meetodiga ning kehakaalude kasvu erinevuste olulisuse arvutamisel kasutati kahepoolset ANOVA testi koos Bonferroni meetodiga. Üheski ajapunktis polnud statistiliselt olulist erinevust sümptomite hinnangu suhtes eksperimentaalgruppide vahel **(A)** ja kaalukasvu erinevuste vahel ei eksperimentaalgruppide ega kontrollgrupi vahel **(B)**.

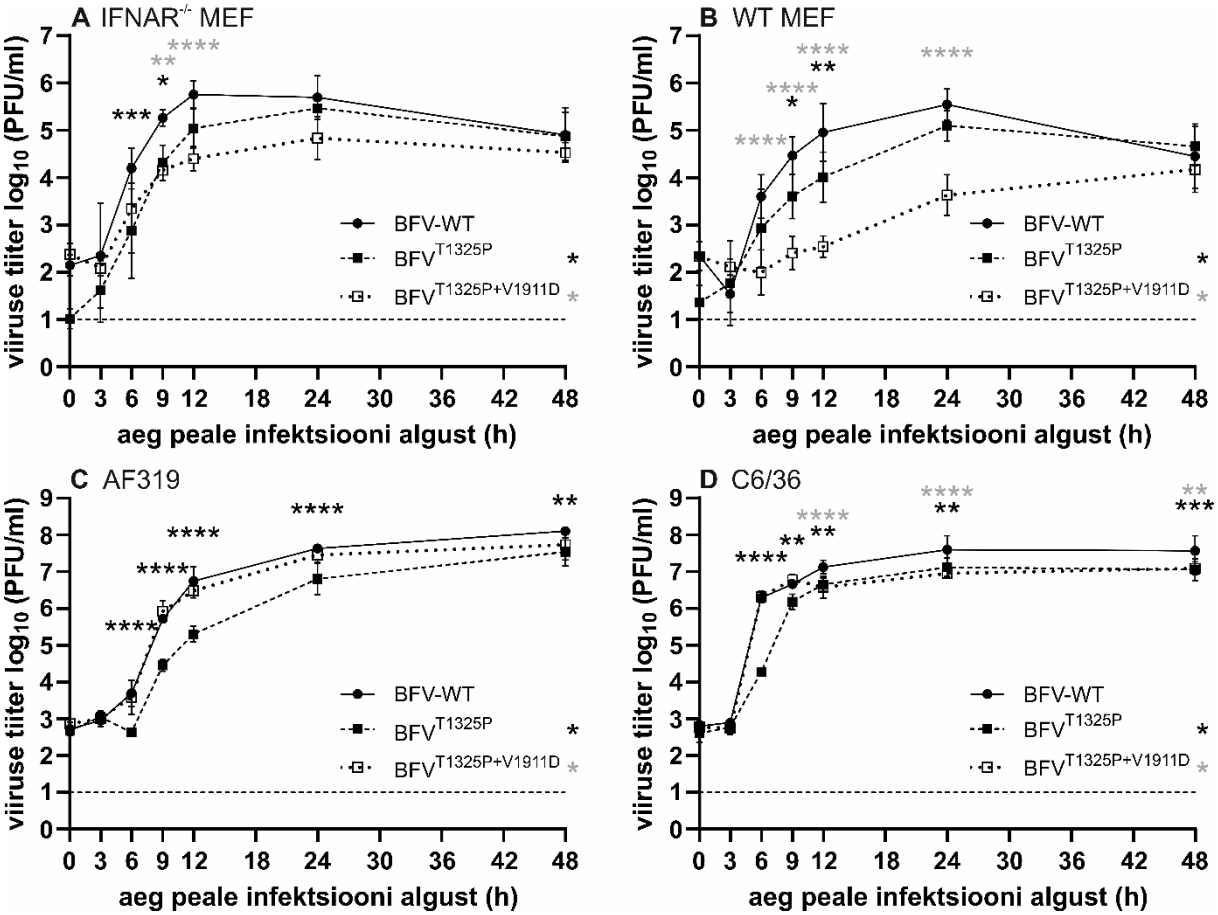
BFV2193 ja BFV-WT replikatsioonikineetika oli imetajarakkudes suuresti sarnane, aga Vero (joonis 5A) ning IFNAR$^{-/-}$ MEF (joonis 5B) rakuliinides, milles on tüüp I IFN signalisatsioon puudulik, oli üksikutes ajapunktides BFV2193 replikatsioonitase kõrgem. Küll aga oli BFV2193 ja BFV-WT kasvukineetika peaaegu identne tervikliku tüüp I IFN süsteemi juuresolekul WT MEF rakkudes ning haiguspilt oli väga sarnane ka *in vivo* hiiremudelis. Eelneva põhjal järeldati, et icDNA päritolu BFV on tõepoolest väga sarnaste omadustega viiruse looduslikule isolaadile ning NGS analüüsi põhjal teostatud muudatused on taastanud BFV metsiktüüpi omadused. Seega konstrueeritud BFV infektsiooniline kloon on edaspidistes katsetes sobilik kontrollviirus BFV mutantide paralleelsetel analüüsidel.

2.3.2. BFV^{T1325P} ja BFV$^{T1325P+V1911D}$ *in vitro* atenueeritud fenotüüp

NGS analüüs BFV2193 isolaadile aitas tuvastada eeldatava sekveneerimise vea nsP4 kodeerivas piirkonnas, kus mittestruktuurse polüproteiini primaarjärjestuses 1911. aminohape oli tuvastatud valiini asemel aspartaadina (mutatsioon V1911D). Sellist viirust (BFV^{V1911D}) aga minu kolleegidel koguda ei õnnestunud, hoopis oli antud mutatsiooni kompenseerimiseks tekkinud viiruse paljundamisel mutatsioon nsP2 kodeerivasse piirkonda, kus treoniini jääk

1325. positsioonis oli asendatud proliiniga (mutatsioon T1325P) ja sellise viiruse nimetasime BFV$^{T1325P+V1911D}$. Mutatsioon T1325P paigutub mittestruktuurse polüproteiini järjestuses nsP2 ja nsP3 vahelise lõikesaidi lähedusse ning selle piirkonna suhtes mutantsete viiruste puhul on kirjeldatud nende aeglasemat replikatsioonikineetikat ning seda eriti tüüp I IFN süsteemi suhtes kompetentsete rakuliinide korral (Gorchakov *et al.*, 2008a; Lulla *et al.*, 2013). Seetõttu iseloomustati käesolevas töös BFV^{T1325P} ja BFVT$^{1325P+V1911D}$ kasvukineetikat imetajarakkudes just WT MEF ja IFNAR$^{-/-}$ MEF rakuliinides.

IFNAR$^{-/-}$ rakkudes oli nii BFV^{T1325P} kui ka BFV$^{T1325P+V1911D}$ replikatsioon BFV-WT-st aeglasem just varajasemates ajapunktides ja alates 12 h ajapunktist oli BFV^{T1325P} replikatsioon kiirem BFV$^{T1325P+V1911D}$ kloonist, millest võib eeldada, et lisanduval mutatsioonil on ka lisanduv negatiivne mõju viiruse replikatsioonile (joonis 7A). WT MEF rakkudes oli BFV^{T1325P} kasvueelis BFV$^{T1325P+V1911D}$ ees eriti silmapaistev, kuna 12 ja 24 h ajapunktides oli viimase tiiter ligi 1000 korda madalam BFV-WT kloonist (joonis 7B). BFV^{T1325P} puhul oli erinevus BFV-WT tiitritega neis ajapunktides kõigest ligi kümnekordne (joonis 7B).



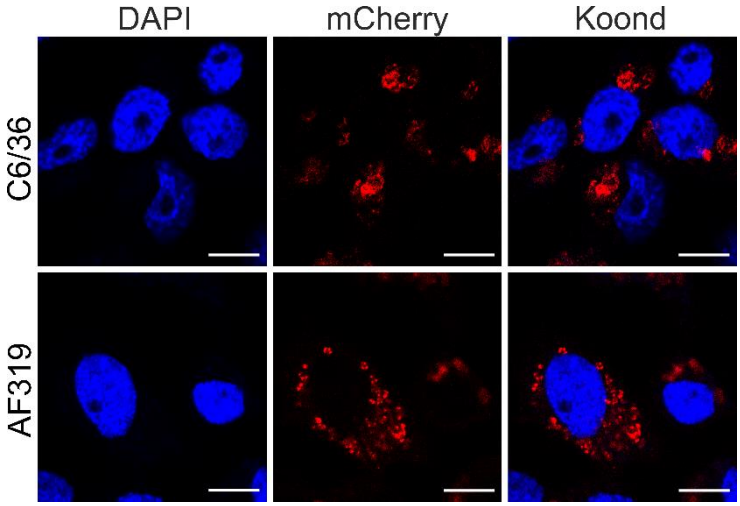
Joonis 7. BFV^{T1325P} ja BFV$^{T1325P+V1911D}$ kasvukineetika võrdlus imetaja- ja putukarakkudes. Mitme-astmeliste kasvukõverate katses nakatati IFNAR$^{-/-}$ MEF **(A)**, WT MEF **(B)**, AF319 **(C)** ja C6/36 **(D)** rakkusid BFV-WT, BFV^{T1325P} ja BFV$^{T1325P+V1911D}$ viirustega MOI 0,1-ga. Rakkudelt koguti sööde ajapunktides 0, 3, 6, 9, 12, 24 ja 48 h peale infektsiooni algust. Viiruste tiitrid määrati lüüsilaikude moodustumise meetodil, mis arvutati ühikutes PFU/ml. Horisontaalne katkendjoon märgistab viiruse tuvastamise miinimumlävendit antud tiiterdamismeetodiga. Iga kujutatud andmepunkt koondab kolme nakatamisparalleeli ja nende kahe korduse aritmeetilist keskmist ning veajooned kujutavad andmepunktide ± standardhälvet. Statistiline olulisuse määramisel arvutati p-väärtused kahepoolse ANOVA testiga koos Bonferroni meetodiga. Statistiliselt oluline erinevus võrdluses BFV-WT-ga on BFV^{T1325P} puhul tähistatud mustade tärnidega ning BFV$^{T1325P+V1911D}$ puhul hallide tärnidega, kus arvutuste p-väärtused on märgitud järgmiselt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 ja ****p<0,0001.

Varasemalt on kirjeldatud nsP2 ja nsP3 vahelise lõikesaidi aeglasema protsessingu positiivset mõju alfaviiruste replikatsioonile putukarakkudes, seetõttu otsustati T1325P mutatsiooni võimalikku sarnast mõju BFV replikatsioonile uurida ka käesolevas töös (Bartholomeeusen *et al.*, 2018). Võrreldes metsiktüüpi BFV-ga ei olnud BFV^{T1325P} ega BFV$^{T1325P+V1911D}$ replikatsioon kiirem kummaski kasutatud putukarakkude liinis, kuid huvitavalt kombel oli AF319 rakkudes BFV^{T1325P} kasvukiirus aeglasem metsiktüüpi viirusest pea kõikides ajapunktides, kuid BFV$^{T1325P+V1911D}$ replikatsioonikineetika oli peaaegu identne BFV-WT-ga (joonis 7C). C6/36 rakuliinis oli samuti täheldatav BFV^{T1325P} atenueeritus, aga alates 12 h ajapunktist oli aeglustunud ka BFV$^{T1325P+V1911D}$ replikatsioon (joonis 7D).

