

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA - GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR -JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MIKROBIOLOOGIA JA VIROLOOGIA ÕPPETOOL

Kairit Tints

**Semliki Forest viiruse mittestruktuurse valgu nsP1
palmitüleerimis-defektsete mutantide funktsionaal-
struktuurne iseloomustamine**

Magistritöö

Juhendaja: Prof. Andres Merits, Ph.D

TARTU
2005

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	5
I. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1. ALFAVIIRUSED	6
1.1 Üldisloomustus.....	6
1.2 SFV virion.....	7
1.3 SFV genoom ja replikonid.....	8
1.4 SFV elutsükkel.....	9
1.5 SFV RNA replikatsioon	11
2. SFV MULTIFUNKTSIONAALNE VALK NSP1	16
II. EKSPERIMENTAALNE OSA	20
UURIMISTÖÖ EESMÄRGID JA HÜPOTEESID	20
MATERJAL JA METOODIKA.....	22
TÖÖ TULEMUSED	29
ARUTELU	41
KOKKUVÕTE	51
SUMMARY	53
KASUTATUD KIRJANDUS	55

KASUTATUD LÜHENDID

ah - aminohape

Amp – ampitsiliin

ATP – adenosiin trifosfaat

ATPaas – adenosiintrifosfataas

bp – aluspaar

BHK – *baby hamster kidney*; beebihamstri neerurakud

BSA – veise seerumi albumiin

cDNA – komplementaarne DNA

CIAP – veise soolte aluseline fosfotaas

CMC – karboksümetüültselluloos

CPV-I – *type I cytoplasmic vacuoles*; tüüp I tsütoplasmaatilised vakuoolid

Cys – tsüsteiin

d1EGFP - degrateeritav võimendatud roheliselt fluoreseeruv valk

DEPC - dietüülpürokarbonaad

DNA – desoksüribonukleiinhape

DTT – ditiotreitool

EEE – *Eastern Equine Encephalitis virus*

EDTA – etüleendiamiintetraädikhape

FCS – veise loote seerum

GMEM - *Glasgow Modified Eagle's Medium*

GMP – guanosiin monofosfaat

GT – guanüültransferaas

GTP – guanosiin trifosfaat

GTPaas- guanosiin trifosfataas

HEPES – hüdroksuetüülpiperasiinetaansulfaat

ICA – *Infectious Center Assay*

IgG – immuunoglobulin G

kb – kiloalus

kDa – kilodalton

MOI – *multiplicity of infection*; infektsiooni kordsus

MT – metüültransferaas

nsP – *nonstructural protein*; mittestruktuurne valk
nt – nukleotiid
NTP – nukleosiid trifosfaat
NTPaas – nukleosiid trifosfataas
ORF – avatud lugemisraam
PAGE – polüakrüülamiid geel-elektroforees
PBS – fosfaatpuhvriga soolalahus
pfu – *plaque forming unit*; plaage moodustav ühik
RdRp – RNA-st sõltuv RNA polümeraas
RNA – ribonukleiinhape
ssRNA – üheaahelaline RNA
rpm – pööret minutis
SDS – naatrium dodetsüülsulfaat
SFV – *Semliki Forest Virus*; Semliki Forest viirus
SIN – *Sindbis virus*; Sindbis viirus
TAE – Tris/Atsetaat/EDTA puhver
TPB – trüptoos-fosfaadi puljong
TE – Tris-EDTA puhver
Tris – trishüdroksümetüülaminmetaan
ts – *temperature sensitive*; temperatuuritundlik
VEE – *Venezuelan Equine Encephalitis virus*
VLP – *virus-like particle*; viirus-laadne partikkel
WEE – *West Equine Encephalitis virus*
wt – *wild type*; metsikut tüüpi

SISSEJUHATUS

Alfaviirused on suhteliselt lihtsa ehitusega positiivse polaarsusega RNA genoomsed viirused, mille uurimine annab olulist infot nii viiruste molekulaarbioloogia kui ka meditsiiniliselt ja majanduslikult tähtsate alfa-sarnaste viiruste kohta. Samuti on alfaviirused mudelobjektiks viiruse paljunemisega seotud rakuliste protsesside uurimisel ning kahe alfaviiruse Semliki Forest viiruse (SFV) ja Sindbis viiruse (SIN) genoomidel põhinevaid vektoreid kasutatakse palju geeniülekanal. Alfaviirustel põhinevad vektorid on väga efektiivsed, mahukad ning kasutatavad väga erinevates rakutüüpides.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida SFV mittestruktuurse valgu nsP1 palmitüleerimismutantide omadusi. Need mutandid olid esialgselt ette nähtud mittetsütotoksiliste SFV replikon-vektorite konstrueerimiseks, kuid vähendasid nagu näitasid läbiviidud eelkatsed SFV replikonide infektsioonilisust sedavõrd, et ei võimalda nende kasutamist efektiivselt toimivates vektorites. Sellest lähtuvalt kujunes töö peamiseks eesmärgiks nende mutantide madala infektsioonilisuse molekulaarsete põhjuste identifitseerimine ja iseloomustamine. Töö teiseks eesmärgiks oli uurida kas ja kuidas on identifitseeritud mehhanisme kasutades võimalik konstrueerida mittetoksilised nsP1 mutatsioone sisaldavad SFV replikon-vektorid.

Käesoleva töö teoreetiline osa annab ülevaate alfaviiruste genoomist, elutsüklist ning viiruste replikatsioonist SFV näitel. Pikemalt on kirjeldatud SFV mittestruktuurse replikatsioonivalgu nsP1 funktsioone.

Töö eksperimentaalne osa kirjeldab nsP1 palmitüleerimismutantide madala infektsioonilisuse põhjuste identifitseerimist ja nende mutantide iseloomustamist erinevate viroloogiliste ja molekulaarbioloogiliste meetodite abil. Peale selle on eksperimentaalselt näidatud SFV genoomil põhinevate replikon-vektorite konstrueerimise võimalikkust. Arutelus on analüüsitud tehtud avastuste tähtsust SFV molekulaarbioloogia mõistmisel ja kavandatud töö tulemustest lähtuvaid täiendavaid uurimissuundi.

Töö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja rakubioloogia instituudis mikrobioloogia ja viroloogia õppetooli juures. Täna professor Andres Meritsat juhendamise ja kasulike nõuannete eest.

I. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. Alfaviirused

1.1 Üldisloomustus

Alfaviirused kuuluvad koos rubiviirustega hästi uuritud *Togaviridae* sugukonda. Nad on väikesed, lipiidse ümbrisega, üheaahelalise positiivse polaarsusega RNA genoomsed viirused, mis nakatavad paljusid selgroogseid peremehi ja putukvektoreid. Nende genoomi suurus varieerub vahemikus 9.7 kb rubiviirustel kuni 11.8 kb alfaviirustel. Alfaviirustele sarnast genoomi ülesehitust omavad ka kollatõve E viirus, putukaviirused sugukonnast *Tetraviridae* ja taimeviirused perekondatest tobamo-, tobra-, hordei-, tricorna-, clostero-, furo-, potex-, carla-, tymo- ja cucumoviirus, mis kõik kokku moodustavad alfa-sarnaste viiruste supersugukonna (Koonin *and* Dolja, 1993).

Alfaviirused on maailmas väga laialt levinud, neid on leitud peaaegu kõikjalt väljaarvatud Antarktikast ja mõnedelt saartelt. Nende levimine toimub verd imevate kiletiivaliste (moskiitod, sääsed) vahendusel (v.a. kalade alfaviirused) lindudele ja väiksematele imetajatele, kes on alfaviiruste looduslikud peremehed. Perekonda kuulub üle 30 liigi viiruseid, millest mõned on inimestele ja loomadele ülekandununa ohtlikud patogeenid. Alfaviirused replitseeruvad nii putukate kui selgroogsete rakkudes. Selgroogsete rakkudes on infektsioon tugev ja tavaliselt lühiajaline (sageli raku surmaga lõppev), kuid putukarakkudes on alfaviiruste infektsioon reeglina apatogeenne ja persistentne. Enamasti kaasneb alfaviiruste infektsiooniga palavik, tugev peavalu, lööve ja liigesevalu, kuid mõned liigid (nt. EEE, VEE, WEE) võivad põhjustada inimestel ja koduloomadel ka surmavat entsefaliiti (Strauss *and* Strauss, 1994).

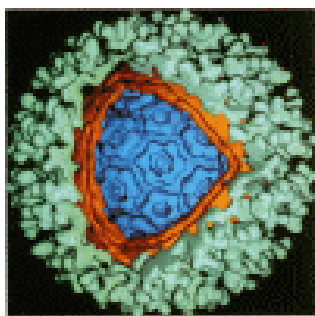
Rohkem kui kümne alfaviiruse genoomid on täielikult või osaliselt sekveneeritud. Nende järjestuste omavaheline võrdlus näitas, et alfaviiruste genoomid on väga sarnase ülesehitusega. Struktuurseid valke kodeerivas alas omavad nad 45 % ning mittestruktuurses alas 60 % järjestuse sarnasust (Strauss *and* Strauss, 1994).

Alfaviiruste tüüpesindajateks on Sindbis viirus (SIN) ning Semliki Forest viirus, mida on viimase kolmekümne aasta jooksul laialdaselt uuritud. Nende kahe viiruse laboratoorsed tüved on inimesele avirulentsed. Erinevalt SIN-st ei ole ka looduslik SFV inimesel esinevate haiguste tekitaja. SIN-viirust on leitud paljudest regioonidest, seal hulgas ka soomest kui Pogosta haiguse (selle sümptomiteks on lööve ning artriit ja mis esineb epideemiatena iga seitsme aasta tagant) tekitaja (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 2002). Selle viiruse peamiseks kandjaks looduses on linnud. Samas põhjustab SFV hiirtel surmavat entsefaliiti ning on seetõttu mudelsüsteemiks viiruselise neuropatogeneesi uurimisel (Atkins *et al.*, 1999 ja Fazakerley, 2002). Lisaks on SIN ja SFV prototüüpideks mitmete teiste patogeensete viiruste ning viiruse paljunemisega seotud rakuliste protsesside - näiteks glükoproteiinide modifitseerimine ja transport, endotsütoos ja membraanide kokkusulamine - uurimisel (Helenius, 1995; Helenius *and* Aebi, 2001; Kielian, 1995). Alfaviiruste lai peremeesring ning efektiivne geeniekspressioon erinevates rakutüüpides on põhjuseks, miks on välja arendatud SFV ja SIN genoomidel põhinevad ekspressioonivektorid. Neid vektoreid kasutatakse biotehnoloogias ja plaanitakse kasutada vaktsineerimisel ning geeniteraapias (Liljeström *and* Garoff, 1991; Frolov *et al.*, 1996).

Allpool on alfaviirustega seotud molekulaarbioloogilisi aspekte täpsemalt käsitletud SFV näitel, sest sellel viirusel põhineb ka käesolev väitekiri.

1.2 SFV virion

SFV virionid on kerajad, ebakorrapärase kujuga 65-70 nm läbimõõduga struktuurid, mis koosnevad ikosaeedrilise sümmeetriaga (T=4) nukleokapsiidist ning on kaetud peremeesraku plasmamembraanist pärineva lipiidse ümbrisega (Joonis 1). Ümbrise lipiidne kaksikkiht on tihedalt läbistatud viiruse 240 transmembraanse glükovalgu E1 ja E2 (kumbki ~50 kDa) heterodimeeridega. Lisaks sisaldab ümbris ka väikest perifeerset E3 valku (10 kDa). Kolm E1/E2 heterodimeeride paari interakteeruvad omavahel ning moodustavad virioni pealispinnal 80 oga-kujulist moodustist. SFV nukleokapsiid sisaldab 240 koopiat kapsiidivalgu (~30 kDa) ning ühte koopiat positiivset ssRNA-d. Seega on kapsiidivalgu ja glükovalkude molaarne suhe viiruspartiklis 1:1 (Strauss *and* Strauss, 1994).

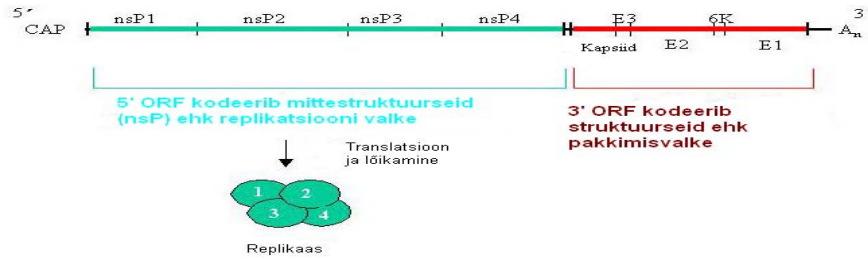


Joonis 1. SFV virion. Halliga on kujutatud ümbrise glükoproteiinid ning sinisega nukleokapsiid. Selgelt on näha nukleokapsiidi ja lipiidse kaksikkihi (oranz) omavahelist interaktsiooni (Strauss *and* Strauss, 1994).

1.3 SFV genoom ja replikonid

SFV genoomiks on positiivse polaarsusega üheaahelaline lineaarne RNA molekul (nn. 42S RNA) pikkusega 11 442 nukleotiidi jääki, mille 5' otsas on 7-metüülguanosiinist *cap*-struktuur ning 3' otsas 100 nukleotiidi pikkune polü(A) järjestus nagu rakulistel mRNA-delgi (Kääriäinen *and* Söderlund, 1978) (Joonis 2). SFV genoomi võib jaotada kaheks suureks osaks. 5' otsapoolne kaks-kolmandikku genoomist moodustab mittestruktuurse ala, millelt kodeeritakse replikatsiooniks vajalikke mittestruktuurseid valke (nsP1-4). Genoomi 3' otsapoolne üks-kolmandik moodustab struktuurse osa, mis ekspresseerib sub-genoomse RNA (nn. 26S RNA) vahendusel ja millelt kodeeritakse viiruse struktuursed valgud (E1, E2, kapsiidivalk). 26S RNA-l on sarnaselt 42S RNA-le 5' ots *cap*-struktuuriga ja 3' ots polüadenüleeritud. Alfaviiruste genoomis paikneb ka kolm mittekodeerivat järjestust, mis asuvad genoomi 5'- ja 3'-otstes ning mittestruktuurse ja struktuurse osa vahel (Strauss *and* Strauss, 1994).

SFV genoomide alusel on konstrueeritud nn. replikon-vektorid, mida kasutatakse võõrgeenide ekspresseerimiseks. Kuna viiruse struktuursed valgud ei ole replikatsiooniks vajalikud, siis on võimalik need asendada soovitud järjestusega. Lihtsamad ja kõige sagedamini kasutatavad on SFV replikon-vektorid, milles struktuurne regioon on asendatud võõrgeenide klonereimiseks vajaliku klonereimisjärjestusega (Liljeström *and* Garoff, 1991).



Joonis 2. SFV genoom on (+) polaarsusega lineaarne RNA molekul, mis sisaldab kahte avatud lugemisraami (ORF). 5' ORF kodeerib mittestruktuurseid (nsP) ehk replikatsiooni valke, mis moodustavad viiruse replikaasi. 3' ORF kodeerib virionide moodustumiseks vajalikke struktuurseid valke. Genoomi 5' otsas paikneb 7-metüülguanosiinist *cap*-struktuur ning 3'otsas polü(A) järjestus.

1.4 SFV elutsükkel

Rakule seondumiseks kasutab SFV rohkem kui ühte seni identifitseerimata valgulist retseptorit, oletatavasti sõltub kasutatava retseptori valik ka peremeesraku tüübist. Ka SIN-i puhul on teada, et viirus kasutab paljusid erinevaid retseptoreid, kuid samas on teada, et imetajarakkudes on SIN-i peamiseks retseptoriks laminiin. SFV sisenemine peremeesraku toimub retseptor-vahendatud endotsütoosi teel klatriiniga kaetud vesiikulites (Helenius *et al.*, 1980). Alfaviiruse virioni ja raku membraanide liitumine toimub endosoomides oleva happelise pH toimel, mis põhjustab glükovalkude konformatsioonilisi muutusi ja aktiveerib selle kaudu E1 fusogeenset aktiivsust, selle protsessi tulemuseks on viiruse nukleokapsiidi vabanemine tsütoplasmasse (Garoff *et al.*, 1994; Kielian, 1995). Peale nukleokapsiidi vabanemist toimub tema kiire (1-2 minuti jooksul) lagunemine ribosoomide toimel, mis seondavad SFV kapsiidivalgu vabastades selle tulemusena genoomse RNA (Singh and Helenius, 1992). Nakatunud rakud on resistentsed superinfektsiooni suhtes (alates 0.5 - 1 tund peale nakatumist).

Vabanenud positiivset RNA genoomi kasutakse mRNA-na, millelt sünteesitakse mittestruktuurne polüproteiin (P1234). Polüproteiini protsessimise esimeseks etapiks on nsP4 valgu, mis on viiruse RNA-st sõltuv RNA polümeraas (RdRp), vabanemine proteolüütilise lõikamise tulemusel. See lõikamine on viiruse replikatsiooniks absoluutselt vajalik (Shirako and Strauss, 1994). Polüproteiini hilisema protsessingu käigus moodustub neli replikatsiooniks vajalikku

mittestruktuurset valku (nsP1-4) ja lühikese elueaga polüproteiini protsessingu vahevormid P12, P34 ning P23. Kogu polüproteiini lõikamine on seotud viiruse mittestruktuurse valgu nsP2 proteaase aktiivsusega (Kääriäinen *and* Ahola, 2002) (Joonis 3).

SIN-i mittestruktuursete valkude ekspressioon erineb mõnevõrra SFV poolt kasutatavast ekspressiooni skeemist. Nimelt sisaldab SIN P1234 polüproteiini avatud lugemisraam peale nsP3 *opal* terminatsioonikoodonit, mistõttu nsP4 translatsioon toimub terminaatori supresseerimise teel ning madalal tasemel. Seetõttu sünteesitakse P1234 polüproteiini võrrelduna P123 polüproteiiniga ka oluliselt väiksemal hulgal (Strauss *and* Strauss, 1994). Siiski ei mõjuta sellised erinevused P1234 polüproteiini sünteesil oluliselt viiruse molekulaarbioloogiat. Peale selle on teada, et sarnane terminator esineb ka vähemalt ühel SFV tüvel (tüvi A7(74)) ja selle vahetamine *sense*-koodoniga ei oma viiruse replikatsioonile olulist mõju.

SFV RNA replikatsioon toimub tsütoplasmas ja viiakse läbi viiruse mittestruktuursetest valkudest koosneva replikaasi poolt. Raku poolsete komponentide osalemist SFV replikatsioonis on vähe uuritud, kuid on teada, et replikatsiooni toimumiseks on vajalikud raku membraanid. Replikatsioon toimub negatiivse RNA ahela vahendusel, millelt amplifitseeritakse uued täispikad genoomid ja subgenoomsed RNA-d. Selgroogsetes peremeesrakkudes inhibeerib SFV juba infektsiooni esimestel tundidel peremeesraku makromolekulide sünteesi ja indutseerib nakatunud rakkude apoptoosi (Strauss *and* Strauss, 1994).

