

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Liis Karo-Astover

Semliki Forest Viiruse mittestruktuurse valgu nsP1 mutatsioonide ja nende poolt põhjustatud kompensatoorsete mutatsioonide uurimine

Magistritöö

Juhendaja: Professor Andres Merits, PhD

Tartu 2007

Kasutatud lühendid

C	(<i>capsid protein</i>) kapsiidivalk
CMC	(<i>carboxymethylcellulose</i>) karboksümetüütselluloos
CPV	(<i>cytopathic vacuole</i>) tsütopaatiline vakuool
DEPC	(<i>diethyl pyrocarbonate</i>) dietüülpürokarbonaat
DTT	(<i>dithiothreitol</i>) ditiotreitool
E	(<i>envelope protein</i>) ümbrise valk
EGFP	(<i>enhanced green fluorescent protein</i>) võimendatud roheliselt fluoreseeruv valk
ER	(<i>endoplasmic reticulum</i>) endoplasmaatiline retiikulum
FCS	(<i>foetal calf serum</i>) veise loote seerum
FACS	(<i>fluorescence activated cell sorting</i>) fluorestsentsi poolt aktiveeritav rakkude sorteerimine
icDNA	(<i>infectious complementary DNA</i>) infektsioosne komplementaarne DNA
IPTG	(<i>isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>) isopropüül tiogalaktopüranosiid
MOI	(<i>multiplication of infection</i>) infektsiooni kordsus, infektsiooniliste viirusosakeste arv ühe raku kohta
NaBes	N,N-bis-(2-hüdoksüetüül)-2-aminoetaan sulfoonhape
nsP	(<i>nonstructural protein</i>) mittestruktuurne valk
HLA	(<i>human leukocyte antigen</i>) inimese leukotsüüdi antigeen
PAC	(<i>puromycin N-acetyltransferase</i>) puromütsiini N-atsetüültransferaas
PBS	(<i>phosphate buffered saline</i>) fosfaadiga puhverdatud soola lahus
SDS	(<i>sodium dodecyl sulfate</i>) naatriumdodetsüülsulfaat
SIN	(<i>Sindbis virus</i>) Sindbis viirus
SFV	(<i>Semliki Forest virus</i>) Semliki Forest viirus
TCA	(<i>trichloroacetic acid</i>) triklooräädikhape
TPB	(<i>Bacto tryptose phosphate broth</i>) trüptoosi ja fosfaati sisaldav puljong
UTR	(<i>untranslated region</i>) mittetransleeritav regioon
VEEV	(<i>Venezuelan equine encephalitis virus</i>) Venetsueela hobuselaadsete entsefaliidi viirus
X-Gal	(<i>5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indoly l- b - D - galactopyranoside</i>) indoolgalaktopüranosiid

Sisukord

Kasutatud lühendid	2
Sisukord	3
Sissejuhatus	4
1 Kirjanduse ülevaade	5
1.1 Ülevaade alfaviirustest	5
1.2 SFV virion ja genoomi struktuur	7
1.3 SFV virioni sisenemine rakku ja varajane infektsioon	8
1.4 SFV valgud ja translatsioon	10
1.5 Replikatsioon ja transkriptsioon	17
1.6 SFV valk nsP1	20
1.7 Replikonid ja tsütotoksilisus	26
2 Eksperimentaalne osa	31
2.1 Eesmärgid	31
2.2 Materjalid ja meetodid	32
2.3 Tulemused	42
2.4 Arutelu	51
Kokkuvõte	58
Summary	59
Kasutatud kirjandus	60
Lisad	65
Lisa 1. Kasutatud SFV praimerid ja nende omadused	65
Lisa 2. Kasutatud plasmiidide kaardid	66
Lisa 3. Mutantide EV ja LI FACS analüüs	68
Lisa 4. Antud töö esimese poolega seotud avaldatud artikkel	68

Sissejuhatus

Alfaviirused on grupp positiivse polaarsusega RNA viirusi, mis paljunevad raku tsütoplasmas. Viiruste pärisperemeheks on väikesed selgroogsed (linnud, imetajad), nakatumine toimub enamasti vektori, kelleks on kõige sagedamini sääsk või moskiito, vahendusel. Viirus nakatab muu hulgas närvirakke, mis tekitab tõsiseid probleeme nakatavale organismile. Pärisperemehel lõpeb infektsioon suurema osa alfaviiruste puhul raske entsefaliidi või surmaga, mistõttu antud gruppi kuuluvate viiruste uurimine on äärmiselt oluline. Samuti on võimalik viirusinfektsiooni kulgemist rakendada mudelsüsteemina mõnede neurodegeneratiivsete haiguste, näiteks *Sclerosis multiplex* (ehk hulgiskleroos), uurimiseks. Semliki Forest viirus (SFV) põhjustab närvirakkude surma ja demüeliniseerumist, mis sarnaneb viimati mainitud haiguse kulgemisega. Lisaks on alfaviirused mudelobjektiks viiruse paljunemisega seotud rakuliste protsesside uurimisel, peale selle kasutatuse inimesele teadaolevalt vähe tsütopatogeensete alfaviiruste genoomidel põhinevaid vektoreid ka geeniulekandesüsteemidena. Alfaviirustel põhinevad vektorid on väga efektiivsed, mahukad ning kasutatavad väga erinevates rakutüüpides.

Käesoleva töö teoreetiline osa annab ülevaate alfaviirustest, keskendudes peamiselt Semliki Forest viirusele. Kirjeldatakse viiruse elutsükli ja käitumist ning keskendutakse replikatsioonikompleksi koosseisus oleva multifunktsionaalse nsP1 valgu omadustele ja selle valgu rollile viiruse infektsioonilisuse juures. Praktilises osas kirjeldatakse palmitüleerimisdefektse nsP1 valguga viiruste kompensatoorsete mutatsioonide otsimist, leidmist ja iseloomustamist.

Magistritöö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia instituudis. Töö valmimisele aitasid kaasa ja väärivad erilist tähelepanu ja tänu juhendaja Andres Merits ning endised ja praegused kolleegid Kairit Tints, Kaja Kiiver, Eva Žusinaite, Margus Varjak, Ingrid Tagen, Kristi Tamm, Liane Ülper ja Inga Sarand.

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Ülevaade alfaviirustest

Alfaviirused on perekond viirusi, mis koos perekonnaga *Rubivirus* moodustavad sugukonna *Togaviridae*. Need kaks perekonda on genoomse ülesehituse poolest omavahel äärmiselt sarnased, ent järjestuse analüüsi alusel vaid kauged sugulased. Järjestuse analüüsi põhjal sarnanevad alfaviirused ka paljude taimeviirustega nagu näiteks tobamoviirused, bromoviirused, mida klassifitseeritakse alfaviiruste laadsete viiruste supersugukonnaks (Strauss ja Strauss 1994).

Alfaviirused on väga laia geograafilise levikuga grupp RNA viirusi. Neid on leitud kõikidelt kontinentidelt. Paremini on iseloomustatud kahte alfaviirust, Sindbis viirust (SIN) ja Semliki Forest viirust (SFV). SIN on kõige laiema levikuga alfaviirus, olles leitud nii Euroopast, Aasiast, Aafrikast kui ka Austraaliast (Strauss ja Strauss 1994). Käesoleva töö uurimisobjekt SFV on esimest korda isoleeritud Ugandas 1944. aastal (Atkins ja teised 1999), ent teda on leitud lisaks Aafrikale ka Venemaalt ja Indiast. Arvatakse, et alfaviiruste laiale levikule on tublisti kaasa aidanud rändlindude migratsioon, kuigi ka inimestel on oma osa. Paljude rändlindude verest on leitud alfaviiruseid, kusjuures lindudele endile viirus tavaliselt väga ei tee ja linnud on sageli nende looduslikuks reservuaariks. Replitseeruma on alfaviirused võimelised ka lüljalgsetes ülekandevektorites, tavalisemateks vektoriteks on sääsk ja moskiito, aga ka lest ja puuk. Lüljalgsetes põhjustavad alfaviirused persistentse eluaegse infektsiooni, selgroogsetes aga akuutse, üldiselt lühiajalise infektsiooni, seda nii looduses kui ka koekultuuris. Sääse rakkudes on alfaviiruse infektsiooniprotsessi väga raske uurida, sest peremeesraku makromolekulide sünteesi ei inhibeerita ning viiruse valke sünteesitakse vähesel määral (Strauss ja Strauss 1994). Selgroogsete rakkudes inhibeerib alfaviirus makromolekulide sünteesi ning viiruse molekule sünteesitakse väga suures hulgas ja replikatsioon toimub peremeesraku tuuma funktsionaalsusest sõltumatult (Gorchakov ja teised 2005). Nakatatakse neuroneid, epiteelirakke, gliiarakke, silelihasrakke, lümfoidse päritoluga rakke, pruuni rasvkoe rakke ja muid rakutüüpe.

Alfaviirused jagatakse nende geograafilise esinemise alusel Vana Maaailma ja Uue Maaailma viirusteks, mis on viimase paari tuhande aasta jooksul arenenud teineteisest sõltumatult (Garmashova ja teised 2007). Need kaks gruppi jagatakse omakorda a.) seroloogilise

ristreaktiivsuse alusel seitsmesse gruppi (Strauss ja Strauss 1994), b.) sekveneeritud järjestuste võrdlemise alusel kaheksasse gruppi (Garmashova ja teised 2007), millest kaks moodustavad mõlema jaotuse korral mainitud SFV-laadsete viiruste ja SIN-laadsete viiruste grupid (Strauss ja Strauss 1994). SIN ja SFV kuuluvad Vana Maailma viiruste hulka, mis põhjustavad peremeesraku transkriptsiooni mahasurumise nsP2 valgu kaasabil. Uue Maailma viiruste hulka kuulub näiteks *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV), mis surub transkriptsiooni maha peamiselt kapsiidivalgu N-terminaalse otsa abil. Seetõttu on Vana ja Uue Maailma viirustel põhinevad replikonid väga erineva tsütotoksilisusega, kusjuures SFV ja SIN viiruse replikonid on tsütotoksilisemad, sest nende translatsiooni mahasuruv faktor kuulub viiruse replikaasikompleksi (Garmashova ja teised 2007). SFV ja SIN põhjustavad kergemaid haigusnähtusid - SFV inimesel tugevat peavalu, palavikku, liigese- ja lihasvalu, SIN epideemset polüartriiti, löövet ja palavikku. Alfaviiruste hulka kuuluvad ka inimesele ja koduloomadele eluohtlikku entsefaliiti põhjustavad viirused (Strauss ja Strauss 1994). Laboris kasvatatavad SFV ja SIN tüved üldjuhul inimesel haigust esile ei kutsu, välja arvatud üks surmaga lõppenud entsefaliidijuht SFV infektsiooni puhul. Närilistele lõpeb alfaviiruse infektsioon enamasti surmaga, kusjuures vastündinud hiired ja isased hiired (Atkins ja teised 1999) on infektsioonile tundlikumad. Lisaks hiirtele neurovirulentsetele viirustüvedele, mis paljunevad kõrge tiitrini ja suunavad rakud apoptoosi, on eraldatud ka vähem virulentseid alfaviiruste tüvesid, mille infektsioonist on võimalik täielikult paraneda (Strauss ja Strauss 1994). Virulentsust mõjutavad E2 geen, nsP3 geen, 5' UTR (mittetransleeritav regioon, *untranslated region*) ja nakatatava raku diferentseerituse aste. Mida rohkem diferentseerunud on rakk, seda vähem tundlik on ta viirusinfektsioonile. Suurimaks erinevuseks on kesknärvisüsteemi kahjustuse aeglasem levik avirulentse tüve puhul. SFV kasutab närvisüsteemis liikumiseks aksonaalset transporti. Neuronaaletes rakkudes on võimalik ka persistentse infektsiooni kujunemine. Kindlates kesknärvisüsteemi piirkondades põhjustab avirulentne viirus rakkude demüeliniseerumist ehk *plaque*'sid, ning on seetõttu kasutatav *Sclerosis Multiplex* mudelina. Nakatatud organismis võib toimuda ka remüeliniseerumine, selleni jõudmine võib võtta kauem aega kui seda nõuab viiruse eemaldamine organismist (Atkins ja teised 1999).

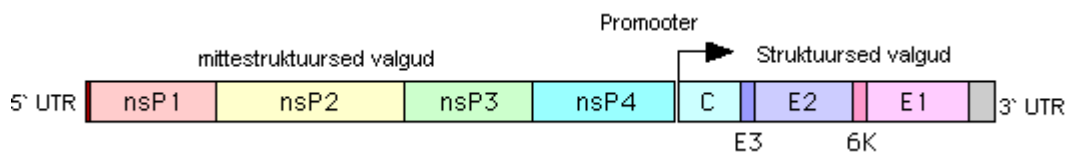
Kuigi RNA viiruste genoom muutub väga kiiresti RNA polümeraasi poolt tekitatavate vigade suure arvu tõttu (vea tõenäosus on keskmiselt 10^{-5} viga nukleotiidi kohta ühe sünteesiprotsessi käigus), on sekveneeritud alfaviiruste aminohappelise järjestuse sarnasus vähemalt 45%

struktuursete valkude osas, mis on vähem konserveerunud, ja 60% mittestruktuursete valkude (nsP) osas. Teatud piirkondadesse tekivad mutatsioonid või ka reversioonid juhusliku mutatsiooni esinemisel kiiremini. Teatud järjestuste oodatust suurem konserveerumine võib olla põhjustatud vajadusest nakatada nii selgroogset peremeest kui ka lüliljalget vektorit, ja nende vahel liikuda (Strauss ja Strauss 1994).

1.2 SFV virion ja genoomi struktuur

SFV virion koosneb nukleokapsiidist ja seda ümbritsevast membraanist, mida läbivad glükoproteiinid. Nukleokapsiid on ikosaeedriline, $T=4$ sümmeetriaga ning ümbritsetud plasmamembraanist pärit kaksikmembraaniga. 33 kDa kapsiidivalgud on organiseerunud hekso- ja pentameersetesse multimeeridesse, mille külge kinnitub 240 membraani läbivate glükoproteiinide E1 ja E2 heterodimeeri. Nii E1 kui ka E2 molekulmass on ligikaudu 50 kDa (Lachmi ja Kääriäinen 1976), nad on glükosüleeritud ja palmitüleeritud. Kolm heterodimeeri moodustavad külgsidemete abil ühe stabiilse ogalaadse struktuuri (Strauss ja Strauss 1994). Lisaks on virioni membraanis veel 10 kDa massiga kolmas glükoproteiin E3, mis tekib, kui E2 eellasmolekul p62 lõigatakse valmis valkudeks (Lachmi ja Kääriäinen 1976). Glükoproteiinide kompleksi transport membraanile on polaarne ja see, millisele membraanile valgud viiakse, sõltub rakutüübist. Koos kõigi proteiinidega on virioni diameeter 69 nm (Strauss ja Strauss 1994).

Kapsiidis sisaldub üheaheelaline positiivse polaarsusega lineaarne RNA genoom, mis on 11 442 nukleotiidijäägi pikkune. Genoom on jaotatud kaheks peamiseks piirkonnaks – 5' otsast kaks kolmandikku genoomist hõlmavad mittestruktuursete valkude geenid, ülejääv kolmandik on aga struktuursete valkude geenide päralt, kusjuures struktuursed valgud transleeritakse subgenoomselt 26S RNA molekulilt ja mittestruktuursed valgud otse genoomselt RNA-lt. Lisaks on genoomi 5' otsas 85 nukleotiidi pikkune mittetransleeritav ala ning 3' otsas 264 nukleotiidi pikkune mittetransleeritav ala. Viimane neist koosneb korduvatest järjestustest. Nii genoomi kui ka subgenoomse RNA 5' otsas on *cap*- struktuur ning 3' otsas polü-A saba. Genoomses RNAs jääb struktuursete ja mittestruktuursete valkude lugemisraamide vahele 41 nukleotiidi pikkune mittetransleeritav ala (Joonis 1. ja Strauss ja Strauss 1994).



Joonis 1. Alfaviiruste genoom. Skemaatiliselt on näidatud kõigi sünteesitavate valkude asukoht ning mõned genoomi reguleerivad piirkonnad (<http://www.microbiology.wustl.edu/sindbis/sindata1.html>).

Kapsiidi pakitakse ainult genoomne RNA. Oletatav pakkimissignaal paikneb 2737. ja 2993. nukleotiidijärgi vahel, ent selle olemasolu pole ilmselt ainuke kriteerium RNA pakkimiseks – genoom, mil pole vastavat järjestust, pakitakse nukleokapsiidi ikka, ainult väiksema efektiivsusega. Pakkimiseefektiivsust mõjutab ka pakitava RNA pikkus – lühemaid genoomseid pakitakse vähem efektiivselt. Kapsiidivalgu tugevalt aluseline N-terminaalne osa seob negatiivse laenguga RNA pakkimissignalis mittespetsiifiliselt. Kapsiidivalgud interageeruvad omavahel spetsiifiliselt C-terminaalset konservitud järjestusi kasutades. Tsütoplasmas vabalt liikuvad nukleokapsiidid jõuavad lõpuks plasmamembraanile, kus seovad seal juba ees ootavaid glükoproteiine. Seonduvad nukleokapsiidid ja glükoproteiinide ogalaadsete struktuuride C-terminaalsed osad, mis paiknevad tsütoplasmas. Igal nukleokapsiidi valgul on seondumiskoht E2 valgu tsütoplasmaatilise osa jaoks. Selline seondumine võib vabastada piisavalt energiat viiruse pungumiseks. Pungumisel toimub nukleokapsiidi küpsemine, efektiivne on see kõrge rakusisese Na^+ -ioonide kontsentratsiooni korral (Helenius ja teised 1985). Arvatakse, et viirusinfektsiooni poolt põhjustatud muutused rakusiseste ionide kontsentratsioonis on olulised järgmise põlvkonna viiruspartiklite vabanemisel (Strauss ja Strauss 1994).

1.3 SFV virioni sisenemine raku ja varajane infektsioon

Arvatakse, et alfaviirused kasutavad raku sisenemiseks valgulisi retseptoreid, kusjuures üks viirus võib sõltuvalt rakutüübist kasutada rohkem kui üht retseptorit. Ühel rakul on võimalikke retseptormolekule kuni miljon koopiat. Olulist rolli viiruse seondumise juures mängib ka retseptori laeng. On pakutud välja mitmeid erinevaid retseptoreid, mida SFV rakkudele kinnitumiseks võib kasutada – näiteks on peamise koosobivuskompleksi antigeenid HLA-A ja

HLA-B, mille puudumine rakupinnal aga ei takista nakatumist. SIN puhul on leitud nii imetaja kui ka sääse rakkude nakatamisel laminiini siduva retseptori suur osalus, kuid samas pole linnu rakkudes vastava retseptori roll SIN seondumisel märkimisväärne (Strauss ja Strauss 1994).

Kinnitumisele järgneb viiruse sisenemine rakku endotsütootilise protsessi abil (Marsh ja Bron 1997) klatriiniga kaetud vesiikulites. Alguses on virione sisaldavate vesiikulite pH neutraalne, kuid see muutub järjest happelisemaks. PH langusele hilistes endosoomides järgnevad muutused virioni glükoproteiinide konformatsioonis (Helenius ja teised 1985) ning E1-E2 heterodimeerid dissotsieeruvad E2 monomeerideks ja E1 homotrimeerideks. Membraani tekivad augud, mis vajavad laienemiseks energiat (Strauss ja Strauss 1994) ning toimub viiruse ümbrise fuseerumine raku sisemembraaniga. Siiski on teada, et osades rakuliinides, nagu BHK-21, on viiruse rakku sisenemiseks piisav ka sulandumine plasmamembraaniga (Marsh ja Bron 1997). Fuseerumine toimub ilmselt eelkõige E1 homotrimeeride abil. Sellele järgneb nukleokapsiidi vabanemine tsütoplasmasse. Lisaks madalale pH väärtusele on nukleokapsiidi vabanemisel, ja seega ka fuseerumise juures, oluline ligikaudu 100 mM Na⁺ ionide kontsentratsioon, mis aitab hoida rakke depolariseerumast (Helenius ja teised 1985). Samuti on oluline kolesterooli või mõne muu sarnase sterooli olemasolu rakus. Kolesterool tundub stabiliseerivat viiruse glükoproteiine, sest selle puudumisel ei toimu ka normaalset järgmise põlvkonna viiruste pungumist rakust (Strauss ja Strauss 1994).

Ribosoomi suur subühik on võimeline siduma 4 kuni 6 SFV kapsiidivalgu monomeeri ning aitab seega kaasa nukleokapsiidi lammutamisele. Seejärel vabanenud RNA siseneb translatsiooniprotsessi (Singh ja Helenius 1992). Pole suudetud selgusele jõuda, miks teise põlvkonna nukleokapsiide ribosoomide poolt ei rünnata, kuigi teooriaid on mitmeid. Näiteks väidetakse, et teise põlvkonna viiruspartikleid ei lagundata sellepärast, et kapsiidivalgude ülehulgas infektsiooni edenedes ei ole vabu ribosoomide uute viiruspartiklite ründamiseks piisavalt; et rakku nakatavate ja seal komplekteeritavate virionide suurus on erinev; või et nakkuse käigus muutunud ionide kontsentratsioon rakus stabiliseerib sünteesitud nukleokapsiide.

Sõltuvalt rakku sisenenud viiruspartiklite arvust, ent enamasti siiski juba esimese tunni jooksul pärast nakatumist, on SFV võimeline käivitama superinfektsiooni blokeerimise, andes seeläbi eelise oma RNA paljundamisele. Vastav protsess vajab translatsiooni toimumist ja mittestruktuursete valkude funktsioone. Arvatakse, et superinfektsiooni blokeerimise

põhjustab kas rakuliste abifaktorite vähesus, mis hõivatakse juba varem olemas olevate replikatsioonikomplekside poolt, viiruse vaba mittestruktuurse proteinaasi kontsentratsiooni kasv ning sellest põhjustatud negatiivset ahelat sünteesiva polümeraasi liiga lühike eluiga või kombinatsioon neist mõlemast (Strauss ja Strauss 1994).

Alfaviirused põhjustavad peremeesraku makromolekulide sünteesi inhibitsiooni, mis saab alguse ligi kolm tundi pärast infektsiooni algust. Mehhanismid, mille abil see toimub, pole veel selged. Proteiinkinaas R osalemisel translatsiooni mahasurumisel ei olda ühel meelel, ent Gorchakov ja teised (2004) on väitnud, et just see on üks, kuigi mitte põhiline, raku translatsiooni maha surumise mehhanismidest. Transkriptsiooni ja translatsiooni mahasurumine pole teineteisega seotud ning viirus, mis surub edukalt maha raku translatsiooni, ei pruugi veel hästi paljuneda (Gorchakov ja teised 2005). Arvatakse, et peremeesraku valgusünteesi inhibeerimine ei vaja viiruse struktuursete valkude funktsioone ega ka subgenoomse RNA kõrget taset. Samas on leitud, et glükoproteiinide korrektne ekspresseerimine raku plasmamembraanil kiirendab tsütopaatilise efekti saavutamist rakkudes. Tsütopaatilise efekti tekkimise ja peremeesraku valgusünteesi mahasurumise vahel ei ole korrelatsiooni. Viiruse geeniekspressiooni varajased etapid põhjustavad peremeesraku valgusünteesi mahasurumise (Frolov ja Schlesinger 1994). Lisaks teistele mehhanismidele võib ka kapsiidivalk rakulise mRNA translatsiooni inhibeerida. Toimub konkurents translatsiooniparatuurile ja initsiatsioonifaktoritele ning on võimalik ka viiruse mRNA eelistamine seoses rakusisese keskkonna muutusega. Viirusinfektsiooni käigus langeb rakusisene K^+ kontsentratsioon ja tõuseb Na^+ kontsentratsioon ning peetakse võimalikuks, et see abistab viirust raku translatsiooni mahasurumisel. Samuti vajab subgenoomne 26S RNA palju väiksemaid initsiatsioonifaktorite kontsentratsioone võrreldes rakulise mRNA translatsiooni initsiatsiooniga, sest seob neid tugevamini. Peremehe DNA sünteesi inhibeerimine vajab viiruse struktuursete valkude sünteesi (Strauss ja Strauss 1994).

