

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MIKROBIOLOOGIA JA VIROLOOGIA ÕPPETOOL

Erkki Kull

**Alfaviiruste mittestruktuursete valkude vastu spetsiifiliste antikehade  
iseloomustamine Semliki Forest viiruse, Chikungunya viiruse ja  
O'nyong'nyong viiruse näitel**

Bakalaureusetöö

Juhendaja MD, DSc Eva Žusinaite

TARTU 2015

## **SISUKORD**

KASUTATUD LÜHENDID .....	3
SISSEJUHATUS .....	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1. Alfaviirused .....	6
1.1. Üldiseloomustus .....	6
1.2. Alfaviiruste virion .....	8
1.3. Alfaviiruse genoom.....	9
1.4. Mittestruktuursed valgud .....	9
1.5. Infektsioonitsükkel.....	10
1.6. Erinevused ja sarnasused alfaviirustel genoomi ja aminohappelise järjestuse tasandil .....	12
EKSPERIMENTAALNE OSA .....	15
1. Töö eesmärgid.....	15
2. Materjalid ja meetodid .....	16
3. Tulemused ja arutelu.....	19
KOKKUVÕTE .....	35
SUMMARY .....	36
KASUTATUD KIRJANDUS .....	37
Lihtlitsents .....	44

## KASUTATUD LÜHENDID

ah - aminohape

BHK – *baby hamster kidney*

BSA – *bovine serum albumin*, veise seerumi albumiin

CHIKV – Chikungunya viirus

CPV-I - *type I cytopathic vacuoles*, I tüüpi tsütopaatilised vakuoolid

DPBS – Dulbecco PBS

ECL – *Enhanced chemiluminescence*, võimendatud kemoluminestsents

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*, ensüüm-immunosorptsioon

FCS – *fetal calf serum*, veise loote seerum

GMEM – *Glasgow Modified Eagle's Medium*

kb – *kilobase*, kiloalus

kDa - kilodalton

NCR – *non coding region*, mittekodeeriv regioon

nsP – *nonstructural protein*, mittestruktuurne valk

nt – nukleotiid

NTD – N-terminaalne domeen

ONNV – O'nyong'nyong viirus

PAGE – polüakrüülamiidgeelelektorforees

PBS – *phosphate buffered saline*, fosfaat puhverdatud soolalahus

PFA – *paraformaldehyde*, paraformaldehüüd

polüA – polü-adenosiin

RRV – Ross River viirus

SDS – *sodium dodecyl sulfate*, naatriumdodetsüülsulfaat

SDS-PAGE – SDS-poliakrüülamiidgeelelektorforees

SFV – Semliki Forest viirus

SINV – Sindbis viirus

TPB – *tryptose phosphate broth*, trüptoos-fosfaat-puljong

## SISSEJUHATUS

Viirused on väikesed organismid, mida ei liigitata elus ega eluta looduse hulka. Neil puuduvad elusorganismile iseloomulikud tunnused nagu näiteks iseseisev paljunemisvõime ja rakuline struktuur. Teisalt, kannavad nad endas geneetilist materjali ning suudavad paljuneda ja evolutsioneeruda läbi loodusliku valiku peremeesraku toel. Viiruseid on maailmas vaieldamatult rohkem kui kõiki teisi bioloogilisi organisme kokku. Nad on võimelised nakatama kõiki elusaid organisme. Viirus kasutab raku masinavärki, et paljuneda ja viia läbi enda eluks vajalikke protsesse.

Alfaviirused on üksikahelalise genoomiga positiivse polaarsusega RNA viirused. Alfaviirused on võimelised nakatama mitmeid erinevaid organismitüüpe, k.a. inimesi. Looduses ringlevad nad selgrootu putukvektori ja selgroogse peremehe vahel. Alfaviirustel on lai peremeesring ja väike lihtsa ehitusega genoom, lisaks ei ole tüüpilised laboratoorsed tüved inimesele patogeensed. Nende omaduste tõttu on neid hea kasutada mudelorganismidena uurimustöodes ja biotehnoloogias.

Viiruse ja peremehe vastastikuse toime ja infektsioonitsükli uurimiseks on vaja teada viiruse poolt kodeeritud valkude funktsioone ja iseärasusi. Alfaviiruste mittestruktuursed valgud kannavad olulist rolli viiruse RNA replikatsioonis. Neid on palju uuritud kuid puudub täpne arusaam nende omaduste ja funktsioonide kohta. Spetsiifiliste mittestruktuursete viirusvalkude iseloomustamiseks on erinevaid meetodeid, kuid kõige laialdasemalt kasutatakse immunofluorestsentsanalüüsi ja *western bloti* meetodit. Need meetodid võimaldavad spetsiifiliste antikehade seondumist vastavatele viirusvalkudele ning tuvastada nende viirusvalkude olemasolu rakkudes ja rakulüsaatides.

Käesolev töö koosneb teoreetilisest ja eksperimentaalsest osast. Teoreetilises osas kirjeldatakse alfaviiruste üldiseid omadusi, virioni ja genoomi ehitust ning mittestruktuurset valke. Lisaks antakse ülevaade selle perekonna viiruste replikatsiooni- ja infektsioonitsüklist. Eksperimentaalse osa eesmärgiks on iseloomustada laboris olevate alfaviiruste-spetsiifiliste mittestruktuursete valkude vastaste antikehade paneeli ning optimeerida nende meetodite protokolle.

Töö on valminud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis RNA viiruste uurimisgrupis.

# KIRJANDUSE ÜLEVAADE

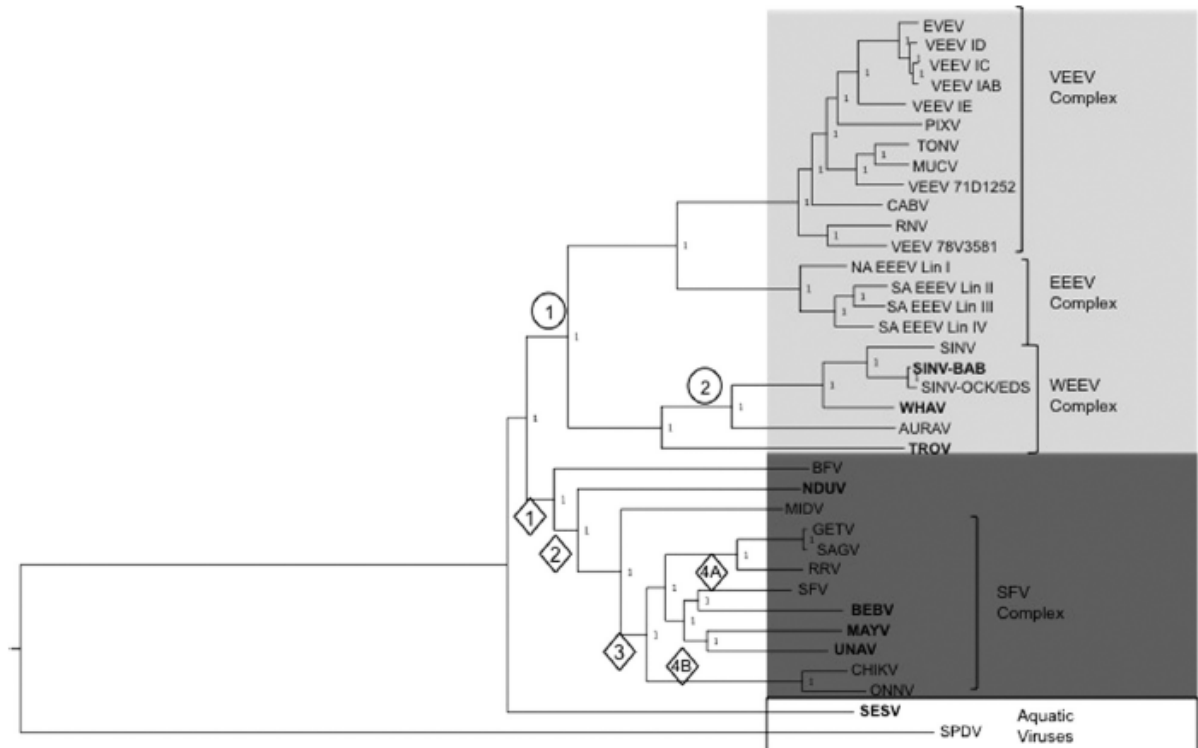
## 1. Alfaviirused

### 1.1. Üldisloomustus

Alfaviirused on positiivse polaarsusega RNA viirused ikosaeedrilise virioni sümmeetriaga. RNA paikneb kapsiidi sees koos 240 kapsiidivalgu koopiaga. Genoom on üksikahelaline RNA, suurusega 11-12 kiloalust (kb). Alfaviiruste perekond kuulub togaviiruste sugukonda, kuhu kuulub 29 liiki, mis omakorda klassifitseeruvad vähemalt kaheksaks antigeenseks kompleksiks (Griffin 2013). Looduses ringlevad alfaviirused selgrootu putukvektori ja selgroogse peremehe vahel. Enamikule alfaviirustele on vektoriks moskiitod, üksikutel juhtudel ka täid või lestad. Selgroogsed peremehed on tavaliselt imetajad või linnud, vees elutsevate viiruste peremeheks on kalad. Alfaviirused on leviku poolest geograafiliste piiranguteta, neid on leitud kõikidelt mandritelt ning paljudelt saartelt.

Patogeensed alfaviirused jaotatakse üldiselt nende haigustekitajate järgi: Vana Maailma viirused, millega nakatumise sümptomiteks on lööve ja artriit ning entsefaliiti põhjustavad Uue Maailma viirused.

Semliki Forest viirus (SFV), Chikungunya viirus (CHIKV) ja O'nyong'nyong viirus (ONNV) on kõik Vana Maailma viirused (Strauss ja Strauss, 1994). Vana- ja Uue Maailma viiruste nimetus tuleneb suurema osa nende viiruste geograafilisest paiknemisest selles grupis, kuigi Vana Maailma viiruseid võib leida ka Uuest Maailmast ja vastupidi. Käesolevas töös kasutatud viirused kuuluvad SFV kompleksi ning on fülogeneetiliselt lähedas suguluses (**Joonis 1**) (Forrester jt, 2012).



**Joonis 1. Alfaviiruste fülogeneetiline puu.** Sellel puul on kõikide alfaviiruste liikide esindajad välja arvatud VEEV kompleks; kasutatud on kogu genoomi ulatuses lugemisraamide joendamist; välja on jäetud osad nSP3st ja kapsiidist, mis ei viita tähenduslikele joondustele. Viirused helehallil taustal klassifitseeruvad Uue Maailma ja tumehallil Vana Maailma viiruste hulka (Forrester jt, 2012).

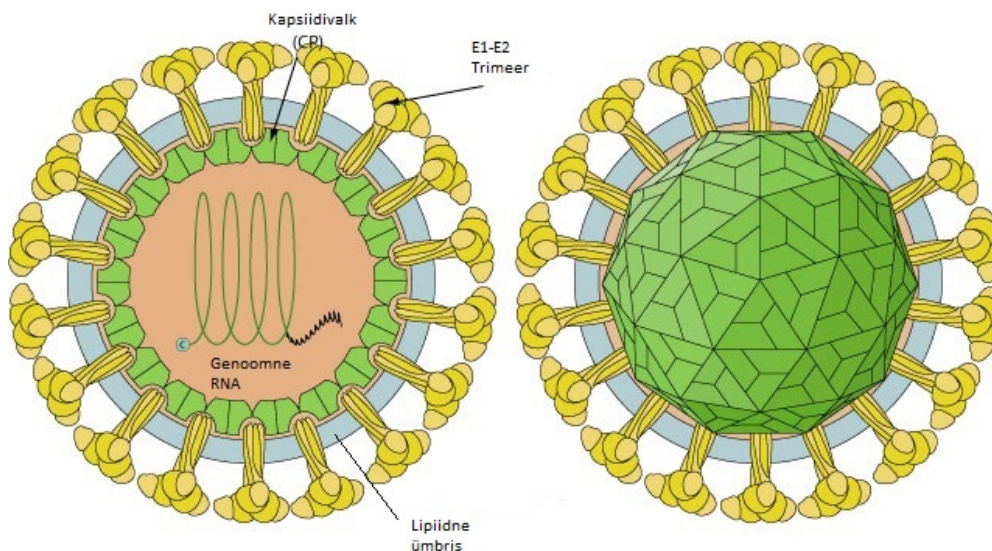
Kõik alfaviirused, mis on inimesele nakkavad on arboviirused, kuna nad levivad lüljalgsete vektorite kaudu. Enamik alfaviiruseid elavad looduses alterneerides paljunemist kas selgroogses peremehe või selgrootus vektoris (moskiitod, puugid). Vektor nakatub viirusega kui ta hammustab viirusega nakatunud peremeest, pärast mida viirus paljuneb vektori kudedes ja kantakse edasi selgroogsele peremehele putuka süljenäärmete kaudu. Pärisperemehe viirus paljuneb, põhjustab vireemiat ja mõnikord ka haigestumist. Vektoris on viiruse nakkus asümptomaatiline. Alfaviiruste looduslik elutsüklil ei hõlma tavaliselt inimesi aga mõned viirused, näiteks Chikungunya viirus on võimeline levima ka inimeste ja moskiitode vahel. Selle tulemusena võivad need viirused põhjustada kiiresti levivat epideemiat tihedalt asutatud troopilistes ja subtroopilistes piirkondades, kus elutsevad vajalikud putukvektorid (Schmaljon ja McClain 1996).

Alfaviiruste suur peremeeste hulk ja väike genoom võimaldab neid kasutada mudelorganismidena uurimustöodes ja biotehnoloogias. Kuna alfaviiruste tüüpilised laboratoorsed tüved ei ole inimesele patogeensed, on neid võimalik kasutada teiste patogeensete tüvede replikatsiooni ja infektsiooni eripärade uurimiseks.

Järgmisena kirjeldatakse selles töös kasutatud tüüpviiruste SFV, CHIKV ja ONNV näitel alfaviiruste virioni, genoomi ehitust ja mittestruktuursete valkude omadusi. Iseloomustatakse ka nende viiruste infektsiooni- ja replikatsioonitsükli.