V1911D mutatsiooni positsioon nsP4 järjestuses on 110. aminohape, mis on nsP4 N-terminaalses alfaviirustele unikaalses domeenis ning lühikeses piirkonnas, millel konkreetne struktuur puudub (Tomar *et al.*, 2006; Rupp *et al.*, 2011). Selle regiooni funktsiooni pole otseselt kirjeldatud, kuid varasemalt on näidatud, et SINV analoogses piirkonnas paiknevat mutatsiooni kompenseerib mutatsioon nsP2 helikaasses domeenis (Rupp *et al.*, 2011). CHIKV puhul on kirjeldatud nsP4 RdRp domeeni ja nsP2 proteaasse domeeni funktsionaalset seost mutatsioonanalüüsidel, millega on seega varasemalt kirjeldatud, et nsP2 ja nsP4 vahel esineb tõepoolest funktsionaalseid interaktsioone (Coffey *et al.*, 2011; Stapleford *et al.*, 2015). Kuna $BFV^{T1325P+V1911D}$ oli erinevalt BFV^{T1325P}-st MEF rakkudes oluliselt atenueeritum ja T1325P+V1911D mutant oli eriti tundlik tüüp I IFN süsteemi suhtes, siis on võimalik, et ka nende kahe positsiooni tähtsus seisneb funktsionaalsetes interaktsioonides (joonised 7A, 7B). Kuna T1325P mutatsioon paikneb nsP2 ja nsP3 vahelise lõikesaidi juures, siis on võimalik, et selline kompensatsioon võib olla V1911D mutatsiooni suhtes ka kaudse efektiga, kus T1325P aeglustab selle lõikesaidi protsessimist. Mittestruktuurse polüproteiini lõikamisetappide aeglustamine on alfaviirustel levinud taktikaks mitmete kompensatoorsete mutatsioonide puhul, kus P23 liitvalgu lõikamise aeglustamist on kirjeldatud näiteks eduka RNA sünteesi ja sfäärulite moodustumise juures oluliseks (Kim *et al.*, 2004; Hellström *et al.*, 2017; Lulla *et al.*, 2018). Kõrgem tundlikkus tüüp I IFN süsteemi suhtes võib samuti olla seotud liitvalgu protsessimise aeglustumisega, kuna varem on näidatud, et sellised alfaviiruste mutandid sünteesivad rakus suuremas koguses RNA-sid, mis aktiveerivad tüüp I IFN ekspressiooni (Liu *et al.*, 2018). P23 liitvalgu lõikamise viibimine aeglustab ka vaba nsP2 kogunemist rakkudes, millel on oluline roll peremeesraku transkriptsiooni alla surumisel ning seega tüüp I IFN ekspressiooni vähendamisel, mis võib samuti selgitada $BFV^{T1325P+V1911D}$ esialgset aeglast replikatsiooni, kuid kõrgeid lõpptiitreid WT MEF rakkudes (Akhrymuk *et al.*, 2018). $BFV^{T1325P+V1911D}$ kasvueelis BFV^{T1325P} ees putukarakkudes viitab sellele, et need mutatsioonid on tõepoolest üksteist toetavad ja RNA sünteesimine ilmselt nende puhul häiritud pole (joonised 7C, 7D). Eelnevaga kokkuvõttes viitavad antud katsete tulemused sellele, et negatiivne mõju nende kahe mutandi replikatsioonile MEF rakkudes tuleneb ilmselt nende viibiva või vähenenud võimekusega suruda alla peremeesraku viirusvastaseid protsesse. Millise võimaliku mehhanismi alusel need toimivad, on aga edasiste uurimuste näidata.

2.3.3. BFV nsP3 lokalisatsiooni rakutuuma määrab NLS

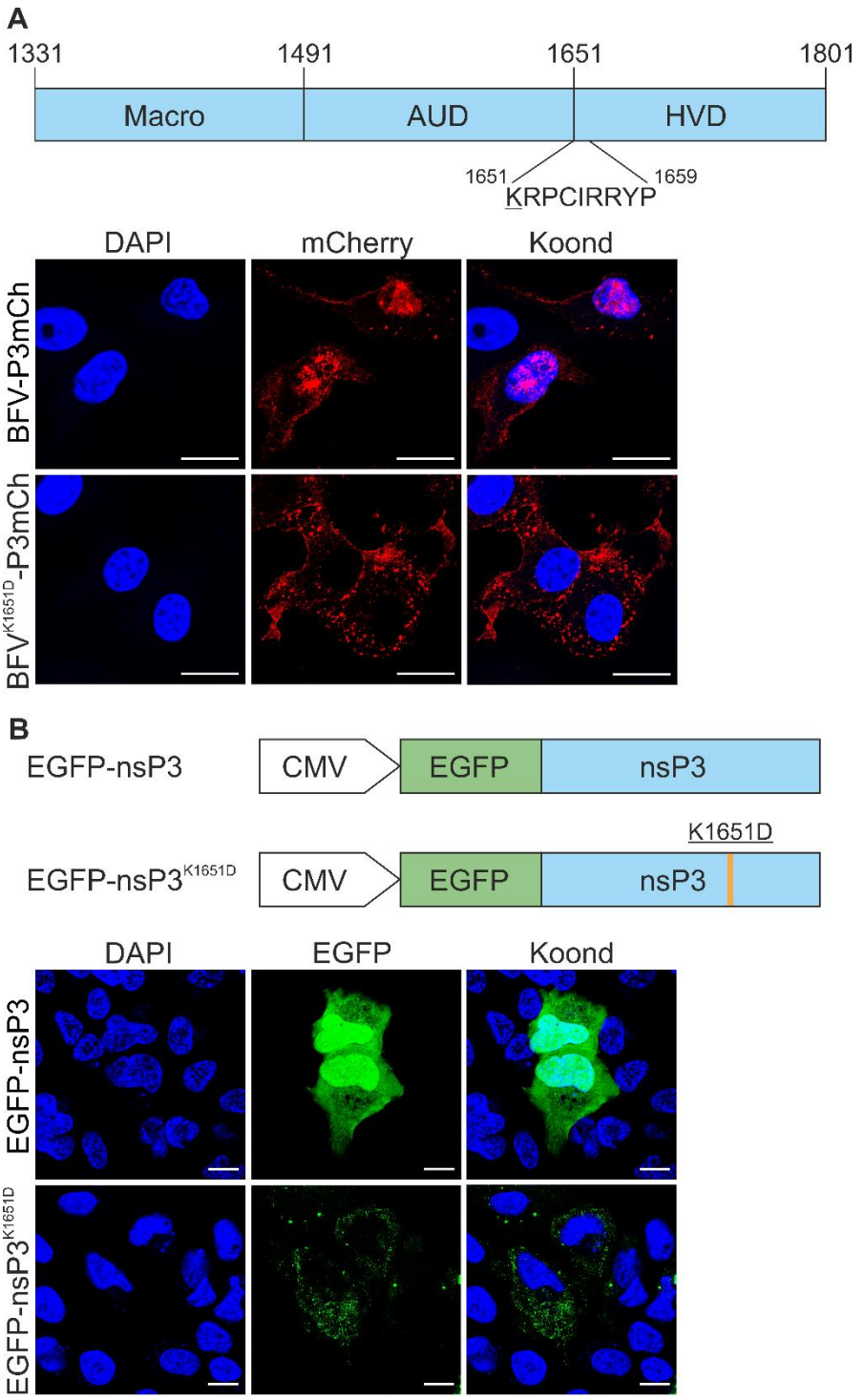
Minu bakalaureusetöö raames konstrueeriti BFV icDNA kloon pSP6-BFV-P3mCh, et fluorestsentsmikroskoobiga oleks võimalik jälgida viiruse infektsiooni nakatatud rakkudes, mille käigus kirjeldasime ka BFV nsP3 alfaviiruste seas unikaalse omaduse lokaliseeruda imetajarakkude tuuma (joonis 9A) (Omler, 2017). Putukarakkude C6/36 ja AF319 nakatamisel BFV-P3mCh-ga oli nsP3 lokalisatsioon tsütoplasmaatiline, millest järeldati, et BFV nsP3 lokalisatsioon rakutuuma ja selle võimalikud funktsioonid tuumas on spetsiifilised imetajarakkudele (joonis 8).



Joonis 8. BFV nsP3 lokalisatsioon putukarakkudes. C6/36 ja AF319 rakke nakatati BFV-P3mCh-ga MOI 1-ga. Rakud fikseeriti 24 h peale infektsiooni algust. Rakutuumad on värvitud DAPI-ga. Fluorestsentsanalüüs teostati Zeiss LSM710 konfokaalmikroskoobiga. Mõõtkava näit on 10 µm.

Tuvastamaks võimalikku NLS-i BFV nsP3 järjestuses, kasutati NLS-de ennustamistarkvara NLStradamus, millega saadi vasteks 9 aminohappejäägi pikkune järjestus AUD ja HVD piirialal (joonis 9A) (Nguyen Ba *et al.*, 2009). Et NLS-de koosseisus on olulistena kirjeldatud arginiini ja lüsiini jääke, siis otsustasid kolleegid luua BFV icDNA klooni, kus asendati tuvastatud järjestuses lüsiini jääk aspartaadiga, mis BFV mittestruktuurse polüproteiini järjestuses on 1651. aminohape (mutatsioon K1651D) (joonis 9A) (Kosugi *et al.*, 2009). Vero rakkude nakatamisel BFV^{K1651D}-P3mCh klooniga nsP3 signaali rakutuumas ei täheldatud (joonis 9A).

Tuvastatud NLS-i mõju näidati ka väljaspool viiruse infektsiooni konteksti, kus CMV promootori kontrolli alt ekspresseeriti U2OS rakkudes eraldiseisvad EGFP-nsP3 ja EGFP-nsP3^{K1651D} liitvalgud (joonis 9B). EGFP-nsP3 lokaliseerus nii tsütoplasmas kui ka rakutuumas, kuid EGFP-nsP3^{K1651D} lokalisatsiooni täheldati üksnes tsütoplasmaatilisena (joonis 9B). Mõlema katse tulemustest järeldati, et BFV nsP3 lokalisatsioon imetajaraku tuuma on aktiivne protsess, mis sõltub NLS-st.



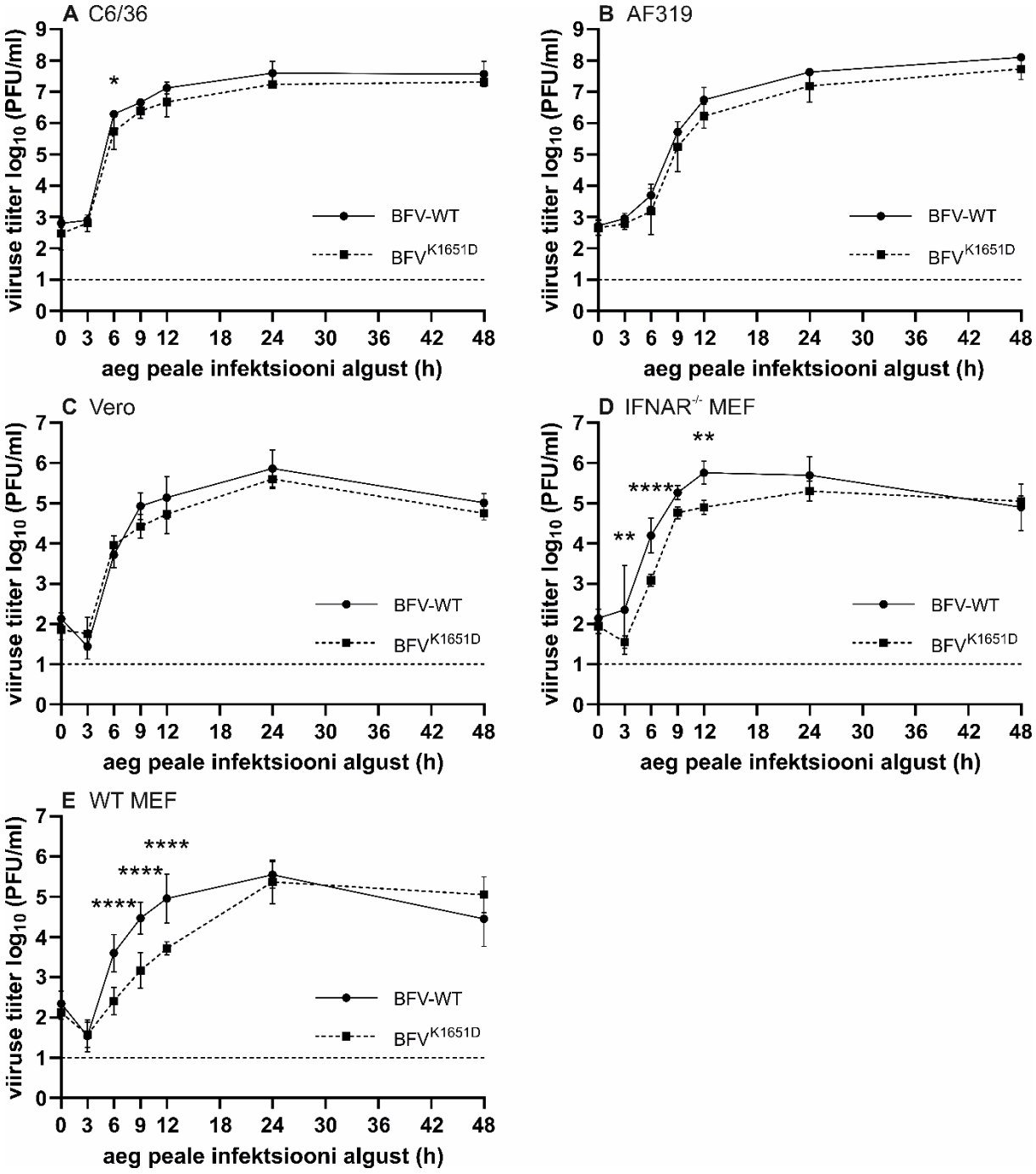
Joonis 9. BFV nsP3 ja BFV^{K1651D} nsP3 lokalisatsioon imetajarakkudes. (A) Skemaatiliselt on kujutatud BFV nsP3 domeenide jaotus, kus numbrid tähistavad nsP3 ja selle domeenide paiknemist mittestruktuurses polüproteiinis. Joonise all on toodud tuvastatud NLS ning alla on joonitud lüsiini jääk, mis muudeti aspartaadiks NLS-i häirimiseks. Vero rakke nakatati BFV-P3mCh ja BFV^{K1651D}-P3mCh-ga MOI 1-ga, fikseeriti 24 h peale infektsiooni algust ja rakutuumad värviti DAPI-ga. **(B)** Konstruktid, millelt ekspresseeriti EGFP-nsP3 ja EGFP-nsP3^{K1651D} liitvalgud. Asendusmutatsiooni ligikaudne asukoht on toodud oranžiga ning joonise kohal on alla joonitult mutatsiooni aminohappeline positsioon nsP3-s polüproteiini kontekstis. U2OS rakke transfekteeriti EGFP-nsP3 ja EGFP-nsP3^{K1651D} ekspresseerimiseks vastavate pcDNA4/TO_HA plasmiididega. 24 h peale transfekteerimist rakud fikseeriti, rakutuumad värviti DAPI-ga. **(A)** ja **(B)** Fluorestsentsanalüüs viidi läbi Zeiss LSM710 konfokaalmikroskoobiga. Mõõtkava näit on 20 μm.