1.4 SFV valgud ja translatsioon

Semliki Forest viiruse mittestruktuurseid valke on neli – nsP1, nsP2, nsP3 ja nsP4 (Joonis 1. ja Lachmi ja Kääriäinen 1976) ning nad transleeritakse vastavas järjekorras (Keränen ja Ruohonen 1983). Mittestruktuursete valgud vastutavad replikatsioonikompleksi moodustumise

ja funktsioneerimise eest. Funktsionaalseid struktuursete valke on samuti neli – E1, E2, E3 ja kapsiidivalk (C), kuid lisaks nendele transleeritakse koos struktuursete valkudega veel viiendat valku, 6K, mille täpset funktsiooni SFV replikatsioonil ja virioni pakkumisel ei ole seni suudetud tuvastada. Mittestruktuursete valgud transleeritakse genoomselt RNA-lt suure polüproteiinina p1234 (Lachmi ja Kääriäinen 1976; Atkins ja teised 1999), struktuursete valgud polüproteiinina järjekorras C-E2(E3)-6K-E1 (Joonis 1, Joonis 3 ja Lachmi ja Kääriäinen 1976). Paljudel teistel alfaviirustel on nsP3 ja nsP4 vahel stopp-koodon UGA, mida 5-20% efektiivsusega ignoreeritakse (Shirako ja Strauss 1994) ja seetõttu sünteesitakse kaks polüproteiini - P123 ja P1234. SFV-l on vastava stopp-koodoni asemel Cys koodon UGU ning sünteesitakse ainult P1234. SFV sünteesib seega nsP4 valku märksa suuremas koguses kui teised alfaviirused, ent nsP4 ja polüproteiini vaheprodukte, mis sisaldavad replikaasivalku, degradeeritakse samuti teistest sugulasviirustest veidi kiiremini (Strauss ja Strauss 1994).

Polüproteiin P1234 lõigatakse autokatalüütiliselt iseseisvateks mittestruktuurseteks valkudeks, kusjuures lõikamise vaheproduktid on samuti funktsionaalsed, näiteks osaleb P123 negatiivse polaarsusega RNA molekuli replikatsioonikompleksis (Shirako ja Strauss 1994), samal ajal kui iseseisvad mittestruktuursete valgud ei suuda RNA negatiivset ahelat sünteesida (Keränen ja Ruohonen 1983). Arvatakse, et RNAas L osaleb selgroogsete rakkudes mingil viisil alfaviiruste negatiivse polaarsusega RNA molekulide sünteesi mahasurumisel. Selgroogsete rakuliinides, kus ei sünteesita RNAas L., ilmneb koos pideva negatiivse ahela sünteesimisega ka putukatele omane persistentne infektsioon (Sawicki ja teised 2003).

Subgenoomne 26S RNA struktuursete valkude tootmiseks sünteesitakse negatiivse polaarsusega RNA molekulilt, transkriptsiooni initsiatsioonisaat ja promooter asuvad nsP4 geeni lõpus. Sünteesitakse suur struktuursete valkude polüproteiin, mille lõikamisel osalevad kapsiidivalk ja rakulise päritoluga proteaasid. Polüproteiini ja selle lõikeprodukte modifitseeritakse nii ko- kui ka posttranslatsiooniliselt (Strauss ja Strauss 1994).

NsP1 on 64 kDa ja 537 aminohappejäkki pikk (Keränen ja Ruohonen 1983). Ta on vajalik negatiivse polaarsusega RNA molekuli sünteesi initsiatsioonil (Hahn ja teised 1989; Salonen ja teised 2005, Lulla ja teised käsikiri 2007). SIN mutant, millel on defekt nsP1 kodeerivas alas, on temperatuuritundlik ainult negatiivse polaarsusega RNA sünteesimise osas mittepermessiivsel temperatuuril, kusjuures defekt on pöörduv, kui rakud asetatakse taas kasvama madalamale temperatuurile. Sama mutatsioon ei mõjutanud positiivse polaarsusega RNA molekulide sünteesi (Sawicki ja teised 1981; Hahn ja teised 1989). NsP1 lisab

genoomsele ja subgenoomsele RNA-le *cap* i, olles ise nii metüültransferaasiks kui ka guanüültransferaasiks (Ahola ja teised 1999, Ahola ja Kääriäinen 1995, Ahola ja teised 1997). Samuti on nsP1 võimeline mõjutama nsP2 proteaaseid omadusi – polüproteiinides, kus sisaldub nsP1, lõigatakse nsP2 ja nsP3 vahelist protsessimisjärjestust väga väikese efektiivsusega (Strauss ja Strauss 1994). NsP1 puhul toimub kindlasti ka posttranslatsiooniline modifitseerimine (Keränen ja Ruohonen 1983). Kui valku ekspresseeritakse rakus üksi, lokaliseerub ta plasmamembraanil ja filopoodiumi-laadsetes struktuurides, kusjuures tegemist on teadaolevalt ainsa alfaviiruste mittestruktuurse valguga, mis omab afiinsust plasmamembraanile (Salonen ja teised 2005, Laakkonen ja teised 1996). Mõningal määral lokaliseerub nsP1 valk ka tuumas (Peränen ja teised 1990). NsP1 seob nsP4 ning vähesel määral ka nsP3, kas otseselt või mõne rakulise faktori kaasabil. NsP2 ja nsP1 vahel pole interaktsiooni tuvastatud. Seega liidab peamiselt nsP1 valk replikatsioonikompleksi valgud omavahel (Kujala ja teised 2001, Salonen ja teised 2003).

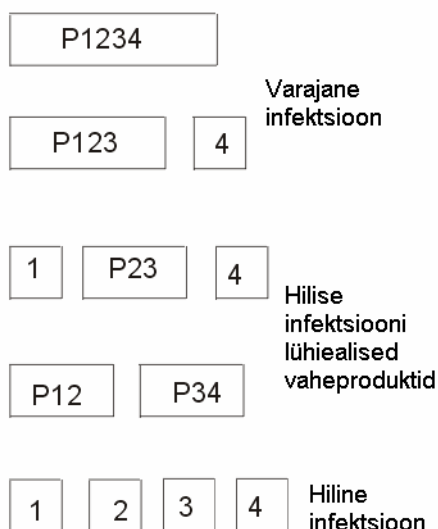
NsP2 on 86 kDa (Lachmi ja Kääriäinen 1976) ja 798 aminohappejääki pikk (Keränen ja Ruohonen 1983). Rakus ekspresseerituna ilma teiste mittestruktuursete valkudeta lokaliseerub nsP2 peamiselt tuumas (Kujala ja teised 2001). Tema N-terminaalne domeen on RNA helikaasete omadustega ning sisaldab nukleosiid trifosfaadi sidumisdomeene GSGKS ja DEAF. NsP2 C-terminaalne osa käitub proteinaasina ka nsP2 valgust eraldi seisva üksusena (Vasiljeva ja teised 2001) ning osaleb peremeesraku RNA sünteesi mahasurumisel (Garmashova ja teised 2007). NsP2 säilitab oma RNA helikaasse ja nukleosiidtrifosfataase aktiivsuse ka polüproteiini staadiumis (Salonen ja teised 2003). NsP2 on tiolproteas, tema ensümaatilist aktiivsust inhibeerivad lisaks klassikalistele tiolproteaside inhibiitoritele ka mõned kahevalentsed ioonid, nagu näiteks Zn^{2+} ja Cu^{2+} (Vasiljeva ja teised 2001). Funktsionaalselt on nsP2 proteaasi domeen papaiini-sarnane, proteaasi aktiivtsentri moodustavad Cys ja His jäägid. NsP2 on võimeline lõikama kolme saiti, kõik need paiknevad mittestruktuursete valkude vahel. Erinevate alfaviiruste vahel on konserveerunud lõikamise kohale eelnevad ja järgnevad kaks kuni neli aminohappejääki, kusjuures ülesvoolu eelviimane aminohape enne lõikamise kohta on Gly alfaviiruste kõigis kolmes lõikesaidis ning viimane aminohappejääk on enamasti väikese kõrvalahelaga aminohape. Samuti on osaliselt konserveerunud ülesvoolu kolmas aminohappejääk, Ala, mistõttu arvatakse ka see positsioon olevat oluline lõikesaidi äratundmisel (Strauss ja Strauss 1994; Lulla ja teised 2006). Lõikamisjärjestuse äratundmise juures on oluline ka ülesvoolu 4. positsioonis paiknev

aminohappejääk, kuigi see ei ole konserveerunud ei erinevate alfaviiruste ega ka SFV kolme lõikesaidi juures (Lulla ja teised 2006). Kõiki kolme saiti on nsP2 võimeline lõikama *in trans* (Shirako ja Strauss 1994).

Funktsionaalset nsP4 valku toodetakse ainult polüproteiinist P1234, andes teiseks produktiks P123 (Joonis 2). Vastav lõikamine toimub mittestruktuursete valkude polüproteiinis kõige suurema efektiivsusega (Lulla ja teised 2006). Mutant, mis pole võimeline iseseisvat nsP4 valku tootma, on igal temperatuuril elujõuetu (Shirako ja Strauss 1994, Lulla ja teised 2006). Seega on nsP4 olemasolu hädavajalik viiruse elulemisele. P1234 protsessinguks on vaja ainult funktsionaalset nsP2 proteaasi kas polüproteiini staadiumis või ka üksi (Merits ja teised 2001). Kõige kiiremini lõigatakse nsP2 valgu ja selle C-terminaalse fragmendi poolt P123/4 vahelist lõikesaiti (Vasiljeva ja teised 2001), mida eelistatakse ka C-terminaalsete järjestuste alusel. Seejärel lõigatakse C-terminaalsete järjestuste alusel P1/23 vahelist saiti ning viimaks P2/3 vahelist saiti (Lulla ja teised 2006). SIN P123 on võimeline lõikamiseks vaid bimolekulaarse reaktsiooni käigus, vajades aktiivseks tööks teist P123 molekuli, mistõttu efektiivsemaks lõikuseks on oluline suurem P123 kontsentratsioon (Shirako ja Strauss 1994). SFV puhul toimub lõikamine väga aeglaselt *in cis* (Vasiljeva ja teised 2003). Seetõttu on vastav reaktsioon alguses äärmiselt aeglane. Produktideks annab selline lõikamine vähesel, ent piisaval määral funktsionaalset nsP1 valku ja P23 (Shirako ja Strauss 1994). P23 on ilma nsP1 järjestuseta väga aktiivne ja afiinne proteaas just nsP2 ja nsP3 vahelisele järjestusele *in trans* (Merits ja teised 2001, Vasiljeva ja teised 2003, Shirako ja Strauss 1994). NsP2 valgu N-terminaalne ots käitub nsP1 järjestusest vabanenuna P23 saidi proteolüüsi aktivaatorina, seetõttu on kiireks P23 polüproteiini protsessinguks tarvis eelnevat P123 lõikust *in cis* (Vasiljeva ja teised 2003). Hilises infektsiooni faasis toodetakse suure nsP2 kontsentratsiooni tõttu peamiselt lühiealisi polüproteiine P12 ja P34, ja valke nsP1, nsP2, nsP3 ja nsP4 (Shirako ja Strauss 1994), mis ei ole võimelised uusi replikatsioonikomplekse moodustama (Vasiljeva ja teised 2003). P12 lõigatakse autokatalüütiliselt funktsionaalseteks nsP1 ja nsP2 valkudeks, kusjuures P12 vahelist saiti pole rakkudes võimalik *in trans* lõigata (Merits ja teised 2001). Hilises infektsioonifaasis kuhjub P34, mida rakus degradeeritakse ja SIN nakatatud rakus vähesel määral ka lõigatakse. SFV puhul on lõikamine aktiivsem (Joonis 2; Peränen ja teised 1988; Strauss ja Strauss 1994).

Lisaks käitumisele proteaasina vajatakse nsP2 valku spetsiifiliselt ka 26S subgenoomse RNA transkriptsiooni initsiatsioonil (Hahn ja teised 1989; Salonen ja teised 2005). Umbes 50%

nsP2 lokaliseerub rakutuumas, peamiselt tuumakeses, ent nsP2 valgu funktsioonid rakutuumas on senini teadmata. Sisaldab tuuma lokalisatsiooni signaali (Tamm 2007, magistritöö). Tsütoplasmas paikneb nsP2 valk enam-vähem võrdselt replikatsioonikompleksides ja difuusselt tsütoplasmas (Peränen ja teised 1988).



Joonis 2. NsP2 proteaasomadused erinevates polüproteiinide kombinatsioonides ja üksi. Varases infektsioonis on põhilisteks produktideks polüproteiinid P1234, P123 ning funktsionaalne nsP4; hilises infektsioonis nsP1, nsP2, P34. Vaheprodukt P23 lõigatakse kiiresti, andes produktideks nsP2 ja nsP3. Samuti lõigatakse kiiresti ka P34, andes produktideks nsP3 ja nsP4.

NsP3 on 61 kDa ja 482 aminohappejääki pikk (Keränen ja Ruohonen 1983). Tema N-terminaalne ots on konserveerunud erinevates alfaviirustes ning on arvatud, et see vahendab kinnitumist membraanidele või interaktsioone teiste mittestruktuursete valkudega (Barton ja teised 1991). NsP3 C-terminaalne ots ei ole konserveerunud. Selles alas paiknevad fosforüleeritavad aminohappejäägid. Valk fosforüleeritakse Ser ja Thr jääkidest (Peränen ja teised 1988), ilmselt rakuliste ensüümide poolt, sest nsP3 ise kinaasest aktiivsust ei oma (Vihinen ja teised 2001). Valgu funktsioonid on halvasti teada, ent on näidatud, et nsP3 on oluline polüproteiini koostises negatiivse polaarsusega RNA sünteesil (Hahn ja teised 1989; Salonen ja teised 2005) ning ka positiivse polaarsusega RNA sünteesil (Salonen ja teised 2005). Mutantides, kus nsP3 fosforüleerimine on halvenenud või blokeeritud, on RNA sünteesi kiirus aeglasem kui esialgsel viirusel, kuigi 24 tunni möödumisel toodavad mõlemad sama arvu infektsioosseid virione. Samas on fosforüleerimisdefektsed mutandid hiirtele

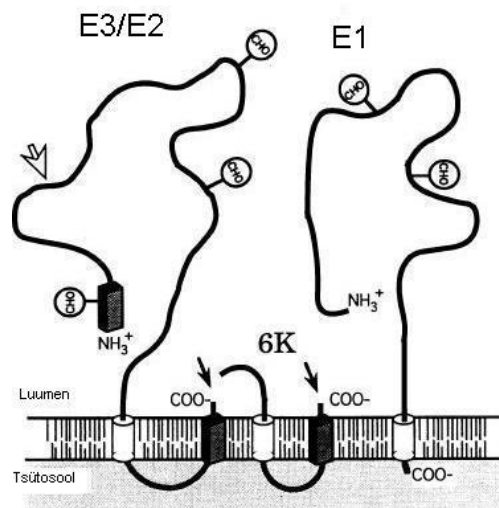
apatogeensed (Vihinen ja teised 2001). SIN puhul nsP3 osalus polüproteiinides mõjutab nsP2 proteaasid aktiivsust – nsP2 ja P12 lõikavad nsP3 ja nsP4 vahelist lõikesaiti väga halvasti, ent P123 ja P1234 lõikavad seda saiti hästi (Strauss ja Strauss 1994). Polüproteiini koostises võimaldab nsP3 replikatsioonikompleksi liikumise endosomaalsesse ratta (Salonen ja teised 2003). Rakus on nsP3 üksi ekspresseerituna paigutunud hajusalt vesikulaarsetesse struktuuridesse (Kujala ja teised 2001) või eri suurusega agregaatidesse tsütoplasmas, mis pole vesiikulitega seotud (Salonen ja teised 2003). Valgu lokaliseerumist vesiikulitesse tema fosforüleerituse aste ei mõjuta (Vihinen ja teised 2001).

NsP4 on 68 kDa ja 614 aminohappejätki pikk (Keränen ja Ruohonen 1983). Ta on viiruse RNA-st sõltuv RNA polümeraas. NsP4 N-terminaalse otsa aminohappeline järjestus on erinevates alfaviirustes tugevalt konserveerunud, ilmselt seetõttu, et N-otsa reegli alusel lagundatakse vaba nsP4 väga kiiresti (De Groot ja teised 1991). Tema pooleluiga on märgatavalt lühem kui teistel viiruse mittestruktuursetel valkudel (Keränen ja Ruohonen 1983). N-terminaalne aminohappejätk on Tyr ning samuti on konserveerunud mõned sisemised Lys jäägid, mida võidakse kasutada ubikvitiini liitmiseks, suunamaks nsP4 ATP-sõltuvasse proteinaaskompleksi. Seni pole suudetud kindlaks teha, missugune Lys on oluline valgu degradeerimiseks (De Groot ja teised 1991). Oletatakse, et nsP4 degradatsioon võib toimuda ka ubikvitiinist sõltumatut rada mööda. On näidatud, et viirused, mille nsP4 N-terminaalne aminohape ei ole Tyr või mõni teine aromaadne aminohappejätk, on selgelt halvenenud replikatsioonivõimega või sootuks elujõuetud (Shirako ja Strauss 1998). Arvatakse ka, et nsP1 ja nsP4 interageeruvad just nsP4 N-terminaalse Tyr kaudu. NsP4, mis on seotud replikaasikompleksiga, on stabiilne ning degradatsiooni eest kaitstud (Barton ja teised 1991). Rakus üksi ekspresseerituna lokaliseerub nsP4 kontsentreeritud punktikestena tsütoplasmas (Kujala ja teised 2001).

C on 267 aminohappejätki pikk. Struktuursete valkude polüproteiinis paikneb ta N-terminaalses otsas. Valgul on seesmine seriinproteaaasne aktiivsus, mille abil lõikab end autokatalüütiliselt *in cis* polüproteiini küljest lahti. Pärast seda proteaas inaktiveerub. Kapsiidivalgu N-terminaalne osa, mis on Pro, Lys ja Arg rikas, ei ole alfaviiruste seas konserveerunud järjestusega. Arvatakse, et see ala seob RNA-d elektrostaatiliselt, sest Lys ja Arg annavad peptiidi osale tugevalt positiivse laengu ning Pro võimaldab aminohapetel tungida negatiivselt laetud RNA molekuli vahele nukleokapsiidis. Kapsiidivalgu C-terminaalne osa on tugevalt konserveerunud. See ala funktsioneerib proteinaasina, osaleb

kapsiidivalgude omavahelisel interaktsioonil ning kontakteerub pungumise ajal glükoproteiinide tsütoplasmaatiliste domeenidega. Samuti on kapsiidivalgus piirkondi, mis RNA-ga spetsiifiliselt seonduvad. Näiteks on sünteesitud kapsiidivalgudel võime siduda ribosoomide suurt subühikut, mistõttu võib kapsiidivalgu selline käitumine kaasa aidata virioni lahtipakkumisele rakku sisenemisel (Strauss ja Strauss 1994).

E3 on 66 aminohapet pikk. Ta on algul seotud E2 külge, mis on 422 aminohapet pikk (Joonis 3). Kuigi ühendus E3/E2 vahel on äärmiselt vastuvõtlik proteaasele rünnakule, püsib polüproteiin (P62) intaktsena väga kaua (Strauss ja Strauss 1994) - lõikamine toimub selgroogsete rakkudes veidi enne rakumembraanile jõudmist (Liljeström ja teised 1991). N-terminaalne signaaljärjestus suunab kapsiidivalguta struktuursete valkude polüproteiini endoplasmaatilisse retiikulumi (ER) (Joonis 3). Signaaljärjestust ei eemaldata, ilmselt seetõttu, et signaaljärjestuse piirkonda lisatakse suhkrujääk.



Joonis 3. Glükoproteiinid ER membraanis. Valged silindrid on membraanankrud; mustad kuubikud signaaljärjestused. Mustad nooled kujutavad signalaase, seest tühi nool aga furini lõikesaiti (Strauss ja Strauss 1994).

E3/E2 polüproteiini C-terminaalse otsa lähedal on hüdrofoobsete aminohapete lõik, mis on E2 membraanankruks. E2 valgu külge polüproteiinis lisatakse N-liiteliselt kaks süsivesinikahelat. Valk palmitüleeritakse pärast ER-ist väljumist, ent enne *cis*-Golgisse jõudmist nelja kuni kuue palmitaadijäägiga. Dimeriseerumiseks E1-ga vajatakse E3/E2 valku lõikamata kujul, lõikamine on vajalik viiruse nakatamisvõime aktiveerimiseks, sest E3/E2 valk on ise liiga stabiilne ja membraanide fuseerumist ei saa toimuda. Lõikamine toimub konsensusjärjestuselt

R-X-(K/R)-R, kus X tähistab suvalist aminohapet. Sellist aluselise aminohappega lõppevat järjestust lõikab rakulise päritoluga ensüüm, furiin (Joonis 3 ja Strauss ja Strauss 1994).

6K on 60 aminohapet pikk. Ta on vajalik selleks, et E1 membraani õigesti sisestataks. Järjestus, mis seda määrab, paikneb 6K C-terminaalses osas. Signaaljärjestuse 6K N- ja C-terminaalses osas tunnevad ära ensüümid, mis annavad produktideks E3/E2, 6K ja E1 peptiidid (Joonis 3). Ka see valk palmitüleeritakse. Virionis on teda võrreldes teiste glükoproteiinidega vähesel määral (Strauss ja Strauss 1994). Mutatsioonid, mis eemaldasid 6K valgu viiruse genoomist, andsid tulemuseks madala tootlikkusega viiruse (Liljeström ja teised 1991). Seega osaleb see valk pigem väga hilises viiruspartikli moodustumise staadiumis. Kuigi 6K kergendab viiruse moodustumist, ei oma moodustunud viiruspartikkel, mis seda valku ei sisalda, mitte mingisugust märgatavat vahet metsik-tüüpi viiruspartiklist (Strauss ja Strauss 1994).

E1 on 438 aminohapet pikk ning sarnaselt E2-ga klassikaline 1. tüüpi integraalne membraanivalk, mille ankurjärjestus paikneb C-terminaalses otsas. Valk on sarnaselt E2-ga glükosüleeritud ja palmitüleeritud, ehkki ainult ühe ahelaga. Pärast mõningasi interaktsioone E2 valguga paigutatakse nii E1 kui ka E2 C-terminaalsed osad tsütoplasmasse. Nii saavad nad C-terminuse fosforüleerumise/defosforüleerumise abil kaasa aidata viiruse pungumisele. Muutused glükovalkude aminohappelises järjestuses mõjutavad viiruse neurovirulentsust (Strauss ja Strauss 1994).

1.5 Replikatsioon ja transkriptsioon

RNA replikatsiooni käigus toodetakse esialgsele RNA molekulile komplementaarne negatiivse polaarsusega RNA koopiat. Replikatsioon toimub modifitseeritud endosomaalsetel ja lüsoomaalsetel membraanidel, mida kutsutakse tsütopaatilisteks vakuoolideks (*cytopathic vacuole*, CPV). Vakuoole klassifitseeritakse suuruse järgi - infektsiooni alguses esineb tüüp I ja infektsiooni hilises faasis tüüp II CPV. Tsütoplasmaatilisi vakuoole, mis ei ole ei endosomaalset ega ka lüsoomaalset päritolu, moodustab ka nakatatud rakus ekspresseeritav nsP3 valk, mistõttu peeti tõenäoliseks just selle valgu osalus CPV-de tekkel (Peränen ja Kääriäinen 1991). Samas, hilisemate andmete põhjal on nsP3 puhul tegemist hoopis valgu agregaatidega tsütoplasmas, mis pole vesiikulitega seotud (Salonen ja teised 2003).