## 1.2. Alfaviiruste virion

Alfaviiruste virionid on sfäärilised 60-70 nm läbimõõduga. Nad koosnevad glükoproteiinvõrega ümbrisest, mille sees on ikosaedriline nukleokapsiid (Joonis 2). Alfaviiruse nukleokapsiidis asub umbes 11.7 kb suurune üheaheelaline positiivse polaarsusega RNA genoom. Kapsiid koosneb 240-st kapsiidivalgu koopiast. Ümbris koosneb lipiidsest kaksikkihist, kuhu on sisse surutud viiruse poolt kodeeritud glükoproteiine (E1 ja E2). Lipiidne kaksikkiht on kokku pandud peremeesraku plasmamembraani lipiididest ning on seega ehituselt sarnane peremehe plasmamembraanile. Viiruse pinnal on 240 E1 ja E2 glükoproteiini poolt moodustatud heterodimeeri. Kapsiidivalgude ja ümbrise glükoproteiinide üks-ühele suhe lihtsustab viiruse kokkupanekul toimuvate interaktsioonide toimumist. Kolm heterodimeeri moodustavad üksteisega interakteerudes viiruse pinnal 80 ogataolist struktuuri. SFV ehituses võib täheldada ka kolmandat valku, väikest E3 valku, mida teistes viirustes ei liigitata virioniga seotud olevaks valguks (Schmaljohn ja McClain, 1996; Strauss ja Strauss, 1994).



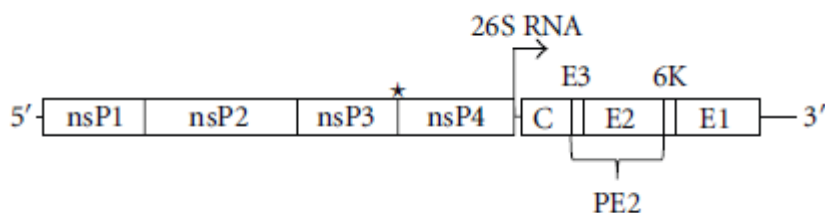
**Joonis 2. Alfaviiruse virion.** Joonisel on alfaviiruse genoom, mis koos kapsiidivalguga moodustavad nukleokapsiidi. Kapsiidi ümbritseb lipiidne ümbris, mida läbistavad E1-E2 trimeerid, mis on kujutletavad ogataoliste struktuuridena ([http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/625.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/625.html), muudatustega).

### 1.3. Alfaviiruse genoom

Alfaviiruste genoom on lineaarne, positiivse polaarsusega üheaahelaline RNA pikkusega 11 000-12 000 nukleotiidijäaki (nt) (Joonis 3). Genoomi 5' otsas asub *cap*-struktuur ja 3' terminaales otsas poliadenüleeritud (polüA) järjestus.

Genoom jaguneb kaheks regiooniks: kaks kolmandikku moodustab mittestruktuurne osa, mis kodeerib mittestruktuurseid või replikaasi valke (nsP1-4, *nonstructural protein*) ja ühe kolmandiku moodustab struktuurne osa, mis kodeerib viiete viiruse struktuurset valku (E1-3, C, abivalk 6K). Mittestruktuurset valgud transleeritakse ühelt või kahelt eellasvalgult (P123 ja P1234), mis sünteesitakse genoomselt RNAlt. Need polüproteiinid lahutatakse osadeks, et toota nelja mittestruktuurset valku.

Struktuursete valkude eellasvalk sünteesitakse 26S mRNAlt ehk subgenoomselt RNAlt (sgRNA). sgRNA on samuti *cap*- ja polü(A) struktuurid. Struktuurne polüproteiin protsessitakse kapsiidivalguks, glükoproteiinideks ja kaheks väikeseks polüpeptiidiks E3 ja 6K (Strauss ja Strauss, 1994).



**Joonis 3. Alfaviiruse genoom.** Alfaviiruse genoom on positiivse polaarsusega RNA molekul. 5' otsas on 7-metüülguanosiini molekul, 3' otsas polüA saba. 5' kaks kolmandikku genoomist kodeerib mittestruktuurseid valke genoomselt RNAlt ja 3' kolmandik 26S subgenoomne RNA struktuurset valke (Yat-Sing Leung jt, 2009).

### 1.4. Mittestruktuurset valgud

Alfaviiruste mittestruktuurset valgud on olulised viiruse RNA replikatsioonis. Neid on palju uuritud, kuid on veel lünki teadmistes nende täpsete funktsioonide ja omaduste kohta.

nsP1 on multifunktsionaalne valk, mis osaleb genoomsele ja sgRNAle *cap*-struktuuri lisamises ja nende metüleerimises, omades guanüülül- ja metüültransferaasset aktiivsust (Mi and Stollar, 1991; Ahola and Kääriäinen, 1995). RNA replikatsiooni ajal seob nsP1 replikatsioonikomplekse raku sisemembraanide külge (Peränen jt, 1995). Lisaks kutsub see

valk esile filopoodide sarnase struktuuride moodustumist nakatunud rakkude plasmamembraanil (Laakonen jt, 1998).

nsP2 on samuti multifunktsionaalne, tema N-terminaalses domeenis (NTD) esineb nii RNA trifosfataasne, nukleosiid trifosfataasne kui helikaasne aktiivsus (Gomez de Cedron jt, 1999; Rikkonen jt, 1994; Vasiljeva jt, 2000). Lisaks on nsP2 karboksüülterminaalsel domeenil proteaasne aktiivsus: see vastutab kõikide mittestruktuursete valkude eelpolüproteiinide (P123, P1234) lõikamise eest (Vasiljeva jt, 2001; Merits jt, 2001). Nende lõikesaitide järjestused ei ole erinevate viiruste vahel kõrgelt konserveerunud (Lulla jt, 2012). nsP2 valk mõjutab ka peremehe immuunvastust: takistab antiviraalset toimet ja kutsub esile tsütotoksilisi efekte (Garmashova jt, 2006).

nsP3 on ainuke fosforüleeritud alfaviiruste mittestruktuurne valk (Vihinen jt, 2001). Tema täpne töömehhanism ja funktsioonid alfaviiruste replikatsioonis ei ole veel täielikult selged. Valgul on kaks eristatavat domeeni: N-terminaalne domeen, mis on alfaviiruste hulgas kõrgelt konserveerunud ja C-terminaalne domeen, mis varieerub pikkuselt ja järjestuselt (Strauss ja Strauss, 1994; Cristea jt, 2006). Fosforüleeritus on arvatavasti oluline RNA sünteesi läbiviimiseks ja ilma nsP3-ta ei moodustu replikatsioonikompleksi (Strauss ja Strauss, 1994; Wang jt, 1994). SFV puhul toob fosforüleeritud aminohappejääkide deleteerimine või modifitseerimine kaasa viiruse patogeensuse langemise, kuid viiruse replikatsioonivõime ja elujõulisus säilib (Vihinen jt, 2001).

nsP4 on alfaviiruse RNA-st sõltuv RNA polümeraas ja on oluline viiruse replikatsioonikompleksi osa. Replikatsioonikompleks on võimeline sünteesima nii genoomset ja subgenoomset RNAd kui ka negatiivse ahelaga RNAd (Rubach jt, 2009). nsP4 eluiga nakatunud rakkudes on lühike ja ta on seal ebastabiilne, kuna lagundatakse ubiviktiini sõltuvas rajas N-otsa reegli alusel (de Groot jt, 1991). SFV puhul stabiliseeritakse ainult need nsP4 molekulid, mis satuvad kohe RNA polümeraasi kompleksi koosseisu (Takkinen jt, 1991).

## **1.5. Infektsioonitsükkel**

### *1.5.1. Sisenemine*

Alfaviiruste infektsioon algab viiruse sisenemisega raku retseptor-vahendatud endotsütoosil, millele järgneb madala pH poolt esile kutsutud membraanide liitumine. Happelise keskkonna olemasolu viitab, et lüsoosomid või teised rakusisesed vakuoolid on peamised viiruse sissetungi kohad. Madal pH kutsub esile E2E1 heterodimeeri lagundamise, mille tulemusena modifitseeritud E1 valk katalüüsib viiruse membraanide ja peremeesraku plasmamembraanide

kokkusulamist ja nukleokapsiidi sisenemist tsütoplasmasse (Helenius jt, 1980; Wahlberg ja Garoff, 1992). Peale sisenemist toimub kiirelt nukleokapsiididelt kapsiidivalkude eemaldamine ribosoomide poolt (Singh ja Helenius, 1992). Genoomselt RNAlt sünteesitakse mittestruktuursete valkude eellasvalk P1234. Tekkinud polüproteiin lõigatakse nsP3/4 saidist ning tekib uus polüproteiin P123 ja mittestruktuurne valk nsP4, mis on alfaviiruse RNA polümeraas (Takkinen jt, 1991). nsP4 tootmine on aluseks RNA replikatsioonile, ilma mille toimumiseta viirus elujõuline ei ole (Shirako ja Strauss, 1994).

### *1.5.2. Replikatsioon*

Viirusliku RNA replikatsioon toimub tsütoplasmaatilistes vakuoolides, mis tulenevad lüsoosomsetest ja endosoomsetest membraanidest. Nende membraanide peal moodustavad mittestruktuursete eellasvalkude produktid replikatsioonikomplekse (Froshauer jt, 1988; Kujala jt, 2001). Ainuke alfaviiruste valk, mis suudab rakuliste membraanidega seostuda on nsP1 (Peränen jt, 1995). Replikatsioon algab nsP1 seondumisega rakulistele membraanidele (Salonen jt, 2005). Esimese asjana moodustub algne replikatsioonikompleks P123 ja nsP4 valkudest, mis sünteesib genoomse RNA pealt negatiivse RNA ahela (Shirako ja Strauss, 1994). See kompleks ei ole võimeline efektiivselt sünteesima positiivset RNA ahelat, seega negatiivse RNA ahela süntees domineerib varajases infektsioonis (Jose jt, 2009). Infektsiooni kulgedes negatiivse RNA ahela süntees väheneb, kuna nsP2 proteaas hakkab P123 polüproteiini autokatalüütiliselt lõikama (Ding ja Schlesinger, 1989). P123 lõigatakse, et toota individuaalseid nsP1-3 valke, millest koos nsP4ga pannakse kokku positiivse ahela replikaas (Takkinen jt, 1991; Shirako ja Strauss, 1994).

Alfaviiruse täispikk genoomne RNA on aluseks negatiivse ahela sünteesile ning mittestruktuursete valkude mRNAle. 26S RNA ehk subgenoomne mRNA käitub struktuursete viiruse valkude translatsioonil informatsiooni vahendajana (Sawicki ja Sawicki, 1980). RNA replikatsioon toimub morfoloogiliselt erilistes, I tüüpi tsütopaatilistes vakuoolides (*Type I cytopathic vacuoles*, CPV-I), mis on viiruse komponentide poolt modifitseeritud endosoomid ja lüsoosomid, seotud kareda tsütoplasmaavõrgustikuga. Tõenäoliselt toimub translatsioon, transkriptsioon ja viiruslike nukleokapsiidide pakkimine üksikutes suurtes CPV-seotud tsütoplasmaatilistes struktuurides (Froshauer jt, 1988). CPV-I pinnal asuvad tsütoplasmaaga seotud kerakesed, kuhu on kogunenud kõik mittestruktuursed valgud koos äsja sünteesitud viirusliku RNAga. Endosomaalne ümbertöötlemine ja CPV-I seondumine plasmamembraaniga põhjustab kerakeste ringlemise plasmamembraani ja endosomaalse-lüsoomaalse sektsiooni vahel (Kujala jt, 2001).

### 1.5.3. Virionide moodustumine ja pungumine

Partiklite moodustamiseks vajalikud struktuursed valgud transleeritakse subgenoomse RNA ahelalt. Kõigepealt sünteesitakse struktuursete valkude polüproteiin, millest kolme kotranslatsioonilise lõikamise tulemusena vabanevad kapsiidivalk C, E3 ja E2 eellasvalk p62, mittestruktuurne valk 6K ja E1 valk (Melancon ja Garoff, 1987). Kapsiidivalk seondub kõigepealt ribosoomidele ja seejärel interakteerub genoomse RNA pakkimissignaali, et moodustada nukleokapsiid (Strauss ja Strauss 1994; Frolova jt, 1997; Söderlund ja Ulmanen, 1977). Ülejäänud struktuursed valgud transporditakse signaaljärjestuste abil läbi plasmamembraani selle pinnale (Liljeström ja Garoff, 1991). Toimub viiruse väljumine rakust: plasmamembraanile difundeeruvad ka nukleokapsiidid, mis seonduvad seal olevate viiruse glükoproteiinidega, mille tulemusena tekib piisavalt energiat, et viiruse partiklid saaksid rakust välja punguda (Strauss ja Strauss, 1994). Efektiivseks viiruse rakust väljumiseks on vajalik ka kolesterooli olemasolu peremeesrakus (Lu ja Kielian, 2000).

## 1.6. Erinevused ja sarnasused alfaviirustel genoomi ja aminohappeline järjestuse tasandil

CHIKV, ONNV ja SFV viiruste mittestruktuursete ja struktuursete eellasvalkude nukleotiidjärjestuste võrdlemisel esineb mittestruktuursete polüproteiinide puhul CHIKV ja ONNV vahel 85%-line homoloogia, CHIKV ja SFV vahel 70%-line homoloogia ning ONNV ja SFV vahel 68%. Struktuurse polüproteiini puhul on need CHIKV ja ONNV vahel 85%, CHIKV ja SFV vahel 62% ning ONNV ja SFV vahel 60%. Seega, alfaviiruste hulgas on ONNV CHIKV-le kõige lähedamalt suguluses olev viirus. Kuigi SFV ning Ross River viirus (RRV) kuuluvad koos ONNV ja CHIKVga SFV antigeensesse kompleksi, on SFV ja RRV omavahel lähedamalt suguluses kui CHIKVga (Khan jt, 2002).

Arvatav seletus bioloogilistele erinevustele ONNV ja CHIKV vahel on muutused 3' mittekodeerivas regioonis (*non-coding region*, NCR). Võrreldes alfaviiruste 3' NCR järjestusi selgub, et see osa viiruse genoomist varieerub tugevalt. Erinevused 3' NCR regioonis tulenevad sellest, et kõikidel sekveneeritud alfaviirustel on kordusjärjestused 3' NCRis, mis varieeruvad pikkuselt, tihti vastavalt serogrupile (Pfeffer jt, 1998). On näidatud, et muutused nendes kordusjärjestustes võivad mõjutada viiruse replikatsiooni erinevates rakutüüpides (Kuhn jt, 1991).

