

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MIKROBIOLOOGIA JA VIROLOOGIA ÕPPETOOL

Anni Noorem

Ross River viiruse infektsiooni visualiseerimine alfaviiruse valkude vastaste
antikehade, lutsiferaaside ja fluorestseeruvate valkude abil

Bakalaureusetöö
Geenitehnoloogia
12 EAP

Juhendaja PhD Andres Merits

TARTU 2016

INFOLEHT

Alfaviirused on mitmekesine perekond putukatega levivaid RNA viiruseid. Mõned alfaviirused (Semliki Forest viirus, Chikungunya viirus) on suhteliselt hästi uuritud, paljudest pole aga peaaegu midagi teada. Ka lihase- ja liigesevalusid, põletikku ja löövet põhjustav Ross River viirus (RRV) kuulub väheuuritud alfaviiruste hulka. Austraalias diagnoositakse igal aastal üle 5000 RRV nakkusjuhu. See ajendas Griffithi Ülikooli virolooge koostöös Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi RNA viiruste uurimisgrupiga RRV-d põhjalikumalt uurima. Selle töö esimeseks etapiks oli vajalike töövahendite valmistamine ja katsetamine. Töövahendite kavandamiseks kasutati nii paremini uuritud alfaviiruste kohta käivaid andmeid kui ka katse ja eksituse meetodit. Käesolevas bakalaureusetöös saadud andmed aitavad paremini mõista RRV-d kui viirust. Loodud töövahendid ja meetodid on vajalikud RRV põhjalikumaks uurimiseks, mis on omakorda aluseks RRV ja teiste väheuuritud alfaviiruste poolt tekitatavate haiguspuhangutega paremaks toimetulemiseks.

Märksõnad: alfaviirused, Ross River viirus, nsP3, subgenoomne promooter, replikon, markervalk, antikehad.

Lõputöö CERCS kood on B230.

Alphaviruses are diverse genus of RNA viruses that are spread by insects. Some, such as the Semliki Forest virus or Chikungunya virus, are quite well known to science, but of many others we know practically nothing. The Ross River virus (RRV) is one of those alphaviruses. It causes joint and muscle pain, rash and inflammation. In Australia, approximately 5000 people get infected with RRV every year. This led virologists at Griffith University to contact the University of Tartu's Institute of Technology's RNA viruses research group to investigate RRV together. The first step was to design and test tools for the research. Design was based on the information that has been obtained for other better known alphaviruses or through experimentation. This research helps to better understand RRV as a virus. The designed tools will help to investigate RRV further, which in turn will provide information on how to handle epidemics caused by less familiar alphaviruses.

Keywords: alphaviruses, Ross River virus, nsP3, subgenomic promoter, replicon, marker proteins, antibodies.

Research CERCS code is B230.

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	9
1.1 ALFAVIIRUSED	9
1.1.1 ÜLDISELOOMUSTUS	9
1.1.2 VIRION JA STRUKTUURSED VALGUD	11
1.1.3 ALFAVIIRUSTE NS VALGUD JA NENDE FUNKTSIOONID	13
1.1.4 ALFAVIIRUSE SISENEMINE RAKKU JA VIIRUSLIKU RNA SÜNTEES	15
1.1.5 VIRONIDE KOKKUPANEK JA VABANEMINE	17
1.2 ROSS RIVER VIIRUS	18
1.2.1 ROSS RIVER VIIRUSE AVASTAMINE.....	18
1.2.2 RRV PÕHJUSTATUD HAIGUS, LEVIK JA VIIRUSE LABORATOORNE DIAGNOOSIMINE	19
1.2.3 IMUUNVASTUS RRV-ga NAKATUMISELE NING ARTRIIDIGA SEOTUD PATOGENEES	20
1.2.4 RRV INFEKTSIOON LABORIHIRES	21
1.3 ALFAVIIRUSTE INFEKTSIOONI UURIMINE MARKERVALKE KASUTADES..	22
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	26
2.1 TÖÖ EESMÄRGID	26
2.2 MATERJAL JA METOODIKA	27
2.3 TULEMUSTE ANALÜÜS JA ARUTELU	36
2.3.1 SUUR DELETSSIOON RRV NSP3 REGIOONIS ON VIIRUSELE LETAALNE .	37
2.3.2 EELISTATUD POSITSIOON MARKERJÄRJESTUSE LISAMISEKS RRV NSP3 VALKU KODEERIVAS ALAS PAIKNEB AH JÄÄKIDE 400 JA 402 VAHEL	39
2.3.3 DUPLITSEERITUD SG PROMOOTERIGA RRV ON VÕIMELINE KANDMA MARKERGEENE.....	42
2.3.4 RRV P3A, RRV 2SG VIIRUSTE JA RRV REPLIKONVEKTORITE VAHENDATUD MARKERVALKUDE EKSPRESSIOONI ANALÜÜS.....	43
2.3.5 KATSE VIIRUSREPLIKON OSAKESTE TOOTMISEKS JA NENDE HULGA MÄÄRAMISEKS	45
2.3.6 ENAMIKE RRV NSP-DEST JA RRV KAPSIIDIVALKU SAAB VISUALISEERIDA WESTERN BLOT MEETODIL, KASUTADES SFV VÕI CHIKV VALKUDE VASTASEID POLÜKLONAALSEID ANTISEERUMEID	47
KOKKUVÕTE	53
SUMMARY	54
KASUTATUD KIRJANDUS	56

LIHTLITSENTS.....	61
LISAD	62

KASUTATUD LÜHENDID

ah – aminohape

BFV – Barmah Forest viirus

BHK 21 – *baby hamster kidney cells*, beebihamstri neeru rakuliin 21

C – *capside*, kapsiid, ks kapsiidivalk

CHIKV – Chikungunya viirus

CMC – *carboxymethyl cellulose*, karboksümetüülselluloos

E – *envelope*, ümbris, ka ümbrisevalk

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

Gluc – *Gaussia* lutsiferaas

GMEM – *Glasgow Modified Eagle's Medium*

HRP – *horseradish peroxidase*, mädarõika peroksidaas

ICA – *infectious centre assay*, infektsioonitsentrite analüüs

icDNA – *infectious complementary DNA*, infektsiooniline komplementaarne DNA

IRES – *internal ribosome entry site*, sisemine ribosoomi seondumispiirkond

MOI – *multiplicity of infection*, infektsiooni kordusnumber

MTaas – *methyltransferase*, metüültransferaas

NanoLuc – Nano lutsiferaas

nsP – *nonstructural protein*, mittestruktuurne valk

NTPaas – *nucleoside triphosphatase*, nukleosiidtrifosfotaas

NTR – *nontranslated region*, mittetransleeritav ala

ONNV – O'nyong'nyong viirus

PBS – *phosphate buffered salin*, fosfaat-puhverdatud soolalahus

pfu – *plaque forming unit*, lüüsilaiiku moodustav ühik

polü(A) saba – paljudest A jääkides koosnev järjestus RNA 3' otsas

Rluc – *Renilla* lutsiferaas

RPM – *revolutions per minute*, pööret minutis

RRV – Ross River viirus

SDS – *sodium dodecyl sulphate*, naatriumdodetsüülsulfaat

SFV – Semliki Forest viirus

Sg – subgenoomne

sgRNA – subgenoomne RNA

SINV – Sindbis viirus

ZIKV – Zika viirus

TF – *trans frame*

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

VRP – *virus-replicon particle*, viirus-replikon partikkel

wt – *wild-type*, metsiktüüp

SISSEJUHATUS

Viirused on bioloogilised objektid, mida leidub kõikjal. Neil puudub rakuline ehitus, seega pole nad elus, aga raske on neid ka päris elututeks objektideks pidada. Viirustel on oma genoom, aga nad vajavad selle ning ka iseenda paljundamiseks organismide abi. Seega on nad parasiidid. Seda, kui palju viiruseid maailmas leidub, ei tea keegi. Neid võib olla isegi miljardeid liike. Lisaks evolutsioneeruvad viirused äärmiselt kiiresti ning ka seetõttu ei saa päris kindel olla, palju neid mingil ajahetkel kokku on.

Kuna viirused on parasiidid, siis aeg-ajalt ikka juhtub, et mõni leiab endale uue elukoha organismis, kes pole tegelikult tema esialgne peremees. Näiteks leiavad nad sageli tee põllumajandusloomadesse või halvemal juhul ka inimestesse. Kuna nad seejuures ise ka muutuvad, võib juhtuda, et mõni pealtnäha täiesti süütu viirus hakkab tekitama meile kahju. Nii juhtus hiljuti teadusele aastakümneid mitte huvi pakkunud Zika viirusega (ZIKV) ja kahtlemata juhtub seda ka tulevikus. Kui “uus” viirus tuleb, on vaja ka teda uurida ja midagi tema vastu ette võtta. Tänapäeval on võimalik luua kõiki olulisi töövahendeid viiruste uurimiseks ja perspektiivis ka uute viiruspuhangutega toimetulekuks. Paraku võtab see aega ja seetõttu tuleb teadlastel sageli tegeleda tagajärgedega, samas kui oleks võimalus probleeme ennetada. Seetõttu on oluline olla valmis ning mõelda pidevalt ette. Probleem on aga selles, et keegi ei tea, missugune viirus hakkab inimkonnale järgmisena kahju tekitama.

Sellest loogikast lähtuvalt hakkas Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi RNA viiruste teadusgrupp tundma huvi väheuuritud Ross River viiruse (RRV) vastu. See viirus on laiale maailmale üsna tundmatu, kuid Austraalias nakatub sellesse igal aastal üle 5000 inimese. Vaktsiini pole ning ravi on ka kehvapoolne, pigem soovitatakse nakatumisi ennetada. RRV infektsiooni põhiliseks sümptomiks on tugev liigesevalu, mis võib mõnikord põhjustada isegi inimeste töövõime tuks muutumise. Hetkel leidub RRV-d looduslikult Austraalias ja selle ümbruses, kuid kunagi ei saa kindel olla, et viirus oma tavalisest levialast välja ei „hüppa“ nagu on seda teinud ZIKV ja Chikungunya viirus (CHIKV). Seetõttu on kasulik olla selliseks olukorraks ette valmistunud.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli RRV uurimiseks vajalike töövahendite (markeritega viirused, replikonid) loomine, kasutades selleks paremini uuritud Semliki Forest viiruse (SFV) ja CHIKV jaoks loodud lähenemisi. Samuti oli oluline analüüsida nende töövahendite omadusi *in vitro* (koekultuuris) ning uurida ka varem valmistatud SFV ja CHIKV poolt kodeeritud valkude vastaste antikehade võimet ära tunda RRV vastavaid valke.

Töö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi RNA viiruste uurimisrühmas. Sooviksin tänada professor Andres Meritsat juhendamise ja nõuannete eest. Samuti soovin tänada igasuguse abi eest Eva Žusinitet, Sirle Sauli, Margit Mutsot, Liis Karo-Astoveri, Age Utti ja Mona Tepporit.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 ALFAVIIRUSED

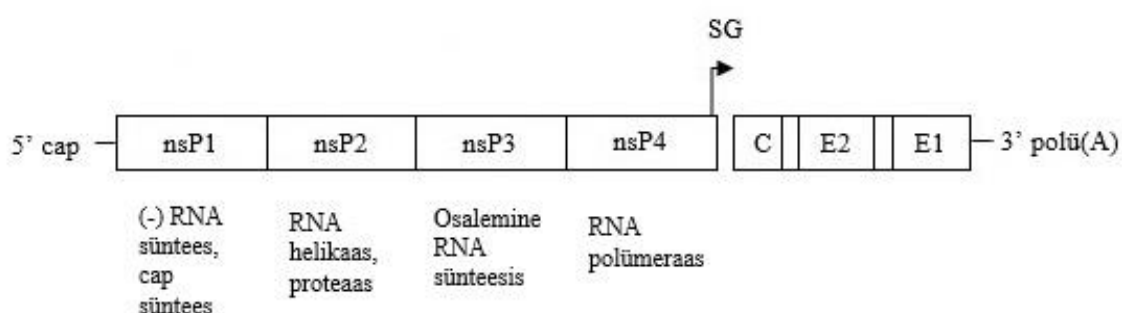
1.1.1 ÜLDISELOOMUSTUS

Alfaviirused kuuluvad koos rubiviirustega sugukonda *Togaviridae*. Alfaviiruseid on praeguseks teada üle kolmekümne, rubiviiruseid on aga ainult üks, Rubella viirus, mis põhjustab punetisi (Luers *et al.*, 2005). Suurim bioloogiline erinevus alfa- ja rubiviiruste vahel on asjaolu, et esimesed on (mõne erandiga) vektorlevikulised, teised aga mitte. Alfaviiruste vektoriteks on verdimevad putukad, peamiselt sääsed. Nad paljunevad nii oma selgroogses peremehe kui ka vektorputukas. Infektsiooni kulg sõltub aga peremehest: lüljalgsetes on see eluaegne, kuid mittepatogeenne, selgroogsetes aga akuutne ja sellega võib kaasneda haiguse tekkimine. Analoogne on viiruse käitumine ka vastavates rakukultuurides. Selgroogsete rakkudes põhjustab alfaviiruse infektsioon raku makromolekulide sünteesi mahasurumist. Nende asemel toodetakse suurtes kogustes viiruse RNA-d ja valke ning nakatunud rakud surevad. Kuigi alfaviirused paljunevad efektiivselt ka putukarakkudes, toimub see rakku oluliselt kahjustamata (Strauss ja Strauss, 1994).

Kõik alfaviirused omavad vähemalt 45% aminohappelist sarnasust struktuursetes valkudes ning ligi 60% sarnasust mittestruktuursetes valkudes (*nonstructural proteins*, nsP) (Strauss ja Strauss, 1994). Siiski ei ole alfaviirused päris ühtne viiruste perekond. Neid saab jagada nii selgroogsete peremeeste järgi, tekitatava haiguse järgi, geograafilise leviala järgi kui ka viiruste genoomide/valkude järjestuste sarnasuste alusel. Päris mitmel juhul annab erinevate tunnuste järgi jagamine sarnase tulemuse. Nii viiruste leviku kui ka ns valke kodeerivate nukleotiidsete järjestuste põhjal jagatakse soojaverelisi loomi nakatavad alfaviirused Vana (Euraasia, Aafrika ja Austraalia) ning Uue Maailma (Ameerika) alfaviirusteks. Eeldatakse, et need rühmad lahknesid teineteisest umbes 2000–3000 aastat tagasi. Jagades alfaviiruseid antigeensete omaduste järgi, on tulemuseks kolm peamist viiruste gruppi: Ida hobuste entsefaliidi/Venezuela hobuste entsefaliidi viiruse (EEEV/VEEV) grupp, SFV grupp ning Sindbis viiruse (SINV) grupp. Käesolevas bakalaureusetöös uuritud RRV kuulub oma järjestuste ja omaduste poolest SFV serogruppi, nagu ka CHIKV (Harley *et al.*, 2001).

Alfaviiruste genoomiks on positiivse polaarsusega üheaahelaline RNA, mille 5' otsas on cap-struktuur ja 3' ots on polüadenüleeritud (polü(A) saba). Genoomi pikkuseks on 11 000–12 000 nukleotiidi ning temas paikneb kaks lugemisraami (Joonis 1). Nendest suurem algab genoomi 5' otsa lähedalt ja kodeerib nsP1–nsP4, täpsemalt nende eellast – mittestruktuurset liitvalku P1234. Ns valgud on alfaviiruste kontekstis valgud, mida toodetakse peremeesrakus,

kuid mida ei pakita valmis virioni. Bioloogiliste funktsioonide poolest võib üldistatult öelda, et nsP-d on viiruse replikaasi valgud. Samas on kõik nsP-d multifunktsionaalsed valgud, mis on olulised nii RNA replikatsiooniks kui ka viiruse ja peremehe vahelisteks interaktsioonideks (vt. 1.1.3). Huvitav on ka see, et replikaasi katalüütilise subühiku, nsP4, hulk nakatatud rakkudes on teiste nsP-de hulgast väiksem. Selle üheks põhjuseks on asjaolu, et enamike alfaviiruste puhul paikneb nsP3 valgu kodeeriva ala lõpus terminaatorikoodon UGA, mistõttu viiruse RNA-lt transleeritakse kahte liitvalku: P123 ja terminaatori läbilugemise tulemusel ka väikeses koguses P1234 liitvalku. Siiski pole see strateegia universaalne ning mõnedes alfaviirustes on terminaatori asemel sense-koodon, mistõttu toodetakse ainult P1234 liitvalku (Rupp *et al.*, 2015).



Joonis 1. Alfaviiruste genoomi üldine ülesehitus. Ära on toodud ka viiruse valkude tähtsamad ülesanded. Joonis on adapteeritud (Powers *et al.*, 2001).

Virioni valke, mida nimetatakse ka struktuurseteks valkudeks, kodeerib eellasvalgu kujul viiruse genoomi teine lugemisraam (Joonis 1). See paikneb RNA genoomi 3' otsa poolses kolmandikus ning selle ekspressioon toimub spetsiaalse rakus sünteesitava RNA vahendusel. Kuna see RNA on genoomist lühem, nimetatakse seda subgenoomseks (sg)RNA-ks. Virioni kuuluvad ja/või selle moodustamisel osalevad struktuursed valgud toodetakse sgRNA pealt järjekorras kapsiidivalk (C), ümbrisevalkude E3 ja E2 eelasvalk (p62), 6K valk ning viimaks E1 (Joonis 1). C-valk moodustab koos RNA genoomiga nukleokapsiidi ning ümbrisevalgud E1 ja E2 (E tuleb sõnast *envelope* – ümbris) moodustavad virion pinnal paiknevaid oga struktuure (Joonis 2) (Kuhn *et al.*, 1996; Strauss ja Strauss, 1994). E3 ja 6K on virioni moodustamisel osalevad abivalgud. Hiljuti selgus, et alfaviirustel on olemas ka kuues struktuurne valk. See moodustub 6K valgu kodeerivas alas aset leidva raaminihke tulemusel ja seetõttu kannab nimetust TF (*trans frame*) valk (Firth *et al.*, 2008).

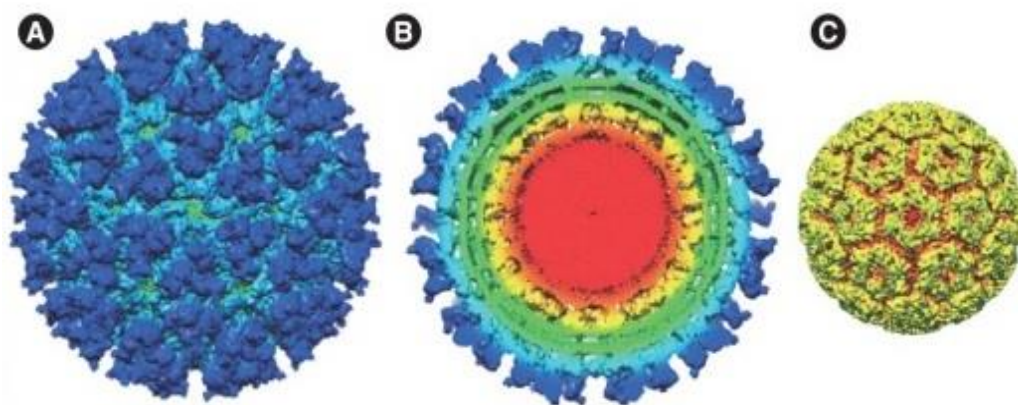
Mitte kõik viiruse RNA regioonid ei kodeeri valke. Genoomi 5' ja 3' otsas paiknevad mittekodeerivad NTR-id (*nontranslated region*), mis sisaldavad signaale RNA

replikatsiooniks. Ka kahe lugemisraami vahel paikneb lühike mittekodeeriv ala. Selle järjestusega kattub nn. sg promooter, mis ulatub ka P1234 liitvalgu C-terminust kodeerivasse alasse. Sg promooter on RNA regioon, mis on vajalik sgRNA-de sünteesiks. SgRNA-de süntees, nagu ka uute genoomide süntees, toimub negatiivse polaarsusega RNA vahendusel (vt. 1.1.3), mis ise sünteesitakse infektsiooni käigus genoomse RNA pealt. Negatiivne RNA ei kodeeri valke ning seda ei pakita ka virionidesse (Strauss ja Strauss, 1994).

1.1.2 VIRION JA STRUKTUURSED VALGUD

Alfaviiruste virionil on vägagi regulaarne ikosaeedriline struktuur (Strauss ja Strauss, 1994) ja nad näevad elektronmikroskoobis välja kui 700Å diameetriga sfäärid (Joonis 2). RNA genoom on ümbritsetud kapsiidiga (Joonis 2), mis omab $T=4$ sümmeetriat ning koosneb 240 koopist kapsiidi valgust. T tähendab virioni triangulatsiooni numbrit, mis märgib struktuuri subühikute arvu, selle kordajaks on 60. Kapsiidi valgus molekulid moodustavad virionis heksa- ja pentameere. Nukleokapsiid (RNA+kapsiid) on ümbritsetud lipiidse kaksikkihiga, mis on omakorda kaetud 80 glükoproteiinse oga poolt moodustatud valgukihiga (Joonis 2). Iga oga koosneb kolmest E1 ja E2 valkude dimeerist. Seega on virionis E1 ja E2 valkude suhe 1:1 (kumbagi on kokku 240 koopiat). Mõnedel alfaviirustel kuulub valmis virioni veel ka E3 valk (Harley *et al.*, 2001; Mancini *et al.*, 2000). E1 ja E2 valgud on glükosüleeritud ning neil on olemas transmembraansed domeenid, mis läbivad lipiidset kaksikkihti. Alfaviiruste glükoproteiine modifitseeritakse täiendavalt ka palmitüleerimise teel (Jose *et al.*, 2009). Lisaks glükoproteiinidele leidub virionis ka väike kogus membraanseoselist 6K valku (Mancini *et al.*, 2000) ning ka TF valku (Firth *et al.*, 2008).

