

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

**Ida hobuste entsefaliidi viiruse replikaasi kompleksi rekonstrueerimine  
funktsionaalsetest komponentidest**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Agneta Miilimäe

Juhendajad: MSc Laura Sandra Lello

Prof. Andres Merits

TARTU 2021

## **INFOLEHT**

### **Ida hobuste entsefaliidi viiruse replikaasi kompleksi rekonstrueerimine funktsionaalsetest komponentidest**

Alfaviirused on positiivse polaarsusega RNA genoomiga putukvektorite teel levivate viiruste (arboviiruste) perekond. Mitmed alfaviiruste perekonda kuuluvad viirused on inimestele patogeensed, põhjustades nii kergemaid sümptomeid kui ka tõsisemaid tervise probleeme, näiteks ajupõletikku või pikaajalist artiiti. Alfaviiruste jaoks puuduvad hetkel efektiivsed viirusvastased vahendid, mistõttu on äärmiselt oluline uurida alfaviiruste replikatsiooni täpseid mehhanisme. Alfaviiruste RNA genoomi replikatsioon toimub membraanseoselistes replikatsioonikompleksides, mis moodustuvad viiruse kodeeritud liitvalgu töötlemisel vabanenud funktsionaalsetest replikaasi valkudest. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli Ida hobuste entsefaliidi viiruse replikatsioonikompleksi rekonstrueerimine kahest funktsionaalsest komponendist ning uurida nii homoloogiliste kui ka heteroloogiliste replikaaside moodustumist nendest funktsionaalsetest komponentidest. Töö läbiviimiseks kasutati efektiivset ning uudset kahekomponentset *trans*-replikatsiooni süsteemi, mis hõlbustab ning muudab ohutumaks ohtlike patogeenide, nagu seda on Ida hobuste entsefaliidi viirus, uurimist.

Märksõnad: alfaviirus, *trans*-replikatsiooni süsteem, EEEV

Lõputöö CERCS kood on B230.

### **Reconstructing the replicase of Eastern equine encephalitis virus from functional components**

Alphaviruses are a genus of insect transmitted viruses (arboviruses) that have a positive-sense RNA genome. Many viruses of the alphavirus genus are pathogenic to humans, causing both mild symptoms and severe health issues like long-time arthritis or encephalitis. There are no effective antivirals available for alphaviruses, so it is crucial to study specific mechanisms of alphavirus replication. Alphavirus replication takes place in membrane-bound replication complexes formed by functional replicase proteins released during the processing of virus-encoded polyprotein. The aim of this bachelor's thesis was to reconstruct the replication complex of Eastern equine encephalitis virus from two functional components and to study the formation of both homologous and heterologous replicases from these functional components. The work was carried out using an innovative two-component *trans*-replicase system that offers an efficient and a safer way of studying dangerous pathogens, such as the Eastern equine encephalitis virus.

Keywords: alphavirus, *trans*-replication system, EEEV

Research CERCS code is B230.

# SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 ALFAVIIRUSED.....	7
1.1.1 ÜLDISELOOMUSTUS.....	7
1.1.2 ALFAVIIRUSTE VIRION.....	7
1.1.3 ALFAVIIRUSTE GENOOMI ORGANISATSIOON.....	8
1.1.4 ALFAVIIRUSTE INFEKTSIOONITSÜKKEL.....	8
1.1.5 ALFAVIIRUSTE RNA REPLIKATSIOON.....	10
1.1.6 MITTESTRUKTUURSED VALGUD.....	11
1.1.7 STRUKTUURSED VALGUD.....	12
1.2 TÖÖS KASUTATUD VIIRUSED.....	12
1.2.1 SFV KOMPLEKSI VIIRUSED.....	13
1.2.2 SFV KOMPLEKSI VÄLISED VIIRUSED.....	14
1.2.3 IDA HOBUSTE ENTSEFALIIDI VIIRUS.....	14
1.3 TRANS-REPLIKATSIOONI SÜSTEEM.....	15
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	18
2.1 TÖÖ EESMÄRGID.....	18
2.2 MATERJAL JA METOODIKA.....	19
2.2.1 EKSPRESSIOONIPLASMIIDIDE KONSTRUEERIMINE.....	19
2.3 REKOMBINANTSETE DNA-de VALMISTAMINE.....	21
2.3.1 EKSPERIMENTIDE LÄBIVIIMINE KOEKULTUURIS.....	23
2.4 TULEMUSED JA ARUTELU.....	25
2.4.1 ÜHEKOMPONENTSE EEEV TRANS-REPLIKAASI AKTIIVSUSE ANALÜÜS IMETAJA- NING PUTUKARAKKODES.....	25
2.4.2 EEEV TRANS-REPLIKAASI EFEKTIIVSUSE VÕRDlus TEISTE ALFAVIIRUSTE TRANS-REPLIKAASIDEGA.....	26

2.4.3	EEEV REPLIKATSIOONI EFEKTIIVSUSE SÕLTUVUS G3BP VALGUST	27
2.4.4	KAHEKOMPONENTSE EEEV TRANS-REPLIKAASI AKTIIVSUSE ANALÜÜS	28
2.4.5	KAHEKOMPONENTSE EEEV TRANS-REPLIKAASI KOMPONENTIDE OPTIMAALSE VAHEKORRA MÄÄRAMINE	29
2.4.6	FUNKTSIONAALSETE REPLIKAASIDE MOODUSTAMINE HETEROLOOGILISTEST REPLIKAASIDE KOMPONENTIDEST	33
	KOKKUVÕTE	41
	SUMMARY	42
	KASUTATUD KIRJANDUS	43
	LIHTLITSENTS	50

## KASUTATUD LÜHENDID

**BFV** – *Barmah Forest virus*, Barmah Forest viirus

**CHIKV** – *Chikungunya virus*, Chikungunya viirus

**CMV** – Tsütomegaloviirus

**CP** – *capsid protein*, kapsiidvalk

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

**EEEV** – *Eastern equine encephalitis virus*, Ida hobuste entsefaliidi viirus

**EILV** – *Eilat virus*, Eilat viirus

**Fluc** – *firefly luciferase*, jaanimardika lutsiferaas

**Gluc** – *Gaussia luciferase*, *Gaussia* lutsiferaas

**HEK293T** – *human embryo kidney cells*, inimese embrüonaalsed neerurakud

**HVD** – *hyper variable domain*, hüper varieeruv domään

**iFCS** – *inactivated fetal calf serum*, inaktiveeritud vasika loote seerum

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

**MAYV** – *Mayaro virus*, Mayaro viirus

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

**ONNV** – *O'nyong-nyong virus*, O'Nyong-Nyong viirus

**PLB** – *passive lysis buffer*, lüüsipuhver

**RC** – *replication complex*, replikatsioonikompleks

**RdRp** – *RNA dependant RNA polymerase*, RNA sõltuv RNA polümeraas

**RRV** – *Ross River virus*, Ross River viirus

**SFV** – *Semliki Forest virus*, Sempliki Forest viirus

**SG** – subgenoomne

**SINV** – *Sindbis virus*, Sindbis viirus

**U2OS** – *human osteosarcoma cells*, inimese luu osteosarkoomi epiteelkoe rakud

**ubi** – ubikvitiin

**UTR** – *untranslated region*, mittekodeeriv ala

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

## SISSEJUHATUS

Viirused on bioloogilised objektid, millel puudub rakuline ehitus. Seetõttu ei ole neil ka rakuvälist bioloogilist aktiivsust ning võimet iseseisvalt paljuneda. Viirustel võib olla kas DNA või RNA genoom, mis on enamasti ümbritsetud kapsiidivalkudega ning osade viiruste puhul ka lipiidse ümbrisega.

Tänapäeva maailmas, kus viiruste levik on tänu linnastumisele ning reisimisele hõlbustatud, suureneb üha enam viiruste uurimise tähtsus. Seda on tõestanud ka 2019. aastal laialdaselt levima hakanud SARS-CoV-2, mille tõttu on Terviseameti andmetel 26. mai 2021 seisuga ainuüksi Eestis haigestunud 129 199 inimest ning surnud 1242 inimest. Lisaks erinevatele piisknakkusega levivatele viirustele nagu seda on SARS-CoV-2, on aina suuremaks probleemiks ka arboviirused, mis kasutavad levimiseks lülijalgseid vektoreid. Varasemalt geograafiliselt piiratud levikuga arboviirused on kliima soojenemise ning reisimise kasvava populaarsuse tõttu osutumas üha suuremaks probleemiks. Arboviiruste hulka kuuluvad ka alfaviirused, mille seas on mitmeid meditsiiniliselt olulisi inimeste patogeene, näiteks Chikungunya viirus (CHIKV) ning Ida hobuste entsefaliidi viirus (EEEV).

Alfaviirused (sugukond *Togaviridae*) on viiruste perekond, millel on positiivse polaarsusega RNA genoom. Alfaviirused kasutavad levimiseks põhiliselt sääski ning nad on laialdaselt levinud üle terve maailma. Näiteks, CHIKV nakkusjuhte on tuvastatud Aafrikas, Aasias, Euroopas ning Ameerikates ning kuigi tema tekitatud haigus ei lõppe tavaliselt surmaga võib viirus põhjustada pikaajalisi liigeste probleeme (CDC, 2018). EEEV levib Ameerikates ning võib inimestele põhjustada erinevaid neuroloogilisi probleeme. EEEV nakkusega seotud neuroloogilisi haiguseid tuvastatakse Ameerika Ühendriigis iga aasta keskmiselt küll kõigest 11 juhul, kuid ligikaudu kolmandiku haigestunute jaoks lõppeb haigestumine surmaga (CDC, 2020).

Selles uurimuses olen keskendunud alfaviiruste, täpsemalt EEEV-i, replikatsiooni mehhanismide uurimisele uudse kahekomponentse *trans*-replikatsiooni süsteemi abil. Alfaviiruste replikatsioonil kannavad olulist rolli neli viiruse kodeeritud mittestruktuurset valku, mis moodustavad RNA sünteesi läbiviimiseks vajalikud replikatsioonikompleksid. Käesoleva bakalaureusetöö raames rekonstrueerisin EEEV replikatsioonikompleksid kahest funktsionaalsest komponendist ning uurisin EEEV replikaasi komponentide ühilduvust teistelt alfaviirustelt pärinevate funktsionaalsete komponentidega.

Bakalaureusetöö on valminud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi rakendusviroloogia uurimislaboris. Täna professor Andres Meritsat ja Laura Sandra Lellot juhendamise ning heade soovitude eest.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 ALFAVIIRUSED

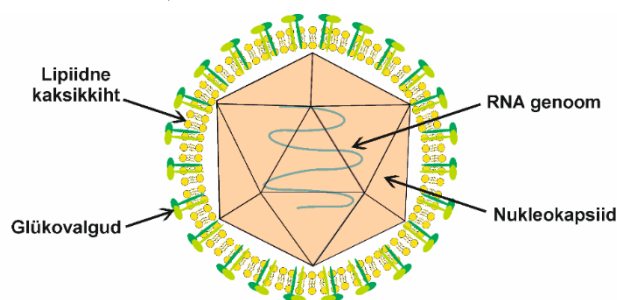
### 1.1.1 ÜLDISELOOMUSTUS

Alfaviirused on *Togaviridae* sugukonda kuuluv viiruste perekond. Alfaviirused on arboviirused ehk nad kasutavad selgroogsete peremeeste nakatamiseks vektoritena lüliljalgseid, valdavalt *Aedes* ja *Culex* perekondadesse kuuluvaid sääski. Alfaviiruste selgroogseteks peremeesteks on näiteks inimesed, hobused, närilised ning linnud. Leidub ka alfaviiruseid, mis nakatavad ainult sääski (Eilat viirus, EILV) ja kalu nakatavaid alfaviiruseid, millel puudub teadaolev lüliljalgne vektor (Strauss ja Strauss, 1994).

Alfaviirused on laialdaselt levinud kõikidel mandritel, v.a Antarktika, ning vastavalt geograafilisele levikualale on neid jaotatud Vana Maailma ja Uue Maailma viirusteks (Powers *et al.*, 2001). Vana Maailma alfaviirused levivad põhiliselt Aafrikas, Aasias ja Austraalias ning nad põhjustavad löövet, palavikku ja poliätriiti. Vana Maailma alfaviiruste hulka kuuluvad näiteks CHIKV, Sindbis viirus (SINV), Ross River viirus (RRV), Barmah Forest viirus (BFV), O'nyong-nyong viirus (ONNV) ning Semliki Forest viirus (SFV). Uue Maailma viirused on entsefaliitse fenotüübiga ning nende levikupiirkonnad on põhiliselt Põhja-, Lõuna- ning Kesk-Ameerika. Uue Maailma alfaviiruste hulka kuuluvad näiteks Venezuela hobuste entsefaliidi viirus (VEEV) ning EEEV (Strauss ja Strauss, 1994).

### 1.1.2 ALFAVIIRUSTE VIRION

Alfaviiruste virion koosneb ikosaeedrilisest T=4 sümmeetriaga nukleokapsiidist ning seda katvast lipiidest ümbrisest (Joonis 1). Nukleokapsiidi on kapsiidivalkude abil pakitud alfaviiruste positiivse polaarsusega RNA genom. Nukleokapsiid on ümbritsetud peremeesorganismi päritolu lipiidse kaksikkihiga, mille pinnale on kinnitunud viiruse glükoproteiinid E1 ja E2. E1 ning E2 valkude heterodimeerid moodustavad virioni pinnal trimeerseid ogataolisi struktuure, mida on virioni pinnal kokku 80 (Jose *et al.*, 2009; Strauss ja Strauss, 1994).

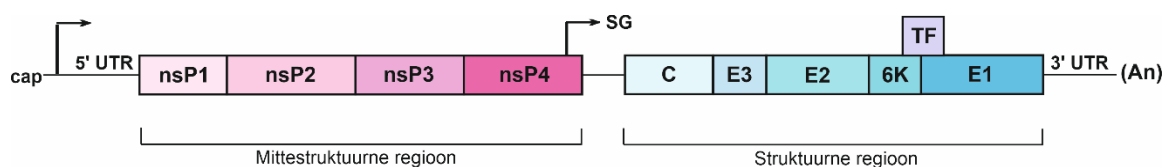


**Joonis 1. Skeem alfaviiruste virionist.** Viiruse genom (sinine) on kapsiidivalkude abil pakitud nukleokapsiidiks (oranž); nukleokapsiidi katab lipiidsest kaksikkihist moodustuv ümbris (kollane); virioni pinnale on

glükovalkudest moodustunud ogastruktuurid (roheline). Joonis pärineb juhendaja Laura Sandra Lello magistritööst. Joonist on kasutatud autori loal.

### 1.1.3 ALFAVIIRUSTE GENOOMI ORGANISATSIOON

Alfaviiruste genoomiks on üheaahelaline RNA, mis on positiivse polaarsusega ning mille 5' otsas on 7-metüülguanosiini *cap*-struktuur ning 3' otsas polü-A-saba (Joonis 2). Genoomi pikkus on umbes 12 kb ning see sisaldab kahte avatud lugemisraami, millest esimene kodeerib virioni mitte kuuluvaid ehk mittestruktuurseid (ns, *non-structural*) ning teine virioni kuuluvaid ehk struktuurseid valke (Strauss ja Strauss, 1994). Ns valgud 1-4 (nsP1-4, *non-structural proteins 1-4*) transleeritakse genoomselt RNA-lt P123 või P1234 liitvalguna. P1234 liitvalk transleeritakse juhul, kui toimub ülelugemine stoppkoodonist nsP3 valku kodeeriva ala 3' otsas. Selline stoppkoodoni ülelugemine toimub kõigest 10% juhtudest, mistõttu on P123 hulk rakus suurem võrreldes P1234 hulgaga (Li ja Rice, 1993). Struktuursed valgud transleeritakse subgenoomselt (SG) mRNA-lt liitvalguna C-E3-E2-6K-E1 (Strauss ja Strauss, 1994). Mõlemad liitvalgud läbivad põhjaliku töötuse, mille tagajärjel moodustuvad eraldiseisvad ns ja struktuursed valgud. Kodeerivatele aladele lisaks paiknevad genoomi otstes ning geenidevahelisel alal kolm mittekodeerivat ala (UTR, *untranslated regions*) (Jose *et al.*, 2009).



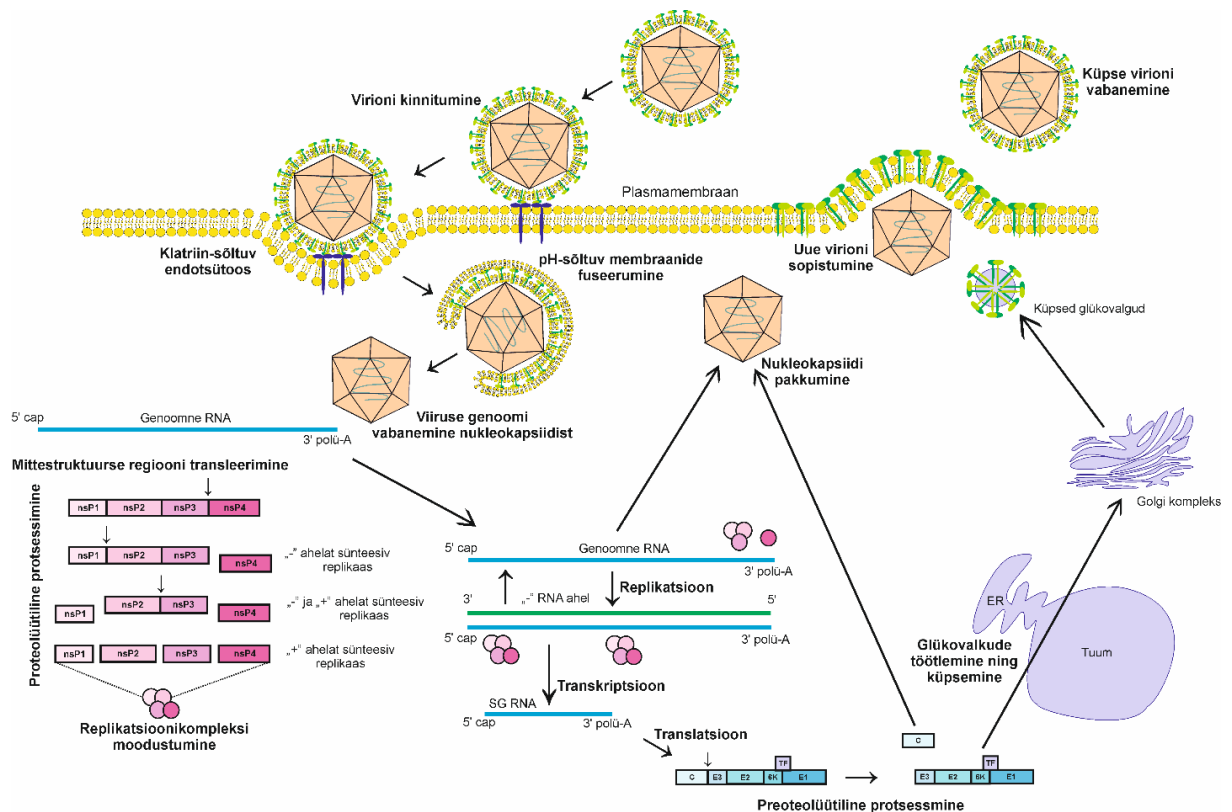
**Joonis 2. Skeem alfaviiruste genoomist.** Genoomi 5' otsas on 7-metüülguanosiini *cap*-struktuur ning 3' otsas poliadenüüleeritud saba; genoom jaguneb kaheks avatud lugemisraamiks: 5' otsa poolne lugemisraam kodeerib mittestruktuursed valke (erinevad roosad) ning 3' otsa poolne lugemisraam kodeerib struktuurseid valke (erinevad sinised), TF on raaminihke tulemusena moodustuv translatsiooni produkt, genoomi otstes ning geenidevahelisel alal on mittekodeerivad regioonid. Joonis pärineb juhendaja Laura Sandra Lello magistritööst. Joonist on kasutatud autori loal.