Struktuurse polüproteiini, mis transleeritakse 26S RNA maatriksilt, protsessingul moodustuvad kapsiidi valk C, ümbrisevalgud E1 ja E2 ning kaks väiksemat peptiidi E3 ja 6K. Struktuurse polüproteiini protsessimine algab kapsiidivalgu autokatalüütilise vabanemisega. Peale kapsiidivalgu lõikamist eksponeerub E3 valgu aminoterminususes olev signaaljärjestus, mis saadab ülejäänud polüproteiini karedapinnalisele endoplasmaatilisele retiikulumile (Melançon *and* Garoff, 1987; Garoff *et al.*, 1990), kus toimub struktuurse polüproteiini glükosüleerimine ja edasine protsessimine peremeesraku ensüümide abil. Rakulise päritoluga signaalpeptidaas lõikab p62 (E2 ja E3 eelvalk) ja 6K ning 6K ja E1 vahelt. E1 subühik ja p62 moodustavad dimeeri, mille lõplik protsessimine toimub hilises sekretoorses rajas (*trans*-Golgis). Moodustunud E1, E2 ja E3 valgud transporditakse plasmamembraanile (Lu & Kielian, 2000; Sariola *et al.*, 1995). 6K omab signaaljärjestust, mis on oluline E1 translokatsioonil ER-I (Liljestrom & Garoff,

1991). Lisaks sellele suurendab 6K valk ka raku membraanide läbilaskevõimet (Sanz *et al.*, 1994) ning virionide pungumist (Loewy *et al.*, 1995).

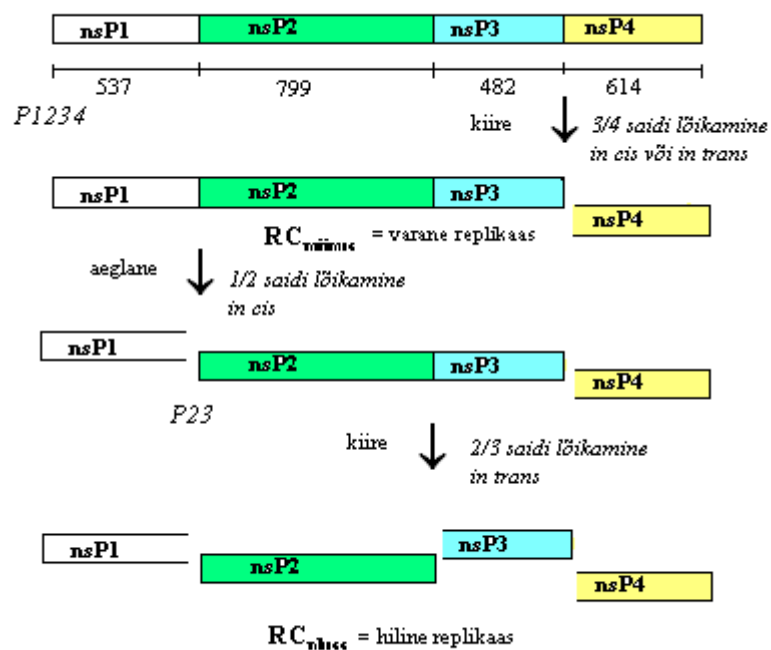
Viiruspartikli moodustumine algab genoomse RNA pakkimisega nukleokapsiididesse. On teada, et peale vabanemist struktuurse polüproteiini küljest seondub kapsiidivalk ajutiselt ribosoomi suurema subühikuga (60S) ja seejärel SFV 42S RNA-ga, moodustades nukleokapsiidi (Sönderlun *and* Ulmanen, 1977). Kapsiidivalk seondub viiruse genoomses RNA-s spetsiifilise nn. pakkimissignaali järjestustega, mis SFV-l ja SIN-l paiknevad vastavalt nsP2 ja nsP1 valke kodeerivates alades (Frolova *et al.*, 1997). Virionide lõplik vabanemine toimub nukleokapsiidi pungumisel läbi plasmamembraani spetsiifiliste piirkondade, mis on modifitseeritud viiruse glükoproteiinide poolt. On näidatud, et pungumise käivitamisel seostub nukleokapsiid plasmamembraanil asuva E2 valgu tsütoplasmaatilise sabaga (Suomalainen *et al.*, 1992).

1.5 SFV RNA replikatsioon

SFV RNA replikatsioon toimub nakatunud raku tsütoplasmas paiknevatel modifitseeritud endosoomide ja lüsoosoomide membraanidel, mis on kohaks, kus moodustuvad nelja viiruse mittestruktuurset valku (nsP1-4) sisaldavad replikatsioonikompleksid. Näidatud on ka mõnede peremeesvalkude seotust SFV replikatsioonikompleksiga (Barton *et al.*, 1991), kuid nende täpne roll ja vajalikkus replikatsioonil pole selge.

SFV replikatsioon algab positiivsele RNA ahelale komplementaarse negatiivse ahela sünteesimisega. Negatiivsete ahelate süntees toimub ainult infektsiooni varajases faasis (kuni 3 tundi peale nakatamist) ja on sõltuv translatsioonist (Sawicki *and* Sawicki, 1980). Proteaasi (nsP2) kontsentratsioon rakus on veel väike ja polüproteiinid suhteliselt stabiilsed. Positiivsete 26S ja 42S positiivsete RNA ahelate süntees on hilisem, translatsioonist sõltumatu ja jätkub ka mitu tundi peale valgusünteesi inhibiitorite lisamist (Wengler *and* Wengler, 1975; Kennedy, 1980). See tuleneb sellest, et SFV RNA süntees on kontrollitud mittestruktuurse polüproteiini (P1234) ekspressiooni ja lõikamisega (Joonis 3). Polüproteiini P1234 ja selle protsessingul tekivate vahevormide pool-eluiga on lühike (u. 10-20 min), sest nad protsessitakse kiiresti viiruse nsP2 proteaasi poolt (Ding *and* Schlesinger, 1989; Hardy *and* Strauss, 1989). Varajases infektsioonis toimub esmalt polüproteiini

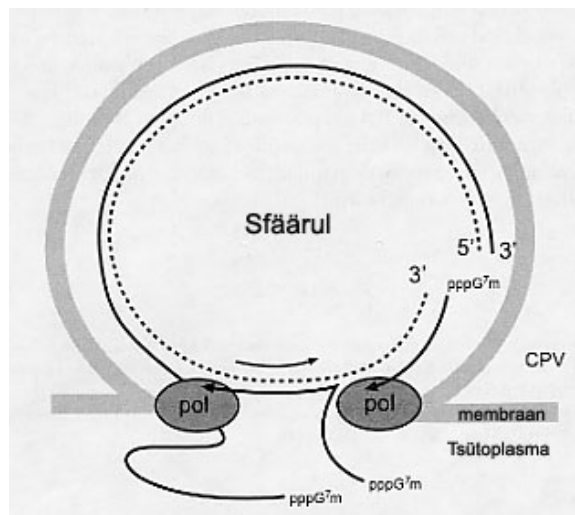
lõikamine *in cis* või *in trans* P123 ja nsP4 valgu vahelt. Tekkinud P123 polüproteiin ja vaba nsP4 moodutavad varase RNA polümeraasi, mis on vajalik negatiivsete RNA ahelate sünteesiks (Lemm *et al.*, 1993; Lemm *et al.*, 1994; Shirako *and* Strauss, 1994). Kuna varane polümeraas on ebastabiilne, on ka negatiivsete ahelate süntees lühiajaline. Varajase polümeraasi konverteerimine hiliseks polümeraasiks on seotud P123 lõikamisega ja seetõttu sõltub uute polüproteiinide pidevast juurdesünteesist. P123 esimese lõikamise tulemusena produtseeritakse nsP1 ning P23, millest protsessitakse väga kiiresti edasi individuaalsed nsP2 ja nsP3 valkud. Selle tulemusena konverteeritakse varajane polümeraaskompleks nsP1-4 valkudest koosnevaks hiliseks polümeraasiks, mis sünteesib negatiivste ahelate maatriksilt positiivseid 42S ja 26S RNA-sid. Subgenoomset 26S RNA-d transkribeeritakse sisemiselt promootorilt, mis asub RNA negatiivses ahelas ja kattub osaliselt nsP4 valku kodeeriva regiooniga. Hiline replikaas on stabiilne ja funktsioneerib ka ns-alkude juurdesünteesi lõppemisel. Hilises infektsioonis (ca 3 tundi peale infektsiooni algust) leiavad aset kaks sündmust. Esiteks, toimub viiruse ns-alkude sünteesi mahasurumine (enamasti siiski mitte täielik) viiruse enese poolt indutseeritud mehhanismi abil. Teiseks, nsP2 kontsentratsiooni kasv rakus lülitab ümber P1234 protsessingu raja. Esimeseks lõikamiseks selles infektsioonifaasis on lõikamine nsP2 ja nsP3 vahelt (s.t. lõikamine toimub sünteesi käigus ja enne seda kui süntees jõuab nsP3/nsP4 liitekohani). Selle tulemusena moodustuvad P12 ja P34 polüproteiinid, mis uusi replikatsioonikomplekse ei moodusta, ehkki protsessitakse valmis nsP1-4 valkudeks. Seega moodustuvad funktsionaalsed replikaasi kompleksid eranditult P123 + nsP4 vahevormi (varajase replikaasi) kaudu ning ainult varajase infektsioonis.



Joonis 3. SVF mittestruktuurse polüproteiini P1234 proteolüütiline protsessimine ning selle tulemusena moodustuvad funktsionaalsed replikatsioonikompleksid.

Uute positiivsete RNA genoomide süntees toimub tüüp I tsütoplasmaatilistes vakuoolides (*type I cytoplasmic vacuoles*, CPV-I). CPV-de moodustumine ei ole sõltuv raku sisenevast virionist, sest CPV-d moodustuvad ka palja infektsioonilise RNA-ga transfekteeritud rakkudes (Peränen *and* Kääriäinen, 1991). CPV-I-d on vesikulaarsed struktuurid (diameeter varieerub 600-2000 nm vahel), mis kujutavad endast modifitseeritud lüsoosome ja endosome ning on tihti lähedalt seotud endoplasmaatilise retiikulumiga (Froshauer *et al.*, 1988; Peränen *and* Kääriäinen, 1991). See annab alust arvata, et viiruse RNA replikatsioon, translatsioon ja pakkimine on kontsentreeritud tsütoplasma kindlasse regiooni (Froshauer *et al.*, 1988). Lisaks on näidatud, et selles piirkonnas võib ka toimuda struktuursete valkude translatsioon ja sünteesitud genoomse RNA pakkimine nukleokapsiidi. CPV-de membraane iseloomustab spetsiifiliste 50 nm diameetriga sissesopistuste ehk sfäärulite paiknemine CPV-I siseküljel. Sfäärulid on kitsa kanali kaudu ühenduses tsütoplasmaaga ning olemasolevad andmed näitavad, et sfäärulid on viiruse replikatsioonikomplekside paiknemise kohaks ja just nendes struktuurides toimub RNA süntees (Kujula *et al.*, 2001) (Joonis 4). Samuti on leitud, et taolised sfäärulid on iseloomulikud kõikidele seni uuritud alfa-sarnastele viirustele. Sfäärulite

moodustumise mehhanismi kohta on tänapäeval veel väga vähe teada. Teada on, et nakatatud rakus asuvad sfäärulid pidevas liikumises, muuhulgas on neid tuvastatud ka nakatunud raku pinnal (ca 3 tundi peale infektsiooni algust)(Kujala *et al.*, 2001).



Joonis 4. SFV positiivsete 42S RNA ahelate sünteesi hüpoteetiline mudel. Negatiivse polaarsusega RNA matriits (tähistatud punktiirjoonega) moodustab tõenäoliselt dupleksi positiivse ahelaga (pidev joon). Hilised RNA polümeraasi molekulid (pol) koosnevad nsP1-nsP4 valkudest ning on kinnitunud membraanile. Kaheaahelaline RNA matriits keerleb läbi kahe erineva polümeraasi kompleksi noolega näidatud suunas. Uued positiivse polaarsusega RNA ahelad sünteesitakse poolkonservatiivse replikatsiooni käigus. *Cap*-struktuur lisatakse viiruse ensüümide poolt kotranskriptsiooniliselt (Kaariainen *and* Ahola, 2002).

Ainsateks valkudeks, mille osalus SFV RNA sünteesil ja modifitseerimisel on teada, on viiruse mittestruktuursed valgud. Neid valke on intensiivselt uuritud ja paljud nende funktsioonid on teada.

NsP1 (SFV 537 ah jääki, 60 kDa) on vajalik negatiivsete-ahelate sünteesi initsiatsiooniks ning viiruse replikaasi seondumiseks raku membraanidele. Veel vastutab nsP1 mRNA-le *cap*-i lisamise eest, omades nii metüültransferaas kui guanüültransferaas aktiivsust (Ahola *and* Kääriäinen, 1995; Ahola *et al.*, 1997; Laakkonen *et al.*, 1996; Ahola *et al.*, 2000b). Täpsemalt on nsP1 funktsioone kirjeldatud allpool.

NsP2 (SFV 799 ah jääki, 89 kDa) valgul on teada palju funktsioone. SFV-ga nakatatud rakkude immunofluoresentsanalüüs näitab, et 50% nsP2 valgust paikneb tuumas (Peränen *et al.*, 1990). Seda põhjustab nsP2 valgu C-terminaalses osas paikneva tuuma lokaliseerimise signaali olemasolu (Rikkonen *et al.*, 1992). NsP2

valgu N-terminaalne domeen on viiruse RNA helikaas ning C-terminaalne domeen on homoloogne papaiin-sarnastele tsüsteiinproteasidele (Hardy *and* Strauss, 1989; Gorbalenya *et al.*, 1991). Nagu eelpool mainitud, on nsP2 ainuke proteaas, mis vastutab mittestruktuurse polüproteiini protsessimise eest. Helikaasne domeen omab ka ATPaasi ja GTPaasi aktiivsust (Rikkonen *et al.*, 1994) ja on ka RNA trifosfataas, mis katalüüsib esimest etappi viirus-spetsiifilisest mRNA *cappimis*-reaktsioonist (Vasiljeva *et al.*, 2000). Veel on leitud, et nsP2 on vajalik subgenoomsete 26S RNA-de sünteesil, initsierides transkriptsiooni sg-promootoril (Hahn *et al.*, 1989b; Suopanki *et al.*, 1998).

NsP3 (SFV 482 ah jääki, 61 kDa) valgu täpne funktsioon ei ole teada, kuid molekulaarbioloogilised uuringud on näidanud, et ta on viiruse replikatsioonil oluline (Hahn *et al.*, 1989b). NsP3 koosneb kahest erinevast domeenist. NsP3 N-terminaalne osa (nn. X-domeen) on konserveerunud kõigil alfaviirustel ning selle domeeniga homoloogseid järjestusi on leitud ka teistelt viirustelt nagu rubella, hepatiit E ning coronaviirused (Koonin *and* Dolja, 1993; Gorbalenya *et al.*, 1991) ning ka rakkude genoomidest. NsP3 C-terminaalne domeen on aga väga varieeruv nii pikkuselt kui järjestuselt (Strauss *and* Strauss, 1994). Selles regioonis asuvad seriini- ja treoniinjäägid on rakuliste kinaaside poolt fosforüleeritud (Peränen *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1990; Vihinen *and* Saarinen, 2000). Fosforüleerimise bioloogiline tähtsus ei ole veel selge, kuid on teada, et vastavate aminohappe jääkide muteerimine või deleteerimine ei blokeeri viiruse replikatsiooni, ehkki mõjutab SFV patogeensust (Vihinen *et al.*, 2001).

NsP4 (SFV 614 ah jääki, 68 kDa) on viiruse RNA polümeraasi katalüütiline subühik. Tema C-terminaalne osa sisaldab kõikidele RNA sõltuvatele RNA polümeraasidele tüüpilisi järjestuselemente, kaasa arvatud universaalset GDD motiivi (Poch *et al.*, 1989; Koonin *and* Dolja, 1993). Alfaviirusega nakatunud rakus on nsP4 kogus võrreldes teiste ns-alkudega väike, sest ta degradeeritakse kiiresti ubiquitinüleerimise raja kaudu proteasoomides (de Groot *et al.*, 1991; Takkinen *et al.*, 1991; Merits *et al.*, 2001). Ebastabiilseks muudab nsP4 valgu tema N-terminaalne türosiinijääk, mille tunneb ära rakuline ubiquitinüleerimise mehhanism (N-otsa reegel, Gonda *et al.*, 1989). Samas on see türosiinijääk oluline viiruse replikatsiooniks. Natiivne nsP4, mida ekspresseeritakse stabiilsetes rakkudes, omab pool-eluiga alla mõne minuti (Ingrid Hääl, Magistristö, 2004), nakatatud rakus stabiliseeritakse osa sünteesitud nsP4 valgust (ca 20% koguhulgast) tänu interaktsioonidele teiste

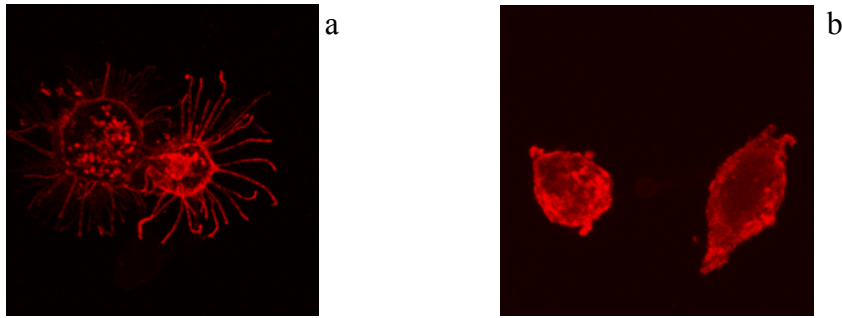
replikaasikompleksi valkude ja/või struktuuridega samal ajal kui ülejäänud osa nsP4-st lagundatakse (de Groot *et al.*, 1991).

2. SFV multifunktsionaalne valk nsP1

SIN viiruse mutanditega on näidatud, et nsP1 valk osaleb negatiivse polaarsusega RNA sünteesi initsiatsioonil ja selleks funktsiooniks vajalik järjestus paikneb nsP1 C-terminaalses osas (Wang *et al.*, 1991). SFV nsP1 kohta analoogsed andmed praegu veel puuduvad, küll aga on SFV mittestruktuurne nsP1 valk üks kõige paremini iseloomustatud alfaviiruste replikatsioonivalke.

SFV nsP1 viib läbi viirus-spetsiifilist genoomse ja subgenoomse mRNA 5' otsa *cap*erimis-reaktsiooni. Kõigepealt funktsioneerib nsP1 kui metüültransferaas (MT) konverteerides GTP metüül-7-GTP-ks (Laakkonen *et al.*, 1994) ja seejärel kui guanüültransferaas (GT) moodustades kovalentse kompleksi. Seega erineb alfaviiruste RNA *cappimine* oluliselt rakuliste mRNA-de omast, toimudes tsütoplasmas ja vastupidist reaktsioonide järjekorda kasutades: rakus toimub esimesena GT vahendatud GMP transportimine RNA-le ning viimasena metüleerimine otse RNA molekulil (Ahola *and* Kääriäinen, 1995). Kuna alfaviiruste MT ja GT reaktsioonid on ühised kõigi alfa-sarnaste viirustega ning erinevad rakulistest reaktsioonidest, on need üheks võimalikuks sihtmärgiks viirus-spetsiifiliste inhibiitorite väljaarendamisel (Lampio *et al.*, 1999).