Mittestruktuursed valgud alfaviiruste hulgas omavad mitmeid ühiseid omadusi nagu näiteks: identne 17 aminohappeline järjestus nsP1 N-terminaalses otsas (Ou jt, 1983), nsP2 valgule on

iseloomulikud N-terminaalses domeenis nukleosiid trifosfaati siduvad motiivid (Solignat jt, 2009), negatiivne nsP3 laeng (Strauss jt, 1984; Faragher jt, 1988) ning RNA-st sõltuv polümeraasi motiiv nsP4 C-terminaalse otsa lähedal (Kamer ja Argos, 1984). CHIKV ja ONNV nsP4 valgud omavad 91%-list sarnasust. RNA-st sõltuva polümeraasi motiivi olemasolu mõlemal viirusel viitab nsP4 valguga sarnasele funktsioonile (Mi jt, 1989). Funktsioonide osas on erinevate alfaviiruste mittestruktuursed valgud väga sarnased. Kuigi mõnede valkude töös esinevad teatud erinevused. SFV nsP1 valk omab hüdrofiilsete ja lipofiilsete omadustega amfipaatsset peptiidisegmenti, mis omab olulist funktsiooni replikatsioonikomplekside sidumisel raku sisemembraani külge RNA replikatsioonil (Spuul jt, 2007). Polüproteiinide lõikamise eest vastutab nsP2 proteinaas ning need lõikesaidid varieeruvad alfaviiruste vahel, kuid SFV puhul ei vii nsP3/4 saidi lõikamist läbi nsP2 proteinaas, vaid vastse P1234 eellasvalgu lõikamist vahendab nsP4 (ten Dam jt, 1999). SFV nsP2 on viiruse replikaasi oluline komponent, ta seondub 26S RNA promooterile ja osaleb positiivsete 42S RNA ahelate sünteesimisel (Suopanki jt, 1998). CHIKV nsP3 valgul on kaks eristatavat domeeni: alfaviiruste seas konserveerunud N-terminaalne domeen ja C-terminaalne domeen, mis varieerub alfaviiruste hulgas nii järjestuselt kui ka pikkuselt. Nukleotiidijärjestuste võrdlemisega on kindlaks tehtud, et CHIKV N-terminaalne domeen kuulub makro H2A domeeni perekonda. Selle perekonna evolutsiooni käigus konserveerunud makrodomeene leidub laialdaselt bakterites, taimedes ja loomades (Pehrson ja Fuji, 1998). Mittekonserveerunud C-terminaalne domeen võimaldab deletsioonide teket ilma mutantse viiruse replikatsioonipotentsiaali halvamata (Davis jt, 1989). CHIKV nsP3 valguga pinnal on positiivselt laetud aminohapped, mis suurendavad selle valguga RNA sidumise võimet (Solignat jt, 2009). Tasub ka märkida, et kui kõikide alfaviiruste nsP3 valgud on negatiivselt laetud, omavad CHIKV ja ONNV rohkem negatiivselt laetud aminohappeid kui sama grupi viirused (Li, jt 1990). Alfaviiruste nsP4 valk erineb viiruste vahel opaal-terminaatorikoodoni olemasolu või puudumise poolest. Terminaatorikoodoni funktsiooniks on reguleerida nsP4 tootmise kogust; pole selge, kuidas haldavad selle valguga produktsiooni viirused, kellel puudub opaal stopp-koodon (Strauss jt, 1988).

### **1.7. Antigeensed omadused**

Alfaviiruste perekonna viirused on liigitatud seitsmesse antigeensesse kompleksi; käesolevas töös kasutatud alfaviirused kuuluvad Semliki Forest kompleksi (Powers jt, 2000). Need seitse antigeenset kompleksi ühendavad viiruseid, millel on sarnased meditsiiniliselt tähtsad iseloomujooned. Järjestusepõhilise analüüsi tulemused on näidanud, et alfaviirused

grupeeruvad sarnaselt nii geneetiliste suhete kui antigeense klassifikatsiooni järgi (Solignat jt, 2009).

Lüüsilaiakude inhibeerimise testidega on võrreldud ONNV, CHIKV ja SFVga nakatatud tassidel inhibitsioonitsoonide suuruseid. Viiruse läbi põdenud hiirte või küülikute antiseerumitesse kastetud paber-kuulikesed asetati nakatatud tassidele ja inkubeeriti 35°C juures. ONNVga nakatatud tassidel oli selge inhibitsioonitsoon kõigi viiruste antiseerumitega kaetud kuulikeste ümber. Samu seerumeid testiti ka SFV ja CHIKVga nakatatud tassidel – CHIKV andis lisaks enda antikehadele vastuse ka SFV seerumite vastu ning SFVd inhibeeris ainult homoloogne antiseerum (Porterfield, 1961).

Monoklonaalseid antikehi kasutades on kindlaks tehtud, et ONNV ja CHIKV vahel esineb ühesuunaline antigeenne suhe ehk CHIKV vastased antikehad reageerivad sarnaselt nii CHIKV kui ONNV antigeenidega aga ONNV antikehad annavad CHIKV antigeeniga reageerimisel nõrga vastuse (Blackburn jt, 1995; Chanas jt, 1979; Karabatsos, 1985). Seroloogiliste testide põhjal on näidatud, et ONNV ja CHIKV antikehad reageerivad omavahel ühesuunaliselt. Sellise antigeense suhte iseloomu tõttu peetakse ONNV CHIKV alamliigiks (Powers jt, 2000). Testid monoklonaalsete antikehadega vihjavad, et ONNV on evolutsiooni käigus säilitanud enamik CHIKV antigeenseid saite, kuid paljud ONNV epitoobid on läbi teinud piisavaid konformatsioonilisi muutusi, et nende vastu valmistatud monoklonaalsed antikehad ei tunne ära CHIKV seondumissaite (Blackburn jt, 1995).

Enamikus avaldatud töödes on katseid tehtud infektsiooni läbi põdenud loomade või inimeste seerumitega, kuid suur osa veres ringlevaid antikehi on suunatud virionis olevate struktuursete valkude vastu. Käesolevas töös on kasutatud mittestruktuurseid valke, mis on saadud kantslikult küülikute immuniseerimisel rekombinantsete valkudega ning nende reaktiivsuse kohta informatsioon puudub.

# EKSPERIMENTAALNE OSA

## 1. Töö eesmärgid

Alfaviiruste mittestruktuursetid valke ja nende omadusi on palju uuritud, kuid nende täpsed funktsioonid ja omadused ei ole veel täielikult selged. Meie labori põhilisteks uurimisobjektideks on alfaviirused Semliki Forest viirus ja Chikungunya viirus, aga ka teised Vana-Maailma alfaviirused. Peamisteks eesmärkideks on viiruse poolt kodeeritud valkude funktsioonide, replikatsioonimehhanismide ning viiruse ja peremehe vaheliste interaktsioonide uurimine. Lisaks uuritakse ka patogeensusega seotud omadusi ja peremehe viiruse-vastase kaitse iseärasusi. Alfaviiruste spetsiifiliste mittestruktuursete valkude vastased antikehad on põhilisteks tööriistadeks molekulaarbioloogilistes uuringutes. Selliste antikehade saamiseks immuniseeriti küülikuid SFV, CHIKV ja ONNV rekombinantsete mittestruktuursete valkudega, mille tagajärjena saadi paneel polükloonaalseid alfaviiruste mittestruktuursete valkude vastaseid antiseerumeid.

Antud töö uuringu eesmärgid olid järgmised:

- 1) iseloomustada laboris olevate SFV, CHIKV ja ONNV mittestruktuursete valkude vastaste antikehade paneeli enim kasutatud immunoloogiliste meetoditega, *western blot* ja immunofluorestsentsanalüüsiga;
- 2) optimeerida nende meetodite protokolle.

## **2. Materjalid ja meetodid**

### **Rakuliinid ja söötmed**

Viiruste paljundamiseks kasutati BHK-21 (*baby hamster kidney*, beebihamstri neeru fibroblastid) rakuliini. Rakke kasvatati 37°C ja 5% CO<sub>2</sub> juures GMEM (*Glasgow Modified Eagle's Medium, Gibco*) söötmes koos 10% FCSi (*fetal calf serum*, veise loote seerum, PAA), 10 mM HEPESe; pH 7.2 (*Sigma*), 10% TPB (*tryptose phosphate broth*, trüptoos-fosfaat-puljong, *Dicfo*) ja 100× penitsilliin/streptomütsiin seguga (*Sigma*). Nakatamisel kasutati GMEM söödet koos 2% BSA (*bovine serum albumin*, veise seerumi albumiin, *Sigma*) ning 10 mM HEPESega.

### **Viirused**

Rakke nakatati kolme erineva viirusega: Semliki Forest viirus (laboritüvi SFV4), Chikungunya viirus (tüvi LR2006\_OPY1) ja O'nyong'nyong viirus. Chikungunya ning O'nyong'nyong viirusega rakkude nakatamise viis läbi juhendaja, kuna need viirused on inimesele patogeensed ning nendega töötamine toimub bioloogilise ohutustaseme 3\*\* tingimustes.

### **BHK-21 rakkude nakatamine**

#### **Immunofluorestsents-analüüsi jaoks**

100 µl viiruse varust tehti lahjendus 3 ml nakatamissöötmes. 150 µl lahjendust lisati igasse auku 24-augustele plaatidele, mille põhjas olid kattedklaasid eelkülvatud rakkudega ja inkubeeriti 37°C juures loksutades iga 10 minuti tagant, et vältida rakkude kuivamist. Tunni aja möödudes eemaldati viirusega sööde ja inkubeeriti rakke kasvusöötmes ~8 tundi.

#### **Western blot'i jaoks**

5 µl viiruse varust tehti lahjendus 2 ml nakatamissöötmes. 2 ml lahjendust lisati 100 mm diameetriga tassile, millele olid eelkülvatud rakud ja inkubeeriti 37°C juures loksutades iga 10 minuti tagant, et vältida rakkude kuivamist. Tunni aja möödudes eemaldati viirusega sööde ja inkubeeriti rakke kasvusöötmes üleöö.

## **Immunofluorestsentsanalüüs**

### **I protokoll**

Rakud fikseeriti 4% PFAga (*Paraformaldehyde*, paraformaldehüüd) 15 minutit. Seejärel pesti klaase 3 korda *Gibco Dulbecco PBS* (*phosphate buffered saline*, fosfaat puhverdatud soolalahus) (2.7 mM KCl; 137 mM NaCl; 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>) (DPBS) ja rakud permeabiliseeriti 0.1% Triton X-100ga 2 minutit. Peale seda pesti uuesti 2 korda DPBSis ning säilitati +4°C juures DPBSis. Rakud blokeeriti 3% BSA/DPBS-is lahuses 20 minutit toatemperatuuril. Seejärel pipeteeriti klaasidele primaarse antikeha (SFV, CHIKV või ONNV mittestruktuursete valkude spetsiifilised küüliku seerumid) lahjendus blokilahuses ja inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Peale seda pesti klaase 0.2% BSA/DPBS lahuses 3 korda 10 minutit ning inkubeeriti klaase sekundaarse antikeha (kitses toodetud küüliku-vastane IgG konjugeeritud Alexa Fluor568-ga, Invitrogen) lahuses (1:1000 lahjendus blokilahuses) 1 tund pimedas. Siis pesti uuesti klaase 0.2% BSA/DPBS lahuses 3 korda 10 minutit. Järgmisena tehti post-fikseerimine 3% PFA-DPBSis 5 minutit ning pesti klaase 3 korda 10 minutit DPBSis. Viimasena pesti klaase destilleeritud vees. Preparaadi valmistamiseks kuivatati rakkudega klaasid ning asetati rakukihiga allapoole alusklaasile 3 µl *SlowFade* + 0.5 µg/ml DAPI pleekimisvastasele reagentile (Invitrogen). Preparaate vaadeldi Carl Zeiss LSM 710 konfokaalmikroskoobiga.

### **II protokoll**

Rakud fikseeriti 4% PFAga (*Paraformaldehyde*, paraformaldehüüd) 20 minutit. Lisati klaasidele 500 µl -20°C metanooli ning hoiti -20°C külmkapis 10 minutit. Seejärel pesti klaase 2 korda DPBSis ning säilitati 4°C juures DPBSis. Rakud blokeeriti 5% FCS-DPBS lahuses 30 minutit toatemperatuuril, peale mida pipeteeriti klaasidele primaarse antikeha (SFV, CHIKV või ONNV mittestruktuursete valkude spetsiifilised küüliku seerumid) lahust, lahjendatud blokk-lahuses ning inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Seejärel pesti klaase 3 korda DPBSiga ja inkubeeriti klaase sekundaarse antikeha (kitses toodetud küüliku-vastane IgG konjugeeritud Alexa Fluor568-ga, Invitrogen) lahuses (1:1000 lahjendus blokilahuses) 1 tund toatemperatuuril pimedas. Siis pesti klaase uuesti 3 korda DPBSiga ja destilleeritud veega. Preparaadi valmistamiseks kuivatati klaas ning asetati alusklaasile 3 µl *SlowFade* + 0.5 µg/ml DAPI pleekimisvastasele reagentile (Invitrogen). Preparaate vaadeldi Carl Zeiss LSM 710 konfokaalmikroskoobiga.