2.3.4. BFV nsP3 tuumalokalisatsiooni puudumise mõju viiruse fenotüübile *in vitro* ja *in vivo*

BFV nsP3 tuumalokalisatsiooni mõju viiruse replikatsioonile hinnati BFV-WT ja BFV^{K1651D} võrdluses esmalt C6/36 ja AF319 rakkudes. BFV^{K1651D} tiitrid olid mõlemas putukarakkude liinis pea kõigis ajapunktides vaid veidi madalamad metsiktüüpi viiruse tiitritest, kus statistiliselt oluline erinevus esines ainult 6 h ajapunktis C6/36 rakkudes (joonised 10A, 10B). Seega ei mõjuta nsP3 NLS-i puudumine oluliselt viiruse replikatsiooni putukarakkudes, kus vastav signaaljärjestus tuumalokalisatsiooni eest ka ei vastuta (joonis 8). Ühtlasi ei mõjutanud NLS-i puudumine oluliselt BFV replikatsiooni Vero rakkudes (joonis 10C).

Vana Maailma alfaviiruste nsP2 ja Uue Maailma alfaviiruste kapsiidivalgu lokalisatsioon rakutuuma on seotud peremeesrakkude viirusvastase efekti mahasurumisega, sealjuures ka tüüp I IFN ülese vastuse alla reguleerimisega (Garmashova *et al.*, 2007b; Atasheva *et al.*, 2010a; Akhrymuk *et al.*, 2012). Ühtlasi on näidatud, et nsP2 ja C tuumalokalisatsiooni takistamisel on selliste alfaviiruste replikatsioonitase tüüp I IFN kompetentsetes rakuliinides madalam (Breakwell *et al.*, 2007; Atasheva *et al.*, 2010b; Taylor *et al.*, 2017; Meshram *et al.*, 2019). Uurimaks, kas BFV nsP3 NLS-i häirimisel on samuti negatiivne mõju viiruse replikatsioonile, võrreldi BFV-WT ja BFV^{K1651D} kasvukineetikaid IFNAR$^{-/-}$ MEF ja WT MEF rakkudes. Oli üllatav, et BFV^{K1651D} replitseerus kuni 12 h ajapunktini metsiktüüpi viirusest aeglasemalt ka IFNAR$^{-/-}$ MEF rakkudes, mis sarnaselt Vero rakkudele on tüüp I IFN vastuse suhtes puudulikud (joonis 10D). 9 h ajapunktis oli BFV^{K1651D} tiiter ligi 3 korda madalam, kui BFV-WT puhul ning 12 h ajapunktis oli vahe 9-kordne (joonis 10D). WT MEF rakkudes oli BFV^{K1651D} veelgi enam atenueeritud, kus 9 h ajapunktis oli tiiter metsiktüüpi viiruse omast ligikaudu 20 korda madalam ning 12 h ajapunktis ligikaudu 17 korda madalam (joonis 10E).

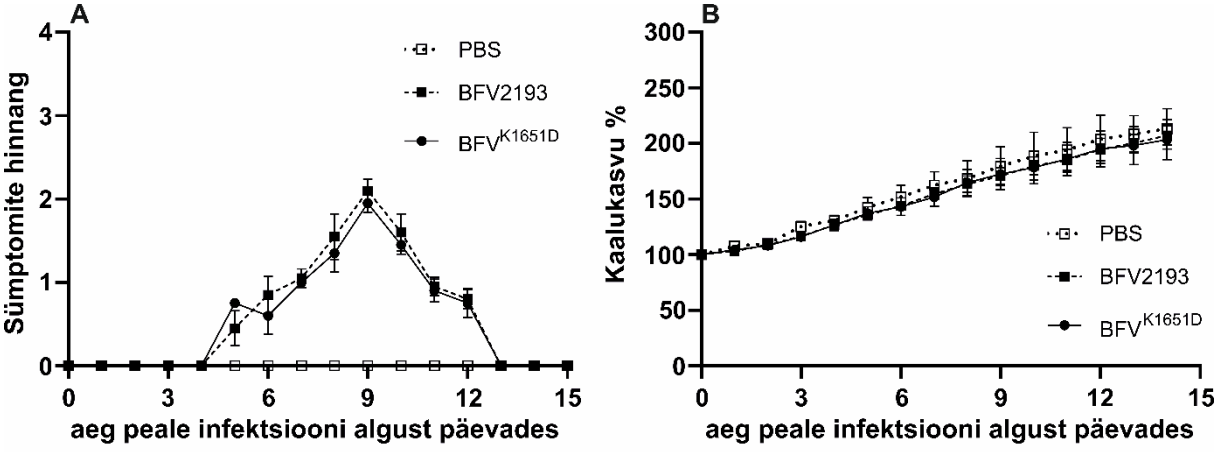
Sellest järeldati, et tüüp I IFN signaliseerimine takistab replikatsiooni viiruse infektsiooni varajastes staadiumites, seda vähemalt MEF rakuliinides, kuid asjaolu, et hilistes ajapunktides olid BFV-WT ja BFV^{K1651D} tiitrid võrdväärsed viitab sellele, et viiruse replikatsioon ja levik olid seetõttu vaid ajutiselt pärsitud.



Joonis 10. BFV^{K1651D} kasvukineetika putuka- ja imetajarakkudes. Mitme-astmeliste kasvukõverate katses nakatati C6/36 **(A)**, AF319 **(B)**, Vero **(C)**, IFNAR$^{-/-}$ MEF **(D)** ja WT MEF **(E)** rakkusid BFV-WT ja BFV^{K1651D}-ga MOI 0,1-ga. Rakkudelt koguti sööde ajapunktides 0, 3, 6, 9, 12, 24 ja 48 h peale infektsiooni algust. Viiruste tiitrid määrati lüüsilaikude moodustumise meetodil, mis arvutati ühikutes PFU/ml. Horisontaalne katkendjoon märgistab viiruse tuvastamise miinimumlävendit antud tiiterdamismeetodiga. Iga kujutatud andmepunkt koondab kolme nakatamisparalleeli ja nende kahe korduse aritmeetilist keskmist ning veajooned kujutavad andmepunktide ± standardhälvet. Statistilise olulisuse määramisel arvutati p-väärtused kahepoolse ANOVA testiga koos Bonferroni meetodiga, mis viiruste vahelisel võrdluses konkreetsetes ajapunktides on tähistatud tärnidega: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

Alfaviiruste mutandid, mis on tüüp I IFN vastuse suhtes tundlikumad WT viirustest, on tihti atenueeritud ka *in vivo* mudelites (Liu *et al.*, 2018, 2020; Chan *et al.*, 2019). Kuna BFV^{K1651D}

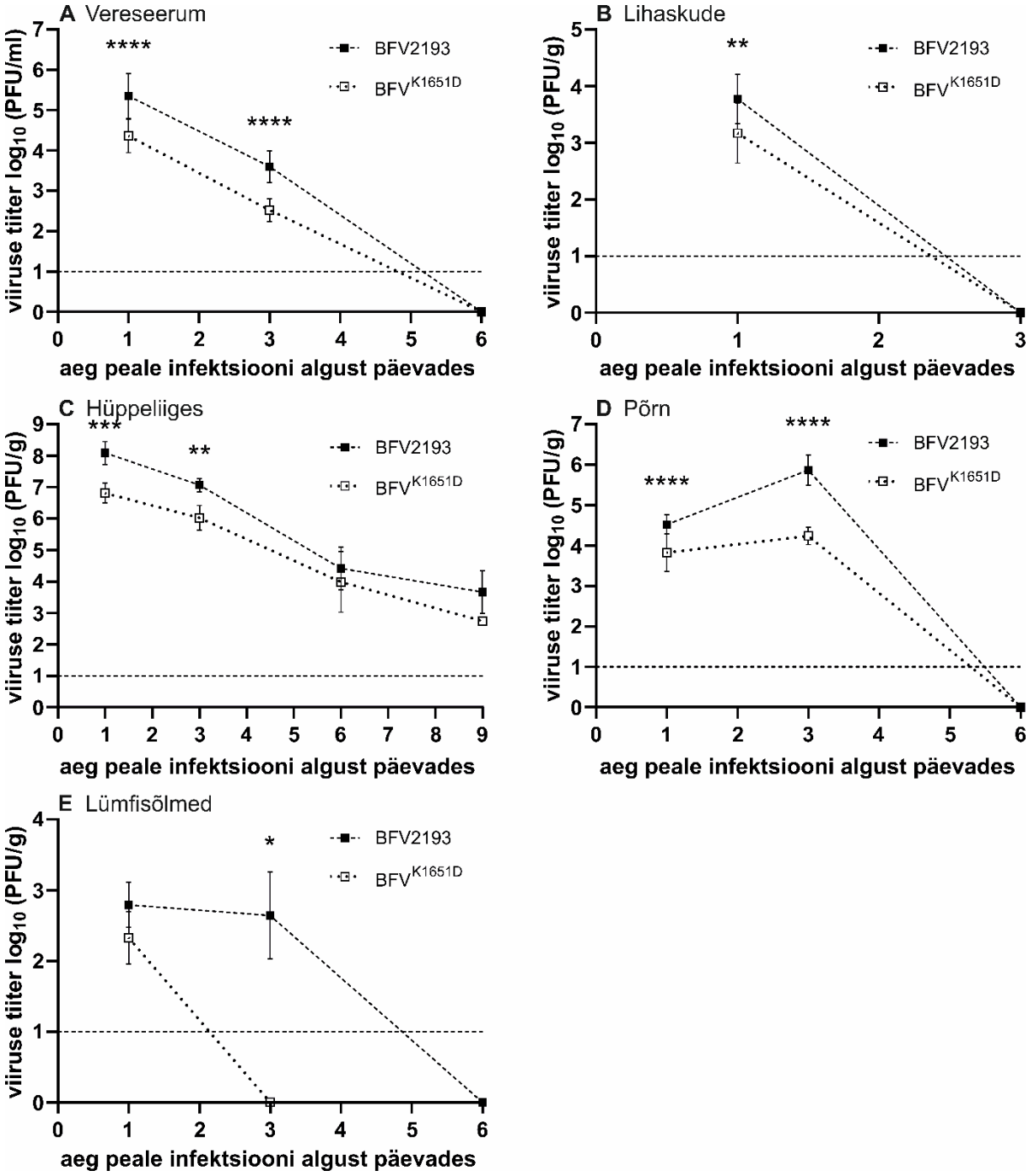
replikatsioon oli atenueeritud WT MEF rakkudes varajastes ajapunktides, siis huvitas meid, kas antud viiruse patogenees on kuidagi erinev ka hiiremudelis. C57BL/6 hiiri nakatati selleks võrdluseks BFV2193 ja BFV^{K1651D}-ga ning jälgiti taaskord haiguse kulgu. Eksperimentaalgruppide sümptomite hinnangutel olulist vahet ei täheldatud ning sümptomid olid võrreldes alapeatükis 2.3.1. kirjeldatud eksperimendiga leebemad (joonis 11A). Esimesi sümptomeid täheldati viiendal päeval peale infektsiooni algust, haiguse haripunkt saabus üheksandal päeval ning peale kolmeteistkümnendat päeva enam haigustunnuseid ei esinenud (joonis 11A). Kõrgeimaks sümptomite hinnanguks haripunktis oli 2 (joonis 11A). Samuti puudusid olulised erinevused kaalu kosumise osas eksperimentaalgruppide ja kontrollgrupi vahel (joonis 11B). Kuna BFV infektsioon ei põhjusta metsiktüüpi C57BL/6 hiirtel kuigi tõsiseid haigustunnuseid, siis tuleb kahe loomkatse hinnangute erinevus ilmselt sellest, et leebeid sümptomeid ongi keeruline hinnata. 1. ja 3. päeval peale infektsiooni algust olid viiruse tiitrid aga BFV2193 nakatatud hiirte vereseerumis statistiliselt oluliselt kõrgemad, kui BFV^{K1651D} puhul (joonis 12A).