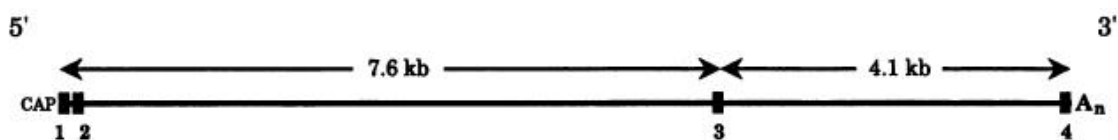
CPV on võimeline rakus liikuma, plasmamembraanilt punguma ja uuesti sisse sopistuma. Varases infektsioonis paiknevad replikatsioonikompleksid CPV-dega seotult plasmamembraani lähistel, hiljem on vakuoolid suuremad ja paiknevad peamiselt perinukleaarses piirkonnas (Kujala ja teised 2001). Vakuoolide arv rakus ei sõltu raku nakatanud viiruse hulgast, küll aga määrab viiruse hulk esmase vakuoolide ilmutumise aja – mida rohkem infektsioonilisi partikleid raku kohta, seda kiiremini ilmuvad ka vakuoolid. Samas ei tulene vakuoolide teke virioni sisenemisest endotsütoosi teel vaid siiski SFV infektsioonist enesest (Peränen ja Kääriäinen 1991). Infektsiooni käigus vakuoolide pind suureneb, nende arv aga väheneb. CPV-d, kus paiknevad replikatsioonikompleksi valgud, värvuvad hiliste endosomaalsete markeritega, ent mitte varaste endosomaalsete markeritega (Kujala ja teised 2001). CPV diameeter on 0,6-2 µm ja nende membraanis paiknevad 50 nm sopistused, kus asuvad RNA polümeraasi kompleksid, mis on maatriksahelaga seotud (Salonen ja teised 2005). Neid väikeseid sopistusi peetakse replikatsiooni toimumise kohtadeks (Kujala ja teised 2001). CPV olemasolu on tuvastatav 1 tund pärast infektsiooni (Strauss ja Strauss 1994). Replikatsioonikompleksi on võimalik CPV-dele siduda ainult polüproteiini staadiumi läbides, üksikud mittestruktuursed valgud liiguvad juba oma signaaljärjestusele vastavalt (Salonen ja teised 2003).

Replikatsioonikompleks on membraaniseoseline, selle funktsioneerimiseks on hädavajalik nsP1 valgu seotus membraanidega (Spuul ja teised 2007). Kompleksis on olemas kõik SFV mittestruktuursed valgud (Kujala ja teised 2001, Salonen ja teised 2003, Shirako ja Strauss 1994), ent on avastatud ka teiste viirusvalkude, näiteks kapsiidivalgu ja E2 glükoproteiini paiknemist replikatsioonikompleksis või selle vahetus läheduses (Strauss ja Strauss 1994). Membraaniga seotud replikatsioonikompleks moodustub vaid siis, kui eelnevalt on polüproteiinina ekspresseeritud P1234 või vähemalt P123 (Salonen ja teised 2003). Arvatakse, et replikatsioonikompleksi viib membraanidele nsP1, olles ainus valk, mis seondub plasmamembraaniga. Kompleksi nõrk kinnitamine membraani toimub fosfatidülseriini-rikka regiooni abil, seejärel liidetakse kompleks tugevalt membraanidega nsP1 palmitüleerimise abil. Kompleksi sidumisel membraanidega osaleb ka nsP3 (Kujala ja teised 2001). Järelikult toimub nsP1 seondumine nsP3 ja nsP4-ga juba polüproteiini järgus ning polüproteiini staadium on replikatsioonikompleksi moodustumiseks hädavajalik.

Negatiivset ahelat sünteesiv polümeraas erineb positiivse ahela polümeraasist, koosnedes polüproteiin P123-st ja nsP4-st (Shirako ja Strauss 1994). Lisaks viirusvalkudele osalevad

protsessil ka mitmed peremeesraku valgud, mis kinnituvad eelkõige genoomse RNA 3' otsale. Kindlaks on tehtud 120 kDa rakulise valgu osalus replikatsioonil (Strauss ja Strauss 1994). Negatiivset ahelat sünteesitakse ainult varase infektsiooni käigus, pideva valgusünteesi tingimustes, mil nii positiivse kui ka negatiivse ahela hulk rakus kasvab eksponentsionaalselt. Seda ahelat sünteesiv polümeraas on lühiealine (Sawicki ja Sawicki 1980). 3 ja 4 infektsioonijärgse tunni vahel lakkab – RNA süntees (Shirako ja Strauss 1994), kuigi + RNA süntees jätkub maksimumkiirusel. Negatiivse ahela polümeraas reguleerib positiivse polaarsusega RNA sünteesi, määrates ära kasutatavate matriitside arvu (Sawicki ja Sawicki 1980). Pärast negatiivsete ahelate sünteesi lõppu jätkub transkriptsioon ehk positiivsete ahelate süntees olemasolevate replikatsioonikomplekside abil nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 ja rakuliste abifaktorite poolt (Strauss ja Strauss 1994). Positiivse RNA ahela polümeraas jääb aktiivseks ka siis, kui polümeraasi valke valgusünteesi inhibitsiooni tõttu enam juurde ei sünteesita (Sawicki ja Sawicki 1980). Arvatakse, et komplekse hilises infektsioonifaasis enam juurde ei sünteesita ning et nende arvu piiravaks teguriks on rakuliste abifaktorite nappus. Üheks tõendiks viimasele väitele on see, et negatiivsete ahelate üleekspressioon ei vii suurenenud RNA sünteesile hilises infektsioonifaasis. Sünteesitud negatiivne ahel jääb seotuks replikatsioonikompleksiga, väljastpoolt juurde antud negatiivseid ahelaid ei hakata kasutama matriitsina +RNA sünteesi jaoks (Strauss ja Strauss 1994). SIN varases infektsioonis on põhilisteks mittestruktuursete valkude vormiks P123 ja nsP4, mis on negatiivse polaarsusega RNA molekuli sünteesimiseks vajalikud komponendid. Infektsiooni kulgedes P123 kontsentratsioon kasvab, toodetakse valmis nsP1, nsP2, nsP3 ja nsP4 (Shirako ja Strauss 1994). SFV puhul toimub P123 lõikamine väga aeglaselt *in cis* (Vasiljeva ja teised 2003). Infektsiooni edenedes muutub proteiinide lõikamine nii kiireks, et P123 enam praktiliselt ei eksisteeri. Sellega aktiveerub positiivse polaarsusega RNA süntees ja sünteesitakse subgenoomsed RNA molekulid ja uute viiruse genoomsed koopiad. (Strauss ja Strauss 1994). Sellistes tingimustes negatiivse RNA ahela sünteesi enam toimuda ei saa. Mutandid, mis ei ole võimelised polüproteiini P123 iseseisvateks valkudeks lõikama, on +RNA molekulide sünteesi suhtes defektsed (Shirako ja Strauss 1994). Ilmselt toimub polüproteiini lõikamise käigus valkude konformatsiooni muutus, mille tagajärjel moodustuvad iseseisvad mittestruktuursed valgud pole võimelised negatiivseid ahelaid sünteesima. Seega reguleerib positiivse ahela sünteesi P123 proteolüüs. Positiivsest ahelast erineb negatiivne muu hulgas ka selle poolest, et negatiivsel ahela 3' otsas paikneb mittepaardunud G nukleotiid (Strauss ja Strauss 1994).

Alfaviiruste genoomis on mitmeid konserveerunud järjestusi, mis arvatakse olevat viiruse replikatsiooni ja transkriptsiooni regulaatoriteks. Joonisel 4 on näha neli konserveerunud regiooni, millest esimene ja teine omavad juuksenõela konformatsiooni ning kaks viimast kujutavad endast konserveerunud järjestusi. Esimene juuksenõel arvatakse olevat promooteriks positiivsete RNA molekulide sünteesil, funktsioneerides seega –RNA molekulil. Teine struktuur, mis võib samuti moodustada kaht juuksenõela, paikneb nsP1 regiooni sees ning reguleerib ilmselt ko-promooterina –RNA sünteesi käivitamist. Kolmas konserveerunud piirkond on subgenoomse RNA molekuli sünteesi promooteriks ning neljas regioon aitab initsieerida –RNA molekuli sünteesi +RNA matriitsil. Muutused nendes konserveerunud regioonides mõjutavad viiruse kasvamist selgroogsetes ja selgrootutes erinevalt – paranenud paljunemine sääse rakkudes võib tähendada halvenenud replikatsiooni hiire rakkudes. Looduslikku järjestust peetakse seetõttu optimaalseks viiruse kõiki võimalikke peremehi arvestavaks järjestuseks. Seetõttu peetakse tõenäoliseks, et nende elementidega, eriti 3' mitte-transleeritava regiooni elementidega, seonduvad eelkõige peremeesraku faktorid ning alles siis viirusvalgud. Samuti on teatud mutatsioonid nendes piirkondades olulised virulentsuse määrajad teatud koetüüpides (Strauss ja Strauss 1994).



Joonis 4. Alfaviiruste konserveerunud järjestused genoomis. 1 ja 2 moodustavad juuksenõela-struktuure, kõik piirkonnad on primaarjärjestuse tasemel konserveerunud (Strauss ja Strauss 1994).

1.6 SFV valk nsP1

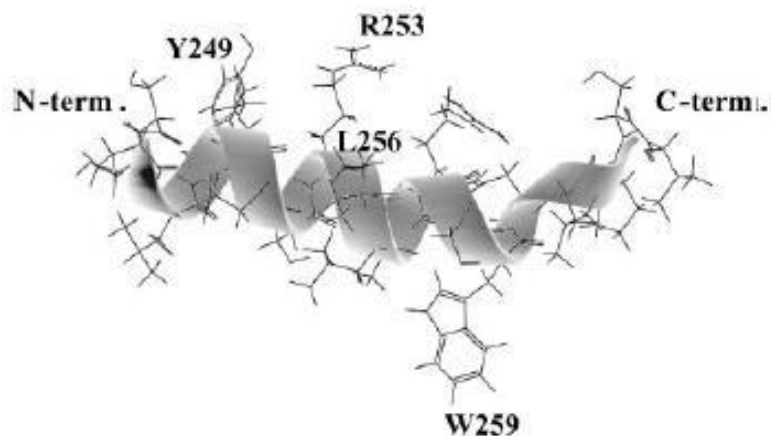
SFV multifunktsionaalne valk nsP1 on 64 kDa ja 537 aminohappejääki pikk (Keränen ja Ruohonen 1983). NsP1 seondub membraanidega (Salonen ja teised 2005) ning omab seondumise tugevdamiseks veel palmitüleeritavaid Cys-e C418-C420, kusjuures palmitaat on Cys-iga liidetud tioester sideme abil (Laakkonen ja teised 1996). Palmitaat on 16 süsinikuline küllastunud rasvhape. NsP1 omab membraanile lokaliseerumise signaali (Salonen ja teised 2003), mis arvatakse sisalduvat amfipaatilises heeliksis valgu N-terminaalses pooles (Spuul ja teised 2007). NsP1 afiinsus membraanidele on tugevam kui nsP2 afiinsus tuumale, sest juhul

kui need kaks valku on ekspresseeritud püsiva polüproteiinina, transporditakse nad plasmamembraanile. Ka üksi ekspresseerituna lokaliseerub nsP1 peamiselt plasmamembraanis (Salonen ja teised 2003) ja seal paiknevates 50 nm läbimõõduga filopoodiumi-laadsetes hargnevates niitjates struktuurides, mis ei sisalda F-aktiini (Laakkonen ja teised 1998). Polüproteiini koosseisus suudab valgu afiinsust plasmamembraanile ületada nsP3 omadus viia kompleks endosomaalsest rajast pärit vesiikulitesse, mis paiknevad plasmamembraani all või tsütoplasmas. NsP1 on endiselt membraanankruks, ent tema sihtmärk on tänu nsP3-le muutunud. Seega on nsP1 ja nsP3 vastutavad replikatsioonikompleksi lokaliseerumise eest CPV-desse (Salonen ja teised 2003).

NsP1 ei sisalda hüdrofoobsete aminohapete lõike mis võiksid olla membraane läbivaks domeeniks, ometi seotakse valk membraanidega. Membraanide sidumise juures on oluline valgu N-terminaalne osa (Laakkonen ja teised 1996), välja arvatud päris esimesed aminohapped (Ahola ja teised 1999). Peaaegu ükski deleteeritud N-terminusega valk ei paikne oma loomulikus asukohas, membraanidel. C-terminaalsed aminohapped on veidi vähem olulised. Ka C-terminuse palmitüleerimise puudumisel oli märgata mõningast valkude seondumist membraanidega (Laakkonen ja teised 1996). Väga paljud deletandid on ensümaatilise aktiivsusega, mistõttu nsP1 on väga raske funktsionaalseteks domeenideks jagada (Laakkonen ja teised 1996, Ahola ja teised 1999).

Membraanidega seondumisel annab oma panuse nsP1 keskmes paiknev amfipaatileine heeliks järjestusega G₂₄₅STLYTESRKLLRSWHLPSV₂₆₄ (Ahola ja teised 1999, Lampio ja teised 2000). Peptiid on alfaviiruste-laadsete superperekonnas konserveerunud ning vastava järjestusega sünteetiline peptiid võistleb nsP1-ga negatiivselt laetud lipiide (Lampio ja teised 2000), eriti fosfatidüülseriini, sisaldavate liposoomide sidumisel (Ahola ja teised 1999), kusjuures liposoomidega seondunult on peptiid alfa-heeliksi struktuuris (Lampio ja teised 2000). NsP1-laadsete valkude seas on konserveerunud pigem kriitiliste aminohappejääkide laengud, mitte niivõrd konkreetne aminohappejääk (Lampio ja teised 2000). Peptiid käitub membraanidesse lokaliseerumise signaalina, sest kaks või enam amfipaatileise heeliksi koopiat viib GFP valgu mittespetsiifiliselt raku membraanidele (Spuul ja teised 2007). Tuumamagnetresonantsi abil on määratud kindlaks amfipaatileise heeliksi alale vastava sünteetilise peptiidi alfa-heeliksi struktuur. Seondumispeptiidi hüdrofoobse pinna moodustavad mitmed Trp, Val, Leu jäägid ning peptiid võib seonduda lipiidide atsüülhelalatega liposoomide kaksikihis. Positiivselt laetud jäägid R253, K254, R257, kuid ka

Y249 seonduvad membraani moodustavate polaarsete fosfolipiidide peadega. Ioonsete interaktsioonide tähtsust näitab ka see, et soola lisamisel vabastatakse amfipaatilise heeliksi järjestusele vastav peptiid fosfolipiidsest vesiikulist (Lampio ja teised 2000). Mutatsioonid konserveerunud hüdrofoobsetes jääkides L255, L256 ja W259 ning ka Y249 jäägis vähendavad nsP1 metüültransferaasset aktiivsust tunduvalt ja mõjutavad tema seondumist liposoomide ja membraanidega (Ahola ja teised 1999, Lampio ja teised 2000). Peptiid sukeldub membraani lateraalselt, nii et W259 on umbes 9 kuni 10 süsiniku sügavusel atsüülahelas. Y249, R253, L256 paiknevad W259 vastaspoolel (Lampio ja teised 2000 ja joonis 5). Y249 võib olla seotud ka otsestes hüdrofoobsetes interaktsioonides või olla ühenduseks seondumispeptiidi ja ülejäänud nsP1 valgu vahel. Seda teooriat toetab asjaolu, et mutatsioon vastavas jäägis oli letaalne, ent ei muuda nsP1 membraani lokalisatsiooni nii suurel määral kui mutatsioon teistes kriitilistes jääkides. Seondumispeptiidi regioon on nsP1 konserveerunumate regioonide seas. Vastavate aminohapete muteerimise tulemusena pole viirus elujõuline, on tugevalt lokaliseerunud ebatavalisse asukohta või omandab kiiresti sekundaarseid kompensatoorseid mutatsioone, kusjuures kompensatoorsed mutatsioonid ei pruugi olla seondumispeptiidi vahetus läheduses, vaid paikneda hoopis kaugemal (Spuul ja teised 2007).



Joonis 5. NsP1 valgu amfipaatilise heeliksi ennustatav struktuur (Spuul ja teised 2007).

Mutatsioonilise analüüsi tulemusena on leitud, et eriti oluline on antud peptiidi sisse jääv nsP1 253. positsioonis paiknev positiivne aminohape. Vastava aminohappe muutmine negatiivselt laetud aminohappeks on viirusele letaalne, laengu muutmine neutraalseks aga suunab viirust sekundaarsete mutatsioonide omandamisele. 255. ja 256. positsioonis paikneval neutraalse aminohappe puhul on oluline ruumiline struktuur – suhteliselt suure ja jäiga kõrvalahelaga aminohappe asendamine väiksemaga põhjustab samuti sekundaarsete kompensatoorsete mutatsioonide tekke. 259. positsioonis paiknev Trp on samuti äärmiselt oluline, sest nagu lähtub ülal toodud andmetest, käitub see aminohape membraanankruna, sukeldudes sügavale lipiidkihti. Selle puudumine nsP1 valgus annab suuremas osas tsütoplasmaatilise lokalisatsiooniga valgu vormi, viiruse kontekstis on vastav mutatsioon letaalne (Spuul ja teised 2007).

Niisiis toimub nsP1 membraaniga seondumine polaarsete interaktsioonide abil positiivselt laetud aminohappejääkide ja anioonsete fosfolipiidide negatiivselt laetud peade vahel. Samuti on olulised hüdrofoobsed interaktsioonid, kriitiline on üksiku Trp ja lipiidide atsüülahelate vahelised hüdrofoobsed interaktsioonid.

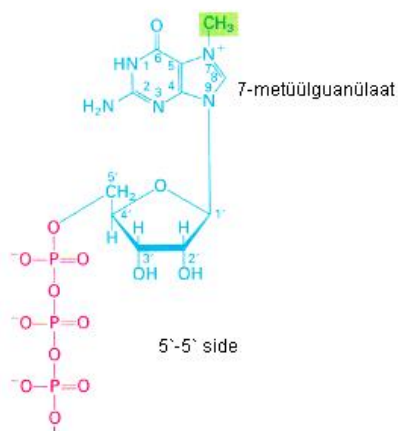
NsP1 seondumist membraanidega tugevdab valgu palmitüleerimine, mille tõestamiseks on konstrueeritud palju vastava valgu mutantseid vorme, muu hulgas ka selliseid, kus on kõik kolm palmitüleeritavat Cys-i kõrvaldatud või asendatud Ala-dega. Sellist mutatsiooni kandvad palmitüleerimisdefektsed viirused on elujõulised ja vastav rekombinantne kolmikmutantne nsP1 omab 40% tavalise nsP1 valgu guanüültransferaasest ja metüültransferaasest aktiivsusest (Laakkonen ja teised 1996). Mittepalmitüleeritava nsP1 valguga viirused jäävad korrektset nsP1 valku sisaldavatele viirustele veidi alla viiruse kasvukineetikas (Ahola ja teised 2000), efekt on märgatavalt väiksem kui vähemalt üks aminohappejääkidest vahemikus 418-420 on palmitüleeritud (Laakkonen ja teised 1996). Veidi on muutunud ka mittepalmitüleeritavate viiruste nsP1 valgu lokalisatsioon rakus – filopodiumi-laadsetes jätketes seda ei tuvastata (Laakkonen ja teised 1996; Ahola ja teised 2000) ning lisaks plasmamembraanile paikneb muteeritud nsP1 valk ka difuusselt tsütoplasmas ning mitmetes erinevates rakusisestes membraanides. Replikatsioonikomplekside lokalisatsioon rakus nsP1 palmitüleerimisest või selle puudumisest ei muutu. Ehkki elujõulised, on SFV palmitüleerimisdefektsed mutandid apatogeensed hiirtele. Mutantne viirus on tuvastatav loomade veres, ent mitte aju homogenaatides, mistõttu hiirte elulemus on märgatavalt parem. Samuti ei suuda vastav mutantne viirus kõigis rakuliinides sarnaselt metsik-tüüpi viirusega

tekitada lüüsilaiagukesi ehk *plaque* `sid, kuigi nakatunud rakkude apoptoosi kutsuvad mõlemad viirused esile (Ahola ja teised 2000).

Palmitüleeritud kujul nsP1 on tugevalt membraaniseoseline – seda on võimalik membraanist eraldada vaid äärmiselt aluselises keskkonnas, pH 12 juures. Mittepalmitleeritud nsP1 lahustamiseks ekstreemseid tingimusi tarvis ei ole (Laakkonen ja teised 1996; Ahola ja teised 2000). Seega muudab palmitüleerimine perifeerse nsP1 tugevalt membraaniseoseliseks valguks. NsP1 palmitüleerimine pole viirusele küll hädavajalik, ent tugevdab oluliselt interaktsiooni raku membraanide ja replikatsioonikompleksi vahel. NsP1 ekspressioon raku põhjustab aktiini stressifibrille lagunemise, kusjuures teised tsütoskeleti komponendid jäävad viirusinfektsioonist puutumata (Laakkonen ja teised 1998). Aktiini tsütoskeleti lõhustamine on olulisel määral seotud nsP1 valguga palmitüleerimisega (Ahola ja teised 2000). F-aktiini esineb nsP1 ekspressiooni korral veidi raku perifeerses osas ja eriti suurte filopoodiumi-laadsete jätkete alguspunktides, olles ilmselt abiks jätkete esialgsel moodustumisel. Koos nsP1 valguga paiknevad jätketel veel transmembraanne valk CD44 ja plasmamembraanivalk ezrin (Laakkonen ja teised 1998).

SFV paljuneb ainult raku tsütoplasmas ning tema nukleiinhappeid rakutuuma ei transpordita. Kaitseks raku tsütoplasmaatiliste RNA-d lagundavate ensüümide eest on ka viirusel tarvis oma nukleiinhappeid kaitsta. Üheks selliseks kaitseks on RNA 5`otsa *cap*-struktuuri lisamine (Joonis 6). Sama modifikatsioon on vajalik ka translatsiooni aktiveerimiseks ja viiruse RNA replikatsiooniks. Raku *cap*-sünteesi eest vastutavad ensüümid asuvad tuumas, SFV puhul lahendab antud probleemi nsP1 valk. NsP1 on nii guaniin-7-metüültransferaas kui ka guanüültransferaas. Metüültransferaas katalüüsib metüülgrupi üleviimist S-adenosüülmetioniinilt GTP 7. positsioonile, jättes alles S-adenosüülhomotsüsteiini (Ahola ja teised 1999). Sellele reaktsioonile järgneb guanüültransferaasi poolt katalüüsitud reaktsioon, mille käigus moodustub m^7GMP -nsP1 kovalentne kompleks, mis sisaldab ilmselt fosfoamiidsidet. Guanüültransferaasse reaktsiooni toimumiseks on vajalik adenosüülmetioniini ja divalentsete katioonide olemasolu, pürofosfaat omab inhibeerivat efekti (Ahola ja Kääriäinen 1995). Mõlemad reaktsioonid on viirus-spetsiifilised, sest rakulised ensüümid, mis on seotud mRNA-le *cap*i lisamisega, moodustavad kovalentseid komplekse ainult GMP-ga kui vahetühendiga guanüültransferaases reaktsioonis. NsP1 puhul

metüültransferaasne reaktsioon eelneb guanüülültransferaasnele ning kovalentne kompleks tekib $m^7\text{GTP}$ ja nsP1 valgu vahel (Ahola ja teised 1997).



Joonis 6. nsP1 poolt lisatav *cap*-struktuur. 7-metüülguanülaat lisatakse RNA 5'otsa nsP1 valgu poolt, mis omab nii guaniin-7- metüültransferaas kui ka guanüülültransferaas aktiivsust.

