

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

Kristi Tamm

**Semliki Forest viiruse mittestruktuurse valgu nsP2 tuumalokalisatsiooni mutantide  
fenotüüpide kirjeldamine**

Magistritöö

Juhendaja: prof. Andres Merits, *Ph.D*

TARTU 2007

## Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus .....	6
1. Kirjanduse ülevaade .....	7
1.1. Alfaviirused .....	7
1.2. Semliki Forest viirus .....	8
1.3. Virioni ehitus .....	8
1.4. Genoomi organisatsioon.....	9
1.5. SFV-l põhinevad vektorid .....	11
1.6. Replikatsioonitsükkel .....	11
1.6.1. Sisenemine rakku .....	11
1.6.2. SFV replikatsioon .....	12
1.6.3. Struktuursete valkude süntees.....	13
1.6.4. Pakkimine ja viiruse vabanemine .....	13
1.7. SFV mittestruktuursed valgud.....	13
1.8. Temperatuuritundlikud mutandid.....	16
1.9. SFV mõju peremehele .....	16
1.10. Alfaviiruste mittetsütotoksilised mutandid .....	17
1.11. Võimalikud SFV rakuspetsiifilise translatsiooni inhibeerimise mehhanismid .....	19
2. Eksperimentaalne osa .....	23
2.1. Uurimustöö eesmärgid .....	23
2.2. Materjal ja meetodika.....	25
2.2.1. Rakuliinid ja söötmed.....	25
2.2.2. Kasutatud plasmiidid.....	25
2.2.3. <i>In vitro</i> transkriptsioon .....	26
2.2.4. Transfektsioon .....	27
2.2.5. VLP-de ja viirus-stokkide kogumine .....	28
2.2.6. Rakkude nakatamine d1EGFP kodeerivaid replikone sisaldavate VLP-dega ja VLP-de tiitri määramine.....	28

2.2.7. Viirusega nakatamine ja lüüsilaikega titreerimine .....	28
2.2.8. Lutsiferaasi ekspressiooni kvantifitseerimine .....	29
2.2.9. Valkude ekspressiooni määramine <i>Western blot</i> meetodil.....	29
2.2.10. Metaboolne märgistamine .....	29
2.2.11. UV-kiiritatud viiruse tootmine ja UV-kiiritatud viirusega nakatatud rakkude valgusünteesi uurimine.....	30
2.2.12. Replikonide tsütotoksilisuse määramine .....	31
2.2.13. Rakkude rakutsükli uurimine läbivoolu tsütomeetril .....	31
2.2.14. <i>Northern blot</i> analüüs .....	32
2.2.15. Pöördtranskriptsioon, PCR ja sekveneerimine .....	32
2.2.16. Statistiline analüüs.....	34
2.3. Tulemused .....	35
2.3.1. SFV replikonis sisalduvate mutatsioonide mõju VLP-tootlikkusele .....	35
2.3.2. Transgeeni ekspressioon replikonidega transfekteeritud rakkudes .....	36
2.3.3. Mutantsete replikonide mõju peremeesraku valgusünteesile.....	40
2.3.4. Mutantsete replikonide tsütotoksilisuse hindamine .....	43
2.3.5. SFV replikonide mõju rakutsüklile .....	45
2.3.6. Replikonide positiivse polaarsusega RNA akumulatsioon rakkudes.....	47
2.3.7. SFV4- $\Delta$ ARR, SFV4-RDD ja SFV4-PG viiruste mõju peremeesraku metabolismile... 51	
2.3.8. Rakku sisenemise tee ei mõjuta SFV4-RDD viiruse tsütotoksilisust.....	53
2.4. Arutelu.....	55
Kokkuvõte .....	62
Summary .....	64
Kasutatud kirjandus.....	66
Kasutatud internetileheküljed.....	72
Lisa 1 .....	73
Lisa 2 .....	74

## **Kasutatud lühendid**

- BHK-21** – hamstri neerurakuliin nr 21 (*baby hamster kidney cells, nr 21*)
- C** – kapsiidivalk (*capsid protein*)
- cDNA** – komplementaarne DNA (*complementary DNA*)
- CMC** – karboksümetüülselluloos (*carboxymethylcellulose*)
- d1EGFP** – destabiliseeritud võimendatud roheliselt helendav valk (*destabilized enhanced green fluorescent protein*)
- DEPC** – dietüülpürokarbonaat (*diethyl pyrocarbonate*)
- DTT** – ditiotreitol (*dithiothreitol*)
- EDTA** – etüleendiamiintetraädikhape (*ethylenediamine tetraacetic acid*)
- EEEV** - *Eastern Equine Encephalitis virus*
- eIF** – eukariooti translatsiooni initsiatsiooni faktor (*eukaryotic translation initiation factor*)
- ER** – endoplasmaatiline retiikulum (*endoplasmic reticulum*)
- FCS** – veise loote seerum (*fetal calf serum*)
- GMEM** - *Glasgow Modified Eagle's Medium*
- LB (sööde)** - Luria-Bertani (sööde)
- MEM** – *Modified Eagle's Medium*
- Met-tRNAi** - initsiaator metionüül-tRNA (*initiator methionyl-tRNA*)
- MOI** – infektsiooni kordsus (*multiplicity of infection*)
- MOPS** – 3-(N-morfoliino)propaansulfoonhape (*3-(N-morpholino)propanesulfonic acid*)
- NLS** – tuuma lokalisatsiooni signaal (*nuclear localization signal*)
- nsP** – mittestruktuurne valk (*nonstructural protein*)
- NTPaas** – nuklosiidtrifosfataas (*nucleoside triphosphatase*)
- PBS** – fosfaatpuhvriga sooladelaht (*phosphate buffered saline*)
- PCR** – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)
- p.f.u** – lüüsilaiiku moodustav ühik (*plaque forming unit*)
- PKR** - kaksikahelalise RNA poolt aktiveeritud proteiinkinaas (*double-stranded RNA activated protein kinase*)

**PLB** – passiivse lüüsi puhver (*passive lysis buffer*)

**RpS6** - ribosoomi valk S6 (*ribosomal protein S6*)

**RT-PCR** – pöördtranskriptsioon-polümeraas-ahelreaktsioon (*reverse transcription polymerase chain reaction*)

**SDS** – naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfate*)

**SFV** – Semliki Forest viirus (*Semliki Forest virus*)

**SSC** - naatriumkloriidi ja naatriumsitraadi lahus (*solution of sodium chloride and sodium citrate*)

**Tris** – trishüdrosümetüülaminmetaan (*trishydroxymethylaminomethane*)

**VEEV** - *Venezuelan Equine Encephalitis virus*

**VLP** – viirus-laadne partikkel (*virus-like particle*)

**wt** – metsik-tüüpi (*wild type*)

## Sissejuhatus

Viiruste bioloogiline mitmekesisus on ülimalt lai, nad suudavad parasiteerida kõigis elusorganismides ja kasutavad enda taastootmiseks ääretult varieeruvaid süsteeme. Üheks põhjalikumalt uuritud mudelviiruseks on Semliki Forest viirus (SFV). SFV kuulub suhteliselt lihtsate ja väikeste positiivse polaarsusega RNA-genoomsete viiruste hulka, olles seejuures suuteline nakatama mitmeid erinevaid peremeesorganisme ja rakutüüpe. Lisaks sellele on SFV kergelt kultiveeritav koekultuuris ja inimesele ohutu. Seetõttu on SFV-l põhinevad vektorid laialt kasutusel geeniekspressiooni süsteemides ning võib oletada, et antud vektorite kasutusala laieneb tulevikus ka näiteks meditsiini valdkonda.