Joonis 11. BFV2193 ja BFV^{K1651D} patogenees hiiremudelis. C57BL/6 hiirtele süstiti rinnakupiirkonna nahaalusesse koesse 10^4 PFU-d viiruseid BFV2193 või BFV^{K1651D} ja kontrollgrupile süstiti selliselt 50 µl steriilset PBS-i, igas grupis oli 5 katselooma. Infektsiooni vältel hinnati iga päev punktisüsteemi alusel (tabel 2) haigussümptomeid **(A)** ning määrati loomade kehakaalud **(B)**. Statistilist olulisust võrreldi sümptomite hindamisel BFV2193 ja BFV-WT nakatatud gruppide vahel ning kaalukasvu protsentide hindamisel eksperimentaalgruppides omavahel ja ka kontrollgrupi vahel. Sümptomite hinnangu statistilise olulisuse arvutamisel kasutati Student'i t-testi koos Bonferroni meetodiga ning kehakaalude kasvu erinevuste statistilise olulisuse arvutamisel kasutati kahepoolset ANOVA testi koos Bonferroni meetodiga. Üheski ajapunktis polnud statistiliselt olulist erinevust sümptomite hinnangu suhtes eksperimentaalgruppide vahel **(A)** ja kaalukasvu erinevuste vahel ei eksperimentaalgruppide ega kontrollgrupi vahel **(B)**.

Erinevused BFV2193 ja BFV^{K1651D} vahel esinesid ka tiitrite määramisel kudedest. Mõlema viiruse tiiter oli tagumiste jäsemete lihaskoest määratav vaid esimesel päeval peale infektsiooni algust, kus BFV2193 tiiter oli statistiliselt oluliselt kõrgem (joonis 12B). See on vastavuses ka

eelneva uuringuga BFV C57BL/6 hiiremudelis, kus kirjeldati BFV vähest infektsioonilisust lihaskoele (Herrero *et al.*, 2014). Tagajäsemete hüppeliigeste tiitrid olid tuvastatavad kuni üheksanda päevani peale infektsiooni algust, kus BFV^{K1651D} tiitrid olid taaskord madalamad metsiktüüpi viirusest ning statistiliselt oluliselt madalamad esimesel ja kolmandal päeval (joonis 12C). Esimesel ja kolmandal päeval peale infektsiooni algust oli ka põrnas BFV^{K1651D} tiitrid oluliselt madalamad BFV2193 tiitritest ja peale neid ajapunkte viiruseid põrnast ei tuvastatud (joonis 12D). Lümfisõlmedes oli BFV2193 tiiter tuvastatav esimesel ja kolmandal päeval, kuid BFV^{K1651D} vaid esimesel päeval peale infektsiooni algust (joonis 12E). Kuigi mõlema viiruse haigustunnused olid väga sarnased, siis viiruste tiitrite määramine kudedest näitas, et BFV nsP3 lokalisatsiooni puudumine rakutuumast atenueerib viirust ka *in vivo*.



Joonis 12. Vereseerumist ja valitud kudedest määratud tiitrid BFV2193 ja BFV^{K1651D} nakatatud hiirtes. C57BL/6 hiirtele süstiti 10^4 PFU-d BFV2193 või BFV^{K1651D} viiruseid. Ajapunktides 1, 3, 6 ja 9 päeva peale infektsiooni algust koguti hiirtelt vere- ja koeproovid, iga ajapunkti kohta nakatati nelja hiirt kummagi viirusega. Vereseerumis **(A)**, tagajäsemete nelipealihastes **(B)**, tagajäsemete hüppeliigestes **(C)**, põrnas **(D)** ja lümfisõlmedes **(E)** määrati tiitrid homogeniseeritud kudedest lüüsilaikude meetodil kahes korduses. Iga andmepunkt graafikul esindab ühe ajapunkti vastavate koeproovide tiitrite aritmeetilist keskmist ± standardhälvet. Statistilise olulisuse arvutamisel kasutati kahepoolset ANOVA testi koos Bonferroni meetodiga. Statistiline olulisus erinevate andmepunktide vahel on tähistatud graafikul tärnidega järgmiselt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

Alfaviiruste nsP3 interakteerub mitmete peremeesraku valkudega ning eelkõige on kirjeldatud neid seondumisi toimuvat HVD vahendusel (Götte *et al.*, 2018). Nende interaktsioonide hulgas on viiruse replikatsioonile olulise mõjuga kirjeldatud FHL1 ja G3BP seondamist, kus viimase interaktsiooni on konkreetselt näidatud ka BFV nsP3-ga (Kim *et al.*, 2016; Götte *et al.*, 2019, 2020; Meertens *et al.*, 2019). Samuti on näidatud, et mitmed valgud, millega nsP3 interakteerub või kolokaliseerub replikatsioonikomplekside koosseisus, on samuti rohkelt esindatud rakutuumas (Cristea *et al.*, 2006; Varjak *et al.*, 2013). Käesolevas magistritöös näidati, et alfaviiruste perekonnas unikaalne omadus, BFV nsP3 lokalisatsioon peremeesraku tuuma, on sõltuv HVD-s paiknevast NLS-st ning selline lokalisatsioon esineb vaid imetajarakkude nakatamisel (joonised 8 ja 9). Teostatud eksperimentide põhjal ei saa paraku teha järeldusi selle kohta, milliste faktoritega võiks nsP3 rakutuumas seonduda, kuid NLS-i olemasolu (joonis 9) viitab sellele, et BFV nsP3 lokalisatsioon imetajarakkude tuuma on aktiivne importiinvalkude vahendatud protsess (Kosugi *et al.*, 2009).

Varasemalt on kirjeldatud NLS-e alfaviiruste nsP2 ja C-valgus, kus vastavalt Vana Maailma ja Uue Maailma alfaviiruste puhul on nende lokalisatsioon rakutuumas seotud peremeesraku transkriptsiooni allasurumisega ja tüüp I IFN vastuse moduleerimisega, ühtlasi on need valgud määravad vastavate alfaviiruste tsütotoksilisuses (Garmashova *et al.*, 2006, 2007a; Atasheva *et al.*, 2010a; Akhrymuk *et al.*, 2012). BFV nsP3 lokalisatsioon imetajaraku tuuma ei ole kindlasti sedavõrd olulise funktsiooniga peremeesraku transkriptsiooni allasurumisel või ka tsütotoksilisusel, kuna NLS-i häirimisel oli BFV replikatsioonikineetika Vero rakkudes väga sarnane metsiktüüpi viirusele (joonis 10C). Antud mutatsioon põhjustas aga BFV lisanduvat atenueerimist tüüp I IFN vastuse juuresolekul varajastes ajapunktides WT MEF rakkudes (joonised 10D, 10E), mistõttu võib BFV nsP3 tuumalokalisatsioonil olla lisanduv roll peremeesraku tüüp I IFN ekspressiooni reguleerimisel ja seejuures tuleb silmas pidada, et nsP2 täidab jätkuvalt oma eelkirjeldatud funktsiooni. Kuna $BFV^{T1325P+V1911D}$ replikatsioon WT MEF rakkudes oli samuti varajastes ajapunktides aeglasem (joonis 7B), siis on võimalik, et selle viiruse NLS-i rikkumine võimaldaks iseloomustada nsP3 tuumalokalisatsiooni lisanduvat mõju viiruse replikatsioonile tüüp I IFN vastuse juuresolekul, mis jääks järgmiste uurimuste kirjeldada. BFV nsP3 ei lokaliseeru putukarakkude tuuma (joonis 8) ning antud mutatsioon ei mõjuta oluliselt BFV replikatsiooni neis rakkudes (joonised 10A, 10B), mis viitab sellele, et see omadus pole juhuslik ega universaalne ja esineb teatud spetsiifilisus sõltuvalt peremeesraku päritolust. Seda oletust toetab ka asjaolu, et Vero rakkudes polnud nsP3 NLS-i häirimisel samuti olulist mõju BFV replikatsioonile vastupidiselt hiire päritolu MEF rakkudes täheldatule (joonised 10C, 10D, 10E). BFV^{K1651D} infektsioonil MEF rakuliinides oli täheldada varajastes

ajapunktides madalamat replikatsioonikineetikat (joonised 10D, 10E) ja kuna rakkude nakatamisel kasutati madalat infektsioonikordajat (MOI 0,1), siis võib järeldada, et mutatsioon pärssis neis rakkudes viiruse replikatsiooni, aga uute sünteesitud viiruste levikut teistele rakkudele mitte. Seega on võimalik, et hiirepäritolu rakkudes on BFV replikatsioon pärsitud mõne spetsiifilise mehhanismiga, millele vastu töötamisel on roll BFV nsP3 lokalisatsioonil rakutuuma.

Viimast hüpoteesi võiks toetada ka see, et BFV^{K1651D}-ga nakatatud C57BL/6 hiirtest kogutud kudedes oli viiruse tiiter madalam, kui metsiktüüpi viirusega nakatatud katseloomades (joonis 11). Loomkatsete tulemused BFV^{K1651D} ja BFV2193 võrdluses langevad kokku ka *in vitro* katsetes kirjeldatud mutatsiooni efektiga, kus BFV nsP3 tuumalokalisatsiooni puudumine atenueerib BFV-d vaid mõnigal määral (joonised 10 ja 12). Kuna BFV põhjustatud tõbi ei ole C57BL/6 hiirtes kuigi raskete sümptomitega, siis eksperimentaalgruppide haigussümptomite visuaalsel hindamisel olulist erinevust ei täheldatud (joonis 11A), mis kajastus ka selles, et nakatatud hiirte kosumine infektsiooni järgselt ei olnud oluliselt mõjutatud (joonis 11B). Seetõttu sobib ilmselt antud C57BL/6 *in vivo* mudel pigem hindamaks BFV ja selle mutantsete/atenueeritud variantide patogeneesi kudede tiitrite määramisega, mida saaks kasutada ka potentsiaalsete vaktsiinikandidaatide analüüsil.

Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö uurimisobjektiks oli alfaviiruste seas võrdlemisi vähe uuritud patogeen BFV. Eesmärgiks oli kirjeldada meie uurimisrühmas varasemalt konstrueeritud infektsiooniliste kloonidega teatud mutatsioonide mõju BFV infektsioonile ning iseloomustada BFV nsP3 tuumalokalisatsiooni signaali ja selle olulisust viiruse replikatsioonile.

Töös võrreldi esmalt BFV-WT icDNA klooni ja BFV2193 loodusliku isolaadi replikatsioonikineetikat koekultuuris. Tulemused näitasid, et konstrueeritud icDNA kloon replitseerus sarnaselt looduslikule isolaadile ja seda eriti tüüp I IFN vastuse juuresolekul MEF rakkudes. Loodusliku isolaadi ja BFV-WT klooni põhjustatud haiguspilt oli nakatatud C57BL/6 hiirtes samuti peaaegu identne, millest kokkuvõttes järeldati, et BFV-WT icDNA kloon on omadustelt väga sarnane loodusliku isolaadiga.

BFV icDNA loomisel omandatud nsP2 ja nsP4 kodeerivate piirkondade suhtes mutantsed viirused paljunesid MEF rakuliinides metsiktüüpi viirusest aeglasemalt. V1911D (nsP4) ja seda kompenseeriv mutatsioon T1325P (nsP2) muutsid BFV tüüp I IFN vastuse suhtes infektsiooni alguses eriti tundlikuks, millest oletati nende positsioonide olulisust rakus esmase viirusvastase oleku mahasurumisel. Putukarakkudes pärssis replikatsiooni pigem üksikmutatsioon T1325P, mistõttu võib eeldada, et nende positsioonide kaudu toimub nsP2 ja nsP4 replikatsiooni toetav interaktsioon. Kuna T1325P mutatsioon on nsP2 ja nsP3 lõikesaitide vahetus läheduses, siis on ka võimalik, et selle mutatsiooni abil aeglustab viirus polüproteiini lõikamist, et V1911D põhjustatud replikatsioonidefekti kompenseerida.