<http://oregonstate.edu/instruction/bb492/fignumbers/figL4-24.html>

On konstrueeritud mitmeid nsP1 mutante, et määrata kindlaks metüültransferaas tsentri asukoht. Aminohappejäägid positsioonides 64 ja 90 on hädavajalikud S-adenosüülmetioniini sidumiseks; 64., 90., 93., 142. ja 249. positsioonis olevate aminohappejääkide muteerimine halvendab tunduvalt või hävitab nsP1 metüültransferaas omadused. 38. positsioonis paiknev His osutus guanüülültransferaas aktiivsuse säilitamiseks samuti oluliseks. Mitte ühelgi neist mutantidest ei olnud muutunud nsP1 palmitüleerimise tase (Ahola ja teised 1997). Nagu mainitud, on kehtiv ka vastupidine - nsP1 valk, mille kõik palmitüleeritavad Cys-id on asendatud Ala-dega ja mida seetõttu ei palmitüleerita, on ensümaatilisel aktiivne (Laakkonen ja teised 1996). Järelikult pole palmitüleerimine seotud valgu ensümaatiliste omadustega. Kõik mutandid, mis ei suutnud läbi viia metüültransferaas reaktsiooni, ei suutnud läbi viia ka guanüülültransferaas reaktsiooni. See kinnitab, et GTP metüleerimine on eeltingimuseks kovalentse kompleksi moodustumisel guaniiniga. Ensümaatiliste omaduste säilimiseks on vajalikud umbes 500 aminohapet nsP1 valgu N-terminaalsest otsast (Ahola ja teised 1997). nsP1 säilitab oma metüültransferaas ja guanüülültransferaas omadused ka polüproteiini staadiumis, kusjuures valgu modifitseerimine võib toimuda polüproteiini staadiumis ning tema esinemist lõplikult lõigatud kujul ei ole vaja (Salonen ja teised 2003).

Membranidega seondumine aktiveerib nsP1 valgu. Seondumine võib toimuda kas otseselt nsP1 ja fosfolipiidide vahelise kontakti tulemusena või alternatiivselt rakulisi abivalke kasutades. Valk on kohanenud funktsioneerima ainult membraanidega seotult membraanses keskkonnas. Detergendid hävitavad nii nsP1 metüültransferaasid kui ka guanüültransferaasid omadused, anioonsete fosfolipiidide lisamine fosfolipiidsete vesiikulite tekitamiseks taastab aga valgu ensümaatilised aktiivsused. Eriliselt hästi taastab mõlemad ensümaatilised aktiivsused fosfatidüülseriini lisamine, kusjuures teatud kontsentratsioonides saavutati isegi metüültransferaasse aktiivsuse hüperaktivatsioon. Teistsuguste anioonsete fosfolipiidide lisamine võis samuti taastada metüültransferaasse aktiivsuse, ent guanüültransferaasse aktiivsuse taastamist täheldati märksa harvemini (Ahola ja teised 1999, Lampio ja teised 2000). Seega võib nsP1 seondumine membraanidele tuleneda tema afiinsusest negatiivselt laetud fosfolipiididele. Eriti hästi sidusid nsP1 valku segaliposoomid fosfatidüülseriini ja fosfatidüülkoliiniga, kusjuures fosfatidüülseriini hulk võis varieeruda 50% - 20%-ni sõltuvalt membraanide lõhkumiseks eelnevalt kasutatud detergendi omadustest (Ahola ja teised 1999).

1.7 Replikonid ja tsütotoksilisus

Semliki Forest viiruse genoomi sekveneerimine ja täispika cDNA kloonid saamine (Liljeström ja teised 1991) on võimaldanud erinevate replikonide loomise. Alfaviirustel põhinevaid replikone on konstrueeritud SFV, SIN ja VEEV baasil (Lundström 2005). Replikoniks nimetatakse RNA molekuli, mis on võimeline iseseisvaks replikatsiooniks, ent erinevalt viiruse genoomsest RNA-st ei ole teda võimalik ilma kõrvalise abita partiklitesse pakkida. Partiklisse pakitakse *helper*-süsteemi kasutades ainult replikoni RNA, mistõttu replikone sisaldavad partiklid on võimelised rakke nakatama vaid ühel korral ning rakus neid juurde ei toodeta. Võimetuse tõttu iseseisvalt levida kõrval asetsevatesse rakkudesse, kasutatakse sageli just replikone võõrgeenide viimiseks rakkudesse geeniteraapia vahendina. Nii on võimalik kontrollida võõrvalgu süsteemset levikut. Samuti on alfaviirusvektorite kasutamise juures oluline roll võrdlemisi suurel, kuni 8 kb võõrgeeni mahutavusel (Lundström ja teised 2001 c) ning laial peremeesringil alustades sääskede ja lindudega ja lõpetades selgroogsete erinevate rakutüüpidega. Reeglina on viirus kõige afiinsem neuronaalsetele rakkudele, mis võimaldab viirust kasutada neurobioloogias ja neurodegeneratiivsete haiguste uurimisel. Samuti tundub

SIN olevat afiinsem kasvajarakkudele neis teatud retseptori suurema hulga esinemise tõttu võrreldes tervete rakkudega (Lundstrom 2005).

Tavaliselt paigutatakse võõrgeen SFV puhul subgenoomse promooteri kontrolli alla, struktuursete valkude asemele. Kapsiidivalgu 5' otsas paiknev võimendaja on vahendiks, mille abil toota suuremal hulgal võõrgeeni. Seda võib ära kasutada tootmaks teatud viiruste ja kasvajate vastaseid antigeene kiirema ja ulatuslikuma immuunvastuse saavutamiseks (Lundstrom 2005). Alfaviirusvektorite abil saavutatakse väga tugev võõrvalgu ekspressioon. Seda omadust on kasutatud erinevate rekombinantsete retseptorite tootmiseks struktuuranalüüsi ja puhastamise jaoks (Lundstrom ja teised 2001 c). SFV puhul on kasutusel kolm erinevat meetodit vektori viimiseks rakkudesse:

1.) Rekombinantsed mitte-paljunevad vektorid. Vastavad replikonid pakitakse viiruslaadsetesse partiklitesse *helper*-süsteemi kasutades. *Helper*-süsteemi põhiidee seisnebki võõrgeeni kodeeriva replikon-RNA pakkimises viiruslaadsetesse partiklitesse. Struktuurset valke kodeeriva(te)l *helper*-vektori(te)l on ära rikutud pakkimissignaali. Seetõttu struktuurset valke kodeerivad molekulid jäävad ainult esialgselt nakatatud raku, mis sureb (Karlsson ja Liljeström, 2003). Kaksik-*helper* süsteem põhineb kapsiidivalgu ja glükoproteiinide ekspresseerimisel erinevatelt vektoritelt. SFV glükoproteiinide ette kloonitakse kapsiidivalgu algusest pärit võimendaja järjestus ning suu- ja sõrataudi viiruse autoproteaasi järjestus. Võimendaja tagab erinevate struktuursete valkude ekspresseerumise võrreldaval tasemel. Suu- ja sõrataudi viiruse autoproteaasi järjestus võimaldab glükoproteiinide järjestusel võimendaja järjestusest vabaneda. Muteerides kapsiidivalgu autoproteaasid domeeni muutub kasutatav süsteem veelgi turvalisemaks (Smerdou ja Liljeström 1999). Rekombinantsete partiklite kasutamisel saavutati hiirtes seitse päeva kestev vaktsiini püsimine süstimise asukohas ning ajutine esinemine sekundaarsetes lümfooidsetes organites (Morris-Downes ja teised 2001).

2.) Otsene rekombinantse DNA transfektsioon sihtmärkrakkudesse (Karlsson ja Liljeström, 2003). DNA on stabiilsem kui RNA, seetõttu on sellel süsteemil geeniteraapia seisukohast järgmise süsteemi ees eeliseid. Viiruse RNA polümeraasi promooter asendatakse eelnevalt näiteks tsütomegaloviiruse DNA polümeraasi promooteriga, mis võimaldab antud DNA vektorit edukalt kasutada. Kuigi sellise DNA-põhise süsteemi abil on samuti võimalik toota *helper*-süsteemi kasutades infektsioonivõimelisi partikleid, on nende tootlikkus märgatavalt väiksem võrreldes RNA-l baseeruva süsteemiga (Lundstrom 2005).

3.) Otsene RNA transfektsioon sihtmärkrakkudesse. SFV replikonidega transfekteeritud rakud surevad lõpuks, seega pole muret võimaliku integratsiooni pärast raku genoomi või ka pikaajalisest antigeeni ekspressioonist tuleneva võimaliku tolerantsuse pärast. Esimesest võib tuleneda kasvajate tekitamine, mistõttu on eriti oluline vältida püsivat integratsiooni raku DNA-sse (Karlsson ja Liljeström, 2003). RNA on alfaviiruste loomulik nukleiinhappe vorm, seetõttu on seda kõige lihtsam toota ja seetõttu ka kõige loogilisem kasutada.

Kahe viimase punkti alternatiiviks on puhta või ka membraani või liposoomiga kaetud vektori viimine organismi nukleiinhappe kujul. Selline käitumine tagab pikemaajalise vaktsiini püsimise injektsiooni asukohas, samuti levib vaktsiin suuremasse hulka sekundaarsetesse asukohtadesse. Sellisel viisil tekitatud immuunvastus on vähem ulatuslik (Morris-Downes ja teised 2001). Samuti on kasutatud ka replikatsioonivõimelist viirust ennast võõrgeenide ekspresseerimiseks, kus viiruse genoomile on lisatud teine subgenoomne promooter, mis kodeerib võõrgeeni. Selline viirus toodab partikleid, ent pikemaajalise infektsiooni korral säilib oht, et viirus kaotab tema elutsükli jaoks ebavajaliku võõrgeeni kodeeriva järjestuse (Lundstrom 2005).

Replikonid, millesse on kloneeritud puromütsiini resistentsust tagav geen (Lisa 2), võimaldavad puromütsiini sisaldavas söötmes kasvada vaid mittetsütopatoogene viiruse RNA-d sisaldavatel rakkudel. See võimaldab eristada nakatunud rakud nakatamata rakkudest, juhul kui nakatajaks ei ole tsütopatoogene viirus. Mitte-transfekteerunud rakud surevad söötmes oleva antibiootikumi tõttu (Sawicki ja Sawicki, 1980; Agapov ja teised 1998; Frolov ja teised 1999). Puromütsiin on translatsiooni elongatsiooni inhibiitor, puromütsiini N-atsetültransferaasi geen (PAC), mis on isoleeritud *Streptomyces alboniger*´ist, tagab resistentsuse vastavale antibiootikumile. Olles kindel, et kõik analüüsitud rakud on tõepoolest nakatunud või transfekteeritud, on lihtsam hinnata rakkudes toimivate protsesside ulatust ja tähendust.

On leitud, et SIN replikonid, mis sisaldavad mutantse nsP2 valguga mittestruktuurset ala ning replitseeruvad metsik-tüüpi viiruse vastava replikoniga võrreldes väga madala tasemel, on selgroogsete rakkudele vähem tsütopatoogeensed. Viimane kehtib ka viiruse kontekstis esimeses põlvkonnas (viirus, mis toodetakse rakkudesse transfekteeritud RNA-st ligikaudu 24 tunni jooksul), kui viirus ei ole jõudnud omandada sekundaarseid mutatsioone. Sekundaarsed mutatsioonid tekivad tavaliselt kas esimese põlvkonna viiruse pikendatud kasvatamisel või esimese põlvkonna viirusvaru kasutamisel teise viiruspõlvkonna saamise jaoks. RNA sõltuv

RNA polümeraas teeb sünteesi käigus palju vigu. Seetõttu on esialgselt kehvema paljunemiseefektiivsusega viirused tavaliselt teises põlvkonnas (saadakse rakkude nakatamisel esimese põlvkonna viirusega) omandanud piisaval hulgal kasulikke mutatsioone, mis taastavad esialgse *Wt*-viiruse sarnase fenotüübi või vähemalt paljunevad märgatavalt paremini võrreldes esialgse viiruse põlvkonnaga. Kehvema replikatsioonivõime ja väiksema tsütopatogeensuse vaheline seos on näha SIN nsP2 valku kodeerivas alas muteeritud replikoni ja viirusega, kus 726. positsioonis asuv aminohappejääk Pro on asendatud Gly-ga (Frolov ja teised 1999). Vastav mutant ei suuda erinevalt metsik-tüüpi viirusest inhibeerida raku transkriptsiooni ja translatsiooni, mis võimaldab selle viiruse pikemas perspektiivis organismist kõrvaldada (Gorchakov ja teised 2004, 2005). Paljud SIN mittetsütotoksilist fenotüüpi põhjustavad mutatsioonid on üle viidud SFV konteksti (Lundstrom ja teised 2001 a ja b). Mutant SFV1-PG, kus 726. positsiooni Pro on asendatud Gly-ga, on üle viidud SFV vastavasse positsiooni, on antud töös edaspidi kasutusel. Lõpuks saadakse mittetsütotoksilise replikoni süsteemi kasutades kõrgem võõrgeeni ekspressiooni tase, kuigi esialgsed ekspresseeritava valgu tasemed on võrreldes *Wt* viiruse järjestust sisaldava replikoni omaga tunduvalt madalamad. Sel teel saadud valk on stabiilne ja funktsionaalne (Agapov ja teised 1998). NsP2 valgus teatud mutatsioone sisaldavad replikonid, mis on rakkudele vähem tsütotoksilised kui metsik-tüüpi viirusvalke kodeeriv replikon, pole võimelised korrektselt negatiivse polaarsusega RNA sünteesi alfaviirustele omasel viisil lõpetama ning osad neist vajavad sama koguse positiivse polaarsusega genoomide saamiseks vähem –RNA ahelaid. See näitab, et mutatsioonid nsP2 valgus mõjutavad sageli replikaasikompleksi efektiivsust. Samuti võib osade mutantsete replikonide toimel olla muutunud positiivse polaarsusega RNA polümeraas ebastabiilseks ning vajada pidevat valgusünteesi erinevalt metsik-tüüpi replikonidest, mille positiivse polaarsusega RNA polümeraas on kogu aeg stabiilne (Sawicki ja teised 2006). Arvatakse, et negatiivse ahela sünteesi mahasurumine on peremehe poolt vahendatud funktsioon, mida kutsutakse esile nsP2 valk.

Mittetsütotoksiliste mutantide isoleerimine ja kirjeldamine on eriti oluline just seetõttu, et võimaldaksid kasutatuna geeniteraapias pikemaajase võõrgeeni ekspressiooni transfekteeritud raku. See on oluline *Wt* SFV ja SIN replikonide ja viiruste tugeva mõju tõttu rakkudele, mille tulemusena rakud paari päeva jooksul surevad. Samas on tugev tsütotoksilisus oluline kasvajate ravis, kus nende võime rakke tappa vähendab tunduvalt kasvaja läbimõõtu. Selle võime edukaks kasutamiseks organismi tasemel on vajalik replikonid täpselt kasvaja

rakkudeni viia, sest alfaviirused on võimelised nakatama paljusid rakutüüpe ning kutsuma esile ka üpris tugevat immuunvastust. See võimaldaks immuniseerimist läbi viia ainult ühe korra. Liposoomide kasutamine on üheks oluliseks vahendiks organismi süsteemsest immuunvastuse tekitamisest mööda pääsemiseks, ent süsteem vajab veel uurimist ja täiendamist (Lundstrom 2005).

2 Eksperimentaalne osa

2.1 Eesmärgid

Antud töö eesmärkideks oli:

- 1.) Tuvastada, kas meie uurimisrühmas Kairit Tintsi poolt *plaque*-puhastatud mutantsete viirusvarude teine põlvkond sisaldab lisaks nsP1 kodeerivale alale mutatsioone ka mõndades teistes mittestruktuurseid valke kodeerivates alades.
- 2.) Iseloomustada punktis 1 tuvastatud mutatsioone ning kaaluda nende võimalikku kasutust geeniteraapia vektorite konstrueerimisel.
- 3.) Võrrelda Inga Sarandi ja Tero Ahola grupi poolt konstrueeritud rekombinantsete viiruste ja nsP1 valku kodeerivas alas kompensatoorseid mutatsioone sisaldavate viiruste replikatsiooni metsikut tüüpi SFV replikatsiooniga.
- 4.) Uurida kompensatoorseid mutatsioone sisaldavate replikonide tsütotoksilisust ja võrrelda seda metsikut tüüpi replikoni tsütotoksilisusega.

2.2 Materjalid ja meetodid

Rakukultuur

Antud töös kasutati hamstri neerurakkude liini BHK-21 ja Aafrika rohepärdiku neerurakkude liini COS 7. Rakke kasvatati 37°C juures inkubaatoris kõrge niiskuse keskkonnas 5% CO₂ juuresolekul. BHK-21 rakke kasvatati GMEM söötmes (*Glasgow`s Modified Eagle`s Medium; Gibco*), mis sisaldas 5% veiseseerumit (FCS), 100 U/ml penitsilliini, 100 µg/ml streptomütsiini ning 0,3% TPB-d (*Bacto Tryptose Phosphate Broth, Difco*). Kui ei ole mainitud teisiti, sisaldavad kõik kasutatud söötmed neid komponente samasuguses hulgas.

COS 7 rakke kasvatati 60 mm petri tassidel IMDM söötmes (*Isocove`s Modified Dulbecco`s Medium, Gibco*), millele oli lisatud 10% FCS-i ning antibiootikumide segu (streptomütsiin 0,1 mg/ml ja penitsilliin 100 U/ml, *Gibco*).

Rakud võeti plastiku küljest lahti trüpsiini abil (*Gibco*).

Kasutatud plastik on pärit firmalt *Greiner*.

Sekveneerimiseks kasutatud viirused

Sekveneerimiseks kasutati Kairit Tintsi poolt *plaque*-puhastatud ja paljundatud rekombinatoorsest viirusest eraldatud viirusvarusid (Tints, Magistritöö, 2005). Kõigi nende viiruste nsP1 valku kodeeriv ala oli eelnevalt sekveneeritud, ent sekundaarseid mutatsioone, mis võiks seletada viiruse paranenud kasvukiirust, ei olnud leitud. Sekveneerimiseks kasutati 16 erinevat viirust, mis olid kasvatatud kas 28°C või 37°C juures. Vastavate mutantsete viiruste genoomi sisse viidud esialgsed mutatsioonid on samad kui tabelites 1 ja 2 toodud viiruste esialgsed mutatsioonid. Allpool töös kasutatud numeratsioon on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Sekveneeritud genoomiga viiruste numeratsioon ja kirjeldus

Viiruse number	Kasvatamise temperatuur°C	Esialgne mutatsioon	Esialgse mutatsiooni positsioon
1-3	28	del3, CCC→Δ	418-420
4, 14	37	del3, CCC→Δ	418-420
5, 6	28	del7, RLSTCCC→Δ	414-420
7, 8	37	del7, RLSTCCC→Δ	414-420
9-13	28	3A, CCC→AAA	418-420
15, 16	37	3A, CCC→AAA	418-420

RNA eraldamine, pöördtranskriptsioon ja PCR

Totaalne RNA eraldati viirusvarudest *Nucleospin RNA II Kit* abil (*Macherey-Nagel*) vastavalt tootja protokollile. 100 µl viiruse preparaadist eraldatud RNA elueeriti 60 µl RNAasi vabas vees.

Pöördtranskriptsioon viidi läbi *Fermentase* cDNA sünteesimise kitiga. Jääl segati kokku restriksioonisegu, mis sisaldas 1.) 5 µl viiruse preparaadist eraldatud totaalset RNA-d 2.) 15-20 pmol järjestusspetsiifilist *antisense* praimerit 3.) DEPC (dietüülpürokarbonaat) töödeldud vett mahuni 11 µl. Segu inkubeeriti 70°C juures 5 minutit, seejärel jahutati jääl ning lisati 1 x transkriptsioonipuhvrit (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT), dNTP-d 1 mM lõppkontsentratsiooniga, 20 ühikut ribonukleaasi inhibiitorit (*RNasin*, *Promega*). Segu inkubeeriti 37°C juures 5 minutit. Seejärel lisati 40 ühikut pöördtranskriptaasi (*M-MuLV Reverse Transcriptase*, *Fermentas*). Reaktsioon viidi läbi 37°C juures 60 minuti jooksul ning see peatati, kuumutades 70°C juures 10 minutit.

Saadud cDNAd kasutati polümeraasi ahelreaktsioonis (PCR). Kokku kasutati PCR reaktsioonides kümnet unikaalset praimeritepaari, mis on ära toodud Lisas 1. Kasutatud reaktsioonimaht oli 25 µl. Segu sisaldas 1.) 5 µl eelmises etapis saadud cDNAd 2.) dNTP segu lõppkontsentratsiooniga 0,2 mM 3.) 0,4 µM kontsentratsiooniga *forward* praimerit 4.) 0,4 µM kontsentratsiooniga *reverse* praimerit 5.) 1x reaktsioonipuhvrit (10 mM Tris-HCl; pH 8,8; 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100) 6.) ühe ühiku polümeraasi *Dynazyme Pol II (Finnzymes)*. Vastav PCR reaktsiooni programm nägi välja järgmine. Esialgsele denaturatsioonile 95°C juures 5 minutit järgnes 30 tsüklit denaturatsiooni 95°C juures 30 sekundit, praimerite seondumine 30 sekundit (kasutatud temperatuur oli 5°C madalam väikseima seondumistemperatuuriga praimerit paardumistemperatuurist, Lisa 1) ning 1 minut ahela sünteesi 72°C juures (lõpptulemuseks olid ligikaudu 800 aluspaari pikkused produktid). Amplifikatsioonile järgnes lõplik süntees 72°C juures 10 minutit. PCR-i reaktsioonisegu puhastati *JetQuick PCR Purification Spin Kit (Genomed GmbH)* abil vastavalt tootja protokollile.

Sekveneerimine

Saadud produktid sekveneeriti kasutades *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit*'i (*Amersham Biosciences Biosciences*). Sekveneerimiseks viidi eelnevalt läbi sekveneerimisreaktsioon 10 µl mahus. Segus sisaldas 1.) 5ml puhastatud PCR produkti 2.) *Amersham Biosciences*'i poolt toodetud *premix*-i 4 µl 3.) 0,24 µM SFV - spetsiifilist praimerit 0,6 µl 4.) kaks korda destilleeritud vett 10 µl mahuni.

Järgnevalt viidi läbi 44 tsükliline amplifikatsioonireaktsioon: 30 sekundit denaturatsiooni 95°C juures, paardumine 15 sekundit (kasutatud temperatuur oli 5°C madalam väikseima seondumistemperatuuriga praimerit paardumistemperatuurist, Lisa 1) ning süntees 60°C juures 1 minut. Pärast jahutamist viidi läbi sadestamisreaktsioon. Selleks lisati igale proovile 0,27 M ammoniumatsetaat:dekstraan 2:1 segu (1,5 µl) ning 35 µl külma 96% etanooli. Segu segati ning asetati -20°C juurde 20 minutiks sadenema, seejärel fuugiti 4°C juures 20 minutit 15 500 g juures. Vedelik aspireeriti ning sade pesti 200 µl 70% külma etanooliga, fuugides 7 minutit 4°C juures. Supernatant eemaldati ning lahtiseid tuube kuivatati 37°C juures etanooli lõhna kadumiseni. Igale proovile lisati 3 µl formamiidi, suspendeeriti ning proovid viidi

kommertsiaalsele sekveneermisteenusele. Saadud järjestuste analüüsimiseks kasutati programmi *BioEdit*.

Kloneerimine

Plasmiidide paljundamiseks kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α . Rakke kasvatati Luria-Bertani (LB) söötmes (*Difco*), mis sisaldas 10 g/l trüptooni, 5 g/l pärmiekstrakti, 10 g/l NaCl ning ampitsilliini (Amp) lõppkontsentratsiooniga 100 μ g/ml. Bakterirakkude transformeerimiseks kasutati kuumaehmatuse meetodit.

Antud töös leitud mutatsioonid viidi pSFV1 Δ CCC-MCS-d1EGFP replikoni sisse unikaalseid restriksioonisaite kasutades. Reaktsiooni jaoks kasutati ligikaudu 2 μ g vektorit.

DNA restriksiooniks kasutati ligikaudu 2 μ g vektorit, firma *Fermentas* poolt toodetud ensüüme ja puhvreid. Lõigatud vektorite defosforüleerimiseks kasutati aluselist fosfotaasi (*CIAP*, *Roche*). Restriksiooniproduktide ligeerimiseks kasutati T4 DNA ligaasi (*Fermentas*). DNA puhastamiseks kasutati *Genomed GmbH* ja *Eppendorf GmbH* toodetud Kit'e vastavalt tootja instruktsioonidele. DNA kloonide õigsust kontrolliti restriksioonanalüüsi, PCR-i ja sekveneermise abil. DNA konstruktide paljundamiseks kasutati minipreparatsiooni aluselise lüüsi meetodit (Sambrook ja Russell 2001).