SFV genoom kodeerib struktuurseid ja mittestruktuurseid valke. Struktuurseid valke vajab viirus uute virionide moodustamiseks, mittestruktuurseid aga viiruse genoomi replitseerimiseks ja transkribeerimiseks. Enim erinevaid funktsioone on teisel mittestruktuursel valgul (nsP2), mida muuseas peetakse ka SFV tsütotoksilisuse tekitajaks. Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli leida ja analüüsida seoseid nsP2 valgu tuuma lokaliseerumise ja SFV tsütotoksilisuse tekitamise vahel.

Käesoleva uurimustöö teoreetiline osa annab lühida ülevaate alfaviiruste grupist, mille hulka kuulub ka SFV. Pikemalt kirjeldatakse SFV virioni ehitust, genoomi struktuuri ja viiruse elutsükli. Kuna käesoleva töö eesmärgiks oli tuua selgust SFV poolt põhjustatud tsütotoksilisuse nähtusesse, siis on teoreetilises osas ülevaade ka viiruse võimalikest tsütotoksilisuse tekitamise mehhanismidest.

Töö eksperimentaalses osas kirjeldatakse uudsete SFV mutantide fenotüüpe. Antud mutandid sisaldavad mutatsioone nsP2 valgu tuumalokalisatsioonisignaali järjestuses. Lisaks tsütotoksilisuse ja nsP2 valgu rakusisese lokalisatsiooni uurimisele keskendutakse eksperimentaalses osas ka viirus-laadsete partiklite tootlikkust mõjutavate faktorite selgitamisele.

Töö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja rakubioloogia instituudis mikrobioloogia ja viroloogia õppetooli juures. Sooviksin tänada professor Andres Meritsat juhendamise ja kannatlikkuse eest. Samuti tänan Inga Sarandit, Kaja Kiivrit, Ingrid Tagenit, Anna Iofikut ja Eva Zusinaitet abi ja kasulike nõuannete eest.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Alfaviirused

Alfaviirused on positiivse polaarsusega RNA genoomsed membraaniga viirused. Nad kuuluvad sugukonda *Togaviridae*, kuhu peale perekonna *Alphavirus* kuulub veel perekond *Rubivirus*, mille ainuesindaja, punetiste viirus, on organisatoorselt sarnane alfaviirustele (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles).

Alfaviiruste hulka kuulub 26 liiki viiruseid, millel omakorda on palju erinevaid geograafiliselt paigutunud tüvesid. Aminohappelises järjestuses on neil viirustel omavahel vähemalt 45 %-line identsus struktuursete valkude osas ja vähemalt 60 %-line identsus mittestruktuursete valkude seas (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles).

Alfaviiruste peremeeste ring on äärmiselt lai. Nad nakatavad nii oma pärisperemehi, kelleks võivad olla linnud või imetajad, kui ka sääski ning teisi verd imevaid selgrootuid, kes on viirusele vektoriks ja kellele on viirusnakkus asümptomaatiline. Osa alfaviirusi on leitud ka kahepaiksetest, roomajatest ja kaladest. Sisenenuna organismi suudab alfaviirus nakatada paljusid erinevaid kudesid (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles).

Selgroogses peremehes põhjustab alfaviirus tavaliselt raske haiguse, samas kui vektoris kulgeb infektsioon suhteliselt healoomuliselt ja kestab kogu elu. Alfaviirused võivad kujutada endast tõsist ohtu inimtervisele. Näiteks põhjustavad *Eastern Equine Encephalitis virus* (EEEV) ja *Western Equine Encephalitis virus* Põhja- ja Lõuna-Ameerikas inimestele surmaga lõppevat entsefaliiti (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles). 2006. aastal toimus Indias ning India ookeani saartel suur Chikungunya viiruse puhang, põhjustades haigestunutel muu seas kõrge palaviku, liigese- ja peavalusid ning unetust. Näiteks Reunioni saare 770 000 elanikust haigestus 265 000 ning suri 237 (Charrel *et al.*, 2007). Arvatakse, et ülisuure leviku põhjuseks oli viiruse uute fülogeneetiliste variantide teke ning viirusele vektoriks olevate sääskede populatsiooni kasvamine. Kardetakse, et Chikungunya viirus võib lähimas tulevikus levida ka Vahemere-äärsetesse maadesse ja põhjustada seal suuri haiguspuhanguid.

## 1.2. Semliki Forest viirus

Semliki Forest viirus (SFV) on suhteliselt lihtne viirus, kodeerides vaid üheksat valku, millest neli mittestruktuurset valku (nsP1, nsP2, nsP3 ja nsP4) on vajalikud viiruse RNA sünteesiks, samas kui struktureeritud valgud moodustavad kapsiidi (C valk) ja sisalduvad membraanis (E1, E2 ja E3). Struktuursete valkude hulka kuulub ka pisike 6K (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles).

SFV eraldati esmakordselt sääskedest Ugandas aastal 1944, kuid järgnevatel aastatel on tehtud lisanduvaid isoleerimisi. SFV looduslikeks peremeesteks peetakse närilisi. SFV originaaltüvi oli L10, mis põhjustab hiirtel surmaga lõppevat entsefaliiti kesknärvisüsteemi nakatamise järel (Atkins *et al.*, 1999, ja viited selles). SFV prototüüpüvi, mille põhjal konstrueeriti esimene infektsiooniline kloon (pSP6-SFV4) (Liljeström *et al.*, 1991), pärineb ilmselt L10-st, kuid on kaotanud osa oma virulentsusest, tõenäoliselt väga pikaajalise koekultuuri rakkudes kasvamise tagajärjel. pSP6-SFV4-lt transkriptsiooni tulemusena saadavat viirust nimetatakse SFV4-ks. Hiljem eraldati ka SFV avirulentne tüvi A7, millest selekteeriti veelgi avirulentsema fenotüübi saamiseks A7[74] tüvi (Atkins *et al.*, 1999, ja viited selles).

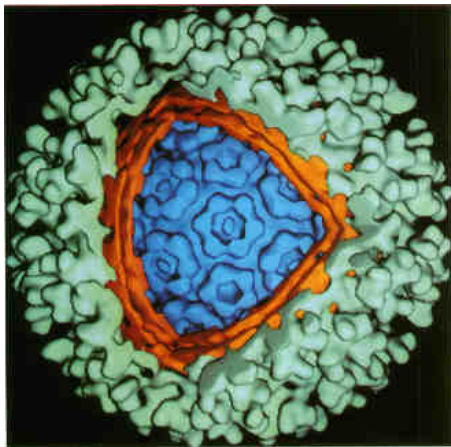
SFV laboratoorseid tüvesid peetakse inimesele avirulentseks, küll aga leidub temalgi looduslike tüvesid, mis põhjustavad inimestel haigusi. Näiteks tekitab Kesk-Aafrikas leiduv SFV tüvi väga tugevaid peavalusid, palavikku, lihase- ja liigesevalu (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles).