Translatsiooni käigus lõikab kapsiidi valk ennast sünteesitava liitvalgu küljest lahti ning vabaneb eraldiseisva valguna (Jose *et al.*, 2009). Peale proteaasse domeeni on kapsiidi valgus ka regioon, mis seonduvad spetsiifiliselt viiruse genoomsele RNA-le. Värskest sünteesitud kapsiidi valk on seotud ribosoomi suure subühikuga. Selline seondumine on ilmselt oluline nii uute nukleokapsiidide moodustamiseks kui ka rakku sisenenud nukleokapsiidide lagundamiseks (vt 1.1.4) (Strauss ja Strauss, 1994). Nukleokapsiidi südamik omab $T=4$ sümmeetriat ning on jagatud välimiseks (proteiinseks) ja sisemiseks regiooniks, mis koosneb arvatavasti valkudest ja RNA-st (Jose *et al.*, 2009).



Joonis 2. Alfaviiruste virioni struktuur SINV virioni näitel. Sinisega on märgitud glükoproteiinid, rohelisega lipiidne kaksikkiht, kollasega kapsiidivalk ja punasega RNA. **A.** Terve virion pealtvaates, näha on oga struktuurid. **B.** Virioni läbilõige. **C.** Nukleokapsiid. Joonis on võetud (Jose *et al.*, 2009).

Pärast kapsiidivalgu vabanemist vastsünteesitud polüpeptiidist, jätkub struktuurse liitvalgu süntees endoplasmaatilise retiikulumi membraanidega seotud ribosoomide abil (Strauss ja Strauss, 1994). Sünteesitav liitvalk lõigatakse rakuliste signaal-peptidaaside poolt p62 (E3E2), 6K ja E1 valkudeks. 6K on väike polüpeptiid, mida on vaja alfaviiruste partiklite kokkupanekuks, kuid mida pakitakse virioni väga väikestes kogustes. Endoplasmaatilises retiikulumis p62 ja E1 glükosüleeritakse ja seejärel moodustavad nad stabiilse heterodimeeri p62/E1, mis pannakse omakorda kokku trimeerideks, mille struktuur on $3 \times (p62/E1)$. E3 lõigatakse p62 küljest lahti alles glükoproteiinide transpordi käigus, see lõikamine toimub Golgi kompleksis furiini abil. Selle tulemusena moodustub E1/E2 heterodimeeridest koosnev trimeer (vastab virioni oga struktuurile), mis selgroogsete rakkudes transporditakse edasi plasmamembraani. E3 vastutab (p62 koostisosana) ogade korrektse kokkupanemise eest ning, interakteerudes E1-ga, väldib nende enneaegset aktiveerumist, mis viiks rakusiseste membraanide liitumisele. Nimelt kujutab E1 endast alfaviiruse *fusion* valku, mis happelises keskkonnas muudab oma konformatsiooni, paljastades peidus oleva *fusion* peptiidi. Seega on E3 vajalik viirusepartikli korrektseks kokkupanekuks ning ogade õigeks voltumiseks. E3 eemaldamine E2 küljest valmistab moodustuva virioni ette uude rakku sisenemiseks (Jose *et al.*, 2009).

1.1.3 ALFAVIIRUSTE NS VALGUD JA NENDE FUNKTSIOONID

nsP1 on ca 540-st aminohappe (ah) jäägist koosnev valk, mida on vaja viiruse RNA sünteesiks, eelkõige negatiivse ahela sünteesi initseerimiseks (Strauss ja Strauss, 1994). Samuti on antud valgul metüültransferaasne ja guanüültransferaasne aktiivsus ning ta osaleb cap-struktuuri lisamisel genoomsetele ja sgRNA-dele. nsP1 on ainsaks alfaviiruse replikaasi kompleksi valguks, millel on võime seonduda peremehe membraanidega ja on seetõttu replikatsioonikompleksile membraanseks “ankruks” (Ahola ja Kääriäinen, 1995; Salonen *et al.*, 2003; Spuul *et al.*, 2007). Tänu membraanidele seondumisele paikneb nsP1 nakatanud rakkudes mitte ainult replikatsioonikompleksides, vaid ka raku plasmamembraani siseküljel (Salonen *et al.*, 2003). Seal mõjutab nsP1 virionide vabanemist rakkudelt ning põhjustab peremeesraku aktiin-tsütoskeleti lagunemist (Jones *et al.*, 2013; Laakkonen *et al.*, 1998).

nsP2 koosneb ca 800-st ah jäägist ning on multifunktsionaalne ensüüm. Tema N–terminaalne regioon kujutab endast nukleosiidtrifosfataasi (NTPaas) (Rikkonen *et al.*, 1994) ja RNA trifosfataasi (Vasiljeva *et al.*, 2000). nsP2 valgu C-terminaalne regioon sisaldab papaiinilaadset tsüsteiini proteaasi ning ensümaatiliselt inaktiivset metüültransferaasi (MTaas) domeeni. Võimalik, et MTaas reguleerib negatiivse RNA ahela sünteesi. Proteaasne aktiivsus on aga vajalik alfaviiruse mittestrukturese liitvalgu lahtilõikamiseks (de Groot *et al.*, 1990; Merits *et al.*, 2001). Kuigi nsP2 valgu N-terminaalses regioonis paiknevad ka RNA helikaasi aktiivsuseks vajalikud motiivid (Jose *et al.*, 2009), on selle aktiivsuse avaldumiseks vajalikud ka valgu C-terminaalses osas paiknevad järjestused (Das *et al.*, 2014). Pole teada, mida RNA helikaas viiruse infektsiooni käigus täpselt teeb. Võimalik, et ta osaleb replikatsioonil tekkiva RNA duplexi lahtiharutamises, võimaldades RNA replikatsiooni ja transkriptsiooni toimumist (Jose *et al.*, 2009). Teada on ka see, et nsP2 on vajalik sgRNA sünteesi initseerimiseks (Suopanki *et al.*, 1998).

SFV (ja muude Vana Maailma alfaviirustega) nakatunud imetajarakkudes paikneb suur osa (kuni 50%) nsP2 valgust raku tuumas (Rikkonen *et al.*, 1994; Utt *et al.*, 2015). Täpselt ei teata, kuidas nsP2 tuuma liigub. SFV nsP2 valgus on olemas tuumalokalisatsiooni signaali sarnane järjestus (Rikkonen *et al.*, 1994). CHIKV nsP2-l selline järjestus puudub ja SINV nsP2-s paiknevad tuumalokalisatsiooni signaalid ei ole funktsionaalsed (Frolov *et al.*, 2009). Tuumas täidab nsP2 vähemalt kahte viiruse RNA replikatsiooniga otseselt mitteseotud funktsiooni. Esiteks põhjustab nsP2 peremehe RNA polümeraas II lagundamist ja selle kaudu raku mRNA-de sünteesi mahasurumist (Akhrymuk *et al.*, 2012). Teiseks blokeerib nsP2 interferoonide kaudu toimuvat signaalülekanne ning selle vahendatud viirusvastast

kaitsereaktsiooni (Breakwell *et al.*, 2007; Fros *et al.*, 2010). Seega osaleb nsP2 alfaviiruse infektsiooniga kaasnavate tsütotoksiliste efektide tekkimises.

nsP3 koosneb ca 500-st ah jäägist ning seda on vaja negatiivse polaarsusega ja sgRNA sünteesiks. nsP3 koosneb kolmest domeenist. Esimene, nn. makro-domeen, on alfaviirustel konserveerunud. Seda domeeni leidub ka muudel viirustel ning lisaks ka pro- ja eukariootsetest rakkudest pärit valkudes (Jose *et al.*, 2009; Malet *et al.*, 2009; Vihinen ja Saarinen, 2000). Samas pole päris selge, mida see regioon viiruse infektsiooni käigus teeb. Võimalik, et viirusele on ta oluline seetõttu, et seondab RNA-d. nsP3 valgu teine domeen on konserveerunud vaid alfaviiruste perekonnas, teiste viiruste (ega rakkude) valkudel pole seda leitud. See domeen seondab tsink ioone ja on samuti viirusele vajalik. Võimalik, et taas RNA seondamise tõttu (Shin *et al.*, 2012). nsP3 valgu kolmas (C-terminaalne) domeen ei ole aga konserveerunud ja erineb oma järjestuselt oluliselt isegi lähedaste (samasse serogruppi kuuluvate) alfaviiruste puhul. Eeldatavasti puudub sellel regioonil fikseeritud ruumiline struktuur ja ta on vajalik vahendamaks interaktsioone peremehe ja/või viiruse teiste valkudega (Thaa *et al.*, 2015). nsP3 on ainus fosforüleeritud ns valk. Selleks on olulised seriini ja treoniini rikkad järjestused nsP3 C-terminaalses domeenis (Jose *et al.*, 2009; Vihinen ja Saarinen, 2000). nsP3 valgu fosforüleeritus on erinevatel alfaviirustel erinev: SINV puhul on see suhteliselt kõrge, aga SFV puhul üpriski madal (Strauss ja Strauss, 1994). Eeldatavasti on fosfolüleeritud ka teiste alfaviiruste nsP3 valkude analoogsed regioonid, samas pole seda siiani katseliselt näidatud. Kuna nsP3 C-terminaalsel osal puudub fikseeritud ruumiline struktuur, talub see regioon (vähemalt SINV ja VEEV puhul) hästi suhteliselt suuri deletsioone (Strauss ja Strauss, 1994). Sama kehtib ka SFV (Thaa *et al.*, 2015; Vihinen *et al.*, 2001) ja CHIKV (Hallengård *et al.*, 2014) nsP3 kohta. Samuti talub see regioon mitmesuguste täiendavate järjestuste, näiteks markervalkude, lisamist (Bick *et al.*, 2003; Tamberg *et al.*, 2007; Utt *et al.*, 2016) ja on seetõttu viiruse replikaasi valkude märgistamise jaoks erilise tähtsusega.

nsP4 koosneb umbes 620-st ah jäägist ning on RNA polümeraas – alfaviiruse replikaasikompleksi katalüütiline subühik (Rubach *et al.*, 2009). Paljude alfaviiruste puhul nõuab nsP4 translatsioon UAG koodonist läbilugemist, mis põhjustab selle valgu väiksemat produktsiooni võrreldes teiste ns valkudega (Strauss ja Strauss, 1994). nsP4 N-terminaalseks aminohappeks on alati türosiin ning seetõttu ta on üpriski ebastabiilne valk. Suur osa sünteesitud nsP4 valgust degradeeritakse kiiresti proteosoomi poolt (de Groot *et al.*, 1991). Replikatsioonikompleksides paiknev nsP4 on proteosoomse degradatsiooni eest kaitstud

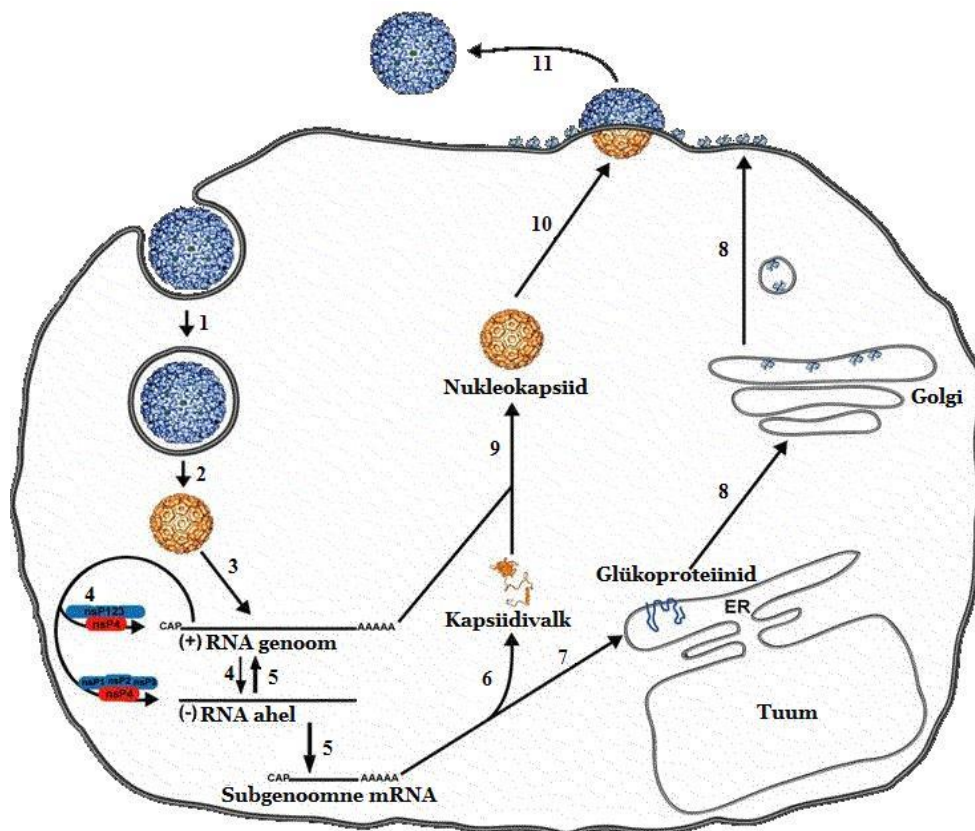
(Strauss ja Strauss, 1994). Võimalik, et nsP4 stabiliseerimises on oluline roll nsP3 valgul (Saul *et al.*, 2015).

nsP4 on oma järjestuse poolest kõige konserveerunud alfaviiruse valk. Samas on tema uurimine eriti keeruline, sest bakterites toodetud rekombinantne nsP4 on vähelahustuv ja väheaktiivne. Siiski on sellise valgu uurimisel kindlaks tehtud, et peale polümeraasse aktiivsuse on nsP4 valgul ka võime sünteesida polü(A) sabasid (Tomar *et al.*, 2006). Lisaks tunneb ta ära viiruse promootereid, kusjuures erinevatele promooteritele seondub nsP4 erinevate ah järjestuste vahendusel (Li ja Stollar, 2007). Viiruse RNA sünteesi läbiviimiseks vajab nsP4 alati teiste ns valkude osalemist. Nende puudumisel on ta väheaktiivne või üldse mitte aktiivne (Rupp *et al.*, 2015). Tõenäoliselt osaleb nsP4 ka interaktsioonides peremehe valkudega (Rathore *et al.*, 2014).

1.1.4 ALFAVIIRUSE SISENEMINE RAKKU JA VIIRUSLIKU RNA SÜNTEES

Alfaviirused nakatavad paljusid rakutüüpe ja väga erinevaid peremehi. Seetõttu on nende retseptorite uurimine keeruline ja andmed nende kohta ebapiisavad ning vastukäivad (Rupp *et al.*, 2015). Kõige tõenäolisemalt viitab see sellele, et alfaviirused kasutavad mitmeid erinevaid retseptoreid. Üheks selliseks on NRAMP (*natural resistance-associated macrophage protein*), mida kasutab SINV, kuid mitte RRV (Rose *et al.*, 2011). Virioni seondamises osalevad ka raku pinnal paiknevad polüsahhariidid. Viiruse poolseks rakkudele seondumise eest vastutavaks valguks on E2, mis on seega alfaviiruste antiretseptoriks (Strauss ja Strauss, 1994).

Virionid sisenevad rakkudesse klatriin-sõltuva endotsütoosiga, mille käivitavad virioni ja raku pinnal olevate komponentide interaktsioonid. Virioni lahtipakkimisel on kriitiliseks sündmuseks pH taseme langus endosoomides, mis toob kaasa struktuursed muutused viiruse membraanvalkudes. E1/E2 heterodimeerid dissotseeruvad, moodustuvad E1 valgu homotrimeerid ja vabaneb E1 valgus asuv *fusion*-peptiid (Li *et al.*, 2010). See toob kaasa endosoomi ja virioni membraanide liitumise, mille tulemusena vabaneb viiruse nukleokapsiid tsütoplasmasse. Seal seondub viiruse kapsiidivalk ribosoomidega, mis toob kaasa kapsiidi lagundamise ja viiruse genoomi vabanemise tsütoplasmasse (Jose *et al.*, 2009; Strauss ja Strauss, 1994).



Joonis 3. Alfaviiruste infektsioonitsükkel. 1. rakku sisenemine, 2. nukleokapsiidi vabanemine, 3. genoomse RNA lahtipakkimine, 4. mittestruktuursete valkude ja negatiivse RNA ahela süntees, 5. subgenoomse ja genoomse RNA süntees, 6. kapsiidivalgu eraldumine struktuurset polüproteiinist, 7. membraanivalkude liikumine endoplasmaatilisse retiikulumi (ER) ja järgnev protsessimine, 8. viirusvalkude liikumine läbi Golgi kompleksi raku plasmamembraanile, 9. nukleokapsiidi moodustumine, 10. nukleokapsiidi liikumine välismembraanini, 11. virioni vabanemine. Joonis ja allkiri on autori nõusolekul võetud Sirle Sauli magistritööst (Sirle Saul, 2010).

Sarnaselt teistele positiivse polaarsusega RNA viirustele on ka alfaviiruste RNA genoom infektsiooniline ehk siis genoomi vabanemine tsütoplasmasse on vajalik ja piisav replikatsioonitsükli käivitamiseks. Replikatsiooniprotsessi esimeseks etapiks on genoomse RNA translatsioon, mille käigus sünteesitakse P1234 (või P123+P1234) liitvalgud. nsP4 vabaneb liitvalgu küljest tänu nsP2 proteassele aktiivsusele. Moodustub P123+nsP4 kompleks. See on viiruse varajaseks replikaasiks, mis sünteesib rakku sisenenud positiivsele genoomsele ahelale vastava negatiivse koopia, mis jääb dupleksisse positiivse RNA-ga, moodustades kaheaheelalise RNA intermediaadi. Järgneb P123 lõikamine individuaalseteks ns valkudeks ja moodustub nsP1–4 valkudest koosnev hiline replikaas, mis sünteesib negatiivse RNA pealt uusi viiruse genome ja sgRNA-sid (Lemm *et al.*, 1994). Alfaviirused on tuntud selle poolest, et nad reguleerivad negatiivse RNA ahela sünteesi. Varajase infektsiooni käigus suureneb viiruse RNA hulk rakkudes eksponentsiaalselt, positiivseid ja negatiivseid ahelaid sünteesitakse enam-vähem võrdselt. Mõni tund pärast infektsiooni algust negatiivsete ahelate

süntees väheneb ja seejärel lakkab, positiivseid ahelaid sünteesitakse konstantselt kogu edasise infektsioonitsükli jooksul. Negatiivsete RNA-de sünteesi katkemine tuleneb sellest, et infektsiooni hilisemas faasis on nsP2 valgu kontsentratsioon rakkudes piisavalt kõrge, et see saaks lõigata sünteesitavat P1234 liitvalku juba enne, kui selle süntees on lõpule viidud. Selle tulemusena moodustuvad P12 ja P34 liitvalgud, millest omakorda tekivad individuaalsed nsP1, nsP2, nsP3 ja nsP4. Need on viirusele vajalikud (täpsemalt peatükis 1.3), kuid kuna negatiivsete RNA ahelate sünteesiks on alati vaja P123 liitvalku, siis sellel infektsiooni etapil uusi replikatsioonikomplekse enam juurde ei moodustu (Strauss ja Strauss, 1994; Vasiljeva *et al.*, 2003).

Nagu kõigil eukarüootide positiivse RNA-ga viirustel toimub ka alfaviirustel RNA replikatsioon rakumembraanidel. Ammu on teada, et alfaviiruse RNA replikatsioonikompleksid kujutavad endast membraanseid “kotikesi” ehk sfääruleid (Grimley *et al.*, 1968). Hilises infektsioonis paiknevad sfäärulid modifitseeritud endosoomide ja lüsoosoomide membraanides. Sfäärulid on stabiilsed ja püsivad funktsionaalsetena kogu infektsiooniprotsessi vältel. Nendne arv on rakus optimeeritud (mida suurem rakk, seda rohkem sfääruleid), sest komplekside arvu suurendamine üle optimaalse taseme ei tõsta toodetavate RNA-de hulka (Strauss ja Strauss, 1994). Hiljutised uurimised näitasid, et sfäärulite moodustumine ei toimu aga endosoomide membraanidel. Reaalseks sfäärulite moodustamise saidiks on hoopis raku plasmamembraan (Frolova *et al.*, 2010; Spuul *et al.*, 2011) ja tsütoplasmasse sisenevad sfäärulid endotsütoosi meenutava protsessi teel. See sisenemine on erinevatel viirustel erineva efektiivsusega ja sõltub viiruse valkude interaktsioonidest raku valkude ja signaalradadega (Spuul *et al.*, 2011; Thaa *et al.*, 2015). Rakulised valgud on olulised nii sfäärulite moodustamiseks, nende rakkudesse sisenemisel kui ka viiruse RNA sünteesil. On ilmne, et viiruse replikatsioonis osalevaid raku valke on palju, tõenäoliselt sadu. Praeguseks ajaks on enamike nende funktsioonid viiruse infektsioonis täiesti teadmata (Rupp *et al.*, 2015).

1.1.5 VIRIONIDE KOKKUPANEK JA VABANEMINE

Alfaviiruse virionide kokkupanek algab replikatsioonikomplekside läheduses. Ilmselt põhjustab seda asjaolu, et “värskelt” sünteesitud genoomsed RNA-d seonduvad kiiresti kapsiidi valguga. Nukleokapsiidi pakitakse ainult genoomseid RNA-sid, sest ainult neil on olemas spetsiifiline pakkimissignaal. See paikneb kas nsP1 (enamus alfaviiruseid) või nsP2 (SFV serograpi viirused) valku kodeerivas alas, mida sgRNA-s ei ole. Interaktsioonid

kapsiidimolekulide vahel viivad ikosaeedrilise nukleokapsiidi kokkupanemiseni. See koosneb ühest RNA ja 240-st kapsiidivalgu molekulist (Jose *et al.*, 2009; Wilkinson *et al.*, 2005).

Tsütoplastmast liiguvad nukleokapsiidid plasmamembraanile, kus toimub interaktsioon glükoproteiinidega. Nukleokapsiid seondub spetsiifiliselt ogasid moodustavate glükoproteiinide, täpsemalt E2 valguga, C-terminaalsete otstega. See interaktsioon tagab virionides kapsiidi- ja ümbrisevalkude 1:1 vahekorra ning käivitab virionide pungumise plasmamembraanist välja. Putukarakkudes on olukord mõnevõrra teistsugune. Nimelt kogunevad seal viiruse glükoproteiinid rakusisestele membraanidele ja sealsamas toimub ka virionide moodustamine. Virionid punguvad rakumembraanide sisse ja nende vabanemine putukarakkudest toimub eksotsütoosi teel (Jose *et al.*, 2009; Miller ja Brown, 1992; Strauss ja Strauss, 1994).