Kloneerimisel kasutati järgnevaid plasmiide:

pBluescript II SK+ (*Fermentas*) – Vektoris on *lacZ* geen, mis kodeerib beeta-galaktosidaasi N-terminaalset fragmenti. See võimaldab rekombinantide sini-valge testimise, kus inserdiga kloon annab IPTG ja X-Gal tingimustes kasvatades valge koloonia. Vektor sisaldab ka *bla* (ApR) geeni, mis kodeerib beeta-laktamaasi, mis annab ampitsilliiniresistentsuse.

pSFV1 Δ CCC-MCS-d1EGFP - pSFV1 vektor, mis sisaldab subgenoomse promooteri alt ekspresseeritavat d1EGFP valku (*Clontech*) ning nsP1 valgu 418-420 positsioonist on deleteeritud kolm Cys-i. Samuti sisaldab multikloneerimissaiti (MCS). Konstrueeritud dr. Inga Sarandi poolt.

pCG-nsP4 on pCG plasmiid, mis sisaldab SFV nsP4 geeni järjestust, mille N-terminaalsesse otsa on lisatud 3F12 saba (*tag*). Konstrueeritud dr. Eva Žusinaite poolt.

pSFV1-MCS-PAC - pSFV1 vektor, mis sisaldab subgenoomse promooteri alt ekspresseeritavat puromütsiini resistentsust tagavat PAC geeni ning tabelis 2 toodud mutatsioone nsP1 valku kodeerivas alas. Samuti sisaldab multikloneerimissaiti (MCS).

Rakkudesse poreerituna käitub replikonina. Konstrueeritud professor Andres Meritsa poolt. Lisaks on kasutusel samas konstruktis nsP2 valku kodeerivas alas mutant, kus 726. positsiooni Pro on asendatud Gly-ga mis on tähistatud kui PG (vastav mutant SIN viiruse kontekstis konstrueeritud Frolov ja teised poolt 1999). SFV konteksti viidud Kristi Tamme poolt (Tamm 2007, magistritöö).

PCR mutagenees

Leitud mutatsioonid viidi pCG-nsP4 plasmidi PCR mutageneesi abil. Selleks kasutati vastavaid praimereid:

EV *sense* 5`fosfaat-GTA TAC CTA TCC AGA AAT TAC CCA ACA GTG GCG TCG TAC CAG 3`

EV *antisense* 5`GTT GCA CGC TGC GAT TGC TAC ATC GGG G

LI *sense* 5`fosfaat-ATC ATA GCC ATG ACC ACC TTG GCG AGG GAC A

LI *antisense* 5`-GAT ACT TTT GCA GCC CTC TAC CTC ATA CCT AGA TGT TAG TGC TGC CAC

Segati kokku PCR`i segu, kus sisaldus 1.) *Phusion polymerase`i* ühe ühiku (*Finnzymes*) 2.) 0,2 mM lõppkontsentratsioonid dNTP segu 3.) *forward* praimerit lõppkontsentratsioonid 0,4 µM 4.) *reverse* praimerit lõppkontsentratsioonid 0,4 µM 5.) 1x reaktsioonipuhvrit (10 mM Tris-HCl; pH 8,8; 2 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100) 6.) pCG-nsP4 plasmidi 0,1 µg. Vastav PCR reaktsiooni programm nägi välja järgmine. Esialgsele denaturatsioonile 98°C juures 3 minutit järgnes 3 tsüklit: denaturatsioon 98°C juures 15 sekundit, praimerite seondumine 30 sekundit 68°C juures ning 5 minut ahela sünteesi 72°C juures. Seejärel 22 tsüklit: denaturatsioon 98°C juures 15 sekundit, ning 5 minut ja 30 sekundit ahela sünteesi 72°C juures. Amplifikatsioonile järgnes lõplik süntees 72°C juures 10 minutit. PCR-i reaktsioonisegu puhastati *JetQuick PCR Purification Spin Kit (Genomed GmbH)* abil vastavalt tootja protokollile. Seejärel eemaldati puhastatud produktist esialgne plasmid 5 ühiku *DpnI (Fermentas)* abil (*DpnI* lõikab metüleeritud ahela katki), seejärel tsirkulariseeriti saadud fragment T4 DNA ligaasi abil (*Fermentas*) ja transformeeriti *E.coli* DH5α rakkudesse.

Konstrukti õigsust kontrolliti restriksioonanalüüsi ja sekveneerimise abil. Valgu ekspressiooni COS7 rakkudes kontrolliti *Western blotting* meetodil.

Western blotting

COS 7 rakke kasvatati 60 mm Petri tassidel IMDM söötmes (*Gibco*). Tasse pesti 1x PBS-iga ning võeti plastiku küljest lahti trüpsiini abil. Seejärel fuugiti rakke 5 ml söötmes 5 minutit 200 g (*Eppendorf Centrifuge 5810 R*). Sööde aspireeriti ning asendati 250 µl IMDM söötmega, mis sisaldas 5 mM NaBes`i pH 7,3. Rakkudesse viidi elektroporatsiooni teel sisse 2 µg mutantset pCG-nsP4 DNA-d ja 50 µg lõhe spermi DNA-d *carrierina*. Rakkudele anti üks pulss 180 V ja 995 µF juures. Seejärel asetati tassid 48 tunniks 37°C juurde kasvama. Seejärel sööde aspireeriti, rakud pesti kolm korda 1x PBS-iga ja lüüsi 60 µl 1x *Laemml*i lüüsilahusega (50 mM TrisHCl, 100 mM DTT, 2% naatrium-dodetsüülsulfaat (SDS), 0,1% broomfenoolsinine, 10% glütserooli) ning koguti 1,5 ml tuubi. Segu kuumutati 100°C juures 5 minutit ning kanti 12% SDS-polüakrüülamiidgeelile. Valgud kanti üle nitrotselluloosfiltrile (*Amersham Biosciences, Hybond ECL*) kasutades poolkuiva ülekandemeetodit ja “Bio-Rad Instruments” aparati. Ülekanne toimus 30 minuti jooksul ülekandepuhvril (48 mM Tris; 39 mM Gly; 0,037% SDS; 20% etanool) pingega 12V.

Filter blokeeriti üleöö 4°C juures 5% lõssipulbri lahuses (5% lõssipulber; 1x PBS; 0,1% Tween20). Järgnevalt inkubeeriti filtrit peroksüdaasiga konjugeeritud 5E11 antikehaga lahjenduses 1: 5000 üks tund 2,5% lõssipulbri lahuses (2,5% lõssipulber; 1x PBS; 0,1% Tween20) ja seejärel pesti 3x 10 minutit pesulahuses (50 mM TrisHCl; 0,1% Tween20). Signaal detekteeriti, kasutades ECL Kit`i (*Amersham Biosciences Pharmacia Biotech*) röntgenfilmile eksponeerimist.

RNA sünteesi analüüsi jaoks kasutatud viirused ja plasmiidid

Rekombinantsete viiruse saamiseks kasutati Kairit Tintsi poolt konstrueeritud SFV infektsioonilist komplementaarset DNAd (*icDNA*) sisaldavaid plasmide, mutandi del7 *icDNA* on konstrueeritud Inga Sarandi poolt. SFV - 6D puhul kasutati valmis viiruse preparaati, mis oli saadud Tero Ahola grupi käest (vastava mutantse viiruse esmakordne

mainimine Ahola ja teised 2000, mutatsiooni valgu tasemel kirjeldatud Laakkonen ja teised 1996). Viirused ning nende erinevused esialgsest viirusest on ära toodud alljärgnevas tabelis 2.

Tabel 2. SFV nsP1 mutantsed viirused (Mugandatud Kairit Tintsi magistritööst).

Nimetus	Nimetus artiklis (Lisa 4)	Esialgne mutatsioon nsP1 valgus	Esialgse mutatsiooni positsioon	Sekundaarse mutatsiooni positsioon	Aminohappe muutus	Nukleotiidi muutus	Päritolu
6D	-	CCC→AAA	418-420				Soome
del3-1	M124V + A197D	CCC→Δ	418-420	455-457 675-677	Met→Val Ala→Asp	A→G C→A	Eesti
del3-2	ΔG244 + T352S	CCC→Δ	418-420	1139-1141 755-757	Thr→Ser Leu, Gly→Glu	A→T ΔCCG	Eesti
3A-1	P181Q	CCC→AAA	418-420	632-634	Pro→Gln	C→A	Eesti
3A-2	L234F	CCC→AAA	418-420	785-787	Leu→Phe	G→T	Eesti
3A-3	Q357L	CCC→AAA	418-420	1154-1156	Gln→Leu	A→G	Eesti
del7	-	RLSTCCC→Δ	414-420				Eesti

RNA *in vitro* transkriptsioon

Transkriptsiooni alustamiseks lineariseeriti 2-3 µg soovitud icDNAd (infektsiooniline cDNA) *BcuI* abil (*Fermentas*). Seejärel puhastati DNA *JetQuick PCR Purification Spin Kit*-iga (*Genomed*) ning elueeriti 30 µl sooja, dietüülpürokarbonaadiga (DEPC) töödeldud, veega.

Jääl segati kokku transkriptsioonisegu, mis sisaldas lõppkontsentratsioon 1.) rNTP segu (1 mM rATP, rCTP, rUTP ja 0,5 mM rGTP; *Promega*) 2.) 5 mM ditiotreitooli (DTT) 3.) 1x bakteriofaag SP6 RNA polümeraasi puhvrit (400 mM Hepes-KOH pH 7,4, 60 mM MgOAc, 20 mM spermidiin-HCl) 4.) 1mM *Ribo m⁷GpppG Cap Analog*'i (*Promega*) 5.) DEPC töödeldud vett reaktsioonisegu mahu viimiseks 50 µl-ni. Transkriptsioonisegu inkubeeriti 5 minutit jääl, seejärel lisati lineariseeritud DNA, 50 ühikut *Recombinant RNasin Ribonuclease*

Inhibitor-it (*Promega*) ja 30 ühikut SP6 RNA polümeraasi (*Promega*). RNA süntees toimus 90 minuti jooksul 37°C juures. Saadud RNA olemasolu (tavaliseks saagiseks oli ligi 50 µg) kontrolliti geelelektroforeesil agarosgeelil.

Viirusvarude saamine

100 mm läbimõõduga tassidel kasvatatud 75-95% konfluentseid BHK-21 rakke pesti 1x PBS-iga (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,8 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4). Rakud eemaldati plastiku küljest trüpsiini toimele, koguti GMEM söötmesse ning fuugiti 200 g juures 20° C juures (*Eppendorf Centrifuge* 5810 R), 5 minuti jooksul. Seejärel sööde eemaldati ning rakud resuspendeeriti 800 µl külmas PBS lahuses. Rakud viidi koos eelnevalt *in vitro* transleeritud RNA-ga elektroporatsiooni küvettidesse (*BioRad*), 850 V ning 25 µF juures anti rakkudele kaks pulssi (*BioRad Gene Pulser Xcell*). Kohe selle järel viidi rakud tassidele, millele oli eelnevalt lisatud 5-15 ml GMEM söödet. Rakke inkubeeriti 37°C juures 24 tundi. Seejärel sööde koguti ning filtreeriti läbi 0,2 µm poori läbimõõduga filtri (*Filtropur, Sarstedt*) ning saadud esmast viirusvaru säilitati -70°C.

Viirusvarude plaque-titreerimine

Saadud primaarsed viirusvarud titreeriti *plaque*-tiitrimise meetodil. 35 mm läbimõõduga tassidel kasvatati BHK-21 rakke nii, et rakud hõlmasid tassi pinnast 95-100%. Uuritavatest viirusvarudest tehti mitmed lahendused, rakke nakatati 200 µl mahus seerumivabas GMEM söötmes. Tasse loksutati iga 10 kuni 15 minuti möödumisel ühe tunni jooksul. Tunni pärast aspireeriti viirusega sööde ning asendati 0,8% lõppkontsentratsiooniga karboksümetüülselluloosi (CMC) ja 2% seerumit (FCS) sisaldava GMEM söötmega. Rakke inkubeeriti 37°C juures kaks ja pool päeva. Seejärel sööde aspireeriti ning tasse värviti kristallviolett sisaldava lahusega (0,25% kristallviolett (*Merck*), 1,85% formaldehüüd, 10% etanool, 35 mM trishüdroksümetüül-aminmetaan (Tris), 0,5% CaCl₂) 40 minutit. Seejärel pesti tasse jooksva sooja veega ning loendati lüüsilaigud ehk *plaque* id. Tiiter arvutati viiruse erinevate lahjenduste poolt tekitatud lüüsilaikude arvu kasutades.

RNA sünteesi analüüs

35 mm läbimõõduga petri tasse töödeldi ühe tunni jooksul 0,1 mg/ml polü-D-Lys-iga (*Sigma*). Seejärel polü-D-Lys eemaldati ning tassidele plaaditi BHK-21 rakud. Rakke kasvatati 24

tundi, seejärel loendati 0,9-1,9 miljonit rakku. Sööde aspireeriti, rakke pesti 1 ml PBS-iga ning nakatati 200 µl seerumivabas söötmes tund aega vastava viirusega, tase iga 10 kuni 15 minuti tagant loksutades. Ühe raku kohta võeti 10 infektsioosset viiruspartiklit (*multiplicity of infection*, MOI 10). Seejärel viirust sisaldav sööde aspireeriti ning asendati 2,5 ml 5% söötmega, mis sisaldas 2 µg/ml antibiootikumi aktinomütsiin D (inhibeerib rakulist RNA sünteesi, *Sigma*). Tunni aja pärast lisati tassidele 500 µl söödet, mis sisaldas 2 µg/ml antibiootikumi aktinomütsiin D ja 5 µCi ($5\text{-}^3\text{H}$) uridiini (*Amersham Biosciences*). 2, 3.5, 5, 6.5 ja 8 tunni pärast, s.o. 4, 5.5, 7, 8.5 ja 10 tundi pärast infektsiooni aspireeriti sööde ning rakud lüüsi 400 µl 1% SDS abil. Lüsaati kuumutati 65°C juures 5 minutit, lisati 1 ml 14% TCA-d (lõppkontsentratsioon 10%) ning sadestati jääl 1 tund. Lüsaat filtreeriti läbi 25 mm *Whatman* i filtrite (*Schleider&Schuell*) kasutades *Millipore* vaakumfiltratsiooni aparatuuri. Filter tehti märjaks 1 ml 10% TCA-ga, seejärel kanti filtrile proov ning pesti filtrit kaks korda 10 ml 5% TCA-ga ning üks kord 5 ml 96% etanooliga. Filtrid kanti üle sintsilatsioonituubidesse ning kuivatati 65°C juures etanooli lõhna kadumiseni. Seejärel kanti filtrile 4 ml sintsilatsioonilahust, segati ning inkubeeriti üleöö pimedas. Järgmisel päeval detekteeriti nukleinhappesse lülitunud radioaktiivse uridiini hulka sintsillaatoriga *WinSpectral 1414 Liquid Scintillation counter* (*Wallac*).

Replikonide tsütotoksilisuse mõõtmine

Tabelis 2 näidatud mutatsioone sisaldavatest viirustest kloneeriti vastavad mutatsioonid puromütsiini resistentsust tagavasse pSFV1-MCS-PAC replikoni (Lisa 2). $1 \cdot 10^6$ BHK (*Baby hamster kidney*) rakku elektroporeeriti 5 µg *in vitro* sünteesitud RNA-d nagu kirjeldatud eespool. Seejärel külvati neist $1,25 \cdot 10^5$ rakku 15 mm tassidele ning lubati GMEM söötmes 3 tunni jooksul plastikule kinnituda. Rakud trüpsiniseeriti 100 µl mahus ning neile lisati 50 µl trüpaansinist värvi (*Flow Laboratories*). 10 µl segust kanti üle loenduskambrisse (*Bürker*) ning loendati elusate rakkude arv. 6 tundi pärast transfektsiooni lisati rakkudele puromütsiini lõppkontsestratsioon 10 µg/ml. Selektiooni jätkati 90 tunni jooksul, iga kahe päeva tagant söödet vahetades. Erinevatel ajapunktidel loendati elusrakkude arv - rakud trüpsiniseeriti 100 µl mahus ning neile lisati 50 µl trüpaansinist värvi (*Flow Laboratories*). 10 µl segust kanti üle loenduskambrisse (*Bürker*) ning loendati elusate rakkude arv.. Katset korrati kolm korda.

Teises lähenduses külvati poratsioonisegust $1 \cdot 10^5$ rakku 35 mm tassile, lubati kinnituda 6 tunni jooksul plastikule ning seejärel alustati puromütsiini selektsiooniga. Eelnevalt on näidatud, et vähem tsütotoksilised replikonid on võimelised tekitama puromütsiini selektsioonis kolooniaid (Frolov ja teised 1999). Seleksiooni jätkati 8 päeva, söödet kahe päeva tagant vahetades. Kaheksandal päeval värviti tassid kristallvioletiga ning hinnati kolooniate tekitamise võimet.

Kolmandas lähenduses külvati $8 \cdot 10^3$ vastava replikon-RNA-ga poreeritud rakku 6 mm läbimõõduga Elisa plaadile ning lubati 100 μ l GMEM söötmes 6 tundi kinnituda. Rakke inkubeeriti puromütsiini selektsioonis 18 kuni 72 tundi. Seejärel lisati 10 μ l rakkude proliferatsiooni taset mõõtvat reagenti WST-1 (*Roche*) vastavalt tootja juhendile. Segu inkubeeriti 37°C juures kõrge niiskuse keskkonnas ja kõrges CO₂ kontsentratsioonis pool tundi. Seejärel segu segati 1 minut ning mõõdeti absorptsioon 440 nm juures (*Sunrise Remote, Tecan*). Kontrolltassil sooritati sama analüüs vahetult enne puromütsiini selektsiooni alustamist. Mõõtmisi sooritati erinevatel ajapunktidel. Katset korrati kolm korda.

Statistiline analüüs

Statistiliseks analüüsiks kasutati paardumata t-testi (*unpaired t-test*), analüüsiks kasutatud programm asub aadressil <http://graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>. Kahe võrreldava väärtuste seeria vaheline erinevus loeti tõestatuks, kui vastav tõenäosus (p-väärtus) oli alla 0,05.

2.3 Tulemused

Eraldatud viiruste kloonide sekveneerimine

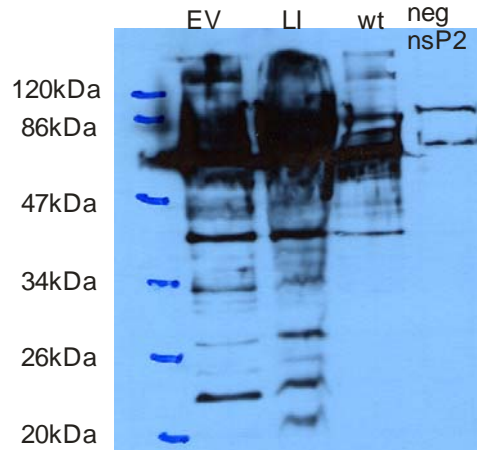
Käesolevas töös sekveneeriti 16 erinevat SFV kloonid kasutades kümme erinevat praimeritepaari. Mutatsiooniks loeti muutust, mis esines päri- ja vastusuunalise praimeriga sekveneerimisel kahel individuaalsel korral ning muutis viirusvalgu aminohappelist järjestust. Läbiviidud analüüsi tulemusena tuvastati kaks mutatsiooni, mis leiti vastavalt kloonis 2 ja kloonis 3 (Tabel 1 ja tabel 3). Mõlemad kloonid, kust mutatsioon leiti, olid puhastatud 28°C juures kasvatatud viirusest. Mõlemal juhul oli säilinud esialgne mutatsioon deleteeritud Cys-idega positsioonides 418-420. Sekundaarne mutatsioon paiknes nendes kloonides nsP4 kodeerivas alas. Seda tulemust võis pidada loogiliseks, sest eelnevalt on näidatud, et alfaviiruste nsP1 ja nsP4 interageeruvad omavahel (Kujala ja teised 2001, Salonen ja teised 2003) ning muudatused nsP1 valgus võivad funktsionaalse replikatsioonikompleksi moodustumiseks vajada kompensatoorset muutust nsP4 valgus. Ülejäänud kloonides mittestruktuurseid valke kodeerivas alas sekundaarseid mutatsioone ei tuvastatud.

Tabel 3. Tuvastatud mutatsioonide asukohad

Klooni number ja uus nimetus	Esialgne mutatsioon	Asukoht nsp1 valgus	Sekundaarne mutatsioon	Asukoht (Nukleotiidi-jääk)	Sekundaarse mutatsiooni aminohappeline muutus
2 EV	CCC→Δ	418-420	GAA→GTA	5918	E→V
3 LI	CCC→Δ	418-420	CTC→ATC	7286	L→I

EV ja LI mutatsioonid viidi kõigepealt PCR mutageneesi tulemusena sisse pCG-nsP4 plasmidi. Muteeritud nsP4 valgus ekspressiooni COS 7 rakkudes kontrolliti *Western blotting* meetodil (Joonis 7).

Nagu on jooniselt näha, toimub mutatsioone sisaldavate plasmiididega transformeeritud rakkudes nsP4 süntees ja hoolimata mutatsioonidest nsP4 alas sünteesitakse COS 7 rakkudes normaalse suurusega valke. Seega on PCR mutageneesi tulemusel saadud kloonid järgneval replikon-vektorite konstrueerimisel kasutatavad.



Joonis 7. pCG-nsP4-EV ja pCG-nsP4-LI ekspressioonianalüüs COS7 rakkudes. EV, LI ja WT on pCG-nsP4 plasmiidid, mis ekspresseerivad mutantset või intaktset nsP4 valku. Negatiivseks kontrolliks on nsP2 valku ekspresseeriv pCG plasmiid. NsP4 on 68kDa ning nsP2 86 kDa.

Unikaalseid restriksioonisaite kasutades viidi leitud mutatsioonid, mida tähistati kui EV ja LI, pSFV1 Δ CCC-MCS-d1EGFP replikoni (Lisa 2). Saadud rekombinantsete replikonide õigsust kontrolliti sekveneerimise abil. Korrektsed vektor-plasmiidid lineariseeriti, sünteesiti *in vitro* RNA ning poreeriti see BHK-21 rakkudesse. 28°C ja 37°C juures sooritatud immuunofluorestsents ja FACS analüüsi tulemused näitasid, et nii konstrueeritud EV ja LI replikon kui ka esialgne kolme deleteeritud Cys-iga replikon on temperatuuritundlikud ning ei suuda 37°C juures kasvada (Lisa 3). Seega on leitud mutatsioonid funktsionaalselt neutraalsed. Kahjuks ei olnud keegi eelnevalt kontrollinud ainult esialgset del3, 3A või del7 mutatsiooni sisaldavate replikonide paljunemisvõimet 28°C juures. Teostatud katsest järeldus, et del3 mutatsiooni sisaldav replikon on temperatuuritundlik (Lisa 3) ja kuigi sama katset ei korratud teiste eelpoolmainitud replikonidega, on del3 ja 3A mutatsioone sisaldavate viiruste replikatsioonivõime üsna sarnane (Žusinaite ja teised 2007), mistõttu on loogiline oletada, et ka 3A mutatsiooni sisaldaval replikonil on temperatuuritundlik fenotüüp. Seega pole 28°C juures eraldatud kloonid tekkinud selektsioonilise surve tagajärjel ning leitud mutatsioonid peaksid kajastama replikatsiooni käigus RNA polümeraaside poolt tehtud vigu. Mõnevõrra ootamatu on vaid see, et LI ja EV replikonidest leitud kahe mutatsiooni puhul on tegemist *sense*-mutatsioonidega, millega kaasneb aminohappejäägi muutus. Leu asendusega Ile-ks ei kaasne ei laengu ega ka polaarsuse muutust, mistõttu antud mutatsiooni neutraalne olemus nsP4 valgu jaoks, mis on alfaviiruste kõige konserveerunud valk, on mõistetav. Glu muutusega Val-iks kaotatakse aga nii vastavas positsioonis paikneva aminohappejäägi laeng

kui ka polaarsus. Jääb arusaamatuks, kuidas nsP4 valk talub oma N-terminaalses alas sellist muudatust, ja seda ilma nähtava fenotüübilise efektita.