## 1.3. Virioni ehitus

SFV virion on väga korrapärase struktuuriga. Ta omab ikosaeedrilist membraani pakitud kapsiidi, mis koosneb üheaheelalisest positiivse polaarsusega RNA genoomist suurusega umbes 11 500 nukleotiidijätki ja ühe kapsiidivalgu 240 koopist (joonis 1). Kapsiidivalgu aluselise reaktiivsusega N-terminaalne domeen seob viiruse RNA (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles).

Virioni membraan pärineb raku plasmamembraanist ja selle sisse on paigutatud viiruse kodeeritud glükoproteiinid, millest kaks, E1 ja E2 on ankurdatud membraani oma C-terminaalsete sabadega. E1 ja E2 moodustavad heterodimeere, kolm heterodimeeri omakorda viiruse oga ehk piigi, mida on virionis kokku 80. Virionis esinevad ka kaks väikest valku – E3 ja 6K, millest E3 on väike perifeerne membraanivalk, 6K on aga esindatud virionis väheste

koopiatena (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles). 6K valgu kohta ei teata palju, kuid teda on nähtavasti viirusele vaja virionide formeerumise mingis etapis, kuna mutant, millel antud valk oli deleteeritud, moodustas palju vähem partikleid kui metsik-tüüpi (wt) viirus (Liljeström *et al.*, 1991). Hiljem on välja pakutud hüpotees, mille kohaselt osaleb 6K ka virioni piigi stabiliseerimisel (McInerney *et al.*, 2004).



**Joonis 1. Alfaviiruse virioni skeem.** Viiruse genoom on pakitud kapsiidi, mis on joonisel tähistatud siniselt. Kapsiid on omakorda kaetud plasmamembraanist pärineva ümbrisega, mis on joonisel oranž. Membraani glükoproteiinid on tähistatud heleroheliselt (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles).

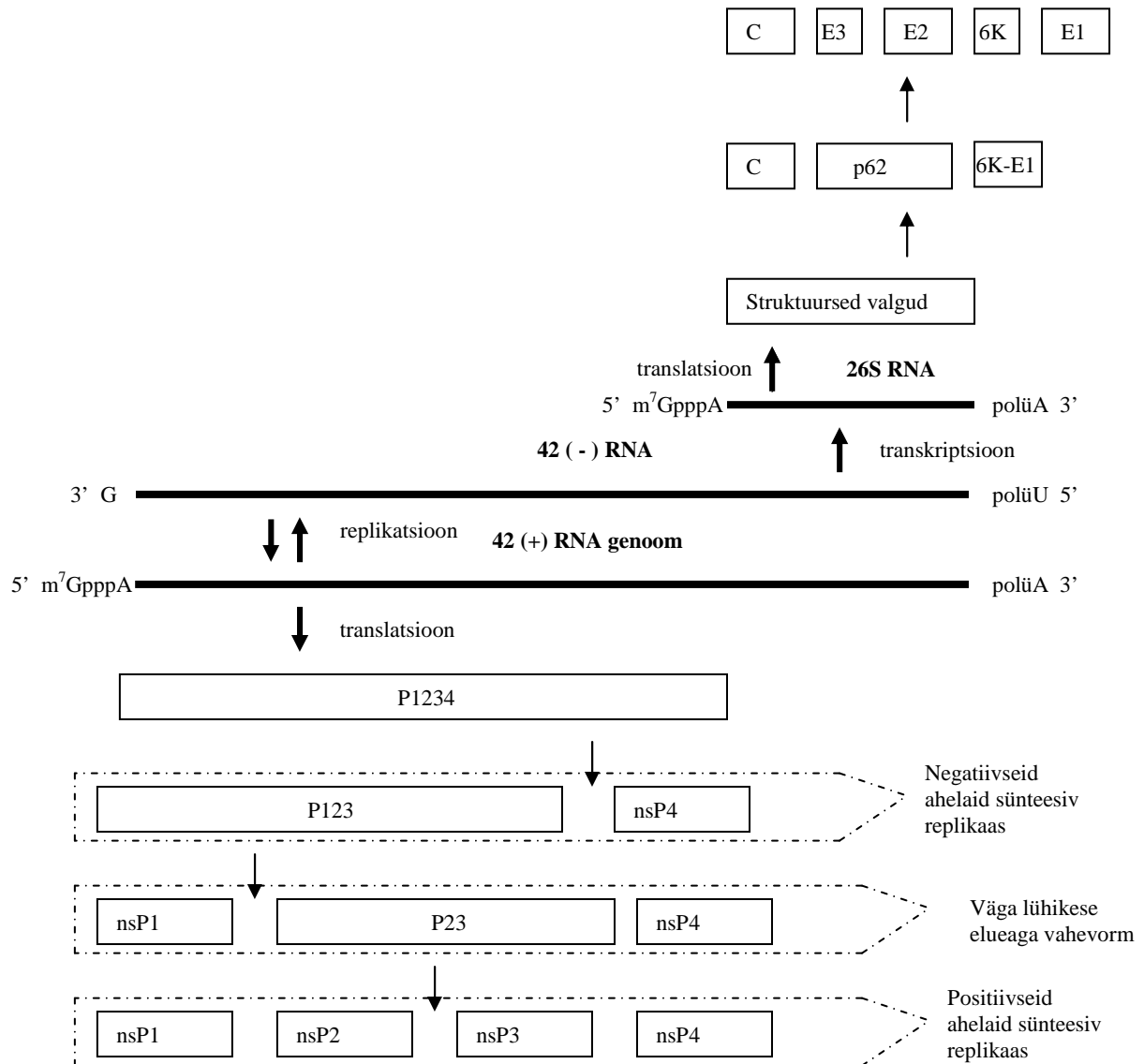
#### 1.4. Genoomi organisatsioon

SFV genoomi organisatsioon on kujutatud joonisel 2. Ligikaudu 11 500 nukleotiidi pikkuse positiivse polaarsusega RNA (42S RNA) 5' otsas on *cap*-struktuur ja 3' otsas asub polü-A saba. Genoom on jagatud kaheks suureks regiooniks: 5'-terminaalne kaks kolmandikku kodeerib mittestruktuurseid valke, mis moodustavad viiruse replikaasi, ning 3'-terminaalne kolmandik kodeerib struktuurseid valke. Mittestruktuurseid valke sünteesitakse genoomselt RNA-lt ühe suure polüproteiinina (P1234) ja protsessitakse hiljem neljaks valguks (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles).

RNA replikatsiooni käigus moodustatakse kõigepealt genoomi negatiivse polaarsusega koopia, mis on komplementaarne genoomsele RNA-le, välja arvatud üks paardumatu G-jääk 3' otsas. See negatiivse polaarsusega RNA on matriitsiks nii uute genoomide kui ka subgenoomse RNA (26S RNA) tootmisel (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles).

26S RNA sünteesitakse, kasutades sisemist transkriptsiooni initsiatsiooni punktis, mis asub umbes kahe kolmandiku kaugusel 42S negatiivse ahela 3' otsast (Brzeski ja Kennedy, 1977). 26S RNA omab samuti *cap*-struktuuri ja on polüadenüleeritud. 26S RNA-lt

transleeritakse struktuursed valgud ühe suure polüproteiinina (Glanville *et al.*, 1976), mis ko- ja post-translatsiooniliselt protsessitakse struktuurseteks valkudeks.