Töös näidati, et BFV nsP3 tuumalokalisatsiooni määrab HVD järjestuse alguses paiknev NLS. Ühtlasi näidati, et putukarakkude nakatamisel nsP3 rakutuuma ei lokaliseeru, tuvastatud NLS on funktsionaalne imetajarakkude kontekstis. Samuti ei mõjutanud putukarakkude nakatamisel NLS-i häirimine BFV kasvukineetikat. Vero rakkudes polnud samuti NLS *knockout* klooni replikatsioon oluliselt erinev metsiktüüpi viirusest, kuid MEF rakkudes oli mutantne viirus varajastes ajapunktides atenueeritud. Seega oli tüüp I IFN vastusel lisanduv negatiivne mõju NLS *knockout* mutandi replikatsioonile. Hiirte nakatamisel olid häiritud tuumalokalisatsiooni signaaliga viiruse tiitrid samuti madalamad, kui BFV-WT nakatatud hiirtest kogutud kudedest. Sellest oletati, et BFV nsP3 tuumalokalisatsioon võib mõjutada tüüp I IFN vastuse kujunemist peremeesrakus. Kuna alfaviiruste nsP3 interakteerub mitmete peremeesraku valkudega, siis pole välistatud ka valgu interaktsioon mõnede rakutuumsete faktoritega, mis jääb aga edasiste uurimuste näidata.

Characterizing Barmah Forest virus mutants *in vitro* and *in vivo*

Résumé

Ailar Omler

The genus *Alphavirus* represents a group of viruses that possess a positive sense RNA genome. Most alphaviruses infect vertebrate hosts, that also serve as their natural reservoir, and virus transmission is dependent on arthropod vectors, most of which are different various of mosquitoes. Many alphaviruses are human pathogens that may cause encephalitis or debilitating arthritis upon infection. Since no vaccine for any alphavirus is available, these pathogens garner continued interest from researchers

This thesis focuses on characterizing Barmah Forest virus (BFV), a widespread human pathogen in Australia that upon infection causes rash, myalgia, fever and polyarthritis. BFV is the second most prevalent alphavirus in Australia (after Ross River virus) and causes around 1000 reported cases of human disease per year. Despite its connection to human disease, BFV has not been the subject of extensive research. In this study, some properties of BFV are characterized by the analysis of several mutant viruses in comparison to wild-type clones.

Most of the viruses used in this study are BFV icDNA clones previously assembled in our research group. First, the BFV-WT icDNA clone was compared to the BFV2193 prototype natural isolate both *in vitro* and *in vivo*. Cell culture experiments showed that BFV-WT exhibited very similar growth kinetics to the natural isolate and did so especially when growth was compared in type I IFN competent MEF cells. Pathogenesis of BFV-WT was also compared to the natural isolate in a C57BL/6 mouse model which too was very similar. It was concluded that the assembled clone derived virus indeed reproduces properties of the natural BFV isolate.

The initial attempts by my colleagues to rescue WT virus from the icDNA resulted instead in rescuing a mutant virus with substitutions in the nsP4 coding region (mutation V1911D) and nsP2 coding region (mutation T1325P). The difference in the nsP4 coding region was attributed to an error in the original published sequence of BFV2193 and the mutation in the nsP2 coding region seemed to be a compensatory change to alleviate the effect of the V1911D mutation, as BFV^{V1911D} rescue itself was unsuccessful. When comparing the growth kinetics of these double ($BFV^{T1325P+V1911D}$) and single (BFV^{T1325P}) mutant viruses, it was observed that both mutants were sensitive to type I IFN signalling and $BFV^{T1325P+V1911D}$ particularly was well attenuated in WT MEF cells. It was proposed that these amino acid positions are important for the initial

modulation of the host cell's antiviral state. In insect cells, rather the BFV^{T1325P} mutant showed some reduction in replication rates and it could be that the indicated residues in nsP2 and nsP4 may facilitate a host specific functional interaction in the replication complex. As the T1325P mutation is in the vicinity of the nsP2-nsP3 cleavage site, the substitution may slow down the proteolytic processing of this particular cleavage event and thus compensate the replication defects imposed by the V1911D mutation in nsP4.

It was previously shown in my bachelor's thesis that the BFV nsP3 localizes in the cell nucleus when infecting mammalian cells, a unique feature within the whole genus. In this study the feature was studied further, and it was shown that the BFV nsP3 nuclear localization depends on a nuclear localization signal (NLS) that maps to the beginning of the HVD. Furthermore, it was demonstrated that BFV nsP3 nuclear localization occurs only in mammalian cells as no such localization was apparent in infected mosquito cells. When infecting mosquito cells with BFV-WT and its NLS knockout counterpart, no significant differences in replication kinetics were observed as well.

In mammalian-derived Vero cells, the lack of nsP3 nuclear localization also did not affect the replication significantly. Conversely, in MEF cells BFV^{K1651D} showed poorer growth at earlier timepoints and further attenuation was observed in WT MEF cells harbouring an intact type I IFN response. The effects of disrupting the NLS in BFV nsP3 were further analysed *in vivo*, where mice were infected with either BFV-WT or BFV^{K1651D} and monitored for clinical scores, weight gain and select tissue samples were subsequently used for virus titration. There were no significant differences in disease symptoms or weight gain between the experimental groups which is probably in owing to the quite mild symptoms exhibited by BFV infected mice altogether. On the contrary, virus titres determined from hind limb ankles, hind limb quadriceps, spleen and lymph nodes showed that BFV-WT had a significant growth advantage over its NLS knockout mutant.

Other alphavirus encoded proteins that possess an NLS are nsP2 and the capsid protein. Both of which interact with host cell nuclear determinants in order to downregulate host transcription and thus also type I IFN response. The lack of nsP3 nuclear localization attributed to attenuation in BFV replication at early timepoints in WT MEF cells and contributed to reduced tissue titres *in vivo*. From this data, it was proposed that when nsP3 localizes in the cell nucleus it could possess additional downregulatory functions to the host's gene expression. As nsp3 has been previously shown to be a major hub for interactions with host factors, it may well be that specific interactions take place between BFV nsP3 and host nuclear factors as well but these hypotheses will need to be analysed in further studies.

Tänusõnad

Soovin tänada prof. Andres Meritsat ja Margit Mutsot hea juhendamise eest ning kogu TÜTI RNA viiruste töörühma kollektiivi abivalmiduse ja nõu eest. Tänan ka prof. Suresh Mahalingamit Griffithi Ülikoolist juhendamise eest, Joseph Freitast tema abi eest eksperimentide läbiviimisel ja kõiki prof. Mahalingami töörühma liikmeid nende nõu ja külalislahkuse eest. Tänan elukaaslast Kristinat absoluutselt kõige eest.

Välislähetus Austraalias Griffithi Ülikooli juures sai võimalikuks tänu Kristjan Jaagu välisõpingute stipendiumile (SA Archimedes, Haridus- ja Teadusministeerium).

Kasutatud kirjandus

Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D.M., Rodríguez, Y., Pacheco, Y., Anaya, J.-M., ja Ramírez-Santana, C. (2018). Mayaro: an emerging viral threat? Emerg Microbes Infec, 7: 1–11.

Ahola, T., ja Kääriäinen, L. (1995). Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 507–511.

Ahola, T., Kujala, P., Tuittila, M., Blom, T., Laakkonen, P., Hinkkanen, A., ja Auvinen, P. (2000). Effects of Palmitoylation of Replicase Protein nsP1 on Alphavirus Infection. J Virol, 74: 6725–6733.

Ahola, T., Laakkonen, P., Vihinen, H., ja Kääriäinen, L. (1997). Critical residues of Semliki Forest virus RNA capping enzyme involved in methyltransferase and guanylyltransferase-like activities. J Virol, 71: 392–397.

Ahola, T., Lampio, A., Auvinen, P., ja Kääriäinen, L. (1999). Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. EMBO J, 18: 3164–3172.

Akhrymuk, I., Frolov, I., ja Frolova, E.I. (2016). Both RIG-I and MDA5 detect alphavirus replication in concentration-dependent mode. Virology, 487: 230–241.

Akhrymuk, I., Frolov, I., ja Frolova, E.I. (2018). Sindbis Virus Infection Causes Cell Death by nsP2-Induced Transcriptional Shutoff or by nsP3-Dependent Translational Shutoff. J Virol, 92.

Akhrymuk, I., Kulemzin, S.V., ja Frolova, E.I. (2012). Evasion of the Innate Immune Response: the Old World Alphavirus nsP2 Protein Induces Rapid Degradation of Rpb1, a Catalytic Subunit of RNA Polymerase II. J Virol, 86: 7180–7191.

Atasheva, S., Fish, A., Fornerod, M., ja Frolova, E.I. (2010a). Venezuelan equine Encephalitis virus capsid protein forms a tetrameric complex with CRM1 and importin alpha/beta that obstructs nuclear pore complex function. J Virol, 84: 4158–4171.

Atasheva, S., Frolova, E.I., ja Frolov, I. (2014). Interferon-Stimulated Poly(ADP-Ribose) Polymerases Are Potent Inhibitors of Cellular Translation and Virus Replication. Journal of Virology, 88: 2116–2130.

Atasheva, S., Krendelchtchikova, V., Liopo, A., Frolova, E., ja Frolov, I. (2010b). Interplay of acute and persistent infections caused by Venezuelan equine encephalitis virus encoding mutated capsid protein. J Virol, 84: 10004–10015.

Barth, B.U., Suomalainen, M., Liljeström, P., ja Garoff, H. (1992). Alphavirus assembly and entry: role of the cytoplasmic tail of the E1 spike subunit. J Virol, 66: 7560–7564.

Bartholomeeusen, K., Utt, A., Coppens, S., Rausalu, K., Vereecken, K., Ariën, K.K., ja Merits, A. (2018). A Chikungunya Virus trans-Replicase System Reveals the Importance of Delayed Nonstructural Polyprotein Processing for Efficient Replication Complex Formation in Mosquito Cells. J Virol, 92.

Breakwell, L., Dosenovic, P., Karlsson Hedestam, G.B., D'Amato, M., Liljeström, P., Fazakerley, J., ja McInerney, G.M. (2007). Semliki Forest Virus Nonstructural Protein 2 Is Involved in Suppression of the Type I Interferon Response. J Virol, 81: 8677–8684.

Burt, F.J., Chen, W., Miner, J.J., ... Mahalingam, S. (2017). Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. Lancet Infect Dis, 17: e107–e117.

Caly, L., Horwood, P.F., Vijakrishna, D., ... Abdad, M.Y. (2019). Divergent Barmah Forest Virus from Papua New Guinea. Emerg Infect Dis, 25: 2266–2269.

Carpentier, K.S., ja Morrison, T.E. (2018). Innate immune control of alphavirus infection. Curr Opin Virol, 28: 53–60.

Cassadou, S., Boucau, S., Petit-Sinturel, M., Huc, P., Leparc-Goffart, I., ja Ledrans, M. (2014). Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. Eurosurveillance, 19: 20752.

Chan, Y.-H., Teo, T.-H., Utt, A., ... Ng, L.F. (2019). Mutating chikungunya virus non-structural protein produces potent live-attenuated vaccine candidate. EMBO Mol Med, 11.

Chen, R., Mukhopadhyay, S., Merits, A., Bolling, B., Nasar, F., Coffey, L.L., Powers, A., Weaver, S.C., ja ICTV Report Consortium (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. J Gen Virol, 99: 761–762.

Choi, H.-K., Tong, L., Minor, W., Dumas, P., Boege, U., Rossmann, M.G., ja Wengler, G. (1991). Structure of Sindbis virus core protein reveals a chymotrypsin-like serine proteinase and the organization of the virion. Nature, 354: 37–43.

Coffey, L.L., Beeharry, Y., Bordería, A.V., Blanc, H., ja Vignuzzi, M. (2011). Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. Proc Natl Acad Sci USA, 108: 16038–16043.

Cristea, I.M., Carroll, J.-W.N., Rout, M.P., Rice, C.M., Chait, B.T., ja MacDonald, M.R. (2006). Tracking and elucidating alphavirus-host protein interactions. J Biol Chem, 281: 30269–30278.

Dalgarno, L., Short, N.J., Hardy, C.M., Bell, J.R., Strauss, J.H., ja Marshall, I.D. (1984). Characterization of Barmah forest virus: an alphavirus with some unusual properties. Virology, 133: 416–426.

Das, P.K., Merits, A., ja Lulla, A. (2014). Functional Cross-talk between Distant Domains of Chikungunya Virus Non-structural Protein 2 Is Decisive for Its RNA-modulating Activity. J Biol Chem, 289: 5635–5653.

Dé, I., Fata-Hartley, C., Sawicki, S.G., ja Sawicki, D.L. (2003). Functional Analysis of nsP3 Phosphoprotein Mutants ofSindbisVirus. J Virol, 77: 13106–13116.