### 1.1.4 ALFAVIIRUSTE INFEKTSIOONITSÜKKEL

Alfaviiruste infektsioonitsükkel algab viiruse sisenemisega organismi (Joonis 3). See toimub nakatunud sääse hammustusega. Organismi sisenenud viirus paljuneb hammustuse kohas, seejärel satub viirus peremeesorganismi verre ning levib selle kaudu erinevatesse kudedesse (Strauss ja Strauss, 1994).

Viirusosakeste sisenemine raku toimub peremeesraku pinnal olevate erinevate retseptorite abil. Artriidi-tüüpi sümptomeid põhjustavad viirused, nagu näiteks CHIKV, ONNV ning RRV kasutavad raku sisenemiseks sageli MXRA8 retseptorit (Zhang *et al.*, 2018), samas kui SINV

kasutab selleks NRAMP retseptorit (Rose *et al.*, 2011). Retseptoriga seondumisele järgneb raku sisenemine klatriin-sõltuva endotsütoosi teel, kus madala pH toimel viiruse ja raku membraanid liituvad ning nukleokapsiid vabaneb raku tsütoplasmasse. Nukleokapsiidi lagunemisel vabaneb viiruse genoomne RNA ning algab ns liitvalgu translatsioon ja selle proteolüütiline töötlus (Jose *et al.*, 2009). Liitvalk ja valminud ns valgud nsP1-4 liiguvad plasmamembraanile, kus nad moodustavad RNA sünteesi läbiviimiseks vajalikud replikatsioonikompleksid. Viiruse infektsioonitsükli käigus sünteesitakse kõigepealt negatiivseid RNA ahelaid, seejärel nende matriitsil positiivseid genoomse RNA ahelaid ning lühemaid SG RNA ahelaid. SG RNA pealt transleeritakse struktuurne liitvalk, mille töötamise järel moodustuvad viiruse struktuursed valgud. Kapsiidivalgu (CP) seondumisel genoomse RNA-ga moodustatakse nukleokapsiidid. Nukleokapsiidid seonduvad E1/E2 dimeeridega ning rakust pungunud virionid on valmis uute rakkude nakatamiseks (Strauss ja Strauss, 1994).

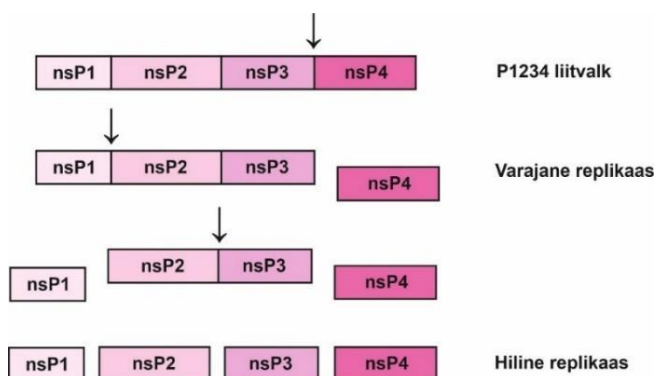


**Joonis 3. Skeem alfaviiruste infektsioonitsüklist.** Alfaviiruste infektsioonitsükkel algab virioni seondumisega peremeesorganismi rakkudega raku pinnal olevate retseptorite kaudu (tumesinised); seejärel siseneb virion raku klatriin-sõltuva endotsütoosi teel; madala pH toimel viiruse ning raku membraanid liituvad ning virion pääseb raku; vabanevad viiruse nukleokapsiid (oranž) ning RNA genoom (sinine); esmalt transleeritakse genoomselt RNA-lt P1234 liitvalk (erinevad roosad), mis läbib kindlas järjekorras toimuva proteolüütilise töötamise; liitvalgu töötlemise tulemusel moodustub neljast iseseisvast nsP1 + nsP2 + nsP3 + nsP4 valgust koosnev replikaas (erinevad roosad), mis paikneb ns valkude poolt moodustatud replikatsioonikompleksides; uued genoomsed RNAd ja SG RNA sünteesitakse negatiivselt RNA ahelalt; SG RNA-lt transleeritakse struktuurne liitvalk (erinevad sinised),

mis läbib proteolüütilise töötuse, mille käigus vabanenud kapsiidivalk seondub genoomse RNA-ga moodustades nukleokapsiidi; nukleokapsiid liigub plasmamembraanile, kus toimub ühinemine glükovalkudega (rohelist) ning toimub moodustunud virioni pungumine, mille järel on see rakkude nakatamiseks valmis. Joonis pärineb juhendaja Laura Sandra Lello magistritööst. Joonist on kasutatud autori loal.

### 1.1.5 ALFAVIIRUSTE RNA REPLIKATSIOON

Viiruse RNA süntees toimub nakatunud rakus moodustunud replikatsioonikompleksides (RC, *replication complex*), mida nimetatakse sfääruliteks. RC-d on plasmamembraanset päritolu membraansed sopistused, mis on ühendatud tsütoplasma. Kuigi RC-d moodustatakse plasmamembraanil, transporditakse nad hiljem endosoomide membraanidele (Spuul *et al.*, 2010). RC-sid ei moodustu kui rakus eraldi ekspresseerida üksikuid ns valke, samuti ei suuda töötlemata P1234 liitvalk replikatsiooni läbi viia. Seega on funktsionaalse RC moodustumiseks vajalikud nii genoomne RNA, sellelt ekspresseeritud liitvalgud P1234 ning P123 kui ka töötuse tulemusena moodustunud neli eraldiseisvat nsP1-4 valku (Joonis 4). Ns liitvalgu töötust viib läbi selle koosseisus olev nsP2 valk (Lemm ja Rice, 1993). Esmalt toimub P1234 lõikamine P123 liitvalguks ning nsP4 valgukuks. Need moodustavad varajase replikaasi, mis on võimeline sünteesima negatiivseid RNA ahelaid. Seejärel toimub P123 liitvalgu lõikamine nsP1 ning nsP2 vahelt ja allesjäänud P23 liitvalgu lõikamine nsP2 ja nsP3 vahelt. Moodustub hiline replikaas, mis koosneb neljast eraldiseisvast replikaasi valgust – nsP1, nsP2, nsP3 ja nsP4. Hiline replikaas sünteesib positiivseid RNA ahelaid (Lemm ja Rice, 1993; Lemm *et al.*, 1994).



**Joonis 4. Alfaviiruste replikaasi moodustumise skeem.** Esmalt toimub P1234 lõikus nsP3 ja nsP4 vahelt, mille tulemusena moodustub varajane replikaas; seejärel toimub lõikus nsP1 ja nsP2 vahelt moodustades P23 liitvalgu; viimase etapina toimub lõikus nsP2 ja nsP3 vahelt. Sellise proteolüütilise töötlemise tulemusena moodustub neli eraldiseisvat valku nsP1-4, mille moodustatud kompleksi nimetatakse hiliseks replikaasiks. Joonis pärineb juhendaja Laura Sandra Lello magistritööst. Joonist on kasutatud autori loal.

### 1.1.6 MITTESTRUKTUURSED VALGUD

**nsP1** kujutab endast rõngakujulist 12-st subühikust koosnevat struktuuri, mis ühendab sfääruli sisu raku tsütoplasma (Jones *et al.*, 2020). nsP1 valgul on mitmeid olulisi funktsioone. nsP1 N-terminaalses otsas on metüültransferaase ja guanüültransferaase aktiivsusega regioon, mis osaleb genoomsele ning SG RNA-le *cap*-struktuuri lisamisel (Ahola ja Kääriäinen, 1995). Teine oluline nsP1 valgufunktsioon on võime seonduda membraanidega ning käituda ankruna RC jaoks (Salonen *et al.*, 2003). nsP1 on ainus ns valk, millel on võime membraanidega seonduda. Lisaks on nsP1 valgul oluline funktsioon negatiivse RNA ahela sünteesimisel – on näidatud, et nsP1 valk seondub nsP4 valguga P123 liitvalguga ning tõenäoliselt ka nsP1 + P23 kujul (Lulla *et al.*, 2008; Shirako *et al.*, 2000).

**nsP2** valk koosneb kahest funktsionaalsest regioonist, mis on seotud paidliku linkeriga (Law *et al.*, 2021). Valgu N-otsa poolne regioon käitub RNA replikatsioonil helikaasina eemaldades RNA sekundaarstruktuure (Gomez de Cedron *et al.*, 1999). Lisaks on sellel regioonil NTP-aasne ja RTP-aasne funktsioon, viimane on vajalik RNA-le *cap*-struktuuri lisamisel (Vasiljeva *et al.*, 2000). On näidatud, et nsP2 suudab seonduda RNA-ga ning osaleb selle kaudu RNA replikatsioonil (Das *et al.*, 2014; Law *et al.*, 2019). nsP2 valguga C-otsa poolne regioon on proteaas, mis on vajalik P1234 liitvalguga töötlemisel (Rupp *et al.*, 2015).

**nsP3** valk jaguneb kolmeks erinevaks domääniks: makrodomään, alfaviiruste unikaalne domään (*alphavirus unique domain*, AUD) ning hüper-muutuval domään (HVD, *hyper variable domain*). Makrodomään on ADP-riboosi eemaldamiseks raku ja viiruse valkudel (Jayabalan *et al.*, 2021). Defektse nsP3 puhul esineb häireid negatiivse ning SG RNA sünteesil (LaStarza *et al.*, 1994). nsP3 HVD domeen on fosforüülitatud (Teppor *et al.*, 2021) ja sellele seonduvad mitmed replikatsiooniks vajalikud peremeesraku päritolu valgud. Peremeesrakkude valgud, millega nsP3 seondub, erinevad vastavalt sellele, kas tegemist on Uue või Vana Maailma alfaviirusega. Nii seonduvad näiteks Vana Maailma viirused G3BP perekonna valkudega ning Uue Maailma viirused FXR perekonna valkudega (Kim *et al.*, 2016; Rupp *et al.*, 2011). On näidatud, et näiteks VEEV seondub FXR perekonna peremeesvalkudega ning FXR *knock out* rakkude puhul väheneb VEEV replikatsioon oluliselt. Samas, G3BP1/2 *knock out* rakkudes esineb replikatsiooni efektiivsuse langus näiteks SINV ning CHIKV puhul (Kim *et al.*, 2016). Huvitaval kombel seondab EEEV HVD nii G3BP1/2 kui ka FXR valke (Frolov *et al.*, 2017). *Trans*-replikatsiooni süsteemi abil on näidatud, et Vana Maailma alfaviiruste hulka kuuluvate BFV, RRV, MAYV, ONNV ning CHIKV replikatsiooni aktiivsused vähenevad G3BP *knock-out* rakkudes oluliselt, samas kui kontrollina kasutatud Uue Maailma alfaviiruse VEEV aktiivsused ei muutu. Huvitav on see, et Vana Maailma alfaviiruste hulka kuuluvad SINV ning SFV ei näidanud sellist sõltuvust G3BP olemasolust ning replikatsiooni aktiivsused säilisid ka

selle puudumisel. Selline erisus on tingitud ühest aminohappe jäägi erinevusest nsP1 valgus G3BP-sõltuvate ning G3BP-sõltumatute Vana Maailma viiruste vahel (Götte *et al.*, 2020).

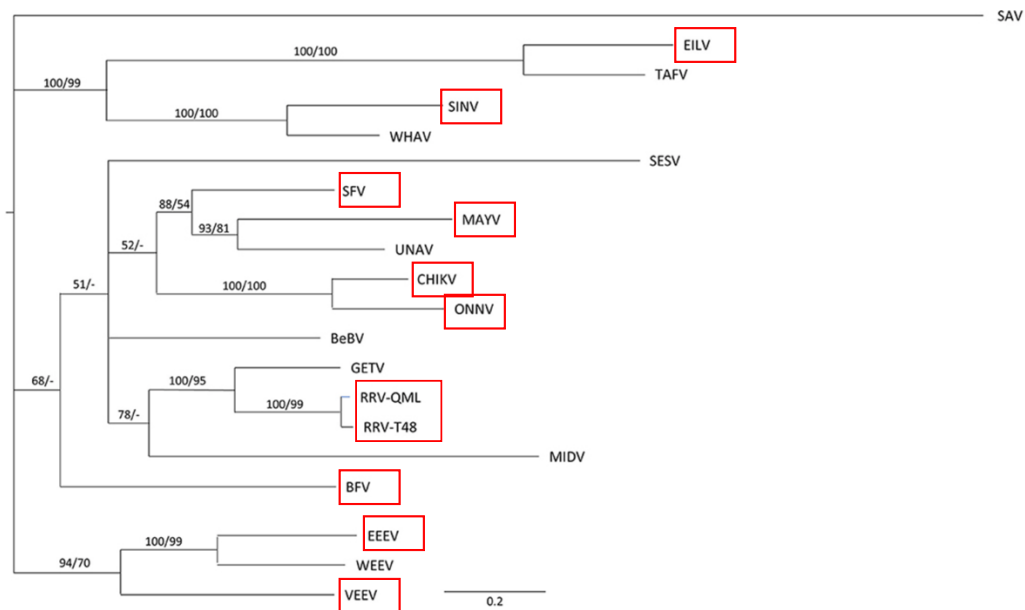
**nsP4** valk on alfaviiruste RNA-sõltuv RNA-polümeraas (*RNA dependant RNA polymerase*, RdRp) ning kannab põhilist rolli RNA replitseerimisel (Rupp *et al.*, 2015). nsP4 valk on võrreldes teiste alfaviiruste ns valkudega kõrgemalt konserveerunud (Strauss ja Strauss, 1994). Alfaviiruste nsP4 valgu C-terminaalne domään omab RdRp-dele iseloomuliku ruumilist struktuuri (Tan *et al.*, 2021, käsikiri ülevaatamisel) ja selles asub RdRp-dele iseloomulik GDD motiiv (Kamer ja Argos, 1984). nsP4 N-terminaalne domeen on alfaviirustele spetsiifiline ning on hädavajalik RNA replikatsiooniks. See domeen ei oma selgelt väljendunud kolmemõõtmelist struktuuri ja on seotud C-terminalse domääniga linkeri abil (Tan *et al.*, 2021 käsikiri ülevaatamisel). nsP4 N-terminaalsel domeenil oluline roll interaktsioonide vahendamisel teiste ns valkudega (Rupp *et al.*, 2011). nsP4 valk vabaneb infektsioonitsükli käigus ainult P1234 liitvalgu töötlemisel. Kuna P1234 transleeritakse võrrelduna P123-ga ligi 10 kroda vähem, moodustub ka nsP4 valku palju väiksemas koguses kui teisi ns valke (Li ja Rice, 1993). Lisaks sellele põhjustab nsP4 vähest hulka rakus ka nsP4 N-otsas asuv türosiini jääk, millel on valgule destabiliseeriv mõju (de Groot *et al.*, 1991).

### **1.1.7 STRUKTUURSED VALGUD**

Struktuursed valgud transleeritakse SG mRNA-lt C-E3-E2-6K-E1 liitvalguna, mida töötletakse viiruse ja raku proteaaside poolt nii ko- kui ka posttranslatsiooniliselt. Töötlemise järel moodustuvad iseseisvad struktuursed valgud (Strauss ja Strauss, 1994). Struktuurse liitvalgu N-otsas on alfaviiruste CP, mis liitvalgust vabanedes seondub genoomse RNA-ga moodustades viiruse nukleokapsiidi (Jose *et al.*, 2009). E1 ning E2 glükovalkude heterodimeerid moodustavad trimeerideks ühinedes virioni pinnal paiknevad ogastruktuurid (Cheng *et al.*, 1995; Pletnev *et al.*, 2001).

## **1.2 TÖÖS KASUTATUD VIIRUSED**

Käesolevas bakalaureusetöös uurisin CHIKV, MAYV, SFV, ONNV ning RRV viirused, mis kuuluvad Semliki Forest viiruse antigeensesse kompleksi (Strauss ja Strauss, 1994) ning teistesse kompleksidesse kuuluvaid EEEV, EILV, VEEV, BFV ning SINV viiruseid (Joonis 5).



**Joonis 5. Skeem alfaviiruste fülogeneetilisest puust.** Joonisel on kujutatud erinevad alfaviiruste hulka kuuluvad viirused. Punaste kastidega on märgitud töös kasutatud viirused, milleks on CHIKV, SFV, MAYV, ONNV, RRV, EILV, VEEV, EEEV, BFV, SINV. Joonis (Nowee *et al.*, 2021).

### 1.2.1 SFV KOMPLEKSI VIIRUSED

Alfaviiruseid on jagatud antigeense ristreaktiivsuse alusel erinevatesse kompleksitesse. Üks sellistest antigeensetest kompleksidest on SFV kompleks (Strauss ja Strauss, 1994).

**SFV** ise ei põhjusta inimestel rasket haigestumist, kuid on tugevalt neurovirulentne närilistes (Mazzon *et al.*, 2018; Atkins *et al.*, 1985). Teised siin töös uuritud SFV kompleksi kuuluvad viirused põhjustavad inimestel palavikku, löövet ning liigesepõletikku ja sarnaste sümptomite tõttu esineb nende viiruste puhul sageli valediagnoosimist. Erinevate vektorite ning ka peremeesorganismide tõttu on SFV kompleksi viirused geograafiliselt laialdaselt levinud (Henss *et al.*, 2019).

**CHIKV** on levinud enam kui 60 riigis. CHIKV kasutab vektoritena troopilistel ning lähistroopilistel aladel *Aedes aegypti* sääski ning jahedamate kliimadega aladel *Aedes albopictus* sääski. Erinevate vektorite kasutamise tõttu on CHIKV levinud Aasias, Aafrikas, Euroopas ning Ameerikates (Zeller *et al.*, 2016).

**ONNV** ning CHIKV on lähedalt suguluses (Powers *et al.*, 2000). ONNV levib ainsana alfaviirustest kasutades *Anopheles* perekonda kuuluvaid sääski ning on põhjustanud mitmeid puhanguid Aafrikas (Rezza *et al.*, 2017).

**RRV** on levib Austraalias, Paapua-Uus Guineas ning Vaikse Ookeani saartel. RRV peremeesorganismide hulka kuuluvad lisaks inimestele ka näiteks hobused ning kangurud. RRV kasutab levimiseks paljusid erinevaid vektoreid – Austraalias on RRV levikut seostatud tervelt 40 erineva sääskede liigiga (Claflin ja Web, 2015).

**MAYV** on ainus Vana Maailma alfaviiruste hulka kuuluv viirus, mis pärineb ning levib põhiliselt Lõuna-Ameerikas (Tesh *et al.*, 1999).

### **1.2.2 SFV KOMPLEKSI VÄLISED VIIRUSED**

Lisaks SFV kompleksi kuuluvatele viirustele olid bakalaureusetöösse kaasatud veel ka EEEV, VEEV, SINV ning EILV viirused. Need viirused kuuluvad erinevatesse kompleksidesse ja erinevad üksteisest suurel määral, mistõttu neid ei seo neid omavahel levikuala või nakatumisel tekkiva haiguse sümptomid.

**VEEV** avastati esmakordselt 1935. aastal, kui ilmnisid haiguspuhangud Kolumbias, Venetsueelas ja Trinidadis (Weaver *et al.*, 2004). Viirusnakkuse puhul ilmnevad inimestel tavaliselt kergemad sümptomid, nagu palavik ning lööve. 4-14% haigestumistest tekib entsefaliidiga seonduvaid tõsiseid neuroloogilisi tüsistusi nagu krambid ja kooma ning umbes 1% haigestumistest lõpeb surmaga (Gardner *et al.*, 2008; Lundberg *et al.*, 2017). VEEV levib peamiselt Lõuna-Ameerikas (Strauss ja Strauss, 1994).

**EILV** isoleeriti 1982-1984. aastatel Negevi kõrbes toimunud arboviiruste uuringute käigus. Erinevalt paljudest teistest alfaviirustest puuduvad EILV-l selgroogsed peremehed (Nasar *et al.*, 2012).

**BFV** levib laialdaselt Austraalias ning Queenslandi osariigis dokumenteeritakse ühe aasta jooksul ligi 400 haigusjuhtumit. BFV põhjustab inimestel palavikku, ulatuslikku löövet ning lihasvalusid, mis ka tervenemise järel jäävad pikemalt häirima (Queensland Government, 2017).