Reaalselt on need protsessid oluliselt keerulisemad, kui ülaltoodud lihtustatud mudel. Nii on korrektsete virionide kokkupanekul oma roll ka 6K valgul ja/või TF valgul. Need valgud soodustavad virionide vabanemist, kuid ei ole selleks absoluutselt vajalikud (Taylor *et al.*, 2016). E3 roll seisneb, nagu ülal märgitud, E1 *fusion*-kompetentse vormi enneaegse moodustamise takistamiseks. Teadmata põhjusel jääb mõnel alfaviirusel (nt. SFV-l) E3 seotuks ka valmis virionidega, enamikel alfaviirustel aga mitte (Li *et al.*, 2010; Strauss ja Strauss, 1994; Voss *et al.*, 2010). Virionide kokkupanekuks ja vabanemiseks on lisaks viiruse valkude ja RNA vahelistele interaktsioonidele olulised ka mitmesugused interaktsioonid peremehe valkudega ning membraanidega. Ainult kõik need intreraktsioonid kokku tagavad E1 ja E2 komplekside õige moodustamise ja transpordi ning infektsiooniliste virionide vabanemise (Kuhn *et al.*, 1996).

1.2 ROSS RIVER VIIRUS

1.2.1 ROSS RIVER VIIRUSE AVASTAMINE

1928. aastal toimusid Austraalias New South Walesi osariigis kaks ebatavalist epideemiat, kus haiguse sümptomiteks olid nahalööve ja liigeste valulik paistetused. Teise Maailmasõja ajal toimusid mitmed sarnased liigestevalu ja artriidiga seotud haiguspuhangud nii Austraalias kui ka Paapua Uus-Guineas. 1946. aastal pani P.G. Dowling sellele sündroomile nimeks epideemiline polüartriit (Harley *et al.*, 2001).

1956. aastal toimusid jällegi haiguspuhangud, kus patsiendid kurtsid liigese-, jäsemete- ja lihaskiiride üle. Shope ja Anderson täheldasid nende sümptomite sarnasust CHIKV põhjustatud

akuutse viirusliku polüartriidi sümptomitele. Samas oli nende kahe haiguse vahel ka märkimisväärsed erinevusi. CHIKV põhjustab järsu algusega raskekujulist artriiti ja kõrget palavikku, millele järgneb lööve. Austraalias aset leidnud haiguspuhangu puhul tekkisid sümptomid suhteliselt hilja ning olid pigem leebed, palavikku ei esinenud peaaegu kunagi ja kui esines, oli see kergekujuline. Siiski pani haiguste vaheline sarnasus Shope ja Andersoni arvama, et ka Austraalias levinud epideemiline polüartriit võib olla põhjustatud viiruse poolt. Selle väljaselgitamiseks testisid nad 16 akuutse ja paraneva patsiendi vereseerumeid ning avastasid, et kuuel neist olid olemas alfaviiruste vastased antikehad. Selle põhjal järeldati, et Austraalias leviv epideemiline polüartriit on põhjustatud senitundmatu alfaviiruse poolt (Harley *et al.*, 2001).

Edasi eraldasid Doherty ja tema kolleegid Ross jõe ümbrusest kogutud moskiitodest arboviiruste (lüljalgsete vektoritega levivate viiruste üldnimetus, lühend sõnadest *arthropod born virus*) A gruppi, mida tänapäeval nimetataksegi alfaviirusteks, kuuluva senitundmatu viiruse. Uurijad süstisid infektsioonilise materjaliga 1–2-päevaseid hiiri (1950–1960-ndatel tavaline meetod putukatega levivate viiruste tuvastamiseks), kellele oli selline infektsioon surmav, mis on alfaviiruste ühine bioloogiline omadus. Peale selle viisid uurijad läbi erinevaid teste nii uue kui ka juba varem iseloomustatud alfaviirustega ning leidsid, et uue viiruse omadused sarnanevad tuntud alfaviiruste omadustele. Oma leiukoha järgi sai uus viirus nimeks Ross River viirus ning tema tüüpilise nimeks sai T48 (T tähistab Townsville ja 48 moskiitopiirkonna numbrit) (Harley *et al.*, 2001). Järgnevad uurimused kinnitasid tehtud järelduste õigsust. Nii selgitati välja, et RRV T48 genoom koosneb 11 853 nukleotiidi jäägist ja omab alfaviiruse genoomile iseloomulikku struktuuri: kodeerib nelja ns valku nsP1–nsP4 (neist viimast terminaatori läbilugemise abil) ja kuute struktuurset (C, E3, E2, 6K/TF ja E1) valku (Joonis 1). Lisaks selgus, et oma järjestuste poolest on kõik need valgud sarnased teiste alfaviiruste vastavate valkudega. Järjestuste sarnasuste, immunoloogiliste omaduste ja ka tekitatava haiguse sümptomite poolest kuulub RRV SFV serogrupi viiruste hulka (Harley *et al.*, 2001).

1.2.2 RRV PÕHJUSTATUD HAIGUS, LEVIK JA VIIRUSE LABORATOORNE DIAGNOOSIMINE

Alfaviirustele on iseloomulik perioodiliste haiguspuhangute tekitamine ehk esineb ajavahemikke, kus nakatunuid on palju ning perioode, kus haigestumisi ette ei tule. RRV-ga nakatumine toimub aga pidevalt üsna kõrgel ja küllalt stabiilsel tasemel. Käesoleval ajal levib RRV peamiselt Austraalias, kus registreeritakse ca 5000 haigusjuhtumit aastas. See aga ei

tähenda et RRV ei põhjustaks ka ulatuslikemaid puhanguid ja/või ei leviks väljaspool Austraaliat. Suurim teadaolev puhang toimus 1970-ndate lõpus ning hõlmas ligi 60 000 juhtumit Austraalias ja Polüneesias (Morrison *et al.*, 2006). Põhimõtteliselt võib RRV levida kõikidesse piirkondadesse, kus leidub tema ülekandeks sobivaid moskiitoliike. RRV peamiseks vektoriteks on *Aedes camptorhynchus*, *Aedes vigilax* ja *Culex annulirostris* (Russell, 2002). Laboratoorsetes tingimustes nakatab RRV aga ka paljude ohtlike arboviiruste (sh CHIKV, ZIKV ja Dengue viiruste) peamiseks levitajateks olevate *Aedes aegypti* ja *Aedes albopictus* rakke. Arvestades alfaviiruste võimet putukvektoreid vahetada, võib see võimaldada RRV-l levida ka oma tavalisest levialast väljapoole. Ei ole teada, kes on RRV looduslik selgroogne peremees, kuid arvestades viiruse Austraalia päritolu, on selleks tõenäoliselt kas mingi kukkurloom või siis lind. Inimene on RRV-le juhuslik peremees. Peale inimese nakatab ta sageli ka hobuseid (Azuolas *et al.*, 2003).

Enamike arboviiruste inkubatsiooniperiood kestab 5–15 päeva, jäädes alfaviiruste puhul pigem 5 päeva lähedusse. RRV põhjustatud haiguse sümptomid ei ole väga spetsiifilised, sest löövet ja liigsevalu põhjustavad ka teised arboviirused. Nii on RRV infektsiooni võimalik segamini ajada Dengue viiruse (ja ilmselt ka ZIKV) põhjustatud infektsiooniga. Eriti sarnanevad RRV tekitatud sümptomid teise Austraalias leviva alfaviiruse, Barmah Forest viiruse (BFV), tekitatud sümptomitele. Selleks, et saaks kindlalt öelda, et tegu on RRV nakkusega, tuleb koguda vähemalt kaks seerumi proovi. Akuutse faasi seerum tuleks koguda mitte hiljem kui 7 päeva pärast haigestumist (st. perioodil kui viiruse hulk veres on kõrge) ning paranemisfaasi seerum 8–28 päeva pärast haigestumist. Nendest proovidest on võimalik viirust identifitseerida seroloogiliselt (antikehade abil) (Harley *et al.*, 2001) ning RT-PCR meetodil. Kogutud proovid kujutavad endast ka väärtuslikku uurimismaterjali, mille abil saab hinnata nii viiruse infektsiooni kulgu kui ka peremehe vastust infektsioonile. Paraku ei koguta selliseid proove kaugeltki mitte kõikide patsientide puhul. Osalt seetõttu, et haiguse alguses pole sümptomid spetsiifilised. Nii on võimalik, et paljud RRV infektsioonijuhud jäävad diagnoosimata või diagnoositakse valesti.

1.2.3 IMUUNVASTUS RRV-ga NAKATUMISELE NING ARTRIIDIGA SEOTUD PATOGENEES

RRV esmase replikatsiooni koht ja sihtmärk-rakud pole teada, kuid arvestades viiruse ülekannet moskiitodega, toimub esmane paljunemine tõenäoliselt moskiito hammustuse piirkonnas. Seega, kui nakatunud moskiito on inimest hammustanud, kinnituvad RRV virionid nahas/naha all paiknevate rakkude pinnal olevatele retseptoritele ning sisenevad

rakku. Järgneb viiruse paljunemine ja levik organismis. Ka selle protsessi detailid pole teada, kuid on selge, et viirus levib skeletilihastesse ning moodustuvad virionid liiguvad suurtes kogustes verre. Levik verre (vireemia) on alfaviirusele väga oluline, kuna ainult nii saab toimuda verest toituvate moskiitode nakatumine. Seega on vireemia tekitamine vajalik tagamaks viiruse ülekandetsükli toimumist. Viiruse hulk veres saavutab kiiresti väga kõrge taseme ($>10^9$ genoomi koopiat ml vere kohta), kuid langeb seejärel kiiresti (vireemia kestab vaid mõned päevad). Selle põhjuseks on alguses tüüp I interferoonide, hiljem neutraliseerivate antikehade poolt vahendatud viiruse eemaldamine verest ja organismist. Selleks ajaks, kui ilmuvad haiguse sümptomid, on nakatunud muud koed, kuid veri on viirusest juba puhastatud. Seetõttu ei saa peale sümptomite ilmnemist viirust perifeerse vereproovi võtmise kaudu enam hästi detekteerida (Harley *et al.*, 2001).

Ehkki RRV põhjustab artriiti, ei ole seni viirusega nakatunud patsientide liigestest elujõulist viirust isoleeritud. Selle põhjuseks võib muidugi olla ka see, et vastavaid proove enamasti ei võeta (Harley *et al.*, 2001). Tõenäolisteks viirusega nakatunud rakkudeks organismis on makrofaagid. Neutraliseerivad antikehad ei suuda nakatunud makrofaage kõrvaldada, selleks on olulised RRV spetsiifilised tsütotoksilised T-lümfotsüüdid. Kroonilise liigesepõletiku tekkimine on seotud sellega, et osade patsientide organism ei suuda toota RRV spetsiifilisi tsütotoksilisi T-lümfotsüüte ning seetõttu ei puhastata organismi nakkusest (La Linn *et al.*, 1996, 1998; Linn ja Suhrbier, 1997). On näidatud ka, et RRV-ga nakatunud rakud toodavad lämmastikoksiidi, mis on põletikku põhjustav mediaator. See lubab oletada et RRV poolt põhjustatud artriit on tõenäoliselt põletikuline (Harley *et al.*, 2001).

Kokkuvõttes võib öelda, et RRV poolt inimestes tekitatava infektsiooni kohta olemasolevates teadmistes on palju ebaselget, kuid samas esineb paralleele praeguseks ajaks enim uuritud artriiti põhjustava alfaviiruse, CHIKV, infektsiooniga.

1.2.4 RRV INFEKTSIOON LABORIHIRES

RRV infektsiooni uurimine nakatatud inimeses, eriti enne sümptomite tekkimist, on keeruline ning enamasti võimatu. Samas on see ülioluline, sest alfaviiruste põhjustatud artriit on potentsiaalseks ohuks tervele maailmale. Uurimaks RRV infektsiooni erinevaid etappe kasutatakse seetõttu loomudelit – laborihiirt. Seda võimaldab asjaolu et RRV on võimeline nakatama immuunkompetentseid hiiri (ZIKV ja Dengue viirused seda ei suuda ja see on suureks probleemiks nende uurimisel). RRV tapab vastündinud hiiri, kuid vanemaid loomi reeglina mitte. Morrison ja teised sooritasid uuringu, kus leidsid, et RRV-ga nakatatud 14–15-

päeva vanustel hiirtel tekivad tõsised haiguse ilmingud (Morrison *et al.*, 2006). Hiired hakkasid lohistama oma tagumisi jalgu, samuti kaotasid nad kaalu ning väike osa nakatunud loomadest suri. Esmased sümptomid tekkisid 4–5 päeva pärast nakatamist, infektsiooni haripunkt, kus ilmsesid maksimaalselt raskekujulised sümptomid saabus 10-ndal päeval ning reeglina taandusid sümptomid 20-ndaks päevaks pärast nakatamist. Lisaks näitasid uurijad erinevate katsete tulemusena, et RRV peamiseks infektsioonikolleteks on luud, liigesed ja skeletilihased. Lisaks leiti, et teatud hiireliinidel põhjustab RRV tõsist põletikku. Seega on hiir küllaltki heaks mudelorganismiks RRV poolt põhjustatud infektsiooni ja patogeneesi uurimiseks (Morrison *et al.*, 2006). Peamiseks probleemiks on aga asjaolu, et ei ole täpselt teada, kas sümptomite tekkimine katseloomal ja inimesel on põhjustatud samade või vähemalt sarnaste mehhanismide poolt.

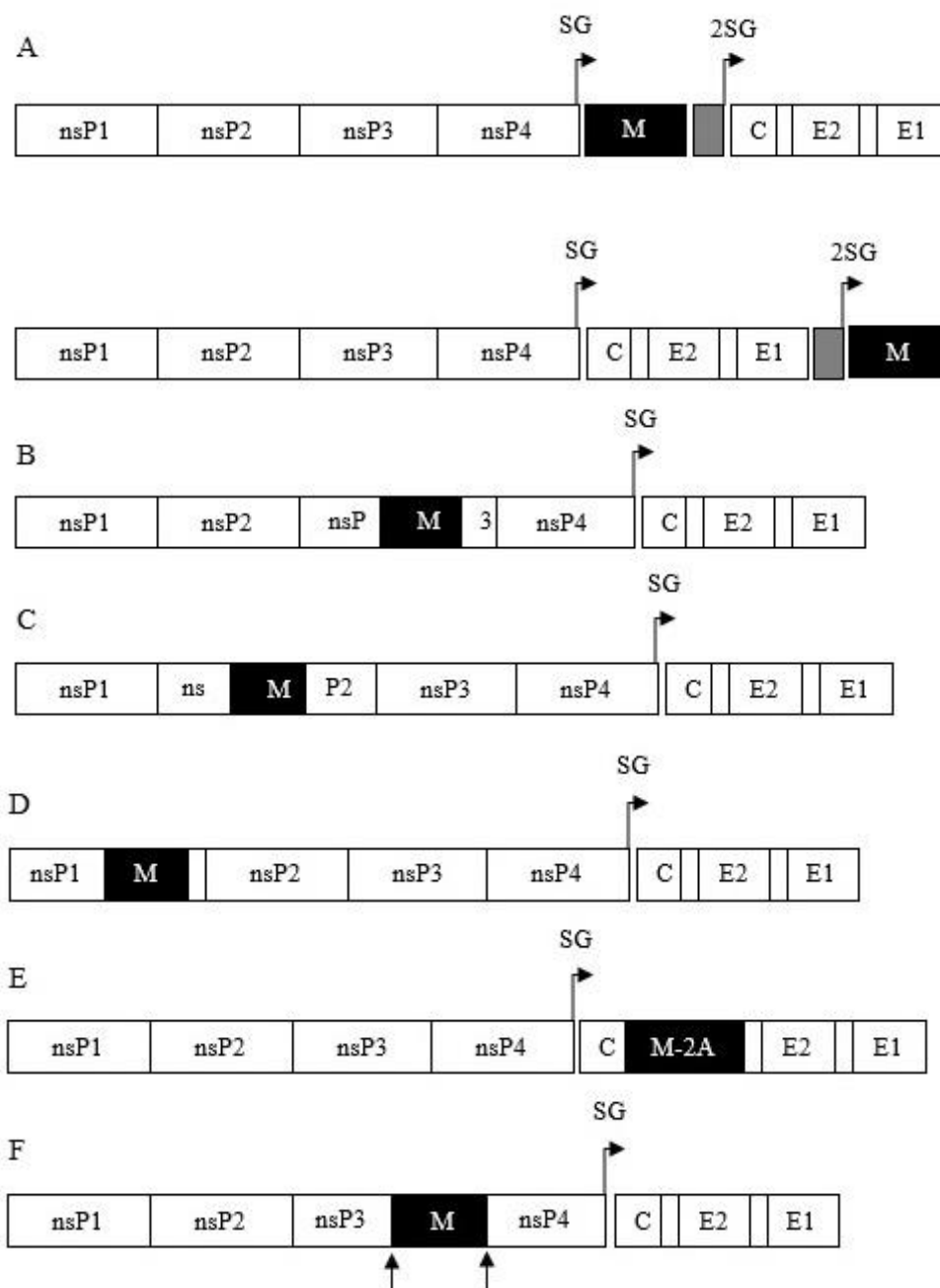
1.3 ALFAVIIRUSTE INFEKTSIOONI UURIMINE MARKERVALKE KASUTADES

Uurimaks viiruse valkude lokalisatsiooni elusates rakkudes ning seda, milliste raku komponentidega need valgud interakteeruvad, kasutatakse sageli fluoresseeruvaid markereid kodeerivaid viiruseid. Sellised viirused on samuti kasulikud viirusinfektsiooni uurimiseks *in vivo*. Paraku ei ole alfaviiruse väike genoom eriti sobilik markerjärjestuste liitmiseks. Alfaviiruste genoomi, täpsemalt selle infektsioonilise cDNA (icDNA), modifitseerimine on küll suhteliselt lihtne, kuid paraku suurendab markereid kodeerivate järjestuste lisamine oluliselt viiruse genoomi mõõtmeid. Sellised muudatused aeglustavad viiruse RNA replikatsiooni ja takistavad teatavast piirist alates genoomide pakkimist ikosaeedrilisse nukleokapsiidi. Selle tulemusena on markergeenita viirusel alati oluline konkurentsieelis (Rausalu *et al.*, 2009). Head markerviirused ongi need, mis on oma omadustelt metsiktüüpi (*wild-type*, wt) viirusele võimalikult sarnased. See sõltub aga nii markeri tüübist kui ka selle genoomi sisestamise viisist. Reeglina, mida väiksem on markervalgu järjestus, seda paremini alfaviirus seda talub. Kindlad seaduspärasused markeri sisestamise kohta puuduvad ning seetõttu on paljud sellised viirus-vektorid saadud katse ja eksituse meetodit kasutades. Mitmete uurimuste tulemusena on praeguseks välja töötatud küllaltki efektiivsed markerite sisestamise strateegiad. Tõsi, enamikke neist pole rakendatud kõikide alfaviiruste peal, piirdutud on SINV, SFV, VEEV ja CHIKV genoomidega. Seega pole selge, kuivõrd universaalsed need lähenemised on. Probleemiks on ka asjaolu, et vaid haruharva on erinevaid strateegiaid omavahel otseselt võrreldud (Rausalu *et al.*, 2009; Tamberg *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2003). Tõid, milles oleks võrreldud ühe ja sama lähenemisega saadud tulemusi erinevate alfaviiruste puhul pole aga üldse. Siiski võib erinevate uurimuste tulemustest

järeldada, et mõnede alfaviiruste puhul sobivad pigem ühed, teisele korral aga teised lähenemised. Kuute kõige levinumat markergeenide lisamise strateegiat on kujutatud joonisel 4 ning kirjeldatud kokkuvõtvalt allpool:

1. Sg promooteri duplitseerimine – duplitseerides sg promooteri järjestust on võimalik saada viiruseid, mis sünteesivad kahte sgRNA-d. Üks neist toodab viiruse struktuurvalke, teine aga markervalke (Rausalu *et al.*, 2009). Sg promooteri koopia on lühike (>100 nukleotiidijäägi) ja see paigutatakse viiruse genoomi 3' NTR-i või lühikesse lugemisraamide vahelisse mittetransleeritavasse regiooni ehk loomulikust sg promooterist allapoole (Joonis 4A).
2. Markerjärjestuse kloneerimine nsP3 valku kodeerivasse alasse (Joonis 4B) – nsP3 C-terminaalne ots pole alfaviirustel konserveerunud ja ei oma fikseeritud ruumilist struktuuri. Seetõttu on võimalik sinna suhteliselt lihtsasti liita huvipakkuvate markervalkude järjestusi (Frolova *et al.*, 2006).
3. Markerjärjestuse kloneerimine nsP2 valku kodeerivasse alasse – kuna alfaviiruste nsP2-l on viiruste replikatsioonil palju funktsioone, siis kloneerimisskeem sõltub vastava uuringu eesmärgist. Näiteks kloneerimine nsP2 C-terminaalsesse regiooni muudab SINV rakkudele mittetoksiliseks. Üldse on nsP2 valku kodeerivas alas kaks kohta, kuhu on võimalik markerjärjestusi sisestada: valgu N-otsa lähedale või lühikesse regiooni, mis jääb RNA helikaasse ja proteaasse osa vahel (Joonis 4C) (Atasheva *et al.*, 2007).
4. Markerjärjestuse kloneerimine nsP1 valku kodeerivasse alasse – nsP1 C-terminuses leidub kohti, kuhu on võimalik markereid sisestada (Joonis 4D). Siiski sõltub tolereeritavuse tase ja koos sellega ka saadud viiruse geneetiline stabiilsus täpsest positsioonist, kuhu marker lisatakse (Utt *et al.*, 2016).
5. Markerjärjestuse kloneerimine struktuursesse regiooni, näiteks kapsiidi- ja E3 valku kodeerivate alade vahele (Joonis 4E) – selle meetodi puhul toimub markervalgu ekspressioon viiruse loomuliku sg promooteri abil (duplitseerimine ei ole vajalik). Paiknemine kapsiidivalgu järel on kasulik, kuna kapsiidivalk lõikab ennast ise ülejäänud liitvalgust (ja seega ka markerist) lahti. Markervalgu vabastamiseks E3 valgust lisatakse nende vahele suu- ja sõrataudi viiruse 2A autoproteaasi järjestus (Thomas *et al.*, 2003). Peale selle saab markervalke liita ka E2 valgu N-otsale.
6. Markerjärjestuse kloneerimine nsP3 ja nsP4 valke kodeerivate alade vahele – selle meetodi puhul lisatakse markerjärjestus, mida ümbritsevad nsP2 proteaasi poolt äratuntavad lõikamisjärjestused, nsP3 ja nsP4 valke kodeerivate alade vahele (Joonis 4F). Sellise lähenemisega säilib mittestruktuurse liitvalgu õige lõikamine ning viiruse valkudele ei lisandu täiendavaid järjestusi. Nii saadud viirused on stabiilsed ja elujõulised ning

ekspresseerivad markereid suhteliselt väikesel, kuid siiski hõlpsasti detekteeritaval hulgal (Tamberg *et al.*, 2007).