Dé, I., Sawicki, S.G., ja Sawicki, D.L. (1996). Sindbis virus RNA-negative mutants that fail to convert from minus-strand to plus-strand synthesis: role of the nsP2 protein. J Virol, 70: 2706–2719.

DeTulleo, L., ja Kirchhausen, T. (1998). The clathrin endocytic pathway in viral infection. EMBO J, 17: 4585–4593.

Dubuisson, J., ja Rice, C.M. (1993). Sindbis virus attachment: isolation and characterization of mutants with impaired binding to vertebrate cells. J Virol, 67: 3363–3374.

Fayzulin, R., ja Frolov, I. (2004). Changes of the Secondary Structure of the 5J End of the Sindbis Virus Genome Inhibit Virus Growth in Mosquito Cells and Lead to Accumulation of Adaptive Mutations. J Virol, 78: 12.

Firth, A.E., Chung, B.Y., Fleeton, M.N., ja Atkins, J.F. (2008). Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. Virol J, 5: 108.

Flexman, J.P., Smith, D.W., Mackenzie, J.S., Fraser, J.R., Bass, S.P., Hueston, L., Lindsay, M.D., ja Cunningham, A.L. (1998). A comparison of the diseases caused by Ross River virus and Barmah Forest virus. Med J Aust, 169: 159–163.

Forrester, N.L., Palacios, G., Tesh, R.B., Savji, N., Guzman, H., Sherman, M., Weaver, S.C., ja Lipkin, W.I. (2012). Genome-Scale Phylogeny of the Alphavirus Genus Suggests a Marine Origin. J Virol, 86: 2729–2738.

Frolov, I., Hardy, R., ja Rice, C.M. (2001). Cis-acting RNA elements at the 5′ end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. RNA, 7: 1638–1651.

Frolov, I., Kim, D.Y., Akhrymuk, M., Mobley, J.A., ja Frolova, E.I. (2017). Hypervariable Domain of Eastern Equine Encephalitis Virus nsP3 Redundantly Utilizes Multiple Cellular Proteins for Replication Complex Assembly. J Virol, 91: e00371-17, e00371-17.

Frolova, E., Frolov, I., ja Schlesinger, S. (1997). Packaging signals in alphaviruses. J Virol, 71: 248–258.

Frolova, E.I., Gorchakov, R., Pereboeva, L., Atasheva, S., ja Frolov, I. (2010). Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. J Virol, 84: 11679–11695.

Fros, J.J., Liu, W.J, Prow, N.A., ... Pijlman, G.P. (2010). Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. J Virol, 84: 10877–10887.

Froshauer, S., Kartenbeck, J., ja Helenius, A. (1988). Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes. J Cell Biol, 107: 2075–2086.

Gao, Y., Goonawardane, N., Ward, J., Tuplin, A., ja Harris, M. (2019). Multiple roles of the non-structural protein 3 (nsP3) alphavirus unique domain (AUD) during Chikungunya virus genome replication and transcription. PLoS Pathog, 15: e1007239.

Gardner, C.L., Ebel, G.D., Ryman, K.D., ja Klimstra, W.B. (2011). Heparan sulfate binding by natural eastern equine encephalitis viruses promotes neurovirulence. Proc Natl Acad Sci USA, 108: 16026–16031.

Garmashova, N., Atasheva, S., Kang, W., Weaver, S.C., Frolova, E., ja Frolov, I. (2007a). Analysis of Venezuelan equine encephalitis virus capsid protein function in the inhibition of cellular transcription. J Virol, 81: 13552–13565.

Garmashova, N., Gorchakov, R., Frolova, E., ja Frolov, I. (2006). Sindbis Virus Nonstructural Protein nsP2 Is Cytotoxic and Inhibits Cellular Transcription. J Virol, 80: 5686–5696.

Garmashova, N., Gorchakov, R., Volkova, E., Paessler, S., Frolova, E., ja Frolov, I. (2007b). The Old World and New World alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. J Virol, 81: 2472–2484.

Garoff, H., Huylebroeck, D., Robinson, A., Tillman, U., ja Liljeström, P. (1990). The signal sequence of the p62 protein of Semliki Forest virus is involved in initiation but not in completing chain translocation. J Cell Biol, 111: 867–876.

Gibbons, D.L., Vaney, M.-C., Roussel, A., Vigouroux, A., Reilly, B., Lepault, J., Kielian, M., ja Rey, F.A. (2004). Conformational change and protein–protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. Nature, 427: 320–325.

Gomez de Cedrón, M., Ehsani, N., Mikkola, M.L., García, J.A., ja Kääriäinen, L. (1999). RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. FEBS Lett, 448: 19–22.

Gorchakov, R., Frolova, E., Sawicki, S., Atasheva, S., Sawicki, D., ja Frolov, I. (2008a). A new role for ns polyprotein cleavage in Sindbis virus replication. J Virol, 82: 6218–6231.

Gorchakov, R., Garmashova, N., Frolova, E., ja Frolov, I. (2008b). Different types of nsP3-containing protein complexes in Sindbis virus-infected cells. J Virol, 82: 10088–10101.

Götte, B., Liu, L., ja McInerney, G. (2018). The Enigmatic Alphavirus Non-Structural Protein 3 (nsP3) Revealing Its Secrets at Last. Viruses, 10: 105.

Götte, B., Panas, M.D., Hellström, K., Liu, L., Samreen, B., Larsson, O., Ahola, T., ja McInerney, G.M. (2019). Separate domains of G3BP promote efficient clustering of alphavirus replication complexes and recruitment of the translation initiation machinery. PLoS Pathog, 15: e1007842.

Götte, B., Utt, A., Fragkoudis, R., Merits, A., ja McInerney, G.M. (2020). Sensitivity of Alphaviruses to G3BP Deletion Correlates with Efficiency of Replicase Polyprotein Processing. J Virol, 94.

Griffin, D.E. (2013). Alphaviruses, p. 651–686. . *In* D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, R.A. Lamb, Diane E. Griffin, M. A. Martin, V. R. Racaniello, B. Roizman (ed.), Fields Virology, 6th ed., vol. 1. Lippincott Willams & Wilkins, Philadelphia.

Grimley, P.M., Levin, J.G., Berezesky, I.K., ja Friedman, R.M. (1972). Specific membranous structures associated with the replication of group A arboviruses. J Virol, 10: 492–503.

de Groot, R.J., Hardy, W.R., Shirako, Y., ja 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: 2631–2638.

de Groot, R.J., Rumenapf, T., Kuhn, R.J., Strauss, E.G., ja Strauss, J.H. (1991). Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 88: 8967–8971.

Hahn, C.S., ja Strauss, J.H. (1990). Site-directed mutagenesis of the proposed catalytic amino acids of the Sindbis virus capsid protein autoprotease. J Virol, 64: 3069–3073.

Hammar, L., Markarian, S., Haag, L., Lankinen, H., Salmi, A., ja Cheng, R.H. (2003). Prefusion rearrangements resulting in fusion Peptide exposure in Semliki forest virus. J Biol Chem, 278: 7189–7198.

Hardy, R.W., ja Rice, C.M. (2005). Requirements at the 3J End of the Sindbis Virus Genome for Efficient Synthesis of Minus-Strand RNA. J Virol, 79: 10.

Hardy, W.R., ja 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. J Virol, 63: 4653–4664.

Hellström, K., Kallio, K., Utt, A., Quirin, T., Jokitalo, E., Merits, A., ja Ahola, T. (2017). Partially Uncleaved Alphavirus Replicase Forms Spherule Structures in the Presence and Absence of RNA Template. J Virol, 91.

Hermanns, K., Zirkel, F., Kopp, A., Marklewitz, M., Rwego, I.B., Estrada, A., Gillespie, T.R., Drosten, C., ja Junglen, S. (2017). Discovery of a novel alphavirus related to Eilat virus. J Gen Virol, 98: 43–49.

Hernandez, R., Ferreira, D., Sinodis, C., Litton, K., ja Brown, D.T. (2005). Single Amino Acid Insertions at the Junction of the Sindbis Virus E2 Transmembrane Domain and Endodomain Disrupt Virus Envelopment and Alter Infectivity. J Virol, 79: 7682–7697.

Herrero, L.J., Lidbury, B.A., Bettadapura, J., Jian, P., Herring, B.L., Hey-Cunningham, W.J., Sheng, K.-C., Zakhary, A., ja Mahalingam, S. (2014). Characterization of Barmah Forest virus pathogenesis in a mouse model. J Gen Virol, 95: 2146–2154.

Hong, E.M., Perera, R., ja Kuhn, R.J. (2006). Alphavirus Capsid Protein Helix I Controls a Checkpoint in Nucleocapsid Core Assembly. J Virol, 80: 8848–8855.

Hunt, A.R., Frederickson, S., Maruyama, T., Roehrig, J.T., ja Blair, C.D. (2010). The First Human Epitope Map of the Alphaviral E1 and E2 Proteins Reveals a New E2 Epitope with Significant Virus Neutralizing Activity. PLoS Neglect Trop Dis, 4: e739.

Hyde, J.L., Chen, R., Trobaugh, D.W., Diamond, M.S., Weaver, S.C., Klimstra, W.B., ja Wilusz, J. (2015). The 5′ and 3′ ends of alphavirus RNAs – Non-coding is not non-functional. Virus Res, 206: 99–107.

Ivanova, L., ja Schlesinger, M.J. (1993). Site-directed mutations in the Sindbis virus E2 glycoprotein identify palmitoylation sites and affect virus budding. J Virol, 67: 2546–2551.

Jacups, S.P., Whelan, P.I., ja Currie, B.J. (2008). Ross River Virus and Barmah Forest Virus Infections: A Review of History, Ecology, and Predictive Models, with Implications for Tropical Northern Australia. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 8: 283–298.

Ramsey, J. ja Mukhopadhyay, S. (2017). Disentangling the Frames, the State of Research on the Alphavirus 6K and TF Proteins. Viruses, 9: 228.

Jose, J., Przybyla, L., Edwards, T.J., Perera, R., Burgner, J.W., ja Kuhn, R.J. (2012). Interactions of the cytoplasmic domain of Sindbis virus E2 with nucleocapsid cores promote alphavirus budding. J Virol, 86: 2585–2599.

Kamer, G., ja Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. Nucleic Acids Res, 12: 7269–7282.

Khan, A.H., Morita, K., Parquet, M.D.C., Hasebe, F., Mathenge, E.G.M., ja Igarashi, A. (2002). Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. J Gen Virol, 83: 3075–3084.

Kielian, M., ja Rey, F.A. (2006). Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. Nat Rev Microbiol, 4: 67–76.

Kim, D.Y., Reynaud, J.M., Rasalouskaya, A., Akhrymuk, I., Mobley, J.A., Frolov, I., ja Frolova, E.I. (2016). New World and Old World Alphaviruses Have Evolved to Exploit Different Components of Stress Granules, FXR and G3BP Proteins, for Assembly of Viral Replication Complexes. PLoS Pathog, 12: e1005810.

Kim, K.H., Rümenapf, T., Strauss, E.G., ja Strauss, J.H. (2004). Regulation of Semliki Forest virus RNA replication: a model for the control of alphavirus pathogenesis in invertebrate hosts. Virology, 323: 153–163.

Knight, R.L., Schultz, K.L.W., Kent, R.J., Venkatesan, M., ja Griffin, D.E. (2009). Role of N-Linked Glycosylation for Sindbis Virus Infection and Replication in Vertebrate and Invertebrate Systems. J Virol, 83: 5640–5647.

Kostyuchenko, V.A., Jakana, J., Liu, X., Haddow, A.D., Aung, M., Weaver, S.C., Chiu, W., ja Lok, S.-M. (2011). The structure of barmah forest virus as revealed by cryo-electron microscopy at a 6-angstrom resolution has detailed transmembrane protein architecture and interactions. J Virol, 85: 9327–9333.

Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., ja Yanagawa, H. (2009). Six Classes of Nuclear Localization Signals Specific to Different Binding Grooves of Importin α. J Biol Chem, 284: 478–485.

Kuhn, R.J. (2013). Togaviridae, p. 629–650. *In* D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, R. A. Lamb, Diane E. Griffin, M. A. Martin, V. R. Racaniello, B. Roizman (ed.), Fields Virology, 6th ed., vol. 1. Lippincott Willams & Wilkins, Philadelphia.

Kulasegaran-Shylini, R., Atasheva, S., Gorenstein, D.G., ja Frolov, I. (2009). Structural and Functional Elements of the Promoter Encoded by the 5′ Untranslated Region of the Venezuelan Equine Encephalitis Virus Genome. J Virol, 83: 8327–8339.

Laakkonen, P., Ahola, T., ja Kääriäinen, L. (1996). The Effects of Palmitoylation on Membrane Association of Semliki Forest Virus RNA Capping Enzyme. J Biol Chem, 271: 28567–28571.