**SINV** isoleeriti esimest korda 1952. aastal Egiptuses Niiluse jõe deltas *Culex* moskiitodest. Esimene inimestega seotud juhtum on kirjeldatud Ugandas 1961. aastal. Viirus põhjustab inimestel sageli sügelevat löövet kerel ja jäsemetel, kerget palavikku ning liigesevalusid. Sindbis viirust on tuvastatud ka Eestis, kus selle tekitatud haigust tuntakse kui Karjala palavikku (ECDC, 2021).

### **1.2.3 IDA HOBUSTE ENTSEFALIIDI VIIRUS**

Ida hobuste entsefaliidi viirus isoleeriti esimest korda 1933. aastal Ameerika Ühendriikides nakatunud hobustest, kuid levik inimeste seas kinnitati alles 1938. aastal (Zacks ja Paessler, 2009; Deresiewicz *et al.*, 1997). Siiski, ei inimesed ega hobused pole EEEV peamiseks peremeheks, põhiliselt levib EEEV lindude ning *Culiseta melanura* sääskede vahel. Suurenenud vektorputukate arvukuse korral võivad need nakatada ka inimesi, hobuseid ja teisi imetajaid (Heberlein-Larson *et al.*, 2019). Põhja-Ameerikas levivad EEEV-i tüved on pidevas ringluses ning on Uue Maailma alfaviiruste seas inimesele kõige patogeensemad. Inimestel

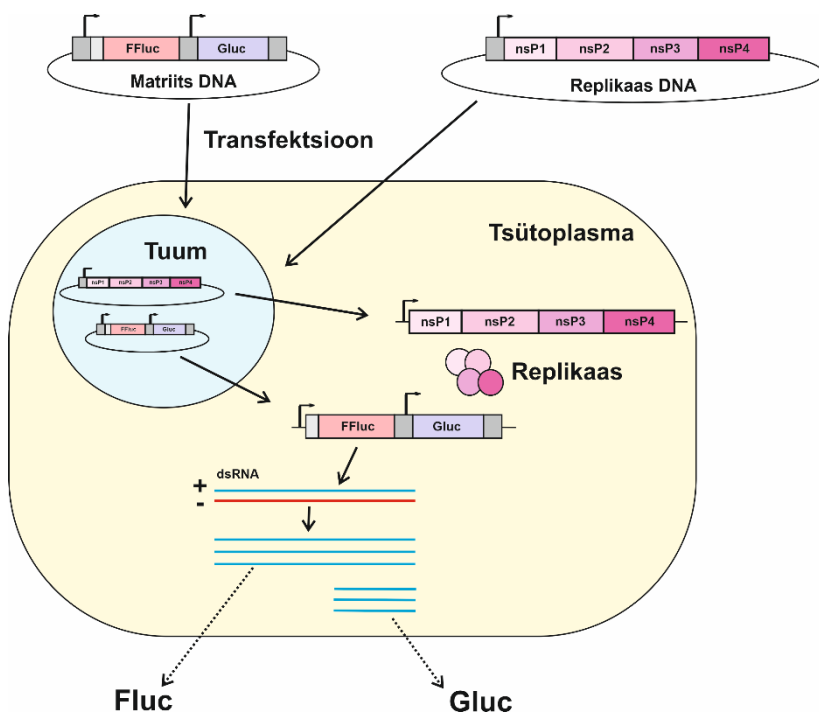
võivad nakatumise korral ilmnedä sümptomid nagu palavik, oksendamine ning hingamisraskused. Kuigi kõigest ~5% nakatunutest tekib meningiit või entsefaliit, lõppeb sellisel juhul kolmandik haigestumistest surmaga (CDC, 2021). Ellujääjate seas täheldatakse pikaajalisi neuroloogilisi puudujääke. EEEV-le on omane kõrge virulentsus ja efektiivne replikatsioon, kuid selle molekulaarsed mehhanismid ei ole veel täielikult mõistetavad, mistõttu ei ole saadaval vaktsiine ega ravimeetodeid (Frolov *et al.*, 2017; Deresiewicz *et al.*, 1997). Varasemalt on näidatud, et alfaviiruste nsP3 valgu HVD kannab olulist rolli alfaviiruste replikatsioonil osaledes replikatsioonikomplekside moodustamisel (Panas *et al.*, 2012; Meshram *et al.*, 2018). Peremeesorganismi rakkudes on erinevaid komplekside moodustamist soodustavaid valke, näiteks stressigraanulite moodustamisel osalevad G3BP perekonna ning FXR perekonna valgud, millel on võime siduda ka RNA-d. Alfaviirused kasutavad selliseid komplekse moodustavaid ning RNA-d siduvaid valke enda kasuks ära replikatsioonikomplekside moodustamisel ja RNA replikatsiooni läbiviimisel. Huvitav on see, et Uue ning Vana Maailma alfaviirused seovad replikatsioonikomplekside moodustamisel erinevaid peremeesorganismi valke. Nii kasutavad Vana Maailma alfaviirused selleks G3BP perekonda kuuluvaid valke ning Uue Maailma alfaviirused FXR perekonda kuuluvad valke (Kim *et al.*, 2016). Erandiks on seejuures EEEV, mis on teadaolevalt ainus Uue Maailma viirus, mis seob nii FXR kui ka G3BP perekonna valke. Kui blokeerida EEEV võime siduda kas FXR või G3BP valke, ei muutu replikatsioonikomplekside moodustumise efektiivsus, kuid mõlema valguga seondumise takistamine nõrgendab oluliselt EEEV replikatsiooni (Frolov *et al.*, 2017). EEEV on bioohutusetaseme 3. klassi (*biosafety level 3*) kuuluv viirus, mida peetakse ka potentsiaalseks biorelvaks. Need asjaolud muudavad selle uurimise teadlaste jaoks ohtlikuks ning kulukaks. Meie uurimisgrupis on hiljuti konstrueeritud tundlik ning efektiivne *trans*-replikatsiooni süsteem ka EEEV jaoks, mis võimaldab EEEV-i replikatsiooni uurimist väljaspool spetsiaalset bioohutustaseme 3. klassi laborit, muutes EEEV-i RNA replikatsiooni uurimise ohutumaks, efektiivsemaks ning odavamaks.

### 1.3 TRANS-REPLIKATSIOONI SÜSTEEM

Alfaviiruste infektsiooni käigus käitub raku tsütoplasmasse vabanenud genoomne RNA mittestruktuursete valkude sünteesil kui mRNA. See tähendab, et mittestruktuursete valkude süntees sõltub viiruse genoomi replikatsioonist, mis omakorda sõltub mittestruktuursete valkude sünteesist. Sellised seosed raskendavad oluliselt erinevate mutatsioonide mõju uurimist replikaasi valgu aktiivsusele ning seda peamiselt infektsioonilise viiruse genoomi viidud mutatsioonide reverteerumise või kompenseerivate mutatsioonide tekke tõttu (Lulla *et al.*, 2013; Žusinaite *et al.*, 2007). Alfaviiruste replikaasid on *trans*-aktiivsed ning suudavad peale

enda genoomi replitseerida veel ka *helper*-RNA-sid (Liljeström ja Garoff *et al.*, 1991) ning vigaseid replikatsiooni segavaid RNA-sid. See on võimaldanud luua *trans*-replikatsiooni süsteemid, kus viiruse RNA replikatsioon ning replikaasi valkude süntees on üksteisest sõltumatud (Frolova *et al.*, 2010; Spuul *et al.*, 2011; Utt *et al.*, 2016).

Alfaviiruste genoomis asuvad RNA sünteesimiseks vajalikud replikaasi siduvad järjestused genoomi UTR-des, nsP1 valgu alguses ning nsP4 valgu lõpus. Kasutades ära neid järjestusi on võimalik konstrueerida matriits-RNA-d, mida alfaviiruste replikaas ära tunneb ning replitseerida suudab. Nii on loodud *trans*-replikatsiooni süsteemid, kus replikaasi aktiivsust saab hinnata matriits-RNA-sse viidud markervalkude tekitatud signaalide abil. Täpsemalt, matriits-RNA konstrueerimisel on alfaviiruste genoomis paiknevad kodeerivad alad asendatud markervalke kodeerivate järjestustega, säilitades vaid UTR-ides, nsP1 alguses ning nsP4 valgu lõpus asuvad replikatsioonis vajalikud elemendid. Nii saab uurida alfaviiruste replikaasi aktiivsust ekspresseerides seda matriits-RNA kõrval *in trans* (Joonis 6) (Spuul *et al.*, 2011; Utt *et al.*, 2016).



**Joonis 6. Alfaviiruste *trans*-replikatsiooni süsteem.** Alfaviiruste *trans*-replikatsiooni süsteem põhineb kahel DNA plasmiidil: matriits-RNA ekspressiooniplasmiid ning replikaasi ekspressiooniplasmiid; matriits-RNA ekspressiooniplasmiidis on alfaviiruste genoomis kodeerivad alad asendatud *Firefly* lutsiferaasi (Fluc) ja *Gaussia* lutsiferaasi (Gluc) kodeerivate järjestustega; teine ekspressiooniplasmiid kodeerib alfaviiruste P1234 mRNA-d, millel puuduvad replikatsiooniks vajalikud elemendid. Replikaasi mRNA-lt transleeritakse mittestruktuursed valgud, mis moodustavad alfaviiruste replikaasi ning hakkavad replitseerima Fluc ning Gluc markervalkude järjestusi sisaldavat matriitsi-RNA-d; esmalt sünteesitakse matriits-RNA-lt negatiivseid ahelaid, millelt saab edasi sünteesida positiivseid genoomsed ning SG RNA-sid. Fluc markervalku kodeeriv järjestus on sisestatud genoomse promooteri kontrolli alla, mistõttu hinnatakse Fluc signaali kui replikatsiooni signaali ning Gluc markervalku

kodeeriv järjestus on sisestatud SG promooteri kontrolli alla, mistõttu hinnatakse Gluc signaali kui transkriptsiooni signaali. Joonis pärineb (Laura Sandra Lello, 2020). Joonist on kasutatud autori loal.

*Trans*-replikatsiooni süsteeme on kasutatud erinevate alfaviiruste uurimiseks. Näiteks uuriti SFV RC-de moodustumist kasutades *trans*-replikatsiooni süsteemi, kus matriits-RNA-d ning replikaasi kodeerivad järjestused olid paigutatud bakteriofaagi T7 RNA polümeraasi promooteri kontrolli alla (Spuul *et al.*, 2011). Meie uurimisgrupis on sarnane bakteriofaag T7 põhine *trans*-replikatsiooni süsteem konstrueeritud ka CHIKV jaoks ja lisaks loodi veel ka süsteem, kus T7 promooteri asemel kasutati konstruktidest inimese tsütomegaloviiruse (CMV, *cytomegalovirus*) varajast promooterit. CHIKV *trans*-replikatsiooni süsteemi kasutati leidmaks uusi ning efektiivsemaid võimalusi viiruse mittestruktuursete valkude märgistamiseks (Utt *et al.*, 2016). Lisaks on valmistatud ka putukarakkude kompetentsed RNA polümeraas II põhised *trans*-replikatsiooni süsteemid, mis sisaldavad *Aedes aegypti* poliübikvitiini promooterit ning seda süsteemi kasutati uurimaks erinevate mutatsioonide mõju alfaviiruste replikatsioonile putukarakkudes (Bartholomeeusen *et al.*, 2018).

Ülalmainitud T7 põhiseid süsteeme saab aga kasutada ainult bakteriofaag T7 RNA polümeraasi ekspresseerivates rakuliinides. CMV varajase promooteriga või poliübikvitiini promooteriga RNA polümeraas II põhiste *trans*-replikatsiooni süsteemide tundlikused on jällegi oluliselt madalamad kui T7 põhistes süsteemides (Utt *et al.*, 2016; Bartholomeeusen *et al.*, 2018). Seetõttu on konstrueeritud ka RNA polümeraas I põhised *trans*-replikatsiooni süsteemid, mida saab kasutada erinevates imetajarakkudes ning mis on tundlikumad kui RNA polümeraas II põhised süsteemid (Bartholomeeusen *et al.*, 2018; Utt *et al.*, 2019). Esimesena konstrueeriti RNA polümeraas I põhine süsteem CHIKV jaoks ning hiljem veel ka SINV, BFV, VEEV, ONNV, MAYV, RRV, SFV ning EILV jaoks (Utt *et al.*, 2019; Götte *et al.*, 2020; Lello *et al.*, 2020). RNA polümeraas I põhiseid süsteeme on kasutatud näiteks alfaviiruste nsP2 valgu helikaasse regiooni uurimisel ning uurimaks alfaviiruste replikatsiooni sõltumist peremeesorganismi G3BP valkudest (Law *et al.*, 2019; Götte *et al.*, 2020). Lisaks on RNA polümeraas I põhiseid süsteeme kasutatatud uurimaks alfaviiruste matriits-RNA-de riskasutamist erinevate teistelt alfaviirustelt pärinevate replikaaside poolt. Samuti on konstrueeritud uudseid alfaviiruste kahekomponentseid *trans*-replikaase uurimaks replikatsioonikomplekside moodustumist erinevatelt viirustel pärinevatest funktsionaalsetest komponentidest (Lello *et al.*, 2020; Lello *et al.*, 2021, käsikiri ülevaatomisel).

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 TÖÖ EESMÄRGID

Bakalaureusetöö on valminud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi rakendusviroloogia laboris varasemalt läbi viidud uurimuste (Lello *et al.*, 2020; Lello *et al.*, 2021, käsikiri ülevaatomisel) jätkuprojektina. Eelnevates projektides uuriti SINV, BFV, EILV, VEEV, CHIKV, ONNV, RRV, SFV ning MAYV viiruste replikaaside matriits-eelistusi ning RC-de moodustumist.

Varasemalt olid tulemused näidanud, et erinevate replikaaside poolt matriits-RNA-de kasutamine ei ole retsiprookne, näiteks CHIKV replikaas replitseerib ning transkribeerib efektiivselt SINV matriits-RNA-d, kuid SINV replikaas CHIKV matriits-RNA-d replitseerida ega transkribeerida ei suuda. See tekitas küsimuse, millised regioonid viiruse genoomis sellist selektiivsust põhjustavad. Selleks konstrueeriti 5' regiooni (5' UTR + nsP1 algus), SG regiooni ning 3' regiooni (3' UTR) hübriidsed SINV/CHIKV matriits-RNA-d ning leiti, et CHIKV matriits-RNA replitseerimiseks ning transkribeerimiseks on SINV replikaasil vaja enda matriitsilt pärinevaid 5' ning SG regioone. Täpsema kaardistamise käigus selgus, et efektiivseks replikatsiooniks on SINV replikaasil vaja enda matriitsilt pärinevat 5' regioonis paiknevat esimest juuksenõelstruktuuri (Lello *et al.*, 2020). Need avastused tekitasid aga uue küsimuse: nimelt, milline osa replikaasist need determinandid matriits-RNA-l ära tunneb? Selleks rekonstrueeriti üheksa ülalmainitud viiruse jaoks kahest funktsionaalsest komponendist koosnevad replikaasid ning viidi taaskord läbi „*mix and match*“ katsed, kus transfekteeriti rakke SINV matriits-RNA-ga ning ühelt viiruselt pärineva P123 ekspressiooniplasmiidiga ning teiselt viiruselt pärineva nsP4 ekspressiooniplasmiidiga. Leiti, et alfaviiruste replikaase on võimalik rekonstrueerida homoloogilistest ning ka heteroloogilistest P123 ja nsP4 komponentidest. Mitme viiruse puhul oli matriits-RNA-d ära tundvaks replikaasi komponendiks nsP4 komponent (Lello *et al.*, 2021; käsikiri ülevaatomisel).

Käesolevas bakalaureusetöös uuritud viiruste ja rakuliinide valik tulenes varasemate projektide andmetest. Varasemalt oli projektidesse kaasatud Uue Maailma alfaviirustest kõigest VEEV. Selleks, et uurida Uue Maailma viiruste replikatsiooni ka teiste viiruste näitel, otsustasime *trans*-replikatsiooni süsteemi konstrueerida ka EEEV jaoks, mis kuulub VEEV-st erinevasse serokompleksi, ning proovida rekonstrueerida EEEV replikaasi samuti erinevatest P123 ja nsP4 komponentidest. Ühekomponentne *trans*-replikatsiooni süsteem (matriits-RNA ekspressiooniplasmiid + P1234 replikaasi ekspresiooniplasmiid) oli EEEV jaoks töö alguseks juba loodud, kuid selle funktsionaalsust ei olnud veel testitud ning kahekomponentset süsteemi (matriits-RNA ekspressiooniplasmiid + P123 ekspressiooniplasmiid + nsP4 ekspressiooniplasmiid) veel konstrueeritud ei olnud.

Töö eesmärkideks kujunesid:

- 1) Testida meie laboris varem konstrueeritud ühekomponentsete (s.t matriits-RNA + P1234 ekspressiooniplasmiidid) EEEV-i *trans*-replikaaside aktiivsust koekultuuris imetaja- ning putukarakkudes.
- 2) Valmistada EEEV kahekomponentse (s.t matriits-RNA + P123 + nsP4 ekspressiooniplasmiidid) *trans*-replikaasi konstruktid ning optimeerida nende kasutamine.
- 3) Uurida EEEV replikaasi funktsionaalsete komponentide võimet moodustada replikaasi komplekse erinevatelt alfaviirustelt pärinevate funktsionaalsete komponentidega.

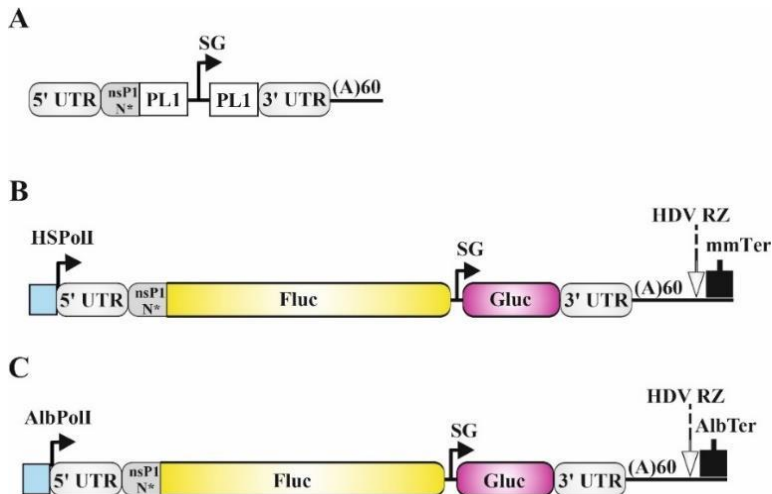
## 2.2 MATERJAL JA METOODIKA

### 2.2.1 EKSPRESSIOONIPLASMIIDIDE KONSTRUEERIMINE

*Trans*-replikatsiooni süsteemi on meie laboris kasutatud mitmete projektide raames ning seetõttu olid ka enamuses töös kasutatud ekspressiooniplasmiididest minu lõputöö tegemise alguseks juba olemas. SINV, BFV, EILV, VEEV, CHIKV, ONNV, RRV, SFV ja MAYV matriits-RNA ekspressiooniplasmiidid, ühekomponentse (P1234) replikaasi ekspressiooniplasmiidid ning kahekomponentse replikaasi (P123 ja nsP4) ekspressiooniplasmiidid on valmistatud minu bakalaureusetöö juhendajate poolt varasemate projektide käigus (Utt *et al.*, 2019; Götte *et al.*, 2020; Lello *et al.*, 2020; Lello *et al.*, 2021, käsikiri ülevaatamisel). Lisaks olid valmistatud veel ka EEEV matriits-RNA ning ühekomponentse (P1234) replikaasi ekspressiooniplasmiidid. EEEV kahekomponentse P123 ja nsP4 replikaasi ekspressioonikonstruktid valmistasin ise.