Joonis 4. Peamised lähenemised markerjärjestuse (M) kloneerimiseks alfaviiruse genoomi. Genoomi 5' ja 3' NTRe pole näidatud ja joonis ei ole tehtud täpses mõõtkavas. **A.** Kaks varianti markerjärjestuse kloneerimiseks kasutades sg promooteri duplitseerimist: sisestamine loodusliku sg promooteri alla intergeenses alas (ülal) või duplitseeritud sg promooteri all peale struktuurvalke kodeerivat ala (all). **B.** Markerjärjestuse kloneerimine nsP3 valku kodeeriva ala viimasesse kolmandikku. **C.** Markerjärjestuse kloneerimine nsP2 valku kodeeriva ala keskele. **D.** Markerjärjestuse kloneerimine nsP1 valku kodeeriva ala lõppu. **E.** Markerjärjestuse kloneerimine struktuursesse regiooni C ja E3 valku kodeeriva ala vahele; 2A – suu- ja sõrataudi viiruse 2A autoproteaas. **F.** Markerjärjestuse kloneerimine nsP3 ja nsP4 valke kodeerivate alade vahele. Noolid joonise alla tähistavad markerjärjestust ümbritsevaid nsP2 proteaasi poolt äratuntavaid lõikamisjärjestusi.

Peale ülal loetletud lähenemiste saab kasutada markeri ekspressiooni IRES (*internal ribosome entry site*, sisemine ribosoomi seondumispirkond) vahendusel. Selle strateegia puhul on probleemiks asjaolu, et alfaviirused nakatavad nii selgroogseid kui ka putukaid. Paraku ei tööta tavaliselt kasutatav entsefalomüokardiidi viirusest (EMCV) pärinev IRES järjestus putukarakkudes (Atasheva *et al.*, 2011), mistõttu saab taolist markerviirust kasutada vaid selgroogsete peremeeste rakkudes (või vastavates loomudelites).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 TÖÖ EESMÄRGID

Kuigi alfaviiruste uurimisega on tegeletud aastakümneid, võib siiski eeldada, et praeguseks on teada vaid väike osa sellesse perekonda kuuluvatest viirustest. Ka on enamike praeguseks tuntud alfaviiruste kohta väga vähe teada. Ehkki RRV on tuntud juba ligi kuuskümmend aastat, on ka tema teadlaste pilkude alt pigem kõrvale jäänud. Enim uuritud alfaviirustega (SFV, SINV, CHIKV) võrreldes on RRV kohta avaldatud ligi kuus korda vähem artikleid, viiruste molekulaarbioloogiat puudutavate teadustööde osas on vahe veelgi suurem. Seetõttu ei ole ka väga palju infot meetodite kohta, mida saaks kasutada RRV uurimiseks. Samuti puuduvad paljud RRV uurimiseks vajalikud töövahendid.

Töö üldiseks eesmärgiks oli RRV uurimiseks vajalike töövahendite täiustamine ja iseloomustamine. Selleks konstrueeriti 10 mutantset viirust, kolm RRV replikoni ning VRP-de (*virus replicon particles*, viirus-replikon osakesed) saamiseks vajalikud helper vektorid. Käesoleva uurimistöö konkreetseteks eesmärkideks olid:

- Selgitada välja piirkonnad RRV nsP3 valku kodeerivas alas, kuhu oleks võimalik lisada markervalke kodeerivaid järjestusi
- Konstrueerida RRV mutandid, mis ekspresseerivad nsP3-marker liitvalke või toodavad markervalke sg promooterilt sünteesitud sgRNA-de kaudu
- Kontrollida saadud mutantide infektsioonilisust koekultuuri rakkudes ning uurida valitud mutantsete viiruste geneetilist stabiilsust mitme põlvkonna jooksul
- Uurida, kas RRV valke saab detekteerid SFV või CHIKV valkude vastu suunatud antikehade abil
- Katsetada uudset RRV replikon-vektorite ja VRP-de süsteemi.

2.2 MATERJAL JA METOODIKA

Käesolev bakalaureusetöö kujutab endast osa Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi ja Griffith University (Austraalia) tööruhmade vahelisest koostööprojektist. Sellest lähtuvalt on siin töös kasutatud paljusid uudseid töövahendeid, mille valmistamine on olnud tehniliselt üsna keeruline ning mida on tulnud valmistada ja analüüsida lühikese aja jooksul. Seetõttu on paljud siin töös analüüsitud konstruktid kavandatud ja valmistatud tööruhma teiste liikmete (peamiselt Sirle Saul ja Andres Merits) poolt. Vastavate mutantide valmistamist ei ole sellepärast allpool ka kirjeldatud. Minu poolt on kavandatud ja kokku pandud RRV mutantsed genoomid, mis kannavad markergeene nsP3 valku kodeerivas alas. Samuti on minu poolt läbi viidud kõik koekultuuri katsed ja Western blot analüüsid. Materjal ja metoodika osas ongi peamiselt kirjeldatud nendeks töödeks kasutatud meetodeid. Üldiseid standartseid meetodeid (näiteks plasmiidide puhastamist vastavate kitide abil) on kirjeldatud detailidesse minemata.

Inimese organismi sattudes põhjustab RRV T48 tõsist haigust. Sama kehtib arvatavasti ka RRV T48-l põhinevate mutantsete viiruste kohta. Seetõttu viidi kõik infektsiooniliste viirustega katsed läbi Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi BSL3* (*Biosafety level 3**) laboris, järgides kõrgendatud bioohutuse tingimusi. TÜ Tehnoloogiainstituudile on loa RRV-ga töötamiseks andnud Terviseamet. Luba töötamiseks geneetiliselt muundatud RRV-ga on väljastatud Tööinspektsiooni poolt. Koopiad nendest lubadest on toodud ka käesoleva lõputöö lisadena.

Söötmed ja lahused. Käesolevas bakalaureusetöös kasutati mitmeid erinevaid söötmeid, mille nimetused ja koostised on ära toodud allpool. Kõik söötmed sisaldasid 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini.

- GMEM sööde: GMEM (*Glasgow Modified Eagle's Medium*), 10% FCS (*fetal calf serum*, vasika loote seerum), 2% TPB (*tryptose phosphate broth*, trüptoos-fosfaat-puljong, Difco) ja 200 mM Hepes (pH 7,2).
- GMEM nakatamissööde: sama, mis GMEM sööde, aga FCS asemel kasutati 10% BSA-d (*bovine serum albumine*, veise seerumi albumiin, Sigma)
- 2% GMEM: sama, mis GMEM sööde, aga kasutati 2% FCS-i
- GMEM-CMC: 2% GMEM ja 2% CMC (karboskümetüülselluloos) segu suhtes 3:2 ehk 50 ml GMEM-CMC söötme tegemiseks kasutatakse 30 ml 2% GMEM ja 20 ml 2% CMC lahust.

Osad töös kasutatud lahused ja puhvrid pärinesid erinevatelt firmadelt ja nende koostised ei ole mitmetel juhtudel täpselt teada. Lisaks nendele kasutati järgmisi puhvreid/töolahuseid, mille valmistasin ise ja/või mis valmistati Tehnoloogiainstituudi tuumiklabori poolt:

- Semi-dry ülekandepuhver: 5,8 g Tris, 2,9 g glütsiini, 0,37 g SDS (*sodium dodecyl sulphate*, naatriumdodetsüülsulfaat), 200 ml metanooli, maht viidud veega 1 liitrini.
- 2x Laemmli puhver/lüüsilahus: 50mM Tris (pH 6,8), 2% SDS, 0,1% broomfenoolsinine, 10% glütserooli.
- Western bloti pesulahus: 50 ml Tris pH 7,5; 30 ml 5M NaCl, 1 ml Tween20, maht viidud veega 1 liitrini.
- 5% piimalahus: 50 ml 5% piimalahuse tegemiseks kasutati 2,5 g lõssipulbrit, mis lahustati 50 ml Western bloti pesulahuses
- 2% piimalahus: 50 ml 2% piimalahuse tegemiseks kasutati 1 g lõssipulbrit, mis lahustati 50 ml Western bloti pesulahuses
- SOB, SOY: vedelsöötmed (SOY puhul ka agarit sisaldavad tardsöötmed) bakterite kasvatamiseks, valmistatud Difco (Becton Dickinson & Company) valmisegudest.

Rekombinantse DNA konstrueerimine. Mutatsioonide sisseviimiseks RRV nsP3 valku kodeerivasse alasse kasutati PCR põhist mutageneesi ja subkloneermist. Esmalt lõigati RRV icDNA-d sisaldavast plasmiidist välja 1754 aluspaari pikkune lõik, mis sisaldas ka nsP3 valgu C-terminaalset domeeni kodeerivat ala. Selleks kasutati *XhoI* ja *XbaI* restriksiooniensüüme. Lõikamisel saadud fragmendid lahutati agaros-geelelektroforeesil (0,8% TAE geel). Õige pikkusega fragment lõigati geelist välja, puhastati kasutades Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitti ning ligeeriti samade ensüümidega lõigatud pKS plasmiidi fragmendiga (Stratagen). Ühe reaktsiooni kohta võeti ≈ 100 ng lõigatud pKS plasmiidi, ≈ 100 ng puhatatud RRV cDNA fragmenti (molaarne vahekord $\approx 1:2$), reaktsioon viidi läbi toatemperatuuril 1x T4 DNA ligaasi puhvris lõppmahus 10 μ l. Reaktsiooni kohta kasutati 1 μ l T4 DNA ligaasi (Thermo Scientific). Saadud plasmiidi kasutati mutatsioonide sisseviimiseks (vt. allpool). Mutatsioone sisaldavatesse plasmiididesse viidi sisse *Renilla* lutsiferaasi (Rluc), nano lutsiferaasi (NanoLuc), ZsGreen või mCherry markervalke kodeerivad järjestused, mis lõigati välja samu markergeene sisaldavatest CHIKV icDNA plasmiididest, kasutades selleks *BcuI* restriksiooniensüümi. Fragmendid puhastati agarosgeelist nagu seda on ülal kirjeldatud. Mutatsioone sisaldavaid plasmiide lõigati samuti *BcuI* ensüümiga ja saadud DNA-sid töödeldi aluselise fosfataasiga (FastAP, Thermo Scientific) vältimaks lõigatud plasmiidide iseendaga kokku ligeerumist. Ligatsioonireaktsioon viidi läbi nii, nagu seda on kirjeldatud

ülal. Saadud plasmiididest, mis sisaldasid õiges orientatsioonis paiknevaid markergeenide järjestusi, lõigati välja markergeeni ning nsP3 järjestusi sisaldavad fragmendid, kasutades selleks restriksiooniensüüme *NdeI* ja *XhoI* (vastavad lõikesaidid on RRV T48 icDNA-s unikaalsed). Fragmendid liideti samade ensüümidega lõigatud RRV icDNA plasmiidiga, kasutades üleval kirjeldatud lähenemist. Ligatsioonisegusid kasutati bakterite transformeerimiseks kuumašoki meetodil.

PCR (*polymerase chain reaction*, polümeraasi ahelreaktsioon) põhine mutageenes.

Markervalke kodeerivate järjestuste kloneerimiseks vajaliku *BcuI* restriksioonisaidi sisseviimiseks RRV nsP3 valku kodeerivasse alasse kasutati PCR põhist mutageneesi. Kuna markergeeni lisati kahte erinevasse järjestusse, viidi läbi kaks mutageneesi reaktsiooni. Nendes reaktsioonides kasutatud praimerite järjestused on toodud allpool.

Reaktsioon A (*BcuI* lõikesaidi sisseviimine nsP3 valku kodeeriva ala koodon 400 ja 402 vahele st. koodon 401 asendati ACT AGT järjestusega)

Forward: 5'GCGACTAGTAGGGTCGAGATCCCCGTGTACG 3'

Reverse: 5' TGCACTAGTCGCAATCGGGGTGTGCATG 3'

Reaktsioon B (*BcuI* lõikesaidi sisseviimine nsP3 valku kodeeriva ala koodon 425 ja 426 vahele)

Forward: 5' TATACTAGTGCAAAACCCATACCAGCACCCAC 3'

Reverse: 5'TGCACTAGTATACTCGCTTGTGCAAGGAATTGC 3'

Reaktsiooni läbiviimiseks segati kokku reaktsioonisegu, mis koosnes kahest praimerist (*forward* ja *reverse*, kumbagi 50 picomooli), 40 µM dNTP segust, 1 µl Phusion PCR polümeraasist (Thermo Scientific), 1xHighFidelity puhvrist, veest ning DNA matriitsist (10 ng reaktsiooni kohta). Reaktsioon viidi läbi mahus 50 µl, kasutades järgnevaid parameetreid:

- Algne denatureerimine 98 °C 30 sekundit
 - Denatureerimine 98 °C 15 sekundit
 - Praimerite seondumine ja DNA süntees 72 °C 2 minutit ja 15 sekundit
 - Täiendav inkubeerimine 72 °C 3 minutit
- } x 25

Programmi lõppedes tõsteti proovid jääle. Võeti 2,5 µl reaktsioonisegu, millele lisati 2,5 µl 6x foreesivärvi ja 10 µl vett ning kanti 0,8% TAE geelile. Geelile pandi ka fragmentide suuruse hindamiseks vajalik marker (Naxo). Elektroforeesil (ca 10 V/cm) lasti kesta seni, kuni proovid olid hästi lahutunud. Soovitud produkti olemasolu tehti kindaks DNA-ga seondunud etiidiumbromiidi UV (lainepikkus 254 nm) valguses vaatlemise teel. Kuna peale õigete produktide muid DNA fragmente proovides ei tuvastatud, puhastati amplifitseeritud DNA otse PCR segust, kasutades Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitti. Saadud

DNA lahusele lisati 1 µl FastDigest *DpnI* ensüümi (lõikab metüleeritud matriits-DNA-d, kuid ei lõika metüleerimata PCR produkti) ja 1 µl *BcuI* ensüümi (lõikab PCR produkti otstes paiknevaid praimeritest pärinevaid äratundmissaite). Reaktsioon toimus 15 minutit 37 °C juures. DNA puhastamiseks kasutati taas Macherey-Nagel kitti, DNA elueeriti kolonnilt 20 µl veega. Saadud DNA-de järjestusi kontrolliti Sanger sekveneerimise abil (Eesti Biokeskuse tuumiklabor). Järgnevalt lisati 100 ng PCR produktile 1 µl T4 DNA ligaasi ja viidi läbi ligeerimine (1x T4 DNA ligaasi puhver, 2 tundi toatemperatuuril). Ligatsioonisegu kasutati bakterite transformeerimiseks.

***Escherichia coli* rakkude transformeerimine kuumašoki meetodil.** Seda meetodit kasutati nii algplasmiidide paljundamiseks vajalike bakterikolooniate saamiseks kui ka ligeerimise tulemusel saadud DNA konstruktide kloonimise käigus. Kasutatud rakutüve (*Escherichia coli* NEB TURBO) valik põhines eelnevatest töödest pärit teadmistel, et enamikes *Escherichia coli* tüvedes (XL-10; DH5alpha, SURE) paljunevad RRV icDNA-d sisaldavad plasmiidid halvasti ja/või on ebastabiilsed. Transformeerimiseks lisati algplasmiidile (ca 10 pg) või DNA ligatsioonisegule 200 µl *Escherichia coli* NEB TURBO kompetentseid rakke. Rakke hoiti 0 °C juures (jääl) pool tundi. Pärast seda tõsteti proovid kuumašoki tegemiseks kaheks minutiks 42 °C juurde. Pärast kuumašokki hoiti proove kaks minutit jääl. Rakkude taastumiseks lisati neile 1 ml SOC söödet (SOB sööde + 10 mM glükoos) ning lasti neil olla 37 °C juures 45–60 minutit. Peale seda külvati rakud klaaskuulikeste abil 10 cm diameetriga ampitsilliini (100 µg/ml) sisaldavatele SOY agariga Petri tassidele. Tasse inkubeeriti 16–18 tundi 37 °C juures ning pärast seda loendati tekkinud bakterikolooniad.

Bakterikultuuride kasvatamine vedelsöötmes, DNA puhastamine mini- ja midipreparatsioonide teel. Minipreparatsioonide jaoks vajalike bakterikultuuride kasvatamiseks valiti transformeeritud rakke sisaldavalt tassidelt kuni kuus (sõltuvalt transformatsiooni eesmärgist ja edukusest) individuaalset kolooniat, mida kasutati 2,5 ml SOY vedelsöötme (sisaldas ampitsilliini 50 µg/ml) inokuleerimiseks. Söödet sisaldavad katseklaasid pandi loksutisse ning inkubeeriti 16–18 tundi 37 °C, 220 RPM (*revolutions per minute*, pööret minutis) juures. Pärast seda puhastati plasmiidid kommertsiaalse kitiga (FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit, Favorgen Biotech Corp.) tootjapoolse protokoll järgi. Saadud DNA proovide kontsentratsioonid mõõdeti Nanodrop spektrofotomeetriga ning plasmiidide õigsust kontrolliti restriksioonianalüüsi ja Sanger sekveneerimise teel. Korrektseid plasmide sisaldavaid baktereid paljundati järgnevalt suuremates kogustes. Selleks külvati bakterid 40 ml SOY söötmesse (ampitsilliin 50 µg/ml), kolvid pandi loksutisse

ning inkubeeriti 18–20 tundi 37 °C ja 220 RPM juures. Pärast seda puhastati plasmiidid kommertsiaalse kitiga (Macherey-Nagel DNA, RNA and protein NucleoBond Xtra Midi kit). Kokku konstrueerisin 5 markergeeni sisaldavat RRV icDNA varianti, nende nimetused on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Töös konstrueeritud ja kasutatud RRV plasmiidid

Plasmiidi nimetus	Päritolu
RRV T48 wt	Algplasmiid
RRV P3A-mCherry	Minu konstrueeritud
RRV P3A-ZsGreen	Minu konstrueeritud
RRV P3B-ZsGreen	Minu konstrueeritud
RRV P3A-Rluc	Minu konstrueeritud
RRV P3A-NanoLuc	Minu konstrueeritud
RRV 2SG	Sirle Saul
RRV 2SG-mCherry	Sirle Saul/Andres Merits
RRV 2SG-ZsGreen	Sirle Saul/Andres Merits
RRV 2SG-Gluc	Sirle Saul/Andres Merits
RRV del45	Sirle Saul
RRV Repl-mCherry	Sirle Saul/Andres Merits
RRV Repl-ZsGreen	Sirle Saul/Andres Merits
RRV Repl-Gluc	Sirle Saul/Andres Merits
RRV Helper E	Sirle Saul
RRV Helper C	Sirle Saul

Lisaks kasutasin töös algplasmiidi pRRV T48 ning viite Sirle Sauli ja Andres Meritsa poolt konstrueeritud RRV icDNA varianti. Peale selle katsetasin kolme RRV replikoni vektorit ja nendega kokku sobivaid RRV helper-RNA-sid kodeerivaid vektoreid (Tabel 1). Replikonid on sellised mutantsed genoomid, kus on olemas RRV ns valke kodeerivad ja RNA replikatsiooniks/transkriptsiooniks vajalikud alad, kuid puudub struktuurseid valke kodeeriv regioon. Seetõttu imetajarakkudesse viidud replikon RNA küll replitseerub ja toodab ka markervalku, kuid ei suuda ise virione moodustada.

***In vitro* transkriptsioon.** *In vitro* transkriptsiooni läbiviimiseks lineariseeriti RRV icDNA-d (või replikoni/helper RNA cDNA-d) sisaldavad plasmiidid. Kasutatud reaktsioonisegu

koosnes FastDigest puhvrist, ensüümist *Ecl136II* (lõikab konstrukte ühest kohast, mis paikneb vahetult polü(A) järjestusest allpool) ning 6 µg DNA proovist. Lineariseerimine toimus 37 °C kraadi juures kahe tunni jooksul. Lõigatud DNA puhastati Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitiga, elueerimismahuks oli 15 µl. Lõikamise efektiivsuse määramiseks kasutati elektroforeesi 0,8% TAE agarosgeelis. Puhastatud DNA kontsentratsiooni määramiseks kasutati Nanodrop spektrofotomeetrit.