**Joonis 2. SFV genoomse organisatsiooni, translatsiooni ja polüproteiinide protsessingu skeem.** SFV genoomselt RNA-lt transleeritakse mittestruktuurne polüproteiin, mis lõigatakse nsP2 valgu poolt mittestruktuurseteks valkudeks. Mittestruktuursete valgud ning nende eelvalgud toimivad RNA replikaasidena joonisel näidatud moel. Esmalt sünteesitakse negatiivse polaarsusega täispikki viiruse genoomi, mis on matriitsiks uute positiivse polaarsusega genoomide ning subgenoomse RNA sünteesimisel. Viiruse struktuursed valgud transleeritakse subgenoomselt RNA-lt polüproteiinina ning protsessitakse lõpp-produktideks viiruse ja raku proteaaside poolt. Skeemi aluseks on Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles.

## 1.5. SFV-1 põhinevad vektorid

SFV replikon-vektorites asendatakse struktuursed geenid transgeeniga, milleks on mõni uurijale huvipakkuv geen. Saadud DNA konstrukti nimetatakse replikoniks. Replikoni komplementaarset DNA-d (cDNA) sisaldavalt plasmiidilt sünteesitud RNA rakku viimisel toodetakse rakus SFV mittestruktuurseid valke ja paljundatakse replikoni RNA-d, kuid kuna struktuursed valgud puuduvad, ei toimu partiklite moodustumist ja vabanemist. Struktuursete valkude ekspresseerimiseks on konstrueeritud *helper*-süsteem, mille vastavas RNA-s puudub pakkimissignaali, kuid on olemas struktuurseid valke kodeerivad järjestused. Helperi ja replikoni RNA-de kotransfektsioonil helper-RNA replitseerub mittestruktuursete valkude abil ja sünteesitud subgenoomse RNA vahendusel ekspresseeritakse rakus ka struktuurseid valke. Selle tulemusena pakitakse replikoni RNA ja rakkudest vabastatakse viiruslaadsed osakesed (VLP-d). Et vältida võimalikku helperi ja replikoni RNA-de rekombinatsiooni ja wt viiruse teket, kasutatakse veel nn *split-helperi* süsteemi, milles üks helper kodeerib vaid kapsiidivalgu ja teine ülejäänud struktuurseid valke (Atkins *et al.*, 1999, ja viited selles).

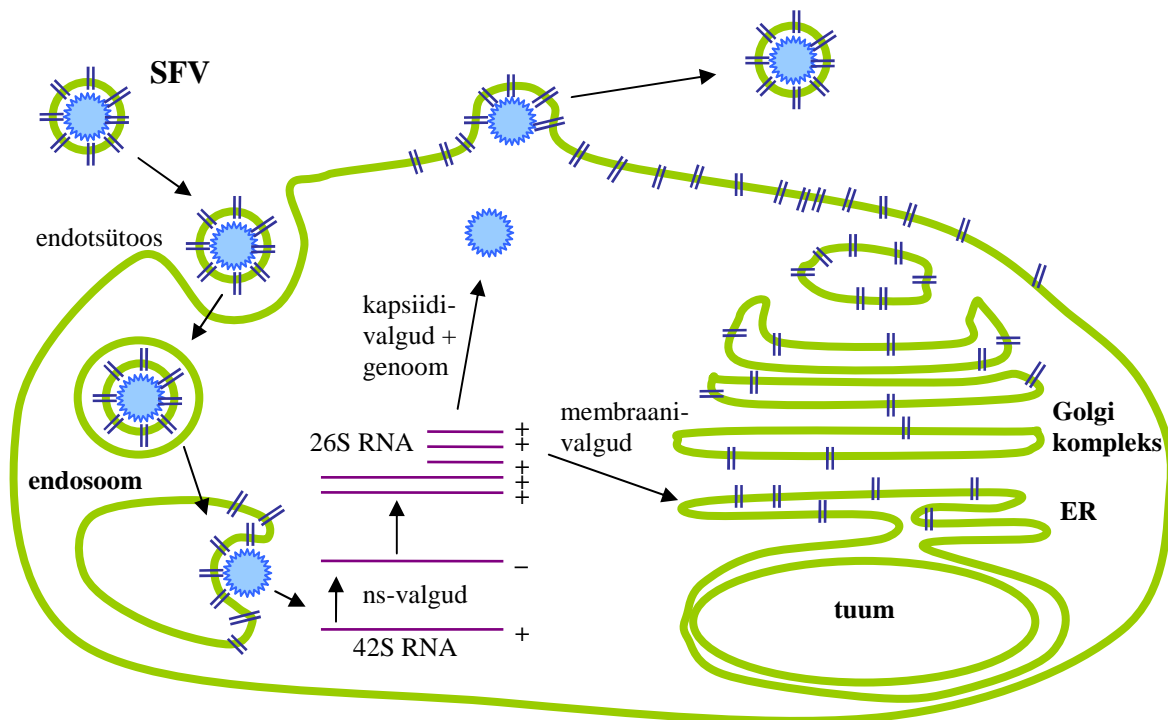
## 1.6. Replikatsioonitsükkel

### 1.6.1. Sisenemine rakku

SFV retseptorid ei ole üheselt määratud. Võimalik, et viirus kasutab mitmeid alternatiivseid rakupinna retseptoreid, kuna ta suudab nakatada väga paljusid erinevaid rakutüüpe. Ühtedeks võimalikeks retseptoriteks raku pinnal võivad olla muu seas inimese (HLA-A ja HLA-B) ning hiire (H-2K ja H-2D) koesobivusantigeenid (Helenius *et al.*, 1978).

Alfaviirused sisenevad rakku endotsütoosi abil (joonis 3), kasutades selleks klatriin-kaetud vesiikuleid, mis muutuvad endosoomideks. Viiruse vabanemine endosoomidest toimub pH-st sõltuvalt, kuna madal pH viib E1-E2 heterodimeeride lagunemisele ja seetõttu vabaneb E1-s asuv *fusion*-domeen. Virioni ja endosoomi membraanid fuseeruvad ning nukleokapsiid vabaneb tsütoplasmasse. Alternatiivseks sisenemisteedeks on virioni membraani fuseerumine raku plasmamembraaniga, mille tulemusena siseneb virioni kapsiid rakku (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles).

SFV lahtipakkimine ehk genoomse RNA vabastamine nukleokapsiidist toimub tänu ribosoomidele, kuna ribosoom seondub kapsiidivalgu sama piirkonnaga, millega oli seotud viiruse RNA (Singh ja Helenius, 1992).



**Joonis 3. SFV replikatsioonitsükkel.** Selgitus on tekstis.

### 1.6.2. SFV replikatsioon

SFV replikatsioon leiab aset raku tsütoplasmas paiknevates membraaniga ümbritsetud sfäärulites (Peränen ja Kääriäinen, 1991). Translatsioon 42S RNA positiivselt ahelalt annab produktiks vaid ühe polüproteiini – mittestruktuursete valkude eellase (Glanville *et al.*, 1976), mis hiljem lõigatakse küpseteks valkudeks. nsP2 valku peetakse vastutavaks kõigi P1234 polüproteiini lõikamiste eest (Merits *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004). SFV replikatsiooni skeem on esitatud joonisel 2.

1) Esmalt toimub lõikamine tulevaste nsP3 ja nsP4 valkude vahel, mille tulemuseks on P123 ja nsP4-st koosnev kompleks, mis toodab genoomselt RNA-lt ühe negatiivse RNA ahela. 3/4 saidi protsessing toimub varajases infektsioonifaasis arvatavasti *in cis*, kui viirusvalkude kontsentratsioon on madal, kuid võib toimuda ka *in trans*.