#### Matriits-RNA ekspressiooniplasmiidide ehitus

Matriits-RNA ekspressiooniplasmiidid on tehtud inimese RNA polümeraas I süsteemi põhiselt. Antud süsteemi konstrukte on üldistavalt nimetatud HSPoII-FG (*Homo Sapiens* RNA polümeraas I promooter ning *Firefly* ja *Gaussia* lutsiferaasi geenide järjestused). Plasmiidis paikneva ekspressioonikasseti ehituse skeem on toodud Joonisel 7. Töös kasutatud matriits-RNA ekspressiooniplasmiidid kannavad nimetusi HSPoII-FG-SINV, HSPoII-FG-BFV, HSPoII-FG-EILV, HSPoII-FG-VEEV, HSPoII-FG-EEEV, HSPoII-FG-CHIKV, HSPoII-FG-ONNV, HSPoII-FG-RRV, HSPoII-FG-MAYV, HSPoII-FG-SFV (Utt *et al.*, 2019; Götte *et al.*, 2020; Lello *et al.*, 2020). Putukarakkude jaoks konstrueeritud matriits-RNA ekspressioonikonstrukti AlbPoII-FG-EEEV (*Aedes albopictus* RNA polümeraas I promooter ning *Firefly* ja *Gaussia* lutsiferaasi järjestused) oli samuti juba varem konstrueeritud minu juhendajate poolt ja erineb imetaja rakkude jaoks konstrueeritud konstrukstist selle poolest, et RNA polümeraas I promooteri ja terminaatori järjestused pärinevad sääselt *Aedes albopictus*.



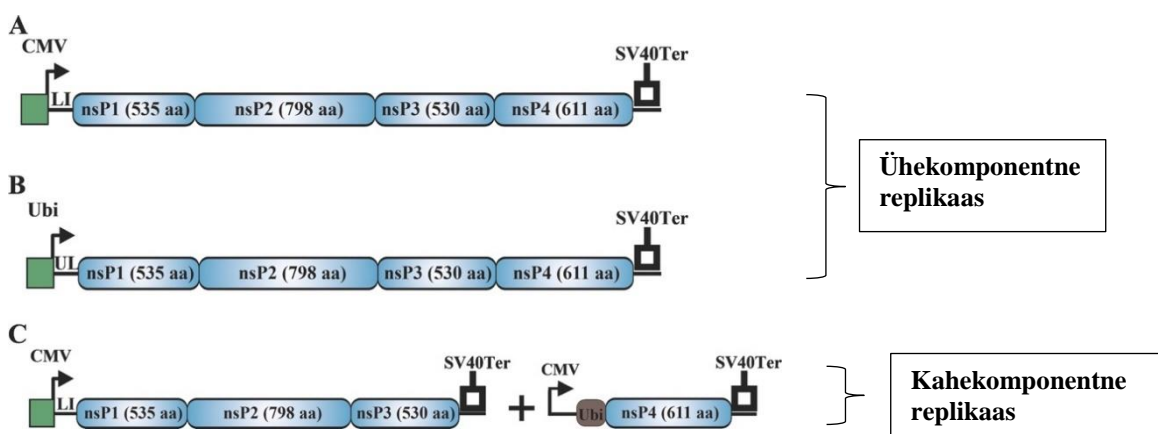
**Joonis 7.** (A) Matriits-RNA ekspressioonikassett, kus nsP1 N\* tähistab nsP1 valku kodeeriva ala algust, PL1 tähistab polülinkerit, milles on restriksiooniensüümide (*ApaI*, *PacI*) äratundmissaidid, SG on viiruse subgenoomne promooter, PL2 tähistab polülinkerit, milles on restriksiooniensüümide (*NotI*, *BgIII*) äratundmissaidid, (A)60 tähistab 60 adeniini jääki; (B) HSPoII-FG matriits-RNA ekspressiooniplasmiid, kus HSPoII tähistab *Homo Sapiens* polümeraas I promooterit, Fluc tähistab *Firefly* lutsiferaasi kodeeriva geeni järjestust, Gluc tähistab *Gaussia* lutsiferaasi kodeeriva geeni järjestust, HVD on hepatiit delta viiruse ribosüüm, mmTer tähistab hiire RNA polümeraas I terminaatorit; (C) AlbPoII-FG matriits-RNA ekspressiooniplasmiid, kus AlbPoII tähistab *Aedes albopictus* polümeraas I promooterit, AlbTer tähistab *Aedes albopictuse* RNA polümeraas I terminaatorit. Joonis pärineb juhendaja Laura Sandra Lello magistritööst. Joonist on kasutatud autori loal.

## Ühekomponentsed (P1234) replikaasi ekspressioonikonstruktid

Ühekomponentse P1234 replikaasi ekspressiooniplasmiidid valmisid samuti varasemate projektide raames minu lõputöö juhendajate poolt (Utt *et al.*, 2019; Götte *et al.*, 2020; Lello *et al.*, 2020). P1234 liitvalku kodeeriva järjestus on paigutatud CMV promooteri kontrolli alla (Joonis 8), seetõttu nimetati neid ekspressiooniplasmiide üldistavalt CMV-P1234 (CMV-P1234-SINV, CMV-P1234-BFV, CMV-P1234-EILV, CMV-P1234-VEEV, CMV-P1234-EEEEV, CMV-P1234-CHIKV, CMV-P1234-ONNV, CMV-P1234-RRV, CMV-P1234-MAYV, CMV-P1234-SFV). Katsetes negatiivse kontrollina kasutatud replikaasi inaktiivseid vorme ekspresseerivad plasmide tähistati kui CMV-P1234<sup>GAA</sup> (CMV-P1234<sup>GAA</sup>-SINV, CMV-P1234<sup>GAA</sup>-BFV, CMV-P1234<sup>GAA</sup>-EILV, CMV-P1234<sup>GAA</sup>-VEEV, CMV-P1234<sup>GAA</sup>-EEEEV, CMV-P1234<sup>GAA</sup>-CHIKV, CMV-P1234<sup>GAA</sup>-ONNV, CMV-P1234<sup>GAA</sup>-RRV, CMV-P1234<sup>GAA</sup>-MAYV, CMV-P1234<sup>GAA</sup>-SFV). Putkarakkudes kasutatud EEEV ühekomponentse replikaasi ekspressiooniplasmiidis on CMV promooter asendatud *Aedes aegypti* polüubikvitiini promooteriga (Joonis 8) ja vastavaid plasmide tähistati kui Ubi-P1234-EEEEV ning Ubi-P1234<sup>GAA</sup>-EEEEV (inaktiivne variant). Need ekspressiooniplasmiidid olid valmistatud varasemate projektide raames juhendajate poolt.

## Kahekomponentsed (P123 ja nsP4) replikaasi ekspressiooniplasmiidid

**P123 ekspressiooniplasmiidid** CMV-P123-SINV, CMV-P123-BFV, CMV-P123-EILV, CMV-P123-VEEV, CMV-P123-EEEEV, CMV-P123-CHIKV, CMV-P123-ONNV, CMV-P123-MAYV, CMV-P123-RRV ja CMV-P123-SFV ning **nsP4 ekspressiooniplasmiidid** CMV-ubinsP4-SINV, CMV-ubinsP4-BFV, CMV-ubinsP4-EILV, CMV-ubinsP4-VEEV, CMV-ubinsP4-EEEEV, CMV-ubinsP4-CHIKV, CMV-ubinsP4-ONNV, CMV-ubinsP4-RRV, CMV-ubinsP4-MAYV ja CMV-ubinsP4-SFV (Joonis 8) olid juba valmistatud varasema projekti raames (Lello *et al.*, 2021, käsikiri ülevaatamisel). Lihtsuse mõttes on edaspidi HS-PolI konstruktid viidatud kui „matriits“ või „matriits-RNA ekspressiooniplasmiid“, CMV-P1234 konstruktid kui „ühekomponentne replikaas“ ning CMV-P123 + CMV-ubinsP4 kui „kahekomponentne replikaas“ (Joonis 8).



**Joonis 8. Skeem imetaja- ja putukarakkudes kasutatavatest ühe- ning kahekomponentse replikaasi ekspressiooniplasmiidist.** (A) Imetajarakkudes kasutatav CMV promooteri (roheline) kontrolli all olev nsP1-4 valke (sinine) kodeeriv järjestus; LI on liiderjärjestus; SV40 on ahvide viiruse 40 hiline polüadenalütsiooni regioon (must); (B) Putukarakkudes kasutatav Ubi promooteri kontrolli all olev nsP1-4 valke kodeeriv järjestus; UI tähistab liiderjärjestust; (C) CMV promooteri kontrolli all olev kahekomponentne replikaas, mis sisaldab nsP1-3 valke ning ubikvitiini järjestusega liidetud nsP4 valku kodeerivaid plasmiide. Joonis pärineb (Lello *et al.*, 2021, käsikiri ülevaatamisel). Joonist on kasutatud autori loal.

## 2.3 REKOMBINANTSETE DNA-de VALMISTAMINE

CMV-P123-EEEEV ja CMV-ubinsP4-EEEEV ekspressiooniplasmiidid valmistasin selle lõputöö raames ise. Nende konstrueerimisel kasutati algkonstruktidena CMV-P1234-EEEEV ekspressiooniplasmiidi. CMV-P123-EEEEV saamiseks eemaldati sellest nsP4 valku kodeeriv järjestus. CMV-ubinsP4-EEEEV saamiseks asendati P123 osa kodeeriva ala ubikvitiini kodeeriva järjestusega kasutades sünteetilisi DNA fragmente (GenScript, USA). Ubikvitiini kodeerivat järjestust kasutati nsP4 ekspressioonikonstruktidest põhjusel, et nsP4 valk lõigatakse

infektsioonitsükli käigus P1234 liitvalgu küljest ning natiivselt algab valk türosiini jäägiga. Sellist valku ei saa rakus ekspresseerida ning seetõttu on nsP4 ekspressiooniplasmiidi nsP4 järjestuse ette lisatud ubikvitiini järjestus, mis rakus posttranslatsiooniliselt nsP4 küljest eemaldatakse.

Rekombinantsete DNAd valmistamisel kasutasin Thermo Fisher Scientific restriksiooniensüüme. Restriksiooniprodukte kontrollisin agaros-elektroforeesi meetodil, kus kasutasin 0,8% agarosgeeli, mida jooksutasin 1x TAE puhvril. Töös puhastatud DNA-d elueerisin nukleasid vabas vees ning nende kontsentratsioonid mõõtsin NanoDrop spektrofotomeetrial.

Inserdina käituvad DNA fragmendid puhastasin agarosgeelist väljalõigatuna *Zymoclean Gel DNA Recovery Kitiga* (Zymo Research). Vektoritena töötavaid DNA fragmente töötlesin lõikeproduktide tagasikloneerumise vältimiseks Thermofisher Scientific aluselise fosfataasiga (1 µl FastAP 1 µg DNA kohta). FastAP-iga töödeldud DNA fragmendid puhastasin *DNA Clean and Concentration Kitiga* (Zymo Research).

Ligatsioonisegude valmistamisel kasutasin „Invitrogen“ T4 DNA ligaasi (Thermo Fisher Scientific), ligatsioonisegusid inkubeerisin ühe tunni jooksul toatemperatuuril.

### **Bakterirakkude transformatsioon kuumašoki meetodil**

Kompetentsete bakterirakkude tüvena kasutasin *Escherichia coli* XL-10. Transformatsiooni protokoll oli järgmine:

- 1) Võtsin kompetentsed rakud jääle sulama 15 minutiks.
- 2) Lisasin 120 µl rakkudele 10 µl ligatsioonisegu.
- 3) Inkubeerisin transformatsioonisegu 30 minutit jääle.
- 4) Järgnevalt tegin transformatsioonisegule kuumašoki 2 minuti vältel temperatuuril 42°C.
- 5) Kuumašoki järel paigutasin segu jääle 2 minutiks.
- 6) Seejärel lisasin rakkudele 0,8 ml SOB söödet, millele oli lisatud 40% glükoosi (suhtega vastavalt 1 ml : 10 µl) ja inkubeerisin segusid 45 minutit 37°C juures.
- 7) Kandsin transformatsioonisegu kanamütsiiniga (25 mg/liitri kohta) SOY-agar plaatidele.
- 8) Inkubeerisin plaate 37°C juures üleöö.

### **Plasmiidse DNA puhastamine**

Transformatsiooni plaatidelt valitud kolooniaid kasvatasin 2 ml SOY söötmes, millele oli lisatud ka kanamütsiini 12.5 mg/liitri kohta. Bakterikultuure kasvatasin loksutil 16-18h 37°C juures. Bakterikultuuridest eraldas DNA kasutades *Plasmid Extraction Mini Kit* (Favorprep). Õigete plasmiidide leidmiseks viisin läbi kontrollrestriksioonid ning restriksioonipildi järgi korrektseid plasmiide kontrollisin Sangeri sekveneerimise meetodil. Sobivaid plasmiide sisaldavad bakterikolooniad kasvatasin 50 ml SOY söötmes (kanamütsiin

12.5 mg/liitri kohta) 37°C juures 16-18h. Suuremas mahus kasvatatud bakteritest eraldasid plasmiidset DNA-d *Endo-free Midipreps Kitiga* (Macherey-Nagel).

### **2.3.1 EKSPERIMENTIDE LÄBIVIIMINE KOEKULTUURIS**

Rakuliini HEK293T (*Human embryonic kidney cells*, inimese embrüonaalsed neerurakud) kultiveerisin DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco) söötmes, millele oli lisatud 10% iFCS (inaktiveeritud veise loote seerumit). U2OS wt (*Human osteosarcoma cells*, inimese osteosarkoomi epiteelkoe päritolu rakud, edaspidi U2OS rakud) ning U2OS G3BP KO (*G3BP knock-out*, edaspidi KO rakud) rakuliine kasvasin IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, Gibco) söötmes, millele oli samuti lisatud 10% iFCS. Mõlemaid rakuliine kultiveerisin 37°C juures ja 5 % CO<sub>2</sub> atmosfääris. C6/36 (*Aedes albopictus* rakud) kultiveerisin Leibowitz L15 söötmes (Corning), millele lisasin 10% iFCS. C6/36 rakke kasvasin 28°C juures ilma täiendava CO<sub>2</sub> lisamata. U2OS ning KO rakkudega viisin katsed läbi 12-augusel plaadil, HEK293T ning C6/36 rakkudega 96-augusel plaadil.

#### **Transfektsiooni protokoll 96-augusel plaadil HEK293T ning C6/36 rakkudega**

Kõik transfektsioonid on läbi viidud kolmes paralleelis kahel sõltumatul korral. Transfektsioonide läbiviimisel kasutasin Lipofectamine LTX ja PLUS reagente (Thermo Fisher Scientific) ning transfektsioonid viisin läbi kasutades tootja poolt ette antud protokolle. HEK293T rakke külvasin 96-augusele plaadile 35 000 rakku ühe augu kohta ning C6/36 rakke külvasin 96-augusele plaadile 30 000 rakku ühe augu kohta. Transfektsiooni protokoll nägi välja järgmine:

- 1) Valmistasin ette DNA segu. Matriits-RNA, P1234, P1234<sup>GAA</sup> ning P123 ekspressiooniplasmide kasutasin igat ühte 50 ng ning ubinsP4 ekspressiooniplasmide kasutasin P123:nsP4 1:1 molaarses vahekorras. Plasmiidide segu mahu viisin veega 10 µl-ni.
- 2) Valmistasin 90 µl OPTI-MEM- i (Gibco) ja 0,4 µl PLUS-i segu.
- 3) Lisasin OPTI-MEM + PLUS segule 10 µl DNA-de segu.
- 4) Valmistasin 98,2 µl OPTI-MEM-i ja 1,4 µl Lipofectamine LTX segu ning lisasin selle DNA + OPTI-MEM + PLUS segule juurde.
- 5) Inkubeerisin reaktsioonisegu 5 min toatemperatuuril.
- 6) Lisasin transfektsioonisegule 400 µl DMEM või L15 söödet.
- 7) Eemaldasid rakkudelt söötme ning kandsid transfektsioonisegud rakkudele 150 µl kaupa.
- 8) HEK293T rakke inkubeerisin rakke 18h 37°C ning EILV plasmide sisaldavaid segusid inkubeerisin ka 48h jooksul 28°C juures. C6/36 rakke inkubeerisin 48h jooksul 28°C juures.

- 9) 18h või 48h möödudes lüüsisin rakud ja mõõtsin replikatsiooni ja transkriptsiooni efektiivsust tähistavad Fluc ja Gluc aktiivsused.

### **Transfektsiooni protokoll 12-augusel plaadil U2OS ja KO rakkudega**

Kõik transfektsioonid on läbi viidud kolmes sõltumatus korduses kasutades Lipofectamine LTX ja PLUS reagente. U2OS ning KO rakke külvasin 12-augusele plaadile 200 000 rakku ühe augu kohta. Transfektsiooni protokoll oli järgmine:

- 1) Valmistasin ette DNA segud. Matriits-RNA, P1234 ning P1234<sup>GAA</sup> ekspressiooniplasmiide kasutasin 1 µg igat ühte ning plasmiidide segu mahu viisin veega 10 µl-ni.
- 2) Valmistasin 30 µl OPTI-MEM-i (Gibco) ja 1 µl PLUS-i segu.
- 3) Lisasin OPTI-MEM + PLUS segule 10 µl DNA-de segu.
- 4) Valmistasin 30 µl OPTI-MEM-i ja 3,5 µl Lipofectamine LTX segu ning lisasin selle DNA + OPTI-MEM + PLUS segule juurde.
- 5) Inkubeerisin reaktsioonisegu 5 min toatemperatuuril.
- 6) Eemaldas rakkudelt söötme ning lisasin 800 µl värsket IMDM söödet.
- 7) Pärast inkubeerimist lisasin transfektsioonisegu rakkudele ning inkubeerisin rakke 18h 37°C juures.
- 8) 18h tunni möödudes lüüsisin rakud ning mõõtsin replikatsiooni ja transkriptsiooni efektiivsust tähistavad Fluc ja Gluc aktiivsused.

### **Lutsiferaaside aktiivsuste mõõtmine**

Lutsiferaaside aktiivsuste mõõtmiseks rakulüsaadist kasutasin *Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit*-i (Promega) ning sama firma poolt toodetud Glomax luminomeetrit. Protokoll on toodud välja ühe augu kohta 96-augusel plaadil, sulgudes on toodud 12-auguse plaadi augu kohta kasutatud kogused.

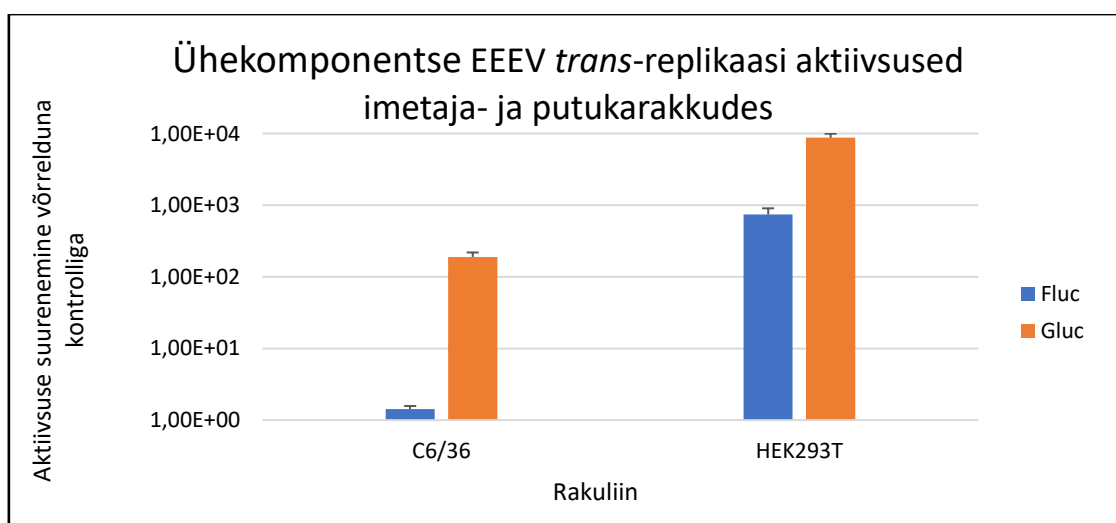
- 1) Esmalt eemaldas rakkudelt söötme ning lisasin 20 µl (250 µl) 1x PLB (*Passive Lysis Buffer*, Promega) lüüsipuhvrit. Loksutasin plaate 400 rpm juures 15 minutit.
- 2) Seejärel segasin kokku 50 µl (20 µl) LARII reagenti (*Luciferase Assay Reagent II*) ja 10 µl (4 µl) rakulüsaati ning mõõtsin Fluc aktiivsust.
- 3) Seejärel lisasin 50 µl (20 µl) 1x SG reagenti (*Stop&Glo* puhver + 50x *Stop&Glo* substraat) ning mõõtsin Gluc aktiivsust.