Ainsana SFV mittestruktuursetest valkudest on nsP1 otseselt seotud raku membraanidega, olles seega kogu viiruse replikatsioonikompleksi tsütoplasmaatilisele membraanile sidujaks (Ahola *et al.*, 2000b). NsP1 seondub tugevasti fosfatitüülseriini sisaldavate negatiivselt laetud membraanidega. On näidatud, et seandumisel membraanidega osalevad kaks funktsionaalselt erinevat nsP1 valgu järjestust (Joonis 5).



Joonis 6. Palmitüleeritud (a) ja palmitüleerimata (b) nsP1 valguga nakatatud BHK-21 rakud (Ingrid Hääl, Magistritöö 2004).

Palmitüleerimisjärjestuse muteerimise mõju viiruse infektsioonile on uuritud ka infektsioonilise SFV ja SIN kontekstis. Ahola *et al.*, töös näidati, et mutantset nsP1 palmitüleerimiskohta omavad viirused (SFV puhul 418-420 CCC→AAA, SIN puhul C→A) on elujõulised ning võimelised paljunema kõrge tiitrini, kuigi nende kasv võrreldes wt viirusega on veidi aeglasem. Näidati ka, et selliste viiruste replikatsiooniga ei kaasne sisseviidud mutatsiooni reverteerumist. Erinevalt metsikut tüüpi viirustest ei põhjustanud mutantsed viirused muutusi nakatunud rakkude morfoloogias, samuti olid need viirused hiirtele apatogeensed (Ahola *et al.*, 2000).

Hiljem läbi viidud katsed, mille käigus üritati sama mutatsiooni sisse viia SFV replikon-vektorisse näitasid, et sellised replikonid kaotavad peagu täielikult replikatsioonivõime (Merits, seni avaldamata andmed). Samasuguse tulemuse andis ka kolme meie laboris konstrueeritud mutandi mut3A, del3 ja del7 analüüs (Tabel 1). Nendest tulemustest järeldub, et mutantsed replikonid, erinevalt vastavatest täispikkadest genoomidest omavad väga madalat infektsioonilisust. Samades katsetes näidati, et mutantsete replikonide defekt ei sõltu temperatuurist st. tegemist ei ole temperatuuritundlike mutantidega. Selle nähtuse iseloomustamine ja selle põhjuste väljaselgitamine oligi antud väitekirjas kajastatud uurimistöö eesmärgiks.

Tabel 1. nsP1-6D mutatsiooni sisaldavate replikonide infektsioonilisuse detekteerimine d1EGFP valgu ekspresseerumise järgi (Inga Sarandi andmed).

Mutatsioon nsP1	Mutandi nimetus käesolevas töös	GFP positiivsete rakkude hulk %	
		28° C	37° C
wt	wt	80%	70%
418-420 CCC→AAA	mut3A	<2%	<2%
418-420 CCC→Δ	del3	<2%	<2%
414-420 RLSTCCC→Δ	del7	<2%	<2%

II. EKSPERIMENTAALNE OSA

UURIMISTÖÖ EESMÄRGID JA HÜPOTEESID

SFV-d kasutatakse sageli nii viiruste elutsükli ning replikatsiooni uurimisel kui ka töövahendina (viirus-vektorina) rakkude transfekteerimisel. Mitmetel juhtudel on SFV vektorite kui töövahendite suurimaks puuduseks nende kõrge tsütotoksilisus koekultuurirakkudele, mis väljendub nakatunud rakkude biosünteeside inhibeerimises ja morfoloogilistes muutustes. Selle probleemi lahendamiseks on konstrueeritud erinevad vähendatud tsütotoksilisusega hästi replitseeruvad mutantsed SFV vektorid. SFV toksilisus omab olulist tähtsust ka vastavate vektorite kasutamisel geenivaktsineerimisel, mõjutades antigeenide ekspressiooni ja viirus-vektori bioloogilist ohutust. Seetõttu omavad SFV mittestruktuursetesse valkudesse sisseviidud tsütotoksilisust vähendavad mutatsioonid suurt potentsiaali alfaviirusvektorite täiendavaks edasi arendamiseks ja nende kasutamisevõimaluste laiendamiseks.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida muteeritud palmitüleerimisjärjestust sisaldavate SFV mutantide omadusi. Eelnevalt oli meie laboris konstrueeritud kolm sellist mutanti, mille nsP1-s tsüsteiinjäädid positsioonis 418-420 olid kas asendatudalaniinidega või deleteeritud (vt Tabel 1). Sellised mutandid olid konstrueeritud kirjanduses avaldatud andmete põhjal (Ahola *et al.*, 2000) ning ette nähtud mittetsütotoksiliste SFV replikon-vektorite konstrueerimiseks. Paraku näitasid läbiviidud eelkatsed, et selliseid mutatsioone sisaldavad SFV replikonid omasid sedavõrd väikest infektsioonilisust, mis ei võimalda nende kasutamist efektiivselt toimuvates vektorites. Samuti olid need andmed teravas vastuolus kirjanduses avaldatud andmetega, mis näitasid, et sarnaseid mutatsioone sisaldavate viiruste infektsioonilisus ja tiitrid on võrreldavad wt viiruse omadega (Ahola *et al.*, 2000). Sellest lähtuvalt kujunes töö peamiseks eesmärgiks madala infektsioonilisuse molekulaarsete põhjuste identifitseerimine ja iseloomustamine. Töö teiseks eesmärgiks oli uurida kas ja kuidas on võimalik identifitseeritud mehhanisme kasutades konstrueerida mittetoksilised nsP1 mutatsioone sisaldavad SFV replikonvektorid.

Peamisteks erinevusteks replikon-vektoril ning täispikkade genoomide vahel on 1.) replikonil puudub struktuurseid valke kodeeriv järjestus ning 2.) infektsiooniline viirus, vastupidiselt replikonile, on võimeline esmalt nakatunud rakkudes paljunema, tootma uusi virione ning ka teisi rakke nakatama. Meie käsutuses olnud andmed võimaldasid formuleerida peamised uurimis-hüpoteesid:

1. Vektorite konstrueerimisel läbi viidud nsP1 palmitüleerimiskoha muteerimine blokeerib oluliselt nii viiruse kui ka replikonide replikatsiooni ning efektiivse replikatsiooni taastamiseks on vajalik kompensatoorsete mutatsioonide tekkimine. See on võimalik ainult infektsioonilise viiruse puhul, sest replikonid ei tooda uusi rakke nakatavaid virione.

2. Palmitüleerimis-defektsed viirused vajavad oma replikatsiooniks lisaks mitte-struktuursele regioonile veel ka replikon-vektoritest puuduvat struktuurset regiooni. See regioon ei ole harilikult replikatsiooniks vajalik, kuid võib mingil põhjusel osutada vajalikuks mutantse viiruse kontekstis.

MATERJAL JA METOODIKA

Bakteritüved ja söötmed

Plasmiidide paljundamiseks kasutati *Escherichia coli* tüvesid DH5 α ning SURE® (*Stratagene*). Rakke kasvatati LB söötmes (*Difco*TM) (10 g/l trüptooni, 5 g/l pärmiekstrakti, 10 g/l NaCl), kuhu oli lisatud ampitsilliini (Amp) lõppkontsentratsioonini 100 μ g/ml. Infektsioonilist cDNA-d sisaldavate plasmiidide paljundamiseks kasutati SOB söödet (*Difco*TM) (20 g/l trüptooni, 5 g/l pärmiekstrakti, 0.5 g/l NaCl, 2.4 g/l MgSO₄, 186 mg/l KCl), kuhu oli lisatud Amp'i lõppkontsentratsiooniga 50 μ g/ml.

Plasmiidid

Käesolevas töös kasutatud algplasmiidide kaardid on toodud lisa 1. Peamised kasutatud plasmiidid olid järgnevad:

pSFV1

SFV mittestruktuursete valkude geene sisaldav replikon-vektor, sisaldab veel kloneerimisjärjestust, SP6 promootorit, polü(A) järjestust ja ampitsilliini resistentsusgeeni.

pSFV1-d1EGFP

pSFV1 vektor, mis sisaldab subgenoomse promootori alt ekspresseeritavat d1EGFP valku (*Clontech*). Konstrueeritud dr.Inga Sarandi poolt.

Helper 1

SFV struktuurset geene, SP6 promootorit, polü(A) järjestust ning ampitsilliini resistentsusgeeni sisaldav abi-plasmiid.

pSFV1 Δ HindIII

pSFV1 trankeeritud vorm, millest *HindIII* restriksiooni kasutades on deleteeritud nsP4, nsP3 ning osa nsP2 valku kodeerivast alast.

pSP6-SFV4

SFV täispikka genoomi sisaldav plasmiid. Sisaldab SP6 promootorit, polü(A) järjestust ning ampitsilliini resistentsusgeeni.

SFV ja SIN mutantsed plasmiidid (kirjeldatud tabelis 2)

Tabel 2.

Plasmiidi nimi	Viirus	Replikon/icDNA	Mutatsioon nsP1 (ah)	Võõrgeen	Päritolu
pTOTO1101	SIN	icDNA	-	-	USA
pTOTO1101 C/A	SIN	icDNA	C→A (420)	-	soome
pSP6-SFV4 ^{6D}	SFV	icDNA	CCC→AAA (418-420)*	-	soome
pSFV1 ^{del3}	SFV	replikon	ΔCCC (418-420)	d1EGFP	eesti
pSFV1 ^{del7}	SFV	replikon	ΔRLSTCCC (414-420)	d1EGFP	eesti
pSFV1 ^{mut3A}	SFV	replikon	CCC→AAA (418-420)*	d1EGFP	eesti

* Sisseviidud mutatsioonid on identsed kodeeritud valkude ah jääkide tasemel, kuid erinevad nukleotiidsete järjestuste tasemel

Pöördtranskriptsioon ja PCR

Totaalne SFV RNA eraldati firma *Macherey-Nagel NucleoSpin[®] RNA II kit*-ga viiruseid sisaldavast koekultuuri söötimest. Pöördtranskriptsiooniks võeti 5 µl puhastatud RNA-d, lisati sellele 15-20 pmol järjestus spetsiifilist *antisense* praimerit ning DEPC vett mahuni 11 µl. Segu inkubeeriti 70° C juures 5 minutit ning jahutati jääl. Seejärel lisati segusse veel transkriptsioonipuhvrit (lõplik kontsentratsioon 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 4mM MgCl₂, 10 mM DTT), 1 mM lõppkontsentratsiooniga dNTP-d, 20 ühikut rekombinantset ribonukleaaasi inhibiitorit (*RNasin[®]*, *Promega*) ning DEPC vett mahuni 19 µl. Segu inkubeeriti 37° C juures 5 minutit ning seejärel lisati 40 ühikut *M-MuLV Reverse Transcriptase*'i (*Fermentas*). Reaktsioon viidi läbi 37° C juures 60 minuti jooksul ning peatati, kuumutades 70° C juures 10 minutit.

Saadud cDNA-d kasutati maatriksina PCR reaktsioonil, mis viidi läbi SFV mittestruktuurse ala jaoks kavandatud spetsiifiliste praimeritega. Üldine PCR reaktsiooni läbiviimise skeem oli järgnev - peale esialgset denaturatsiooni 95° C 5 minutit toimus amplifikatsioon tingimustel: denaturatsioon 95° C 30 sekundit, praimerite seondumine 30 sekundit (kasutatud temperatuur sõltus konkreetse reaktsioonis kasutatud praimerite seondumistemperatuurist), ekstensioon 72° C 1

minut, korrates sama tsüklit 29 korda. Amplifikatsioonile järgnes lõppekstensioon 72° C juures 10 minutit. PCR-i reaktsioonisegu puhastamiseks kasutati *JetQuick PCR Purification Spin Kit*-i (*Genomed GmbH*) vastavalt tootja protokollile. Saadud produkte kasutati sekveneerimiseks ja ka edaspidiseks klonereerimiseks.

Kloneerimine

DNA-de restrikteerimiseks kasutati firma *MBI Fermentas* ensüüme ja puhvreid, lõigatud vektor DNA-de defosforüleerimiseks kasutati aluselist fosfotaasi (CIAP, *MBI Fermentas*) ja restriksiooniproduktide ligeerimiseks T4 DNA ligaasi (*MBI Fermentas*). DNA puhastamiseks kasutati *Genomed GmbH* ja *Eppendorf GmbH* toodetud *Kit*'e vastavalt tootja instruktsioonidele. DNA kloonide õigsust kontrolliti restriksioonanalüüsi, PCR-i ja sekveneerimise abil.

Mutantsete infektsiooniliste cDNA-de konstrueerimiseks lõigati plasmiididest pSFV1^{mut3A}, pSFV1^{del3} ja pSFV1^{del7} ensüümidega *SphI* ja *XbaI* välja SFV mittestruktuurseid valke kodeeriv regioon ning kloneeriti need samade ensüümidega lõigatud Helper1 vektorisse.

Töös identifitseeritud kompensatoorsete mutatsioonide kloneerimiseks disainiti mutatsioone sisaldavatele piirkondadele vastavad spetsiifilised praimerite paarid (Tabel 3), mille abil amplifitseeriti *plaque*-puhastatud viiruse cDNA-lt mutatsioone sisaldav piirkond. Praimerite disainimisel arvestati viiruse cDNA-s leiduvate unikaalsete lõikamisjärjestuste asukohtadega. PCR-l saadud DNA lõik subkloneeriti pGEM-T vektorisse (*Promega*) vastavalt tootja instruktsioonile ning saadud kloonid sekveneeriti. Seejärel tõsteti mutatsiooni sisaldav fragment vastavat esialgset mutatsiooni (mut3A, del3, del7) sisaldavasse pSFV1- Δ *HindIII* vektorisse (Tabel 4). Saadud vahekloonid sekveneeriti ning saadud mutatsioonide kombinatsioonid viidi üle *EclI36II* ning *BcuI* restriksiooni kasutades replikonvektorisse pSFV1-d1EGFP. Saadud rekombinantsete kloonide nsP1 regioonid kontrolliti üle sekveneerimisega.

Tabel 3. Kompensatoorsete mutatsioonide kloneerimisel kasutatud praimerid

Nimi	Sense/antisense	Järjestus: (5'→3')
1236F	sense	5' –ATCTCGAGGATAGAGAGATCGCAGGAAAAATC- 3'
1236R	antisense	5' –ATAGATCTGTACCCTACCGTTTTACCGTACAG- 3'
57F	sense	5' –ATCTCGAGGCAGGCGCGTATCCAACC- 3'
57R	antisense	5' –ATAGATCTGCGTGATCTGACTGGGATTGC- 3'

Tabel 4. Kloneerimise skeem pSFV1- Δ HindIII tüüpi vahevektoritesse.

Mutatsioon	Aminohappe muutus	Mutatsiooni positsioon (nt jääkide järgi)	Nukleotiid muutus	Esialgne mutatsioon	PCR praimerid	Sub-kloneerimise ensüümid*
mut3A-1	Pro→Gln	632-634	C→A	CCC→AAA	1236F/1236R	5' <i>Eco</i> 72I, 3' <i>Adel</i>
mut3A-2	Leu→Phe	785-787	G→T	CCC→AAA	1236F/1236R	5' <i>Eco</i> 72I, 3' <i>Adel</i>
mut3A-3	Gln→Leu	1154-1156	A→G	CCC→AAA	57F/57R	5' <i>Van</i> 91I, 3' <i>Stu</i> 1
del3-1	Met→Val Ala→Asp	455-457 675-677	A→G C→A	Δ CCC	1236F/1236R	5' <i>Pst</i> 1, 3' <i>Adel</i>
del3-2	Thr→Ser Leu, Gly→Glu	1139-1141 755-757	A→T Δ CCG	Δ CCC	57F/57R	5' <i>Van</i> 91I, 3' <i>Stu</i> 1
del7-1	Phe→Leu	485-488	T→C	Δ RLSTCCC	1236F/1236R	5' <i>Pst</i> 1, 3' <i>Adel</i>

* Klooned PCR fragmendis asunud mutantse lõigu ülekandmiseks vastavasse pSFV1- Δ HindIII

plasmidi kasutatud ensüümid

Rakud ja söötmed

Konstrueeritud viiruste ja replikon-vektorite infektsioonilisuse analüüsimiseks ning rekombinantsete viiruste kogumiseks kasutati hamstri neerurakuliini BHK-21. Rakke kasvatati GMEM söötmes (*Gibco*TM), millele oli lisatud 200 mM HEPES (pH 7.2), 7.5 % FCS-i, 100 U/ml penitsilliini, 100 ng/ml streptomütsiini ning 2% TPB-d (*Bacto*TM). Rakke inkubeeriti 37° C ja 5% CO₂ sisalduse juures.

RNA transkriptsioon *in vitro*

Enne transkriptsiooni lineariseeriti 3.0 μ g SFV icDNA-d või replikon-vektorite DNA-d *Bcu*I-ga, puhastati *JetQuick PCR Purification Spin Kit*'ga (*Genomed GmbH*) ja elueeriti 30 μ l DEPC veega. *In vitro* transkriptsiooni segu (50 μ l) sisaldas: rNTP segu (1 mM rATP, rCTP, rUTP ning 0.5 mM rGTP; *Promega*), 5 mM DTT, 1mM *Ribo m*⁷*GpppG Cap Analog*'i (*Promega*) ning 1x SP6 puhvrit (80 mM Hepes-KOH pH 7.4, 12 mM MgOAc, 4 mM spermidin-HCl). Kõik komponendid segati kokku jääs. Enne lineariseeritud DNA (3.0 μ g) lisamist lasti segul DNA sadenemise vältimiseks soojeneda toatemperatuurini. Seejärel lisati 50 ühikut rekombinantset ribonukleaasi inhibiitorit (*RNasin*[®], *Promega*) ja 30 ühikut SP6 RNA polümeraasi (*Promega*). Süntees viidi läbi 37° C juures 90 minuti jooksul. Saadud RNA koguse ja kvaliteedi analüüsimiseks kasutati agarosgeel-elektroforeesi.

RNA transfektsioon BHK-21 rakkudesse

In vitro sünteetised transkriptid transfekteeriti BHK-21 rakkudesse elektroporatsiooni teel. Iga transfektsiooni jaoks võeti u 4 miljonit rakku (50-70% konfluentne 100 mm Ø tass). Rakkude ettevalmistamiseks aspireeriti sööde, pesti rakke kaks korda 1x steriilse PBS-ga, trüpsiniseeriti, suspendeeriti lisatud söötmes ning koguti 15 ml koekultuuri tuubi. Seejärel rakud tsentrifuugiti (5 min. 1000 rpm 20° C juures *Eppendorf Centrifuge* 5810 R), sööde eemaldati ja rakud resuspendeeriti 800 µl PBS-s. Rakususpensioon ja *in vitro* transkriptsiooni produktid segati kokku eelnevalt jahutatud küvetis (*BioRad*), elektroporatsiooniks tehti kaks pulssi 850 V ning 25 µF juures (*BioRad Gene Pulser II*). Koheselt peale poratsiooni kanti rakud üle tassidele (60 mm Ø), kuhu oli eelnevalt lisatud 3 ml GMEM söödett. Rakke inkubeeriti 37° C või 28° C juures 5% CO₂ tingimustes vastavalt 24 ja 72 tundi. Peale inkubeerimist koguti sööde (primaarne viirus-stokk), vastavalt konkreetsele ülesandele koguti osadel juhtudel ka rakud ning kasutati *Western blot* ja/või FACS analüüsiks nagu kirjeldatud allpool.