Laakkonen, P., Hyvönen, M., Peränen, J., ja Kääriäinen, L. (1994). Expression of Semliki Forest virus nsP1-specific methyltransferase in insect cells and in Escherichia coli. J Virol, 68: 7418–7425.

Lanciotti, R.S., Ludwig, M.L., Rwaguma, E.B., Lutwama, J.J., Kram, T.M., Karabatsos, N., Cropp, B.C., ja Miller, B.R. (1998). Emergence of Epidemic O'nyong-nyong Fever in Uganda after a 35-Year Absence: Genetic Characterization of the Virus. Virology, 252: 258–268.

Lark, T., Keck, F., ja Narayanan, A. (2018). Interactions of Alphavirus nsP3 Protein with Host Proteins. Front Microbiol, 8: 2652.

Law, Y.-S., Utt, A., Tan, Y.B., Zheng, J., Wang, S., Chen, M.W., Griffin, P.R., Merits, A., ja Luo, D. (2019). Structural insights into RNA recognition by the Chikungunya virus nsP2 helicase. Proc Natl Acad Sci USA, 116: 9558–9567.

Lee, E., Stocks, C., Lobigs, P., Hislop, A., Straub, J., Marshall, I., Weir, R., ja Dalgarno, L. (1997). Nucleotide Sequence of the Barmah Forest Virus Genome. Virology, 227: 509–514.

Lello, L.S., Utt, A., Bartholomeeusen, K., ... Merits, A. (2020). Cross-utilisation of template RNAs by alphavirus replicases. PLoS Pathog, vastuvõetud, avaldamisel.

Levis, R., Schlesinger, S., ja Huang, H.V. (1990). Promoter for Sindbis virus RNA-dependent subgenomic RNA transcription. J Virol, 64: 1726–1733.

Levy, D.E., ja Darnell, J.E. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. Nat Rev Mol Cell Biol, 3: 651–662.

Li, G.P., ja Rice, C.M. (1989). Mutagenesis of the in-frame opal termination codon preceding nsP4 of Sindbis virus: studies of translational readthrough and its effect on virus replication. J Virol, 63: 1326–1337.

Liang, Z., ja Li, G. (2005). Recombinant Sindbis virus expressing functional GFP in the nonstructural protein nsP3. Gene Ther Mol Biol, 9: 317–324.

Liu, X., Mutso, M., Cherkashchenko, L., ... Mahalingam, S. (2020). Identification of Natural Molecular Determinants of Ross River Virus Type I Interferon Modulation. J Virol, 94: e01788-19.

Liu, X., Mutso, M., Utt, A., Lepland, A., Herrero, L.J., Taylor, A., Bettadapura, J., Rudd, P.A., Merits, A., ja Mahalingam, S. (2018). Decreased Virulence of Ross River Virus Harboring a Mutation in the First Cleavage Site of Nonstructural Polyprotein Is Caused by a Novel Mechanism Leading to Increased Production of Interferon-Inducing RNAs. MBio, 9.

Ludwig, G.V., Kondig, J.P., ja Smith, J.F. (1996). A putative receptor for Venezuelan equine encephalitis virus from mosquito cells. J Virol, 70: 5592–5599.

Lulla, A., Lulla, V., ja Merits, A. (2012). Macromolecular assembly-driven processing of the 2/3 cleavage site in the alphavirus replicase polyprotein. J Virol, 86: 553–565.

Lulla, V., Karo-Astover, L., Rausalu, K., Merits, A., ja Lulla, A. (2013). Presentation overrides specificity: probing the plasticity of alphaviral proteolytic activity through mutational analysis. J Virol, 87: 10207–10220.

Lulla, V., Karo-Astover, L., Rausalu, K., Saul, S., Merits, A., ja Lulla, A. (2018). Timeliness of Proteolytic Events Is Prerequisite for Efficient Functioning of the Alphaviral Replicase. J Virol, 92.

MacMicking, J.D. (2012). Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. Nat Rev Immunol, 12: 367–382.

Malet, H., Coutard, B., Jamal, S., ... Canard, B. (2009). The Crystal Structures of Chikungunya and Venezuelan Equine Encephalitis Virus nsP3 Macro Domains Define a Conserved Adenosine Binding Pocket. JVI, 83: 6534–6545.

Marshall, I.D., Woodroofe, G.M., ja Hirsch, S. (1982). Viruses recovered from mosquitoes and wildlife serum collected in the Murray Valley of South-Eastern Australia, February 1974, during and epidemic of encephalitis. Aust J Exp Biol Med, 60: 457–470.

Mayuri, Geders, T.W., Smith, J.L., ja Kuhn, R.J. (2008). Role for Conserved Residues of Sindbis Virus Nonstructural Protein 2 Methyltransferase-Like Domain in Regulation of Minus-Strand Synthesis and Development of Cytopathic Infection. J Virol, 82: 7284–7297.

McPherson, R.L., Abraham, R., Sreekumar, E., Ong, S.-E., Cheng, S.-J., Baxter, V.K., Kistemaker, H.A.V., Filippov, D.V., Griffin, D.E., ja Leung, A.K.L. (2017). ADP-ribosylhydrolase activity of Chikungunya virus macrodomain is critical for virus replication and virulence. Proc Natl Acad Sci USA, 114: 1666–1671.

Meertens, L., Hafirassou, M.L., Couderc, T., ... Amara, A. (2019). FHL1 is a major host factor for chikungunya virus infection. Nature, 574: 259–263.

Meshram, C.D., Lukash, T., Phillips, A.T., Akhrymuk, I., Frolova, E.I., ja Frolov, I. (2019). Lack of nsP2-specific nuclear functions attenuates chikungunya virus replication both in vitro and in vivo. Virology, 534: 14–24.

Morrison, T.E., Whitmore, A.C., Shabman, R.S., Lidbury, B.A., Mahalingam, S., ja Heise, M.T. (2006). Characterization of Ross River virus tropism and virus-induced inflammation in a mouse model of viral arthritis and myositis. J Virol, 80: 737–749.

Mukhopadhyay, S., Chipman, P.R., Hong, E.M., Kuhn, R.J., ja Rossmann, M.G. (2002). In Vitro-Assembled Alphavirus Core-Like Particles Maintain a Structure Similar to That of Nucleocapsid Cores in Mature Virus. Journal of Virology, 76: 11128–11132.

Mukhopadhyay, S., Zhang, W., Gabler, S., Chipman, P.R., Strauss, E.G., Strauss, J.H., Baker, T.S., Kuhn, R.J., ja Rossmann, M.G. (2006). Mapping the Structure and Function of the E1 and E2 Glycoproteins in Alphaviruses. Structure, 14: 63–73.

Nasar, F., Palacios, G., Gorchakov, R.V., ... Weaver, S.C. (2012). Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. Proc Natl Acad Sci USA, 109: 14622–14627.

Neighbours, L.M., Long, K., Whitmore, A.C., ja Heise, M.T. (2012). Myd88-Dependent Toll-Like Receptor 7 Signaling Mediates Protection from Severe Ross River Virus-Induced Disease in Mice. J Virol, 86: 10675–10685.

Nguyen Ba, A.N., Pogoutse, A., Provart, N., ja Moses, A.M. (2009). NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. BMC Bioinformatics, 10: 202.

Nunes, M.R.T., Faria, N.R., de Vasconcelos, J.M., ... de Costa Vansconcelos, P.F. (2015). Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. BMC Med, 13: 102.

Omler, A. (2017). Barmah Forest viiruse mittestruktuursete valkude lokalisatsioon imetajarakus. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.

Ou, J.H., Rice, C.M., Dalgarno, L., Strauss, E.G., ja Strauss, J.H. (1982). Sequence studies of several alphavirus genomic RNAs in the region containing the start of the subgenomic RNA. Proc Natl Acad Sci USA, 79: 5235–5239.

Owen, K.E., ja Kuhn, R.J. (1996). Identification of a region in the Sindbis virus nucleocapsid protein that is involved in specificity of RNA encapsidation. J Virol, 70: 2757–2763.

Panas, M.D., Ahola, T., ja McInerney, G.M. (2014). The C-terminal repeat domains of nsP3 from the Old World alphaviruses bind directly to G3BP. J Virol, 88: 5888–5893.

Panas, M.D., Varjak, M., Lulla, A., Er Eng, K., Merits, A., Karlsson Hedestam, G.B., ja McInerney, G.M. (2012). Sequestration of G3BP coupled with efficient translation inhibits stress granules in Semliki Forest virus infection. Mol Biol Cell, 23: 4701–4712.

Peränen, J., Laakkonen, P., Hyvönen, M., ja Kääriäinen, L. (1995). The alphavirus replicase protein nsP1 is membrane-associated and has affinity to endocytic organelles. Virology, 208: 610–620.

Peränen, J., Rikkonen, M., Liljeström, P., ja Kääriäinen, L. (1990). Nuclear localization of Semliki Forest virus-specific nonstructural protein nsP2. J Virol, 64: 1888–1896.

Peränen, J., Takkinen, K., Kalkkinen, N., ja Kääriäinen, L. (1988). Semliki Forest Virus-specific Non-structural Protein nsP3 Is a Phosphoprotein. J Gen Virol, 69: 2165–2178.

Pietilä, M.K., Hellström, K., ja Ahola, T. (2017). Alphavirus polymerase and RNA replication. Virus Res, 234: 44–57.

Pietilä, M.K., van Hemert, M.J., ja Ahola, T. (2018). Purification of Highly Active Alphavirus Replication Complexes Demonstrates Altered Fractionation of Multiple Cellular Membranes. J Virol, 92: e01852-17, /jvi/92/8/e01852-17.atom.

Powers, A.M., Brault, A.C., Shirako, Y., Strauss, E.G., Kang, W., Strauss, J.H., ja Weaver, S.C. (2001). Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. J Virol, 75: 10118–10131.

Ramsey, J., ja Mukhopadhyay, S. (2017). Disentangling the Frames, the State of Research on the Alphavirus 6K and TF Proteins. Viruses, 9.

Rezza, G., Chen, R., ja Weaver, S.C. (2017). O'nyong-nyong fever: a neglected mosquito-borne viral disease. Pathog Blog Health, 111: 271–275.

Rikkonen, M., Peränen, J., ja Kääriäinen, L. (1994a). ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. J Virol, 68: 5804–5810.

Rikkonen, M., Peränen, J., ja Kääriäinen, L. (1994b). Nuclear targeting of Semliki Forest virus nsP2. Arch Vir S, 9: 369–377.

Rose, P.P., Hanna, S.L., Spiridigliozzi, A., Wannissorn, N., Beiting, D.P., Ross, S.R., Hardy, R.W., Bambina, S.A., Heise, M.T., ja Cherry, S. (2011). Natural resistance-associated macrophage protein is a cellular receptor for sindbis virus in both insect and mammalian hosts. Cell Host Microbe, 10: 97–104.

Rubach, J.K., Wasik, B.R., Rupp, J.C., Kuhn, R.J., Hardy, R.W., ja Smith, J.L. (2009). Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro. Virology, 384: 201–208.

Rudd, P.A., Wilson, J., Gardner, J., ... Suhrbier, A. (2012). Interferon response factors 3 and 7 protect against Chikungunya virus hemorrhagic fever and shock. J Virol, 86: 9888–9898.

Rupp, J.C., Jundt, N., ja Hardy, R.W. (2011). Requirement for the amino-terminal domain of sindbis virus nsP4 during virus infection. J Virol, 85: 3449–3460.

Rupp, J.C., Sokoloski, K.J., Gebhart, N.N., ja Hardy, R.W. (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. Journal of General Virology, 96: 2483–2500.

Russo, A.T., White, M.A., ja Watowich, S.J. (2006). The Crystal Structure of the Venezuelan Equine Encephalitis Alphavirus nsP2 Protease. Structure, 14: 1449–1458.

Saul, S., Ferguson, M., Cordonin, C., Fragkoudis, R., Ool, M., Tamberg, N., Sherwood, K., Fazakerley, J.K., ja Merits, A. (2015). Differences in Processing Determinants of Nonstructural Polyprotein and in the Sequence of Nonstructural Protein 3 Affect Neurovirulence of Semliki Forest Virus. J Virol, 89: 11030–11045.

Schilte, C., Couderc, T., Chretien, F., ... Albert, M.L. (2010). Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. J Exp Med, 207: 429–442.

Schmidt, M.F. (1982). Acylation of viral spike glycoproteins: a feature of enveloped RNA viruses. Virology, 116: 327–338.

Scholte, F.E.M., Tas, A., Albulescu, I.C., Žusinaite, E., Merits, A., Snijder, E.J., ja van Hemert, M.J. (2015). Stress Granule Components G3BP1 and G3BP2 Play a Proviral Role Early in Chikungunya Virus Replication. J Virol, 89: 4457–4469.