## 2.4 TULEMUSED JA ARUTELU

Kõik siin töös kasutatud matriits-RNA ekspresiooniplasmiidid sisaldasid Fluc ning Gluc markergeene kodeerivaid järjestusi. Kuna Fluc markervalk on ekspresseeritud viiruse genoomse promooteri all ning Gluc markervalk viiruse SG promooteri all, siis on lihtsuse mõttes edaspidi Fluc signaalist räägitud kui replikatsiooni tugevusest ning Gluc signaalist räägitud kui transkriptsiooni tugevusest. Replikatsiooni ja transkriptsiooni tugevust hinnati võrreldes uuritava replikaasi poolt indutseeritud markerite aktiivsuseid markerite aktiivsusega negatiivses kontrollkatses.

### 2.4.1 ÜHEKOMPONENTSE EEEV *TRANS*-REPLIKAASI AKTIIVSUSE ANALÜÜS IMETAJA- NING PUTUKARAKKUKES

Ühekomponentse EEEV *trans*-replikatsiooni süsteemi funktsionaalsust ei olnud varem koekultuuri kontekstis veel testitud. Seetõttu uurisin esmalt, kas see on imetaja- ning putukarakkudes üldse aktiivne. Selleks transfekteerisin HEK293T ning C6/36 rakke vastavalt HSPoII-FG-EEEV + CMV-P1234-EEEV ning AlbPoII-FG-EEEV + Ubi-P1234-EEEV ekspresiooniplasmiididega, negatiivsete kontrollidena kasutasin vastavalt inaktiivseid CMV-P1234<sup>GAA</sup>-EEEV ning Ubi-P1234<sup>GAA</sup>-EEEV ekspresiooniplasmiide. Selgus, et nii imetaja- kui ka putukarakkude kompetentsed EEEV *trans*-replikaasid on aktiivsed (Joonis 9). EEEV *trans*-replikaas näitas inimese rakkudes üles kõrget replikatsiooni ning transkriptsiooni efektiivsust. Putukarakkudes ilmsid mõnevõrra väiksemad replikatsiooni ning transkriptsiooni aktiivsused, kuid sama on varem täheldatud ka teiste alfaviiruste puhul (Lello *et al.*, 2020). Seega näitavad need tulemused, et kasutatud replikaas ja matriits on aktiivsed ning neid võib edaspidi kasutada EEEV replikatsiooni uurimisel.

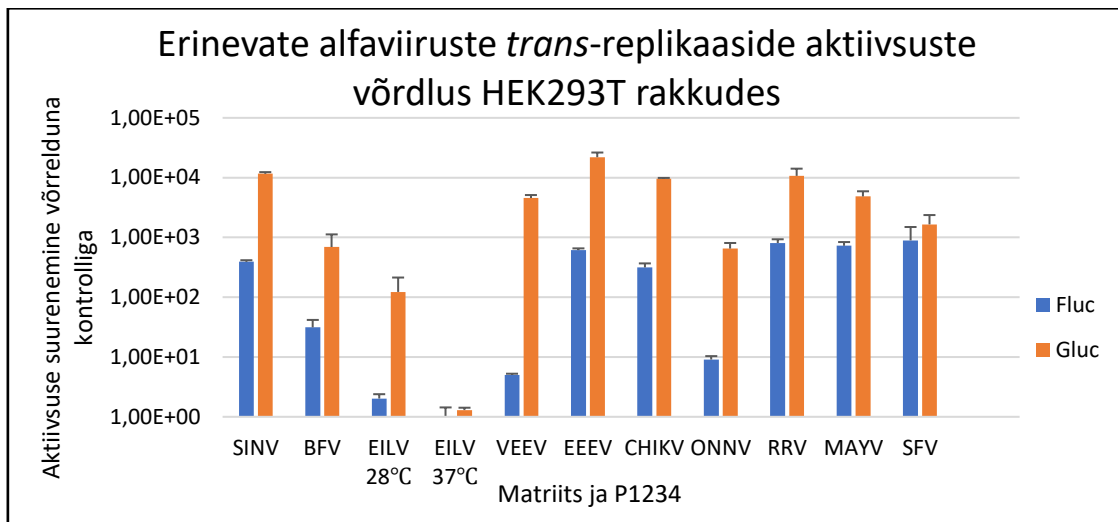


Joonis 9. Ühekomponentse EEEV *trans*-replikaasi aktiivsused imetaja- ja putukarakkudes. HEK293T ning C6/36 rakke transfekteerisin 96-auguse plaadi formaadis vastavalt HSPoII-FG-EEEV + CMV-P1234-EEEV ning

AlbPolI-FG-EEEV + Ubi-P1234-EEEV ekspressiooniplasmiididega, kus plasmiidide suhe oli 1:1. Transfektsiooni järgselt inkubeerisin C6/36 rakke 48h 28°C juures ning HEK293T rakke 18h 37°C juures. Inkubatsiooniaja möödudes mõõtsin Fluc ja Gluc markergeeni aktiivsust. Tulemused on normaliseeritud negatiivse kontrollina kasutatud vastavate P1234<sup>GAA</sup> suhtes. Katse teostas kolmes paralleelis kahel sõltumatul korral. Joonisel on näidatud kolmes paralleelis teostatud katse keskmised ja standardhälve.

#### **2.4.2 EEEV TRANS-REPLIKAASI EFEKTIIVSUSE VÕRDLUS TEISTE ALFAVIIRUSTE TRANS-REPLIKAASIDEGA**

Varasemad projektid uurimaks alfaviiruste replikatsiooni *trans*-replikatsiooni süsteemi abil on meie laboris läbi viidud kasutades SFV antigeensesse kompleksi kuuluvaid (CHIKV, ONNV, MAYV, RRV ning SFV) ja erinevatesse SFV kompleksi välistesse kompleksidesse kuuluvaid viiruseid (VEEV, SINV, EILV, BFV) (Götte *et al.*, 2020; Lello *et al.*, 2020). Käesoleva bakalaureusetöö üheks eesmärgiks oli jagada EEEV replikaas kaheks funktsionaalseks komponendiks (P123 + nsP4) ning uurida nende komponentide võimet moodustada heteroloogilisi replikatsioonikomplekse teiste alfaviiruste replikaasi komponentidega. Selleks oli vaja esmalt kontrollida, kas EEEV *trans*-replikaas töötab sama efektiivselt kui eelnevate uuringute raames konstrueeritud *trans*-replikaasid. Selleks viisin läbi katse, kus transfekteeerisin HEK293T rakke HSPolI-FG-EEEV ning CMV-P1234-EEEV ekspressiooniplasmiididega (edaspidi homoloogiline kombinatsioon) ning homoloogiliste kombinatsioonidega SINV, BFV, EILV, VEEV, CHIKV, ONNV, RRV, MAYV ning SFV matriits-RNA ja replikaasi ekspressiooniplasmiididest. Tulemused näitasid, et EEEV *trans*-replikaasi aktiivsused on võrreldavad teiste *trans*-replikaasidega (Joonis 10). Replikatsiooni puhul ilmnes, et EEEV replikatsiooni aktiivsusest on kõrgemad ainult RRV, MAYV ning SFV replikatsioonid ning transkriptsiooni puhul töötab EEEV replikaas teiste uuritud viiruste replikaasidest efektiivsemalt. Huvitav on see, et VEEV replikatsioon jäi EEEV omast väga palju madalamale, samas kui transkriptsiooni tasemed olid küllaltki sarnased. VEEV *trans*-replikaasi madalat replikatsiooni aktiivsust on täheldatud ka varasemates uurimustes (Lello *et al.*, 2020). EEEV *trans*-replikaasi sarnased efektiivsused võrreldes teiste *trans*-replikaasidega näitasid, et EEEV süsteem on efektiivne ning selle P123 ja nsP4 komponente saab kasutada alfaviiruste uurimiseks ka heteroloogilisi kombinatsioone kasutades.

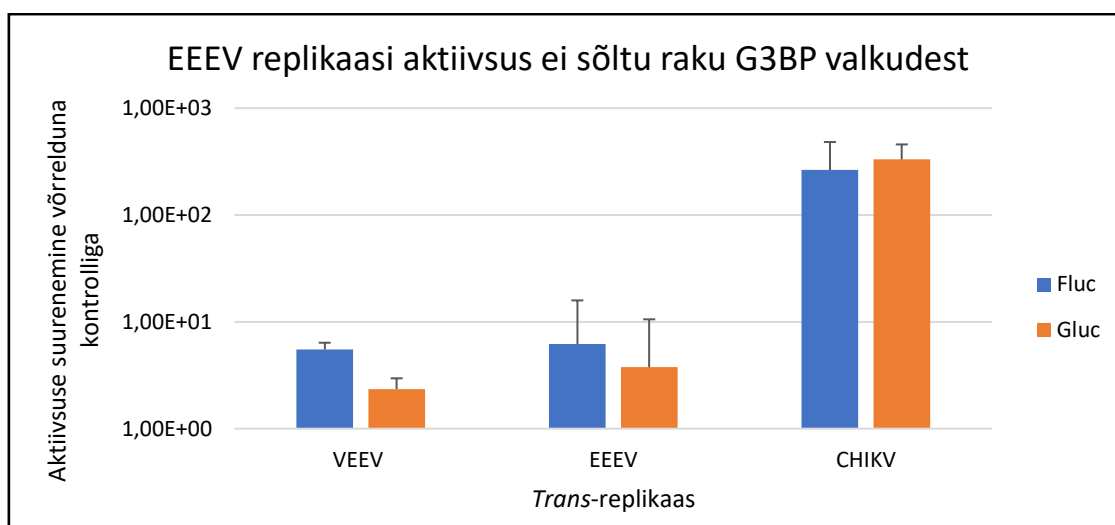


**Joonis 10. Erinevate alfaviiruste *trans*-replikaaside aktiivsuste võrdlus HEK293T rakkudes.** Transfekteeerisin HEK293T rakke homologiliste HSPoII-FG ja CMV-P1234 ekspressiooniplasmiidide kombinatsioonidega. Transfektsiooni järgselt inkubeerisin rakke 18h 37°C juures (EILV puhul ka 48h 28°C juures). Inkubatsiooniaja möödudes mõõtsin Fluc ja Gluc markergeeni aktiivsust. Tulemused on normaliseeritud negatiivse kontrollina kasutatud vastavate P1234<sup>GAA</sup> ekspressioonikonstruktide suhtes. Katse teostas kolmes paralleelis kahel sõltumatul korral. Joonisel on näidatud kolme paralleeli keskmised ja standardhälbed.

### 2.4.3 EEEV REPLIKATSIOONI EFEKTIIVSUSE SÕLTUVUS G3BP VALGUST

Vana ja Uue Maailma viirustel on erinev tundlikkus peremeesraku G3BP valkude olemasolu suhtes. Paljudel Vana Maailma viirustel, nagu näiteks CHIKV, langeb replikatsiooni aktiivsus G3BP valgu puudumisel oluliselt, sest CHIKV nsP3 valgu HVD seondub just selle perekonna valkudega (Götte *et al.*, 2020; Frolov *et al.*, 2017). Teisalt, näiteks Uue Maailma viiruste hulka kuuluva VEEV replikatsiooni aktiivsust G3BP valkude puudumine ei mõjuta, kuna VEEV nsP3 seondub hoopis FXR perekonna valkudega. EEEV on ainus Uue Maailma viirus, mis seondub nii G3BP kui ka FXR perekonna valkudega (Frolov *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2016). Järgnevalt tahtsime *trans*-replikatsiooni süsteemi abil kontrollida, kuidas mõjutab G3BP puudumine EEEV replikatsiooni. Selleks transfekteeerisin U2OS ning G3BP KO rakke EEEV, VEEV ning CHIKV matriits-RNA ning replikaaside ekspressiooniplasmiididega. VEEV käitus siin katses kui positiivne kontroll, millel G3BP sõltuvust ei esine ning CHIKV käitus kui negatiivne kontroll, mis on G3BP sõltuv. Replikatsiooni ning transkriptsiooni tulemused esitasin sõltuvusena G3BP deletsioonist ehk jagasin U2OS rakkudes saadud tulemused läbi tulemustega, mis sain KO rakkudest (wt/KO) (Joonis 11). Oodatult põhjustas G3BP valkude puudumine CHIKV replikatsiooni ning transkriptsiooni aktiivsuste järsu languse, samal ajal kui VEEV replikaasi aktiivsuseid G3BP puudumine negatiivselt ei mõjutanud. Selles katses käitus EEEV sarnaselt VEEV-ga, mis näitab, et EEEV replikaasi aktiivsuse tagamiseks piisab FXR valkude olemasolust. Samuti kinnitavad selle katse tulemused, et EEEV ning ka teised *trans*-

replikatsiooni süsteemid on usaldusväärsed uurimisvahendid, sest *trans*-replikaasi katses saadud fenotüüp vastab kirjanduses vastavale viiruste kontekstis nähtule (Kim *et al.*, 2016; Frolov *et al.*, 2017).



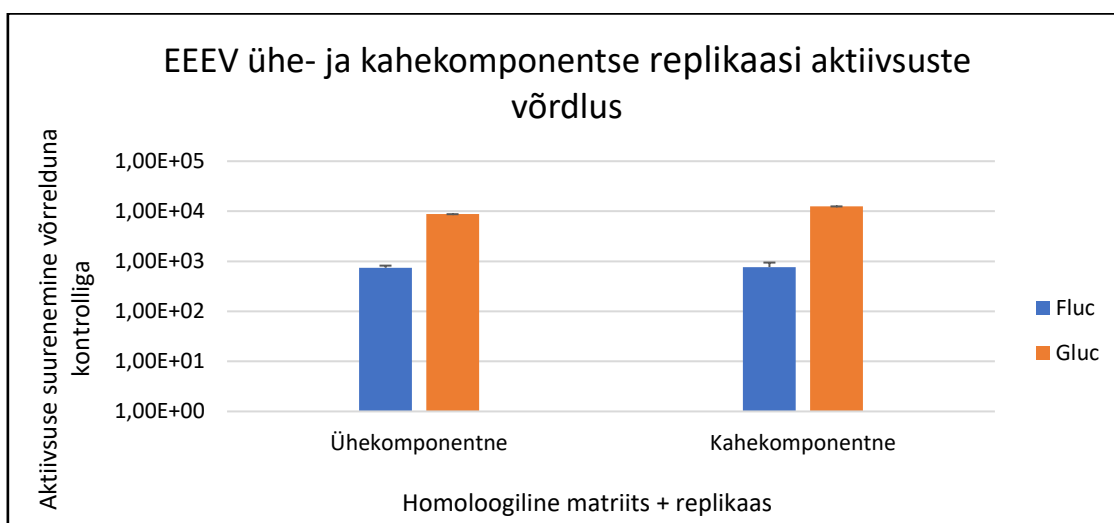
**Joonis 11. EEEV replikaasi aktiivsus ei sõltu raku G3BP valkudest.** Transfekteerisin U2OS ning G3BP KO rakke 12-auguse plaadi formaadis HSPoII-FG-VEEV/EEEV/CHIKV ekspresiooniplasmiididega ning neile homologiliste P1234 ekspresioonikonstruktidega. Inkubatsiooniaja möödudes mõõtsin Fluc ja Gluc markevalkude aktiivsust. Tulemused on normaliseeritud vastavate viiruste P1234<sup>GAA</sup> suhtes. Andmed on esitatud sõltuvusena G3BP deletsioonist ehk wt U2OS rakkudes saadud aktiivsused on jagatud läbi KO rakkudes saadud aktiivsustega. Katse on teostatud kolmes korduses. Joonisel on näidatud kolme korduse keskmised ja standardhälbed.

#### 2.4.4 KAHEKOMPONENTSE EEEV TRANS-REPLIKAASI AKTIIVSUSE ANALÜÜS

Varasemate projektide käigus on meie laboris uuritud kahest homologilisest või heteroloogilisest komponendist koosnevate replikaaside aktiivsuseid üheksa erineva alfaviiruse näitel (Lello *et al.*, 2021; käsikiri ülevaatamisel). Kuna EEEV kuulub serokompleksi, mida polnud varasemalt uuritud, otsustasime jagada ka EEEV replikaasi funktsionaalseteks P123 ning nsP4 komponentideks. Sellise rekonstrueeritava replikaasi potentsiaalne funktsionaalsus annaks hea võimaluse uurida ohutumalt ning efektiivsemalt BSL3 ohuklassi kuuluva EEEV RNA replikatsiooni.

P123 ning nsP4 komponentideks jagatud EEEV replikaasi funktsionaalsust testisin HEK293T rakkudes, kuhu transfekteerisin HSPoII-FG-EEEV, CMV-P123-EEEV ning CMV-ubinsP4-EEEV ekspresiooniplasmiidid 1:1:1 suhtes. Negatiivse kontrollina kasutasin CMV-P123-EEEV ning CMV-ubinsP4-EEEV asemel inaktiivset CMV-P1234<sup>GAA</sup>-EEEV ekspresiooniplasmiidi. Kahekomponentse süsteemi aktiivsuse hindamiseks kasutasin

positiivse kontrollina ühekomponentset EEEV süsteemi (HSPoII-FG-EEEV + CMV-P1234-EEEV). Mõõdetud Fluc ning Gluc signaalid näitasid, et EEEV kahekomponentne replikaas töötab väga efektiivselt (Joonis 12). Replikatsiooni puhul oli kahekomponentse replikaasi aktiivsus ühekomponentse omast isegi mõnevõrra kõrgem, samas kui transkriptsioonil oli veidi kõrgem ühekomponentse replikaasi signaal, samas olid vahed mõlemal juhul väga väikesed. EEEV replikaasi edukas jagamine P123 ning nsP4 komponentideks annab võimaluse uurida EEEV replikaasi kompleksi moodustumise täpsemaid mehhanisme ning võimaldab uurida EEEV replikaasi komponentide ühilduvust teistelt alfaviirustelt pärinevate P123 ja nsP4 komponentidega.



**Joonis 12. EEEV ühe- ja kahekomponentse replikaasi aktiivsuste võrdlus.** Transfekteerisin HEK293T rakke HSPoII-FG-EEEV + CMV-P1234-EEEV ekspressiooniplasmiididega suhtes 1:1 või HSPoII-FG-EEEV + CMV-P123-EEEV + CMV-ubinsP4-EEEV ekspressioonikonstruktidega suhtes 1:1:1. Transfektsiooni järgselt inkubeerisin rakke 18h 37°C juures. Inkubatsiooniaja möödudes mõõtsin Fluc ja Gluc aktiivsused. Tulemused on normaliseeritud negatiivse kontrollina kasutatud EEEV P1234<sup>GAA</sup> suhtes. Katse on teostatud kolmes paralleelis, kahel sõltumatul korral. Joonisel on näidatud kolme paralleeli keskmised ja standardhälbed.