RNA sünteesiks kasutati mMessage mMachine SP6 kitti (Ambion INC The RNA Company) ning sellega kaasasolevat protokollit. Protokollit järgi valmistati reaktsioonisegu (kogumaht 5 µl), mis koosnes 2,5 µl NTP/cap-analoog segust, 0,5 µl 10x reaktsioonipuhvist, 0,75 µl GTP lahusest, 0,5 µl ensüümide segust ning 0,75 µl lineariseeritud DNA-st. RNA süntees viidi läbi 37 °C juures kahe tunni jooksu. Lisaks sünteesiti ka referents-RNA, mille alusel hinnati hiljem saadud RNA produktide kontsentratsioone. Referents-RNA sünteesimiseks kasutati samu komponente, kuid reaktsiooni mahuks oli 20 µl. Peale sünteesi lõppu puhastati referents-RNA mitteseondatud nukleotiididest, kasutades RNeasy kitti (Qiagen) ning järgides sellega kaasasolevat protokollit. Referents-RNA elueeriti 20–30 µl. Mitteseondunud nukleotiidide eemaldamine võimaldas mõõta referents RNA kontsentratsiooni spektrofotomeetri abil. Sünteesitud RNA-d tõsteti kohe jääle, lisati kontsentratsioonide optimeerimiseks 10 µl RNAaside vaba vett ning segati korralikult. Edasi kanti 1% TAE agarosgeelile nii referents-RNA (kontsentratsioonid vahemikus 0,3-2,4 µg raja kohta) kui ka 1 µl igast sünteesitud RNA reaktsioonisegust. Kõikidesse proovidesse lisati ka vajalik kogus foreesivärvi. Elektroforeesil lasti joosta 150 V juures. Reaktsioonide saagist hinnati kõigepealt vaadeldes etiidiumbromiidiga värvitud geeli UV valguses. Kui RNA süntees õnnestus, kvantifitseeriti sünteesitud RNA-de kogused, kasutades selleks Typhoon TRIO masinat (Amersham Bioscience) ning Image Quant programmi. Saadud tulemustest lähtudes arvestati välja imetajate rakkude transfitseerimiseks vajalikud RNA-de kogused.

Rakkude kasvatamine ja lahtilöömine. Kõikides *in vitro* koekultuuri katsetes kasutati BHK-21 (*baby hamster kidney*, beebihamstri neeru) rakuliini. Vedelas lämmastikus hoitud rakud sulatati üles ning pandi 10 cm diameetriga Petri tassile GMEM söötmesse kasvama. Päeva pärast vaadati rakke mikroskoobi all ning kui nende kasvutihedus (konfluentsus) oli umbes 85%, löödi rakud lahti. Selleks eemaldati tassilt sööde ning rakukultuuri pesti söötmejääkidest lahtisaamiseks 1x PBS-ga (*Phosphate buffered saline*, fosfaat-puhverdatud soolalahus), mida lisati rakkudele ettevaatlikult tassi külje pealt vältimaks rakkude plastikult lahtitulemist. Seejärel loksutati tassi õrnalt ning eemaldati PBS. Rakud võeti plastikult lahti töödeldes neid trüpsiini lahusega umbes ühe minuti jooksul. Pärast seda lisati tassile 2 ml

GMEM söödet ning rakud viidi suspensiooni pipeteerimise teel. Saadud suspensioonist kanti uutele Petri tassidele, mis sisaldasid 7 ml GMEM söödet, soovitud kogus rakke. Näiteks 1:3 lahjenduse saamiseks kanti uuele tassile 1/3 algselt tassilt kogutud rakke. Rakkudel lasti kasvada 37 °C inkubaatoris, 5% CO₂ juures seni, kuni rakukultuur saavutas edasisteks katseteks soovitud tiheduse.

Infectious centre assay (ICA) – infektsioonitsentrite analüüs. Iga sünteesitud RNA proovi ning ka *mock* (kontrollrakud) transfektsiooniks kasutati BHK-21 rakke, mida oli 10 cm diameetriga Petri tassil kasvatatud ca 90% kasvutiheduseni. Rakud eemaldati ülal kirjeldatud meetodil plastikult, koguti 50 ml koekultuuri tuubi ning sadestati tsentrifuugimise teel (Eppendorf 5810 tsentrifuug, rootor A-4-82, 5 minutit 1000 RPM). Sadestatud rakkudelt eemaldati söötme ja trüpsiini segu ning rakud suspendeeriti külmas PBS-s. Edasi võeti varasemalt kokku segatud RNA reaktsioonisegud (3 µg RNA-d, viidud veega kogumahuni 25 µl) ning sooritati elektroporatsioon. Selleks tõsteti eelnevalt jään jahutatud elektroporatsiooni küvetti (elektroodide vahe 4 mm) 800 µl rakkude suspensiooni ning lisati sellele RNA proov. Küvett paigutati elektroporatsiooni masinasse (BioRad GenePulser Xcell), mida oli eelnevalt seadistatud nii, et elektroporatsiooni parameetrid oleksid 850 V ja 25 µF. Rakke pulseeriti kaks korda, segades pulsside vahel rakke koputades küveti küljele. Kohe pärast elektroporatsiooni lisati küvetti 800 µl GMEM söödet. Elektroporatsiooni segust tehti GMEM söödet kasutades seeriaviisilised lahjendused alates 10⁻¹ kuni 10⁻⁶. 10⁻¹ lahjenduse saamiseks asetati katseklaasi 1080 µl GMEM söödet ning 120 µl elektroporatsioonisegu. Järgnevateks lahjendusteks tõsteti esimesest katseklaasist 120 µl järgnevasse (sisaldas samuti 1080 µl GMEM söödet), loksudades vahepeal õrnalt segamiseks. Saadud lahjendustest kanti 1 ml rakkude suspensiooni konfluentsetele BHK-21 rakkudega kaetud 6-augustele plaatidele. Elektroporeeritud rakkudel lasti rakukultuurile seonduda 37 °C inkubaatoris, 5% CO₂ juures 2–3 tunni jooksul. Pärast seda eemaldati GMEM sööde ning pandi rakkudele lüüsilaiikude saamiseks peale 2 ml GMEM-CMC söötmesegu. Plaat inkubeeriti 37 °C juures inkubaatoris, 5% CO₂ juures kuni 72 tundi. Lüüsilaiikude visualiseerimiseks eemaldati plaatidelt sööde, rakkude fikseerimiseks lisati igasse plaadiauku 1 ml 10% formaldehüüdi/PBS segu ning inkubeeriti UV-kiirguse all 30 minutit. Pärast seda värviti rakke kristallviolett värviga (20% metanooli, 0,2% kristallvioletti). Plaadid pesti veega värvist puhtaks, kuivatati ning loendati lüüsilaiikud. Nende järgi arvutati ICA tiiter, mis näitab rekombinantse viiruse vabanemise efektiivsust.

Ülejäänud elektroporatsiooni segu kanti 10 cm diameetriga Petri tassile, kuhu oli eelnevalt lisatud 7 ml GMEM söödet. Rakke inkubeeriti 37 °C inkubaatoris, 5% CO₂ juures 24–48

tundi. RRV infektsiooni tulemusel tekkinud tsütopaatilise efekti (rakkude ümardumine, lahtitulek plastikult) ilmnemisel koguti viirust sisaldav sööde 15 ml tuubi ning tsentrifuugiti 4000 RPM juures 15 minutit (Eppendorf Centrifuge 5810R, rootor A-4-81). Sellega tagati see, et surnud rakud ja nende jäänused sadenesid põhja ning viirus jäi söötmesse. Saadud viirusvaru kujutab endast P0 põlvkonda, mida edasiste uuringuteks tarvis säilitati -80 °C juures.

Viirusvarude tiitri määrmine lüüsilaikude meetodil ja viirusvarude paljundamine.

Viirusvarude tiiter määrati lüüsilaikude meetodil. See meetod on identne ICA-ga välja arvatud see, et 6-augusel plaadil ette kasvatatud BHK-21 rakkude nakatamiseks kasutati siin juba olemasolevat viirusvaru (P0-P5). Kasutatud lahjendused jäid vahemikku 10^{-3} — 10^{-8} . Iga augu kohta võeti 300 µl viiruse lahjendust. Plaadid tõsteti jällegi 37 °C inkubaatorisse, 5% CO₂ juurde. Neid loksuti iga 20 minuti tagant, tagamaks viiruse ühtlast jaotumist ning vältimaks rakkude kuivamist. Ühe tunni möödudes eemaldati GMEM nakatamissööde ning rakkudele lisati (2 ml augu kohta) GMEM-CMC söötmesegu. Rakud fikseeriti ja lüüsilaigud visualiseeriti ülalpool kirjeldatud meetodil. Sarnast protokollit kasutati ka viiruse mutantide stabiilsuse hindamiseks. Erinevus seisnes selles, et enne rakkude fikseerimist ja värvimist loendati fluoretsentsmikroskoobi abil fluoreseeruvat markerit ekspresseerivate viiruste poolt tekitatud lüüsilaigud.

P0 (ja järgnevate põlvkondade) viirusvarude paljundamine viidi läbi madala MOI (*multiplicity of infection*, infektsiooni kordusnumber) juures. Selleks nakatati 90% konfluentsusega BHK-21 rakke, lisades neile viirust arvestusega 1 infektsiooniline virion (pfu, *plaque forming unit*) 10 raku kohta (MOI=0,1). Nakatamine viidi läbi nagu ülal kirjeldatud. Tasse inkubeeriti nakatamissöötmes 37 °C ja 5% CO₂ juures, loksutades iga 20 minuti järel. Tunni aja möödudes eemaldati viirus ning pandi peale 7 ml GMEM-i ning inkubeeriti samadel tingimustel nagu enne kuni tsütopaatilise efekti tekkimiseni. Viirused koguti nagu seda on kirjeldatud ülal.

Markervalkude ekspressiooni ja nende aktiivsuse määramine. Viiruste ja replikonide puhul, mille genoomi on liidetud luminesseeruvaid markereid (Rluc, NanoLuc, *Gaussia* lutsiferaas (Gluc)) kodeerivad järjestused, hinnati markerite ekspressiooni, mõõtes vastava lutsiferaasi aktiivsust nakatatud (või tranfekteeritud) rakkudes. Selleks kasutati Promega Rluc lutsiferaasi aktiivsuse määramise reagentide (Promega Luciferase Assay System kit) ja Promega Glowmax 20/20 luminomeetrit. Pärast viirusvaru kogumist tassile jäänud rakud lüüsiti lüüsilahusega ning inaktiveeriti UV-kiirguse abil kümne minuti jooksul. Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine viidi läbi vastavalt tootjapoolsele (Promega) protokollile. Kuna Gluc on sekreteeritav valk, mõõdeti selle aktiivsus otse sööttest.

Viiruste ja replikonide puhul, mis ekspresseerivad fluorestseeruvaid mCherry või ZsGreen markereid, jälgiti nakatatud (transfekteeritud) rakkude helendust Olympus fluorestsentsmikroskoobi abil, kasutades vastavaid filtreid. Nakatunud rakkudest piltide tegemiseks rakud fikseeriti 4% formaldehüüdiga, hoides tase 40 minutit UV-kiirguse all (selle protsessi käigus viirus inaktiveerub). Pildid saadi ja salvestati kasutades kaameraga varustatud Nikon fluorestsentsmikroskoopi. Pildistamise viis läbi Eva Žusinaite.

Viirus-replikon osakeste (VRP-de) saamine ja nende hulga hindamine VRP varude lahjedamise meetodil. VRP-de saamiseks transfekteeeriti BHK-21 rakke kolme RNA (RRV Repl-ZsGreen, RRV Helper E ja RRV Helper C) seguga nagu seda on kirjeldatud ICA puhul. VRP-sid sisaldav sööde koguti ka samamoodi nagu ülevalpool kirjas. Saadud söötmetest tehti lahjendused ning nendega nakatati kahes korduses 12-augusel plaadil kasvavaid BHK-21 rakke. Positiivseks kontrolliks olevaid rakke nakatati RRV 2SG-ZsGreen viirusega, negatiivseks kontrolliks olid nakatamata rakud. Tehtud VRP-de (või viiruse) lahjendustest kanti igasse auku 100 µl VRP-de varu ja GMEM nakatussöötme segu. ZsGreen markeri ekspressiooni vaadati 24 ja 48 tundi pärast nakatamist. Nakatamise efektiivsuse hindamiseks ja VRP-de tiitri määramiseks loendati 20-nes vaateväljas olevad roheliselt fluorestseeruvad rakud ning arvutati nende aritmeetiline keskmine. Võttes arvesse helendavate rakkude arvu, kasutatud suurendust (20x) ja lahjendusfaktoreid, arvutati VRP-de tiitrid.

Western blot analüüs. Käesolevas töös kasutati Western blot (immuunoblot) analüüsi selleks, et teada saada, kas RRV valke on võimalik tuvastada, kasutades varasemalt SFV ja CHIKV valkude vastu valmistatud polükloonaalseid küüliku antiseerumeid.

Western blot analüüsiks kasutati RRV T48-ga nakatatud rakkudest valmistatud lüsaate, kontrolliks oli nakatamata BHK-21 rakkudest valmistatud lüsaat. Lüsaatide saamiseks lisati 10 cm diameetriga Petri tassidel olevatele rakkudele 1 ml 1x Laemmli lüüsipuhvrit. Valkude denatureerimiseks kuumutati lüsaate 5 minutit 100 °C juures. Saadud proovid kanti denatureerivale 10% SDS-polüakrüülamiidgeelile nii, et igasse hambasse kanti 10 µl rakulüsaati (vastab ligikaudu 10⁵ rakule) ja seejärel lahutati valgud elektroforeesi abil. Lahutatud valgud kanti üle nitrotselluloosfiltrile (“Amersham”, PrototamTM-ECLTM), kasutades *Trans-Blot Semi-Dry* aparaati (“Bio-Rad”). Valkude ülekandmine membaanile viidi läbi 15 V juures ühe tunni vältel Semi-Dry puhvris. Seejärel blokeeriti membraan kasutades selleks 5% piimapulbri lahust (inkubeeriti kas 4 °C juures üleöö või 60 minutit toatemperatuuril loksutil). Pärast blokkimist asetati membraanid 2% piimapulbri lahusesse, mis sisaldas ka primaarset antikeha ning inkubeeriti toatemperatuuril loksutil 60 minutit. Seejärel eemaldati mitteseondunud antikehad pestes membaani 3 korda (iga kord 10 minutit)

Western bloti pesulahusega. Pesu järel pandi membraanid uuesti 2% piimalahusesse, kuid seekord koos sekundaarse antikehaga, milleks oli küüliku immuunoglobuliin G (IgG) vastane määrõika peroksidaasiga (HRP – *horseradish peroxidase*) konjugeeritud antikeha ning inkubeeriti loksutil 60 minutit. Inkubatsiooni lõppedes pesti membraani jällegi 3 korda 10 minutit pesulahusega. Seejärel segati kokku kaks kemoluminesentsi tekitavat HRP substraati sisaldavat lahust (ECL kit, GE Healthcare). Saadud segu kanti tsellofaanile, kuhu asetati membraan(id). Luminesentsi detekteerimiseks eksponeeriti membraani röntgenfilmile. Pärast eksponeerimist film ilmutati, kuivatati ning sellele märgiti markervalkude asukohad. Selle järgi hinnati antikehade abil detekteeritud valkude suuruseid ja nende vastavust RRV valkude molekulaarsetele massidele.

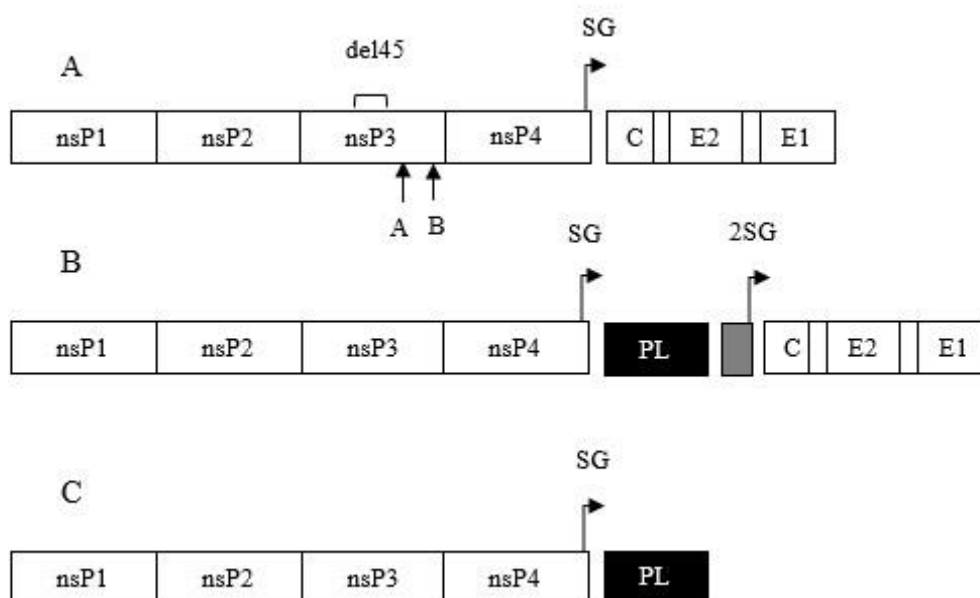
2.3 TULEMUSTE ANALÜÜS JA ARUTELU

RRV on meditsiiniliselt oluline, kuid siiski suhteliselt vähe uuritud viirus. Eriti puudulikud on andmed viiruse molekulaarbioloogia kohta. Osalt on selle põhjuseks uurimistöödeks vajalike tööriistade puudumine, kuid samas takistab vähene teave viiruse molekulaarbioloogia kohta selliste tööriistade valmistamist. Replikonvektori kavandamine on muidugi suhteliselt lihtne, sest vaja on deleteerida ainult struktuurne regioon, kuid toimivate helper-RNA-de kavandamine on keerulisem ülesanne. Samuti ei ole olemas andmeid, mille alusel otsutada, kuhu ja kuidas RRV genoomi viia markervalke kodeerivaid järjestusi ning millised olemasolevatest markeritest selleks sobivad ja millised mitte. Markervalke kodeerivate järjestuste viimine subgenoomse promooteri alla on suhteliselt lihtne ning toimib kõikide seni uuritud alfaviiruste puhul. Samas on igal alfaviirusel erinev piirkond, kuhu saab paigutada täiendava subgenoomse promooteri ning ka see, kui pikk see olema peaks. Markeri paigutamine nsP3 ja nsP4 vahele nõuab täpseid teadmiseid RRV P1234 liitvalgu lõikamise kohta, mida aga pole. Isegi markeri liitmine nsP3 valgu C-terminaalsesse regiooni pole nii lihtne. Sellel regioonil puudub küll fikseeritud ruumiline struktuur, kuid samas paikneb seal arvukalt motiive, mida viirus kasutab seondumiseks raku valkudega. Labori senised kogemused on näidanud, et taolise motiivi katkestamine markervalgu insertsiooni teel muudab rekombinantse viiruse geneetiliselt ebastabiilseks. Probleem on selles, et selliseid motiive ja nende tähtsust viirusele pole võimalik üldjuhul ette ennustada. Kuna nsP3 C-terminaalsed regioonid ei ole konserveerunud, siis ei saa ka kopeerida teiste alfaviiruste puhul kasutatud disaine. See jätab kaks võimalikku lähenemist: kogu nsP3 järjestuse skanneerimine, kasutades näiteks transposoon vahendatud mutageneesi nagu seda tehti SINV nsP2 puhul (Atasheva *et al.*, 2007) või kasutada katse ja eksituse meetodit. Lähtudes sellest, et nsP3 C-

terminaalse regiooni kohta on teiste alfaviiruste puhul päris palju teada, valiti kombinatsioon ratsionaalsest kavandamisest (võlditi juba tuntud motiivide rikkumist) ning katse ja eksituse meetodist.

2.3.1 SUUR DELETSIOON RRV NSP3 REGIOONIS ON VIIRUSELE LETAALNE

Esimeses RRV mutandis kõrvaldati mutageneesi abil nsP3-s regioon, mis vastab oma paiknemiselt, kuid mitte järjestuselt SFV nsP3 valgu fosforüleerimise järjestusele (Joonis 5A). On teada, et nii SFV kui ka CHIKV taluvad selles regioonis suuri deletsioone (Hallengård *et al.*, 2014; Vihinen *et al.*, 2001). Deletsiooni sisaldav mutant RRV del45 valmistati Sirle Sauli poolt ning sisaldab 45 ah jäägi pikkust deletsiooni nsP3 valgus (puudu on ah jäägid 323-367).



Joonis 5. Kasutatud viiruste ja replikonide genoomide skeemid. Joonis ei ole mõõtkavas ja viiruse (replikoni) 5' ja 3' NTR-e ei ole näidatud. **A.** Deletsiooni regioon ja kaks piirkonda markerite kloonimiseks nsP3 valgu kodeerivas alas. Deletsioon on märgitud joonise kohal, markerite lisamise positsioonid (A ja B) nooltega joonise all. Positsiooni A kasutati ZsGreen, mCherry, Rluc ja NanoLuc sisestamiseks ning positsiooni B ainult ZsGreen kloonimiseks. **B.** Duplitseeritud sg promooteriga konstrukt RRV 2SG. **C.** RRV Repl konstrukti skeem. **B, C.** PL – polülinker. Sellesse viiruse sg promooteri alla olevasse järjestusse kloonitati ZsGreen, mCherry ja Gluc markerjärjestused.

Ideeks oli uurida, kas ka RRV talub antud mutatsiooni ning kui jah, siis kas seda regiooni saab kasutada markerite lisamiseks ja konstrukti ennast RRV vastase vaktsiinikandidaadina. Paraku näitas selle mutandi analüüs ICA meetodil, et konstrukt ei tooda lüüsilaike moodustavat viirust, seda kinnitas ka rakkude nakatamine kogutud viirusvaruga (Tabel 2).

Tabel 2. Töös kasutatud rekombinatsete viiruste vabanemine ja paljunemine BHK-21 rakkudes. ND – *not detected*, lüüsilaike ei tekkinud (katse sooritati kaks korda). RRV P3A ZsGreen ja RRV P3B ZsGreen puhul on näidatud kolme, RRV 2SG ZsGreen ja RRV del45 puhul kahe katse keskmine tulemus. Ülejäänud konstruktidega sooritati ainult üks katse.