Sekveneerimine ja järjestuste analüüs

Konstrueeritud konstruktide ning *plaque*-puhastatud viiruste cDNA-de sekveneerimiseks kasutati kommertsiaalset sekveneerimisteenust. Saadud järjestuste analüüsimiseks kasutati programmi *Bioedit* (loodud Tom Hall-i poolt).

Viirusega nakatamine ja viiruse *plaque* titreerimine

Viirus-stokkide paljundamiseks kasutati 50 µl primaarsetest viirus-stokki, millega nakatati 100% konfluentseid BHK-21 rakke 6 cm Ø tassil. Nakatamiseks inkubeeriti rakke 500 µl nakatamissöötme (seerumivaba GMEM + primaarstokk) 1 h 37° C juures tase iga 10 minuti järel loksutades. Seejärel nakatamissööde eemaldati ja rakkudele lisati 3 ml GMEM söödett ning lasti viirusel koguneda 24 tundi 37° C juures või 48 tundi 28° C juures 5% CO₂ tingimustel. Nakatunud rakkudelt koguti uusi virione sisaldav sööde, puhastati filtreerimisega läbi 0.2 µm filtri ja kasutati sekundaarse viiruse stokina.

Nii primaarsed kui ka sekundaarsed viirus-stokkid titreeriti *plaque*-titreerimise meetodil. 100% konfluentseid BHK-21 rakkude 6 cm Ø tase nakatati viirus-stoki erinevate lahjendustega (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ jne) sarnaselt eelnevalt kirjeldatule, kusjuures

iga viiruse lahjendust analüüsiti kahel paralleelsel tassil. Peale nakatamissöötme eemaldamist kaeti tassid eelnevalt soojendatud CMC-söötmega, mis sisaldas 2 osa 2% CMC lahust ning 3 osa GMEM-i, millele oli lisatud 2% FCS-i. Nakatatud BHK rakke inkubeeriti 48 tundi 37° C juures, seejärel sööde eemaldati ning rakud värviti kristallviolett-fikseerimislahusega (0.25% kristallviolett (*Merck*), 1.85% formaldehüüd, 10% etanool, 35 mM Tris, 0.5% CaCl₂) 15 - 30 minuti jooksul, pesti jooksva sooja veega ja kuivatati õhu käes. Viiruse tekitatud *plaque*'d (lüüsilaigud) loendati ja arvutati viiruse tiiter.

Viiruse plaque puhastamine

Infektsioonilise viiruse puhastamiseks *plaque*-dest nakatati BHK-21 rakke (10 cm Ø tass) erinevate viiruste lahjendustega nagu ülal kirjeldatud. Peale nakatamissöötme eemaldamist kaeti tassid eelnevalt soojendatud 2xGMEM - 1.8% agar seguga ning inkubeeriti 5 päeva 28° C juures. Lüüsilaikude tuvastamiseks värviti rakke üleöö 37° C juures mitte-toksilise 2% neutraalpunase-1.8% agar seguga. Tassidel moodustunud lüüsilaikudest võeti steriilse plastik otsikuga agarooši tükki ja selles leiduvad virionid elueeriti seerumivabas GMEM söötmes. Saadud esialgset stokki amplifitseeriti nakatades BHK-21 rakke ülal kirjeldatud meetodil.

Infectious center assay (ICA)

ICA läbiviimisel elektroporeeriti eelpool kirjeldatud meetodit kasutades BHK-21 rakkudesse 1 µg või 20 µg *in vitro* transkribeeritud RNA-d. Peale poratsiooni tehti transfekteeritud rakkudest lahjendused seerumivabas GMEM söötmes (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴), millega nakatati 6 cm Ø tassidel kasvavaid 100% konfluentseid BHK-21 rakke. Peale 2 tunnist inkubatsiooni 37° C juures eemaldati rakkudelt sööde, tassid kaeti CMC - söötmega ning inkubeeriti 37° C juures 5% CO₂ tingimustel 48 tundi. *Plaques* tuvastati kristallviolettiga värvides, kasutades selleks eelpool kirjeldatud meetodit.

Viiruste kasvukõverate tegemine ja analüüs

Viiruste primaarsete kasvukõverate tegemiseks elektroporeeriti BHK-21 rakkudesse 20 µg *in vitro* transkribeeritud RNA-d, sekundaarsete kasvukõverate saamiseks nakatati rakke viirus-stokkidega MOI 10 tingimustes. Rakke inkubeeriti 37° C juures 5% CO₂ tingimustes ja 2, 4, 6, 8, 10, 12 ning 24 tundi peale

transfektsiooni või nakatamist võeti rakkudelt viirus-stokkid (500 µl). Titreeriti need eelpool kirjeldatud meetodil ning viiruste kasvu analüüsiti kasutades *Microsoft Excel* andmetöötlus-programmi.

Western blot

BHK-21 konfluentsetelt koekultuuri tassidelt (6 cm Ø) eemaldati sööde, rakke pesti kolm korda PBS-ga ning lüüsi 100 µl Laemmli puhvis (100 mM TrisHCl pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.2% broomfenoolsinine, 20% glütserool). Rakulüsaati kuumutati 100 °C juures 5 min ning valgud lahutati geel-elektroforeesil 10% SDS-polüakrüülamiidgeelis 1xSDS puhvis (0.125 M Tris, 0.9 M glütsiin, 0.5% SDS). Geeli igale rajale kanti ca 1/20 lüüsitud materjalist. Foreesil lahutatud valgud kanti üle firma *Amersham* nitrotselluloosfiltrile, mis immutati nagu geelgi poolkuivas ülekandepuhvis (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0.037% SDS, 20% etanool). Ülekanne viidi läbi 30 minutit jooksul 10 V juures *Bio-Rad Instruments* ülekande-aparaadiga. Filter blokeeriti 1 tunni jooksul toatemperatuuril või üleöö 4° C juures 5% lõssipulbri lahuses (0.1% Tween20-PBS-s). Seejärel inkubeeriti filtrit primaarse antikehaga 1 tund 2% lõssipulbri lahuses (0,1% Tween20-PBS-s). Valkude detekteerimiseks kasutati järgnevaid küülikus toodetud polükloonaalseid antikehi: anti-nsP1 lahjendusega 1:10000, anti-nsP2 lahjendusega 1:6000, anti-nsP3 lahjendusega 1:10000, anti-nsP4 lahjendusega 1:4000 ning anti-EGFP lahjendusega 1:50000. Järgnevalt pesti filtrit 4x10 min pesulahusega (50mM TrisHCl pH 7.5, 30 mM NaCl, 0.1% Tween20) ja inkubeeriti 1 tund 2% lõssipulbri lahuses sekundaarse antikehaga, milleks oli peroksüdaasiga konjugeeritud küüliku IgG-vastane kitseantikeha (lahjendusega 1:10000). Seejärel pesti filtrit veelkord 4x10 min pesulahusega ning signaal detekteeriti *Amersham Pharmacia Biotech*'i ECL™ detektsiooni *Kit* ga.

Rakkude analüüs FACS-ga

SFV replikon-vektorite infektsioonilisuse uurimiseks analüüsiti vektorite vahendatud d1EGFP ekspressiooni 24 tundi peale transfektsiooni läbivoolutsütomeetriat kasutades. Preparaatide valmistamiseks eemaldati rakkudelt sööde, pesti rakud PBS-ga, trüpsiniseeriti, koguti kokku ning tsentrifugeeriti 1000 rpm-i 4° C 5 minutit (*Eppendorf Centrifuge 5415 D*). Sadenenud rakud suspendeeriti 600 µl PBS-s ning analüüsiti *Beckton-Dickinson* FACSCalibur masinat kasutades.

TÖÖ TULEMUSED

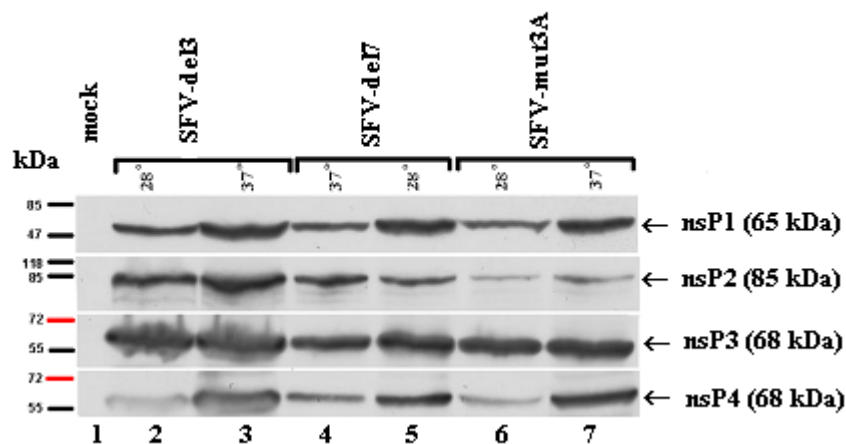
1. NsP1 palmitüleerimisjärjestuse mutatsioone sisaldavate infektsiooniliste viiruste konstrueerimine ning analüüsimine

NsP1 palmitüleerimisjärjestuses orginaalset CCC→AAA (siin ja edaspidi 6D mutatsioon, Ahola *et al.*, 2000) ja Inga Sarandi poolt konstrueeritud mut3A, del3 ja del7 mutatsioone sisaldavate SFV genoomide saamiseks konstrueeriti vastavaid mutatsioone sisaldavad infektsioonilised cDNA-d sisaldavad plasmiidid. Selliste icDNA kloonide transkriptid on rakkudesse viiduna võimelised tootma viiruseid, mis on suutelised paljunema, moodustama uusi virione ning nakatama ka kõrvalolevaid rakke.

Infektsioonilistelt kloonidelt sünteesiti *in vitro* SP6 RNA polümeraasiga RNA-d (ca 20 µg RNA-d iga konstrukti kohta) ning transfekteeriti nendega BHK-21 rakke. Arvestades teoreetilist võimalust, et nsP1 mutatsioone sisaldavad viirused võivad omada temperatuuritundlikut fenotüüpi inkubeeriti transfekteeritud rakke kahel erineval temperatuuril (37°C juures 24 h või 28° C juures 72 h). Rekombinantsete viiruste primaarstokid koguti peale vastavat inkubatsiooniaega, titreeriti ning paljundati järgnevalt BHK-21 rakkudes kõrge tiitrigastokide (sekundaarstokid) saamiseks. Rekombinantsete viirusteprimaarstokidega nakatatud rakkudest pärinevat materjali kasutati rekombinantse viiruse replikatsioonivalkude detekteerimiseks immunoblot meetodil (Joonis 7). Selle analüüsi tulemused näitasid, et kõik konstrueeritud rekombinantset viirused ekspresseerivad mittestruktuurset valke (nsP1-4) ja on seega elujõulised. Kõik neli viiruse mittestruktuurset valku ekspresseeruvad nii 28° C kui 37° C juures (joonis 7, rajad 2-7). Seega ei oma ükski mutant selget ts-fenotüüpi ning järgnevates katsetes kasutati nakatatud rakkude inkubeerimiseks reeglina 37° C temperatuuri.

RNA genoomseid viiruseid iseloomustab suur spontaansete mutatsioonide ja reversioonide sagedus. Selleks, et teha kindlaks, et mutantsete viiruste paljundamisel on toimunud esialgsete mutatsioonide (6D, mut3A, del3 või del7) reversioone puhastati kogutudsekundaarstokidest vastavate rekombinantsete viiruste genoomsed RNA-d. Palmitüleerimiskohta sisaldav regioon amplifitseeriti RT-PCR abil ja sekveneeriti. Saadud järjestuste analüüs näitas, et kõikidel juhtudel oli esialgne

mutatsioon säilunud ja seega ei kujuta saadud sekundaarstokid endast revertante või wt SFV kontaminatsiooni. Seega on meie poolt saadud tulemused vastavuses kirjanduses SFV-6D kohta avaldatud andmetega (Ahola *et al.*, 2000).



Joonis 7. SFV nsP-valkude ekspressiooni analüüs immunoblot meetodil. BHK-21 rakke nakatati kolme nsP1 palmitüleerimis-defektse viiruse – SFV-del3, SFV-del7, SFV-mut3A (rajad 2-7) - primaarstokidega, negatiivse kontrollina kasutati *mock*-nakatatud rakke (rada 1). Nakatatud rakke inkubeeriti kas 72 tundi 28° C juures või 24 tundi 37° C juures ja lüüsiiti 2xSDS puhvrts 0.1 M DTT juuresolekul. Valgud lahutati SDS-PAGE abil ja SFV ns-valgud detekteeriti immunoblotil. Nooltega on näidatud erinevate ns-valkude asukohad filtril.

Järgnevalt titreeriti nii rekominantsete viiruste ja edaspidises töös positiivse kontrollina kasutatud wt SFV4 sekundaarsed stokid *plaque* titreerimise meetodit kasutades. Titreerimise tulemused näitavad, et rekombinantsete viirustesekundaarstokide tiiter on võrreldav wt viiruse tiitriga (Tabel 5) olles sellest vaid 2-6 korda madalam (primaarstokkide tiitride vahed osutusid mõnevõrra suuremateks). See analüüs näitas ka, et palmitüleerimis-defektsed rekombinantsete SFV-d on võimelised BHK-21 rakkudel *plaque*-sid moodustama ja ei erine selle omaduse poolest oluliselt wt SFV-st. Sarnaselt ülal toodud andmetega on ka need tulemused vastavuses eelnevalt kirjanduses avaldatud andmetega (Ahola *et al.*, 2000).

Tabel 5. wt SFV ning 6D mutantsete viiruste primaarsete ja sekundaarsetestokide tiitrid

nsP1	Primaarstokk (pfu/ml)	Sekundaarstokk (pfu/ml)
wt	$1,8 \times 10^9$	$5,4 \times 10^9$
mut3A	2×10^8	$1,4 \times 10^9$
del3	3×10^8	9×10^8
del7	1×10^8	2×10^9

2. Rekombinantsete SFV genoomide esialgse infektsioonilisuse testimine

Ülal kirjeldatud katsetes saadud andmed kinnitasid veelkord vastuolu palmitüleerimisjärjestuses mutatsioone sisaldavate SFV replikonide ja neid samu mutatsioone sisaldavate SFV täispikkade genoomide käitumise vahel. Selle vastuolu üheks võimalikuks seletuseks on struktuurse regiooni olemasolu täispikkades genoomides ja selle puudumine SFV replikonides. Sellest tuleneb teoreetiline võimalus, et nsP1 palmitüleerimise mutatsiooni sisaldav SFV vajab efektiivseks replikatsiooniks kas struktuursete valkude või neid kodeeriva regiooni olemasolu. Selle hüpoteesi testimiseks kasutati *infectious center assay*-d (ICA), mis võimaldab otseselt välja selgitada wt ja muteeritud SFV genoomide suhtelist infektsioonilisust.

Läbiviidud katse andmed (Tabel 6) näitasid selgelt, et palmitüleerimis-defektsete viiruste *in vitro* sünteesitud RNA-d omavad *in vitro* sünteesitud wt SFV RNA-dega võrreldes väga madalat infektsioonilisust. Mutantide SFV-6D, SFV-mut3A ja SFV-del3 RNA-de infektsioonilisus osutus 20 000-50 000 korda madalamaks kui wt SFV RNA-l. Sellist suurusjärku erinevus lubab oletada, et oma olemuselt on sisseviidud mutatsioonid SFV-le letaalsed ja blokeerivad täielikult viiruse RNA replikatsiooni. Samuti on RNA-de infektsioonilisuste vahe (suurusjärg $\sim 10^{-4}$) sarnane *in vitro* transkriptsioonil kasutatud SP6 RNA polümeraasi poolt läbiviidaval RNA sünteesil tekkiva vigade arvuga. Need asjaolud viitavad üheselt võimalusele, et SFV-6D, SFV-mut3A ja SFV-del3 puhul saab rekombinantse viiruse infektsioon alguse väga väikesest arvust esmaselt nakatunud rakkudest. Iga sellises rakus asuv replitseeruv genoom sisaldab tõenäoliselt *in vitro* transkriptsiooni käigus juhuslikult tekkinud kompensatoorset mutatsiooni, mis taastab genoomi replikatsioonivõime. Mutant SFV-del7 osutus teistest mutantidest tunduvalt infektsioonilisemaks, kuid ka tema infektsioonilisus on selgelt madalam kui wt SFV RNA-del (umbes 40 kordne vahe). Sarnane on ka antud katses kontrollidena kasutatud SIN ja C/A SIN mutandi RNA-de infektsioonilisuse vahe (33 korda). 30-40 kordne

vahe RNA-de infektsioonilisuses ei ole seletatav kompensatoorsete mutatsioonide kogunemisega ja näitab selgelt, et erinevalt eelnevalt analüüsitud mutantidest on SFV-del7 ja C/A SIN genoomid võimelised ilma täiendavate mutatsioonideta replitseeruma.

Kokkuvõetuna näitavad antud katse tulemused, et struktuurse osa lisamine SFV replikonidele ei muuda palmitüleerimis-defektseid genoome elujõulisemaks. Selle katse andmete põhjal jagunevad konstrueeritud mutantsed genoomid kahte erinevasse gruppi: 1.) Mutatsioone 6D, mut3A ja del3 sisaldavad genoomid moodustavad replikatsioonivõimete viiruste grupi ja nende replikatsioon on absoluutselt sõltuv kompensatoorsete mutatsioonide tekkest. 2.) Mutatsioonid del7 ja ka C/A SIN kujutavad endast viiruse replikatsiooni mahasuruvaid, kuid mitte täielikult blokeerivaid mutatsioone. Selliseid mutatsioone sisaldavate genoomide replikatsioon ei ole absoluutselt sõltuv kompensatoorsete mutatsioonide tekkimisest. Samas ei võimalda selle katse tulemused välistada võimalike täiendavate mutatsioonide olemasolu ja nende potentsiaalset tähtsust. SFV-del7 ja C/A SIN võivad põhimõtteliselt rakukultuuris paljuneda kõrge tiitrini ehkki nende paljunemine võib toimuda mõnevõrra aeglasemalt kui wt viiruste puhul. Samuti on võimalik, et nende mutantide puhul leiab kompensatoorsete (replikatsiooni ja/või paljunemist soodustavate) mutatsioonide tekkimine aset just replikatsiooni käigus, mitte *in vitro* transkriptsioonil.

Tabel 6. Infectious center assay tulemused.