## 2.4.5 KAHEKOMONENTSE EEEV *TRANS*-REPLIKAASI KOMPONENTIDE OPTIMAALSE VAHEKORRA MÄÄRAMINE

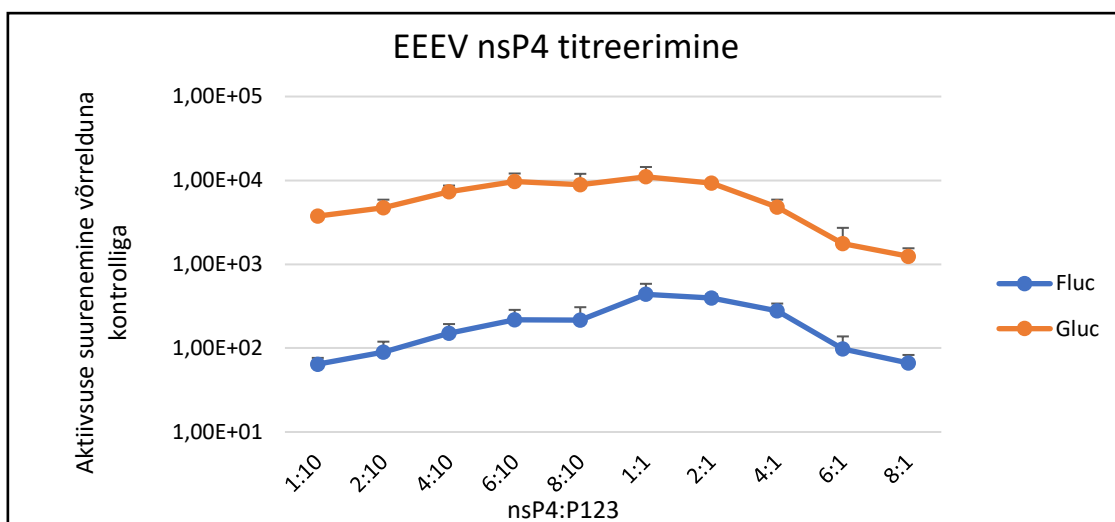
On teada, et nsP4 valku sisaldavat P1234 liitvalku sünteesitakse viiruse infektsioonitsükli käigus võrreldes P123 liitvalguga umbes 10-korda vähem. Lisaks sellele on nsP4 ebastabiilne ja selle kogus nakatunud rakkudes võib olla muude nsP-de kogusest isegi sadu kordi madalam. *Trans*-replikaasi kasutamisel on see vahekord lihtsasti muudetav võimaldades uurida, milline nsP4 ja P123 komponentide vahekord rekonstrueeritud replikaasis on replikatsiooni ja transkriptsiooni seisukohast kõige efektiivsem. Varasemad uuringud on näidanud, et kõikidel uuritud alfaviirustel on replikatsiooni limiteerivaks faktoriks nsP4 kogus, mida suurendades

suureneb ka replikatsiooni ja transkriptsiooni efektiivsus (Lello *et al.*, 2021; käsikiri ülevaatomisel). Samas, kui viia rakkudesse rohkem P123 komponenti kaitub see pigem replikaasi aktiivsusele inhibeerivalt. Uurimaks, kas sama kehtib ka EEEV replikaasi puhul viisin lbi funktsionaalsete komponentide titreerimise katsed. Kuna nsP4 on alfaviiruste RdRp, siis viisin esmalt lbi EEEV nsP4 komponendi titreerimise. Katse jooksul hoidsin P123 komponendi koguse konstantsena ning suurendasin nsP4 kogust P123 suhtes vahekorras 1:10 kuni vahekorran 8:1 (Tabel 1).

**Tabel 1. EEEV nsP4 titreerimisel kasutatud nsP4 : P123 ekspressiooniplasmiidide molaarsed vahekorrad.**

nsP4 : P123 (200 ng) molaarne vahekord	nsP4 kogus (ng) 200 ng P123 kohta
1:10	15
2:10	30
4:10	60
6:10	90
8:10	115
1:1	146
2:1	292
4:1	584
6:1	879
8:1	1168

Sarnaselt varasemates projektides saadud tulemustele ilmnes ka EEEV puhul, et nsP4 koguse suurendamine rakus tdstab replikatsiooni ning transkriptsiooni aktiivsuseid (Joonis 13). Samas, erinevalt kdgist seni uuritud alfaviirustest saavutas EEEV replikaasi efektiivsus maksimumi nsP4:P123 ekspressiooniplasmiidide 1:1 vahekorra puhul, sellest edasi (suhetest 2:1 kuni suhteni 8:1) ilmnes replikaasi aktiivsuse vchenemine. Replikatsiooni ning transkriptsiooni efektiivsuse kasv nsP4 koguse suurenemisel on loogiline arvestades seda, et nsP4 on alfaviiruste RdRp. Asjaolu, et nsP4 koguse suurendamine alates nsP4:P123 1:1 suhtest kuni 8:1 suhteni omab replikatsioonile ning transkriptsioonile inhibeerivat efekti viitab sellele, et suured nsP4 kogused on EEEV RNA snteesile mingil pthjusel mitte optimaalsed.



**Joonis 13. EEEV nsP4 titreerimine.** Transfekteerisin HEK293T rakke 96-auguse plaadi formaadis HSPoll-FG-EEEV + CMV-P123-EEEV + CMV-ubinsP4-EEEV ekspressiooniplasmiididega, kus nsP4 kogus varieerus ning P123 kogus püsis konstantsena kogu katse vältel. Transfektiooni järgselt inkubeerisin rakke 18h 37°C juures. Inkubatsiooniaja möödudes mõõtsin Fluc ja Gluc aktiivsuseid. Tulemused on normaliseeritud negatiivse kontrollina kasutatud EEEV P1234<sup>GAA</sup> suhtes. Katse teostas kolmes korduses, kahel sõltumatul korral. Joonisel on näidatud kolme korduse keskmised ja standardhälbed.

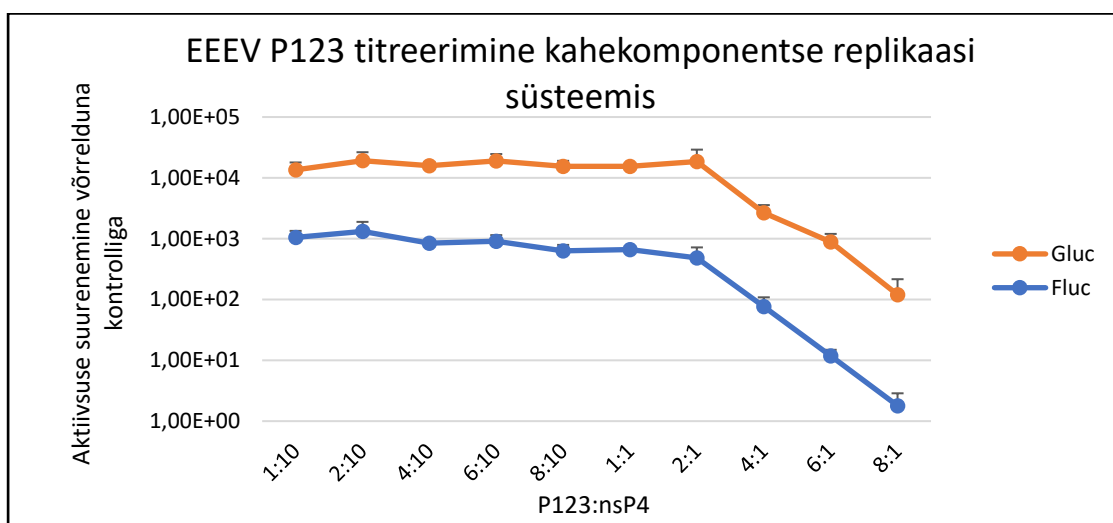
Järgnevalt viisin läbi ka EEEV replikaasi P123 komponendi titreerimise. P123 komponendi titreerimisel testisin erinevaid P123 koguseid konstantse nsP4 komponendi suhtes (Tabel 2).

**Tabel 2. EEEV P123 titreerimiskatses kasutatud P123 : nsP4 ekspressiooniplasmiidide molaarsed suhted.**

P123 : nsP4 (146 ng) molaarne vahekord	P123 kogus (ng) 146 ng nsP4 kohta
1:10	20
2:10	40
4:10	80
6:10	120
8:10	160
1:1	200
2:1	400
4:1	800
6:1	1200
8:1	1600

Saadud tulemused näitsid, et sarnaselt teistele alfaviirustele (Lello *et al.*, 2021, käsikiri ülevaatomisel) ei ole ka EEEV puhul P123 komponent replikatsiooni ning transkriptsiooni

aktiivsust limiteerivaks komponendiks (Joonis 14). P123 osakaalu suurendamine P123:nsP4 suhtelt 1:10 kuni suhteni 1:1 ei oma replikatsioonile ning transkriptsioonile efektiivsust tõstvat mõju. P123:nsP4 vahekorra suurendamine vahekorrast 1:1 kuni suhteni 8:1 omab replikaasi efektiivsusele hoopis tugevalt inhibeerivat mõju. See efekt võib olla põhjustatud mõne ns valgu tsütotoksilisusest rakkudele, kuid võib olla põhjustatud ka suure DNA hulga tsütotoksilisest toimest. Võttes arvesse nsP4 hulga optimeerimisel saadud tulemusi on siiski loogilisem, et inhibeerivat efekti põhjustab siiski just P123 ülehulk nsP4 suhtes. Sisuliselt annavad mõlemad katsed väga sarnase sõltuvuse P123:nsP4 vahekorrast ja näitavad, et optimaalsemaks suhteks on P123:nsP4 ekspresiooniplasmiidide vahekord 1:1.



**Joonis 14. EEEV P123 titreerimine kahekomponentse replikaasi süsteemis.** Transfekteerisin HEK293T rakke 96-auguse plaadi formaadis HSPoII-FG-EEEEV + CMV-P123-EEEEV + CMV-ubinsP4-EEEEV ekspresiooniplasmiididega, kus P123 kogus varieerus ning nsP4 kogus püsis konstantsena kogu katse vältel. Transfektiooni järgselt inkubeerisin rakke 18h 37°C juures., Inkubatsiooniaja möödudes mõõtsin Fluc ja Gluc aktiivsust. Katse tulemused on normaliseeritud negatiivse kontrollina kasutatud EEEV P1234<sup>GAA</sup> suhtes. Katse teostasin kolmes korduses, kahel sõltumatal korral. Joonisel on näidatud kolme korduse keskmised ja standardhälbed.

Kokkuvõttes näitasid teostatud katsed, et ka EEEV puhul on nsP4 hulk replikatsiooni ning transkriptsiooni limiteerivaks komponendiks. Mõnevõrra ootamatuks osutus nsP4 ülehulga inhibeeriv mõju replikaasi aktiivsusele. Siiski säilitas EEEV replikaas kõrge aktiivsuse erinevate nsP4:P123 vahekordade puhul. Kuna aktiivsus oli kõrgeim 1:1 vahekorra puhul, otsustasin edasistes kahekomponentse replikaasiga läbiviidavates katsetes kasutada P123 ning nsP4 komponente ekspresseerivaid plasmiide suhtes 1:1.

## 2.4.6 FUNKTSIONAALSETE REPLIKAASIDE MOODUSTAMINE HETEROLOOGILISTEST REPLIKAASIDE KOMPONENTIDEST

Varasemad uurimused on näidanud, et mitmed alfaviirused suudavad efektiivselt moodustada heteroloogilisi replikatsioonikomplekse, kus P123 pärineb ühelt ning nsP4 teiselt alfaviirusest. Siiski, oleme ka näinud, et mõnele viirusele kuuluvad komponendid funktsionaalseid heteroloogilisi kombinatsioone moodustada ei suuda. Selliste viiruste hulka kuuluvad näiteks SINV ning VEEV, kelle P123 ei moodusta efektiivselt töötavat replikatsioonikompleksi mitte ühegi heteroloogilise nsP4-ga ja BFV, mille nsP4 ei sobi kokku ühegi heteroloogilise P123 komponendiga (Lello *et al.*, 2021, käsikiri ülevaatomisel). Kuna EEEV kuulub seni uuritud alfaviirustest erinevasse kompleksi, oli järgnevalt oluline uurida EEEV P123 ning nsP4 komponentide ühilduvust teistelt alfaviirustelt pärit P123 ning nsP4 komponentidega. Selline heteroloogiliste replikaaside katsetamine aitab uurida ning mõista, et milline replikaasi komponent tunneb matriitsil ära replikatsiooniks ning transkriptsiooniks vajalikud determinandid ning mis tingimustel moodustavad erinevatelt alfaviirustelt pärinevad P123 ja nsP4 komponendid aktiivseid replikatsioonikomplekse.

Järgnevalt viisin läbi nii-öelda „*mix and match*“ katsed, kus kombineerisin erinevatelt viirustelt pärit P123 ning nsP4 komponente. Matriits-RNA ekspresiooniplasmiididena kasutasin katsetes EEEV või SINV matriitse ekspresseerivaid plasmiide:

- EEEV matriitsi kasutasin selleks, et näha, kas EEEV P123 või nsP4 komponendil esineb kindel eelistus enda homoloogilise matriitsi suhtes.
- SINV matriitsi kasutasin selleks, et välistada EEEV matriitsist tulenevaid võimalikke kompensatoorseid efekte EEEV P123 ning nsP4 komponentidega heteroloogiliste replikatsioonikomplekside moodustumisel. Lisaks, varasemalt oli meie laboris näidatud, et SINV matriits on alfaviiruste replikaaside jaoks universaalne, s.t. seda suudavad efektiivselt replitseerida ning transkribeerida paljud teiste alfaviiruste replikaasid (Lello *et al.*, 2020). Kuna oleme SINV matriitsi kasutanud ka muudes replikatsioonikomplekside moodustamist käsitlevates projektides, võimaldab SINV matriitsi kasutamine võrrelda selles projektis saadud tulemusi muudes töödes saadud tulemustega.

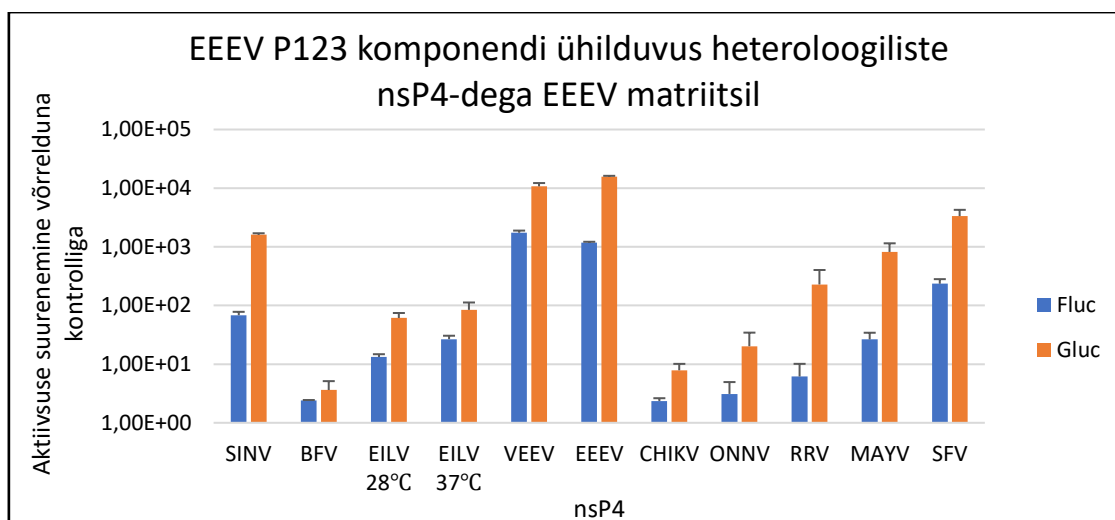
Heteroloogiliste replikaasi komponentide ühildavuse uurimiseks transfekteerisin HEK293T rakke järgnevate kombinatsioonidega ekspresiooniplasmiididest:

- 1) EEEV või SINV matriits-RNA ekspresiooniplasmiid + EEEV P123 ekspresiooniplasmiid + 10-lt erinevalt alfaviirustelt pärinevad nsP4 ekspresiooniplasmiidid.

2) EEEV või SINV matriits-RNA ekspressiooniplasmiid + EEEV nsP4 ekspressiooniplasmiid + 10-lt erinevalt alfaviiruselt pärinevad P123 ekspressiooniplasmiidid.

**EEEV P123 komponendi kokkusobivus heteroloogiliste nsP4 komponentidega sõltub kasutatavast matriits-RNast.**

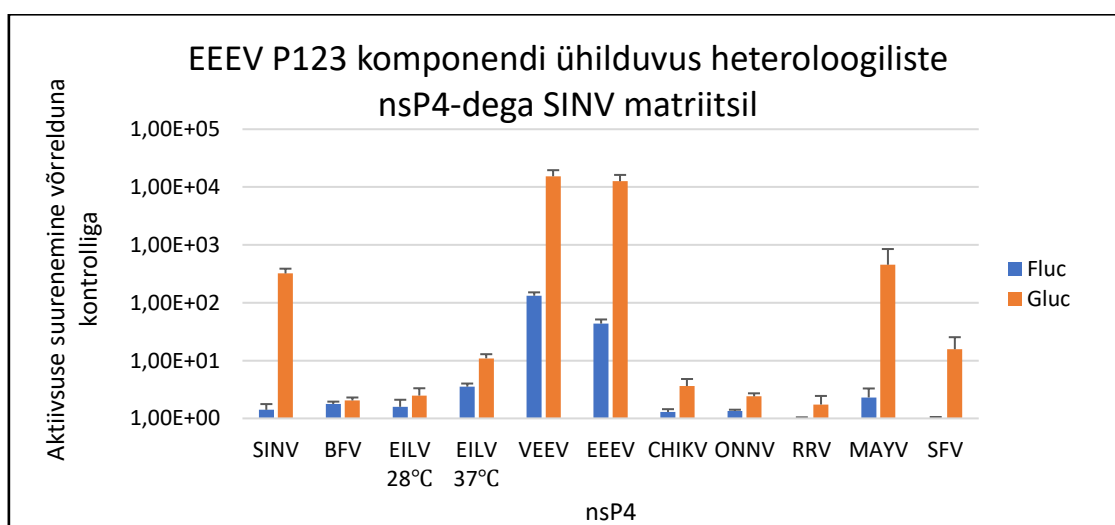
Esmalt analüüsisin EEEV P123 komponendi võimet moodustada funktsionaalseid replikaase heteroloogiliste nsP4-dega. Tulemustest selgus, et EEEV matriitsi kasutamisel moodustab EEEV P123 aktiivseid replikatsioonikomplekse enamike kasutatud viiruste nsP4-dega (Joonis 15). Peale omaenda homoloogilise nsP4 moodustab EEEV P123 väga efektiivselt funktsionaalsed replikaasid ka VEEV, SINV ning SFV nsP4-dega. Kõige kehvemini töötavad replikaasid moodustab EEEV P123 BFV, CHIKV ning ONNV nsP4-dega.



**Joonis 15. EEEV P123 komponendi ühilduvus heteroloogiliste nsP4-dega EEEV matriitsil.** Transfekteerisin HEK293T rakke 96-auguse plaadi formaadis HSPoII-FG-EEEV + CMV-P123-EEEV ning erinevate viiruste CMV-ubinsP4 ekspressiooniplasmiididega. Transfektiooni järgselt inkubeerisin rakke 18h 37°C juures (EILV puhul 48h 28°C juures). Inkubatsiooni aja möödudes mõõtsin Fluc ja Gluc markervalkude aktiivsust. Tulemused on normaliseeritud negatiivse kontrollina kasutatud nsP4-le vastavate viiruste P1234<sup>GAA</sup> suhtes. Katse teostas kolmes korduses, katset kordasin kahel sõltumatu korral. Joonisel on näidatud keskmised ja standardhälbed.

Joonisel 15 esitatud tulemustest on näha, et EEEV P123 kokkusobivus heteroloogiliste nsP4 valkudega ei sõltu oluliselt teise viiruse süstemaatilistest kuuluvusest. SFV ja CHIKV on lähedased viirused (kuuluvad SFV kompleksi), kuid nende nsP4 valkude moodustatud kompleksid omavad väga erinevaid efektiivsuseid. Samas on CHIKV ja BFV väga erinevad, kuid vastavate nsP4 valkude moodustatud komplekside aktiivsused on peaaegu identsed.