## Western blot

Viirusvalkude tuvastamiseks rakulüsaatides kasutati *western blot* analüüsi. Rakud pesti PBSiga, lüüsi 500 µl-s Laemmli puhvris (50 mM Tris-HCl pH 6.8; 100 mM DTT; 2% SDS; 10% glütserool; 0.02% broomfenoolsinine) ja saadud lüsaate kuumutati 5 minutit 100°C juures. Lüsaadid säilitati -20°C juures. Lüsaati kanti 10% SDS-poliakrüülamiidgeelile ja lahutati SDS-PAGE'il (SDS-poliakrüülamiidgeelelektroforeesil) 1× SDS jooksupuhvris (25 mM Tris; 0.25 M glütsiin; 0.1% SDS; pH 8.3). Lahutatud valgud kanti 15 minuti jooksul 15 V juures geelilt üle nitrotselluloosfiltrile (*GE Healthcare*). Geeli ja filtrit hoiti enne ülekannet *semi-dry* ehk poolkuivas ülekande puhvris (39 mM glütsiin; 48 mM Tris; 0.037% SDS; 20% metanool). Ülekandeks kasutati *Trans-Blot Semi-Dry* masinat (*Bio-Rad*). Valkudega filtrit blokeeriti 5% lõssilahusega *western blot*'i pesulahuses (50 mM Tris pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.1% Tween20) üleöö 4°C juures või 1 tund toatemperatuuril. Seejärel inkubeeriti filtrit primaarse antikehaga 2% lõssilahuses 1 tund toatemperatuuril. Pärast seda pesti filtrit 3 korda 10 minutit *western blot*'i pesulahuses, peale mida inkubeeriti filtrit sekundaarse antikehaga 2% lõssipulbri lahuses 1 tund ning pesti uuesti 3 korda 10 minutit *western blot*'i pesulahuses. Kõik inkubatsioonid ja pesud teostati loksutil.

Kasutatud primaarsed antikehad on saadud küülikute immuniseerimisel meie laboris toodetud ja puhastatud rekombinantsete SFV, CHIKV ja ONNV mittestruktuursete valkudega. Testitud primaarsete antikehade lahjendused on välja toodud **Tabelis 1.** tulemuste ja arutelu sektsioonis.

Sekundaarne antikeha oli 1:10000 lahjendusega küüliku immunoglobuliinide vastane kitse IgG, millega konjugeeritud mädarõika peroksüdaasi signaali pärast *western blot*'i detekteeriti. Selleks kasutati *GE Healthcare ECL (Enhanced chemiluminescence)* tuvastamise kit'i. Signaal filtrilt eksponeeriti röntgenfilmile 1 minuti jooksul.

### 3. Tulemused ja arutelu

#### Antikehade iseloomustamine *western blot*iga

Eelnevate uuringute käigus oli välja selgitatud optimaalseimad SFV antiseerumite lahjendused *western blot*'i jaoks. Need andmed võeti eeskujuks ülejäänud antikehadega lahjenduste tegemisel ning ebasobiva tulemuse korral testiti vastavalt liiga tugeva ja liiga nõrga signaali korral lahjemat või kangemat lahjendust ning valiti välja kõige selgema signaaliga ja kõige väiksema taustamüraga pildid. Töös kasutatud antiseerumite testitud lahjendused on välja toodud **Tabelis 1**.

**Tabel 1. Kasutatud antiseerumite lahjendused, nendele seerumitele vastavate valkude pikkused ja eeldatavad molekulmassid.** Lahjenduste tulbas on märgitud ära kõik testitud lahjendused, millest valiti välja optimaalseimad. Tumedalt on tähistatud parimat tulemust näidanud lahjendused.

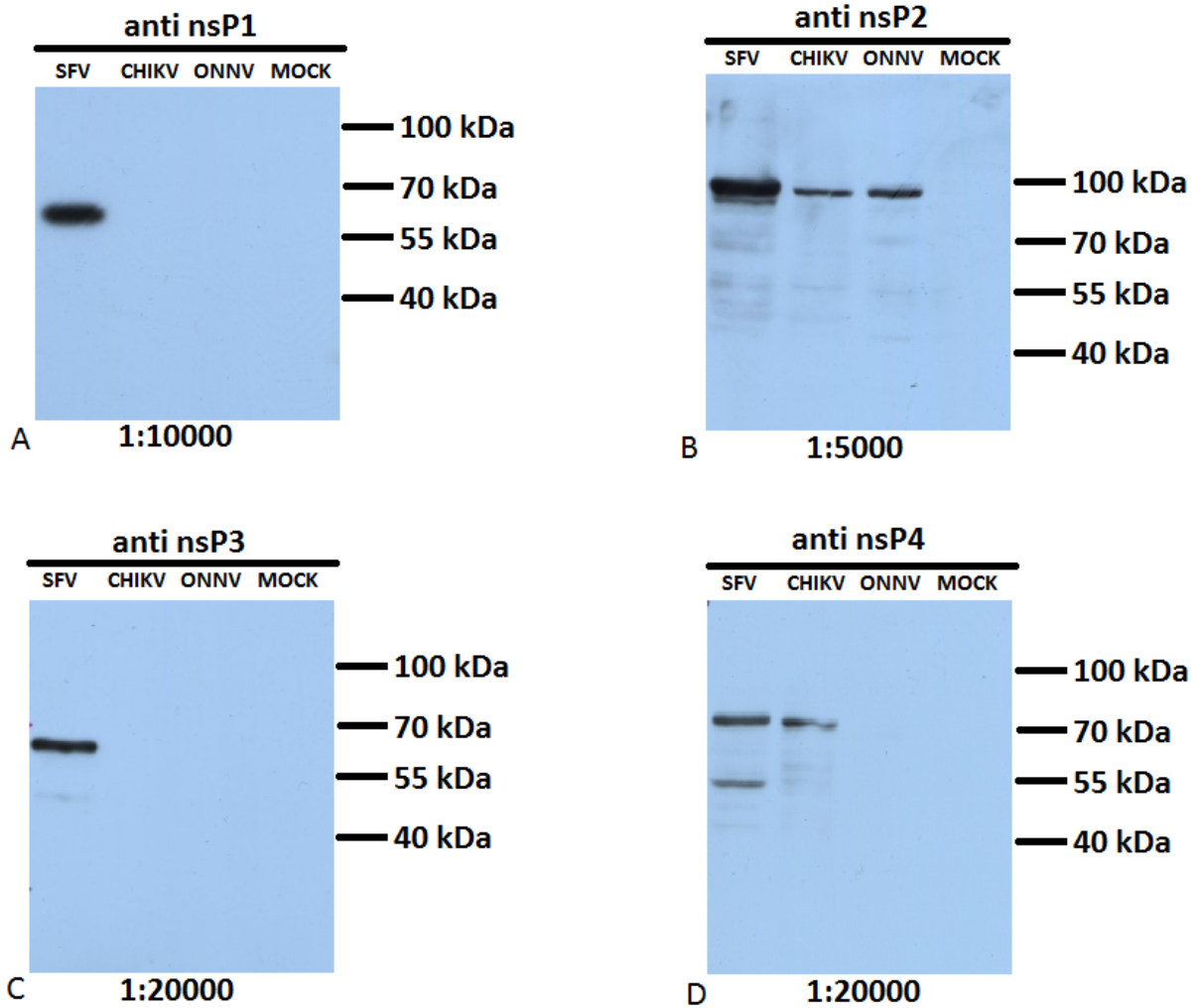
<b>Antikeha</b>	<b>Western blot lahjendus</b>	<b>Immunofluores tsentsanalüüsi lahjendus</b>	<b>Valgu pikkus (ah)</b>	<b>Molekulmass (kDa)</b>
anti-SFV nsP1	<b>1:10000</b>	1:2000 1:1000 <b>1:500</b>	537	64
anti-SFV nsP2	<b>1:5000</b> 1:10000	1:1000 <b>1:500</b> 1:250	798	96
anti-SFV nsP3	1:10000 <b>1:20000</b>	1:4000 1:2000 <b>1:1000</b>	482	59
anti-SFV nsP4	1:10000 <b>1:20000</b>	1:4000 1:2000 <b>1:1000</b>	614	74
anti-CHIKV nsP1	<b>1:5000</b> 1:10000	1:2000 1:1000 <b>1:500</b>	535	64
anti-CHIKV nsP2	<b>1:5000</b> 1:10000	1:1000 1:500 <b>1:250</b>	798	96
anti-CHIKV nsP3	1:5000 <b>1:10000</b>	1:2000 <b>1:1000</b> 1:500	530	64
anti-CHIKV nsP4	<b>1:5000</b> 1:10000	<b>1:1000</b> 1:500 1:250	611	73
anti-ONNV nsP1	<b>1:10000</b>	1:5000 1:2500 <b>1:1000</b>	535	64
anti-ONNV nsP2	<b>1:10000</b>	1:5000 1:2500 <b>1:1000</b>	798	96
anti-ONNV nsP3	<b>1:10000</b>	1:5000 1:2500 <b>1:1000</b>	570	68

Pärast nakatamist ja üleöö inkubeerimist lüüsi rakud ja tuvastati *western blot*iga spetsiifiliste mittestruktuursete viirusvalkude olemasolu rakkudes. Uuritava viirusvalgu olemasolu näitab temale vastava molekulmassi kõrgusel ilmnev triip. Triibu paksus varieerub vastavalt valgu kogusele rakulüsaadis. Kõikides lüsaatides oli erinevate antiseerumitega inkubeerimise järgselt tuvastatavad vastavate mittestruktuursete valkude signaalid, lisaks tundsid osad antikehad ära valke teiste viirustega nakatatud lüsaatides. Negatiivse kontrollina kasutati nakatamata BHK-21 rakkude lüsaati.

*Semliki Forest viiruse spetsiifiliste mittestruktuursete valkude vastaste antikehade western blot analüüsid*

SFV puhul uuriti kõikide mittestruktuursete valkude sisaldust rakulüsaatides, alustades antiseerumi lahjendusest 1:10000. NsP2 puhul oli sellel lahjendusel signaal liiga nõrk ning nsP3 ja nsP4 puhul oli lahjendus liiga kange, kuna ilmnes palju mittespetsiifilist signaali ja taustamüra. Seetõttu kasutati vastavalt nsP2 puhul kangemat lahjendust (1:5000) ning nsP3 ja nsP4 puhul lahjemat lahjendust (1:20000).

Kõik SFV-vastased antiseerumid tundsid ära vastavad mittestruktuursed valgud ning nende suurused olid kooskõlas kirjanduses avaldatud andmetega (**Joonis 4**) (Takkinen jt, 1990). Lisaks tundis anti-nsP2 seerum ära valgu ~95 kDA juures CHIKV ja ONNVga nakatatud rakkudes ning anti-nsP4 seerum valgu ~75 kDA juures CHIKVga nakatatud rakkudes. Need signaalid võivad olla tulenenud nende antiseerumite ristreaktiivsusest, mille tõttu analüüsitud antikehad tunnevad ära ka teiste alfaviiruste mittestruktuurseid valke. NsP4 puhul ilmneb SFV-ga nakatatud rakkude lüsaadis mittespetsiifiline lisaband ~50 kDA juures, mis võib olla põhjustatud liiga suurest lüsaadi hulgast geelil või valgu degradatsioonist, mille tulemusena tekib lisasignaal (Mahmood ja Yang, 2012).

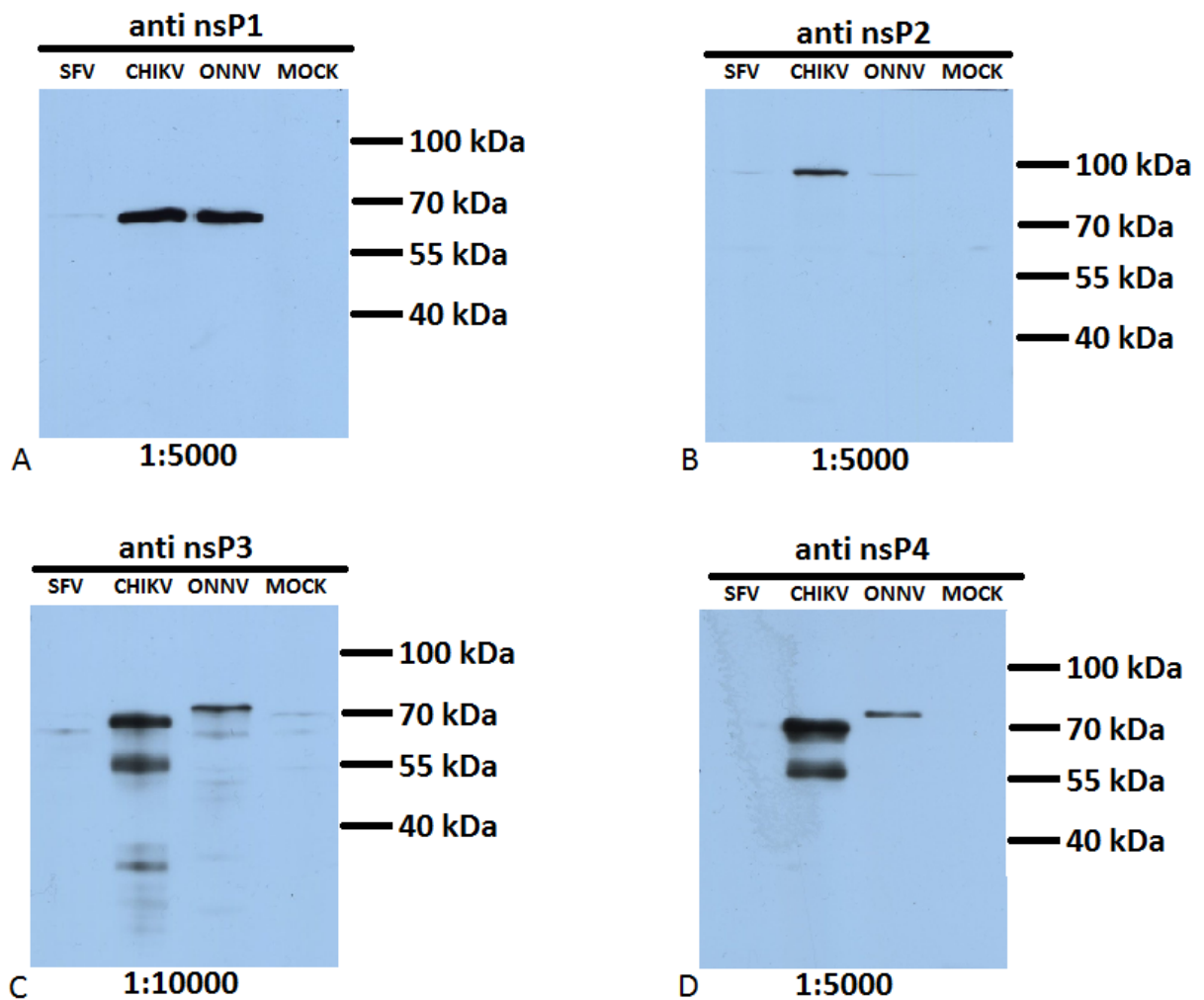


**Joonis 4. Western blot analüüsid Semliki Forest viiruse spetsiifiliste mittestruktuursete valkude vastaste antikehadega.** Geelile on kantud kolme erineva alfaviirusega nakatatud rakkude lüsaate: Semliki Forest viirus (SFV), Chikungunya viirus (CHIKV) ja O'nyong'nyong viirus (ONNV). Negatiivseks kontrolliks on geelile kantud nakatamata rakkude lüsaat (MOCK). (A) anti-nsP1 (64 kDa), (B) anti-nsP2 (96 kDa), (C) anti-nsP3 (59 kDa), (D) anti-nsP4 (74 kDa). Marker – *Prestained protein ladder (Pageruler, Thermo Scientific)*.