2) Järgnevalt lõigatakse *in cis* P123 polüproteiini küljest nsP1.

3) Vahetult peale nsP1 valgu protsessimist ülejäänud polüproteiini küljest leiab aset nsP1 + nsP2 + nsP3 + nsP4 kompleksi moodustumine *in trans* toimuva P23 lõikuse tagajärjel. Küps replikaas ei suuda enam toota negatiivseid RNA ahelaid ning sünteesib genoomseid ja subgenoomseid RNA-sid molaarses vahekorras ligikaudu 1:2 (Vasiljeva *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004).

### **1.6.3. Struktuursete valkude süntees**

Umbes 2...4 tundi peale infektsiooni algust hakkab alfaviirusega nakatatud raku lõppema kõikide rakuspetsiifiliste valkude ja viiruse mittestruktuursete valkude süntees. Seejärel transleeritakse rakuks vaid viiruse 26S RNA-d kasutades selleks erilist geneetilist elementi – translatsioonilist enhaanseri, mis paikneb struktuursete valkude kodeeriva ala alguses (vt alapeatükk 1.11. Võimalikud SFV rakuspetsiifilise translatsiooni inhibeerimise mehhanismid). Alfaviiruste struktuursete valgud sünteesitakse 26S RNA-lt polüproteiinina, mis protsessitakse nii ko- kui ka posttranslatsiooniliselt. Kapsiidivalk asub selles polüproteiinis N-terminuses ja ta omab seriinproteaaasi aktiivsust, mis toimib *in cis*, et vabastada ennast sünteesijärgus oleva polüproteiini küljest. E3, E2, 6K ja E1 valgud lõigatakse individuaalseteks valkudeks raku ensüümide poolt. Kõige viimasena toimub lõikamine E3 ja E2 valgu vahel. Nii E1 kui ka p62 (E3-E2 eelvalk) omavad oma C-terminuste lähedal membraani ankurdamise signaali, samuti glükosüleeritakse ja palmitüleeritakse nad mõlemad. Küpses virionis esinevad E2 ja E1 dimeerid moodustuvad juba staadiumis, kui p62 valk pole veel protsessitud. p62 ja E1 heterodimeerid liiguvad läbi Golgi kompleksi rakupinnale, kusjuures enne sihtpunkti jõudmist toimub lõikamine ka p62-s, moodustades E3 ja E2 valgud (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles).

### **1.6.4. Pakkimine ja viiruse vabanemine**

Viiruse RNA pakkimiseks kapsiidi peetakse kõige olulisemaks SFV genoomse RNA nukleotiidi vahemikus 2766 kuni 2823 (oletatav pakkimissignaali), mis asuvad nsP2 valku kodeerivas regioonis (joonis 4; White *et al.*, 1998). Tõenäoliselt käivitab just see regioon RNA seondumise kapsiidivalgu N-terminaalse osaga.

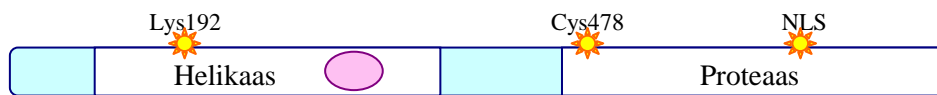
SFV nukleokapsiidid moodustuvad tsütoplasmas, jõudes plasmamembraanini seonduvad nad eelnevalt sinna paigutatunud E2 glükoproteiini C-terminaalse otsaga (joonis 3). Viiruse vabanemine toimub plasmamembraanilt pungumise teel (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles).

## **1.7. SFV mittestruktuursete valgud**

**nsP1** osaleb viiruse RNA-de *capping*-reaktsioonis, mis on erinev raku enda *capping*-mehhanismist (Ahola ja Kääriäinen, 1995). Nakatunud raku lokaliseerub nsP1 viiruse

replikatsioonikompleksides ning lisaks ka plasmamembraani ja filopoodilaadsetesse jätkettesse raku pinnal, mis on tekitatud nsP1 enda poolt (Kujala *et al.*, 2001). On näidatud, et membraanidele seondumine on vajalik nii nsP1 guaniin-7-metüültransferaasse kui ka guanüülültransferaasse aktiivsuse aktiveerimise jaoks (Ahola *et al.*, 1999).

**nsP2** valk omab paljusid erinevaid aktiivsusi ja on seega viirusele funktsionaalselt väga oluline. SFV nsP2 valgu N-terminaalne osa käitub helikaasi, RNA-trifosfataasi ja nukleosiidtrifosfataasina (NTPaasina), samas kui C-terminaalne domeen on proteaas (joonis 4).



**Joonis 4. SFV nsP2 valgu skeem.** Joonisele on märgitud nsP2 valgu ensümaatiliste aktiivsuste eest vastutavad helikaasne ja proteaasne domeen. nsP2 proteaasne domeen vastutab SFV mittestruktuurse polüproteiini protsessingu eest, helikaasne domeen vastutab aga helikaasse, nukleosiidtrifosfataasse ja RNA-trifosfataasse aktiivsuse eest. Tärnidega on joonisele märgitud ensümaatiliste aktiivsuste jaoks oluliste aminohappejääkide Lys192 ja Cys478 ning tuumse lokalisatsiooni signaali (NLS) asukohad. Ovaaliga on tähistatud järjestus, mis on kodeeritud SFV oletatavale pakkimissignaali vastava järjestuse poolt. Skeemi aluseks on Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles.

nsP2 nukleosiidtrifosfataasest aktiivsust, mida viirus vajab oma genoomi replikatsiooniks ja ka transkriptsiooniks, tõestati mutatsiooniga Lys-192→Asn, mis eemaldas nsP2-lt igasuguse NTPaasest aktiivsuse (Rikkonen *et al.*, 1994). Sellist mutatsiooni sisaldav viirus ei olnud eluvõimeline (Rikkonen, 1996).

Sama mutatsiooni kasutati, et tõestada ka nsP2 helikaasest aktiivsuse olemasolu (Gomez de Cedron *et al.*, 1999). Helikaasest aktiivsuse tähtsus on siiani jäänud ebaselgeks. Võimalik, et viirusele on seda vaja näiteks nukleosiidtrifosfataasest aktiivsuse käivitumiseks, kuna üksikahelaline RNA tundub stimuleerivat nsP2 NTPaasest aktiivsust.

nsP2 on teine SFV viirusspetsiifiline valk, mis osaleb viiruse RNA-de *capping*-reaktsioonil. nsP2 N-terminaalne ala on nimelt vastutav ka RNA-trifosfataasest aktiivsuse eest. Seda tõestati järjekordselt mutatsiooniga Lys-192→Asn, mis eemaldas nsP2-lt RNA-trifosfataasest aktiivsuse (Vasiljeva *et al.*, 2000).