Viiruse nimi	ICA		P0 viirusvaru	
	Lüüsilaigu diameeter	Vabanemise efektiivsus wt RRV või RRV 2SG* suhtes (%)	Lüüsilaigu diameeter	Tiiter (pfu/ml)
RRV T48 (wt)	2—4 mm	100	valdavalt 3—5 mm	Kuni 10^9
RRV del45	ND	0	ND	ND
RRV P3A ZsGreen	3—4 mm	99	3—5 mm	$1,29 \times 10^8$
RRV P3B ZsGreen	2—3 mm	27	2—4 mm	$7,93 \times 10^7$
RRV P3A mCherry	2—4 mm	124	3-4mm	$1,98 \times 10^8$
RRV P3A Rluc	2—3 mm	53	4—5 mm	$3,3 \times 10^7$
RRV P3A NanoLuc	3 mm	1	2—4 mm	$1,13 \times 10^8$
RRV 2SG	2—4 mm	100*	3—5 mm	$9,67 \times 10^8$
RRV 2SG mCherry	2—3 mm	0,17*	3—4 mm	$4,47 \times 10^8$
RRV 2SG ZsGreen	2—3 mm	0,24*	2—4 mm	$6,47 \times 10^8$
RRV 2SG Gluc	2—3 mm	0,32*	3—5 mm	8×10^8

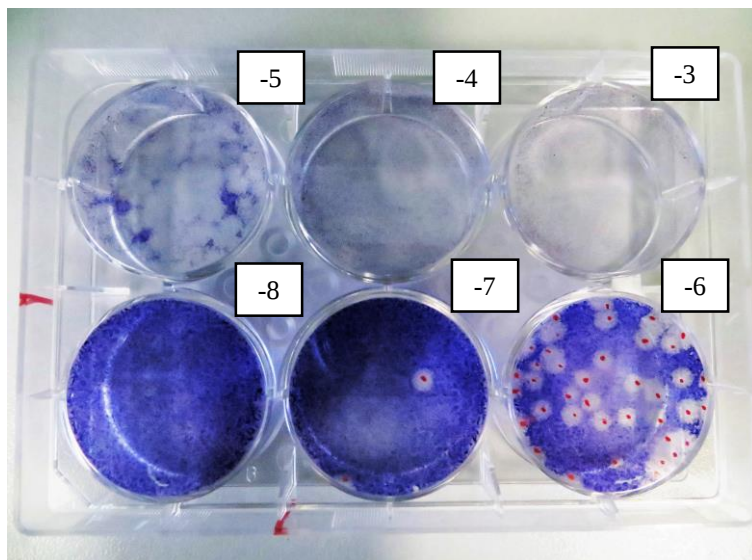
Sama tulemuse andis ka korduskatse. Sellisel tulemusel on kaks võimalikku seletust. Esiteks, erinevalt SFV-st ja CHIKV-st võib RRV puhul deleteeritud regioon sisaldada ühte või enam viirusele absoluutselt olulist järjestust, mistõttu RRV del45 on mitteinfektsiooniline. Teiseks on võimalus, et see mutant on küll infektsiooniline, kuid deletsiooni tõttu on ta kaotanud võime rakke tappa ning ei tekita seetõttu lüüsilaike. Nende kahe võimaluse eristamiseks on vaja transfitseeritud/nakatud rakkude lüsaate analüüsida Western blot meetodil, et teha kindlaks kapsiidivalgu ekspressioon või selle puudumine. Kapsiidivalgu süntees sõltub rangelt RNA replikatsioonist, sest vajab sgRNA sünteesi ning selle uurimine on seetõttu vägaks heaks indikaatoriks mõistmaks, mis mutandis toimub. Alternatiivselt saab mutantse viiruse genoomi viia markervalke kodeerivaid järjestusi, mistõttu muutub võimalikuks infektsiooni jälgimine. Tänu selles töös välja töötatud meetoditele on võimalikud mõlemad lähenemised, kuid hetkel pole neist kumbagi katsetatud. Praegu tundub aga kõige tõenäolisem võimalus, et RRV del45 ei ole üldse infektsiooniline. Nimelt on meie koostööpartnerid

näidanud, et RRV-l paikneb deleeritud järjestuses vähemalt üks viirusele oluline motiiv, mis asub SFV-l deletsioonipiirkonnast väljaspool. Seda saadi teada pärast RRV del45 mutandi kavandamist. Samuti on nemad ja meie töörühm näidanud, et SFV ja CHIKV vastavad regioonid on küll deleteeritavad, kuid neid ei saa omavahel vahetada (Thaa *et al.*, 2015). Seega on kahtlemata tegemist funktsionaalselt tähtsa piirkonnaga ning kui edaspidises töös on kavas kasutada selles regioonis modifitseerimist RRV vastaste vaktsiinikandidaatide saamiseks, peaksid vastavad muudatused olema kas lühema deletsiooni kasutamine või siis järjestikused punktmutatsioonid, mis jätaksid olulise interaktsioonimotiivi puutumata. Käesoleva töö jaoks otseselt oluliseks jäelduseks on see, et nsP3 regioon ah jääkide 323-367 vahel ei ole markervalkude sisetamise kohana kuigi hea.

2.3.2 EELISTATUD POSITSIOON MARKERJÄRJESTUSE LISAMISEKS RRV NSP3 VALKU KODEERIVAS ALAS PAIKNEB AH JÄÄKIDE 400 JA 402 VAHEL

RRV nsP3 regioon ah jääkide 367 ja 390 vahel sisaldab motiivi, mis tõenäoliselt seondab rakulist valku amfifüsiini. Ah jäägist 450 allpool paiknevad CD2AP ja G3BP valke seondavad motiivid. Seetõttu valiti positsioonid markeri lisamiseks nende kahe piirkonna vahelises alas. Arvestades võimalust, et ka valitud regioonis võib esineda viirusele olulisi seni identifitseerimata motiive, valiti kaks erinevat positsiooni, kuhu üritati sisse viia markervalk. Positsioon A paiknes nsP3 koodonite 400 ja 402 vahel ning positsioon B koodonite 425 ja 426 vahele (Joonis 5A). Mõlemasse positsiooni viidi PCR-põhise mutageneesiga sisse järjestus ACTAGT, mis kujutab endast ensüümi *BcuI* äratundmisaiti ja toob kaasa kahe ah jäägi (Thr ja Ser) lisandumise insertsiooni piirkonda. Esimeseks markeriks, mis nendesse positsioonidesse paigutati oli ZsGreen, sest seda on kerge detekteerida ning varasemad katsed muude alfaviirustega on näidanud, et üldiselt on see suhteliselt hästi talutav marker. Saadud konstruktidele anti nimedeks RRV P3A-ZsGreen ja RRV P3B-ZsGreen. Esimese katse eesmärgiks oli võrrelda neid konstrukte omavahale ja ka wt RRV-ga. Selle käigus sooviti välja selgitada, kumb neist piirkondadest (mõlemad või ei kumbki) on sobilikum markerjärjestuste lisamiseks ja kasutamiseks edasiseks kloneerimiseks. Juba ICA tulemused näitasid, et RRV P3B-ZsGreen vabanemine RNA transkriptidest on wt RRV-ga võrrelduna kolm korda vähem efektiivsem, kuid RRV P3A-ZsGreen ja wt RRV vabanemise efektiivsused on vägagi sarnased (Tabel 2). Mõlemad mutantsed viirused paljunesid kõrgesse tiitrisse (Joonis 6), kuid ka selle katse käigus oli näha, et RRV P3A-ZsGreen on efektiivsem kui RRV P3B-ZsGreen (Tabel 2). Neid katseid korrati kolm korda ja iga kord saadi sarnased tulemused. See lubas oletada, et RRV talub paremini positsioonis A paiknevat markerit. Selle

täiendavaks uurimiseks paljundati mõlemat mutantset viirust kaks põlvkonda. Saadud P1 ja P2 viirusvarude tiiter määrati lüüsilaukude meetodil. Ka siin iseloomustas RRV P3B-ZsGreen viirust oluliselt vähem efektiivsem paljunemine, mistõttu otsustati see konstrukt järgnevatest katsetest välja jätta.



Joonis 6. Lüüsilauk-titrimismeetodil saadud värvitud 6-augulise tassi näidis. Elusad rakud värvuvad siniseks, viiruse poolt nakatunud rakud ei värvu ning on nähtavad lüüsilaukudena.. Näidatud on kasutatud lahjendused.

RRV P3A-ZsGreen viiruse vabanemise efektiivsus ja kõrge, kuid siiski wt RRV-st madalam tiiter (Tabel 2) lubasid oletada, et see konstrukt on geneetiliselt suhteliselt stabiilne. Selle otseseks analüüsimiseks viidi läbi RRV P3A-ZsGreen seeriaviisiline paljundamine ja koguti P1–P5 viirusvarud. Kuue põlvkonna viirusvarude (P0–P5) tiitrite määramine näitas, et RRV P3A-ZsGreen viiruse paljunemisvõime selle eksperimendi jooksul oluliselt ei muutunud. See annab taas tunnistust efektiivsest paljunemisest ning eeldatavast geneetilisest stabiilsusest. Sellele otsese kinnituse saamiseks teostati RRV P3A-ZsGreen geneetilise stabiilsuse analüüs. Selleks loendati kõigepealt mikroskoobis ZsGreen positiivsed fookused ning siis määrati värvimisega lüüsilaukude koguarv 6-augustel plaatidel. Katse sooritati kahes korduses, mõlemad korrad andsid suhteliselt sarnase tulemuse.

Läbiviidud analüüsi tulemustest (Tabel 3) on näha, et viiruse passeerimise tulemusena ZsGreen positiivseid fookuseid tekitavate virionide protsent küll mõnevõrra langes (P3 ja P4 põlvkonnad), kuid püsis siiski ka katse lõpus 50% tasemest ülalpool. See on selge tunnistus funktsionaalse inserdi püsimisest RRV P3A-ZsGreen genoomis. Pole päris selge, mis põhjustas ZsGreen positiivsete fookuste protsendi vähenemise. Tavaliselt tuleneb see inserdi

kadumaminekust, kuid tüüpiliselt järgneks sellele algse viiruse kiire väljatõrjumine paari (sageli ühe) põlvkonna jooksul. Kuna siin seda ei täheldatud (Tabel 3), ei saa ka öelda, et viirus oleks markerjärjestuse välja visanud. Pigem oli ZsGreen positiivsete fookuste loendamine mikroskoopi kasutades vähemefektiivne ning seda ilmselt eriti P3 ja P4 põlvkondade puhul. Alternatiivne võimalus on see, et ZsGreen marker ei läinud kaduma, vaid inaktiveerus osades viirustes punktmutatsioonide tekkimise ja kuhjumise tõttu. RRV replikaas teeb palju sünteesivigu ja mutatsioonide kogunemine viirusele mitteolulistesse piirkondadesse, näiteks markerit kodeerivasse järjestusse, on paratamatu. Selle põhjalikumaks analüüsiks oleks vaja P1–P5 põlvkonna viirustest markerit kodeeriv regioon koos seda ümbritsevate nsP3 järjestustega välja RT-PCR-rida ja sekveneerida, kuid praegu seda veel tehtud ei ole. Kahtlemata aga annavad siin läbiviidud analüüside tulemused kinnitust, et positsioon A RRV nsP3 valgus sobib ZsGreen ja eeldatavasti ka muude markervalkude järjestuste sisestamiseks RRV konstruktidesse.

Ülaltoodud lähenemist kasutades valmistati kolm täiendavat nsP3 regioonis markergeeni kandvat viirust, mida nimetati, vastavalt neis sisalduvale markerile, RRV P3A-Rluc, RRV-P3A-NanoLuc ja RRV P3A-mCherry. Markerid valiti selliselt, et need võimaldaksid viiruse määramist kudedes/elusas katseloomas (punaselt helendav mCherry) või viiruse infektsiooni kvantifitseerimist luminesentsi mõõtmise abil (Rluc ja NanoLuc). Kõik need konstruktid osutusid infektsioonilisteks. Sarnaselt RRV P3A-ZsGreen konstruktile toimus RRV P3A-mCherry vabanemine transkriptidest wt RRV-le sarnase efektiivsusega (Tabel 2). RRV P3A-Rluc vabanemise efektiivsus oli mõnevõrra väiksem. Samuti oli ka vastava P0 viirusvaru tiiter 3–5 korda väiksem kui teistel positsioonis A markerit kandvatel viirustel (Tabel 2). See tulemus on loogiline ja suure tõenäosusega tuleneb sellest, et Rluc valku kodeeriv järjestus (ca 960 nukleotiidi jääki) on ZsGreen ja mCherry valku (kumbki ca 730 nukleotiidi jääki) kodeerivatest järjestustest pikem. Varasemad tööd meie laboris ja ka teistes uurimisrühmades on selgelt näidanud, et pikem markerit kodeeriv järjestus vähendab nii rekombinantse viiruse vabanemise efektiivsust kui ka sellise viiruse paljunemist (Sun *et al.*, 2014). Üllatuslikult toimus RRV P3A-NanoLuc vabanemine väga madala efektiivsusega, kuid peale vabanemist paljunes viirus siiski kõrgesse tiitrisse (Tabel 2). Sellise käitumise põhjus ei ole teada. Võimalik, et tegemist on defektiga viiruse vabanemisel, kuid mitte selle paljunemisel.

Tabel 3. RRV P3A-ZsGreen geneetilise stabiilsuse analüüsi tulemused. Kuna katset korrati vaid kaks korda, pole ära toodud veapiire.

Viiruse põlvkond	ZsGreen positiivsete lüüsilaikude % (kahe katse keskmine)
P0	89
P1	86
P2	70
P3	56
P4	58
P5	64

Kokkuvõtvalt võib öelda, et kõik siin konstrueeritud viirused paljunesid kõrge tiitrini ($>3 \times 10^7$ pfu/ml), mis võimaldab nende kasutamist nii koekultuuris kui ka *in vivo* katsetes.

2.3.3 DUPLITSEERITUD SG PROMOOTERIGA RRV ON VÕIMELINE KANDMA MARKERGEENE

Kuna töö alguses puudus teadmine, kas markerjärjestuste liitmine nsP3 valku kodeerivasse alasse õnnestub, arendati seetõttu tööühma poolt paralleelselt välja duplitseeritud sg promooterit sisaldav viirus, mis sai nimeks RRV 2SG (Joonis 5B). See vektor võimaldab ekspresseerida markergeene viiruse enda sg promooteri abil sünteesitud sgRNA-de vahendusel. RRV struktuursete valkude ekspressioon toimub selles lähenemises duplitseeritud sg promooterilt sünteesitud RNA-delt. Selline lähenemine võimaldab toota markervalke individuaalsete valkudena erinevalt RRV P3A viirustest, mis toodavad nsP3-marker liitvalke. Samuti toodetakse neid eeldatavalt ka oluliselt suuremates hulkades. Samas ei ole sellised vektorid mitte ainult alternatiiviks, vaid ka oluliseks täienduseks nsP3 valgus markerit sisaldavatele vektoritele. Nimelt on erinevatel vektoritel erinevad omadused, mis omakorda võimaldavad nende rakendamist erinevateks töödeks (vt. lähemalt 2.3.4).

Esimeseks analüüsiks kujunes RRV 2SG vabastamise efektiivsuse määramine ICA meetodil. See analüüs näitas, et RRV 2SG viiruse vabanemise efektiivsus on vähemalt võrdne wt RRV-ga, vahest isegi mõnevõrra kõrgem. Kõrge aktiivsuse põhjuseks on arvatavasti asjaolu, et ilma markerita RRV 2SG viiruses toimub struktuursete valkude tootmine kahe sg promooteri (looduslik ja duplitseeritud) vahendusel. Ka paljunes RRV 2SG wt RRV-ga sarnasesse ($\approx 10^9$

pfu/ml) tiitrisse. Seega kujutab RRV 2SG endast sobivat vektorit markergeenide kloneerimiseks ja ekspresseerimiseks. Nii lisatigi sellesse vektorisse ZsGreen või mCherry markergeenid (RRV 2SG-ZsGreen ja RRV 2SG-mCherry). Rluc või NanoLuc asemel kasutati aga Gluc markerit (RRV 2SG-Gluc), sest see on sekreteeritav valk ja seetõttu detekteeritav otse söötimest. Gluc valku ei saa lisada nsP3 valgule, sest sekretsioonisignaal nsP3-Gluc liitvalgus võib selle valgu funktsioone mõjutada ettearvamatul ja võimalik, et viirusele ebasoodsal viisil.

ICA tulemused näitasid, et RRV 2SG-ZsGreen, RRV 2SG-mCherry ja RRV 2SG-Gluc viiruste vabanemise efektiivsus oli RRV 2SG-ga võrreldes oluliselt (≥ 100 korda) madalam. Samas moodustasid need viirused RRV 2SG-ga sarnaseid lüüsilaike ja paljunesid kõrgesse tiitrisse (Tabel 2), mis näitas, et sarnaselt RRV P3A-NanoLuc viirusega mõjutab markeri lisamine küll nende viiruste vabanemist, kuid mitte järgnevat paljunemist. Mis kõige olulisem, RRV 2SG-ZsGreen ja RRV 2SG-mCherry viirused ekspresseerisid vastavaid fluorestseeruvaid valke ja RRV 2SG-Gluc viirusega nakatatud rakkude söötmes oli määratav väga kõrge Gluc aktiivsus (vt. lähemat 2.3.4).

2.3.4 RRV P3A, RRV 2SG VIIRUSTE JA RRV REPLIKONVEKTORITE VAHENDATUD MARKERVALKUDE EKSPRESSIOONI ANALÜÜS

Töö eelnevates osades on kirjeldatud erinevate viiruskonstruktide, mis ekspresseerivad samu (ZsGreen või mCherry) või sarnaste omadustega (erinevad lutsiferaasid) markervalke, üldiseid omadusi. Lisaks nendele konstrueeriti meie töörühmas ka seeria RRV replikonvektoreid, mis ekspresseerisid ZsGreen, mCherry või Gluc markereid (RRV Repl-ZsGreen, RRV Repl-mCherry, RRV Repl-Gluc. Joonis 5C). Sellepärast osutus võimalikuks ja vajalikuks erinevate konstruktide omavaheline võrdlemine.

Esmalt võrreldi lutsiferaase ekspresseerivaid vektoreid. Kuna replikonid ei ole võimelised virione moodustama, mõõdeti võrreldavate tulemuste saamiseks kõikide mutantide (ka nende, mis moodustavad virione) markervalkude aktiivsust infektsiooniliste RNA-dega transfekteritud rakkudes (Rluc, NanoLuc) või nende rakkude söötmes (Gluc). Saadud tulemused kinnitasid, et kõik analüüsitud konstruktid toodavad lutsiferaase (Tabel 4). Tänu väga madalale taustale (wt RRV kontroll) ületas viirus- (replikon-) vahendatud markeri ekspressioon fooni mitte vähem kui 5×10^4 korda. Samuti oli selgesti näha et sg promooteri vahendusel ekspresseeritud lutsiferaaside aktiivsus on ≈ 100 korda kõrgem nsP3 valgule liidetud lutsiferaaside omast. Osaliselt võib see erinevus tuleneda individuaalse Gluc suuremast aktiivsusest. Samas on ilmne, et sg promooteri vahendatud markervalkude süntees

toimub oluliselt kõrgemal tasemel kui nsP3-marker liitvalgu süntees. See kajastab alfaviiruse valkude sünteesi loomulikke vahekordi: kõik alfaviirused sünteesivad struktuurseid valke ns valkudest oluliselt rohkem.

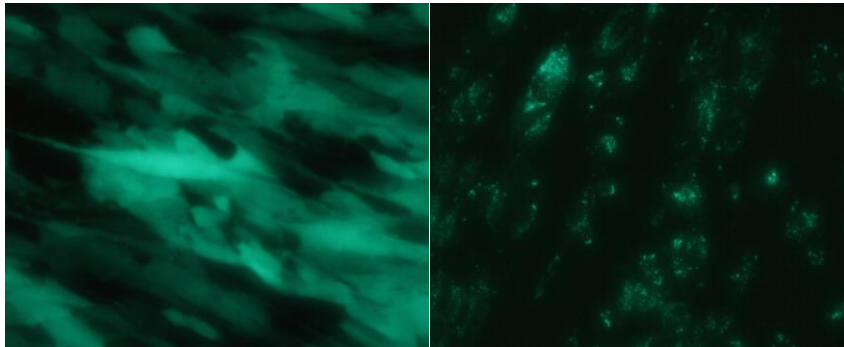
Järgnevalt jälgiti erinevate RRV konstruktide vahendatud fluorestseeruvate markerite ekspressiooni. Visuaalsel vaatlemisel selgus, et RRV Repl-ZsGreen ja RRV Repl-mCherry ekspresseerivad vastavaid valke. Nende ekspressioon toimub kõrgel tasemel ning ekspresseeritavate markerite lokaliseerimine rakkudes sarnaneb vastavalt RRV 2SG-ZsGreen (Joonis 7) ja RRV 2SG-mCherry (Joonis 8) nakatatud rakkudele. Kuna soovisime markerite lokaliseerimise uurida eelkõige nakatatud, mitte transfitseeritud (transfektsioon mõjutab viiruse valkude ekspressiooni ja nende lokaliseerimise) rakkudes, siis virione mitte moodustavaid replikonkonstrukte antud analüüsi käigus rohkem põhjalikumalt ei uuritud.