*Chikungunya viiruse spetsiifiliste mittestruktuursete valkude vastaste antikehade western blot analüüsid*

CHIKV puhul uuriti samuti kõikide mittestruktuursete valkude sisaldust rakulüsaatides. Kõikide antiseerumite puhul testiti 1:5000 ja 1:10000 lahjendust. NsP1-, nsP2- ja nsP4- vastaste seerumite puhul oli kõige optimaalsem 1:5000 lahjendus, sest teise lahjenduse korral ei tekkinud piisavalt tugevat signaali. NsP3 puhul osutus esimene lahjendus (1:5000) liiga kangeks, kuna liialt tugeva signaali tõttu ei olnud võimalik eristada geelelektroforeesil lahutatud valke, lisaks esines palju mittespetsiifilist signaali. Anti-nsP2 seerumi puhul oli klassikaline röntgenfilmile eksponeerimise aeg (1 min) liiga lühike, kuna signaali ei olnud võimalik peaaegu üldse tuvastada. 15 minutilise eksponeeringuga ilmnes sobivam signaal.

Kõik antiseerumid reageerisid endale spetsiifiliste mittestruktuursete valkudega, paiknemine geelil oli kooskõlas kirjanduses esitatud andmetega (**Joonis 5**) (Khan jt, 2002). Lisaks tundis nsP1 antiseerum ära ka sama molekulmassiga valgu ONNVga nakatatud rakkudes. CHIKV anti-nsP2 seerumi puhul on sarnaselt anti-SFV nsP2 seerumile (**Joonis 4**) näha tugevat signaali CHIKVga nakatatud rakkudes ning nõrgemat signaali SFV ja ONNV rakulüsaatides. Anti-CHIKV nsP3 seerum tunneb ONNV rakulüsaatides ära produkti ~75 kDa juures, milleks võib olla ONNV nsP3 valk (68 kDa). *Western blot* analüüsil anti-nsP3 seerumiga ilmneb taustamüra, mis on tõenäoliselt põhjustatud membraani liialt pikast eksponeerimisest röntgenfilmile, liiga lühikesest pesuajast või liiga kangest antiseerumi lahjendusest. Mittespetsiifiline lisaband ~55 kDa juures anti-nsP3 antikeha korral võib olla tekkinud nsP3 valgu mittefosforüleerimise tagajärjel. Fosforüleerimise käigus lisatakse järk-järgult algele valguvormile fosfaatrühmasid, mille tulemusena suureneb tema molekulmass (Li jt, 1990). Selle tõttu on näha ka kaks erinevat signaali, üks fosforüleeritud (~65 kDa) ja teine fosforüleerimata valgu kohta (~55 kDa). Anti-nsP4 seerumiga analüüsilt on näha, et lisaks spetsiifilise valgu signaalile esineb ka lisasignaal ~55 kDa juures ning antikehad tunnevad ära ka ~75 kDa suuruse produkti ONNV rakulüsaatides. Kuigi geelilt on raske tuvastada täpset produkti suurust, võib arvata, et antikeha tunneb ära ONNV nsP4 valgu, mille eeldatav suurus on 73 kDa (Lanciotti jt, 1998).

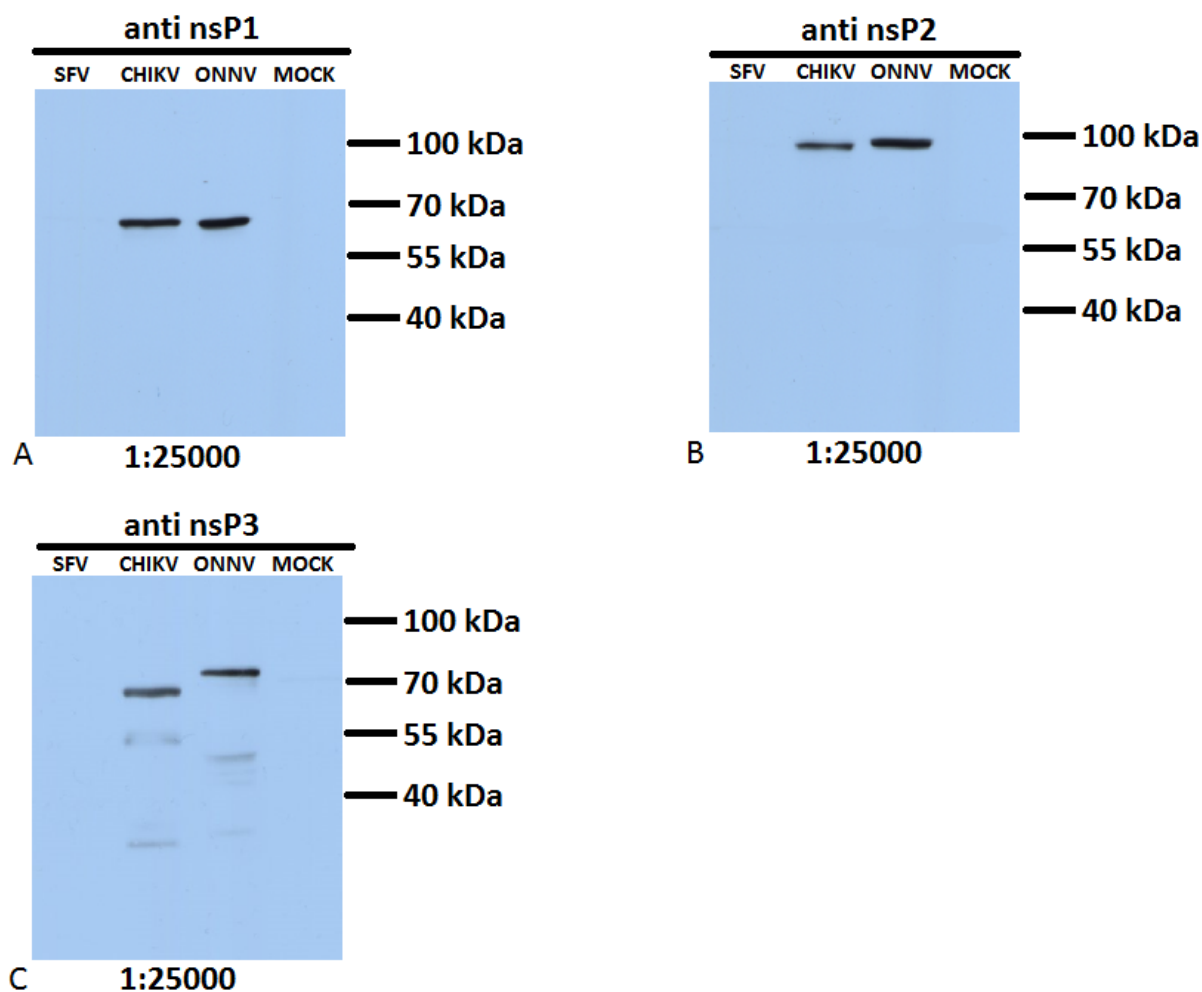


**Joonis 5. Western blot analüüsid Chikungunya viiruse spetsiifiliste mittestruktuursete valkude vastaste antikehadega.** Geelile on kantud kolme erineva alfaviirusega nakatatud rakkude lüsaate: Semliki Forest viirus (SFV), Chikungunya viirus (CHIKV) ja O'nyong'nyong viirus (ONNV). Negatiivseks kontrolliks on geelile kantud nakatamata rakkude lüsaat (MOCK). (A) anti-nsP1 (64 kDa), (B) anti-nsP2 (96 kDa), (C) anti-nsP3 (64 kDa), (D) anti-nsP4 (73 kDa). Marker – *Prestained protein ladder (Pageruler, Thermo Scientific)*.

*O'nyong'nyong viiruse spetsiifiliste mittestruktuursete valkude vastaste antikehade western blot analüüsid*

O'nyong'nyong viirusel kasutati *western blot* analüüsi tuvastamiseks nsP1-3 valkude sisaldust rakulüsaatides. Spetsiifilist anti-nsP4 seerumit laboris ei olnud. NsP4 valgule spetsiifilisi antikehase on raske toota, kuna selle antikeha saamiseks on esmalt vaja puhtal kujul nsP4 valku. NsP4 valgu isoleerimine on raske, kuna bakterikultuuris, kus pole temale omaseid tingimusi sünteesitakse teda väga kiiresti ja üleküllas. Selle tulemusena ei jää valk lahusesse vaid sadestub välja. Kuna laboris puudus vajadus anti-ONNV nsP4 seerumi vastu, seda ei toodetud. Kõikide antiseerumite korral osutus esmaselt testitud 1:25000 lahendus sobivaks.

Ka ONNV puhul reageerisid kõik antiseerumid endale spetsiifiliste mittestruktuursete valkudega ning nsP1 ja nsP2 puhul oli nende paiknemine geelil kooskõlas kirjanduses avaldatud andmetega (Lanciotti jt, 1998). Spetsiifiline signaal nsP3 valgule ilmnes selle eest ~75 kDa juures, mis ei vasta kirjanduses esitatule (68 kDa) (**Joonis 6**). Selle põhjuseks võib olla tõenäoliselt post-translatsiooniliste modifikatsioonide, näiteks fosforüleerimise, mõju valgule. Nii anti-nsP1 kui anti-nsP2 seerumitega *western blot* analüüsid näitavad, et need antikehad tunnevad lisaks enda spetsiifilisele valgule ära ka sama molekulmassiga valgu CHIKVga nakatatud rakkude lüsaatides. Anti-nsP3 puhul esineb sarnaselt anti-CHIKV nsP3 seerumile (**Joonis 5**) kerge taustamüra, millel võivad olla sarnased põhjused: liiga lühike pesuaeg, liiga pikk röntgenfilmile eksponeerimine või liialt kange antikeha lahus (Mahmood ja Yang, 2012). Lisaks on selle antikeha puhul selgelt tuvastatav signaal ~70 kDa juures CHIKVga nakatatud rakulüsaadis.



**Joonis 6. Western blot analüüsid O'nyong'nyong viiruse spetsiifiliste mittestruktuursete valkude vastaste antikehadega.** Geelile on kantud kolme erinevate alfaviirusega nakatatud rakkude lüsaate: Semliki Forest viirus (SFV), Chikungunya viirus (CHIKV) ja O'nyong'nyong viirus (ONNV). Negatiivseks kontrolliks on geelile kantud nakatamata rakkude lüsaat (MOCK). (A) anti-nsP1 (64 kDa), (B) anti-nsP2 (96 kDa), (C) anti-nsP3 (~75 kDa). Marker – *Prestained protein ladder (Pageruler, Thermo Scientific)*.

Antikehade iseloomustamisel oli peamine eesmärk teada saada, kas testitud antikehad tunnevad ka ära valke teiste viirustega nakatatud rakulüsaatides. Kõige enam esines rist-reaktiivsust CHIKV ja ONNV seerumite vahel. Kõikide CHIKV mittestruktuursete valkude vastased antikehad tundsid ära ka vastavaid valke ONNVga nakatatud rakkude lüsaatides, kuigi anti-CHIKV nsP2 korral oli signaal väga nõrk. Selline rist-reaktiivsus leiab aset tõenäoliselt selle tõttu, et CHIKV ja ONNV mittestruktuursete polüproteiinide järjestuste vahel on suurem homoloogia (85%) kui SFV ja CHIKV vahel (70%) või SFV ja ONNV vahel (68%). Teisalt jällegi tundsid ka SFV antiseerumid ära CHIKV ja ONNV mittestruktuursete valke. Selle põhjuseks võib olla nende viiruste lähedane sugulus, mille tõttu antikehad endale vastava viiruse vastu tunnevad ära ka teise viiruse samu valke. Kõige paremini oli selline

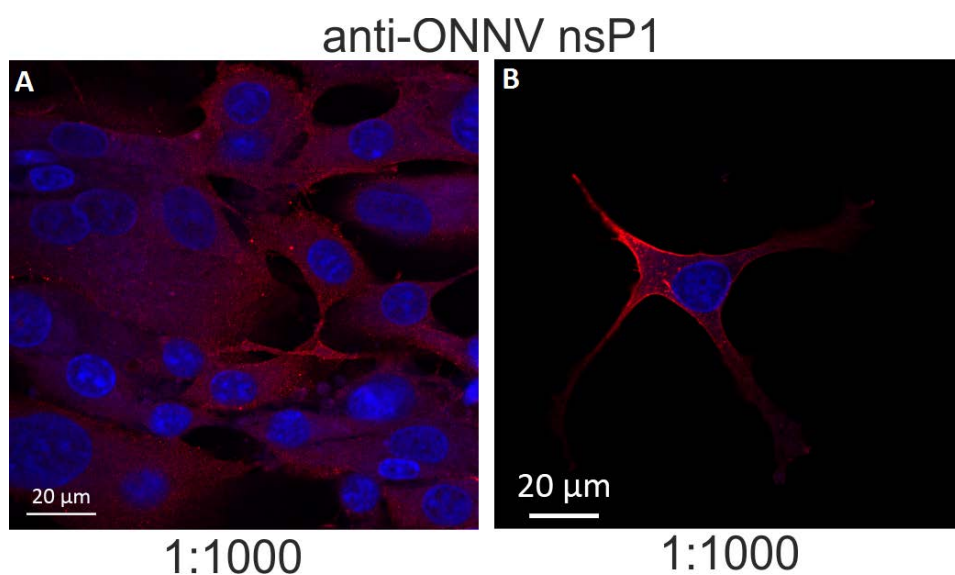
signaal vaadeldav CHIKV anti-nsP1 ja ONNV anti-nsP1 antikehade võrdlemisel. Mõlemad tundsid homoloogses rakulüsaadis ja vastavalt kas ONNV või CHIKV lüsaadis ära sama molekulmassiga valgu.