On näidatud, et nsP2 on tsüsteinproteas ja ühtlasi ka ainus proteas, mida SFV vajab oma P1234 polüproteiini lahtilõikamiseks. Mutatsioon nsP2 katalüütilises tsentris (Cys-478→Ala) välistas täielikult P12<sup>CA34</sup>, P12<sup>CA3</sup> ja P2<sup>CA3</sup> lõikamise (Strauss ja Strauss, 1994, ning viited selles; Merits *et al.*, 2001; Vasiljeva *et al.*, 2001). Hiljuti määrati kindlaks *Venezuelan Equine Encephalitis virus*'e (VEEV) proteaasse domeeni kristallstruktuur (Russo *et al.*, 2006). Leiti, et proteaasne domeen jaguneb kaheks aladomeeniks: N-terminaalne osa vastutab proteaasi ensümaatilise aktiivsuse eest ja C-terminaalne osa sarnaneb S-adenosüül-L-metioniinist sõltuvatele RNA-metüültransferaasidele. Nii N- kui ka C-terminaalse aladomeeni mõningad aminohappejäägid osalevad proteaasi substraadi seondamisel. Kristallstruktuuri põhjal oletati aga, et C-terminaalne aladomeen ei ole funktsionaalne RNA-metüültransferaas, vaid tõenäoliselt on tema roll replikaasi kompleksis RNA-matriitsi seondamisel. Järjestuste sarnasuse põhjal võib oletada, et SFV nsP2 proteaasse domeeni struktuur on VEEV omale sarnane.

SFV-ga nakatunud rakkudes transporditakse umbes 50% nsP2-st tuuma juba varases infektsioonifaasis (Peränen *et al.*, 1990; Rikkonen, 1996; Kujala *et al.*, 2001). Selle nähtuse põhjuseks on nsP2-s sisalduv tuumse lokalisatsiooni signaal (NLS), mille aminohappeline järjestus on P(647) RRR V(651). Mutatsioonid, mis asendavad NLS järjestuse arginiinid aspartaathapetega (Arg-648→Asp, Arg-649→Asp ja Arg-650→Asp, saades nii vastavalt nõ DRR, RDR ja RRD viirused) muudavad viiruse nsP2 valgu täielikult tsütoplasmaatiliseks, kuid ei takista viiruse replikatsiooni (Rikkonen *et al.*, 1992; Rikkonen, 1996).

On välja pakutud ka teooria, mille kohaselt nsP2 reguleerib 26S RNA transkriptsiooni (Suopanki *et al.*, 1998), kindlaid tõendeid sellele siiski pole. Tegu võib olla ka nsP2 kui proteaasi aktiivsuse kaudse efektiga, mis seisneb replikaasi kompleksi funktsioonide mõjutamises.

On ka näidatud, et nsP2 on SFV valkudest kõige olulisem tsütopatogeensuse põhjustamisel (vt alapeatükk 1.9. SFV mõju peremehele 1.10. Alfaviiruste mittetsütotoksilised mutandid).

**nsP3** valgu funktsioonid on jäänud siiani ebaselgeks. Teada on, et tema N-terminaalne domeen on alfaviiruste seas kõrgelt konserveerunud ja et nsP3 fosforüleeritakse (Peränen *et al.*, 1988; Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles). SFV-ga nakatatud rakus on näha nsP3-e lokalisatsiooni viiruse replikatsioonikompleksides (Kujala *et al.*, 2001). Üksinda ekspresseerituna moodustab nsP3 rakus amorfseid agregate (Salonen *et al.*, 2003).

**nsP4** valk on viiruse RNA polümeraasi katalüütiline sub-ühik. nsP4 sisaldab aminohappelist järjestust GDD, mis on tüüpiline paljudele viiruselistele RNA-sõltuvatele RNA polümeraasidele. nsP4 on ebastabiilne valk, kuna rakus ta ubikvitinüleeritakse ja degradeeritakse proteasoomi poolt (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles). Iseseisvalt ekspresseeritud nsP4 valgu puhul on täheldatud selle tsütoplasmaatilist lokalisatsiooni (Kujala *et al.*, 2001).

### **1.8. Temperatuuritundlikud mutandid**

Alfaviiruste temperatuuritundlikud mutandid isoleeriti juba mitu kümnendit tagasi peale viiruse tööstlust mutageeniga ning selektsiooni temperatuuritundlikkuse suhtes (Keränen ja Kääriäinen, 1974). Temperatuuritundlikud mutandid suudavad kasvada vaid mitterestriktiivsel temperatuuril (28°C – 30°C), kuid on eluvõimetud restriktiivsel temperatuuril (37°C – 39°C).

On huvipakkuv märkida, et enamus temperatuuritundlike mutantide mutatsioonidest lokaliseerusid nsP2 geeni. See kinnitab nsP2 valgu olulist, kuid paindlikku rolli SFV replikatsioonil (Lulla *et al.*, 2006).

Varemalt osutusid temperatuuritundlikud mutandid väga kasulikeks tööriistadeks, kuna neid uurides on avastatud mitmeid mittestruktuursete valkude omadusi. Tänapäeval pakuvad nad huvi ka võimaluse tõttu luua valguekspressiooni süsteeme, mis on kergesti kontrollitavad kasvukeskkonna temperatuuri reguleerimisega.

### **1.9. SFV mõju peremehele**

Nakatades selgroogsest organismist pärinevat rakku, blokeerivad alfaviirused peremeesraku makromolekulide sünteesi (Strauss ja Strauss, 1994, ja viited selles; Frolova *et al.*, 2002). Translatsiooni blokeerimine ei pruugi olla seotud transkriptsiooni mahasurumisega, kuna on leitud Sindbise viiruse (SFV lähisugulane alfaviiruste seas) mutant, millel esines translatsiooniline aga mitte transkriptsiooniline blokeering (Frolov, 2004, ja viited selles). Tõenäoliselt vajab viirus neid mehhanisme raku ja organismi viirusvastase vastuse inhibeerimiseks ning kogu olemasoleva metaboolse ressursi suunamiseks viiruse replikatsiooni tarbeks.

Ühes hiljuti ilmunud artiklis (Garmashova *et al.*, 2007) kirjeldatakse uurimustööd erinevate alfaviiruste poolt tekitatud transkriptsiooni mahasurumise kohta. Leiti, et SFV-I ja

Sindbise viirusel osaleb transkriptsiooni inhibeerimisel viiruse valkudest nsP2, samas kui EEEV ja VEEV puhul täidab sama rolli viiruse kapsiidivalk. Sellest järeldub, et alfaviirused võivad sõltuvalt liigist kasutada erinevaid rakulise transkriptsiooni blokeerimise meetodeid. Sama uurimisrühm on ka täheldanud, et mittetsütotoksilised Sindbise viiruse mutandid (näiteks SIN/G, vaata järgmist alapeatükki) ei ole suutelised maha suruma RNA polümeraas II sõltuvat rakulist transkriptsiooni (Gorchakov *et al.*, 2005).

Ajalooliselt on oletatud, et raku makromolekulide sünteesi mahasurumine on põhjuseks, miks SFV infektsioon tekitab lõpuks peremeesraku surma. Nüüdseks on aga teada, et kuigi neuronite kultuuris kutsub SFV esile nekroosi, mis tõenäoliselt on tingitud valgusünteesi lõppemisest, siis hamstri neerurakuliinis nr 21 (BHK-21), oligodendrotsüütide ja gliiarakkude puhul käivitub apoptootiline rada (Glasgow *et al.*, 1997). Üheks võimalikuks apoptoosi initsieerimise mehhanismiks on endoplasmaatilise retiikulumi (ER) stressi esilekutsumine läbi ER ülelaadimise vastuse, mis võib käivituda, kui liiga palju valke kuhjub ER-s (näiteks SFV struktuursed valgud) (Pahl, 1999, ja viited selles; Rao *et al.*, 2004, ja viited selles). Teiseks võimalikuks mehhanismiks, kuidas alfaviirused võivad käivitada apoptoosi, on kaksikahelalise RNA-ga aktiveeritavalt proteiinkinaasilt (PKR, vaata alapeatükk 1.11. Võimalikud SFV rakuspetsiifilise translatsiooni inhibeerimise mehhanismid) lähtuvad signaalirajad, mis samuti kulmineeruvad apoptoosiga (Garcia *et al.*, 2006, ja viited selles).