Tabel 4. Lutsiferaaside aktiivsused infektsiooniliste RNA-dega transfitseeritud rakkudes ja rakulüsaatides

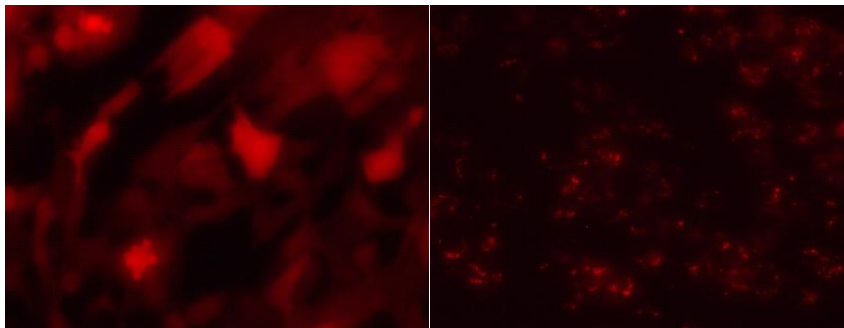
Konstrukt	Lutsiferaasi taust (wt RRV)	Lutsiferaasi aktiivsus (konstrukt)
RRV P3A-Rluc	300	$3,4 \times 10^7$
RRV P3A-NanoLuc	680	$3,6 \times 10^7$
RRV 2SG-Gluc	680	$2,9 \times 10^9$
RRV Repl-Gluc	300	$4,8 \times 10^9$

RRV 2SG-ZsGreen ja RRV P3A-ZsGreen poolt nakatatud rakkude analüüs näitas, et sg promooteri vahendatud ZsGreen ekspressioon on tunduvalt tugevam nsP3 valgule liidetud ZsGreen ekspressioonist (Joonis 7). RRV 2SG-ZsGreen viirusega nakatatud rakkude puhul ei ole võimalik näha, kus täpselt ekspresseeritud markervalk paiknes, terve rakk hiilgas. See vastab eeldatule, et viiruse valgule mitteliidetud ZsGreen paikneb rakkudes difuusselt. Sellised viirused sobivad kasutamiseks katsetes, kus on vajalik saavutada markervalgu võimalikult kõrge tase ning pole oluline markeri rakusisene lokaliseerimine. RRV P3A-ZsGreen viiruse poolt nakatatud rakkudes oli ZsGreen signaal tunduvalt nõrgem, kuid samas oli vägagi selgelt näha, kus seda markerit rakus leidub. Seega sobivad sellised vektorid eelkõige töödeks, kus on vaja jälgida viirusvalkude paiknemist rakkudes. Nii on selge, et rakkudes nähtavad heledad täpid on nsP3-ZsGreen valku sisaldavad kompleksid. Osa neist on kahtlemata RRV replikatsioonikompleksid, teine osa kujutab endast tõenäoliselt muid nsP3 poolt moodustatavaid komplekse (Gorchakov *et al.*, 2008). Nendel kompleksidel vahet tegemiseks

oleks vaja neid täiendavalt märgistada, kasutades selleks kaheaheelise RNA vastu suunatud antikeha (seondub vaid replikatsioonikompleksidele). Samas on ka olemasolevate piltide alusel võimalik väita, et RRV replikatsioonikompleksid paiknevad raku tsütoplasmas sarnaselt SFV replikatsioonikompleksidele (mitte plasmamembraani all nagu CHIKV puhul). RRV 2SG-mCherry ja RRV P3A-mCherry viiruste poolt nakatunud rakkude analüüs andis eeldatult samasugused tulemused (Joonis 8).



Joonis 7. ZsGreen markeri ekspressioon RRV 2SG-ZsGreen (vasak paneel) ja RRV P3A-ZsGreen nakatatud BHK-21 rakkudes. Rakke nakatati MOI 0,1 tingimustest, umbes 24 tundi pärast nakatamist rakud fikseeriti ja analüüsiti. Signaaliks on ZsGreen fluorestsents.



Joonis 8. mCherry markeri ekspressioon RRV 2SG-mCherry (vasak paneel) ja RRV P3A-mCherry nakatatud BHK-21 rakkudes. Rakke nakatati MOI 0,1 tingimustest, umbes 24 tundi pärast nakatamist rakud fikseeriti ja analüüsiti. Signaaliks on mCherry fluorestsents.

2.3.5 KATSE VIIRUSREPLIKON OSAKESTE TOOTMISEKS JA NENDE HULGA MÄÄRAMISEKS

Replikonid on konstruktid, kus on olemas ns regioon, kuid puudub struktuurseid valke kodeeriv ala (Joonis 5C). Nagu kirjeldatud eelmises peatükis (2.3.4), ekspresseerivad RRV Repl-ZsGreen, RRV Repl-mCherry, RRV Repl-Gluc vastavaid markereid kõrgel tasemel

(andmed RRV Repl-Gluc kohta on toodud Tabelis 4). Markervalkude tootmine replikonide poolt tähendab seda, et vastavad replikon-RNA-d toodavad funktsionaalset replikaasi, mis viib läbi RNA replikatsiooni ja sgRNA sünteesi. Samas ei moodusta replikonid virione, sest selleks on vajalik ka struktuursete valkude süntees.

Lihtsaim viis tagada alfaviiruste VRP-de kokkupanek, on toota struktuurset valke helper-RNA-delt. On oluline märkida, et ka siin on viiruse struktuursete valkude ekspressioon vahendatud sgRNA sünteesi kaudu. Seega, kui helper-RNA-sid ei replitseerita ega transkribeerita, ei toimu ka struktuursete valkude tootmist. Helper-RNA-de replitseerimiseks vajalik replikaas ekspresseeritakse sellisel lähenemise puhul replikon-RNA-lt. Lihtsaim viis toota suurtes hulkades struktuurset valke, on kasutada helper-RNA-d, mis ekspresseeriks kogu struktuurset regiooni. Selle lähenemise puuduseks on asjaolu, et selline helper-RNA rekombineerub kergesti replikon-RNA-ga ning tekiks reaalne viirus, mis on võimeline levima rakust rakku. Selle vältimiseks jagatakse struktuurset valke kodeeriv regioon kahe helper-RNA vahel nii, et ühelt helper-RNA-lt toodetakse (replikoni juuresolekul) kapsiidi valgu ja teiselt ümbrisevalkude mRNA-sid. Sama lähenemist kasutati ka meie töörühmas konstrueerimaks RRV helper-RNA-sid, mida nimetati vastavalt RRV Helper C ja RRV Helper E (Tabel 1).

VRP-de valmistamiseks lisati RRV Repl-ZsGreen transkriptidele RRV Helper C ja RRV Helper E *in vitro* transkribeeritud RNA-d. Saadud seguga transfitseeriti BHK-21 rakke, kasutades samu tingimusi nagu infektsiooniliste viiruste vabastamisel. ICA-d siin aga ei tehtud, sest VRP-d ei tekita lüüsilaike. 48 tundi pärast transfektsiooni oli täheldatav nii tsütopaatilise efekti tekkimine kui ka ZsGreen markeri ekspressioon. Rakkudelt koguti sööde, mis peaks sisaldama VRP-sid ning uuriti selle varu võimet nakatada uusi rakke. Selleks tehti kogutud söötimest seeriaviisilised lahjendused, millega nakatati 12-augusel plaadil ette kasvatatud BHK-21 rakke. Kontrolliks nakatati rakke ka RRV 2SG-ZsGreen viirusvaruga. 24 tundi pärast nakatamist helendasid ainult RRV 2SG-ZsGreen-iga nakatatud kontrollrakud, olukord oli samasugune ka täiendava 24 tunni möödudes. Suurim rakkude nakatamiseks kasutatud söötme kogus oli 100 µl ja kuna ka sellel juhul ühtegi rohelist rakku ei täheldatud, siis tuleb järeldada, et kogutud proovis sisaldus vähem kui 10 VRP-d 1 ml söötme kohta. Samas on alfaviiruste VRP-de saagis tüüpiliselt $>10^8$ VRP/ml. Seega andis esimene RRV VRP-de tegemise katse negatiivse tulemuse.

Nimetatud katse tehti vahetult enne lõputöö valmimist ja sellepärast pole seda veel korratud. Seetõttu on tegemist esialgse tulemusega, mis võib kontrollkatsete käigus kinnitust mitte

leida. Siiski võib spekulatsioonidele üle, mis võis olla probleemiks. Kahtlemata on probleemid seotud helper-RNA-dega, sest replikon kindlasti töötas. Jättes kõrvale võimalikud tehnilised probleemid helper-RNA-de järjestustes (konstruktid on saadatud uuesti sekveneerimisele), saab välja tuua järgneva seletuse. RRV helper-RNA-de järjestused kavandati lähtudes CHIKV helper-RNA-de disainist. Nagu on lõputöös korduvalt mainitud, ei kehti see, mis on leitud ühel alfaviirusel, alati teisele alfaviirusele. Seega on võimalik, et RRV helper-RNA-des on puudu mingi RNA replikatsiooniks oluline element. Seda võib uurida ko-transfekteerides rakke RRV replikoni ja RRV Helper RNA-dega ja analüüsides viimaste replikatsiooni/transkriptsiooni Northern blot meetodil. Samuti võib proovida, kas RRV replikone on võimalik pakkida CHIKV helper-RNA-de abil või ka vastupidi. Kõige lihtsam viis on aga arvatavasti uurida, kas replikon RNA juuresolekul toimub RRV Helper C vahendatud kapsiidivalgu süntees. Selle sünteesi toimumine on kindel märk Helper C RNA replikatsioonist/transkriptsioonist. Praegu on kapsiidivalgu ekspressiooni kindlaks tegemine võimalik Western blot meetodit kasutades (vt. 2.3.6). Edaspidised katsed kavandataksegi lähtuvalt nendest kaalutlustest.

2.3.6 ENAMIKE RRV NSP-DEST JA RRV KAPSIIDIVALKU SAAB VISUALISEERIDA WESTERN BLOT MEETODIL, KASUTADES SFV VÕI CHIKV VALKUDE VASTASEID POLÜKLONAALSEID ANTISEERUMEID

Viirus-spetsiifiliste antikehade valmistamine on aeganõudev (tavaliselt umbes 6 kuud) ja kulukas protsess. Heade antikehade saamine võib olla keeruline, näiteks juhtudel kui soovitud antigeeni tootmine/puhastamine rekombinantse valguna ei tööta. Kui on vaja uut viirust kiiresti analüüsida või mõnel juhul ka diagnoosida, tuleb tavaliselt alguses läbi ajada juba olemasolevate töövahenditega. Seetõttu kasutatakse „uue“ viiruse valkude visualiseerimiseks mingi „vana“ sugulasviiruse vastaseid antikehi või -seerumeid. On selge, et sellise katse õnnestumine sõltub suuresti sellest, kui lähedalt „uus“ ja „vana“ viirus suguluses on. SFV serograssi kuuluvate viiruste valkude järjestuste omavaheline sarnasus on keskmiselt 60% läheduses. Samas leidub aga kõikides valkudes regioone, mille piires on järjestuste sarnasus oluliselt suurem (isegi kuni 90%). See loob võimaluse selleks, et polükloonaalsete antikehade seas leidub ka selliseid, mis tunnevad ära enam kui ühe alfaviiruse valke. Meie laboris on olemas polükloonaalsed antikehad BFV (nsP1, nsP2 ja nsP3), SINV (nsP2 ja nsP3), O'nyong'nyong viiruse (ONNV, nsP1, nsP2 ja nsP3), SFV (nsP1, nsP3 ja kapsiidivalk) ja CHIKV (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 ja kapsiidivalk) valkude vastu. Nendest viirustest kuuluvad RRV-ga samasse serograssi kolm viimast. Töös kasutati SFV ja CHIKV valkude vastaseid

antiseerume. ONNV valkude vastaseid antiseerume esialgu ei analüüsitud, sest see viirus on CHIKV-ga väga sarnane ning ONNV vastased antikehad on seetõttu oma omadustelt sarnased CHIKV vastastele antikehadele.

„Vanade“ antikehade kasutamisel millegi uue visualiseerimiseks on probleemiks taust, mida on vaja eristada spetsiifilisest signaalist. Seetõttu kasutatakse eelistatud meetodina Western bloti, mis ei näita ainult valkude äratundmist antikehade poolt, vaid ka äratuntavate valkude suurust. See võimaldab aru saada, kas tegemist on uuritava või mõne muu valguga. Western bloti kui meetodi puuduseks on oluliselt suuremad vajaminevad antikehade kogused. See on eriti oluline olukorras, kus üritatakse ära tunda mingit „võõrast“ valku, mille äratundmine on „oma“ antigeeni (st. valgu, mille vastu antikeha tekitab) äratundmisest reeglina madalama efektiivsusega. Meile Western blot sobis, sest laboris valmistatud CHIKV ja SFV valkude vastased antiseerumid on väga kõrge tiitriga ja kättesaadavad suurtes kogustes.

Sooritatud katse skeem oli lihtne: wt RRV-ga nakatud BHK-21 rakkude lüsaati uuriti, kasutades CHIKV ja SFV valkude vastaseid antiseerumeid. Kontrolliks oli nakatamata BHK-21 rakkudest valmistatud lüsaat. Antiseerumid ja nende kasutatud lahjendused on toodud tabelis 5.

Üldreeglina kasutati RRV valkude visualiseerimiseks 5x väiksemat antiseerumi lahjendust (st. 5x suuremat antikehade kogust), kui seda kasutatakse SFV või CHIKV valkude analüüsimiseks. Erandiks oli CHIKV nsP4 vastane antiseerum, mida kasutati samas lahjenduses nagu CHIKV nsP4 visualiseerimisel. nsP4 on alfaviiruste kõige konserveerunud valk ja peaks olema kõige paremini äratuntav teise alfaviiruse vastaste antikehade poolt. Veel väiksemaid lahjendusi (suuremaid antikehade koguseid) ei kasutatud, sest varasemast oli teada, et sellisel juhul tekib tugev ebaspetsiifiline taust.

Tabel 5. RRV valkude visualiseerimiseks kasutatud CHIKV ja SFV antiseerumid ja lahjendused.

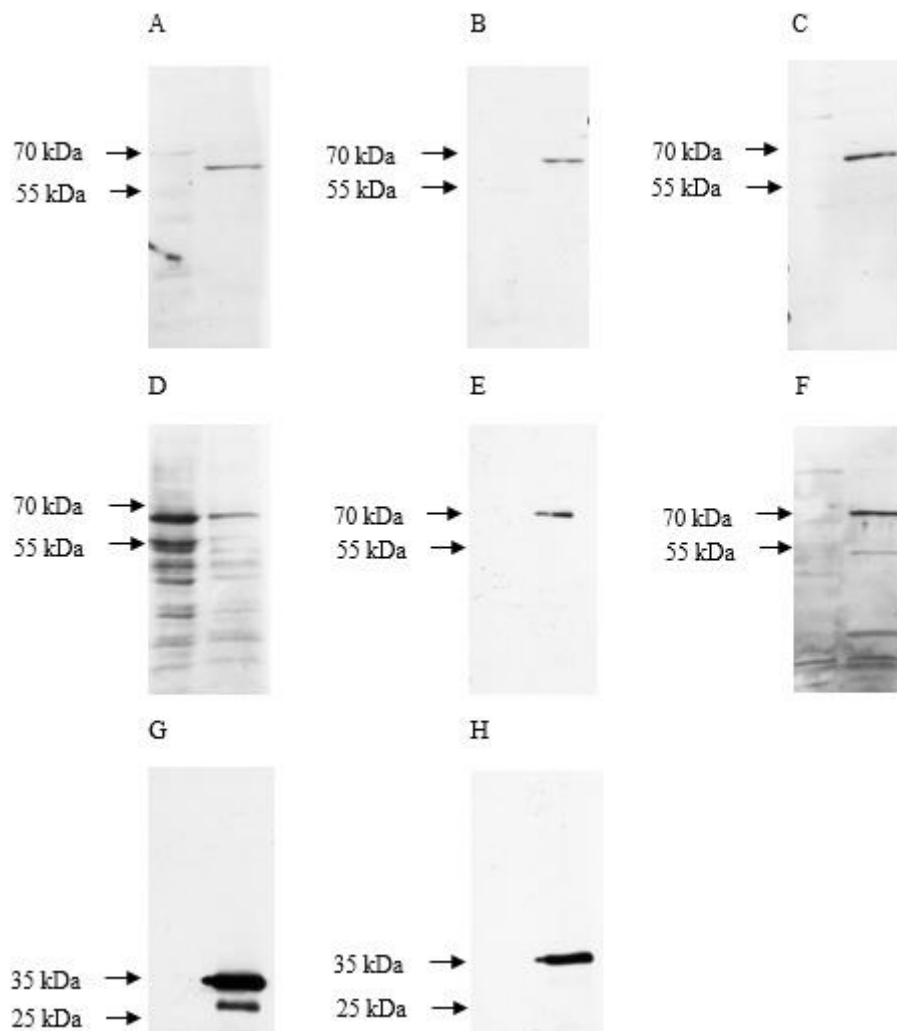
Valk, mille vastu antiseerum on valmistatud	RRV valkude detekteerimiseks kasutatud lahjendus
CHIKV nsP1	1:10 000
CHIKV nsP2 (helikaasne osa)	1:5000
CHIKV nsP3	1:5000
CHIKV nsP4	1:4000
CHIKV kapsiidvalk (C)	1:50 000
SFV nsP1	1:10 000
SFV nsP3	1:10 000
SFV kapsiidivalk (C)	1:50 000

Saadud tulemused näitasid järgmist:

1. Nii CHIKV (Joonis 9A) kui ka SFV (Joonis 9B) nsP1 vastased antiseerumid tundsid RRV-ga nakatunud rakkudes ära valgu, mille liikumine geelis vastab RRV nsP1 valgule. RRV nsP1 valgu molekulmass on 59,64 kDa. Western blotiga saab määrata umbkaudseid valkude molekulmasse. Pealegi esineb valkudel sageli anormaalset (arvatust aeglasemat) liikumist SDS geelis, mistõttu nad näivad olema tegelikkusest suuremad. Võib eeldada, et CHIKV ja SFV antikehad tunnevad ära ühe ja sellesama valgu. Selle katse tulemustest võib järeldada, et RRV nsP1 määramiseks sobib paremini vähem ebaspetsiifilist signaali andnud SFV nsP1 vastane antiseerum.
2. CHIKV nsP2 helikaasse osa (ah jäägid 1-470) vastane antiseerum tunneb RRV-ga nakatatud proovi lüsaadist ära küll mingi valgu, kuid see on RRV nsP2 valgust (molekulmass 89,7 kDa) selgelt väiksem (Joonis 9C). Tema päritolu pole teada, tegemist võib olla viiruse poolt indutseeritud rakulise valguga. Seega ei saa RRV nsP2 äratundmiseks kasutada CHIKV nsP2 helikaase osa vastast antiseerumit. SFV nsP2 vastane antiseerum on meie laboris praegu tegemisel. Lisaks sellele on meil olemas CHIKV nsP2 proteaasse osa, SINV nsP2 valgu, ONNV nsP2 valgu ja BFV nsP2 valgu vastased antiseerumid. Seega on vaja edaspidi uurida, kas mõni nendest viiest antiseerumist on võimeline RRV nsP2 valku ära tundma.
3. CHIKV nsP3 valgu vastane antikeha tunneb nii RRV-ga nakatatud rakkudes kui ka kontrollrakkudes ära arvukalt valke (Joonis 9D). Kuna kõik need valgud esinevad mõlemas proovis, siis CHIKV nsP3 vastane antiseerum RRV nsP3 visualiseerimiseks ei sobi. Küll aga tunneb SFV nsP3 vastane antiseerum ära RRV-ga nakatunud proovis valgu, mille näiv suurus on RRV nsP3 molekulmassist (58,2 kDa) küll suurem (Joonis 9E), kuid alfaviiruste nsP3

valgud paistavadki Western blotil tegelikest massidest suurematena. Seda põhjustab nsP3 fosforüleerimine, mis muudab valgu liikumise SDS geelis aeglasemaks. Seega sobib RRV nsP3 visualiseerimiseks SFV nsP3 valgu vastane antiseerum.

4. CHIKV nsP4 vastane antiseerum tunneb RRV-ga nakatatud proovis ära valgu, mis vastab RRV nsP4 molekulmassile (68,45 kDa) (Joonis 9F). Kuigi CHIKV nsP4 antikeha ei ole eriti efektiivne (lahjendus 1:4000), on ta küllalt hea RRV nsP4 äratundmiseks. Seda ilmselt nsP4 valkude järjestuste konserveerumise tõttu.
5. Nii CHIKV (Joonis 9G) kui SFV (Joonis 9H) kapsiidivalgu vastased antikehad tunnevad efektiivselt ära ka RRV kapsiidivalgu (molekulmass 30,53 kDa). See äratundmine on oluliselt efektiivsem kui ns valkude äratundmine (Joonis 9A-F) ja seda tõenäoliselt seetõttu, et võrreldes nsP-dega on kapsiidivalgu hulk RRV-ga nakatatud rakkudes palju suurem.

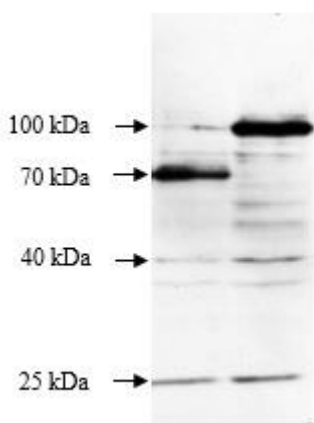


Joonis 9. RRV valkude äratundmine SFV ja CHIKV antiseerumite poolt analüüsituna Western blot meetodi abil. Geeli igasse hambasse kanti wt RRV-ga nakatatud rakkude (iga paneeli parem rada) või nakatamata kontrollrakkude (iga paneeli vasak rada) lüsaat arvestusega 50 000 rakku iga proovi kohta. Kasutatud

antiseerumid on tehtud järgmiste valkude vastu: A. CHIKV nsP1; B. SFV nsP1; C. CHIKV nsP2; D. CHIKV nsP3; E. SFV nsP3, F. CHIKV nsP4; G. CHIKV kapsidivalk; H. SFV kapsidivalk. Membraane eksponeeritud röntgenfilmile 1–2 minutit. Visualiseeritud valgu molekulmassile lähimate markerite positsioonid on näidatud paneelidest vasakul.

Selle osa kokkuvõtteks saab öelda, et analüüsitud antiseerumid tunnevad ära RRV kapsidivalgu ja on sobivad selle määramiseks Western bloti meetodil. nsP1, nsP3 ja nsP4 valke on samuti võimalik määrata. Siiski on nsP-de puhul saadav signaal suhteliselt nõrk, mistõttu oleks vaja kasutada suuremaid antiseerumi koguseid. Vältimaks ebaspetsiifilise signaali tekkimist, oleks vaja enne seda antiseerumeid puhastada, eemaldades nendest raku valke seondavad antikehad. RRV nsP2 valgu äratundmine ei õnnestunud, kuid võiks proovida, kas seda saab teha muude alfaviiruste nsP2 vastu suunatud antiseerumite abil. Samuti on järgnevalt vaja uurida, kas need antiseerumid on võimelised RRV valke ära tundma ka muid meetode (immunofluorestsentsanalüüs, immuunosadestamine) kasutades.