*Western blot* analüüside tulemuste võrdlemisel on võimalik järeldada, et soovitud spetsiifilise signaali saamist mõjutavad peale antiseerumite lahjenduste ka teised tegurid, nagu näiteks rakulüsaatide kogus, pesuajad ning röntgenfilmile eksponeerimise aeg. Soovitud tulemuste saamiseks tuleks esialgu leida optimaalseimad tingimused ühe antiseerumiga (soovitavalt sellisega, mida on suures koguses) ning seejärel teha *western blot*'id ülejäänud analüüsitavaate antiseerumitega. Kui sellisel teel ei saavutata soovitud tulemust, on võimalik uue katse tegemisel parameetreid muuta.

### 3.2. Immunofluorestsentsanalüüs

Teise meetodina antikehade iseloomustamisel kasutati kaudset immunofluorestsentsanalüüsi. Primaarsete antikehadena kasutati täpselt samu antiseerumeid, mis *western blot* analüüsis (**Tabel 1**), kuid rakkude inkubeerimisel kasutatud antikehade lahjendused olid 5-25 korda kangemad. Igast antiseerumist tehti 3 lahjendust: *western blot*ist 5× kangem lahjendus ning lisaks veel kaks tugevamat lahjendust. Nakatamata rakke inkubeeriti alati kõige kangema antiseerumi lahjendusega.

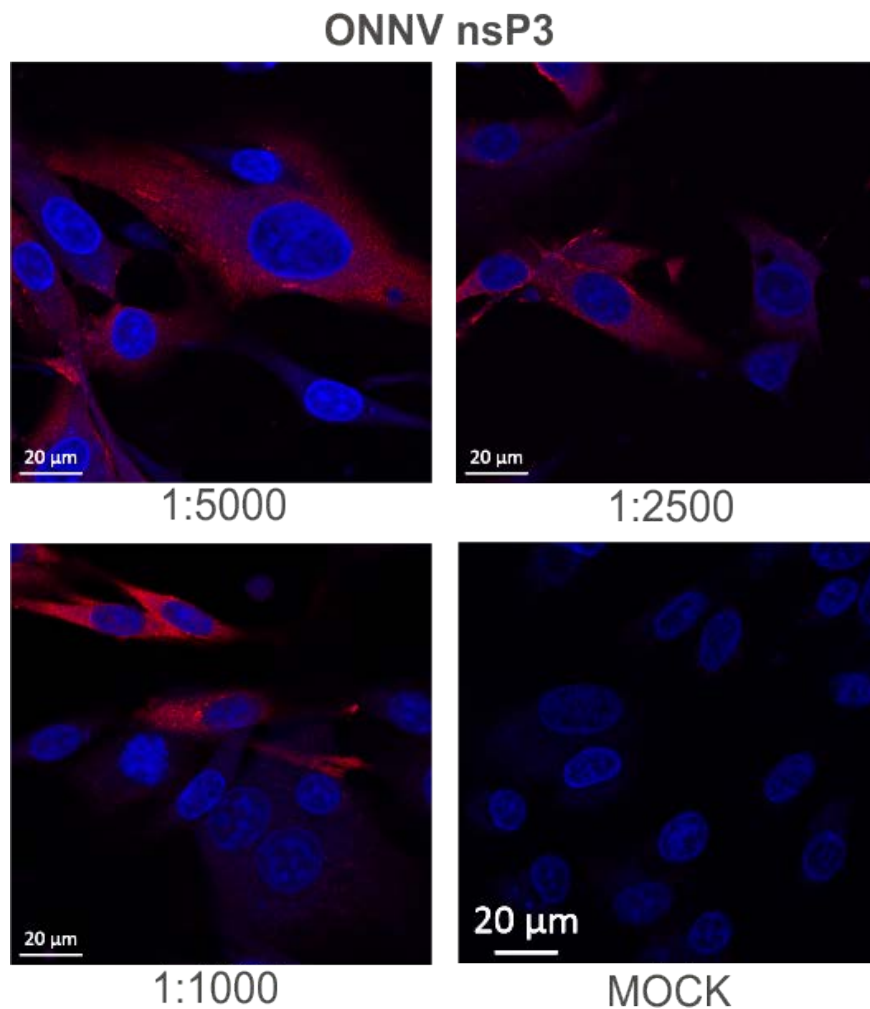
Pärast nakatamist fikseeriti rakud ning töödeldi vastavalt protokollile, et permeabiliseerida rakkude membraanid. Juba esimeste katsetega oli selge, et materjalide ja meetodite osas kirjeldatud immunofluorestsentsi II protokoll (permeabiliseeriti metanooliga) omab mitmeid eeliseid I protokollile (permeabiliseeriti Triton X-100ga, inkubeerimisjärgsed pesud 10 minutit) ees. Esiteks, oli I protokoll järgi tehtud preparaatide vaatlemisel mikroskoobis vaja kasutada tavalisest mitu korda suuremat laseri tugevust, vastasel juhul ei olnud näha soovitud rakkude helendamist (**Joonis 7**). Teiseks on II protokoll vähem aeganõudvam. Nende asjaolude tõttu on ka enamik töös esitatud immunofluorestsentsi pildid valminud just II protokoll järgi.



**Joonis 7. Kahe erineva immunofluorestsentsanalüüsi protokollide tulemuste võrdlus.** (A) I protokoll, (B) II protokoll. ONNVga nakatatud BHK-21 rakud. Primaarne antikeha anti-ONNV nsP1 (1:1000). Siniselt on värvunud rakutuumad (DAPI) ja punaselt nakatatud rakud, kus antikeha on ära tundnud nsP1 valgu. Sekundaarse antikeha (*Invitrogen Alexa Fluor 568*) lahjendus 1:1000.

Nende kahe pildi võrdluses on näha, et pildil **B** on selgelt ja hästi tuvastatav nsP1 valgu lokaliseerimine plasmamembraanile. Ka pildil **A** on see näha, kuid esineb palju mittespetsiifilist signaali.

Järgnevalt on välja toodud SFV, CHIKV ja ONNV spetsiifiliste mittestruktuursete valkude vastaste antikehadega läbi viidud immunofluorestsentsanalüüsid, pildistatud konfokaalmikroskoobi all. Esimesena on näidatud pilt, kus on võrdluseks toodud kõik lahjendused ühe antiseerumi kohta (**Joonis 8**). Edaspidi on valitud välja ainult lahjendus, mis andis parima pildi. Piltide valimisel lähtuti sellest, kui hästi on antikeha valgule seondunud ehk kui tugevalt rakud helendavad. Arvestati ka seda, kas nakatunud ja nakatumata rakke on võimalik selgelt eristada (minimaalne taustamüra).



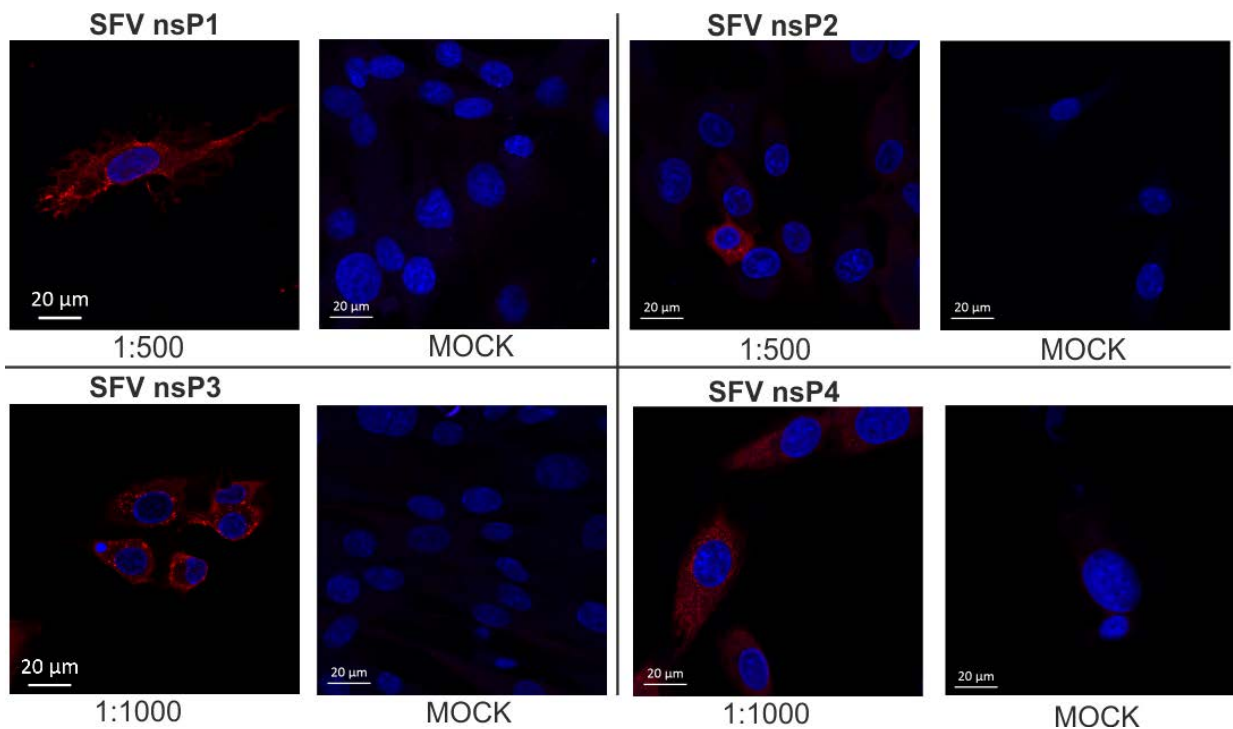
**Joonis 8. Anti-ONNV nsP3 seerumite erinevate lahjenduste võrdlus immunofluorestsentsanalüüsil.** ONNVga nakatatud BHK-21 rakud ja nakatumata rakud (MOCK). Siniselt on värvunud rakutuomad (DAPI), punaselt on värvunud nakatatud rakud, kus antikeha on ära tundnud viiruse nsP3 valgu. Sekundaarse antikeha (*Invitrogen Alexa Fluor 568*) lahjendus 1:1000.

Näitena on toodud anti-ONNV nsP3 seerumite erinevate lahjenduste võrdlus immunofluorestsentsanalüüsil. Kõikide lahjenduste korral on selgelt eristatavad siniselt helendavad rakkude tuomad (DAPI) ja spetsiifilise valgu ära tundnud antikeha seondumise järgselt punaselt helendavad nakatatud rakud. nsP3 valgu signaal lokaliseerub hajuvalt tsütoplasmas, lisaks on näha tugevamalt värvunud täppe, mis viitavad valgu olemasolule

replikatsioonikompleksides (**Joonis 8**) (Vihinen jt, 2001). Lahjenduste võrdlemisel on näha, et kõige erksamalt helendavad kõige kangema antiseerumi lahjendusega inkubeeritud rakud. Samas, on ka 1:5000 lahjenduse korral selgelt tuvastatav näha soovitud signaal, mistõttu antikeha säästlikkusele mõeldes on mõistlikum kasutada nõrgemat lahjendust.

**Joonisel 9** esitatud piltidel on välja toodud kõige optimaalsemad lahjendused testitud SFV antiseerumitele. Kõikidel piltidel on näha nakatatud rakud (helendavad punaselt) ja rakkude tuumad (sinised, värvunud DAPIga). nsP1 valk lokaliseerub vastavalt kirjanduses avaldatud andmetele raku plasmamembraani (Spuul jt, 2007), ning seda kinnitavad ka antud töös läbiviidud katsed. nsP2 valk omab tuumalokalisatsioonisignaali ja kirjanduses avaldatud andmete põhjal peaks oluline kogus nsP2 valku lokaliseeruma rakutuumadesse (Peränen jt, 1990). Käesoleva töö katsete tulemustes ei ole näha tugevat nsP2 valgu signaali tuumas. nsP3 ja nsP4 valgud lokaliseeruvad peamiselt tsütoplasmas leiduvatesse varieeruva suurusega vesiikuleid-meenutavatesse struktuuridesse ning levivad mõningal määral hajutatult läbi tsütoplasma, mis on ka kooskõlas ka kirjanduses täheldatuga (Peränen ja Kääriäinen, 1991; Peränen jt, 1993).

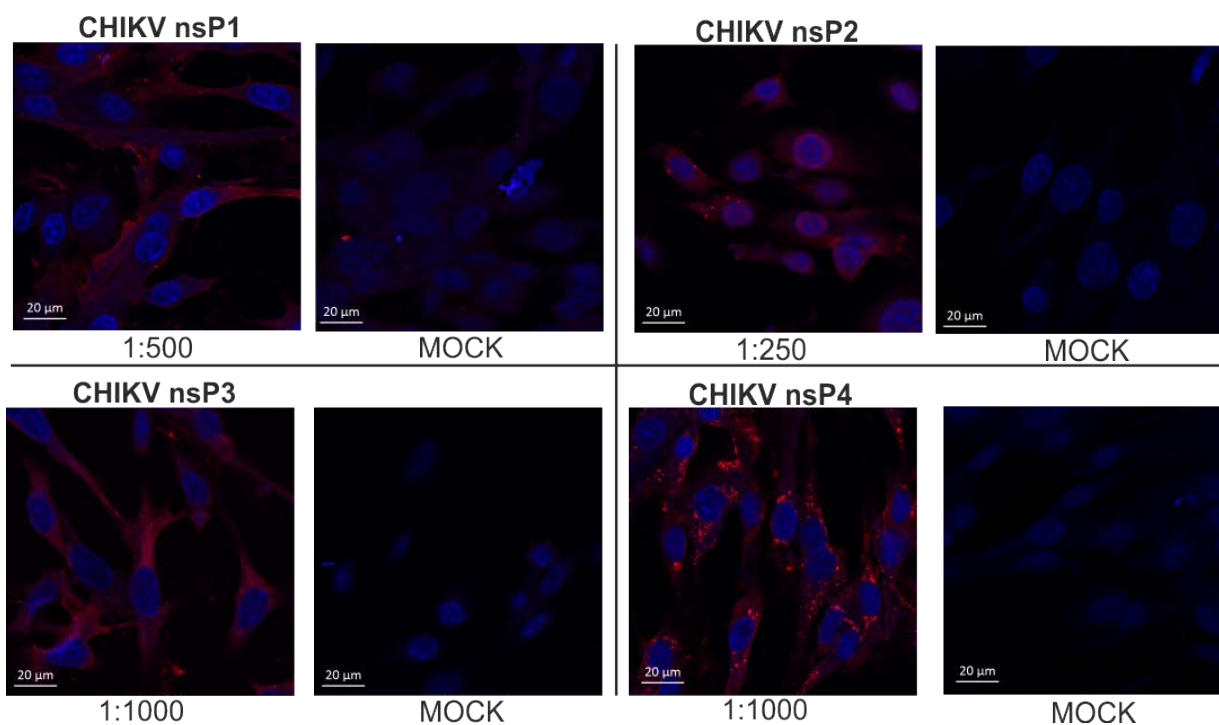
Nii anti-nsP1, anti-nsP3 kui anti-nsP4 puhul on tulemuste esitlemisel välja valitud kõige kangem testitud lahjendus, et võimalikult hästi visualiseerida spetsiifiliste valkude lokalisatsiooni nakatatud rakkudes. Nõrgemate lahjenduste korral ei olnud näha soovitud signaal piisavalt tugev. Anti-nsP2 puhul on tegu keskmise lahjendusega, kuna kõige kangema puhul esines mittespetsiifilist signaali ja nakkumata rakkudes ning nõrgimas lahjenduses ei olnud nsP2 valgu tuumalokalisatsioon tuvastatav.