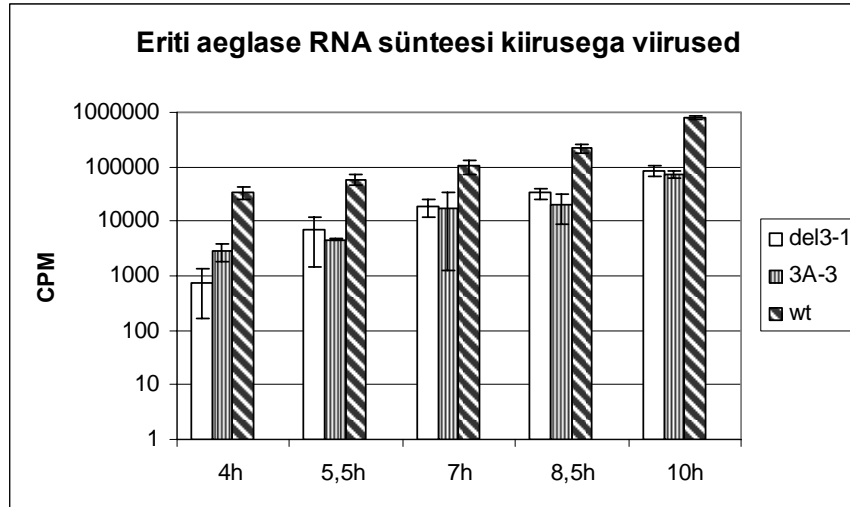
Kuna uurimistöö eesmärgiks oli aga leida mutante, mis oleksid potentsiaalseteks geeniteraapia vektoriteks, jäeti antud mutandid edasisest uuringust välja.

RNA sünteesi analüüs

Uurimisgrupis läbi viidud analüüsi tulemusena oli võimalik tuvastada efektid, mis tulenesid nsP1 defekte kompenseerivatest mutatsioonidest (Lisa 4, Žusinaite ja teised 2007). Põhilised mõjud on halvenenud replikatsioonivõimega viiruste replikatsioonivõime taastamine, nsP1 ja nsP4 vaheliste interaktsioonide taastamine ning enamasti ka nsP1 valgu taastatud lokaliseerimine rakus filopoodiumi-laadsetes niitjates struktuurides. Viimane neist erines tugevalt mutantide vahel, mille replikatsioonivõimes ei suudetud tuvastada erinevusi. Seetõttu, tuvastamiseks erineva rakusisese nsP1 lokaliseerimise võimalikku põhjust ja tagajärgi, oli oluline uurida rekombinantsete viiruste bioloogilisi omadusi. Antud küsimuse selgitamiseks uuriti viiruse RNA sünteesimise kiirust muteerunud viirustega nakatatud rakkudes ja antud mutatsioone sisaldavate replikonide mõju tsütotoksilisusele nakatatud rakkudes.

Viiruse RNA sünteesi uurimiseks nakatati rakke tabelis 2 toodud mutantsete ja originaalse SFV viirusega ning inhibeeriti rakulise RNA sünteesi, nagu kirjeldatud ülalpool. Rakulise RNA sünteesi inhibeerimine oli vajalik selleks, et olla kindel, et analüüsitakse viiruse RNA sünteesi seda, spetsiifiliselt raku RNA-dest eraldades. Saadud tulemused näitasid, et rekombinantsete viirused jagunevad kolmeks grupiks: 1.) eriti aeglase RNA sünteesi kiirusega viirused (Joonis 8), 2.) aeglase RNA sünteesi algusega viirused (Joonis 9), 3.) keskmise RNA sünteesi kiirusega viirused (Joonis 10).

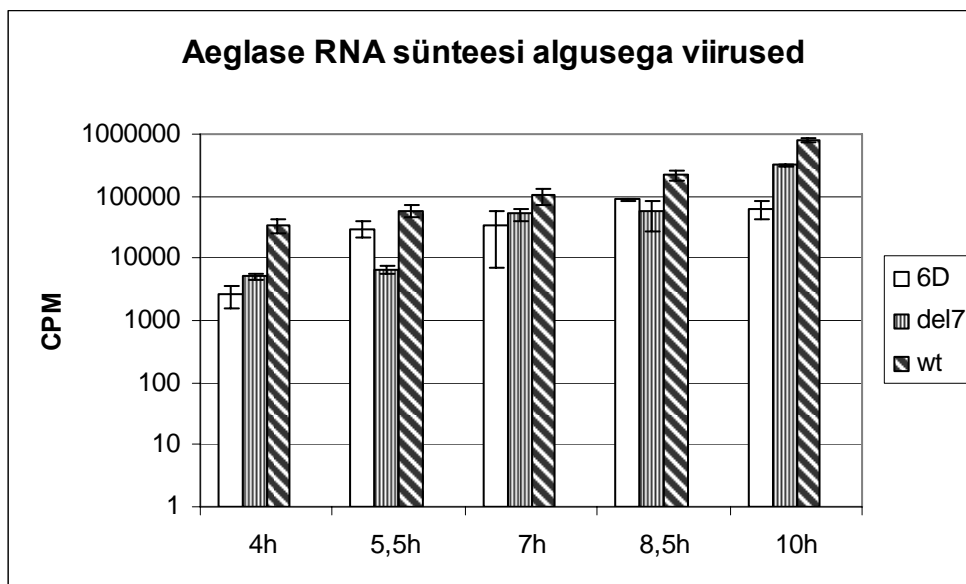
Eriti aeglase RNA sünteesi kiirusega viiruste gruppi kuulub kaks viirust – del3-1 ja 3A-3. Esimene neist (Joonis 8) jääb metsik-tüüpi viiruse RNA sünteesi kiirusele 4 tundi pärast infektsiooni alla 40 korda, teine 10 korda. Ilmselt ei ole nendesse mutantidesse sisestatud sekundaarsed mutatsioonid piisavalt mõjusad, et täielikult muuta esialgset temperatuuritundlikku fenotüüpi ning sellega on seletatav ka esialgne äärmiselt suur mahajäämus RNA sünteesi kiiruses. Kümnest infektsioonijärgse tunni lõpuks on mutant del3-1 poolt sünteesitava RNA kogus võrreldav mutant 3A-3 poolt sünteesitava RNA kogusega, vahe metsik-tüüpi viirusega võrreldes on aga endiselt kümnekordne.



Joonis 8. Mutantsete eriti aeglase RNA sünteesi kiirusega viiruste RNA sünteesi kiirus võrrelduna mutatsioonideta viiruse RNA sünteesi kiirusega. Tulemused on esitatud 1,7 miljoni raku kohta logaritmilises skaalas. Petri tasse töödeldi ühe tunni jooksul polü-D-Lys-iga ning BHK-21 rakud plaaditi. Rakke kasvatati 24 tundi, seejärel loendati 0,9-1,9 miljonit raku ning nakatati tund aega vastava viirusega. Ühe raku kohta võeti 10 infektsioosset viiruspartiklit (MOI 10). Seejärel lisati 2 µg/ml antibiootikumi aktinomütsiin D (inhibeerib rakulist RNA sünteesi) sisaldav sööde. Tunni aja pärast lisati tassidele 5 µCi ($5\text{-}^3\text{H}$) uridiini. 2, 3,5, 5, 6,5 ja 8 tunni pärast rakud lüüsi 400 µl 1% SDS abil. Lüsaati kuumutati 65°C juures 5 minutit, lisati 1ml 14% TCA-d (lõppkontsentratsioon 10%) ning sadestati 1 tund jääl. Lüsaat filtreeriti läbi filtrite. Filter märgati 1 ml 10% TCA-ga, seejärel kanti peale proov ning pesti kaks korda 5% TCA-ga ning üks kord 5 ml 96% etanooliga. Filtrid kanti üle sintsilatsioonitubidesse ning kuivatati. Filtrile kanti sintsilatsioonilahus ning inkubeeriti üleöö pimedas. Järgmisel päeval detekteeriti nukleiinhappesse lülitunud radioaktiivse uridiini hulk sintsillaatoriga. Esitatud on keskmiselt kolme katse keskmised tulemused koos standardhälbega.

Aeglase RNA sünteesi algusega viiruste hulka (Joonis 9) kuuluvad 6D ja del7 mutandid, millest esimesel on asendatud Cys-id positsioonides 418-420 Ala-dega (Ahola ja teised 2000, Laakkonen ja teised 1996) ning teisel on deleteeritud seitsme aminohappe pikkune ala koos palmitüleeritavate Cys-idega (Tabel 2). Kummastki neist pole eraldatud sekundaarseid kompensatoorseid mutatsioone, mis 6D puhul kindlasti eksisteerivad, sest selle viiruse puhul on tegemist vähemalt teisese viirusvaruga. Esialgne 6D mutatsioon on valgu tasemel identne 3A mutatsiooni sisaldava viiruse mutatsiooniga, ent erineb koodonkasutus 418-420. positsioonis paiknevate Ala-de jaoks. Sekundaarsete mutatsioonide olemasolu 6D mutatsiooni sisaldavas viiruses on põhjuseks, miks vastav viirus üldse replitseeruda suudab. Oluline on ka märkida, et selle viiruse saamisel ei ole kasutatud *plaque*-puhastamise meetodit, mistõttu viirusvaru kujutab endast erinevate mutantsete genoomide kogumit. Esialgne RNA sünteesi

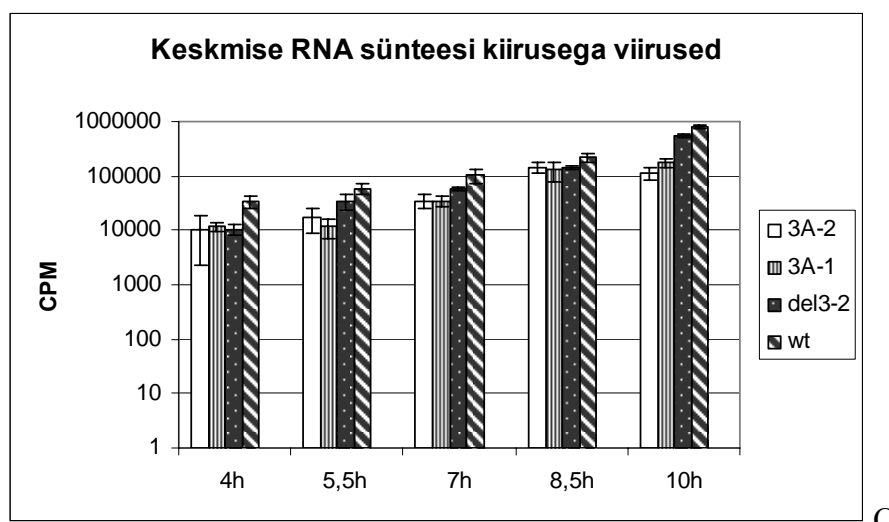
tasemete vahe metsik-tüüpi viirusega võrreldes on 6D ja del7 mutantsete viiruste puhul vastavalt ligikaudu kolmeteistkümne- ja viiekordne ja kümnendaks infektsioonijärgseks tunniks on kümne- ja kolmekordne. Seega del7 paigutamine sellesse gruppi kahe ja kümnenda tunni ajapunkti põhjal on mõnevõrra tinglik, kuid arvesse tuleb võtta ka seda, et viis ja pool tundi pärast infektsiooni ületab mutandi 6D poolt sünteesitud RNA hulk mutant del7 poolt sünteesitavat RNA hulka, kusjuures mõlemad jäävad metsik-tüüpi viiruse RNA sünteesi kiirusele alla. Seega del7 RNA sünteesi tase esimeses ja viimasel ajapunktis võrreldes metsik-tüüpi viiruse RNA sünteesi tasemega eriti ei muutu, ent mingi põhjusel mutandi vahepealne RNA sünteesi kiirus 5.5 ja 7 infektsioonijärgse tunni vahel suureneb, siis taas pidurdub ning sünteesitud RNA hulk ei muutu kahe järjestikkuse ajapunkti jooksul peaaegu üldse. Suhteliselt sarnane on ka mutandi 6D RNA sünteesimise profiil. Algsele mahajäämusele järgneb kiire RNA sünteesi faas 4. ja 5.5. tunni vahel, see kiirendus toimub veidi varem kui mutandi del7 puhul. Tõusule järgneb faas, kus RNA sünteesi tase muutub vähe ning mahajäämus metsik-tüüpi viiruse RNA sünteesi kiirusest suureneb taas. Seega on mõlemale selle grupi liikmele iseloomulik esialgne mahajäämus RNA sünteesi kiiruses võrreldes metsik-tüüpi viiruse RNA sünteesimise kiirusega, järgnev järsk hüpe sünteesiaktiivsuses ning seejärel taas järsk pidurdumine.



Joonis 9. Mutantsete aeglase RNA sünteesi algusega viiruste RNA sünteesi kiirus võrrelduna mutatsioonideta viiruse RNA sünteesi kiirusega. Legend sama mis joonise 8 puhul.

Keskmise RNA sünteesi kiirusega viirusteks on 3A-2, 3A-1 ja del3-2. Kõigi nende puhul on esialgne mahajäämus RNA sünteesi kiiruses võrreldes metsik-tüüpi viirusega ligikaudu kolmekordne. 3A-2 puhul paisus see vahe kümnendaks infektsioonijärgseks tunniks seitsmekordseks, 3A-1 puhul viiekordseks. On näha, et kuigi mainitud mutantide esialgne RNA sünteesi kiirus oli võrreldav metsik-tüüpi viirusega ning 8,5 tunni järel praktiliselt eristamatu (statistiline erinevus puudus), ei osutunud lõpuks kõik antud gruppi kuuluvad mutantsed viirused siiski viiruse RNA paljundamise seisukohalt nii efektiivseteks kui metsik-tüüpi viirus. Üllatajaks oli del3-2, mille RNA sünteesi kiirus peaaegu kõigis ajapunktides oli metsik-tüüpi viiruse RNA sünteesi kiirusest praktiliselt eristamatu. Kümnendaks infektsioonijärgseks tunniks oli vahe metsik-tüüpi viiruse ja del3-2 mutandi vahel kõigest kahekordne. Seega iseloomustab selle grupi mutante suhteliselt ühtlane RNA sünteesimise kiirus, milles puuduvad või on oluliselt vähem eristatavad kiired RNA sünteesimise kiiruse tõusud ja langused. Selle poolest sarnaneb antud grupi liikmete RNA sünteesimise kiirus mutantidest kõige enam metsik-tüüpi viiruse RNA sünteesimise kiirusega. Samuti on RNA sünteesimise kiiruse aeglustumine hilisem, nagu mutantide 3A-2 ja 3A-1 puhul, või puudub hoopis, nagu mutandi del3-2 puhul.

Seega tuvastati uuritud mutantidel kolm erinevat RNA sünteesimise profiili. Vajalikud on täpsemad uuringud, mis näitaksid, missuguste RNA vormide süntees (genoomne, subgenoomne) on suuremal määral mõjutatud.



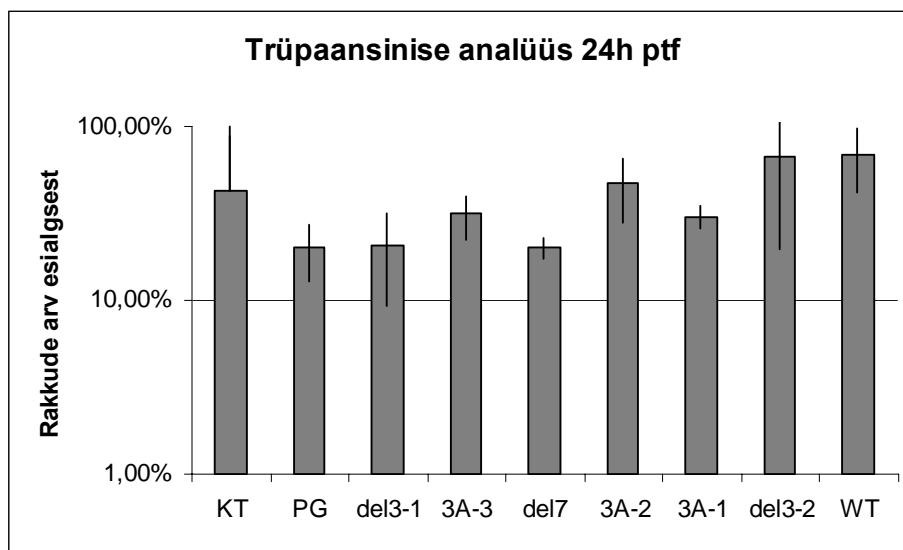
Joonis 10. Mutantsete keskmise RNA sünteesi kiirusega viiruste RNA sünteesi kiirus võrrelduna mutatsioonideta viiruse RNA sünteesi kiirusega. Legend sama, mis joonise 8 puhul.

Võrdlusele viirusega, millel puudus mutatsioon nsP1 alas, selgus, et statistiliselt olulised ei olnud erinevused ainult mutantide 3A-1 ja 3A-2 puhul 8.5 tunni ajapunktis ja del3-2 puhul 5.5, 7 ja 8.5 tunni ajapunktis. Kõik antud mutandid paigutuvad keskmise RNA sünteesi kiirusega viiruste gruppi.

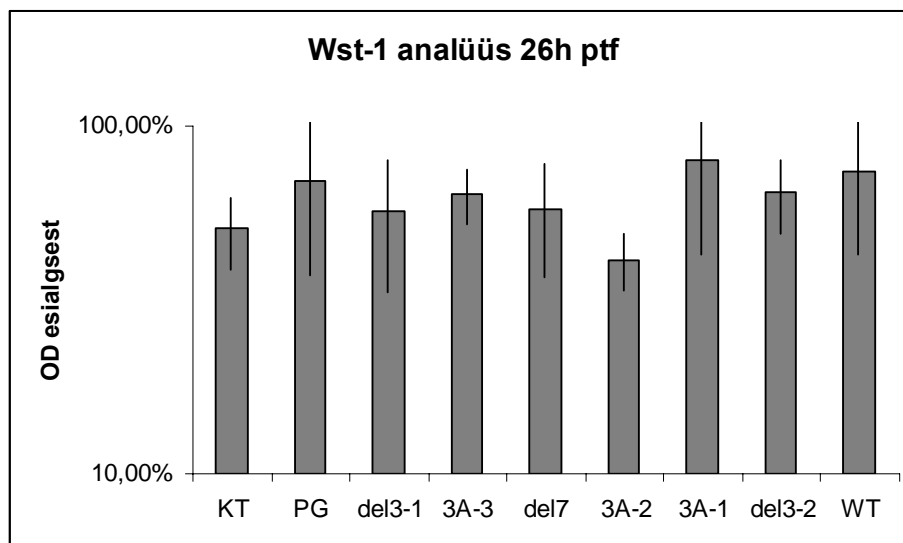
Replikonide tsütotoksilisuse mõõtmine

Esialgseid mutatsioone ja sisseviidud kompensatoorseid mutatsioone sisaldavate replikonide tsütotoksilisuse mõõtmiseks kasutati kolme erinevat meetodit, mis kõik sisaldasid puromütsiini selektsiooni alates 6. transfektsioonijärgsest tunnist. Esimene meetod hõlmas puromütsiini sisaldavas söötmes kasvavate rakkude arvu loendamist trüpaansinise abil, mis värvib surnud rakke. Selle meetodi puhul on probleemiks tulemuste stabiilsuse saavutamine, seda eelkõige loendamise suhtelisuse tõttu, mistõttu ei olnud erinevates ajapunktides kogutud info põhjal võimalik ühtset tõusvat, laskuvat või stabiilset kõverat tekitada, kuigi katsed korraldati mitmeid kordi. Joonisel 11 A on kujutatud 24. infektsioonijärgsel tunnil loendatud rakkude arv võrreldes nende rakkude arvuga, mis loendati enne puromütsiini selektsiooni. Nagu näha, ei erine ükski kasutatud konstruktidest oluliselt kontrollrakkudest, mis iseenesest üsna kiiresti puromütsiini selektsioonis surema peaksid. Üllatuseks oli ka SFV1-PG mutandi suur suremus, sest eelnevalt on näidatud selle mutatsiooni tsütotoksilisust vähendavat toimet (Tamm 2007, magistritöö ja Frolov ja teised 1999).

Seetõttu kontrolliti järgnevalt replikonide võimet rakkudesse transfekteerituna põhjustada kolooniate tekitamist, mida seni oli täheldatud mittetsütotoksiliste mutantide puhul. Kolooniad saavad tekkida ainult siis, kui rakkudes on ekspresseeritud replikonides sisalduv PAC-geen ning kui vastav replikon ei ole rakkudele tsütotoksiline. Ainus konstrukti, mis suutis läbiviidud katses kolooniaid tekitada, oli SFV1-PG mutatsiooni sisaldav replikon, mis näitab, et selle mutandi puhul on kolooniate moodustamiseks vajalikud tingimused täidetud. SFV1-PG selline võime oli kooskõlas kirjanduses SFV sugulasviiruse SIN kohta avaldatud andmetega (Frolov ja teised 1999). Ükski teine konstrukti kolooniaid 8 päeva jooksul ei tekitanud. See näitab, et vähemalt üks kolooniate tekitamise tingimustest pole antud replikonide puhul täidetud. Tõenäolisem tundub, et on säilitatud tsütotoksilised omadused, kuigi spetsiifiliselt ei kontrollitud replikonide võimet PAC-valku ekspresseerida. PAC-järjestuse olemasolu replikonis kontrolliti sekveneerimisega.



A



B

Joonis 11. Mutantsete replikonide tsütotoksilisuse määramine. $1 \cdot 10^6$ BHK raku poreeriti $5 \mu\text{g}$ *in vitro* sünteesitud replikon-RNA-d. Neist külvati A.) $1,25 \cdot 10^5$ raku 15 mm tassidele ning lubati kinnituda. 6 tundi pärast transfektsiooni lisati rakkudele puromütsiini lõppkontsestratsioonis $10 \mu\text{g/ml}$ ning inkubeeriti 18 tundi. Rakud trüpsiniseeriti ning neile lisati trüpaansinist, segu kanti üle loenduskambrisse ning loendati elusate rakkude arv. Esitatud on kolme katse keskmine elusrakkude arv 24 tundi *post transfection*. 100% on loetud sama katseskeemi järgides enne puromütsiini selektsiooni analüüsitud tassidelt saadud tulemused. B.) $8 \cdot 10^3$ raku 6 mm läbimõõduga Elisa plaadile ning lubati kinnituda. 6 tundi pärast transfektsiooni lisati rakkudele puromütsiini lõppkontsestratsioonis $10 \mu\text{g/ml}$ ning inkubeeriti 20 tundi. Seejärel lisati reagenti WST-1 vastavalt tootja instruktsioonile. Segu inkubeeriti pool tundi, seejärel segati 1 minut ning mõõdeti absorptsioon 440 nm juures. Katset korrati kolm korda. 100% on loetud sama katseskeemi järgides enne puromütsiini selektsiooni analüüsitud tassidelt saadud tulemused.

Kolmandaks kontrolliti replikonide tsütotoksilisust, kasutades rakkude proliferatsiooni taset mõõtvat Wst-1 süsteemi. Tegemist on ühendiga, mis lõigatakse rakuliste ensüümide poolt vees lahustuvaks ühendiks. Lõikamisega kaasneb segu värvuse muutus. Mida aktiivsemad on proovis olevad rakud, täpsemalt rakkude mitokondriaalsed dehüdrogenaasid, seda suurem on proovi optiline tihedus. Joonisel 11 B on esitatud 26 tundi pärast transfektsiooni saadud analüüsi tulemused. Sarnaselt trüpaansinise analüüsiga pole ka siin rakkude elulemuse langus väga suur. Võrreldes olukorraga enne puromütsiini selektsiooni oli suurem nähtud vahe kontrollrakkude ja 3A-2 mutatsiooni sisaldava replikoniga transfekteeritud rakkude elulemuse vahel, samas pole see vahe kuigi suur ja ei korreleeru teistest katsetest saadud tulemustega. Seega vajab rekombinantsete replikonide põhjustatud tsütotoksiline efekt täiendavat analüüsi. Lisaks otsesele tsütotoksilisuse mõõtmisele oleks tarvis analüüsida ka nende mutantide mõju rakus toimuvatele protsessidele, eelkõige peremeesraku makromolekulide sünteesile.