Viirus	pfu/μg RNA
wt SFV	6×10^5
6D	25
Mut3A	25
del3	12
del7	1.4×10^4
wt SIN	2.2×10^5
C/A SIN	6×10^3

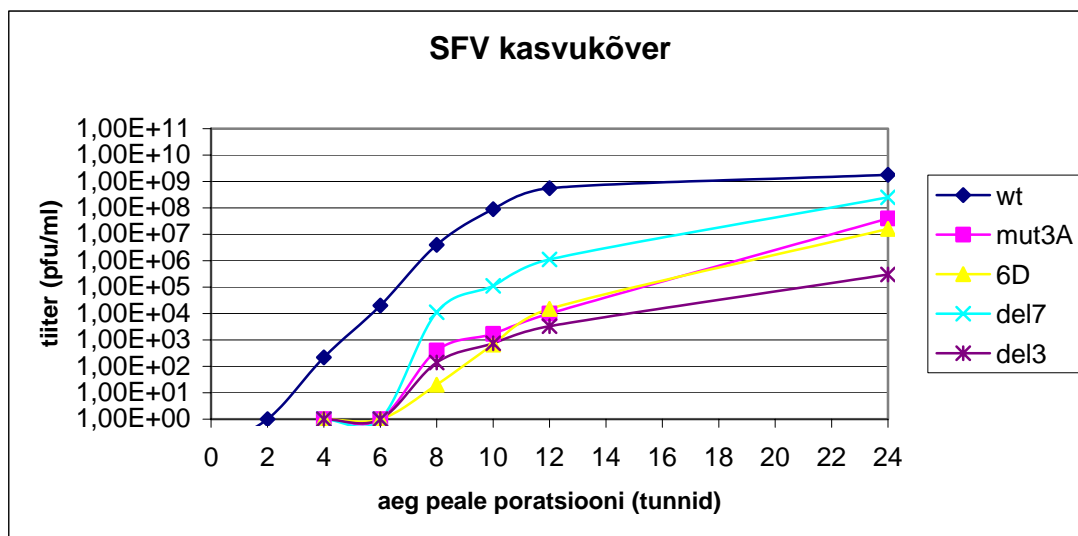
3. Metsikut tüüpi ja palmitüleerimis-defektsete SFV-de primaarsed ja sekundaarsed kasvukõverad

Ülal kirjeldatud ICA tulemused näitavad, et ehkki mutantsete viiruste esialgne infektsioonilisus erineb oluliselt wt viiruse omast moodustavad kõik analüüsitud viirused lõppkokkuvõtteks sarnase tiitriga sekundaarstokid (Tabel 5). Sellest järeldub, et viiruse paljunemisel rakukultuuris peavad aset leidma sündmused, mille tulemusena esialgsed kuni 50 000 kordsed vahed viiruse (RNA) infektsioonilisuses kaovad või vähenevad väga oluliselt. Nende sündmuste väljaselgitamiseks analüüsiti wt ja mutantsete viiruste kogunemist koekultuuris kasvukõverate määramise abil.

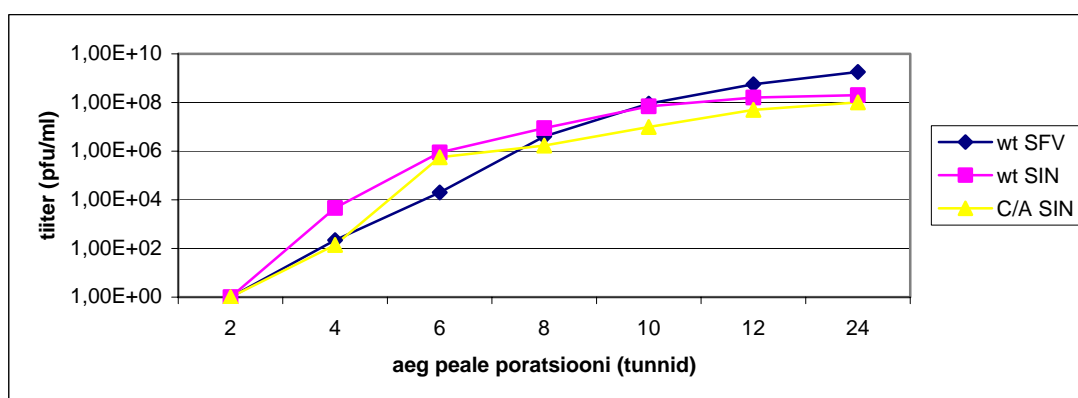
Kõigepealt analüüsiti viiruste kogunemist *in vitro* sünteesitud RNA-ga transfekteeritud BHK-21 rakukultuuris (primaarne kasvukõver) 2, 4, 6, 8, 10, 12 ja 24 tundi peale transfektsiooni. Saadud tulemused näitavad, et wt SFV tiitri kasv on järsk ja kiire samal ajal kui mutantsete viiruste tiitri kasv on aga märgatavalt aeglasem (Joonis 8). Ka selles katses jagunevad mutantsete viirused samadesse gruppidesse kui ICA tulemuste põhjal. Mutantsete SFV-6D, SFV-mut3A ja SFV-del3 kogunemine algab ca 4 tundi hiljem kui wt SFV-l ning ka 24 tunni möödudes jääb nende viiruste tiiter wt SFV-ga võrreldes oluliselt madalamaks. Kuigi ka SFV-del7 kogunemine algab ca 4 tundi hiljem kui wt SFV kogunemine, tõuseb tema tiiter hiljem kiiresti ja jõuab 24-ndaks tunniks wt SFV tiitri lähedale. Tähelepanuväärne on ka asjaolu, et SFV-del7 tiiter kasvab 6-nda ja 12-nda tunni vahel oluliselt kiiremini (ja on umbes kahe suurusjärgu võrra kõrgem) kui teistel analüüsitud mutantidel ja tema kasvukõver näitab klassikalise “logaritmilise faasi” olemasolu. Seega näitavad SFV mutantide primaarsed kasvukõverad sama tendentsi kui ICA tulemused.

Kuna ICA eksperimendis käitus SFV-del7 sarnaselt SIN C/A mutandiga, siis analüüsiti siinkohal ka SIN C/A ja SIN primaarseid kasvukõveraid. Saadud tulemused näitavad, et olulisi erinevusi mutantse ja metsikut tüüpi SIN viiruste kogunemises ei ole (Joonis 9, roosa ja kollane kõver). Seega ei sarnane SIN C/A selle omaduse poolest SFV-del7-le, kuna SIN C/A mutandil puudub viiruse kogunemise hiline mine (võrdle jooniseid 8 ja 9). Selle erinevuse üheks põhjuseks võib olla asjaolu, et SIN palmitüleerimisjärjestus koosneb vaid ühest Cys-jäägist ja palmitüleerimist blokeeriv mutatsioon toob seetõttu kaasa vaid ühe ah jäägi vahetamise nsP1 valgus. On loogiline oletada, et selline defekt mõjutab SIN nsP1 valgu replikatiivseid funktsioone

oluliselt vähesemal määral kui kolme Cys-jäägi muteerimine või deleteerimine mõjutab SFV nsP1 funktsioone.



Joonis 8. wt SFV ning palmitüleerimis-defektsete mutantide primaarsed kasvukõverad. Graafiku horisontaalteljel on ajapunktid (tunnid) ning vertikaalteljel viiruste tiitrid rakusöötmes (pfu/ml). wt SFV kasvukõver on joonistatud tumesinise-, mut3A roosa-, del7 helesinise-, del3 lilla- ning algne 6D kollase joonena



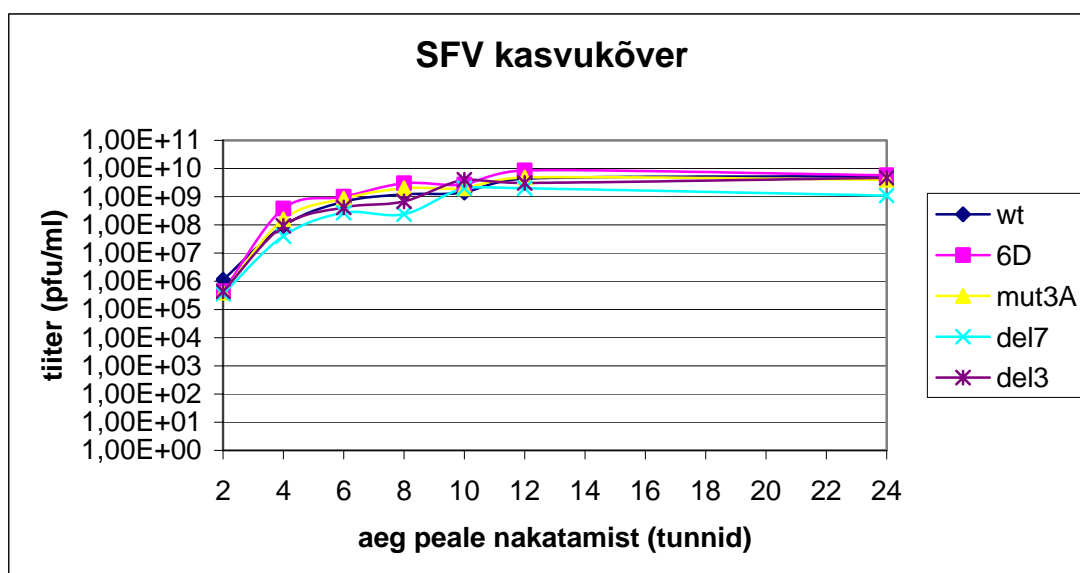
Joonis 9. wt SIN ja C/A SIN primaarsed kasvukõverad. Võrdluseks on graafikul toodud samadel tingimustel tehtud wt SFV kasvukõver.

Antud katses tuvastatud erinevused mutantsete viiruste primaarsetes kasvukõverates kajastavad tõenäoliselt erinevaid mehhanisme, mis osalevad rekombinantsete viiruste moodustumises ja kogunemises. Selleks, et uurida moodustunud rekombinantsete viiruste replikatsiooni- ja paljunemisvõimet nakatati BHK-21 rakke nii wt SFV kui mutantsete SFV-6D, SFV-mut3A, SFV-del3 ja SFV-del7-ga moi 10 tingimustes ja analüüsiti järgmise põlvkonna viiruste kogunemist

samadel tingimustel kui eelpool kirjeldatud katses. Sellise analüüsi tulemusena saadud sekundaarsed kasvukõverad näitavad, et peale nakatamist ühe ja sellesama moi tingimustes toimub mutantsete viiruste kogunemine sama kiiresti ning samal tasemel kui wt SFV-1 (Joonis 10). Kõikide selles katses analüüsitud viiruste kasvukõverad vastavad klassikalisele “ühe infektsioonitsükli” eksperimendile tüüpilisele kasvukõverale.

Võttes kokku kasvukõverate analüüsi tulemused võib järeldada et:

1. Kõik erinevused mutantsete viiruste ja wt SFV kogunemises avalduvad ainult primaarselt transfitseeritud rakkukultuuris (Joonis 8). Tõenäoliselt leiab just sellel etapil aset kompensatoorset(seid) mutatsioone sisaldvate SFV-6D, SFV-mut3A ja SFV-del3 genoomide mitme-astmeline paljunemine (toimub uute rakkude nakatamise kaudu), mida väljendab ka logaritmilise paljunemise faasi puudumine nende viiruste kogunemiskõveratel (Joonis 8).
2. Rekominantsete viirustesekundaarstokide infektsioonilisus ja paljunemiskiirus nakatunud rakkudes ei erine oluliselt wt SFV samadest näitajatest (Joonis 10).
3. SFV-del7 käitumine erineb nii wt SFV-st kui ka ülejäänud mutantidest. Seetõttu on võimalik, et sekundaarses infektsioonis täheldatud SFV-del7 suurem infektsioonilisus (võrrelduna primaarse infektsiooniga) ei tulene ainult kompensatoorsete mutatsioonide kogunemisest viiruse replikaasis, vaid võib olla seletatav ka muude faktoritega.



Joonis 10. wt SFV ja palmitüleerimis-defektsete mutantide sekundaarsed kasvukõverad. Graafiku horisontaalteljel on ajapunktid peale nakatamist (tunnid) ning vertikaalteljel viiruste tiitrid söötmes

(pfu/ml). wt SFV kasvukõver on joonistatud tumesinise-, mut3A kollase-, del7 helesinise-, del3 lilla- ning algne 6D roosa joonena.

4. Kompensatoorste mutatsioonide kandidaatide identifitseerimine rekombinantsete SFV-mut3A, SFV-del3 ja SFV-del7 genoomides

Loogiline on eeldada, et rekombinantsete SFV-de primaar- ja sekundaarstokid võivad endast kujutada erinevate genotüüpide segusid ja sisaldavad seega mitmeid erinevaid kompensatoorseid mutatsioone kandvaid viiruseid. Kuna ei olnud alust eeldada, et üks või teine genotüüp oleks mingis konkreetses viiruse stokis domineeriv oli enne mutatsioonide identifitseerimise läbiviimist vaja jagada viiruse stokid individuaalseteks viiruse kloonideks (isolaatideks). Selliseks viiruse kloonimiseks kasutati mutantsete viiruste primaarstokke, sest RNA viiruste korduv amplifitseerimine viib vältimatult täiendavate mutatsioonide kogunemisele, mis raskendab tõeliste kompensatoorsete mutatsioonide identifitseerimist. Viirustestokide kloonideks jagamine viidi läbi mutantsete viiruste *plaque* puhastamise teel. Puhastamise tulemusel eraldati iga mutantse viiruse (SFV-mut3A, SFV-del3, SFV-del7) kohta kuni 10 erineva fenotüübiga (st. erineva kuju ja suurusega) *plaque*. Kokku isoleeriti 24 *plaque*, millest elueeritud viiruseid amplifitseeriti üks kord koekultuuris paljundamise teel. Amplifitseeritud viirustest eraldati genoomne RNA ning selle järjestust analüüsiti RT-PCR ja sekveneerimisega. Kõikidest puhastatud viiruse kloonidest sekveneeriti ka esialgset mutatsiooni (mut3A, del3 ja del7) sisaldav regioon ja näidati, et isoleeritud mutantsete viiruste kloonid ei kujuta endast revertante või wt SFV kontaminatsiooni.

Järgnev analüüs rajanes oletusel, et kompensatoorsed mutatsioonid tekivad viiruse mittestruktuursesse regiooni. See oletus põhineb teadmisel, et struktuurse regiooni olemasolu ei mõjuta mutantsete genoomide/replikonide infektsioonilisust (vt. ülal) ja et replikatsioonilisi defekte kompenseerivad mutatsioonid paiknevad viirustel reeglina replikaasi valkudes. Peale selle arvestati ka asjaoluga, et replikaas-valgu defekti kompenseerimiseks on vajalik tõenäoliselt mutatsioonide olemasolu ekspresseeritud valgu tasandil ja seetõttu tuleb esmajoones otsida ainult selliseid mutatsioone millega kaasneb ah jäägi vahetumine kodeeritavas valgus. Nendest eeldustest lähtuvalt viidi läbi isoleeritud viiruste genoomide mittestruktuursete regioonide saadud järjestuste sekveneerimine ja analüüs. Esimesel etapil sekveneeriti

täielikult kahest *plaque*-st (tähistatud kui mut3A P1, del7 P1) eraldatud viiruste mittestruktuursed alad. Mõlemal juhul tuvastati aminohappe jääki muutvate mutatsioonide olemasolu nsP1 kodeerivas alas (vt. Tabel 4). *Plaque*-st del7 P1 pärineval viirusel leiti üks selline mutatsioon, samal ajal kui *plaque*-st del3-1 pärineval viirusel (vt. Tabel 4) leiti kaks sellist mutatsiooni. Need tulemused lubasid eeldada, et potentsiaalsed kompensatoorsed mutatsioonid on tekkinud eeskätt nsP1 valku kodeerivas järjestuses. Seetõttu sekveneeriti ülejäänud 22-l isoleeritud viirusel ainult nsP1 valku kodeeriv region. Selle tulemusena leiti veel neli aminohapet muutvat mutatsiooni (mut3A-2, mut3A-3, del3-1, del3-2; vt. Tabel 4). Kuuest identifitseeritud mutatsioonist kaks (del7-1 ning del3-2) esinesid kahel erineval kloonil, ülejäänud neli aga ainult ühel kloonil. Kaks rekombinantset viirust sisaldasid kombinatsiooni kahest mutatsioonist. Lisaks ülal mainitud SFV del3-1-le sisaldas ka *plaque*-st del3-2 pärinev viirus lisaks nsP1 ah jääki muutvale punktmutatsioonile ka kolme nukleotiidilist minideletsiooni, mis samuti muutis nsP1 valgu aminohappelise järjestust (vt. Tabel 4). Kokkuvõetuna näitavad sekveneerimise ja järjestuste analüüsi tulemused, et:

- 1.) Ükski leitud aminohappelistest muutustest ei toonud kaasa tsüsteiini jääkide moodustumist ja seega ei ole ühelgi juhul tegemist uue palmitüleerimiskoha moodustumisega. Selle põhjal võib järeldada, et palmitüleerimis-defektsete viiruste paljunemise käigus ei kompenseerita mitte palmitüleerimis-funktsiooni, vaid mingit muud viiruse replikatsiooniks olulist mehhanismi.
- 2.) Mutatsioonid nsP1 regioonis leiti vaid 8 kloonil 24-st (33% isoleeritud kloonide koguarvust). See näitab, et ülejäänud kloonid sisaldavad tõenäoliselt mutatsioone nsP2-nsP4 valke kodeerivas alas või siis genoomi mitte-kodeerivates regioonides. Kui see on tõesti nii, siis järeldub sellest, et nsP1 defekti on võimalik kompenseerida ka teiste replikatsioonivalkude muutmise teel. Üheks võimaluseks seda seletada on nsP1 valgu interaktsioonid teiste ns-valkudega, mistõttu muutuseid nsP1 struktuuris saab kompenseerida ka sobivate muutuste tekitamisega tema interaktsiooni-partnerite struktuurides.

5. Topelt-mutantsete SFV replikonide konstrueerimine ja nende omaduste iseloomustamine

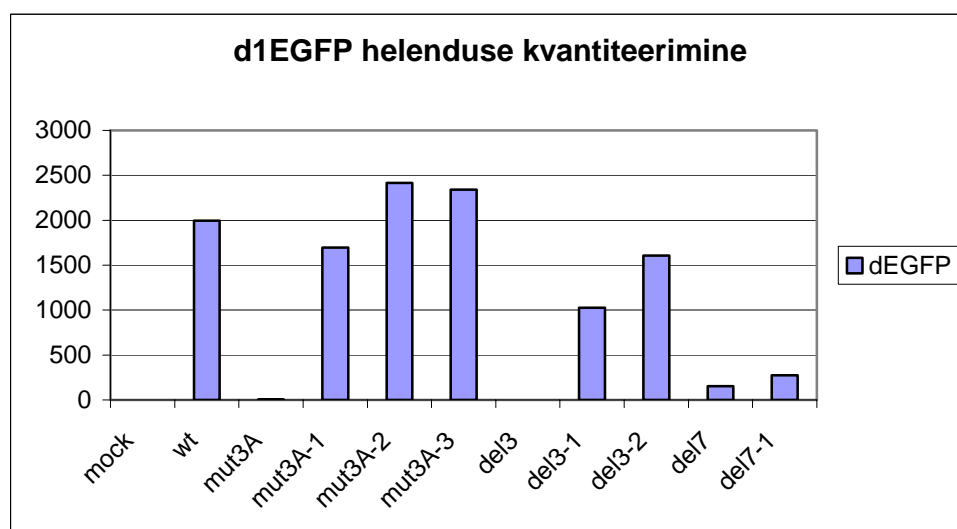
Identifitseeritud mutatsioonide funktsionaalse tähtsuse analüüs viidi läbi nende kloneerimise teel vastavat esialgset mutatsiooni (mut3A, del3, del7) sisaldavatesse replikon-vektoritesse. Selline lähenemine valiti seetõttu, et identifitseeriti palmitüleerimis-defektsete mutantide replikatsiooni defekt just replikon-vektor süsteemi kasutades. *Plaque*-dest del3-1 ja del-2 leitud kaksik-mutatsioonid viidi SFV-del3-d1EGFP replikon-vektoritesse sisse koos.