**Joonis 9. Semliki Forest viiruse spetsiifiliste mittestruktuursete valkude-vastaste antikehade analüüs immunofluorestsentsmeetodiga.** SFVga nakatatud BHK-21 rakud ja nakatamata rakud (MOCK). Siniselt on värvunud rakutuomad (DAPI), punaselt on värvunud nakatatud rakud, kus antikeha on ära tundnud endale spetsiifilise viiruse valgu. Sekundaarse antikeha (*Invitrogen* Alexa Fluor 568) lahjendus 1:1000.

**Joonisel 10** on näidatud CHIKV puhul välja valitud lahjendused, mille korral on piltidel kõige selgemalt näha punaselt helendavad nakatatud rakud ning siniselt helendavad rakkude tuomad. NsP1 valgu lokaliseerimine on vastavalt kirjanduses esitatud andmetele alfaviirustele omaselt plasmamembraanis, eristatavad on erksamalt helendavad piirjooned rakkude ümber (Spuul jt, 2007). CHIKV nsP2 valgu puhul on hästi näha tema lokaliseerumist tuuma (punase värvi jäljed siniste tuumade peal), mis vastab ka kirjanduses esitatule, et alfaviiruste nsP2 valk transporditakse tuuma (Peränen jt, 1990; Peränen jt, 1993). NsP3 valk lokaliseerub granulaarselt tsütoplasmas, lisaks on murdosa valgust tuvastatav ka hajutatult (Varjak jt, 2010). Sarnane paigustus on täheldatav ka käesoleva uuringu tulemustes. NsP4 valgu lokaliseerimine on kirjanduse andmetel sarnane nsP3ga, kuid antud katsetes on nsP4 puhul näha tugevamat granulaarset mustrit, mis viitab suurema koguse valgu lokaliseerumist rakusisestesse vesiikulitesse (Peränen jt, 1993). Samuti võib tuvastatava valgu signaali erinevus tuleneda sellest, et nsP3 preparaati on valmistatud II protokolliga ja nsP4 preparaati I protokolliga järgi.

CHIKV anti-nsP1 ja anti-nsP2 seerumite puhul andsid kõige paremaid tulemusi kangeimad testitud lahjendused (vastavalt 1:500 ja 1:250). Anti-NsP3 puhul oli optimaalseim vahepealne lahjendus (1:1000) ja anti-nsP4 puhul kõige nõrgem lahjendus (1:1000). Anti-NsP1 ja anti-nsP2 puhul ei olnud lahjemate lahjenduste korral näha spetsiifilist lokaliseerumise signaali, vastavalt plasmamembraanis ja rakutuumades. Anti-nsP4 seerum andis tugevama lahjenduse korral liialt palju mittespetsiifilist signaali.

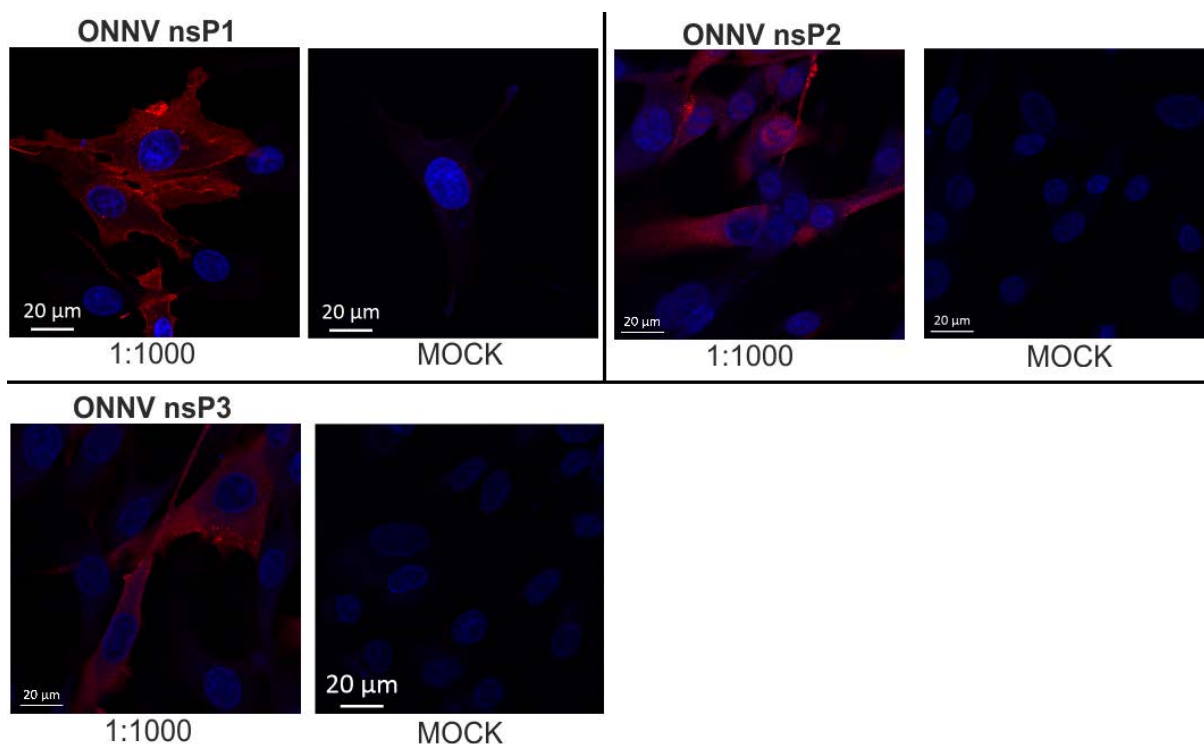


**Joonis 10. Chikungunya viiruse spetsiifiliste mittestruktuursete valkude-vastaste antikehade analüüs immunofluorestsentsmeetodiga.** CHIKVga nakatatud BHK-21 rakud ja nakatamata rakud (MOCK). Siniselt on värvunud rakutuumad (DAPI), punaselt on värvunud nakatatud rakud, kus antikeha on ära tundnud endale spetsiifilise viiruse valgu. Sekundaarse antikeha (*Invitrogen* Alexa Fluor 568) lahjendus 1:1000.

**Joonisel 11** kujutatud ONNV vastaste antikehade puhul valmisid kõige paremad tulemused 1:1000 lahjendustega. Kuigi, nagu erinevate lahjenduste võrdlusest (**Joonis 8.**) näha on, tekib spetsiifiliste valkude signaal kõikide lahjendustega. ONNV mittestruktuursete valkude vastaste antikehade seerumid näitasid immunofluorestsentsanalüüsil kõige paremaid pilte.

ONNV mittestruktuursete valkude lokaliseerimine sarnaneb eelpool iseloomustatud viiruse valkudele. Anti-nsP1 seerumi korral sarnaselt kirjanduses avaldatud informatsioonile näha lokaliseerumist plasmamembraani (tugevamalt värvunud piirjooned) (Spuul jt, 2007). NsP2 valgule on iseloomulik liikuda tuuma (sinistel tuumade peal esinev punane värv) (Peränen jt, 1990; Peränen jt, 1993), mida on märgata ka käesolevatel pildidel. Anti-nsP3 seerum seondub

nsP3 valgule, mis paikneb granulaarselt tsütoplasmas (valk on lokaliseerunud vesiikulitesse) ja ka osa valgust on tuvastatav diffuuselt tsütoplasmas (Varjak jt, 2010).



**Joonis 11. O'nyong'nyong viiruse spetsiifiliste mittestruktuursete valkude-vastaste antikehade analüüs immunofluorestsentsmeetodiga.** ONNVga nakatatud BHK-21 rakud ja nakatamata rakud (MOCK). Siniselt on värvunud rakutuomad (DAPI), punaselt on värvunud nakatatud rakud, kus antikeha on ära tundnud endale spetsiifilise viiruse valgu. Sekundaarse antikeha (*Invitrogen Alexa Fluor 568*) lahjendus 1:1000.

Immunofluorestsentsanalüüsi lahjenduste võrdlemisel võib öelda, et kuigi kõik võimaldavad vaadelda soovitud signaali, tasub parema pildikvaliteedi saamiseks kasutada tugevamat lahjendust kui 5× kangem võrreldes *western blot*'iga. Erinevaid lahjendusi võrreldes selgub, et on raske määrata ühte lahjendust, mida sobiks kasutada kõikide antiseerumite puhul. Katseid tehes tuleks alati testida korraga mitut erinevat lahjendust, et leida konkreetsele antiseerumile sobivaim. Kahe erineva protokolliga järgi saadud tulemuste analüüs näitab, et mõttekam II protokolliga eelistamine esimesele, kuna see võimaldab saavutada sarnaseid või paremaid tulemusi väiksema ajakuluga.

Mõlema meetodiga (*western blot* ja immunofluorestsents) tuvastasid kõik antikehad endale spetsiifilise mittestruktuurse valgu ja seonduvad sellele, mille tulemusena oli näha vastav signaal röntgenfilmil või konfokaalmikroskoobis. *Western blot* analüüsi tulemustest oli ka

näha, et teatud antikehad tundsid ära ka teiste viiruste poolt ekspresseeritud valke, kuid kuna *western blot* analüüs tuvastab vaid kindlate valkude olemasolu rakulüsaatides ei saa sellest põhjanevaid järeldusi teha.

Käesolevas töös kirjeldatud antikehade paneeli võib veel analüüsida näiteks ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) testiga, et välja selgitada uuritava valgu kogus või läbivoolu tsütomeetriaga (*flow cytometry*), et tuvastada näiteks nakatatud rakkude osakaalu.

Enne nende meetoditega katsete planeerimise hakkamist tuleks välja selgitada, kas kasutada soovitud antiseerumitega on juba eksperimente läbi viidud. Kui eelnevalt on välja selgitatud parameetreid soovitud katsete tegemiseks, võib neid võtta eeskujuks. Kui antiseerumeid varem testitud ei ole, on esialgu mõttekas testida ühte antiseerumit, et välja selgitada soovitud tulemusi andvad parameetrid: antikeha lahjendus, geelile kantav rakulüsaatide kogus ja röntgenfilmile eksponeerimise aeg. Tuleb arvestada, et erinevad antiseerumid võivad reageerida erinevalt ning alati ei ole võimalik kasutada identseid parameetreid. Rakendades neid andmeid kõikide ülejäänud antikehade testimisel on võimalik ebasobivaid *western blot* pilte analüüsides leida optimaalseimad tingimused kõikide antiseerumite jaoks. Immunofluorestsentsanalüüsi läbiviimisel saab eeskujuks võtta *western blot* analüüside tulemusi. Antud töös kasutati primaarse antikeha lahjendustena *western blot*ist 5-25× kangemaid lahjendusi, mis osutusid ka sobivaks. Sarnaselt *western blot*iga tuleks parima tulemuse leidmiseks testida mitut erinevat lahjendust. Kõige lõpuks tuleks varuda kannatust, kuna kohati on katsete ooteajad pikad ning alati ei pruugi esimese korraga välja tulla soovitud tulemus. Katseid korrates tekivad rutiin ja oskused, mis aitavad edaspidi saavutada häid tulemusi.

## KOKKUVÕTE

Selle töö eesmärgiks oli iseloomustada alfaviiruste spetsiifiliste mittestruktuursete valkude vastu suunatud antikehade paneeli kahe enim kasutatud immunoloogilise meetodiga ning selle käigus optimeerida nende meetodite protokolle.

Uuriti SFV, CHIKV, ja ONNV mittestruktuursete valkude vastaseid spetsiifilisi antiseerumeid *western blot* ja immunofluorestsentsi meetodiga. Mõlema meetodiga antikehi analüüsides selgus, et kõik tunnevad ära vastavad mittestruktuursed valgud. *Western blot* analüüsi korral testiti erinevaid lahjendusi, et leida optimaalseim lahjendus edasistes katsetes kasutamiseks. Antikehade iseloomustamisel oli peamine eesmärk teada saada, kas testitud antikehad tunnevad ka ära valke teiste viirustega nakatatud rakulüsaatides. Selgus, et mitmed antikehad omasid erinevate viiruste vahel rist-reaktiivsust, mis on tõenäoliselt põhjustatud antud töös kasutatud viiruste omavahelisest lähedasest sugulusest. Immunofluorestsentsanalüüsi tulemuste võrdlemisel selgus, et üks käesolevas töös kasutatud protokollidest andis paremaid tulemusi kui teine ning oli lisaks sellele ka vähem ajakulukam. Niisamuti oli võimalik välja selgitada optimaalseim antiseerumite lahjendus, mida selle meetodiga katsete tegemisel kasutada.

Läbiviidud katsete tulemuste põhjal saadi informatsiooni SFV, CHIKV ja ONNV spetsiifiliste mittestruktuursete valkude vastaste antikehade kohta edasiseks kasutamiseks. Samuti saab käesoleva töö tulemustes esitatud informatsiooni kasutada edasiste katsete planeerimisel.