Sefton, B.M. (1977). Immediate glycosylation of Sindbis virus membrane proteins. Cell, 10: 659–668.

Shin, G., Yost, S.A., Miller, M.T., Elrod, E.J., Grakoui, A., ja Marcotrigiano, J. (2012). Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis. Proc Natl Acad Sci USA, 109: 16534–16539.

Shirako, Y., ja Strauss, J.H. (1994). Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. J Virol, 68: 1874–1885.

Singh, I., ja Helenius, A. (1992). Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. J Virol, 66: 7049–7058.

Smit, J.M., Waarts, B.-L., Kimata, K., Klimstra, W.B., Bittman, R., ja Wilschut, J. (2002). Adaptation of alphaviruses to heparan sulfate: interaction of Sindbis and Semliki forest viruses with liposomes containing lipid-conjugated heparin. J Virol, 76: 10128–10137.

Snyder, A.J., ja Mukhopadhyay, S. (2012). The Alphavirus E3 Glycoprotein Functions in a Clade-Specific Manner. J Virol, 86: 13609–13620.

Sokoloski, K.J., Haist, K.C., Morrison, T.E., Mukhopadhyay, S., ja Hardy, R.W. (2015). Noncapped Alphavirus Genomic RNAs and Their Role during Infection. J Virol, 89: 6080–6092.

Spuul, P., Balistreri, G., Kääriäinen, L., ja Ahola, T. (2010). Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. J Virol, 84: 7543–7557.

Spuul, P., Salonen, A., Merits, A., Jokitalo, E., Kääriäinen, L., ja Ahola, T. (2007). Role of the Amphipathic Peptide of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP1 in Membrane Association and Virus Replication. J Virol, 81: 872–883.

Stapleford, K.A., Moratio, G., Henningsson, R., ... Vignuzzi, M. (2016). Whole-Genome Sequencing Analysis from the Chikungunya Virus Caribbean Outbreak Reveals Novel Evolutionary Genomic Elements. PLoS Negl Trop Dis, 10: e0004402.

Stapleford, K.A., Rozen-Gagnon, K., Das, P.K., Saul, S., Poirier, E.Z., Blanc, H., Vidalain, P.-O., Merits, A., ja Vignuzzi, M. (2015). Viral Polymerase-Helicase Complexes Regulate

Replication Fidelity To Overcome Intracellular Nucleotide Depletion. J Virol, 89: 11233–11244.

Strauss, E.G., Rice, C.M., ja Strauss, J.H. (1983). Sequence coding for the alphavirus nonstructural proteins is interrupted by an opal termination codon. Proc Natl Acad Sci USA, 80: 5271–5275.

Strauss, J.H., ja Strauss, E.G. (1994). The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. Microbiol Rev, 58: 491–562.

Tang, J., Jose, J., Chipman, P., Zhang, W., Kuhn, R.J., ja Baker, T.S. (2011). Molecular Links between the E2 Envelope Glycoprotein and Nucleocapsid Core in Sindbis Virus. J Mol Biol, 414: 442–459.

Taylor, A., Liu, X., Zaid, A., Goh, L.Y.H., Hobson-Peters, J., Hall, R.A., Merits, A., ja Mahalingam, S. (2017). Mutation of the N-Terminal Region of Chikungunya Virus Capsid Protein: Implications for Vaccine Design. MBio, 8: e01970-16.

Tellinghuisen, T.L., Perera, R., ja Kuhn, R.J. (2001). In vitro assembly of Sindbis virus core-like particles from cross-linked dimers of truncated and mutant capsid proteins. J Virol, 75: 2810–2817.

Teppor, M., Žusinaite, E., ja Merits, A. (2020). (Käsikiri) Phosphorylation sites in the hypervariable domain in Chikungunya virus nsP3 are crucial for virus replication, J Virol, retsenseerimisel.

Tomar, S., Hardy, R.W., Smith, J.L., ja Kuhn, R.J. (2006). Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsP4 possesses terminal adenylyltransferase activity. J Virol, 80: 9962–9969.

Tourrière, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J.M., Bertrand, E., ja Tazi, J. (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. J Cell Biol, 160: 823–831.

Tsetsarkin, K.A., Vanlandingham, D.L., McGee, C.E., ja Higgs, S. (2007). A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. PLoS Pathog, 3: e201.

Tuittila, M.T., Santagati, M.G., ja Ytta, M.R. (2000). Replicase Complex Genes of Semliki Forest Virus Confer Lethal Neurovirulence. J Virol, 74: 11.

Utt, A., Rausalu, K., Jakobson, M., Männik, A., Alphey, L., Fragkoudis, R., ja Merits, A. (2019). Design and Use of Chikungunya Virus Replication Templates Utilizing Mammalian and Mosquito RNA Polymerase I-Mediated Transcription. J Virol, 93.

Vale, T.G., Carter, I.W., McPhie, K.A., James, G.S., ja Cloonan, M.J. (1986). Human arbovirus infections along the south coast of New South Wales. Aust J Exp Biol Med Sci, 64 (Pt 3): 307–309.

Varjak, M., Maringer, K., Watson, M., ... Duprex, P.W. (2017). Aedes aegypti Piwi4 Is a Noncanonical PIWI Protein Involved in Antiviral Responses. MSphere, 2:00144-17.

Varjak, M., Saul, S., Arike, L., Lulla, A., Peil, L., ja Merits, A. (2013). Magnetic fractionation and proteomic dissection of cellular organelles occupied by the late replication complexes of Semliki Forest virus. J Virol, 87: 10295–10312.

Vasiljeva, L., Merits, A., Auvinen, P., ja Kääriäinen, L. (2000). Identification of a Novel Function of the Alphavirus Capping Apparatus: RNA 5'-triphosphatase activity of nsP2. J Biol Chem, 275: 17281–17287.

Vasiljeva, L., Merits, A., Golubtsov, A., Sizemskaja, V., Kääriäinen, L., ja Ahola, T. (2003). Regulation of the Sequential Processing of Semliki Forest Virus Replicase Polyprotein. J Biol Chem, 278: 41636–41645.

Vihinen, H., Ahola, T., Tuittila, M., Merits, A., ja Kääriäinen, L. (2001). Elimination of Phosphorylation Sites of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP3. J Biol Chem, 276: 5745–5752.

Vihinen, H., ja Saarinen, J. (2000). Phosphorylation site analysis of semliki forest virus nonstructural protein 3. J Biol Chem.

Voss, J.E., Vaney, M.-C., Duquerroy, S., Vonrhein, C., Girard-Blanc, C., Crublet, E., Thompson, A., Bricogne, G., ja Rey, F.A. (2010). Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. Nature, 468: 709–712.

Wahlberg, J.M., Bron, R., Wilschut, J., ja Garoff, H. (1992). Membrane fusion of Semliki Forest virus involves homotrimers of the fusion protein. J Virol, 66: 7309–7318.

Walker, P.J., Siddell, S.G., Lefkowitz, E.J., ... Davison, A.J. (2019). Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). Arch Virol, 164: 2417–2429.

Wang, K.S., Kuhn, R.J., Strauss, E.G., Ou, S., ja Strauss, J.H. (1992). High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. J Virol, 66: 4992–5001.

Weiss, B., Geigenmüller-Gnirke, U., ja Schlesinger, S. (1994). Interactions between Sindbis virus RNAs and a 68 amino acid derivative of the viral capsid protein further defines the capsid binding site. Nucleic Acids Res, 22: 780–786.

Weiss, B., Nitschko, H., Ghattas, I., Wright, R., ja Schlesinger, S. (1989). Evidence for specificity in the encapsidation of Sindbis virus RNAs. J Virol, 63: 5310–5318.

Wesula Olivia, L., Obanda, V., Bucht, G., Mosomtai, G., Otieno, V., Ahlm, C., ja Evander, M. (2015). Global emergence of *Alphaviruses* that cause arthritis in humans. Infection Ecology & Epidemiology, 5: 29853.

Zhang, R., Kim, A.S., Fox, J.M., ... Diamond, M.S. (2018). Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. Nature, 557: 570–574.

Zhang, X., Fugère, M., Day, R., ja Kielian, M. (2003). Furin Processing and Proteolytic Activation of Semliki Forest Virus. J Virol, 77: 2981–2989.

Žusinaite, E., Tints, K., Kiiver, K., Spuul, P., Karo-Astover, L., Merits, A., ja 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. J Gen Virol, 88: 1977–1985.

Kasutatud veebiaadressid

http://www9.health.gov.au/cda/source/cda-index.cfm (Australian Department of Health, Notifiable Diseases Surveillance System, Austraalia) Kasutatud 01.08.2020.

Lisad

Lisa 1 Griffithi Ülikoolis Glükoomika Instituudis loomkatsete läbiviimise koolituse läbimise protokoll. Juhendas ja hindas Glükoomika Instituudi vivaariumi peaspetsialist Janette Currie.

TIER 2 – ANIMAL PROCEDURE COMPETENCY RECORD

INVESTIGATOR: AILAR OMLER **GROUP:** MAHALINGAM GLY/12/18 **FACILITY:** G26 **INDUCTION DATE:** 24/08/2018

TICK	CODE	TIER 2 ANIMAL PROCEDURE DESCRIPTION	COMPETENCY DATE	APPROVED ASSESSOR	SIGNATURE
COMPETENCY A		**BASIC ANIMAL HANDLING - Mice**			
✓	A1 - M	Restraint of mice (M) / rats (R) / rabbits (Rb) / other	5/09/2018	Janette Currie	
✓	A2- M	Sexing mice (M) / rats (R)	5/09/2018	Janette Currie	
✓	A3 - M	Euthanasia by Cervical Dislocation	27/09/2018	Janette Currie	
✓	A4 - M	Euthanasia by CO2	5/09/2018	Janette Currie	
	A5	Euthanasia by Injection			
✓	A6	Monitoring Procedures (welfare scoring - project specific)	27/09/2018	Janette Currie	
COMPETENCY B		**IDENTIFICATION**			
✓	B1	Ear punch / notching for Identification in mice	27/09/2018	Janette Currie	
	B2	Animal tattoo marking			
	B3	Microchip implantation			
COMPETENCY C		**MODERATE TECHNIQUES**			
	C1	Intravenous (I/V) - into a vein			
	C2	Intramuscular (I/M) - into a muscle			
✓	C3	Subcutaneous (S/C) - under the skin	27/09/2018	Janette Currie	
✓	C4	Intraperitoneal (I/P) - into the abdominal cavity/peritoneum	27/09/2018	Janette Currie	
	C5	Intradermal (I/D) - into the dermal layer of the skin			
✓	C6	Submandibular blood collection	27/09/2018	Janette Currie	
✓	C7	Tail tip blood collection	04/10/2018	Janette Currie	
	C8	Orbital plexus- sinus bleeding			
	C9	Orbital plexus - sinus injection			
	C10	Topical application - onto the skin			
	C11	Oral dosing by gavage - into the mouth by pharyngeal			
	C12	Oral dosing by tube - stomach tube			
	C13	Mucous membranes - surfaces in lungs, mouth and nose			
	C14	Intrapleural - pleural space around the lungs			
	C15	Skin biopsies			
✓	C16	Delivery of anaesthetic – Isoflurane (Iso) / other	4/10/2018	Janette Currie	
	C17				

TIER 2 – ANIMAL PROCEDURE COMPETENCY RECORD 2018 Griffith University - Bioscience Resources Facility

TIER 2 – ANIMAL PROCEDURE COMPETENCY RECORD

INVESTIGATOR: AILAR OMLER

GROUP: MAHALINGAM **FACILITY:** G26
GLY12/18

TICK	CODE	TIER 2 ANIMAL PROCEDURE DESCRIPTION	COMPETENCY DATE	APPROVED ASSESSOR	SIGNATURE
COMPETENCY D		SURGICAL PROCEDURES WITH NO RECOVERY			
✓	D1	Aseptic preparation of surgical instruments	27/09/2018	Janette Currie	
✓	D2 - M	Cardiac puncture – in mice / rats / rabbit	27/09/2018	Janette Currie	
	D3	Spinal cord removal			
	D4	Fixation perfusion (project specific) – brain /			
✓	D5	Lymph node extraction	04/10/2018	Janette Currie	
	D6	Splenectomy			
	D7	Caesarean			
✓	D8 -M	Autopsy – collect tissue from mice (M)/ rats (R)	04/10/2018	Janette Currie	

TRAINING NOTES:

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Ailar Omler

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Barmah Forest viiruse mutantide iseloomustamine *in vitro* ja *in vivo*“,

mille juhendajad on prof. Andres Merits ja Margit Mutso,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 12.08.2022 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Ailar Omler

12.08.2020