Konstrueeritud topelt-mutantsete replikonide infektsioonilisust analüüsiti mõõtes FACS-il vastavate vektorite vahendatud d1EGFP ekspressiooni. Signaalid, mis olid tugevamad kui 99,5% kontrollrakkude (*mock* poreeritud rakud) autofluorestsentsi signaal, loeti pärinevaks d1EGFP positiivsetest rakkudest. Metsikut tüüpi SFV- d1EGFP ning mutantsete SFV1-mut3A-d1EGFP, SFV1-del3-d1EGFP ja SFV1-del7-d1EGFP RNA-dega poreeritud rake kasutati selles eksperimendis kontrollidena. Antud katse tulemused (Tabel 7) näitavad, et kõikidel identifitseeritud mutatsioonidel on algseid palmitüleerimist blokeerivaid mutatsioone sisaldavatele replikon-vektoritele kompensatoorne mõju. Enamikel juhtudel suurendas kompensatoorse mutatsiooni lisamine infektsioonilisust (mõõdetuna d1EGFP positiivsete rakkude arvu järgi) ligi kaks suurusjärku (Tabel 7). Taas on erandiks topelt-mutant SFV-del7-1-d1EGFP, mille infektsioonilisus ületab esialgse mutandi oma vähem kui kaks korda ja on mitmeid kordi väiksem kui teistel topelt mutantidel. Oluline on siinkohal mainida, et esialgne mutant SFV-del7-d1EGFP on vastupidi, võrrelduna SFV-mut3A-d1EGFP ja SFV-del3-d1EGFP-ga palju infektsioonilisem (vt. Tabel 6). Need andmed toetavad kaudselt ülal tehtud oletust, et SFV-del7 defekti kompenseerimise mehhanism erineb teiste mutatsioonide puhul toimivast mehhanismist, milleks on kompensatoorsete mutatsioonide tekkimine replikaasi kodeerivas regioonis.

Tabel 7. d1EGFP positiivste rakkude hulk protsentides wt SFV, ainult esialgset mutatsiooni sisaldavate ning topelt-mutantsete d1EGFP-d ekspresseerivate replikonidega transfekteeritud rakkude hulgas.

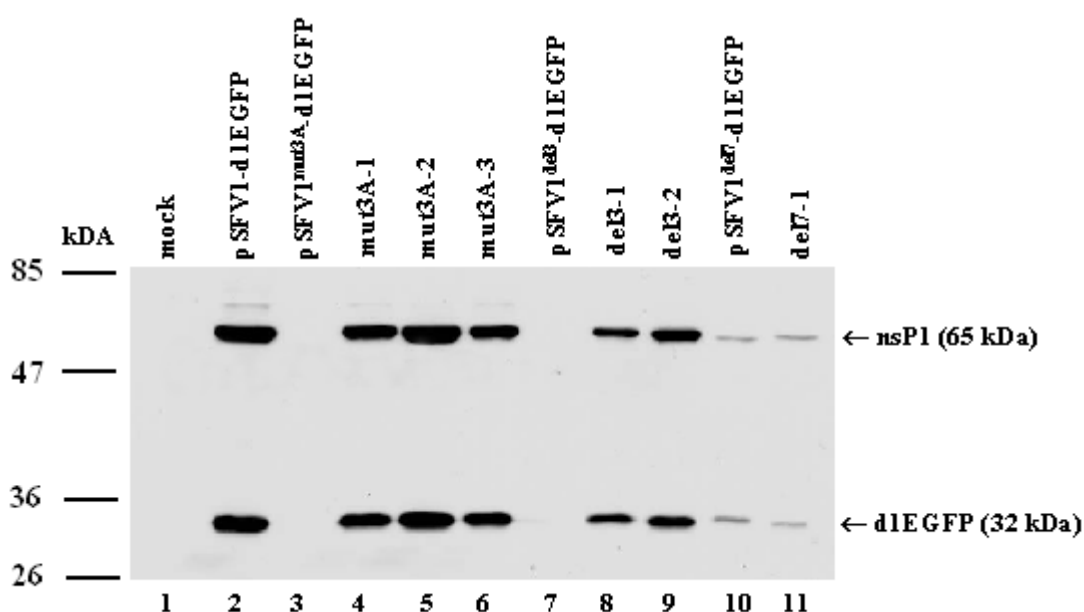
nsP1	d1EGFP positiivsete rakkude arv %
wt	72.2%
mut3A	0,42%
mut3A-1	43,87%
mut3A-2	64,96%
mut3A-3	60,71%
del3	1,22%
del3-1	33,40%
del3-2	58,61%
del7	6,56%
del7-1	10,57%

Konstrueeritud vektorite vahendatud d1EGFP ekspressiooni kvantifitseerimise tulemused korreleeruvad hästi d1EGFP positiivsete rakkude hulga (Tabel 7, Joonis 11). Peamiseks erinevuseks on see, et kui d1EGFP positiivsete rakkude hulga poolest (st. RNA infektsioonilisuse poolest) ei ületa ükski topelt-mutantne replikon metsikut tüüpi SFV-d1EGFP replikoni, siis d1EGFP ekspressiooni taseme poolest (st. vektori vahendatud valguekspressiooni taseme poolest) ületavad topelt-mutandid SFV-mut3A-2-d1EGFP ja SFV-mut3A-3-d1EGFP mõnevõrra ka wt SFV-d1EGFP vektorit (Joonis 11). Need andmed näitavad, et topelt-mutantsed replikon-vektorid võivad osutada kasulikuks instrumendiks võõrgeenide ekspresseerimisel kõrgel tasemel.



Joonis 11. Topelt-mutantide vahendatud d1EGFP ekspressiooni analüüs FACS-I abil. Graafiku vertikaalteljel toodud arvud näitavad d1EGFP ekspressiooni transfekteeritud rakukultuuris (suhtelise fluoretsentsi ühikutes).

FACS analüüsil saadud andmeid kontrolliti ka uurides replikonide vahendatud SFV ns-valkude ja d1EGFP markergeeni ekspressiooni *Western blot* analüüsil (Joonis 12). Saadud andmed kinnitavad veelkord, et esialgsed mut3A ja del3 replikonid ei ole infektsioonilised (Joonis 12, rajad 3 ja 7), kuid nende alusel konstrueeritud topelt-mutatsioone sisaldavad replikonid on taastanud oma replikatsioonivõime (Joonis 12, rajad 4, 5, 6, 8, 9). Nii SFV-del7-d1EGFP kui ka tema alusel konstrueeritud topelt-mutantne replikon replitseeruvad wt SFV-st ja ülejäänud mutantidest nõrgemini (Joonis 12, rajad 10 ja 11). See tulemus on kooskõlas ülejäänud SFV-del7 mutandi uurimisel saadud tulemustega.



Joonis 12. SFV topelt-mutantide poolt ekspresseeritava nsP1 ja d1EGFP ekspressiooni analüüs *Western blot* meetodil. BHK-21 rakkudesse transfekeeriti elektroporatsioon meetodil wt, erinevaid palmitüleerimist blokeerivaid mutatsioone ja konstrueeritud topelt-mutatsioone sisaldavate ja d1EGFP-d ekspresseerivate replikonide RNA transkripte. Ekspressiooni detekteerimiseks kasutati anti-nsP1 antikeha lahjendusel 1:10000 ning anti-EGFP antikeha lahjendusel 1:50000-le. Rajal 2 on näidatud positiivse kontrollina kasutatud wt pSFV1-d1EGFP-le vastav ekspressioonitase. Ülemine nool näitab nsP1 valgu ning alumine nool d1EGFP asukohta filtril.

Seega näitasid antud katsed, et kõik kolm SFV-mut3A ja mõlemad SFV-del3 analüüsil leitud mutatsioonid omavad selget kompensatoorset efekti ja et neid saab kasutada uudsete SFV vektorite väljatöötamisel. SFV-del7 puhul identifitseeritud mutatsiooni kompensatoorne efekt osutus seevastu väikeseks ja seetõttu ei saa seda mutatsiooni pidada tõeliseks kompensatoorseks mutatsiooniks.

ARUTELU

Alfaviirused kujutavad endast laialt levinud positiivse polaarsusega RNA genoomseid viirusi. Alfaviiruste lai peremeeste ring ja efektiivne geeniekspressioon erinevates rakutüüpides on viinud nende viiruste genoomidel ja replikonidel põhinevate geeniekspressiooni, -vaksineerimise ja -teraapia vektorite väljatöötamisele (Liljeström *and* Garoff, 1991). Sarnaselt kõikide teiste viiruslike vektorsüsteemidega kajastavad ka alfaviirustel põhineva vektorsüsteemi omadused süsteemi aluseks oleva viiruse molekulaarbioloogilisi omadusi. Nendest omadustest tulenevalt on iga konkreetne vektor kasutatav vaid teatud ülesannete täitmiseks ja mittedobiv muude ülesannete tarvis. Seetõttu on loomulik, et ka alfaviirus-vektorid ei ole universaalsed ja nendega töötamisel esineb mitmeid probleeme. Paljudel juhtudel on suurimaks probleemiks alfaviirus-vektoritele omane kõrge tsütotoksilisus, mis väljendub peremeesraku makromolekulide (DNA, RNA ja valgud) sünteesi kiires seiskamises ja peremeesraku apoptoosi indutseerimises. Need omadused mõjutavad alfaviiruste kasutamist ekspresioonivektoritena rekombinantste valkude tootmisel (lühendavad selliste valkude ekspresseerimise aega) ja geenivaktsiinidena. Viimasel juhul on näidatud, et alfaviiruste kõrge tsütotoksilisus põhjustab immuunvastuse tekkimist eelkõige rist-praimeerimise vahendusel (Huckriede *et al.*, 2004). Peale selle iseloomustab alfaviiruseid morfoloogiliste muutuste esilekutsumine peremeesrakkudes. Kõige selgemini väljendunud muudatuseks on raku aktiivtsütoskeleti lagundamine ja raku plasmamembraanil filopoodia-sarnaste struktuuride tekkimise indutseerimine. Need nähtused on tõsiseks takistuseks alfaviirus-vektorite kasutamisel töövahenditena molekulaar- ja rakubioloogilistes uuringutes.

Nagu ülal märgitud tulenevad alfaviirus-vektorite omadused viiruse enese bioloogilistest omadustest. Ehkki käesoleval ajal ei ole alfaviiruste molekulaarbioloogia kohta käiv andmekogu kaugeltki täielik on mitmed mehhanismid, mis osalevad alfaviirus (ja -vektor) indutseeritud tsütopatoloogias, juba identifitseeritud. Suurem osa selliseid mehhanisme on seotud alfaviiruste mittestruktuursete valkude funktsioonidega ja viiruse replikaasi komplekside moodustamise ning funktsioneerimisega. Teavat rolli viiruse indutseeritud tsütopatoloogias omavad ka alfaviiruse struktuursed valgud, kuid kuna enamus alfaviirus-vektoreid kujutab endast replikon vektoried (milles struktuursed valgud

puuduvad), siis on selliste efektide tähtsus alfaviirustel põhinevate vektorite konstrueerimisel ja kasutamisel oluliselt väiksem.

Andmed selle kohta kuidas ja miks alfaviiruste kodeeritud mittestruktuursed valgud põhjustavad tsütotoksilisi efekte on praegu veel mittetäielikud ja suurel määral ka vastuolulised. Peamiseks patogeensuse determinandiks on peetud mittestruktuurset valku nsP2, kuid viimased uurimused on näidanud, et ainult nsP2 ekspressioon rakkudes ei too kaasa mingeid arvestatavaid tsütotoksilisi efekte (Hääl *et al.*, käsikiri). Samas uurimuses näidati, et ka teiste SFV mittestruktuursete valkude individuaalne ekspresseerimine ei põhjusta tsütotoksilisi efekte. Sellest saab järeldada, et alfaviiruste indutseeritud tsütotoksilised efektid realiseeruvad tervikliku replikatsioonikompleksi moodustamise ning selle funktsioneerimise tasemel ja et alfaviiruse indutseeritud tsütotoksilisuse vähendamiseks on vaja modifitseerida replikatsioonikomplekside moodustamist j nende funktsioneerimist.

Ainsaks alfaviiruse valguks, mille individuaalse ekspressiooniga kaasnevad rakus olulised muutused on nsP1. Selle valgu eksperssioon on piisav ja vajalik selleks, et indutseerida aktiin-tsütoskeleti lagundamine ja filopoodiate moodustumine raku pinnal (Laakonen *et al.*, 1996; Ahola *et al.*, 2002). Ehkki selle protsessiga ei kaasne teadaolevalt raku metabolismi blokeerimist ega elulemuse vähenemist, on nsP1 poolt indutseeritavad efektid rakkudele väga ilmsed (Hääl *et al.*, käsikiri). Kuna tegemist on muutustega rakus, mis takistavad alfaviirus-vektorite kasutamist töövahenditena mitmetes rakubioloogilistes uurimustes, on selle efekti uurimine ja tema võimalik kõrvaldamine oluliseks sammuks vektorite võimaliku kasutusala laiendamisel.

SFV nsP1 valgu indutseeritud efekte rakus saab oluliselt vähendada muteerides selles valgus asuvat palmitüleerimise järjestust CCC (418-420) (Ahola *et al.*, 2000). Selle järjestuse muteerimine ei blokeeri viiruse replikatsiooni, kuid sellega kaasneb SFV patogeensuse vähenemine, mis on oluline SFV kasutamisel geenivaktsiini kandidadina. Paraku näitasid mitmed läbiviidud eelkatsed, et CCC järjestuse muteerimine AAA järjestuseks blokeerib vastavat mutatsiooni kandvate replikonvektorite replikatsioonivõimet (Merits, avaldamata andmed). Ka muud sellesse regiooni sisse viidud mutatsioonid nagu kolme tsüsteiini jäägi deleteerimine (del3) või nende deleteerimine koos neile eelneva nelja ah jäägiga (del7) omavad põhimõtteliselt sarnast efekti (Sarand, avaldamata andmed). Seetõttu kujunes antud töö lähtepunktiks selle vastuolu (replitseeruv mutantne viirus *versus* replikatsioonivõimetu replikonvektor) molekulaarsete põhjuste leidmine.

Töö alguses konstrueeriti nsP1 palmitüleerimiskoha mutatsioone sisaldavad SFV infektsioonilised cDNA kloonid - SFV-mut3A, SFV-del3 ja SFV-del7. Neid kasutati koos SFV-6D klooniga (Ahola *et al.*, 2000) ja kahe Sindbis viiruse klooniga käesoleva uurimise läbiviimiseks. Samuti formuleeriti kaks hüpoteesi nsP1 palmitüleerimis-defektsete viiruste ja replikonide erineva infektsioonilisuse taseme põhjuste kohta. Esimene hüpotees oletas, et võibolla vajavad palmitüleerimis-defektsed viirused oma replikatsiooniks ka viiruse struktuurset regiooni, mis harilikult ei ole alfaviiruste replikatsioonil vajalik. Ehkki sellist võimalust võis juba ette pidada suhteliselt vähetõenäoliseks (ei meie labori ega ka kirjanduses avaldatud andmed ei vihja sellisele võimalusele) kontrolliti seda hüpoteesi *infectious center assay* (ICA) meetodil. Saadud tulemused (Tabel 6) näitasid selgelt, et struktuurse osa lisamine ei taasta palmitüleerimis-defektsete SFV mutantide replikatsioonivõimet. Samuti näitasid sarnased katsed Sindbis viiruse ja tema mutandiga, et SIN puhul ei takista palmitüleerimiskoha (milleks on vaid üks tsüsteiini jääk) muteerimine viiruse replikatsiooni. Kui neid tulemusi võib pidada oodatuteks, siis SFV mutantide omavaheline võrdlemine tõi välja ka ootamatu tulemuse. Nimelt osutus mutant SFV-del7 märkimisväärselt infektsioonilisemaks kui ülejäänud SFV mutandid. Selle nähtuse põhjus jääb vähemalt esialgu arusamatuks – kui Sindbis viiruse palmitüleerimis-defektse mutandi elujõulisust saab seletada sellega, et mutatsioon piirdub vaid ühe aminohappe jäägi vahetusega, siis SFV-ga näib olukord olema vastupidine – kõige ulatuslikumat mutatsiooni (seitsme ah jäägi deletsiooni) sisaldav mutant osutus kõige elujõulisemaks. Teine oluline järeldus ICA tulemuste kohta seisneb selles, et SFV mutandid jagunevad selgesti kahte gruppi: peaaegu replikatsioonivõimetus SFV-6D, SFV-mut3A ja SFV-del3 ning replikatsioonivõimeline (ehkki vähenenud infektsioonilisusega) SFV-del7. Sellest tulemusest võis eeldada, et ka järgnevates katsetes peavad nimetatud mutandid käituma erinevalt. Veelgi enam, need tulemused lubavad oletada, et molekulaarsed mehhanismid, millele põhineb nende viiruste replikatiivse potentsiaali suurenemine (viirus *versus* replikon) võivad olla fundamentaalselt erinevad.

Põhinedes ICA eksperimendi tulemustele formuleeriti mutantide SFV-6D, SFV-mut3A ja SFV-del3 replikatsioonivõime taastumise kohta järgnev hüpotees. See oletab, et nende mutantsete viiruste paljunemine põhineb kompensatorsete mutatsioonide, mis muudavad mutantsed viirused taas elujõuliseks, tekkimisel. Kuna SFV-6D, SFV-mut3A ja SFV-del3 genoomid ei ole replikatsioonivõimelised, siis

peavad sellised kompensatoorsed mutatsioonid tekkima *in vitro* RNA sünteesi käigus. Selleks ülesandeks kasutatud SP6 RNA polümeraas „eksib“ keskmiselt korra 10 000 nukleotiidi jäägi kohta ja seetõttu kujutab juba transkriptsiooniks kasutatav *in vitro* sünteesitud RNA kõikvõimalike mutantide segu. Selle oletuse kasuks rääkis ka asjaolu, et SFV-6D, SFV-mut3A ja SFV-del3 genoomide infektsioonilisus oli 20 000-50 000 korda väiksem wt SFV genoomi infektsioonilisusest, st. vahe oli samas suurusjärgus kui SP6 RNA polümeraasi tehtav vigade arv. Samuti võis eeldada, et peamiselt on tegemist ühe nukleotiidiliste muutustega viiruse genoomi mittestruktuurses alas, sest replikatsiooniks on vajalik ainult see osa SFV genoomist ning kompenseerida tuleb just viiruse replikatsiooni. Lisaks võis eeldada, et kompensatoorse mutatsiooni näol peab tegemist olema aminohappe jääke muutvate mutatsioonidega, sest ka esialgne mutatsioon avaldub nsP1 valgu aminohappelise järjestuse muutusena.