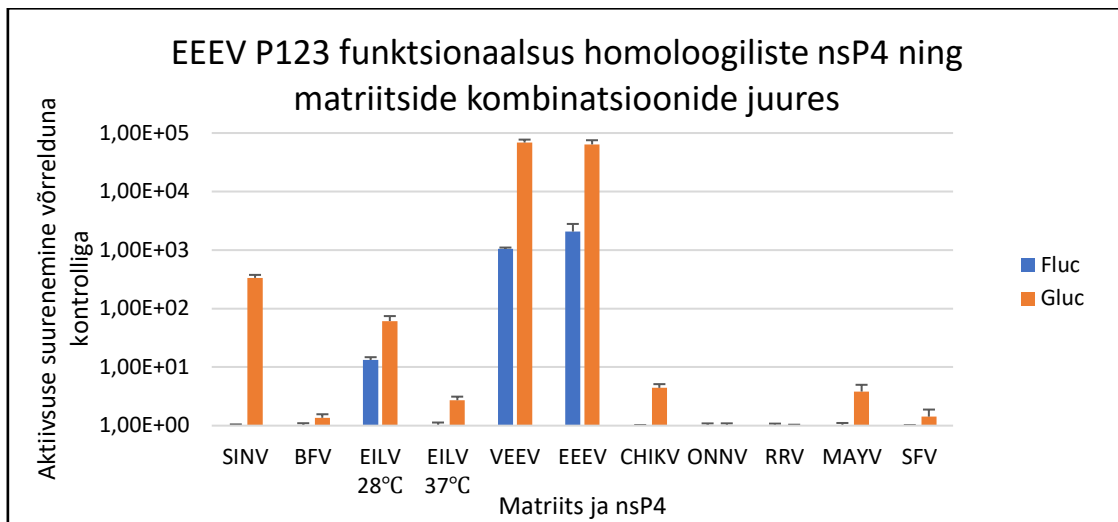
Samas, see katse oli läbi viidud kasutades EEEV enda matriits-RNA ekspresiooniplasmidi. Selleks, et välistada võimalust, et EEEV enda matriitsi ja P123 komponendi omavaheline kokkusobivus mõjutab heteroloogilise nsP4 kasutamise efektiivsust, viisin sama katse läbi ka SINV matriits-RNA ekspresiooniplasmiidiga. Katse tulemused näitasid, et SINV matriitsil muutub EEEV P123 võime moodustada heteroloogilisi funktsionaalseid replikaase oluliselt (Joonis 16). Endiselt moodustas EEEV P123 efektiivselt replikaasi omaenda (homoloogilise) nsP4-ga ning ka VEEV nsP4-ga. On märkimisväärne, et võrrelduna EEEV matriitsiga olid replikatsiooni efektiivsused SINV matriitsil ~10 korda madalamad, samal ajal kui transkriptsiooni efektiivsused olid väga sarnased (Võrdle joonis 15 ja 16). Nõrgal tasemel suutsid replikatsiooni ning transkriptsiooni läbi viia ka EEEV P123 ning SINV ja MAYV nsP4-st moodustunud replikaasid. Suuremaid erinevusi kahe matriitsi vahel näitas EEEV P123 ja SFV nsP4 valgust koosnev replikaas, mis EEEV matriitsil oli väga efektiivne (Joonis 15), kuid ei suutnud replitseerida ega efektiivselt transkribeerida SINV matriitsi (Joonis 16). Need tulemused näitavad, et EEEV P123 võime moodustada heteroloogilisi replikaase sõltub kasutatavast matriits-RNA-st: omaenda matriitsil on EEEV P123 kombineeritav peaaegu kõigiga heteroloogilistest nsP4-dest, samal ajal kui SINV matriitsil olid töötavad kombinatsioonid kõigest VEEV, SINV ning MAYV nsP4-dega. See tulemus oli mõnevõrra ootamatu, sest eelnevas projektis on meie laboris näidatud, et VEEV P123 (uuritud P123 valkude seas järjestuselt EEEV-le lähim) ei moodusta töötavat replikatsioonikompleksi mitte ühegi heteroloogilise nsP4-ga. Lisaks, kui meie eelnevad tulemused näitasid, et matriitsi valikul on juhtiv roll nsP4 komponendil (Lello *et al.*, 2021, käsikiri ülevaatomisel), siis näitavad siin saadud tulemused, et EEEV puhul omab olulist rolli ka P123.



**Joonis 16. EEEV P123 komponendi ühilduvus heteroloogiliste nsP4-dega SINV matriitsil.** Transfekteerisin HEK293T rakke 96-auguse plaadi formaadis HSPoII-FG-SINV + CMV-P123-EEEV + erinevate viiruste CMV-ubinsP4 ekspresiooniplasmiididega. Transfektsiooni järgselt inkubeerisin rakke 18h 37°C juures (EILV puhul ka

48h 28°C juures). Inkubatsiooniaja möödudes mõõtsin Fluc ja Gluc markerite aktiivsust. Tulemused on normaliseeritud negatiivse kontrollina kasutatud nsP4-le vastavate viiruste P1234<sup>GAA</sup> suhtes. Katse teostas in kolmes korduses, katset kordasin kahel sõltumatul korral. Joonisel on näidatud keskmised ja standardhälbed.

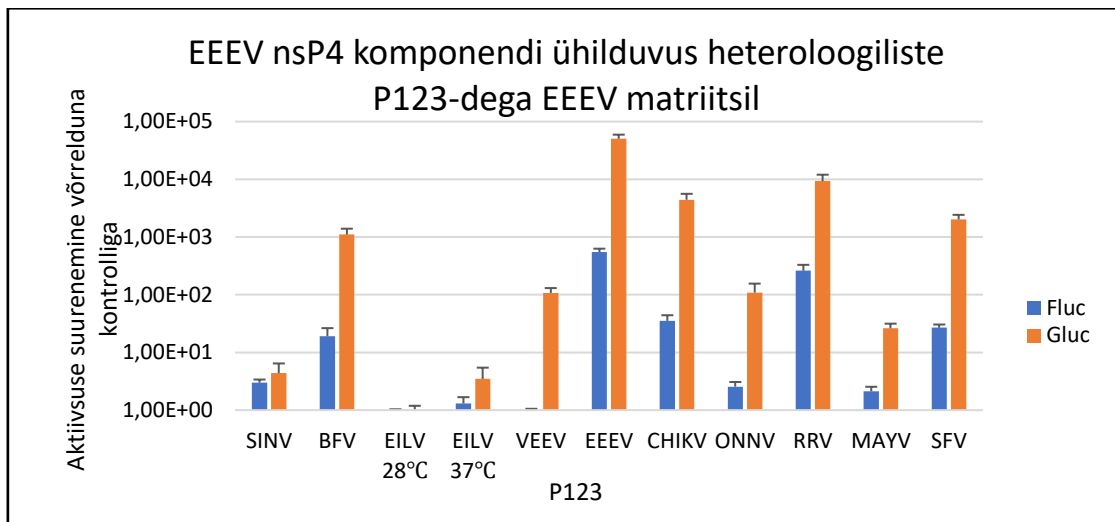
EEEV P123 matriits-selektiivuse täiendavaks uurimiseks analüüsisin, kas EEEV P123 komponent suudab moodustada funktsionaalse replikaasi olukorras, kui kombineerida ühelt ja samalt viirustelt pärinevad nsP4 valgu ja matriits RNA ekspressiooniplasmiidid. Selleks transfekteerisin rakke EEEV P123 ning homoloogiliste paaridega RNA matriitse ning nsP4-valke kodeerivatest plasmiididest (näiteks EEEV P123 + CHIKV matriits-RNA + CHIKV nsP4 ekspressiooniplasmiidid). Nagu näitasid ka varasemad katsed, moodustas EEEV P123 aktiivse replikaasi EEEV enda homoloogilise nsP4 valgu ja matriits-RNA-ga (Joonised 15, 17). Kombinatsioon, mis koosnes EEEV P123 valgust ja SINV nsP4-st ning matriits-RNA-st oli taas väheaktiivne replikatsiooni ja mõnevõrra aktiivsem transkriptsiooni läbiviimise osas (Joonised 16, 17). Ainsana oli heteroloogilistest kombinatsioonidest kõrgelt aktiivne kombinatsioon, mis koosnes EEEV P123 valgust ja VEEV nsP4 valgust ja matriitsist (Joonis 17). Kuna EEEV P123 moodustas aktiivse kompleksi VEEV nsP4-ga ka EEEV (Joonis 15) ning SINV (Joonis 16) matriitsidel, siis võib oletada, et need valgud on funktsionaalselt kokkusobivad matriitsist sõltumatul moel. Mõningast aktiivsust omas ka EEEV P123 ja EILV nsP4 ning matriitsi kombinatsioon, kuid seda ainult 28 °C juures (Joonis 17). Teiste nsP4 ning matriitsi kombinatsioonide puhul jäid EEEV P123 poolt moodustavate komplekside replikatsiooni aktiivsused allapoole tuvastamise piiri ja ka transkriptsiooni aktiivsused olid väga madalad (Joonis 17). See näitab, et SFV kompleksi kuuluvate viiruste ja BFV nsP4 valkudega suudab EEEV P123 funktsionaalseid replikatsioonikomplekse moodustada ainult enda homoloogilise matriitsi juuresolekul. Need andmed näitavad selgelt et EEEV replikatsioonikompleksi moodustamisel on oluline roll matriits-RNA ja P123 vahelistel interaktsioonidel.



**Joonis 17. EEEV P123 funktsionaalsus homoloogiliste nsP4 ning matriitside kombinatsioonide juures.** Transfekteerisin HEK293T rakke 96-auguse plaadi formaadis CMV-P123-EEEV ning homoloogiliste paaridega HSPoII-FG ja CMV-ubinsP4 ekspressiooniplasmiididest. Transfektiooni järgselt inkubeerisin rakke 18h 37°C juures (EILV puhul 48h 28°C juures). Inkubatsiooniaja möödudes mõõtsin Fluc ja Gluc markervalkude aktiivsust. Tulemused on normaliseeritud matriitsi ja nsP4-le vastavate P1234<sup>GAA</sup> suhtes. Katse teostas kolmes korduses, joonisel on tulpadena kujutatud kolme korduse keskvaärtused. Katse teostas kolmes korduses kahel sõltumatu korral. Joonisel on näidatud keskmised ja standardhälbed.

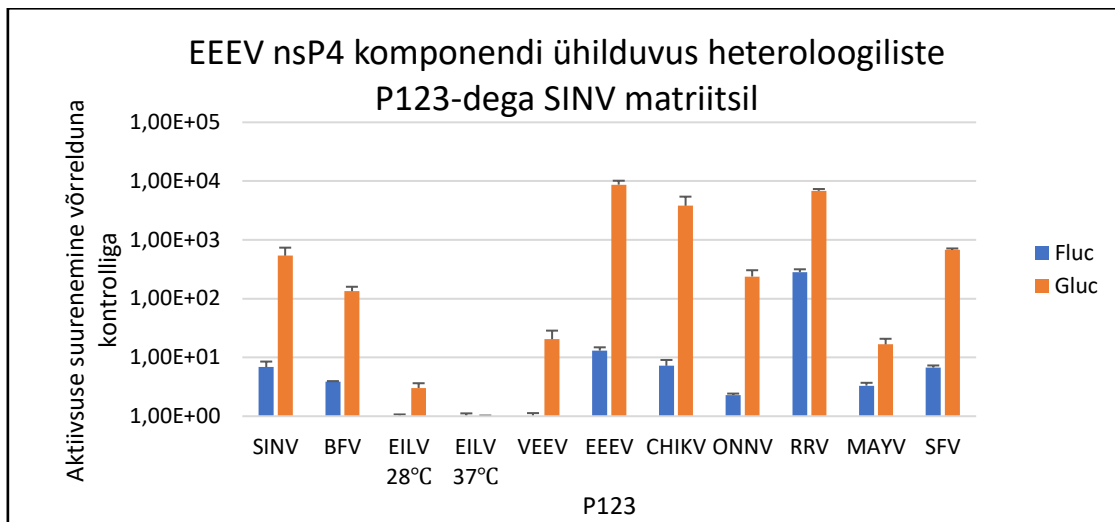
### **EEEV nsP4 komponent moodustab aktiivseid komplekse heteroloogiliste P123 komponentidega nii omaenda kui ka SINV matriits-RNA-l.**

Järgnevalt testisin EEEV nsP4 komponendi võimet moodustada replikatsioonikomplekse heteroloogiliste P123 komponentidega EEEV matriitsil (Joonis 18). Saadud tulemused näitasid, et EEEV nsP4 suudab efektiivselt replikatsioonikomplekse moodustada nii omaenda (homoloogilise) kui ka BFV, CHIKV, RRV ning SFV P123-dega. Seega on EEEV nsP4 ühildatav erinevate SFV kompleksi kuuluvate viiruste P123-dega (v.a. MAYV nsP4). Samal ajal ei suutnud EEEV nsP4 moodustada EEEV matriitsil efektiivseid replikatsioonikomplekse SINV, EILV ning VEEV P123-dega. Siiski, vähemalt SINV ning VEEV P123 puhul ei seisne probleem tõenäoliselt EEEV nsP4 selektiivsuses, vaid selles, et SINV ning VEEV P123 komponendid ei moodusta funktsionaalset replikaasi mitte ühegi seni analüüsitud heteroloogilise nsP4 komponendiga (Lello *et al.*, 2021, käsikiri ülevaatomisel). Siiski on huvitav asjaolu, et VEEV ning EEEV küllakti selektiivsete P123 komponentide käitumine ei ole üksteise suhtes retsiiprookne: EEEV P123 moodustab VEEV nsP4-ga väga aktiivse kompleksi (Joonised 15–17), samal ajal kui VEEV P123 ja EEEV nsP4 moodustatud replikatsioonikompleksi aktiivsus on madal (Joonis 18).



**Joonis 18. EEEV nsP4 komponendi ühilduvus heteroloogiliste P123-dega EEEV matriitsil.** Transfekteerisin HEK293T rakke 96-auguse plaadi formaadis HSPolI-FG-EEEV + CMV-ubinsP4-EEEV ning erinevate viiruste CMV-P123 ekspressioonikonstruktiividega. Transfektsiooni järgselt inkubeerisin rakke 18h 37°C juures (EILV puhul ka 48h 28°C juures). Inkubatsiooniaja möödudes mõõtsin Fluc ja Gluc markervalkude aktiivsust. Tulemused on normaliseeritud negatiivse kontrollina kasutatud EEEV P123<sup>GAA</sup> suhtes. Katse teostas kolmes korduses, katset kordasin kahel sõltumatu korral. Joonisel on näidatud keskmised ja standardhälbed.

Sama katse SINV matriits-RNA ekspressiooniplasmiidi kasutades andis väga sarnase tulemuse (Joonis 19). Taas moodustas EEEV nsP4 efektiivsemalt replikatsioonikomplekse just SFV kompleksi kuuluvate viiruste P123-dega (v.a. MAYV P123). Kombineerimine EILV ja VEEV P123 valkudega jäi endiselt ebaefektiivseks, kuid ootamatult tõusid SINV P123 + EEEV nsP4 kombinatsiooni replikatsiooni ning transkriptsiooni aktiivsused. Võrreldes EEEV matriitsil nähtuga, langesid SINV matriitsil minimaalset BFV, VEEV, EEEV, CHIKV ning SFV P123 poolt moodustatud heteroloogiliste replikaasikomplekside aktiivsused. Sellele vaatamata saab tulemustest järeldada, et EEEV nsP4 suudab efektiivselt replikatsioonikomplekse moodustada erinevate alfaviiruste P123 komponentidega ning näitab üles paremat ühildavust kui EEEV P123 komponent. Sarnaselt muudele alfaviirustele on olemas ka selge asümmeetria. Lisaks juba mainitud VEEV/EEEV kombinatsioonidele võib näha, et EEEV P123 + BFV nsP4 omab väga madalat aktiivsust (Joonised 15, 16), samal ajal kui BFV P123 ja EEEV nsP4 on oluliselt aktiivsem (Joonised 18, 19). Huvitav asümmeetria ilmneb ka EEEV ja EILV komponentide kombineerimisel, kus EEEV P123 + EILV nsP4 on EEEV matriitsil küllaltki aktiivne mõlemal temperatuuril (Joonis 15), samal ajal kui EILV P123 + EEEV nsP4 aktiivsus on väga madal (Joonised 18, 19).



**Joonis 19. EEEV nsP4 komponendi ühilduvus heteroloogiliste P123-dega SINV matriitsil.** Transfekteerisin HEK293T rakke 96-auguse plaadi formaadis HSPoli-FG-SINV + CMV-ubinsP4-EEEV ning erinevate viiruste CMV-P123 ekspressiooniplasmiididega. Tranfektsiooni järgselt inkubeerisin rakke 18h 37°C juures (EILV puhul 48h 28°C juures). Inkubatsiooniaja möödudes mõõtsin Fluc ja Gluc markerite aktiivsust. Tulemused on normaliseeritud negatiivse kontrollina kasutatud EEEV P123<sup>GAA</sup> suhtes. Katse teostas kolmes korduses, katset korrati kahel sõltumatu korral. Joonisel on näidatud keskmised ja standardhälbed.

EEEV replikaasi uurimisel saadud tulemused täiendasid oluliselt meie andmeid alfaviiruste replikaaside kohta. EEEV nsP4 komponent oli hästi ühildatav heteroloogiliste P123 komponentidega, samas, kui EEEV P123 komponent näitas üles kõrget selektiivsust. See asjaolu võimaldas välja selgitada EEEV P123 komponendi ja homologilise EEEV matriits RNA kokkusobivuse tähtsuse. Varasemad uuringud meie laboris on pigem viitanud sellele, et matriitsi spetsiifilisuse eest vastutab alfaviiruste replikaasis nsP4 komponent, kuid need tulemused olid saadud SFV kompleksi kuuluvate viiruste puhul. Siin nähtud tulemused näitavad, et ka P123 komponendil võib matriitsi äratundmisel olla oluline roll. Kindasti on see nii EEEV puhul ja on võimalik, et see võib kehtida ka muude SFV kompleksi mitte kuuluvate alfaviiruste puhul.

Kokkuvõttes võib öelda, et antud uurimuse tulemusel on valminud efektiivsed ning tundlikud töövahendid EEEV edasiseks uurimiseks. See töö näitas, et EEEV jaoks on replikatsioonil limiteerivaks komponendiks nsP4, samas kui P123 komponendi kogusest replikatsioon ning transkriptsioon positiivset sõltuvust ei näidanud. Lisaks näitasin, et EEEV replikaasi on võimalik rekonstrueerida P123 ning nsP4 komponentidest ning need komponendid on võimelised osalema ka heteroloogiliste replikaaside moodustumisel. EEEV P123 komponent näitas üles matriits-RNA-st sõltuvat kõrget selektiivsust heteroloogiliste nsP4 suhtes, sarnanedes selle omaduse poolest VEEV selektiivsele P123 komponendile. Samas, EEEV nsP4

komponent moodustas aktiivseid replikaase erinevatele viirustele kuuluvate P123 komponentidega ja tegi seda matriits-RNA päritolust vähe sõltuval moel.

## KOKKUVÕTE

Alfaviirused on *Togaviridae* sugukonda kuuluv putukvektorite abil levivatest viirustest koosnev perekond. Alfaviirustel on lipiidse ümbrisega sfäärilised virionid ja positiivse polaarsusega RNA genoom. Käesolevas bakalaureusetöös uurisin *trans*-replikatsiooni süsteemi abil Ida hobuste entsefaliidi viiruse (EEEV) replikatsiooni masinavärki. Täpsemalt uurisin EEEV *trans*-replikaasi funktsionaalsust teiste varasemalt konstrueeritud *trans*-replikaaside kontekstis ning testisin EEEV replikaasi komponentide funktsionaalset ühilduvust teistelt alfaviirustelt pärinevate komponentidega.

Esmalt testisin varasemate projektide raames valmistatud EEEV *trans*-replikatsiooni süsteemi aktiivsust imetaja- ning putukarakkudes. Selgus, et EEEV *trans*-replikaas on hea ning tundlik töövahend, mille aktiivsused on vähemalt võrreldavad varasemalt meie laboris konstrueeritud *trans*-replikatsiooni süsteemidega. Seejärel kasutasin EEEV *trans*-replikaasi uurimaks EEEV sõltuvust peremeesorganismi päritolu G3BP valgust ning oodatult selgus, et EEEV efektiivse replikatsiooni ning transkriptsiooni läbiviimiseks G3BP valku ei vaja.