Lisaks katsetati SFV nsP3 vastast antiseerumit nsP3 ja nsP3-ZsGreen valkude tuvastamiseks wt RRV-ga ja RRV P3A-ZsGreen viirustega nakatatud rakkudes. See analüüs näitas selgelt, et wt RRV ekspresseerib vaba nsP3 valku, kuid RRV P3A-ZsGreen toodab oluliselt suuremat (molekulmass 84,89 kDa) nsP3-ZsGreen liitvalku (Joonis 10). Jooniselt on näha, et RRV P3A-ZsGreen viirusega nakatatud rakkudes on nsP3-ZsGreen ainus selgesti äratuntav valk. See tulemus kinnitab, et RRV P3A-ZsGreen on geneetiliselt küllalt stabiilne ja markeri kadumaminek nsP3 valgust on harva esinev sündmus.



Joonis 10. Wt RRV ja RRV P3A-ZsGreen viiruste poolt ekspresseeritava nsP3 valgu detekteerimine western blot meetodil. Geeli vasak rada vastab wt RRV-ga nakatatud rakkude ja parem rada RRV P3A-ZsGreen nakatud rakkude lüsaadile (MOI=0,1, põlvkond P5). Valkude visualiseerimiseks kasutati SFV nsP3

vastast antiseerumit. Membraane eksponeeriti röntgenfilmile üks minut. Paneelist vasakul on näidatud markerite positsioonid.

KOKKUVÕTE

Ross River viirus (RRV) on putukatega ülekanduv alfaviirus, mille peamine leviala on Austraalia. Viiruse poolt põhjustatud sümptomiteks on lihase- ja liigesevalud ning põletik. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli RRV infektsiooni uurimiseks vajalike töövahendite loomine ja analüüsimine.

Esmalt valiti RRV nsP3 valgus välja markergeenide sisestamiseks sobivad positsioonid ja konstrueeriti vastavad markervalke kodeerivad viirused. Saadud viiruste võrdlemine näitas, et positsioonis A (koodonite 400 ja 402 vahel) ZsGreen markerjärjestust sisaldav viirus vabaneb infektsioonilisest RNA-st efektiivsemalt, paljuneb paremini ning on geneetiliselt stabiilsem, kui positsioonis B (koodonite 425 ja 426 vahel) ZsGreen markerjärjestust sisaldav viirus.

Järgnevalt konstrueeriti viirused, mis sisaldasid positsioonis A mCherry, NanoLuc või Rluc markereid. Neid viiruseid võrreldi kõigepealt omavahel ja siis ka RRV rekombinantidega, milles sarnased markerid olid paigutatud viiruse subgenoomse promooteri kontrolli alla. Leiti, et kuigi rekombinantsete viiruste vabanemine toimus erineva efektiivsusega, paljunesid kõik kõrgete tiitriteni. Näidati, et viirused, milles markerjärjestus paiknes subgenoomse promooteri all, toodavad markervalke suuremates kogustes, kui seda teevad nsP3 valgus markerit sisaldavad viirused. nsP3 valgus markerit sisaldavate viiruste puhul lokaliseerusid ZsGreen ja mCherry rakus fookustesse, mis võivad kujutada endast viiruse replikatsioonikomplekse. Seetõttu on sellised viirused kasulikud RRV replikatsiooni uurimiseks.

Töös katsetati ka RRV replikone, millesse oli lisatud markervalke kodeerivad järjestused, kuid mis ei tooda virione. Kõik analüüsitud replikonid ekspresseerisid markervalke kõrgel tasemel. Samas ei õnnestunud replikone pakkida viirus-replikon partiklitesse. Nende põhjuste väljaselgitamiseks on vaja teha lisakatseid.

Viimasena uuriti SFV ja CHIKV vastaste polükloonaalsete antikehade võimet ära tunda RRV vastavaid valke. Selleks kasutati Western bloti meetodit. Katse oli ootamatult edukas: RRV kapsiidivalgu äratundmine oli väga efektiivne ning ka kolme RRV ns valku oli sellisel viisil võimalik visualiseerida. See on suurepärane tulemus, sest võimaldab kokku hoida raha ja aega, mis kuluks RRV spetsiifiliste antikehade valmistamiseks.

Kokkuvõttes valmistati ja iseloomustati mitmeid erinevaid töövahendeid (rekombinantset viirused, replikonid, antikehad), mis võimaldavad senisest oluliselt efektiivsemalt visualiseerida RRV infektsiooni koekultuuris ja eeldatavasti ka loomudelites.

Detection of Ross River virus infection using anti-alphavirus antibodies and viruses encoding for luciferase or fluorescent markers

Anni Noorem

SUMMARY

Alphaviruses are RNA viruses that are transmitted to humans by insects. All alphaviruses encode four nonstructural proteins and six structural proteins. Nonstructural proteins are not packed into virion. Alphaviruses can be divided into three serogroups: Semliki Forest virus (SFV) group, Venezuelan equine encephalitis virus/Eastern equine encephalitis virus (VEEV/EEEV) group and Sindbis virus (SINV) group. The Ross River virus (RRV) used in this study belongs to the first group. RRV is an alphavirus that spreads mostly in Australia. It causes muscle and joint pain, rash and inflammation. In Australia about 5000 people get infected with this virus every year, but there is no vaccine or cure. It is suggested to just avoid getting bitten by mosquitoes. Scientists have not been really interested in studying this virus until now. Virologists at Griffith University in Australia contacted the RNA virus research group in University of Tartu, Institute of Technology and proposed to investigate RRV together. The aim of this study was to design and analyze tools suitable for working with RRV.

First, we chose two possible positions, A and B, for inserting markers in nsP3 protein coding area and constructed corresponding recombinant viruses. We then compared the titers and rescue efficiencies of these viruses and concluded that position A is more suitable for inserting marker genes. Viruses containing markers in this position were also genetically more stable.

Next, we inserted other marker genes into position A and compared the obtained viruses with one another and also with recombinant viruses, where similar markers were under the control of subgenomic promoter. Viruses, where the marker sequence was inserted under the control of subgenomic promoter, expressed marker proteins in higher quantity compared to viruses, where the marker sequence was inserted in the coding region of nsP3. The rescue efficiencies of the recombinant viruses differed slightly from one another, but all the constructed viruses grew to high titers.

Replicon vectors were also designed. These constructs lack the region encoding for structural proteins, so they cannot produce virions and were used to express marker proteins under the control of subgenomic promoter. All replicon constructs expressed marker proteins in high

quantities. Attempts to produce virus-replicon particles were also made, but this was unsuccessful. The exact reasons for why this did not work are not yet known and further research is needed.

Also, experiments to find out whether RRV proteins could be detected with SFV and Chikungunya virus polyclonal antibodies were conducted. The obtained results showed that, RRV capsid protein and three nonstructural proteins can be very efficiently detected with Western blot analysis using polyclonal antibodies against other alphaviruses.

In conclusion, many tools to analyze RRV were designed. Results indicate that these can efficiently be used in cell culture and in the future also in an animal model.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Ahola, T., and Kääriäinen, L. (1995). Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 507–511.
- Akhrymuk, I., Kulemzin, S.V., and Frolova, E.I. (2012). Evasion of the innate immune response: the Old World alphavirus nsP2 protein induces rapid degradation of Rpb1, a catalytic subunit of RNA polymerase II. *J. Virol.* 86, 7180–7191.
- Atasheva, S., Gorchakov, R., English, R., Frolov, I., and Frolova, E. (2007). Development of Sindbis viruses encoding nsP2/GFP chimeric proteins and their application for studying nsP2 functioning. *J. Virol.* 81, 5046–5057.
- Atasheva, S., Foy, N.J., Wang, E., Frolova, E.I., Weaver, S., Frolov, I., and others (2011). Design of chimeric alphaviruses with a programmed, attenuated, cell type-restricted phenotype. *J. Virol.* 85, 4363–4376.
- Azuolas, J., Wishart, E., Bibby, S., and Ainsworth, C. (2003). Isolation of Ross River virus from mosquitoes and from horses with signs of musculoskeletal disease. *Aust. Vet. J.* 81, 344–347.
- Bick, M.J., Carroll, J.-W.N., Gao, G., Goff, S.P., Rice, C.M., and MacDonald, M.R. (2003). Expression of the zinc-finger antiviral protein inhibits alphavirus replication. *J. Virol.* 77, 11555–11562.
- Breakwell, L., Dosenovic, P., Hedestam, G.B.K., D’Amato, M., Liljeström, P., Fazakerley, J., and McInerney, G.M. (2007). Semliki Forest virus nonstructural protein 2 is involved in suppression of the type I interferon response. *J. Virol.* 81, 8677–8684.
- Das, P.K., Merits, A., and Lulla, A. (2014). Functional cross-talk between distant domains of chikungunya virus non-structural protein 2 is decisive for its RNA-modulating activity. *J. Biol. Chem.* 289, 5635–5653.
- Firth, A.E., Chung, B.Y., Fleeton, M.N., and Atkins, J.F. (2008). Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. *Virol. J.* 5, 1.
- Frolov, I., Garmashova, N., Atasheva, S., and Frolova, E.I. (2009). Random insertion mutagenesis of sindbis virus nonstructural protein 2 and selection of variants incapable of downregulating cellular transcription. *J. Virol.* 83, 9031–9044.
- Frolova, E., Gorchakov, R., Garmashova, N., Atasheva, S., Vergara, L.A., and Frolov, I. (2006). Formation of nsP3-specific protein complexes during Sindbis virus replication. *J. Virol.* 80, 4122–4134.
- Frolova, E.I., Gorchakov, R., Pereboeva, L., Atasheva, S., and Frolov, I. (2010). Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *J. Virol.* 84, 11679–11695.
- Fros, J.J., Liu, W.J., Prow, N.A., Geertsema, C., Ligtenberg, M., Vanlandingham, D.L., Schnettler, E., Vlak, J.M., Suhrbier, A., Khromykh, A.A., et al. (2010). Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. *J. Virol.* 84, 10877–10887.

- Gorchakov, R., Garmashova, N., Frolova, E., and Frolov, I. (2008). Different types of nsP3-containing protein complexes in Sindbis virus-infected cells. *J. Virol.* 82, 10088–10101.
- Grimley, P.M., Berezesky, I.K., and Friedman, R.M. (1968). Cytoplasmic structures associated with an arbovirus infection: loci of viral ribonucleic acid synthesis. *J. Virol.* 2, 1326–1338.
- de Groot, R.J., Hardy, W.R., Shirako, Y., and Strauss, J.H. (1990). Cleavage-site preferences of Sindbis virus polyproteins containing the non-structural proteinase. Evidence for temporal regulation of polyprotein processing in vivo. *EMBO J.* 9, 2631.
- de Groot, R.J., Rümenapf, T., Kuhn, R.J., Strauss, E.G., and Strauss, J.H. (1991). Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 8967–8971.
- Hallengård, D., Kakoulidou, M., Lulla, A., Kümmerer, B.M., Johansson, D.X., Mutso, M., Lulla, V., Fazakerley, J.K., Roques, P., Le Grand, R., et al. (2014). Novel attenuated Chikungunya vaccine candidates elicit protective immunity in C57BL/6 mice. *J. Virol.* 88, 2858–2866.
- Harley, D., Sleight, A., and Ritchie, S. (2001). Ross River virus transmission, infection, and disease: a cross-disciplinary review. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 909–932.
- Jones, P.H., Maric, M., Madison, M.N., Maury, W., Roller, R.J., and Okeoma, C.M. (2013). BST-2/tetherin-mediated restriction of chikungunya (CHIKV) VLP budding is counteracted by CHIKV non-structural protein 1 (nsP1). *Virology* 438, 37–49.
- Jose, J., Snyder, J.E., and Kuhn, R.J. (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* 4, 837–856.
- Kuhn, R.J., Griffin, D.E., Owen, K.E., Niesters, H., and Strauss, J.H. (1996). Chimeric Sindbis-Ross River viruses to study interactions between alphavirus nonstructural and structural regions. *J. Virol.* 70, 7900–7909.
- Laakkonen, P., Auvinen, P., Kujala, P., and Kääriäinen, L. (1998). Alphavirus replicase protein NSP1 induces filopodia and rearrangement of actin filaments. *J. Virol.* 72, 10265–10269.
- La Linn, M., Aaskov, J.G., and Suhrbier, A. (1996). Antibody-dependent enhancement and persistence in macrophages of an arbovirus associated with arthritis. *J. Gen. Virol.* 77, 407–411.
- La Linn, M., Mateo, L., Gardner, J., and Suhrbier, A. (1998). Alphavirus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize a cross-reactive epitope from the capsid protein and can eliminate virus from persistently infected macrophages. *J. Virol.* 72, 5146–5153.
- Lemm, J.A., Rümenapf, T., Strauss, E.G., Strauss, J.H., and Rice, C. (1994). Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *EMBO J.* 13, 2925.
- Li, M.-L., and Stollar, V. (2007). Distinct sites on the Sindbis virus RNA-dependent RNA polymerase for binding to the promoters for the synthesis of genomic and subgenomic RNA. *J. Virol.* 81, 4371–4373.

- Li, L., Jose, J., Xiang, Y., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2010). Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature* 468, 705–708.
- Linn, M., and Suhrbier, A. (1997). Persistence of Ross River virus in macrophages. *Arbovirus Res Aust* 7, 153–159.
- Luers, A.J., Adams, S.D., Smalley, J.V., and Campanella, J.J. (2005). A phylogenomic study of the genus Alphavirus employing whole genome comparison. *Comp. Funct. Genomics* 6, 217–227.
- Malet, H., Coutard, B., Jamal, S., Dutartre, H., Papageorgiou, N., Neuvonen, M., Ahola, T., Forrester, N., Gould, E.A., Lafitte, D., et al. (2009). The crystal structures of Chikungunya and Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket. *J. Virol.* 83, 6534–6545.
- Mancini, E.J., Clarke, M., Gowen, B.E., Rutten, T., and Fuller, S.D. (2000). Cryo-electron microscopy reveals the functional organization of an enveloped virus, Semliki Forest virus. *Mol. Cell* 5, 255–266.
- Merits, A., Vasiljeva, L., Ahola, T., Kääriäinen, L., and Auvinen, P. (2001). Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein by nsP2 protease. *J. Gen. Virol.* 82, 765–773.
- Miller, M.L., and Brown, D.T. (1992). Morphogenesis of Sindbis virus in three subclones of *Aedes albopictus* (mosquito) cells. *J. Virol.* 66, 4180–4190.
- Morrison, T.E., Whitmore, A.C., Shabman, R.S., Lidbury, B.A., Mahalingam, S., and Heise, M.T. (2006). Characterization of Ross River virus tropism and virus-induced inflammation in a mouse model of viral arthritis and myositis. *J. Virol.* 80, 737–749.
- Powers, A.M., Brault, A.C., Shirako, Y., Strauss, E.G., Kang, W., Strauss, J.H., and Weaver, S.C. (2001). Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *J. Virol.* 75, 10118–10131.
- Rathore, A.P., Haystead, T., Das, P.K., Merits, A., Ng, M.-L., and Vasudevan, S.G. (2014). Chikungunya virus nsP3 & nsP4 interacts with HSP-90 to promote virus replication: HSP-90 inhibitors reduce CHIKV infection and inflammation in vivo. *Antiviral Res.* 103, 7–16.
- Rausalu, K., Iofik, A., Ülper, L., Karo-Astover, L., Lulla, V., and Merits, A. (2009). Properties and use of novel replication-competent vectors based on Semliki Forest virus. *Virol. J.* 6, 1.
- Rikkonen, M., Peränen, J., and Kääriäinen, L. (1994). ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *J. Virol.* 68, 5804–5810.
- Rose, P.P., Hanna, S.L., Spiridigliozzi, A., Wannissorn, N., Beiting, D.P., Ross, S.R., Hardy, R.W., Bambina, S.A., Heise, M.T., and Cherry, S. (2011). Natural resistance-associated macrophage protein is a cellular receptor for sindbis virus in both insect and mammalian hosts. *Cell Host Microbe* 10, 97–104.
- Rubach, J.K., Wasik, B.R., Rupp, J.C., Kuhn, R.J., Hardy, R.W., and Smith, J.L. (2009). Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro. *Virology* 384, 201–208.

- Rupp, J.C., Sokoloski, K.J., Gebhart, N.N., and Hardy, R.W. (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J. Gen. Virol.* 96, 2483–2500.
- Russell, R.C. (2002). Ross River virus: ecology and distribution. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 1–31.
- Salonen, A., Vasiljeva, L., Merits, A., Magden, J., Jokitalo, E., and Kääriäinen, L. (2003). Properly folded nonstructural polyprotein directs the Semliki Forest virus replication complex to the endosomal compartment. *J. Virol.* 77, 1691–1702.
- Saul, S. (2010) Peremeesraku kaasasündinud immuunvastuse uurimiseks vajalike Semliki Forest viirusel põhinevate vektorite konstrueerimine ja iseloomustamine. Magistritöö
- Saul, S., Ferguson, M., Cordonin, C., Fragkoudis, R., Ool, M., Tamberg, N., Sherwood, K., Fazakerley, J.K., and Merits, A. (2015). Differences in Processing Determinants of Nonstructural Polyprotein and in the Sequence of Nonstructural Protein 3 Affect Neurovirulence of Semliki Forest Virus. *J. Virol.* 89, 11030–11045.
- Shin, G., Yost, S.A., Miller, M.T., Elrod, E.J., Grakoui, A., and Marcotrigiano, J. (2012). Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 16534–16539.
- Spuul, P., Salonen, A., Merits, A., Jokitalo, E., Kääriäinen, L., and Ahola, T. (2007). Role of the amphipathic peptide of Semliki forest virus replicase protein nsP1 in membrane association and virus replication. *J. Virol.* 81, 872–883.
- Spuul, P., Balistreri, G., Hellström, K., Golubtsov, A.V., Jokitalo, E., and Ahola, T. (2011). Assembly of alphavirus replication complexes from RNA and protein components in a novel trans-replication system in mammalian cells. *J. Virol.* 85, 4739–4751.
- Strauss, J.H., and Strauss, E.G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58, 491–562.
- Sun, C., Gardner, C.L., Watson, A.M., Ryman, K.D., and Klimstra, W.B. (2014). Stable, high-level expression of reporter proteins from improved alphavirus expression vectors to track replication and dissemination during encephalitic and arthritogenic disease. *J. Virol.* 88, 2035–2046.
- Suopanki, J., Sawicki, D.L., Sawicki, S.G., and others (1998). Regulation of alphavirus 26S mRNA transcription by replicase component nsP2. *J. Gen. Virol.* 79, 309–319.
- Tamberg, N., Lulla, V., Fragkoudis, R., Lulla, A., Fazakerley, J.K., and Merits, A. (2007). Insertion of EGFP into the replicase gene of Semliki Forest virus results in a novel, genetically stable marker virus. *J. Gen. Virol.* 88, 1225–1230.
- Taylor, A., Melton, J.V., Herrero, L.J., Thaa, B., Karo-Astover, L., Gage, P.W., Nelson, M.A., Sheng, K.-C., Lidbury, B.A., Ewart, G.D., et al. (2016). Effects of an in-frame deletion of the 6k gene locus from the genome of Ross River virus. *J. Virol.* 90, 4150–4159.
- Thaa, B., Biasiotto, R., Eng, K., Neuvonen, M., Götte, B., Rheinemann, L., Mutso, M., Utt, A., Varghese, F., Balistreri, G., et al. (2015). Differential phosphatidylinositol-3-kinase-Akt-mTOR activation by Semliki Forest and Chikungunya viruses is dependent on nsP3 and connected to replication complex internalization. *J. Virol.* 89, 11420–11437.

- Thomas, J.M., Klimstra, W.B., Ryman, K.D., and Heidner, H.W. (2003). Sindbis virus vectors designed to express a foreign protein as a cleavable component of the viral structural polyprotein. *J. Virol.* 77, 5598–5606.
- Tomar, S., Hardy, R.W., Smith, J.L., and Kuhn, R.J. (2006). Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsP4 possesses terminal adenylyltransferase activity. *J. Virol.* 80, 9962–9969.
- Utt, A., Das, P.K., Varjak, M., Lulla, V., Lulla, A., and Merits, A. (2015). Mutations conferring a noncytotoxic phenotype on chikungunya virus replicons compromise enzymatic properties of nonstructural protein 2. *J. Virol.* 89, 3145–3162.
- Utt, A., Quirin, T., Saul, S., Hellström, K., Ahola, T., and Merits, A. (2016). Versatile Trans-Replication Systems for Chikungunya Virus Allow Functional Analysis and Tagging of Every Replicase Protein. *PloS One* 11, e0151616.
- Vasiljeva, L., Merits, A., Auvinen, P., and Kääriäinen, L. (2000). Identification of a Novel Function of the Alphavirus Capping Apparatus RNA 5'-TRIPHOSPHATASE ACTIVITY OF Nsp2. *J. Biol. Chem.* 275, 17281–17287.
- Vasiljeva, L., Merits, A., Golubtsov, A., Sizemskaja, V., Kääriäinen, L., and Ahola, T. (2003). Regulation of the sequential processing of Semliki Forest virus replicase polyprotein. *J. Biol. Chem.* 278, 41636–41645.
- Vihinen, H., and Saarinen, J. (2000). Phosphorylation site analysis of Semliki forest virus nonstructural protein 3. *J. Biol. Chem.* 275, 27775–27783.
- Vihinen, H., Ahola, T., Tuittila, M., Merits, A., and Kääriäinen, L. (2001). Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3. *J. Biol. Chem.* 276, 5745–5752.
- Voss, J.E., Vaney, M.-C., Duquerroy, S., Vornrhein, C., Girard-Blanc, C., Crublet, E., Thompson, A., Bricogne, G., and Rey, F.A. (2010). Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 468, 709–712.
- Wilkinson, T.A., Tellinghuisen, T.L., Kuhn, R.J., and Post, C.B. (2005). Association of Sindbis virus capsid protein with phospholipid membranes and the E2 glycoprotein: implications for alphavirus assembly. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 2800–2810.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anni Noorem

(sünnikuupäev: 26.01.1993)

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

Ross River viiruse infektsiooni visualiseerimine alfaviiruse valkude vastaste antikehade, lutsiferaaside ja fluorestseeruvate valkude abil,

mille juhendaja on Andres Merits,

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

Tartus, 23.05.2016

LISAD