2.4 Arutelu

Kairit Tintsi poolt oli mutantsete viiruste primaarsest varust puhastatud mitmed viiruskloonid. Töö esimeseks eesmärgiks oli tuvastada võimalikud sekundaarsed mutatsioonid nende kloonide mittestruktuurseid valke kodeerivas alas. Läbiviidud uurimuse tulemusena tuvastati viirustest, mille esialgne mutatsioon hõlmas kolme Cys-i deletsiooni nsP1 valgus, kaks mutatsiooni nsP4 kodeerivas alas (EV ja LI, Tabel 3). Selline mutatsioonide paiknemine tundus loogilisena, sest eelnevalt oli koimmuunosadestamise meetodil näidatud nsP1 ja nsP4 valgu vahel selge interaktsiooni olemasolu (Salonen ja teised 2003). Seetõttu võis eeldada, et mutatsioonid paiknevad piirkondades, mis osalevad nende kahe valgu omavahelisel seondumisel. Paraku selgus (Lisa 3), et nii esialgne mutant kui ka tuvastatud „kompensatoorsete“ mutatsioonidega viirused on temperatuuritundlikud ja ei suuda 37°C juures replitseeruda. Ükski senini uuritud temperatuuritundlikku fenotüüpi põhjustav mutatsioon nsP1 valgus ei muuda selle valgu ensümaatilisi omadusi, kuid neid mutatsioone sisaldavate viiruste negatiivse polaarsusega RNA ahela süntees on kõrgemal temperatuuril defektne (Lulla ja teised 2007, käsikiri). Alfaviiruse negatiivsete ahelate sünteesi viib läbi P123 polüproteiinist ja nsP4 valgust koosnev varajane replikaasikompleks, mille toimimiseks on vaja polüproteiini koosseisus oleva nsP1 valgu osalust ja interaktsiooni nsP4 valguga (Shirako ja Strauss 1994). NsP1 valk osaleb alfaviiruste negatiivse polaarsusega RNA sünteesil ja seetõttu on nendest andmetest loogiline järeldada, et mutatsioonid, mis lõhuvad nsP1 ja nsP4 vahelise interaktsiooni (Lisa 4, Žusinaite ja teised 2007), peavadki tekitama viirusele probleeme eelkõige negatiivse polaarsusega RNA ahela sünteesimisel. Kompensatoorsed mutatsioonid, mis taastavad vastavate valkude vahelised interaktsioonid, peaksid olema parema negatiivse polaarsusega RNA sünteesimise võimega. Töös toodud tulemustest järeldub, et LI ja EV mutatsioonid sellist efekti tõenäoliselt ei oma, küll aga ülejäänud viis analüüsitud tõelist kompensatoorset mutatsiooni. Paraku nõuab selle väite kontrollimine viiruse negatiivse polaarsusega RNA sünteesi analüüsimist, ent see on antud ressursside kättesaadavuse juures raskendatud. Tehniliselt lihtsamaks meetodiks oleks nsP1 ja nsP4 vaheliste interaktsioonide uurimine, sest on näidatud, et tõelised kompensatoorsed mutatsioonid taastavad esialgsete mutatsioonide poolt rikutud interaktsiooni (Lisa 4, Žusinaite ja teised 2007). Selline analüüs võiks kinnitada või ümber lükata spekulatsioonid LI ja EV mutatsioonide funktsionaalsusest.

Erinevat LI ja EV mutatsioonidest olid ülejäänud viis kompensatoorset mutatsiooni piisavad taastamaks mutantsete nsP1 valkude (del3 ja 3A) interaktsioonid nsP4 valguga (Lisa 4, Žusinaite ja teised 2007). On tähelepanuväärne, et kõik need mutatsioonid paiknevad nsP1 valgus endas. Sellest võib järeldada, et palmitüleerimisdefekti põhjustavatest mutatsioonidest tingitud seondumise defekte teise replikaasi kompleksi valguga saavadki kompenseerida vaid teised mutatsioonid esialgses valgus, mitte mujal. Selle põhjuseks võib olla asjaolu, et ilmselt on viiruse replikaasikompleksi kolmedimensionaalne struktuur äärmiselt keeruline ning kuna eeldatakse ka teatud rakuliste komponentide osalust valkude omavaheliste kontaktide abistamisel (Strauss ja Strauss 1994, Kujala ja teised 2001, Salonen ja teised 2003), on üsna tõenäoline, et mida rohkemates valkudes mutatsioon toimub, seda suurem on võimalus kogu kompleksi mittetoimimiseks. Samas on oluline, et sekundaarne mutatsioon nsP1 alas ei muudaks kodeeritava valgu ensümaatilisi omadusi, millega on kooskõlas ka antud sekundaarsete kompensatoorsete mutatsioonidega viiruste analüüsi tulemused (Žusinaite ja teised 2007). Teine võimalik põhjus, miks ei õnnestunud tuvastada ühtegi nsP1-st väljaspool paiknevat funktsionaalset kompensatoorset mutatsiooni, võib seisneda selles, et kõnealused mutatsioonid omavad mitut efekti, mõjutades rohkem kui ühte viirusele olulist funktsiooni. Mõned meie andmetest toetavad seda hüpoteesi, sest lisaks interaktsioonidele nsP4-ga on mutantsetele valkudele iseloomulik ka halvenenud seondumine rakumembraaniga ja mõningane lokalistasioon tsütoplasmas (Žusinaite ja teised 2007). Sellisel juhul on võimalik, et mutatsioon nsP4-s võib küll taastada interaktsioonid nsP1-ga, kuid ei suuda parandada nsP1 ebakorrektselt rakusisest paiknemist. Seepärast oleks huvitav uurida, kas LI või EV mutatsioonid kandvad nsP4 valgud omavad sarnaseid iseloomulikke jooni või mitte.

Hoolimata tuvastatud EV ja LI mutatsioonidest nsP4 valku kodeerivas alas, ekspresseeritakse vastavat valku pCG plasmiidilt ning eeldatavasti ka viirusega nakatatud rakkudes metsik-tüüpi valguga võrreldaval tasemel. Seega ei mõjutanud vastavad mutatsioonid nsP4 valgu funktsioone. Võimalik, et tuvastatud mutatsioonid aitavad viirusel paremini kasvada 28°C juures, sest tuvastatud kloonid olid isoleeritud just sellel temperatuuril. On huvitav, et selline mutatsioon nagu EV, millega kaasneb nii laengu kui ka polaarsuse muutus nsP4 valgu N-terminaalses regioonis (127. aminohappejääk), ei muuda valku inaktiivseks. Ilmselt paikneb nimetatud mutatsioon väljaspool nsP4 polümeraasse aktiivsusega domeeni.

Eespool kirjeldatud tulemustest lähtub, et 28°C juures selekteeritud ja puhastatud viiruste kloonid ei vaja sel temperatuuril paljunemiseks kompensatoorseid mutatsioone. Samuti ei

leitud ühestki esialgset del7 mutatsiooni kandva viiruse teise põlvkonna isolaadist, kaasa arvatud 37°C juures paljundatud isolaadid, sekundaarseid mutatsioone. See on ilmselt põhjustatud vastava mutantse viiruse piisavalt kõrgest infektsioonilisusest, mistõttu sekundaarsete mutatsioonidega genotüübid ei saavuta ainult ühe põlvkonna jooksul enamust ainult esialgset mutatsiooni sisaldava genotüübi üle.

Ka neljast 37°C juures isoleeritud viiruse kloonist, mis sisaldasid esialgset del3 või 3A mutatsiooni, ei õnnestunud tuvastada sekundaarseid mutatsioone. Võimalik, et see oli põhjustatud kloonide ebapiisavast *plaque*-puhastamsiest, sest tavaliselt kasutatava protokollil alusel peab kloone puhastama kolm korda, aga antud kloonide puhul sai puhastamist läbi viidud vaid korra. See võis põhjustada segapopulatsiooni viirustest, millel ei olnud võimalik tuvastada otsest muutust piisaval arvul kordadest lugemaks muutust tõesti mutatsiooniks. Segapopulatsiooni esinemise võimalust kinnitab ka tähelepanek, et eriti raskelt sekveneeritavate kloonide puhul teostatud kontroll-sekveneerimine kas Saksamaal või Rootsis (kommertsiaalne sekveneerimisteenus) tuvastas kahel juhul ühe ja sama cDNA pealt PCR abil amplifitseeritud lõigu päritolu kahest erinevast kloonist.

Töö järgmiseks eesmärgiks oli funktsionaalsete rekombinantsete viiruste, mis sisaldasid sekundaarseid mutatsioone, bioloogiliste omaduste analüüs rakukultuuris. Selle analüüsi eesmärkideks oli selgitada, miks just need mutatsioonid suutsid taastada viiruse elujõulisuse ja teha kindlaks, kas ja kui suurel määral erinevad üksteisest antud rekombinantsete viiruste ja metsikut tüüpi viiruse bioloogilised omadused. Samuti pakkus huvi mutandi del7 iseloomustamine, ehkki antud mutandil ei ole tuvastatud sekundaarseid mutatsioone. Esialgne analüüs kasvukiiruste võrdlemise eksperimendis näitas, et need viirused on omavahel üsna sarnased, samal ajal aga erines nende viiruste poolt kodeeritud nsP1 valgu rakusisene lokalisatsioon (Lisa 4 ja Žusinaite ja teised 2007). Samuti oli huvitav jälgida, kas teisese 6D mutandi viirusvaruga nakatatud rakud käituvad sarnaselt varem avaldatud tulemustega (Ahola ja teised 2000).

Analüüsi alustati mutantsete ja metsik-tüüpi viiruste esialgse RNA sünteesi kiiruse võrdlusega. See meetod on oluliselt tundlikum ning informatiivsem kui kasvukiiruste võrdlemine. Selgus, et samasugust esialgset mutatsiooni (del3 ja 3A) sisaldavate viiruste RNA sünteesi kiirus sõltub oluliselt ka kompensatoorse mutatsiooni tüübist (Joonis 8-10). Meie grupi avaldatud andmetest on näha, et kõigi kompensatoorseid mutatsioone sisaldavate viiruste puhul on taastunud nsP1 valgu võime nsP4 siduda ja virionide moodustamise kiirus on võrreldav

metsik-tüüpi viiruse vastava kiirusega (Lisa 4, Žusinaite ja teised 2007). Nüüd, kasutades tundlikumat meetodit, ilmnesevad olulised erinevused viiruste isolaatide vahel. Seega ei korreleeru esialgse RNA sünteesi kiirus otseselt virionide moodustamisega. Sarnased tulemused on saadud ka teiste SFV mutantide uurimisel (Ahola ja teised 2000; Tamm, magistratöö 2007).

Esialgse RNA sünteesi kiiruse alusel jagunesid uuritud viirused kolme gruppi. Igat gruppi iseloomustavad teatud RNA sünteesi iseärasused, mis peegeldavad erinevusi nende viiruste replikatsioonikomplekside moodustamisel ja funktsioneerimisel.

1. Eriti aeglase RNA sünteesi kiirusega viiruste (del3-1 ja 3A-3, Joonis 8) puhul on iseloomulik ulatuslik ja püsiv mahajäämine metsik-tüüpi viiruse RNA sünteesi kiirusest. See erinevus väheneb veidi alles infektsioonitsükli lõpuks (10 tundi). Kõige tõenäolisemad põhjused antud nähtusele võivad olla kas replikatsioonikomplekside väiksem arv ja/või nende komplekside väiksem produktiivsus. Esimene võimalus on rohkem tõenäoline, sest replikatsioonikomplekside moodustumine sõltub negatiivse RNA ahela sünteesist ja see omakorda nsP1 valgust (Shirako ja Strauss 1994), mis antud juhul on mutantne. Seega seisneks nende viiruste RNA sünteesi defekt replikatsioonikomplekside moodustamises aeglasemalt ja väiksemas hulgas. Selle hüpoteesi kontrollimiseks oleks vaja uurida viiruse replikatsioonikomplekside moodustamist rakkudes, mida nakatatakse fluorestseeruvaid replikatsioonikomplekse tootvate viirustega (Tamberg ja teised 2007).
2. Aeglase RNA sünteesi kiirusega viiruste (6D, del7; Joonis 9) RNA sünteesi kõige iseloomulikumaks jooneks võrreldes metsik-tüüpi viiruse RNA sünteesiga on algse mahajäämise hüppeline vähenemine 5,5 tundi pärast infektsiooni (6D) või 7 tundi pärast infektsiooni (del7). Selle tulemusena jõuab mutantide RNA sünteesi kiirus vahepeal peaaegu järele metsik-tüüpi viiruse RNA sünteesi kiirusele (del7). Sellele faasile järgneb aga väga aeglane viirusliku RNA hulga suurenemine. Võib oletada, et efekti põhjustajaks on vähemalt kaks defekti - esialgse mahajäämise tingib viiruse puudulik replikatsioonikomplekside moodustumine, sünteesi aeglustamise aga moodustunud replikatsioonikomplekside ebastabiilsus. Nende defektide olemust on üsna raske seletada. Üheks väga spekulatiivseks võimaluseks oleks mutandi halvenenud, ent pikemat aega kestev negatiivse polaarsusega RNA ahelate süntees, mis metsikut tüüpi viiruse puhul kirjanduse andmeil lõpeb ligikaudu 4 tunni jooksul pärast infektsiooni algust (Shirako ja Strauss 1994). Replikatsioonikomplekside inaktiveerumise põhjuseks ei ole tõenäoliselt

defektid nsP1 valgu ensümaatilistes aktiivsustes. Loogilisem oleks otsida põhjust valgu ja replikatsioonikomplekside muutunud lokalisatsioonist nakatatud rakkudes. Igal juhul on põhjalikumaks uurimiseks vajalik nakatatud rakkudes toimuvate protsesside mitmekülgne uurimine. Kahjuks antud hüpoteesi põhjalikuks kontrollimiseks napib Tartu Ülikoolil vahendeid ja aparatuuri.

3. Keskmise RNA sünteesi kiirusega viirused (3A-1, 3A-2, del3-2; Joonis 10) on oma olemuselt kõige sarnasemad metsikut tüüpi viirusele. Nende puhul on märgata väikest algset mahajäämust metsik-tüüpi viiruse RNA sünteesi kiirusest. Põhjus võib seisneda replikatsioonikomplekside aeglasemas moodustumises. Mahajäämus hilistes ajapunktides võib aga viidata replikatsioonikomplekside väiksemale stabiilsusele. Suhteliselt väikesed vahed metsik-tüüpi viirusega lubavad oletada, et olulisi defekte nende mutantide replikaaside funktsioneerimises ei ole.

Oluline on otsida seoseid nende viiruste nsP1 valkude omaduste ja viiruste RNA sünteesi iseärasuste vahel. Ainaks nsP1 valgu omaduseks, mille poolest antud mutantsed viirused üksteisest erinevad, on tema võime lokaliseeruda filopoodiumi-laadsetes struktuurides. Loogiline on oletada, et viirused, mille nsP1 filopoodiumi-laadsetes struktuurides lokaliseerub ja muidu metsikut tüüpi viiruse nsP1 valgu omadustele sarnaneb, võiksid replitseeruda paremini kui need, mille nsP1 valgu omadused on erinevad. Nagu näitavad eespool ja lisas 4 toodud andmed, ei pea see oletus paika. Viirused, mille nsP1 valk ei lokaliseeru filopoodiumi-laadsetes struktuurides, ei kuulu eriti aeglase RNA sünteesi kiirusega mutantide hulka. Samas on eelnevalt näidatud, et viirused, mille nsP1 ei lokaliseeru filopoodiumi-laadsetes struktuurides, ei ole neurovirulentsed hiirtele (Ahola ja teised 2000). Kuna saadud andmed näitavad, et viiruse RNA sünteesi kiirus ei ole seotud filopoodiumide moodustamisega ja seega ka neuropatogeensusega, siis on võimalik neid omadusi teineteisest sõltumata modifitseerida. Juhul, kui tulemused leiavad kinnitust, oleks see kasulik uute geeniteraapia vektorite väljatöötamiseks, võimaldades lahutada geeniteraapia vektorite puhul soodsad omadused, nagu replikatsiooni kiirus, ebasoodsatest, nagu tsüto- ja neuropatogeensus.

Üks olulisemaid antud tööst tulenevaid järeldusi on see, et kompensatoorsed mutatsioonid suurendavad mutantsete nsP1 del3 ja 3A valkude seondumist raku plasmamembraaniga. Lisaks aktiveerivad kompensatoorsed mutatsioonid neljal juhul viiest võime lokaliseeruda filopoodiumi-laadsetes struktuurides, kusjuures nende nähtustega ei kaasne palmitüleerimise taastekkimist (Lisa 4, Žusinaite ja teised 2007). Seepärast tekib küsimus, kuidas taastatakse

selline rikutud funktsioon? Üheks võimaluseks on, et see toimub teise membraane siduva elemendi, amfipaatilise seondumispeptiidi, mõjutamise vahendusel. Kuidas võivad leitud kompensatoorsed mutatsioonid, mis ei asu otseselt seondamispeptiidis, mõjutada nsP1 valgu seondumist membraanidele selle elemendi kaudu?

Del3-2 mutandi puhul on tuvastatud kaks kompensatoorset mutatsiooni, millest teine põhjustab ühe hüdrofoobse (Leu) ja ühe neutraalse aminohappe (Gly) asendumist hüdrofiilse aminohappega (Glu). Antud mutatsioon jääb membraanidega seonduvast amfipaatilisest heeliksist ainult 25 aminohappejäägi kaugusele. Niisugune lähedus võib viidata sellele, et antud mutatsioon võiks parandada valgu seondumist membraanidega. Veel lähemale, umbes 10 aminohappejäägi kaugusele seondumispeptiidist, jääb ka kolmandasse gruppi kuuluva mutant 3A-2 puhul tuvastatud sekundaarse mutatsiooni asukoht. Ülejäänud kompensatoorsed mutatsioonid asuvad aga kaugemal - 3A-1 puhul jääb muutus ligikaudu 65 aminohappejäägi kaugusesse, ja ka del3-1 puhul jääb tuvastatud sekundaarne mutatsioon ligikaudu sama kaugusele. See võib teoreetiliselt mõjutada valgu seondumist membraanidele, sest on näidatud, et ka seondumispeptiidi järjestusest kaugemal paiknevad mutatsioonid võivad mõjutada nsP1 valgu seondumisvõimet (Spuul ja teised 2007). Huvitav on ka tähelepanek, et kompensatoorsete mutatsioonidega, välja arvatud 3A-2 mutandi puhul, kaasnes enamasti laengu muutus. Seegi on sarnane olukorraga amfipaatilise heeliksi juures, kus on konserveerunud pigem kriitiliste aminohappejääkide laengud, mitte niivõrd konkreetsed aminohapped (Lampio ja teised 2000). Seetõttu võivad eriti seondumispeptiidi läheduses paiknevate kompensatoorsete mutatsioonidega kaasneda muutused seondumispeptiidi omadustes, mis võivad oluliselt parandada peptiidi esialgset seondumist membraanidele, või siis parandada seondumist teiste replikaasikompleksi valkudega.

Ehkki mitmed sekundaarsed mutatsioonid paiknevad seondumispeptiidi vahetus läheduses, ei eksisteeri otsesest korrelatsiooni mutatsiooni asukoha ja RNA sünteesi kiiruse vahel. Amfipaatilise heeliksi järjestusele lähemal paiknevate sekundaarsete kompensatoorsete mutatsioonidega viiruste esialgne RNA sünteesi kiirus oli teiste mutantidega võrreldes küll suurem (del3-2 ja 3A-2, Joonis 10), kuid juba seondumispeptiidist 50 aminohappejäägi kaugusel paikneva kompensatoorse mutatsiooni puhul võis täheldada nii esialgse RNA sünteesi kiiruse madalat (del3-1) kui ka suuremat (3A-1) efektiivsust.

Hindamaks adekvaatsemalt erinevat RNA sünteesi kiirust mutantsete viiruste vahel, oleks tulevikus kindlasti tarvis analüüsida, kas erinevate RNA tüüpide süntees nende vahel erineb.

Negatiivse polaarsusega RNA ahelate sünteesi hindamine on ääretult keeruline, ent subgenoomse ja genoomse RNA sünteesi hulga hindamine peaks olema teostatav.

RNA sünteesi kiiruse analüüs näitas, et konstrueeritud viiruste vahel eksisteerivad olulised erinevused. Seepärast oli oluline veel analüüsida, kas sellised erinevused eksisteerivad ka viiruste põhjustatud tsütotoksilisuse vahel. Meie poolt avaldatud andmed (Žusinaite ja teised 2007) viitavad kaudselt sellele, et kõik konstrueeritud mutandid on tsütotoksilised, kuna nad moodustavad rakukultuuris *plaque*'sid. *Plaque*-titreerimine ja viiruste kasvukiiruste analüüs ei ole väga tundlikud meetodid, mistõttu tsütotoksilisuse olemasolu ei saanud pidada tõestatuks. Seepärast kasutasime konstruktide tsütotoksilisuse hindamiseks kolme erinevat spetsiifilist meetodit (Joonis 11). Kõik need lähenemised hõlmasid puromütsiini selektsiooni ja puromütsiini N-atsetüültransferaasi geeni sisaldavate mutantsete replikonidega transfekteeritud rakkude kasutamist. Ehkki ükski nendest meetoditest ei andnud väga selgeid tulemusi, võib mõningaid järeldusi siiski teha. Esiteks, tsütotoksilisuse analüüs kinnitas, et kõik konstrueeritud mutandid on tsütotoksilised. See on kooskõlas nende juba varem täheldatud võimega moodustada rakukultuuris lüüsilaike. Paraku ei võimalda saadud andmed eristada üksteisest vähem ega rohkem tsütotoksilisi mutante. Ilmselt olulised erinevused nende mutantide tsütotoksilisuse vahel puuduvad. See tulemus oli ootamatu, sest eeldasime näiteks 3A-2 mutandi madalamat tsütotoksilisust rakkudele seoses tema võimetusega lokaliseerida nsP1 valku filopoodiumi-laadsetesse jätketesse. Samuti ei leitud mingeid korrelatsioone viiruse RNA sünteesi kiiruse ja viiruse poolt põhjustatud tsütotoksiliste efektide vahel. Neid katseid on vaja kindlasti korrata ja vajadusel kasutatud meetodeid ka täiendada. Nii näiteks kahe meetodi puhul kolmest, trüpaansinise ja Wst-1 analüüsi puhul, ei täheldatud ka varem kirjeldatud SFV1-PG replikoni vähenenud tsütotoksilist efekti ega ka *Wt*-järjestust sisaldavate replikonidega transfekteeritud rakkude kiiret suremist. Seetõttu on antud tulemusi väga raske tõlgendada, liiatigi veel, kuna nad ei ole samade konstruktidega elektroporeeritud rakude jaoks eri analüüsides üheselt mõistetavad. Peale selle näitavad saadud tulemused ka seda, et peale nakatatud rakkude surma uurimise on vaja analüüsida ka muid viiruse poolt rakkudele avaldatavaid mõjusid, eelkõige rakus toimuva transkriptsiooni, translatsiooni ja rakutsükli mõjutamist.

Kokkuvõte

Antud uurimustöö keskendus Semliki Forest viiruse replikatsioonikompleksi valgu nsP1 palmitüleerimisdefektsete mutantide ja nendega kaasnevate kompensatoorsete mutatsioonide tuvastamisele ja analüüsile. Töö käigus tuvastati kaks mutatsiooni, LI ja EV, replikaasi valku nsP4 kodeerivast alast, mis aga läbiviidud analüüsil osutusid mittefunktsionaalseteks. Kirjeldati seitsme palmitüleerimisdefektse viiruse, millest osad sisaldasid viiruspartiklite tootlikkust taastavaid kompensatoorseid mutatsioone, RNA sünteesi kiirust neljast kuni kümne infektsioonijärgse tunnini. Leiti, et membraanidega seonduva amfipaatilise heeliksi lähedusse jäävad mutatsioonid võivad mõjutada positiivselt neid sisaldavate viiruste esialgset RNA sünteesi kiirust. RNA sünteesi kiiruse alusel jagati uuritud mutandid kolme gruppi ning pakuti välja hüpoteesid erinevuste päritolu kohta. Samuti analüüsiti antud mutatsioone sisaldavate ja puromütsiini resistentsust tagavate replikonide tsütotoksilisust ning leiti, et antud meetodeid kasutades pole võimalik tuvastada konstruktide erinevust metsik-tüüpi järjestust sisaldavatest replikonidest.