Siiski on selle hüpoteesiga seotud ka teatud probleemid. Esiteks, hüpotees ei sobi seletamiseks SFV-del7 infektsioonilisuse tõusu. Selle viiruse RNA infektsioonilisus oli vaid 40 korda väiksem wt SFV RNA omast ja seda ei saa seletada *in vitro* transkriptsioonil tekkivate mutatsioonidega (st. SFV-del7 on infektsiooniline ka ilma igasuguste täiendavate mutatsioonideta). Teiseks, *in vitro* RNA süntees ei ole ainus protsess, mille käigus toimub kompensatoorsete mutatsioonide teke. Sarnased mutatsioonid võivad tekkida ja kindlasti tekivadki ka viiruse RNA replikatsioonil *in vivo*. Peale selle kaasneb *in vivo* replikatsiooniga ka selektsioon paremini replitseeruvate genotüüpide kasuks. Seega on võimalik, et *in vitro* sünteesitud ja juhuslikke mutatsioone sisaldavaid SFV-6D, SFV-mut3A ja SFV-del3 RNA-sid „töödeldakse“ täiendavalt *in vivo* replikatsiooni käigus; samuti on väga võimalik, et just *in vivo* toimiv mutageenesis ja selektsioon on vastutav SFV-del7 viiruse infektsioonilise potentsiaali suurenemise eest. Ehkki *in vivo* toimuvaid sündmusi ei ole tehniliselt võimalik otse jälgida, annab nendest sündmustest ettekujutuse viiruse kasvukõverate analüüsimine. Sellest lähtudes konstrueeriti kõikidele analüüsitud viirustele primaarsed ja sekundaarsed kasvukõverad.

Primaarne kasvukõver kajastab viiruse kogunemist peale transfektsiooni (Joonis 8). Klassikalist viiruse kasvukõverat nn. ühe replikatsioonitsükli eksperimendis iseloomustab nn. logaritmiline faas (sünonüüm – valmimise faas), mille jooksul toimub viiruse hulga eksponentsiaalne suurenemine. Metsikut tüüpi SFV puhul oli see faas hästi väljendunud, viiruse tiitri kiire kasv kestis umbes 12 tunnini, kust edasi tiitri

kasv aeglustus järsult. SFV-6D, SFV-mut3A ja SFV-del3 viiruste kogunemist väljandavad kasvukõverad on seevastu „lamedad“ ja nendes puudub logaritmiline faas. Ka on nende mutantide kogunemine ajaliselt umbes 4 tundi hilisem kui wt SFV puhul ja viiruse tiitrid jäävad metsikut tüüpi viiruse omast oluliselt madalamaks (see vahe väheneb märgatavalt 24-ndaks tunniks)(Joonis 8). Need iseärasused näitavad selgelt, et mutantsete viiruste kogunemine ei jälgi ühe replikatsioonitsükli skeemi. Selle asemel transfitseerub tõenäoliselt esmaselt replikatsioonivõimelise (st. kompensatoorset mutatsiooni sisaldava) mutantse RNA-ga väga väike arv rakke (ICA tulemuste põhjal võib oletada, et see arv on ca 500 rakku katse kohta). Nendest rakkudest väljuvad 4-6 tunni möödudes esimesed uue põlvkonna virionid, mis nakatavad naaberrakke (kuna iga SFV-ga nakatanud rakk annab ca 300 uut infektsioonilist partiklit, siis eeldatavasti on sellel staadiumi tulemusena nakatunud kuni 150 000 rakku). Nakatunud rakkudest väljub uus põlvkond (see on suure tõenäosusega esimene punkt, kus õnnestub viiruse tiitrit määrata, enne seda on tiiter määramiseks liiga madal), mis nakatab nüüd juba kõik tassil olevad rakud. Kuna viiruse valmimise, vabanemise ja uute rakkude nakatamise protsessid on pidevad (ei esimese ega ka teise põlvkonna rekombinantsete viiruste väljumine ei toimu sünkroonselt, vaid kestab tunde; sama kehtib ka uute rakkude nakatamise kohta), siis on tulemuseks katses nähtud „lamedad“ kasvukõverad. Väga huvitav on mutantse SFV-del7 kasvukõver. Lähtudes ICA tulemustest (Tabel 6) peab selle mutandiga transfektsioonijärgselt nakatunud rakkude arv olema suurusjärgus 250 000-500 000 rakku. Sellest järeldub esiteks, et SFV-del7 viiruse infektsioon saab kulgeda maksimaalselt kahe etapiliselt (esialgselt nakatunud rakkudest väljunud viirus nakatab kõik järelejäänud rakud) ja teiseks, et erinevalt ülejäänud mutantidest on esmaselt nakatunud rakkudest väljuva viiruse kogus piisav viiruse tiitri määramiseks. Mõlemad need järeldused leiavad selget tõestust SFV-del7 kasvukõvera kujus. Selgelt on näha logaritmiline faas, mis vastab viiruse väljumisele esialgselt nakatatud rakkudest ning millele järgneb viiruse tiitri aeglane ja pidev tõus, mis vastab ka viiruse väljumisele sekundaarselt nakatatud rakkudest. Küll aga ei ole võimalik vastata, miks esineb ka SFV-del7 kasvukõveras sama nelja-tunnine mahajäämus wt SFV kogunemisest kui ka teistel mutantidel. Üheks võimalikuks seletuseks on see, et esmaselt nakatanud rakkudes replitseerub SFV-del7 aeglasemalt kui wt SFV ja sellest tuleneb ka mahajäämus partiklite valmimisel.

Sekundaarne kasvukõver kajastab viiruste kogunemist peale rakkude nakatamist kõrge moi tingimustes (Joonis 10). Erinevalt primaarsetest kasvukõveratest on sekundaarsed kõverad nii wt SFV-l kui ka kõikidel analüüsitud mutantidel praktiliselt identsed ja jälgivad klassikalist „ühe infektsioonitsükli“ kõverat, samuti on väga sarnased moodustuvate viiruste tiitrid. Sellest järeldub, et viirustestokides, mida kasutati rakkude nakatamiseks, on mutantsete viiruste ja wt SFV replikatiivsed potentsiaalid praktiliselt võrdsustunud. Mutantide SFV-6D, SFV-mut3A ja SFV-del3 puhul tähendab see seda, et on toimunud juhuslike *in vitro* tingimustes tekkinud mutatsioonide seleksioon ja kinnistumine viiruse populatsioonis (võimalik, et lisaks on toimunud ka täiendavate adaptiivsete mutatsioonide tekkimine *in vivo* replikatsiooni ja seleksiooni tulemusena). Raskem on oletada, millised muutused on vastutavad SFV-del7 suurenenud replikatiivse potentsiaali eest. Võib eeldada, et sellel juhul ei ole tegemist *in vitro* sünteesi käigus moodustunud mutatsioonidega, vaid *in vivo* tingimustes tekkinud ja selekteerunud mutatsioonidega. Need mutatsioonid võivad lokaliseeruda nii mittestruktuurses alas (võimendavad replikatsiooni) kui ka struktuurses regioonis (suurendades näiteks rekombinantse viiruse saagist). Samuti ei saa välistada võimalust, et SFV-del7 replikatiivse potentsiaali suurendamise eest vastutavad RNA struktuuri muutvad kompensatoorsed mutatsioonid. Võimalik on isegi see, et tegemist ei ole üldse kompensatoorsete mutatsioonidega, vaid erinevused tulenevad RNA rakkudesse sisenemise viisist (elektroporatsioon *versus* klassikaline sisenemine nakatamise teel). Huvitav on siinkohal märkida, et SFV-del7 stoki sekundaarne kasvukõver näitab selle viiruse mõnevõrra väiksemat kogunemist võrreldes wt viiruse ja teiste mutantidestokidega. Siiski ei võimalda hetkel olemasolevad andmed järeldada, et selle nähtuse põhjuseks on SFV-del7 madalam replikatsioonitase. Selle oletuse kinnitamiseks või ümberlükkamiseks on vajalikud täiendavad eksperimendid (viiruste RNA ja valkude sünteesi otsene uurimine metaboolse märgistamise meetodil).

Ei ICA eksperimendi tulemused ega kasvukõverate analüüs ei suuda anda informatsiooni, kas replikatiivse defekti kompenseerimine toimub alati ühe kindla mutatsiooni tekkimise teel või eksisteerib palju erinevaid kompensatoorseid mutatsioone, millest ükski ei ole prevaleeruv. Kuna SIN viiruse kompensatoorsete mutatsioonide uurimine (Frolov *and* Fayzulin, 2004) on näidanud viimase oletuse paikapidavust, siis lähtuti sellest võimalusest ka antud töös. Kompensatoorsete mutatsioonide tuvastamisele eelnes mutantsete viiruste (SFV-mut3A, SFV-del3 ja

SFV-del7) *plaque* puhastamine viiruse primaarstokidest. Viiruste *plaque*-de kogumisel arvestati erinevustega nende fenotüübis (st. kujus ja suurus), sest oletati, et erineva fenotüübiga *plaque*-d on tekitatud tõenäoliselt erinevaid kompensatoorseid mutatsioone sisaldavate viiruste poolt. Kokku puhastati töö käigus 24 erinevat viiruse stokki, millest kahe viiruse mittestruktuursed alad sekveneeriti täielikult ja ülejäänud viiruste mitestruktuursed alad osaliselt (genoomi esimesed 1900 nukleotiidi jääki, mis katavad kogu nsP1 valku kodeerivat ala). Sekveneerimise tulemused näitasid, et mõlemad täielikult sekveneeritud viirused sisaldavad täiendavaid mutatsioone vaid nsP1 regioonis, samal ajal kui osaliselt sekveneeritud viiruste hulgas leiti mutatsioone nsP1 regioonis vaid kuuel viirusel. Kokku tuvastati sekveneerimise tulemusena kuus mutatsiooni (nendest kaks topelt-mutatsiooni), mis muudavad nsP1 valgus järjestust. Kokku leiti selliseid mutatsioone 8-1 *plaque* puhastatud viirusel. Sekveneerimise tulemuste analüüs võimaldab teha mitmeid olulisi järeldusi.

Esiteks, mitte ükski *plaque*-puhastatud stokk ei sisaldanud esialgse mutatsiooni (mut3A, del3 või del7) reversioone või pseudoreversioone ning ükski identifitseeritud potentsiaalne kompensatoorne mutatsioon ei tekita nsP1 valgus uusi tsüsteiini jääke. Sellest järeldub, et palmitüleerimise funktsioon ei ole SFV replikatsiooniks otseselt vajalik ja et sekundaarsed mutatsioonid kompenseerivad mingit muud viiruse replikatsiooniga seotud defekti. On vähetõenäoline, et tegemist võiks olla nsP1 MT ja/või GT reaktsiooni aktiveerimisega, sest mõlemad need funktsioonid on olemas ka mutantsetel valkudel. Seega võib suure tõenäosusega väita, et palmitüleerimise suhtes negatiivsete genoomide replikatsiooniline defekt väljendub kas mingis muus nsP1 funktsioonis (nt. võimes initsieerida negatiivsete ahelate sünteesi) ja/või võimes interakteeruda SFV teiste replikaasi valkudega või peremehe valkudega. Informatsiooni nende võimaluste kohta võiks anda leitud mutatsioonide projekteerimine nsP1 ruumilisele struktuurile koos analüüsiga, kuidas sellised muudatused mõjutavad viiruse valkude vahelisi ja valk/RNA interaktsioone. Paraku ei ole selline analüüs aga võimalik, sest siiani ei ole suudetud välja selgitada SFV nsP1 (ja ka muude ns-valkude) ruumilist struktuuri.

Teiseks, palmitüleerimis-defektsete viiruste replikatsioonivõime taastamiseks eksisteerib arvukalt erinevaid võimalusi (mitte üks kindel mutatsioon). Need võimalused on tõenäoliselt ligikaudu võrdväärsed, sest ükski nendest ei osutunud (vähemalt primaarstokis) domineerivaks: ainult kaks mutatsiooni leiti kahes korduses, kõik ülejäänud vaid ühes konkreetses viiruse isolaadis.

Kolmandaks, mutatsioonid nsP1 valgus tuvastati vaid 8 isoleeritud viirusel 24-st (st. 33% juhtudest). Võib eeldada, et ülejäänud SFV-mut3A ja SFV-del3 isolaadid sisaldavad kompensatoorseid mutatsioone muudes regioonides, eeldatavasti nsP2-nsP4 kodeerivas alas või genoomi mittekodeerivates regioonides. SFV-del7 puhul on võimalik ka kompensatoorsete mutatsioonide paiknemine struktuurses regioonis. Kui see eeldus vastab tõele (selle väljaselgitamiseks on vaja sekveneerida 16 viirus isolaadi vastavad regioonid) siis järeldub sellest, et nsP1 defekti on võimalik kompenseerida mutatsioonidega muudes replikaasi valkudes. See oleks tugevaks argumendiks hüpoteesi, et palmitüleerimis-defektsete viiruste replikatsioonivõimetus tuleneb viiruse valkude vaheliste interaktsioonide blokeerimisest, kasuks. See hüpotees tundub tõenäoline, sest SIN replikaasi mutantide uurimine on näidanud, et teatud mutatsioone nsP4 valgus on võimalik kompenseerida mutatsioonidega nsP1 valgus (Shirako *et al.*, 2000) ja seetõttu kuulub vastav uurimus edasise töö plaani.

Sekundaarsete mutatsioonide identifitseerimine ei ole iseenesest veel tõestuseks, et need mutatsioonid omavad ka funktsionaalset tähtsust. Nii RNA süntees *in vitro* kui ka RNA replikatsioon *in vivo* toimuvad ilma “vigade parandus” funktsioonita ensüümide abil ja seetõttu sisaldavad RNA-viiruste genoomid alati juhuslikke mutatsioone. Tõestamiseks identifitseeritud mutatsioonide funktsionaalset tähtsust viidi need mutatsioonid sisse vastavat esialgset mutatsiooni sisaldavasse replikon-vektorisse, millesse oli eelnevalt kloneeritud d1EGFP markergeen. Saadud topelt-mutantsete replikonide replikatsioonivõimet ja võimet ekspresseerida markervalgu uuriti replikon-RNA-dega transfekteeritud rakkudes FACS analüüsi ja *western blotting*-ut kasutades. Nende analüüside tulemused (Tabel 7, Joonis 11 ja 12) näitasid üheselt, et kõik viis mutatsiooni, mis identifitseeriti SFV-mut3A ja SFV-del3 viirustest, omasid selget kompensatoorset efekti. Kõik viis topelt-mutantset replikoni omasid wt SFV replikoniga sarnast infektsioonilisust ning ekspresseerisid d1EGFP-d wt SFV replikoniga võrreldaval tasemel. Esialgsetes katsetes nähtud mõningased erinevused nende konstruktide infektsioonilisuses ja d1EGFP ekspressiooni tasemetes ei ole suured ja nende erinevuste statistilise usaldusväärsuse väljaselgitamiseks on vaja vastavaid katseid korrata. Kuues mutatsioon, mis identifitseeriti ühes SFV-del7 isolaadis, omas teiste mutatsioonidega võrreldes oluliselt väiksemat kompensatoorset efekti, suurendades vastava replikoni infektsioonilisust vähem kui kaks korda. Seega ei saa see mutatsioon olla ainsaks SFV-del7 stoki infektsioonilisuse suurenemise põhjuseks. Oluline on märkida, et nimetatud mutatsioon pärineb SFV-del7 isolaadist,

mille mittestruktuurne regioon täilikult sekveneeriti. Sellest järeldub, et SFV-del7 infektsioonilisuse suurendamisel osalevad lisaks mittestruktuures alas tekkinud *sense*-mutatsioonidele veel ka muud mehhanismid, milleks võivad olla mutatsioonid struktuurses regioonis, sünonüümsed mutatsioonid või protsessid, mis on seotud viiruse RNA sisenemisega rakku ja replikatsiooni initsieerimisega.

Käesoleva uurimistöö käigus selgitati välja põhjused, miks SFV palmitüleerimis-defektsed replikonid omavad erinevalt täispikkadest genoomidest väga madalat infektsioonilisust. Nagu näitavad selles töös läbi viidud katsed on seda probleemi võimalik lahendada identifitseeritud kompensatoorsete mutatsioonide sisseviimisega vastavatesse vektoritesse. Läbi viidud uurimus on lisanud olulist teavet SFV molekulaarbioloogia kohta ja on oma eesmärgid saavutanud. Samas näitab tehtud töö kätte ka edasiste uurimuste suunad.

Esiteks on vajalik uurida käesolevas töös identifitseeritud kompensatoorsete mutatsioonide toimet mitte ainult replikonide, vaid ka täispikkade viiruse genoomide kontekstis. Selleks on vaja nimetatud mutatsioonid sisse viia SFV-mut3A, SFV-del3 ja SFV-del7 infektsioonilistesse kloonidesse, viia läbi ICA analüüs ning mutantide kasvukõverate analüüs. Kõigi eelduste kohaselt kinnitavad nende eksperimentide tulemused siin tehtud järelduste paikapidavust. Järgnevalt on vaja uurida metaboolset märgistamist kasutades SFV-del7 ja SFV-del7-1 replikatsiooni ja võrrelda saadud tulemusi wt SFV ja teiste mutantide analüüsil saadud tulemustega. Selle katse tulemused peaksid tõestama või ümber lükkama tähelepaneku, et SFV-del7 võib replitseeruda madalamal tasemel kui seda teevad teised analüüsitud viirused ja nende mutandid. Peale selle on vaja lahendada ka leitud kahe kaksik-mutandiga (del3-1 ja del3-2) seotud küsimused ja teha kindlaks kumb (või mõlemad) identifitseeritud mutatsioonidest omab kompensatoorset efekti. Seda saab uurida kloneerides need mutatsioonid eraldi replikonidesse ja viies läbi analüüsi käesolevas töös kirjeldatud meetode kasutades. Väga huvitav küsimuse on seotud ka identifitseeritud kompensatoorsete mutatsioonide toimega wt-viiruse kontekstis (st. ilma mut3A, del3 või del7 mutatsioonideta) ja heteroloogilises kontekstis (nt. SFV-del3-st identifitseeritud mutatsioon SFV-del7 genoomis). See töö nõuab mitmete täiendavate konstruktide valmistamist ja analüüsi, kuid võib potentsiaalselt anda väga väärtuslikke tulemusi. Võib eeldada, et SFV-mut3A ja SFV-del3 isolaatidest eraldatud mutatsioonid omavad kompensatoorset efekti mõlema esialgse mutatsiooni suhtes. Selleks oletuseks annab alust asjaolu, et nimetatud esialgsete mutantide

kompanseerimine toimub sarnast mehhanismi kasutades. Samuti on tõenäoline, et wt SFV kontekstis suruvad nimetatud kompensatoorsed mutatsioonid viiruse replikatsiooni maha. See eeldus tuleneb oletusest, et kompensatoorsete mutatsioonide tõenäoliseks toimemehhanismiks on esialgsete mutatsioonide poolt rikutud viiruse replikaasi valkude vaheliste interaktsioonide taastamine. Äärmiselt intrigeeriv on aga küsimus, kuidas mõjutavad SFV-mut3A-st ja SFV-del3-st identifitseeritud mutatsioonid SFV-del7 replikatsiooni. Teoreetiliselt on siin võimalik nii kompensatoorne kui ka täiendavalt inhibeeriv toime ning praegused andmed ei võimalda eelistada kumbagi nendest oletustest.