Seejärel valmistasin EEEV replikatsiooni uurimiseks uued töövahendid, mille käigus jagasin EEEV ühekomponentse P1234 replikaasi P123 + nsP4 komponentideks. Selline süsteem võimaldas funktsionaalse EEEV replikaasi rekonstrueerimist ning katsed selle süsteemiga näitasid, et P123 ja nsP4 komponentidest moodustuva kompleksi aktiivsust limiteerivaks faktoriks on nsP4 kogus rakus. Siiski leidsin, et kõrged nsP4 kontsentratsioonid inhibeerivad replikatsiooni ning optimaalseim P123:nsP4 ekspressioonikonstruktide koguste suhe on 1:1.

Uudse EEEV kahekomponentse *trans*-replikatsiooni süsteemiga uurisin EEEV P123 ning nsP4 komponentide ühilduvust teistelt alfaviirustest pärinevate komponentidega. Selgus, et EEEV P123 näitab üles kõrget matriits-RNA-st sõltuvat selektiivsust heteroloogiliste nsP4-de suhtes, töötades efektiivselt ainult enda homoloogilise nsP4 ning VEEV nsP4-ga. Samas on EEEV nsP4 komponent üsna universaalne, moodustades aktiivset replikaasi erinevatele alfaviirustele kuuluvate P123 komponentidega.

Käesoleva uurimuse käigus valminud töövahendid aitavad tulevikus oluliselt lihtsustada kõrgesse bioohtustaseme klassi kuuluva EEEV RNA replikatsiooni uurimist. Siin töös saadud tulemused aitavad paremini mõista alfaviiruste aktiivse replikaasi moodustumist ning erinevatelt alfaviirustelt pärinevate mittestruktuursete valkude ja matriits-RNA-de ühilduvust. See heidab omakorda suuremat valgust alfaviiruste evolutsioonilisele arengule ning on kindlasti oluline samm võimalike viirusvastaste vahendite loomisel.

## SUMMARY

### **Reconstructing the replicase of Eastern equine encephalitis virus from functional components**

Alphaviruses are a genus of arboviruses in the *Togaviridae* family. Alphaviruses have lipid-enveloped spherical virions and a positively polarized RNA genome. In this bachelor's thesis, I studied the replication machinery of Eastern equine encephalitis virus (EEEV) using a trans-replication system. I studied the functionality of the EEEV trans-replicase in the context of other previously constructed trans-replicases. In addition, I reconstructed the EEEV replicase from two functional P123 + nsP4 components and tested the compatibility of these components with components from other viruses.

Firstly, I tested the activity of EEEV trans-replicase system that was prepared during previous projects in mammalian and insect cells. It turned out that the EEEV trans-replicase is a good and sensitive tool with comparable activity to the trans-replication systems that were previously designed in our laboratory. Thereupon, I used the EEEV trans-replicase to study the dependence of EEEV on host derived G3BP protein, and as it was expected, G3BP protein was not essential for efficient EEEV replication and transcription.

I also developed new tools for studying the EEEV replication, in which I divided the EEEV one-component P1234 replicase into two functional P123 + nsP4 components. This kind of system allows to reconstruct the EEEV replicase from functional components. Titration experiments of P123 and nsP4 components were performed, as P123 and nsP4 components are not synthesized in equal amounts in the cell during alphavirus infection. Titration experiments showed that the limiting component of EEEV replication is the amount of nsP4 in the cell and the optimal ratio of P123:nsP4 is 1:1.

With the novel EEEV two-component trans-replication system, I studied the compatibility of the P123 and nsP4 components of EEEV with other alphavirus-derived components. It was found that EEEV P123 shows high selectivity and works effectively only with its own homologous nsP4 and VEEV nsP4. However, the nsP4 component of EEEV is quite universal, as it was capable of forming an active replicase with P123 components belonging to different alphaviruses.

The tools developed in this study will significantly facilitate researching the replication of EEEV in the future. The results obtained in this work contribute to a better understanding of the formation of active replicases of alphaviruses, in particular EEEV, and the compatibility of non-structural proteins between different alphaviruses. This in turn sheds more light on the evolutionary development of alphaviruses and is certainly an important step in the development of possible antiviral agents.

## KASUTATUD KIRJANDUS

1. Ahola, T., Kääriäinen, L. (1995). Reaction in alphavirus mRNA capping; Formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(2), 507–511.
2. Atkins, G. J., Sheahan, B. J., Dimmock, N. J. (1985). Semliki Forest Virus Infection of Mice: A Model for Genetic and Molecular Analysis of Viral Pathogenicity. *Journal of General Virology*, 66, 395–408.
3. Bartholomeeusen, K., Utt, A., Coppens, S., Rausalu, K., Vereecken, K., Ariën, K. K., Merits, A. (2018). A Chikungunya Virus trans-Replicase System Reveals the Importance of Delayed Nonstructural Polyprotein Processing for Efficient Replication Complex Formation in Mosquito Cells. *Journal of Virology*, 92(14).
4. Cheng, R. H., Kuhn, R. J., Olson, N. H., Rossmann, M. G., Choi, H. K., Smith, T. J., Baker, T. S. (1995). Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. *Cell*, 80(4), 621–630.
5. Claflin, S. B., Webb, C. E. (2015). Ross River Virus; Many vectors and Unusual Hosts Make for an Unpredictable Pathogen. *PLoS Pathogens*, 11(9).
6. De Groot, R. J., Rümenapf, T., Kuhn, R. J., Strauss, E. G., Strauss, J. (1991). Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(20), 8967–8971.
7. Deresiewicz, R.L., Thaler, S.J., Hsu, L., Zamani, A.A. (1997). Clinical and Neuroradiographic Manifestations of Eastern Equine Encephalitis. *The New England Journal of Medicine*, 336, 1867–1874.
8. Frolov, I., Kim, D. Y., Akhrymuk, M., Mobley, J. A., Frolova, E. I. (2017). Hypervariable Domain of Eastern Equine Encephalitis Virus nsP3 Redundantly Utilizes Multiple Cellular Proteins for Replication Complex Assembly. *Journal of Virology*, 91(14).
9. Frolova, E.I., Gorchakov, R., Pereboeva, L., Athaseva, S., Frolov, I. (2010). Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *Journal of Virology*, 84(22), 11679–11695.
10. Gardner, C. L., Burke, C. W., Tesfay, M. Z., Glass, P. J., Klimstra, W. B., Ryman, K. D. (2008). Eastern and Venezuelan equine encephalitis viruses differ in their ability to infect dendritic cells and macrophages: impact of altered cell tropism on pathogenesis. *Journal of Virology*, 82(21), 10634–10646.

11. Gomez de Cerdón, M., Ehsani, N., Mikkola, M.L., García J. A., Kääräinen, L. (1999). RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. *FEBS Letters*, 446(1), 19–22.
12. Götte, B., Panas, M. D., Hellström, K., Samreen, B., Larsson, O., Ahola, T., McInerney, G. M. (2019). Separate domains of G3BP promote efficient clustering of alphavirus replication complexes and recruitment of the translation initiation machinery. *PLoS Pathogens*, 15(6).
13. Götte, B., Utt, A., Fragkuodis, R., Merits, A., McInerney, G. M. (2020). Sensitivity of Alphaviruses to G3BP Deletion Correlates with Efficiency of Replicase Polyprotein Processing. *Journal of Virology*, 94(7).
14. Heberlein-Larson, L. A., Tan, Y., Stark, M. L., Cannons, A. C., Shilts, M. H., Unnash, T. R., Das, S. R. (2019). Complex Epidemiological Dynamics of Eastern Equine Encephalitis Virus in Florida. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 100(5), 1266–1274.
15. Henss, L., Yue, C., Kandler, J., Faddy, H. M., Simmons, G., Panning, M., Lewis-Ximenez, L. L., Baylis, S. A., Schnierle, B. S. (2019). Establishment of an Alphavirus-Specific Neutralization Assay to Distinguish Infections with Different Members of the Semliki Forest Complex. *Viruses* 11(1), 82.
16. Jayabalan, A. K., Adivarahan, S., Koppula, A., Abraham, R., Batish, M., Zenkulsen, D., Griffin, D. E., Leung, A. K. L. (2021). Stress granule formation, disassembly, and composition are regulated by alphavirus ADP-ribosylhydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(6).
17. Jones, R., Bragagnolo, G., Arranz, R., Reguera, J. (2020). Capping pores of alphavirus nsP1 gate membranous viral replication factories. *Nature*, 589, 615–619.
18. Jose J., Snyder J.E., Kuhn, R.J. (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiology*, 4(7), 837–856.
19. Kamer, G., Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNAdependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research*, 12(18), 7269–7282.
20. Kim, D.Y., Reynaud, J.M., Rasaloukaya, A., Akhrymuk, I., Mobley, J.A., Frolov, I., Frolova, E.I. (2016). New World and Old World Alphaviruses Have Evolved to Exploit Different Components of Stress Granules, FFE and G3BP Proteins, for Assembly of Virals Replication Complexes. *PLoS Pathogens*, 12(8).

21. LaStraza, M. W., Lemm, J. A., Rice, J. M. (1994). Genetic analysis of the nsP3 region of Sindbis virus: evidence for roles in minus-strand and subgenomic RNA synthesis. *Journal of Virology*, 68(9).
22. Law, Y. S., Wang, S., Tan, B. Y., ... Luo, D. (2021). Interdomain Flexibility of Chikungunya Virus nsP2 Helicase-Protease Differentially Influences Viral RNA Replication and Infectivity. *Journal of Virology*,
23. Law, Y.-S., Utt, A., Tan, Y. B., Zheng, J., Wang, S., Chen, M. W., Griffin, P. R., Merits, A., ja Luo, D. (2019). Structural insights into RNA recognition by the Chikungunya virus nsP2 helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(19), 9558–9567.
24. Lello, L. S., Utt, A., Bartholomeeusen, K., Wang, S., Rausalu, K., Kendall, C., Coppens, S., Fragkoudis, R., Tuplin, A., Alphey, L., Arien, K. K., Merits, A. (2020). Cross-utilisation of template RNAs by alphaviruses replicases. *PLoS Pathogens*. 16(9).
25. Lemm, J. A., Rice C.M. (1993). Assembly of functional Sindbis virus RNA replication complexes: requirement for coexpression of P123 and P34. *Journal Of Virol.* Apr; 67(4), 1905-15.
26. Lemm, J. A., Rümenapf, T., Strauss, E. G., Strauss, J. H., Rice, C. M. (1994). Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *The EMBO Journal*, 13(12), 2925–2934.
27. Li, G., Rice, C.M. (1993). The signal for translational readthrough of a UGA codon in sindbis virus RNA involves a single cytidine residue immediately downstream of the termination codon. *Journal of Virology*, 67(8), 5062–5067.
28. Liljeström, P., Garoff, H. (1991). A new generation of animal cell expression vectors nased on the Semliki Forest virus replicon. *Bio/Technology*, 9(12), 4107–4113.
29. Lulla, V., Karo-Astover, L., Rausalu, K., Merits, A., Lulla, A. (2013). Presentation Overrides Specificity: Probing the Plasticity of Alphaviral Proteolytic Activity through Mutational Analysis. *Journal of Virology*. 87(18), 10207–10220.
30. Lulla, V., Sawicki, D. L., Sawicki, S. G., Lulla, A., Merits, A., Ahola, T. (2008). Molecular defects caused by temperature-sensitive mutations in Semliki Forest virus nsP1. *Journal of Virology*, 82(12), 9236–9244.
31. Lundberg, L., Carey, B., Kehn-Hall, K. (2017). Venezuelan Equine Encephalitis Virus Capsid - The Clever Caper. *Viruses*, 9(10), 279.

32. Mazzon, M., Castro, C., Thaa, B., Liu, L., Mutso, M., Mahalingam, S., Griffin, J.L., Marsh, M., McInerney, G. (2018). Alphavirus-induced hyperactivation of PI3K/AKT directs pro-viral metabolic changes. *PLoS Pathogens*, 14(1).
33. Meshram, C. D., Agback, P., Shiliaev, N., Urakova, N., Mobley, J. A., Agback, T., Frolova, E. I., Frolov, I. (2018). Multiple Host Factors Interact with the Hypervariable Domain of Chikungunya Virus nsP3 and Determine Viral Replication in Cell-Specific Mode. *Journal of Virology*, 92(16).
34. Nasar, F., Palacios, G., Gorchakov, R. V. (2012). Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(36), 14622–14627.
35. Panas, M. D., Varjak, M., Lulla, A., Eng, K. E., Merits, A., Hedestam, G.B., McInerney, G. M. (2012). Sequestration of G3BP coupled with efficient translation inhibits stress granules in Semliki Forest virus infection. *Molecular Biology of the Cell*, 23(24), 4701–4712.
36. Pletnev, S. V., Zhang, W., Mukhopdhyay, S., Fisher, B. R., Hernandez, R., Brown, D. T., Baker, T. S., Rossman, M. G., Kuhn, R. J. (2001). Locations of carbohydrate sites on alphavirus glycoproteins show that E1 forms an icosahedral scaffold. *Cell*, 105(1), 127–136.
37. Powers, A. M., Brault, A. C., Shirako, Y., Strauss, E. G., Kang, W., Strauss, J. H., Weaver, S. C. (2001). Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. *Journal of Virology*, 75(21), 10118–10131.
38. Powers, A. M., Brault, A. C., Tesh, R. B., Weaver, S. C. (2000). Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: Evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *Journal of General Virology*, 81(2), 471–479.
39. Rezza, G., Chen, R., Weaver, S. C. (2017). O'nyong-nyong fever: a neglected mosquito-borne viral disease. *Pathogens and Global health*, 111(6), 271–275.
40. Rose, P.P., Hanna, S.L., Spiridigliozzi, A., Wannissom, N., Beiting, D.P., Ross, S.R., Hardy, R.W., Bambina, S.A., Heise, M.T., Cherry, S. (2012). Natural Resistance Macrophage Protein (NRAMP) is a cellular receptor Sindbis virus in both insect and mammalian hosts. *Cell Host Microbe*, 10(2), 97–104.
41. Rupp, J.C., Jundt, N., Hardy, R.W. Requirement for the amino-terminal domain of sinbis virus nsP4 during virus infection. (2011). *Journal Of Virology*, 85(7), 3449–3460.
42. Rupp, J.C., Sokoloski, K.J., Gebhart, N.N., Hardy, R.W. (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *Journal Of General Virology*, 96(9), 2483–2500.

43. Salonen, A., Vasiljeva, L., Merits, A., Magden, J., Jokitalo, E., Kääriäinen, L. (2003). Properly Folded Nonstructural Polyprotein Directs the Semliki Forest Virus Replication Complex to the Endosomal Compartment. *Journal Of Virology*, 77(3), 1691–1702.
44. Shirako, Y., Strauss, E. G., Strauss, J. H. (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(1), 148–160.
45. Spuul, P., Balistreri, G., Hellström, K., Golubtsov, A., Jokitalo, E., Ahola, T. (2011). Assembly of Alphavirus Replication Complexes from RNA and Protein Components in a Novel trans-Replication System in Mammalian Cells. *Journal of Virology*, 85(10), 4739–4751.
46. Spuul, P., Balistreri, G., Kääriäinen, L., Ahola, T. (2010). Phosphatidylinositol 3-Kinase-, Actin-, and Microtubule-Dependent Transport of Semliki Forest Virus Replication Complexes from the Plasma Membrane to Modified Lysosomes. *Journal of Virology*, 84 (15), 7543–7557.
47. Strauss, J. H., Strauss, E. G. (1994). The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. *Microbiological Reviews*, 491–562.
48. Teppor, M., Zusinaite, E., Merits, A. (2021). Phosphorylation Sites in the Hypervariable Domain in Chikungunya Virus nsP3 are Crucial for Viral Replication. *Journal of Virology*, 95(9).
49. Tesh, R. B., Watts, D. M., Russell, K. L., Damodaran, C., ... Gubler, D. J. (1999). Mayaro Virus Disease: An Emerging Mosquito-Borne Zoonosis in Tropical South America. *Clinical Infectious Diseases*, 28, 67–73.
50. Utt, A., Quirin, T., Saul, S., Hellström, K., Ahola, T., Merits, A. (2016). Versatile Trans-Replication Systems for Chikungunya Virus Allow Functional Analysis and Tagging of Every Replicase Protein. *PLOS One*, 11(3).
51. Utt, A., Rausalu, K., Jakobson, M., Männik, A., Alphey, L., Frangkoudis, R., Merits, A. (2019). Design and Use of Chikungunya Virus Replication Templates Utilizing Mammalian and Mosquito RNA Polymerase I-Mediated Transcription. *Journal of Virology*, 93(18).
52. Vasiljeva, L., Merits, A., Auvinen, P., Kääriäinen, L. (2000). Identification of a Novel Function of the Alphavirus Capping Apparatus: RNA 5'- Triphosphatase activity of nsP2. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 17281–17287.
53. Weaver, S. C., Ferro, C., Barrera, R., Boshell, J., Navarro, J. C. (2004). Venezuelan Equine Encephalitis. *Annual Review Entomology*, 49, 141-74.

54. Zacks, M. A., Paessler, S. (2010). Encephalitic alphaviruses. *Veterinary Microbiology*, 10(3–4), 281–286.
55. Zeller, H., Van Bortel, W., Sudre, B. (2016). Chikungunya: Its History in Africa and Asia and Its Spread to New Regions in 2013–2014. *The Journal of Infectious Diseases*, 214(5), 436–440.
56. Zhang, R., Kim, A. S., Fox, J. M., ... Diamond, M. S. (2018). Mxra8 is a receptor for multiple arthropogenic alphaviruses. *Nature* 557, 570–574.
57. Žusinaite, E., Tints, K., Kiiver, K., Spuul, P., Karo-Astover, L., Merits, A., Sarand, I. (2007). Mutations at the palmitoylation site of non-structural protein nsP1 of Semliki Forest virus attenuate virus replication and cause accumulation of compensatory mutations. *Journal of General Virology*, 88(7), 1977–1985.

## KÄSIKIRJAD

1. Lello, L. S., Bartholomeeusen, K., Wang, S., Coppens, S., Fragkoudis, R., Alphey, L., Ariën, K. K., Merits, A., Utt, A. (2021). NsP4 is a major determinant of alphavirus replicase activity and template selectivity. *Käsikiri ülevaatamisel ajakirjas Journal of Virology*.
2. Tan, Y. B., Lello, L. S., Liu, X., Law, Y. S., Kang, C., Lescar, J., Zheng, J., Merits, A., Luo, D. (2021). A crystal structure of alphavirus nonstructural protein 4 (nsP4) reveals an intrinsically dynamic RNA-dependent RNA polymerase. *Käsikiri ülevaatamisel*.

## KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. <https://www.cdc.gov/easternequineencephalitis/tech/epi.html>

Külastatud: 22.05.2021 kell 01.00

2. <https://www.cdc.gov/chikungunya/symptoms/index.html>

Külastatud: 22.05.2021 kell 01.07

3. [https://www.terviseamet.ee/et/koroonaviirus/koroonakaart?fbclid=IwAR3P04PBFYU28vQ63yiLKLu-UY72DoRSI\\_zeHTTUismKrmaXJQ3ID0CY1w](https://www.terviseamet.ee/et/koroonaviirus/koroonakaart?fbclid=IwAR3P04PBFYU28vQ63yiLKLu-UY72DoRSI_zeHTTUismKrmaXJQ3ID0CY1w)

Külastatud: 22.05.2021 kell 01.12

4. <https://www.terviseamet.ee/et/koroonaviirus/koroonaviiruse-andmestik>

Külastatud: 26.05.2021 kell 15.02

5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.625711/full>

Külastatud: 26.05.2021 kell 15.40

6. <http://conditions.health.qld.gov.au/HealthCondition/condition/14/217/190/barmah-forest-virus>

Külastatud: 26.05.2021 kell 16.21

# LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Agneta Miilimäe

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

**Ida hobuste entsefaliidi viiruse replikaasi kompleksi rekonstrueerimine funktsionaalsetest komponentidest,**

mille juhendajad on Andres Merits ja Laura Sandra Lello,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 31.12.2024 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Agneta Miilimäe

31.05.2021