# **Characterization of antibodies against specific alphavirus non-structural proteins by the example of Semliki Forest virus, Chikungunya virus and O'nyong'nyong virus**

Erkki Kull

## **SUMMARY**

The alphavirus genus consists of 29 species, all alphaviruses have a positive-sense single stranded RNA genome. In nature, alphaviruses circle between their insect vectors and vertebrate hosts, they are widespread and have been found all around the world. Several characteristics, such as a small genome, host variability and non-pathogenicity of typical laboratory strains enables the use of alphaviruses as a model organism in research and biotechnology.

Alphavirus non-structural proteins are essential for the RNA replication of the virus. The individual non-structural proteins are well studied but their exact functions and properties are not fully known. Antibodies against these specific non-structural proteins are the main tools in molecular biologic studies. In order to obtain these antibodies, rabbits were immunized with recombinant non-structural proteins, which gave us a panel of polyclonal antisera against specific alphavirus non-structural proteins. This study used two most used immunological methods, immunofluorescence and western blot to characterize this panel of antibodies. Also, the protocols for these methods were optimized for the best usage.

As a result it was found that all of the antibodies recognized proteins that are specific to them. Furthermore, some antibodies also recognized proteins from cell lysates infected with another virus. The most likely reason for this is the close relation of these viruses. Also, the optimal antibody dilutions for western blot and immunofluorescence protocols were found and one of the two protocols used for immunofluorescence provided much better results than the other, in addition of being more time saving.

The information that is obtained during this research can be used to plan further experiments. This panel of antibodies may also be tested with additional methods in order to get more information.

## **KASUTATUD KIRJANDUS**

Ahola, T and 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 USA*. 92: 507-11.

Blackburn, N. K., Besselaar, T. G. and Gibson, G. (1995). Antigenic relationship between chikungunya virus strains and o'nyong nyong virus using monoclonal antibodies. *Res Virol*. 146: 69-73.

Chanas, A. C., Hubalek, Z., Johnson, B. K. and Simpson, D. I. H. (1979). A comparative study of O'nyong nyong virus with Chikungunya virus and plaque variants. *Archives of Virology*. 59: 231-8.

Chen, K. C., Kam, Y. W., Lin, R. T., Ng, M. M., Ng, L. F. and Chu, J. J. H. (2013). Comparative analysis of the genome sequences and replication profiles of chikungunya virus isolates within the East, Central and South African (ECSA) lineage. *Viol J*. 10: 169

Cristea, I. M., Carroll, J. W., Rout, M. P., Rice, C. M., Chait, B. T., MacDonald, M. R. (2006). Tracking and elucidating alphavirus-host protein interactions. *J Biol Chem*. 281: 30269-78.

Davis, N.L., Willis, L.V., Smith, J.F. and Johnston, R.E. (1989). In vitro synthesis of infectious Venezuelan equine encephalitis virus RNA from a cDNA clone: analysis of a viable deletion mutant. *Virology*. 171: 189–204.

de Groot, R. J., Rümenapf, T., Kuhn, R. J., Strauss, E. G. and Strauss, J. H. (1991). Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 88: 8967–71.

Ding, M. And Schlesinger, M. J. (1989). Evidence that Sindbis Virus NSP2 Is an Autoprotease Which Processes the Virus Nonstructural Polyprotein. *Virology*. 171: 280–4.

Faragher, S. G., Meek, A. D. J., Rice, C. M. and Dalgarno, L. (1988). Genome sequences of a mouse-avirulent and a mouse-virulent strain of Ross River virus. *Virology*. 163: 509-26.

Forrester, N. L., Palacios, G., Tesh, R. B., Savji, N., Guzman, H., Sherman, M., Weaver, S. C and Lipkin, W. I. (2012). Genome-Scale Phylogeny of the Alphavirus Genus Suggests a Marine Origin. *Journal of Virology*. 86: 2729–38

- Frolova, E., Frolov, I. and Schlesinger, S. (1997). Packaging signals in alphaviruses. *J Virol.* 71: 248–58.
- Froshauer, S., Kartenbeck, J. and Helenius, A. (1988). Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes. *JCB.* 107 :2075-86.
- Garmashova, N., Gorchakov, R., Frolova, E. and Frolov, I. (2006). Sindbis virus nonstructural protein nsP2 is cytotoxic and inhibits cellular transcription. *J Virol.* 80: 5686-96.
- Gomez de Cedron, M., Eshani, N., Mikkola, M. L., Kääriäinen, L. and Garcia, J. A. (1999). RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. *The FEBS Letters* 448: 19-22.
- Griffin, D. E. (2013). Alphaviruses, p. 651-86. *In* D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, R. A. Lamb, M. A. Martin, V. R. Racaniello, B. Roizman, *Fields Virology*. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins.
- Helenius, A., Kartenbeck, J., Simons, K. and Fries, E. (1980). On the entry of semliki forest virus into BHK-21 cells. *JCB.* 84: 404–20.
- Jose, J., Snyder, J. E., & Kuhn, R. J. (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* 4: 837-56.
- Kamer, G. and Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research.* 12: 7269–82.
- Karabatsos, N. (1975). Antigenic relationships of group A arboviruses by plaque reduction neutralization testing. *Am J Trop Med Hyg.* 24: 527-32.
- Karpf, A. R., Lenches, E., Strauss, E. G., Strauss, J. H. and Brown, D. T. (1997). Superinfection exclusion of alphaviruses in three mosquito cell lines persistently infected with Sindbis virus. *J Virol.* 71: 7119-23.
- Keränen, S. and Ruohonen, L. (1983). Nonstructural proteins of Semliki Forest virus: synthesis, processing, and stability in infected cells. *J Virol.* 47: 505-15.
- Khan, A. H., Morita, K., del Carmen Parquet, M., Hasebe, F., Mathenge, E. G. and Igarashi, A. (2002). Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J Gen Virol.* 83: 3075-84.

- Kuhn, R. J., Niesters, H. G., Hong, Z. And Strauss, J. H. (1991). Infectious RNA transcripts from Ross River virus cDNA clones and the construction and characterization of defined chimeras with Sindbis virus. *Virology*. 182: 430-41.
- Kujala, P., Ikäheimonen, A., Ehsani, N., Vihinen, H., Auvinen, P., and Kääriäinen, L. (2001). Biogenesis of the Semliki Forest Virus RNA Replication Complex. *J Virol*. 75, 3873–84.
- Kääriäinen, L., Takkinen, K., Keränen, S. and Söderlund, H. (1987). Replication of the genome of alphaviruses. *J Cell Sci*. 7: 231-50.
- Laakkonen, P., Auvinen, P., Kujala, P. and Kääriäinen, L. (1998). Alphavirus Replicase Protein NSP1 Induces Filopodia and Rearrangement of Actin Filaments. *J Virol*. 72: 10265-69.
- Lanciotti, R. S., Ludwig, M. L., Rwaguma, E. B., Lutwama, J. J., Kram, T. M., Karabatsos, N., Cropp, B. C. and Miller, B. R. (1998). Emergence of epidemic O'nyong-nyong fever in Uganda after a 35-year absence: genetic characterization of the virus. *Virology*. 252: 258-68.
- Li, G.P., La Starza, M.W., Hardy, W.R., Strauss, J.H. and Rice, C.M. (1990). Phosphorylation of Sindbis virus nsP3 in vivo and in vitro. *Virology*. 179: 416-27.
- Liljeström, P. and Garoff, H. (1991). Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *J Virol*. 65: 147–54.
- Lu, Y. and Kielian, M. (2000). Semliki Forest Virus Budding: Assay, Mechanisms, and Cholesterol Requirement. *J Virol*. 74: 7708–19.
- Lulla, A., Lulla, V. and Merits, A. (2012). Macromolecular assembly-driven processing of the 2/3 cleavage site in the alphavirus replicase polyprotein. *J Virol*. 86: 553–65.
- Mahmood, T. and Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 4: 429-34.
- Merits, A., Vasiljeva, L., Ahola, T., Kääriäinen, L. and Auvinen, P. (2001). Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein by nsP2 protease. *J Gen Virol*. 82: 765–73.
- Mi, S. and Stollar, V. (1991). Expression of Sindbis virus nsP1 and methyltransferase activity in *Escherichia coli*. *Virology*. 184: 423-7.

- Mi, S., Durbin, R., Huang, H. V., Rice, C. M. and Stollar, V. (1989). Association of the Sindbis virus RNA methyltransferase activity with the nonstructural protein nsP1. *Virology*. 170: 385-91.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. and Schätzl, H. (2013). Viruses with Single-Stranded, Positive-Sense RNA Genomes, p. 437–520. In S. Modrow, D. Falke, U. Truyen, and H. Schätzl, *Molecular Virology*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ou, J. H., Strauss, E. G. and Strauss, J. H. (1983). The 5'-terminal sequences of the genomic RNAs of several alphaviruses. *J Mol Biol*. 168: 1-15.
- Pehrson, J.R. and Fuji, R.N. (1998). Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res*. 26: 2837-42.
- Peränen, J. and Kääriäinen, L. (1991). Biogenesis of type I cytopathic vacuoles in Semliki Forest virus-infected BHK cells. *J Virol*. 65: 1623-7.
- Peränen, J., Laakkonen, P. Hyvönen, M. and Kääriäinen, L. (1995). The alphavirus replicase protein nsP1 is membrane associated and has affinity to endocytic organelles. *Virology*. 208: 610-20.
- Peränen, J., Rikkinen, M., Liljeström, P. and Kääriäinen, L. (1990). Nuclear localization of Semliki Forest virus-specific nonstructural protein nsP2. *J Virol*. 64: 1888-96.
- Peränen, J., Rikkinen, M. and Kääriäinen, L. (1993). A method for exposing hidden antigenic sites in paraformaldehyde-fixed cultured cells, applied to initially unreactive antibodies. *J Histochem Cytochem*. 41: 447-54.
- Pfeffer, M., Kinney, R. M. and Kaaden, O. R. (1998). The alphavirus 3' nontranslated region: size heterogeneity and arrangement of repeated sequence elements. *Virology*. 240: 100-8.
- Powers, A. M., Brault, A. C., Tesh, R. B. And Weaver, S. C. (2000). Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol*. 81: 471-9.
- Rikkinen, M., Peränen, J. and Kääriäinen, L. (1994). ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus non-structural protein nsP2. *J Virol*. 68: 5804-10.
- Rubach J. K., Wasik B. R., Rupp J. C., Kuhn R. J., Hardy R. W., Smith J. L. (2009) Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity *in vitro*. *Virology*. 384: 201–208.

- Salonen, A., Ahola, T. and Kääriäinen, L. (2005). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 285: 139–73.
- Sawicki, D. L. and Sawicki, S. G. (1980). Short-lived minus-strand polymerase for Semliki Forest virus. *J Virol*. 34: 1108–18.
- Sawicki, D. L. Perri, S., Polo, J. M., and Sawicki, S. G. (2006). Role for nsP2 Proteins in the Cessation of Alphavirus Minus-Strand Synthesis by Host Cells. *J Virol*. 80: 360-71
- Schmaljohn, A. L. and McClain D. (1996) Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae) In S. Baron (ed.), *Medical Microbiology*, 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston (TX).
- Shirako, Y. and Strauss, J. H. (1994). Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *J Virol*. 68: 1874–85.
- Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L. and Devaux, C. (2009). Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virology*. 393: 183-97.
- Spuul, P., Salonen, A., Merits, A., Jokitalo, E., Kääriäinen, L. and Ahola, T. (2007). Role of the amphipathic peptide of Semliki forest virus replicase protein nsP1 in membrane association and virus replication. *J Virol*. 81: 872-83.
- Strauss, E. G., Levinson, R., Rice, C. M., Dalrymple, J. and Strauss, J. H. (1988). Nonstructural proteins nsP3 and nsP4 of Ross River and O'Nyong-nyong viruses: Sequence and comparison with those of other alphaviruses. *Virology*. 164: 265-74.
- Strauss, E. G., Rice, C. M. and Strauss, J. H. (1984). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Sindbis virus. *Virology*. 133: 92-110.
- Strauss, J. H. and Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews*. 58: 491–562.
- Suopanki, J., Sawicki, D. L., Sawicki, S. G. and Kääriäinen, L. (1998). Regulation of alphavirus 26S mRNA transcription by replicase component nsP2. *J Gen Virol*. 79: 309-19.
- Söderlund, H. and Ulmanen, I. (1977). Transient association of Semliki Forest virus capsid protein with ribosomes. *J Virol*. 24: 907–9.

- Takkinen, K., Peränen, J. and Kääriäinen, L. (1991). Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein. *J Gen Virol.* 72: 1627–33.
- Takkinen, K., Peränen, J., Keränen, S., Söderlund, H. and Kääriäinen, L. (1990). The Semliki-Forest-virus-specific nonstructural protein nsP4 is an autoprotease. *Eur J Biochem.* 189: 33-8
- ten Dam, E., Flint, M., and Ryan, M. D. (1999). Virus-encoded proteinases of the Togaviridae. *J Gen Virol.* 80: 1879-88.
- Wahlberg, J. M. and Garoff, H. (1992). Membrane fusion process of Semliki Forest virus. I: Low pH-induced rearrangement in spike protein quaternary structure precedes virus penetration into cells. *JCB.* 116: 339-48.
- Wang, Y. F., Sawicki, S. G. and Sawicki, D. L. (1994). Alphavirus nsP3 Functions To Form Replication Complexes Transcribing Negative-Strand RNA. *J Virol.* 68: 6466–75
- Vasiljeva, L., Merits, A., Auvinen, P. and Kääriäinen, L. (2000). Identification of a novel function of the Alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *J Biol Chem.* 275: 17281-7.
- Vasiljeva, L., Valmu, L., Kääriäinen, L. and Merits, A. (2001). Site-specific protease activity of the carboxyl-terminal domain of Semliki Forest virus replicase protein nsP2. *J Biol Chem.* 276: 30786–93.
- Vihinen, H., Ahola, T., Tuittila, M., Merits, A. and Kääriäinen, L. (2001). Elimination of Phosphorylation Sites of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP3. *J Biol Chem.* 276: 5745–52.

## **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

[http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/625.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/625.html)

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

Mina, Erkki Kull

(sünnikuupäev: 31.03.1992)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose:

**Alfaviiruste mittestruktuursete valkude vastu spetsiifiliste antikehade iseloomustamine  
Semliki Forest viiruse, Chikungunya viiruse ja O'nyong'nyong viiruse näitel,**

mille juhendaja on Eva Žusinaite,

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 20.05.2015