Teiseks ettenähtavaks uurimissuunaks on *plaque*-puhastatud isolaatide täiendav sekveneerimine ja väljaspool nsP1 regiooni asuvate kompensatoorsete mutatsioonide identifitseerimine ja analüüs. See uurimine võimaldab saada olulist informatsiooni SFV replikatsioonivalgude omavahelistest koostoimetest ning võib olla vajalik uudsete SFV replikon-vektorite konstrueerimisel.

Kolmandaks kavandatavaks uurimissuunaks on identifitseeritud mutatsioonide alusel uute omadustega SFV replikon-vektorite ja replitseeruvate vektorite konstrueerimine ning analüüs. Selleks on kavas detailselt iseloomustada topelt-mutantsete vektorite infektsioonilisust ja nende vahendatud võõrgeenide ekspressiooni iseärasusi. Erilist tähelepanu on kavas osutada uudsete vektorite poolt peremeesrakkudele avaldatavate mõjude, nagu raku morfoloogia ja metabolismi mõjutamine ning apoptoosi indutseerimine, uurimisele. Kaugemas perspektiivis on kavas uurida selliste replikonide kasutamise võimalusi ka geenivaktsiinide kandjatena või muudes geeni- ja biotehnoloogilistes lähenemistes.

KOKKUVÕTE

Semliki Forest viirus (SFV) kuulub perekonda *Alphavirus* (sugukond *Togaviridea*). SFV nakatab paljude imetajate erinevaid rakutüüpe ja replitseerub nende rakkude tsütoplasmas moodustuvatel membraansetel struktuuridel. SFV infektsioonil toimub efektiivne viiruse geenide ekspressioon ja seetõttu on välja arendatud suur hulk tema genoomi mittestruktuursel osal põhinevaid replikonvektoreid. Nii nende vektorite kui ka SFV replikatsiooniga imetajate rakkudes kaasnevad struktuursed ümberkorraldused, raku makromolekulide sünteesi mahasurumine ja nakatanud rakkude apoptootiline surm.

SFV replikatsiooni viib läbi viiruse kodeeritud mittestruktuursetest (nsP1-4) valkudest koosnev replikaaskompleks. Kõik SFV nsP-d on multifunktsionaalsed valgud ja nende funktsioone on hästi uuritud. SFV replikaaskompleksi kuuluvad ka peremeesrakust pärinevad membraanid, millele kinnitub nsP1 valgu vahendusel kogu replikatsioonikompleks. On näidatud, et selles seondumises osaleb kaks nsP1 struktuurset elementi – amfipaatileine α -heeliks nsP1 keskosas ja kolmest tsüsteiini jäägist koosnev palmitüleerimisjärjestus nsP1 C-terminaalses regioonis (ah jäägid 418-420). Esimene nendest elementidest on SFV replikatsiooniks absoluutselt vajalik samal ajal kui palmitüleerimis-defektsed SFV mutandid on elujõulised. Kuna need mutandid ei põhjusta rakkudes struktuurseid ümberkorraldusi ja on peremeesorganismile apatogeensed siis kujutavad nad endast potentsiaalset materjali SFV-vektorite konstrueerimiseks.

Käeseolevas töös kirjeldatud uurimus kinnitas esialgseid avaldamata andmeid, et palmitüleerimis-defektsed SFV replikonid SFV-mut3A, SFV-del3 ja SFV-del7 omavad erinevalt samu mutatsioone sisaldavatest täispikkadest genoomides madalat infektsioonilisust ja ei ole seega kasutatavad SFV replikon-vektorites. Uurimuse käigus näidati, et see erinevus ei tulene struktuurse regiooni puudumisest mutantsetes replikonides, vaid on seotud täispikkade mutantsete genoomide sünteesil ja selektsioonil rakukultuuris toimuvate sündmustega. Näidati, et palmitüleerimist takistavad mutatsioonid jagunevad kahte erinevasse klassi. Mutatsioonid mut3A ja del3 on SFV-le letaalsed, kuid selliseid mutatsioone sisaldavate genoomide replikatsioonivõimet võivad taastada kompensatoorsed mutatsioonid SFV replikaasi regioonis. Töö käigus identifitseeriti kokku viis erinevat kompensatoorset mutatsiooni

nsP1 regioonis, näidati nende funktsionaalset tähtsust ja võimalust nende kasutamiseks uudsete SFV replikon-vektorite konstrueerimisel. Nende mutatsioonide uurimisel selgus, et kompenseeritavaks funktsiooniks ei ole palmitüleerimine, vaid mingid muud veel identifitseerimata replikatiivsed funktsioonid. Samuti näitavad kaudsed andmed, et palmitüleerimis-defekti kompenseerivad mutatsioonid võivad paikneda ka väljaspoole nsP1 valku kodeerivat regioone. Mutatsioon del7 ei blokeeri erinevalt eelnevatest mutatsioonidest SFV replikatsiooni, vaid omab replikatsiooni võimet mahasuruvat efekti. Vastavat mutatsiooni sisaldava viiruse paljundamisel leiab aset selle defekti kompenseerimine, kuid selle mehhanismid erinevad mutatsioonide mut3A ja del3 kompenseerimisel toimivatest mehhanismidest.

SUMMARY

Semliki Forest virus (SFV) belongs to genus *Alphavirus* family *Togaviridae*. SFV infects different tissues of different mammalian hosts and replicates in membranous structures in cytoplasm of infected cells. SFV replication leads to efficient expression of viral genes and this, together with broad host range of the virus, has led to development of SFV based replicon vectors. Similar to SFV the replication of these vectors in mammalian cells leads to changes in cellular structures, inhibition of host DNA, RNA and protein synthesis and finally to the apoptotic cell deaths.

SFV replication is carried out by replicase complex consisting from four SFV non-structural proteins (nsP1-4). All these are well studied multifunctional proteins. The SFV replicase complex is bound to cellular membranes and this interaction is mediated by nsP1. It has been demonstrated that two structural elements of nsP1 participate in the membrane attachment. These are amphipatic α -helix located in the middle of the protein and palmitoylation sequence containing three cystein residues located at C-terminal region of nsP1 (aa 418-420). The first of these elements is absolutely required for SFV replication in contrast to the second one which has been shown to be dispensable. SFV genomes with mutations in palmitoylation sequence have been shown to be apathogenic to animal host and to not induce morphological changeses in infected cells. Therefore these mutants represent significant potential value for advanced SFV replicon vector development.

The preliminary results indicated that in contrast to full genomes the SFV replicons, carrying non-palmitoylation mutations designated as mut3A, del3 and del7, possess very low infectivity. These results were confirmed in this study and the phenomenon was studied in detail. It was found that the presence or absence of structural region does not have detectable role for infectivity of palmitoylation-deficient SFV constructs. Instead the random mutagenesis taking place during *in vitro* and *in vivo* RNA synthesis followed by selection in infected cells was found to play the major role. It was revealed that the non-palmitoylation mutations can be divided into two categories. Mutations mut3A and del3 were found to be lethal for SFV thus the replication of SFV genomes with these mutations totally depend on appearance of compensatory mutations within non-structural region. In this study five different

compensatory mutations were identified within the sequence encoding for nsP1 and their functional significance as well as potential for usage for vector construction was demonstrated by reverse genetic experiments. It was also revealed that the function compensated by these mutations was not palmitoylation as such but another function in SFV replication which remains so far unidentified. Indirect evidences that this function can also be compensated by mutations outside of nsP1 region were also obtained. In contrast to previous group the mutation del7 was found not to cause total block of SFV replication. SFV-del7 replicons were able to replicate albeit with significantly reduced efficiency. This defect was also compensated during propagation of corresponding viruses in cell culture but the mechanisms involved in this process may differ from those involved in compensation of replication of the SFV-mut3A and SFV-del3.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Ahola, T. and L. Kaariainen.** 1995. Reaction in alphavirus mRNA capping formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7 methyl GMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 507-11.
- Ahola, T., P. Kujala, M. Tuittila, T. Blom, P. Laakkonen, A. Hinkkanen, and P. Auvinen.** 2000. Effects of palmitoylation of replicase protein nsP1 on alphavirus infection. *J Virol* **74**:6725-33.
- Ahola, T., P. Laakkonen, H. Vihinen, and L. Kaariainen.** 1997. Critical residues of Semliki Forest virus RNA capping enzyme involved in methyltransferase and guanylyltransferase-like activities. *J Virol* **71**:392-7.
- Ahola, T., A. Lampio, P. Auvinen, and L. Kaariainen.** 1999. Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *Embo J* **18**:3164-72.
- Atkins, G. J., B. J. Sheahan, and P. Liljestrom.** 1999. The molecular pathogenesis of Semliki Forest virus: a model virus made useful? *J Gen Virol* **80**:2287-97.
- Barton, D. J., S. G. Sawicki, and D. L. Sawicki.** 1988. Demonstration in vitro of temperature-sensitive elongation of RNA in Sindbis virus mutant ts6. *J Virol* **62**:3597-602.
- Barton, D. J., S. G. Sawicki, and D. L. Sawicki.** 1991. Solubilization and immunoprecipitation of alphavirus replication complexes. *J Virol* **65**:1496-506.
- de Groot, R. J., T. Rumenapf, R. J. Kuhn, E. G. Strauss, and J. H. Strauss.** 1991. Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:8967-71.
- Ding, M. X., and M. J. Schlesinger.** 1989. Evidence that Sindbis virus NSP2 is an

autoprotease which processes the virus nonstructural polyprotein. *Virology* **171**: 280-4.

Fazakerley, J. K. 2002. Pathogenesis of Semliki Forest virus encephalitis. *J Neurovirol* 8 Suppl **2**:66-74.

Frolov, I., T. A. Hoffman, B. M. Pragai, S. A. Dryga, H. V. Huang, S. Schlesinger, and C. M. Rice. 1996. Alphavirus-based expression vectors: strategies and applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11371-7.

Frolova, E., I. Frolov, and S. Schlesinger. 1997. Packaging signals in alphaviruses. *J Virol* **71**:248-58.

Frolov, I., and R. Fayzulin. 2004. Changes of the Secondary Structure of the 5' End of the Sindbis Virus Genome Inhibit Virus Growth in Mosquito Cells and Lead to Accumulation of Adaptive Mutations. *J Virol* **78**: 4953-64.

Froshauer, S., J. Kartenbeck, and A. Helenius. 1988. Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes. *J Cell Biol* **107**:2075-86.

Garoff, H., D. Huylebroeck, A. Robinson, U. Tillman, and P. Liljestrom. 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**:867-76.

Gonda, D. K., A. Bachmair, I. Wunning, J. W. Tobias, W. S. Lane, and A. Varshavsky. 1989. Universality and structure of the N-end rule. *J Biol Chem* **264**:16700-12.

Gorbalenya, A. E., E. V. Koonin, and M. M. Lai. 1991. Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alph- and coronaviruses. *FEBS Lett* **288**:201-5.

Hahn, Y. S., E. G. Strauss, and J. H. Strauss. 1989. Mapping of RNA- temperature sensitive mutants of Sindbis virus: assignment of complementation groups A, B, and G to nonstructural proteins. *J Virol* **63**:3142-50.

Hardy, W. R., and J. H. Strauss. 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**:4653-64.

Helenius, A. 1995. Alphavirus and flavivirus glycoproteins: structures and functions. *Cell* **81**:651-3.

Helenius, A., and M. Aebi. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**:2364-9.

Helenius, A., J. Kartenbeck, K. Simons, and E. Fries. 1980. On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *J Cell Biol* **84**:404-20.

Huckriede, A., L. Bungener, M. Holtrop, J. de Vries, B. Waarts, T. Daemen and J. Wilschut. 2004. Induction of cytotoxic T lymphocyte activity by immunization with recombinant Semliki Forest virus: indications for cross-priming. *Vaccine* **22**: 1104-1113.

Hääl, I. 2004. Semliki Forest viiruse mittestruktuurseid valke ekspresseerivate rakuliinide konstrueerimine ja iseloomustamine. Magistritöö.

Kaariainen, L., and T. Ahola. 2002. Functions of alphavirus nonstructural proteins in RNA replication. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **71**:187-222.

Kaariainen, L., and H. Soderlund. 1978. Structure and replication of alpha-viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **82**:15-69.

Kielian, M. 1995. Membrane fusion and the alphavirus life cycle. *Adv Virus Res* **45**:113-51.

Koonin, E. V., and V. V. Dolja. 1993. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**:375-430.

Kujala, P., A. Ikaheimonen, N. Ehsani, H. Vihinen, P. Auvinen, and L. Kaariainen. 2001. Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. *J Virol* **75**:387-84.

Laakkonen, P., T. Ahola, and L. Kaariainen. 1996. The effects of palmitoylation on membrane association of Semliki forest virus RNA capping enzyme. *J Biol Chem* **271**:28567-71.

Laakkonen, P., P. Auvinen, P. Kujala, and L. Kaariainen. 1998. Alphavirus replicase protein NSP1 induces filopodia and rearrangement of actin filaments. *J Virol* **72**:10265-9.

Laakkonen, P., M. Hyvonen, J. Peranen, and L. Kaariainen. 1994. Expression of Semliki Forest virus nsP1-specific methyltransferase in insect cells and in *Escherichia coli*. *J Virol* **68**:7418-25.

Lampio, A., T. Ahola, E. Darzynkiewicz, J. Stepinski, M. Jankowska-Anyszka, and L. Kaariainen. 1999. Guanosine nucleotide analogs as inhibitors of alphavirus mRNA capping enzyme. *Antiviral Res* **42**:35-46.

Lampio, A., I. Kilpelainen, S. Pesonen, K. Karhi, P. Auvinen, P. Somerharju, and L. Kaariainen. 2000. Membrane binding mechanism of an RNA virus-capping enzyme. *J Biol Chem* **275**:37853-9.

Lemm, J. A., and C. M. Rice. 1993. Assembly of functional Sindbis virus RNA replication complexes: requirement for coexpression of P123 and P34. *J Virol* **67**:1905-15.

Li, G. P., M. W. La Starza, W. R. Hardy, J. H. Strauss, and C. M. Rice. 1990. Phosphorylation of Sindbis virus nsP3 in vivo and in vitro. *Virology* **179**:416-27.

- Liljestrom, P., and H. Garoff.** 1991. Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *J Virol* **65**:147-54.
- Loewy, A., J. Smyth, C. H. von Bonsdorff, P. Liljestrom, and M. J. Schlesinger.** 1995. The 6-kilodalton membrane protein of Semliki Forest virus is involved in the budding process. *J Virol* **69**:469-75.
- Lu, Y. E., and M. Kielian.** 2000. Semliki forest virus budding: assay, mechanisms, and cholesterol requirement. *J Virol* **74**:7708-19.
- Melancon, P., and H. Garoff.** 1987. Processing of the Semliki Forest virus structural polyprotein: role of the capsid protease. *J Virol* **61**:1301-9.
- Merits, A., L. Vasiljeva, T. Ahola, L. Kaariainen, and P. Auvinen.** 2001. Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein by nsP2 protease. *J Gen Virol* **82**:765-73.
- Peranen, J., and L. Kaariainen.** 1991. Biogenesis of type I cytopathic vacuoles in Semliki Forest virus-infected BHK cells. *J Virol* **65**:1623-7.
- Peranen, J., M. Rikkinen, P. Liljestrom, and L. Kaariainen.** 1990. Nuclear localization of Semliki Forest virus-specific nonstructural protein nsP2. *J Virol* **64**:1888-96.
- Peranen, J., K. Takkinen, N. Kalkkinen, and L. Kaariainen.** 1988. Semliki Forest virus-specific non-structural protein nsP3 is a phosphoprotein. *J Gen Virol* **69**:2165-78.
- Poch, O., I. Sauvaget, M. Delarue, and N. Tordo.** 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J* **8**:3867-74.

- Rikkonen, M., J. Peranen, and L. Kaariainen.** 1992. Nuclear and nucleolar targeting signals of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Virology* **189**:462-73.
- Rikkonen, M., J. Peranen, and L. Kaariainen.** 1994. Nuclear targeting of Semliki Forest virus nsP2. *Arch Virol Suppl* **9**:369-77.
- Sanz, M. A., L. Perez, and L. Carrasco.** 1994. Semliki Forest virus 6K protein modifies membrane permeability after inducible expression in *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* **269**:12106-10.
- Sariola, M., J. Saraste, and E. Kuismanen.** 1995. Communication of post-Golgi elements with early endocytic pathway: regulation of endoproteolytic cleavage of Semliki Forest virus p62 precursor. *J Cell Sci* **108**:2465-75.
- Sawicki, D. L., and S. G. Sawicki.** 1980. Short-lived minus-strand polymerase for Semliki Forest virus. *J Virol* **34**:108-18.
- Shirako, Y., and J. H. Strauss.** 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**:1874-85.
- Shirako, Y., E. G. Strauss and J. H. Strauss.** 2000. Suppressor mutations that allow Sindbis virus RNA polymerase to function with nonaromatic amino acids at the N-terminus: Evidence for interaction between nsP1 and nsP4 in minus-strand RNA synthesis. *Virology* **276**:148-60.
- Singh, I., and A. Helenius.** 1992. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *J Virol* **66**:7049-58.
- Soderlund, H., and I. Ulmanen.** 1977. Transient association of Semliki Forest virus capsid protein with ribosomes. *J Virol* **24**:907-9.

- Strauss, J. H., and E. G. Strauss.** 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* **58**:491-562.
- Suomalainen, M., P. Liljestrom, and H. Garoff.** 1992. Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of alphaviruses. *J Virol* **66**:4737-47.
- Suopanki, J., D. L. Sawicki, S. G. Sawicki, and L. Kaariainen.** 1998. Regulation of alphavirus 26S mRNA transcription by replicase component nsP2. *J Gen Virol* **79**:309-319.
- Takkinen, K., J. Peranen, and L. Kaariainen.** 1991. Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein. *J Gen Virol* **72**:1627-33.
- Wang, Y. F., S. G. Sawicki, and D. L. Sawicki.** 1991. Sindbis virus nsP1 functions in negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **65**:985-8.
- Vasiljeva, L., A. Merits, P. Auvinen, and L. Kaariainen.** 2000. Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *J Biol Chem* **275**:17281-7.
- Wengler, G.** 1975. Comparative studies on polyribosomal, nonpolyribosome-associated and viral 42 S RNA from BHK 21 cells infected with Semliki Forest virus. *Virology* **65**:601-5.
- Wengler, G.** 1975. Protein synthesis in BHK-21 cells infected with semliki forest virus. *J Virol* **17**:10-9.
- Wengler, G.** 1975. Studies on the synthesis of viral RNA-polymerase-template complexes in BHK 21 cells infected with Semliki Forest virus. *Virology* **66**:322-6.
- Wengler, G., and H. S. Gross.** 1979. Replicative form of Semliki Forest virus RNA contains an unpaired guanosine. *Nature* **282**:754-6.
- Vihinen, H., T. Ahola, M. Tuittila, A. Merits, and L. Kaariainen.** 2001.

Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3. *J Biol Chem* **276**:5745-52.

Vihinen, H., and J. Saarinen. 2000. Phosphorylation site analysis of Semliki forest virus nonstructural protein 3. *J Biol Chem* **275**:27775-83.

Lisa 1. Käesolevas töös kasutatud algplasmiidide kaardid. Joonisel on toodud vektorite pSFV1, Helper1, pSFV1-d1EGFP ja pSFV1 Δ HindIII kaardid.