Avirulentse A7[74] tüve puhul tunduvad toimivat samad mehhanismid mis virulentse SFV4 puhulgi, ainult selle vahega, et SFV4 paljuneb neuronites kiiremini kõrge tiitrini kui A7[74] ja seega põhjustab ka suurema hulga neuronite surma, enne kui immuunsüsteem jõuab reageerida (Glasgow *et al.*, 1997; Atkins *et al.*, 1999, ja viited selles). See võibki saada peremeesorganismile saatuslikuks.

### **1.10. Alfaviiruste mittetsütotoksilised mutandid**

On leitud ja konstrueeritud SFV ja Sindbise viiruse mutante, mis on peremeesrakule suhteliselt mittetsütopatoogensed. Enamasti on nendel vektoritel või viirustel punktmutatsioonid nsP2 valku kodeerivas alas, mille tulemusena ei suruta maha peremeesraku valgusünteesi ja seega lastakse rakul kauem normaalselt funktsioneerida ning elada kui wt alfaviirusega nakatunud rakul (Perri *et al.*, 2000; Lundström *et al.*, 2001 (A), ning viited selles; Lundström *et al.*, 2001 (B); Lundström *et al.*, 2003). Ka mutant SFV4-RRD kuulub siia kategooriasse (Lundström *et al.*, 2003). SFV4-RDR puhul on märgatud vaid DNA sünteesi mahasurumise vähenemist, samal ajal kui translatsiooni blokeerimine oli enam-

vähem sama efektiivne kui SFV4-lgi (Rikkonen, 1996). Samas ei kutsunud SFV4-RDR hiirtes esile letaalset efekti isegi  $10^8$  lüüsilaiiku moodustava ühikuga (p.f.u-ga) kõhuõõnde nakatades (Rikkonen, 1996). SFV4-RDR viirus kutsub analoogiliselt SFV4-le ja A7[74]-le BHK-21 rakkudes esile apoptoosi ja neuronites nekroosi (Fazakerley *et al.*, 2002), kuid tõenäoliselt kulgeb ka tema infektsioon aeglasemalt kui SFV4 korral.

Täheldatud on ka tsütotoksilisust vähendavate mutatsioonide sünergilist efekti. Nii vähendas kahe mutatsiooni viimine samasse SFV vektorisse saadud vektori tsütopatogeensust veelgi (Lundström *et al.*, 2003).

Ka Sindbise viirusel, mis on paljuski väga sarnane SFV-le, on leitud mutantseid replikone, mis on mittetsütopatogeensed, suudavad kasvada persistentset BHK-21 rakkudes ja ekspresseerivad võõrgeeni kõrgel tasemel (Agapov *et al.*, 1998). Mittetsütopatogeenset fenotüüpi põhjustavad mutatsioonid kaardistati nsP2 geeni regiooni (Frolov *et al.*, 1999). Neist üheks oli Pro-726→Gly, selle mutatsiooniga viirust (SIN/G) on uuritud ka põhjalikumalt. Antud viirusega nakatatud rakus lokaliseerub nsP2 peaaegu täielikult tuuma vastandina wt viirusele, mille korral raku tuuma lokaliseerub ainult umbes 50 % nsP2 valgust (Gorchakov *et al.*, 2005). Samuti näidati, et kui wt viiruse korral toimub rakus üldine geeniekspressiooni mahareguleerimine, siis SIN/G puhul aktiveeritakse ligi 400 geeni ekspressioon ja surutakse maha paljude teiste geenide ekspressioon. Indutseeritud valkudest osalevad paljud viiruse poolt tekitatud stressiga võitlemisel. Muu hulgas näidati, et tänu aktiivsele peremeesraku-spetsiifilisele valgusünteesile toodetakse SIN/G viirusega nakatatud rakkudes palju rohkem tsütokiine kui wt viirusega nakatatud rakkudes. Tänu sellele suudab rakk efektiivselt võidelda viirusega ja peatada selle replikatsiooni (Frolova *et al.*, 2002; Gorchakov *et al.*, 2005).

On uuritud SFV ja Sindbise viiruse põhjal konstrueeritud mittetsütotoksilisi replikone, mis andsid BHK-21 rakkudes persistentse infektsiooni (Perri *et al.*, 2000). Persistentse infektsiooni eest vastutavad mutatsioonid kaardistati nsP2 valku kodeerivasse alasse. Leiti, et rakud, mis sisaldasid persistentset infektsiooni tagava mutatsiooniga replikone, sünteesivad viiruse positiivse polaarsusega RNA-sid märkimisväärselt madalamal tasemel (alla 10 %) kui wt replikonidega nakatatud rakud (Sawicki *et al.*, 2006). Arvatakse, et selle nähtuse põhjuseks on viiruse küpse replikaasi ebastabiilsus. Samuti leiti, et samad mutatsioonid tagavad viiruse negatiivse polaarsusega RNA pideva sünteesi vastandina wt viirusele või replikonile, mille puhul lõpeb negatiivse polaarsusega RNA sünteesimine mõned tunnid peale nakkuse algust. See tulemus on igati loogiline, kuna negatiivse polaarsusega RNA sünteesi suudab läbi viia vaid osaliselt protsessitud viiruse replikaas. Wt viirusega nakatatud rakus blokeeritakse kogu

raku translatsioon varsti peale infektsiooni algust, selle tulemusena lõpeb ka SFV mittestruktuurse polüproteiini ning tema protsessingu vaheproduktide sünteesimine. Kuna persistentset infektsiooni tagavad mutandid ei takista raku elulemust ja võimaldavad translatsiooni jätkumist, siis toodetakse pidevalt juurde ka värsked viiruse replikaasi komponente ja seega võimaldatakse negatiivse polaarsusega RNA-de sünteesi.