Käesoleva uurimustöö tulemusi arvesse võttes võib öelda, et Semliki Forest viiruse elujõulisust, mille nsP1 valgus sisalduvad viiruse elulemust vähendavad ja nsP1 valgu ning replikaasikompleksi valkude seondumist raskendavad mutatsioonid, ei ole võimalik parandada kompensatoorsete mutatsioonidega nsP4 valku kodeerivas alas. NsP1 kodeerivas alas mutatsioone sisaldavate viiruste esialgne RNA sünteesi kiirus ei sõltu oluliselt mutantse nsP1 valgu rakusisesest lokalisatsioonist. Samuti puudub otsene korrelatsioon viiruse RNA sünteesi kiiruse ja viiruse poolt toodetavate viiruspartiklite hulga vahel. Faktorid, mis põhjustavad esialgse RNA sünteesi suurema kiiruse kompensatoorseid mutatsioone sisaldavate genoomide puhul, vajavad täiendavat uurimist.

Summary

Semliki Forest virus (SFV, genus Alphavirus) is an RNA virus of positive polarity. It replicates in the cytoplasm of various cell types of different hosts. Replication takes place on the membranes of cellular origin and is mediated by viral non-structural proteins, nsP1-nsP4. The object of the current study is nsP1, a protein capable of capping viral RNAs and the remedy of anchoring the replication complex on membranes via an amphipatic helix and subsequent palmitoylation.

The research „The Study of Semliki Forest Virus Nonstructural Protein nsP1 Mutations and their Compensatory Mutations” concentrated on the analysis of the palmitoylation-defective mutants and detection of the compensatory mutations in the replication complex protein nsP1. Two non-functional mutations, LI and EV, were also detected in the replicase protein nsP4 coding sequence. The initial speed of RNA synthesis of seven palmitoylation-defective mutant viruses, some of which contained mutations restoring the production rate of viral particles, was described. Studying the initial speed of RNA synthesis from four to ten hours post infection, rather positive effect to the primary RNA synthesis rate of the mutations mapping into the vicinity of the membrane-binding amphipatic helix, was discovered. According to the rate of RNA synthesis three groups of viruses were distinguished among studied mutants. Several hypothesis for the origin of such groups were proposed. In addition, the cytotoxicity of corresponding replicon vectors containing also a gene coding puromycine resistance, was analyzed. It was concluded that by using current methods it is not possible to identify differences in the cytotoxicity of wild-type constructs and mutant ones.

Considering the results from the current study we can say that it is not possible to compensate for the defects in the viability of the virus and interaction of viral proteins resulting from mutations in the nsP1 coding sequence with secondary mutations in the nsP4 coding sequence. The RNA synthesis rate does not correlate with the localization of the mutant nsP1 protein in an infected cell. What is more, there is no correlation between the viral RNA synthesis rate and the amount of produced viral particles. The reasons for increased initial speed of RNA synthesis should be explored more in detail.

Kasutatud kirjandus

1. Agapov E.V.; Frolov I.; Lindenbach B.D.; Pragai B.; Schlesinger S.; Rice C.M. (1998) Noncytopathic Sindbis Virus RNA Vectors for Heterologous Gene Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12989-12994
2. Ahola T.; Laakkonen P.; Vihinen H.; Kääriäinen L. (1997) Critical Residues of Semliki Forest Virus RNA Capping Enzyme Involved in Methyltransferase and Guanylyltransferase-Like Activities. *JVI.*, **71(1)**: 392-397
3. Ahola T.; Kujala P.; Tuittila M.; Blom T.; Laakkonen P.; Hinkkanen A.; Auvinen P. (2000) Effects of Palmitoylation of Replicase Protein nsP1 on Alphavirus Infection. *JVI.*, **74(15)**: 6725-6733
4. Ahola T.; Kääriäinen L. (1995) Reaction in Alphavirus mRNA Capping: Formation of a Covalent Complex of Nonstructural Protein nsP1 with 7-methyl-GMP. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**: 507-511
5. Ahola T.; Lampio A.; Auvinen P.; Kääriäinen L. (1999) Semliki Forest Virus mRNA Capping Enzyme Requires Association with Anionic Membrane Phospholipids for Activity. *The EMBO Journal* **18(11)**: 3164-3172
6. Atkins G.J.; Sheahan B.J.; Liljeström P. (1999) The Molecular Pathogenesis of Semliki Fores Virus: a Model Virus Made Useful? Review article *JGVI.*, **80(9)**: 2287-2297
7. Barton D.J.; Sawicki S.G.; Sawicki D.L. (1991) Solubilization and Immunoprecipitation of Alphavirus Replication Complexes. *JVI* **65(3)**: 1496-1506
8. De Groot R.J.; Rümenapf T.; Kuhn J.; Strauss E.G.; Strauss J. (1991) Sindbis Virus RNA Polymerase is Degraded by the N-End Rule Pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8967-8971
9. Frolov I. and Schlesinger S. (1994) Comparison of the Effects of Sindbis Virus and Sindbis Virus Replicons on Host Cell Protein Synthesis and Cytopathogenicity in BHK Cells. *JVI.*, **68(3)**: 1721-1727
10. Frolov I.; Agapov E.; Hoffman T.Jr.; Pragai B.M.; Lippa M.; Schlesinger S.; Rice C.M. (1999) Selection of RNA Replicons Capable of Persistent Noncytopathic Replication in Mammalian Cells. *JVI* **73(5)**: 3854-3865

11. Garmashova N.; Gorchakov R.; Volkova E.; Paessler S.; Frolova E.; Frolov I. (2007) The Old World and New World Alphaviruses Use Different Virus-Specific Proteins for Induction of Transcriptional Shutoff. *JVI.*, **81(5)**: 2472-2484
12. Gorchakov R.; Frolova E.; Frolov I. (2005) Inhibition of Transcription and Translation in Sindbis Virus-Infected Cells. *JVI* 79(15): 9397-9409
13. Gorchakov R.; Frolova E.; Williams B.R.G.; Rice C.M.; Frolov I. (2004) PKR-Dependent and -Independent Mechanisms Are Involved in Translational Shutoff During Sindbis Virus Infection. *JVI* **78(16)**: 8455-8467
14. Hahn Y.S.; Strauss E.G.; Strauss J.H. (1989) Mapping of RNA⁺ Temperature-Sensitive Mutants of Sindbis Virus: Assignment of Complementation Groups A, B, and G to Nonstructural Proteins. *JVI* **63(7)**: 3142-3150
15. Helenius A.; Kielian M.; Wellsted J.; Mellman I.; Rudnick G. (1985) Effects of Monovalent Cations on Semliki Forest Virus Entry into BHK-21 Cells *JBC* **260(9)**: 5691-5697
16. Karlsson G.B. and Liljeström P. (2003) Live Viral Vectors – Semliki Forest Virus. *Methods Mol. Med.* **87**: 69-82 *Vaccine Protocols*, 2nd edition Humana Press Inc., Totowa, NJ
17. Keränen S. And Ruohonen L. (1983) Nonstructural Proteins of Semliki Forest Virus: Synthesis, Processing, and Stability in Infected Cells. *JVI.*, **47(3)**: 505–515.
18. Kujala P.; Ikäheimonen A.; Ehsani N.; Vihinen H.; Auvinen P.; Kääriäinen L. (2001) Biogenesis of the Semliki Forest Virus RNA Replication Complex. *JVI.*, **75**: 3873-3884
19. Laakkonen P.; Auvinen P.; Kujala P.; Kääriäinen L. (1998) Alphavirus Replicase Protein nsP1 Induces Filopodia and Rearrangement of Actin Filaments. *JVI.*, **72(12)**: 10265-10269
20. Laakkonen P.; Ahola T.; Kääriäinen L. (1996) The Effects of Palmitoylation on Membrane Association of Semliki Forest Virus RNA Capping Enzyme. *JBC.*, **271(45)**: 28567-28571
21. Lachmi B.E. and Kääriäinen L. (1976) Sequential Translation of Nonstructural Proteins in Cells Infected With a Semliki Forest Virus Mutant. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **73(6)**: 1936–1940.

22. Lampio A.; Kilpeläinen I.; Pesonen S.; Karhi K.; Auvinen P.; Somerharju P.; Kääriäinen L. (2000) Membrane Binding Mechanism of an RNA Virus-capping Enzyme. *JBC.*, **275(48)**: 37853-37859
23. Liljeström P.; Lusa S.; Huylebroeck D.; Garoff H. (1991) In Vitro Mutagenesis of a Full-Length cDNA Clone of Semliki Forest Virus: the Small 6,000-Molecular-Weight Membrane Protein Modulates Virus Release. *JVI.*; **65(8)**: 4107-4113
24. Lulla A.; Lulla V.; Tints K.; Ahola T.; Merits A. (2006) Molecular Determinants of Substrate Specificity for Semliki Forest Virus Nonstructural Protease. *JVI.*, **80(11)**: 5413-5422
25. Lulla V.; Sawicki D.L.; Sawicki S.G.; Merits A.; Ahola T. (2007) Molecular Defects in Semliki Forest Virus Temperature-sensitive Mutants ts10 and ts14 Mapping to nsP1. *Manuscript.*
26. Lundstrom K. (2005) Biology and Application of Alphaviruses in Gene Therapy. *Gene Therapy* **12**: 92-97 *Conference Paper.*
27. Lundstrom K.; Ziltener P.; Hermann D.; Schweitzer C.; Richards J.G.; Jenck F. (2001 a). *J. Of Receptor & Signal Transduction Research* **21(1)**: 55-70
28. Lundstrom K.; Rotmann D.; Hermann D.; Schneider E.M.; Ehrenguber M.U. (2001 b) Novel Mutant Semliki Forest Virus Vectors: Gene Expression and Localization Studies in Neuronal Cells. *Histochem. Cell Biol.* **115**: 83-91
29. Lundstrom K.; Schweitzer C.; Rotmann D.; Hermann D.; Schneider E.M.; Ehrenguber M.U. (2001 c) Semliki Forest Virus Vectors: Efficient Vehicles for In Vitro and In Vivo Gene Delivery. *FEBS Letters* **504**: 99-103 *Minireview*
30. Marsh M. and Bron R. (1997) SFV Infection in CHO Cells: Cell-type Specific Restrictions To Productive Virus Entry at the Cell Surface. *JCS.*, **110**: 95-103
31. Merits A.; Vasiljeva L.; Ahola T.; Kääriäinen I.; Auvinen P. (2001) Proteolytic Processing of Semliki Forest Virus-specific Non-structural Polyprotein by nsP2 protease *JGVI.*, **82**: 765-773
32. Morris-Downes M.M.; Phenix K.V.; Smyth J.; Sheahan B.J.; Lileqvist S.; Mooney D.A.; Liljeström P.; Todd D.; Atkins G.J. (2001) Semliki Forest Virus-based Vaccines: Persistence, Distribution and Pathological Analysis in Two Animal Systems. *Vaccine*, **19**: 1978-1988

33. Peränen J. and Kääriäinen L. (1991) Biogenesis of Type I Cytopathic Vacuoles in Semliki Forest Virus-Infected BHK Cells. *JVI*, **65(3)**: 1623–1627.
34. Peränen J.; Rikkinen M.; Liljeström P.; Kääriäinen L. (1990) Nuclear Localization of Semliki Forest Virus-Specific Nonstructural Protein nsP2. *JVI* **64(5)**: 1888-1896
35. Peränen J.; Takkinen K.; Kalkkinen N.; Kääriäinen L. (1988) Semliki Forest Virus-Specific Non-Structural Protein nsP3 Is a Phosphoprotein. *JGVI* **69**: 2165-2178
36. 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. *JVI*, **77(3)**: 1691-1702
37. Salonen A.; Ahola T.; Kääriäinen L. (2005) Viral RNA Replication in Association with Cellular Membranes. Review article *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **285**: 139-173
38. Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning a laboratory manual* 3rd. edition.
39. Sawicki D.L.; Silverman R.H.; Williams B.R.; Sawicki S.G. (2003) Alphavirus Minus-Strand Synthesis and Persistence in Mouse Embryo Fibroblasts Derived from Mice Lacking Rnase L and Protein Kinase R. *JVI*, **77(3)**: 1801-1911
40. Sawicki D.L.; Perri S.; Polo J.M.; Sawicki S.G. (2006) Role for nsP2 Proteins in the Cessation of Alphavirus Minus-Strand Synthesis by Host Cells. *JVI* **80(1)**: 360-371
41. Sawicki D.L. and Sawicki S.G. (1980) Short-Lived Minus-Strand Polymerase for Semliki Forest Virus. *JVI*, **34(1)**: 108-118
42. Sawicki D.L.; Sawicki S.; Keränen S.; Kääriäinen L. (1981) Specific Sindbis Virus-Coded Function for Minus-Strand RNA Synthesis. *JVI*, **39(2)**: 348-358
43. 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. *JVI*, **68(3)**: 1874-1885
44. Shirako Y. And Strauss J. (1998) Requirement for an Aromatic Amino Acid or Histidine at the N Terminus of Sindbis Virus RNA Polymerase. *JVI* **72(3)**: 2310-2315
45. Singh I.; and Helenius A. (1992) Role of Ribosomes in Semliki Forest Virus Nucleocapsid Uncoating *JVI* **66(12)**: 7049-7058
46. Smerdou C. and Liljeström, P. (1997) Two-Helper RNA System for Production of Recombinant Semliki Forest Virus Particles. *JVI*, **73(2)**: 1092-1098

47. Spuul P.; Salonen A.; Merits A.; Jokitalo E.; Kääriäinen L.; Ahola T. (2007) Role of the Amphipathic Peptide of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP1 in Membrane Association and Virus Replication. *JVI.*, **81(2)**: 872-883
48. Strauss J.H. and Strauss E.G. (1994) The alphaviruses: gene expression, replication and evolution. Review article *Microbiol. Rev.*, **58**:, 491–562.
49. 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 compensatory mutations. *JGVI.*, **88**: 1977-1985
50. Tamberg N.; Lulla V.; Fragkoudis R.; Lulla A.; Fazakerley J.K.; Merits A.
51. Tamm, K. (2007) Semliki Forest viiruse mittestruktuurse valgu nsP2 tuumalokalisatsiooni mutantide fenotüüpide kirjeldamine Tartu Ülikool, Bioloogia-ja Geograafiateaduskond, Molekulaar-ja Rakubioloogia Instituut, Mikrobioloogia ja viroloogia õppetool. 1-75. Magistritöö.
52. Tints K. (2005) Semliki Forest viiruse mittestruktuurse valgu nsP1 palmitüleerimis-defektsete mutantide funktsionaal-struktuurne iseloomustamine. Tartu Ülikool, Bioloogia-ja Geograafiateaduskond, Molekulaar-ja Rakubioloogia Instituut, Mikrobioloogia ja viroloogia õppetool. 1-62. Magistritöö.
53. Vasiljeva L.; Merits A.; Golubtsov A.; Sizemskaja V.; Kääriäinen L.; Ahola T. (2003) Regulation of the Sequential Processing of Semliki Forest Virus Replicase Polyprotein. *JBC* **278(43)**: 41636-41645
54. Vasiljeva L.; Valmu L.; Kääriäinen L.; Merits A. (2001) Site-specific Protease Activity of the Carboxyl-terminal Domain of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP2. *JBC* **276(33)**: 30786-30793
55. Vihinen H.; Ahola T.; Tuittila M.; Merits A.; Kääriäinen L. (2001) Elimination of Phosphorylation Sites of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP3. *JBC* **276(8)**: 5745-5752
56. <http://www.microbiology.wustl.edu/sindbis/sindata1.html>
57. <http://oregonstate.edu/instruction/bb492/fignumbers/figL4-24.html>
58. <http://graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>

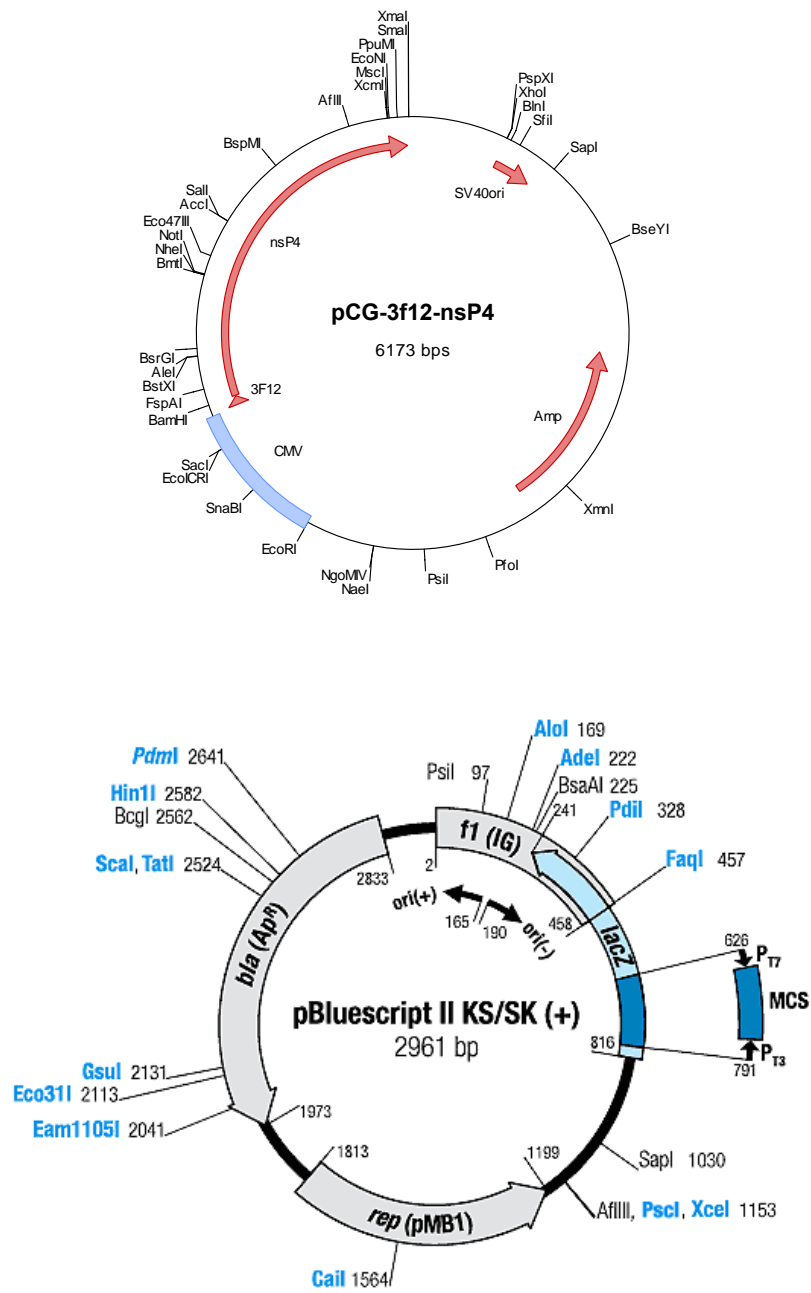
Lisad

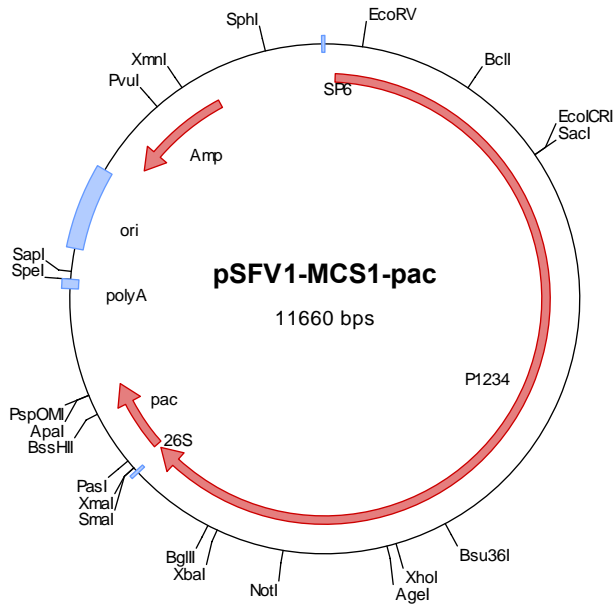
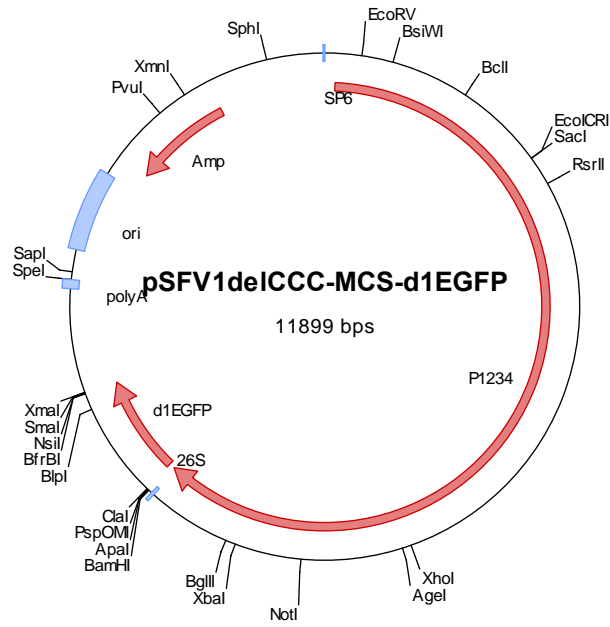
Lisa 1. Kasutatud SFV praimerid ja nende omadused

Sense praimer	Järjestus 5'→3'	Asukoht SFV genoomis	Parim paardumise temperatuur°C
F4	CCCGTGCACCCTCTAGCAGA	1814-1833	58
F5	GACTCCATCCTGCTAAACGGG	2399-2419	56
F6	CTATCAAACATTCCACAGGGTA	2999-3020	51
F7	CACGTCCTGCTGGTGAGTGAGT	3599-3620	59
F8	GCCGTGGCGAAGAAATGGCCGT	4199-4220	60
F9	GGCGAAACAATGGACAACATCG	4799-4820	55
F10	ACGCCTGCCCAAGGACTGCGT	5399-5420	62
F11	GGGTCGGATAGTTGCTTGGACA	5999-6020	57
F12	GACGCGATCATCGCCTCTCACT	6599-6620	59
F13	GTTAGCAAGTGGTTCCGACAGG	7199-7221	59
Antisense praimer	Järjestus 5'→3'	Asukoht SFV genoomis	
RN4	TTTGCTCCGAGGTTTAACAAGA	2497-2518	51
RN5	TTTTCGCCCAACACACGTTCGC	3119-3140	57
RN6	GGCAGTCCTAAACTTAGGTCGT	3693-3714	55
RN7	CGCTACAGCGTGGATGACGGG	4283-4303	60
RN8	GGGCGATCCGTTCTGCTGTCAT	4895-4916	59
RN9	CAGGACGTCGTCGAAGTCTCC	5498-5518	58
RN10	GTTCTGAAAGGGTGACGGGACGGC	6095-6118	63
RN11	ATCTTCGAGGATCATTTAAACCTG	6696-6718	52
RN12	CCACCTTGGCGAGGGACATT	7299-7318	56
RN13	ACGCGGGACCTGGCAAAGCTAGCTT	7877-7900	61

Lisa 2. Kasutatud plasmiidide kaardid

Kaardid on konstrueeritud programmiga *Clone Manager Professional Suite version 8 (Sci Ed Software)* ning *Fermentas`e* koduleheküljelt.





Lisa 3. Mutantide EV ja LI FACS analüüs

	Negatiivne kontroll	del3	del3+EV	del3+LI	d1EGFP
GFP positiivsete rakkude arv 28°C juures	0,01%	62,71%	68,92%	69,59%	92,57%
GFP positiivsete rakkude arv 37°C juures	0,00%	0,11%	0,08%	0,13%	90,41%

Lisa 4. Antud töö esimese poolega seotud avaldatud artikkel

<http://vir.sgmjournals.org/cgi/reprint/88/7/1977>