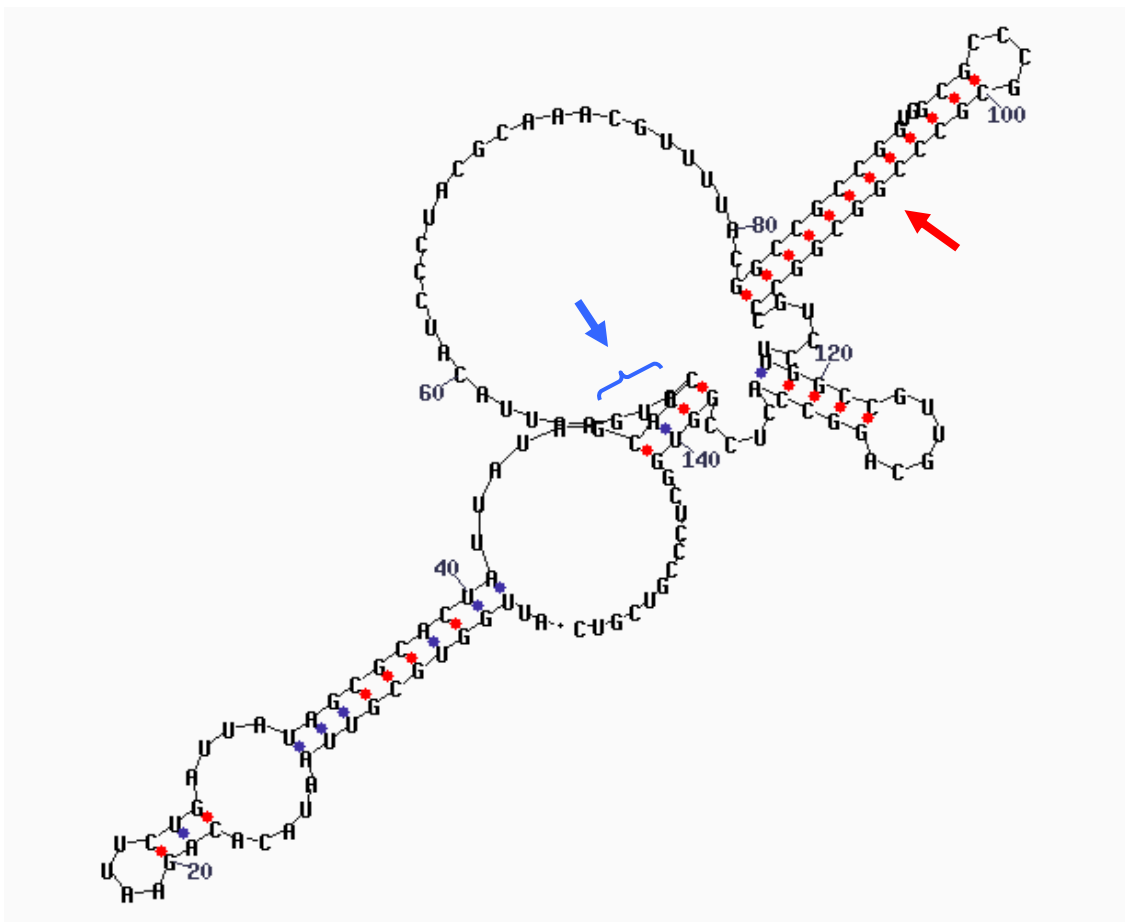
### **1.11. Võimalikud SFV rakuspetsiifilise translatsiooni inhibeerimise mehhanismid**

1) Üheks tõenäoliseks mehhanismiks, mis viib alfaviirusega nakatatud raku valgusünteesi mahasurumisele, on PKR-lt lähtuv rada. PKR mängib eukarüootidel mitmete viiruste vastases kaitses olulist rolli, kuna seondudes kaksikahelalise RNA-ga, mis on paljude viiruste (sh SFV) replikatsioonil tekkiv molekul, PKR dimeriseerub, fosforüleerub ja fosforüleerib seejärel ka eukarüoodi translatsiooni initsiatsiooni faktori  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ). Fosforüleeritud eIF2 $\alpha$  seob omakorda eukarüoodi translatsiooni initsiatsiooni faktori 2B (eIF2B), mis on translatsiooni initsiatsioonil limiteerivaks faktoriks, ja seeläbi saavutatakse väga järsk raku valgusünteesi blokk (Saunders ja Barber, 2003, ning viited selles). PKR-st lähtuv rada kulmineerub apoptoosi käivitamisega (Garcia *et al.*, 2006, ja viited selles). Kuna enamusel juhtudest blokeeritakse nii rakuliste kui ka viiruseliste mRNA-de translatsiooni initsiatsioon, siis toimib see mehhanism viiruse replikatsiooni peatamisel.

On leitud, et mõnede rakuliste ja viiruseliste mRNA-de translatsiooni võib eIF2 $\alpha$  fosforüleerimine sootuks võimendada (Holcik ja Sonenberg, 2005, ja viited selles; Garcia *et al.*, 2006, ja viited selles). Neist kõige silmatorkavamaks kirjeldatud juhtumiks on alfaviirused, mille subgenoomse RNA translatsioon toimub väga efektiivselt tingimustes, kus kõik raku eIF2 $\alpha$  molekulid on fosforüleeritud. Tõestati, et nende RNA-de kodeeriva järjestuse alguses paikneb unikaalne geneetiline element, n-ö translatsiooniline enhaanser (joonis 5), mis kujutab endast stabiilset RNA sekundaarstruktuuri (Frolov ja Schlesinger, 1996; McInerney *et al.*, 2005; Ventoso *et al.*, 2006). Arvatakse, et translatsiooniline enhaanser suudab iseseisvalt peatada ribosoomi RNA-l kodeeriva järjestuse alguses ning initsiaator metionüül-tRNA (Met-tRNA<sub>i</sub>) võib kompleksi toimetada alternatiivne eukarüoodi translatsiooni initsiatsiooni faktor 2A (eIF2A). On näidatud, et peremeesraku valgusünteesi blokeerimise tingimustes on subgenoomsete RNA-de translatsioon sõltuv nende RNA-de transkriptsioonist viiruse genoomi negatiivse polaarsusega koopialt (Sanz *et al.*, 2007). See nähtus lubab oletada, et SFV hilises infektsioonifaasis toimuva subgenoomsete RNA-de translatsiooni jaoks on lisaks SFV translatsioonilise enhaanseri struktuurile ja eIF2A

translatsioonifaktorile vajalikud ka komponendid viiruse replikaasist, mis võivad osaleda näiteks subgenoomse RNA ja ribosoomi vahel interaktsioonide loomisel.

Siiski näidati kasutades PKR negatiivset rakupopulatsiooni ja SIN/G viirust, et Sindbise viiruse poolt indutseeritavas translatsiooni mahasurumises ei ole PKR-sõltuv rada ainus ning isegi mitte peamine mehhanism (Gorchakov *et al.*, 2004, Ventoso *et al.*, 2006).



**Joonis 5. SFV subgenoomse RNA translatsioonilise enhaanseri skeem.** Joonisel on kujutatud SFV subgenoomse RNA esimese 153 nukleotiidi sekundaarstruktuur ennustatuna MFOLD (3.1.2) programmiga (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>). Kõige stabiilsemale juuksenõela-struktuurile viitab punane nool. Kogu struktuuri vabaenergia on  $\Delta G = -236$  kJ/mol. Sinise noolekesega on osutatud kapsiidivalgu kodeeriva järjestuse esimesele AUG koodonile.

2) Arutletud on ka SFV struktuursete valkude osalusest translatsioonilise inhibitsiooni tekkel. Struktuursete valkude roll valgusünteesi mahasurumise initsieerimises on aga väheusutav mitmel põhjusel. Esiteks seetõttu, et raku translatsiooni blokeerimine toimub ka juhul, kui raku viiakse viiruse replikon, millel puuduvad struktuursetid valke kodeerivad geenid. Lisaks sellele toodetakse SFV struktuursetid valke subgenoomselt RNA-lt ühe suure

polüproteiinina, mille alguses on translatsiooniline enhaanser. Translatsioonilise enhaanseri moodustab aga suur ja stabiilne RNA sekundaarstruktuur, mis mõjub translatsioonile tavatingimustes takistavalt. Seetõttu hakatakse SFV struktuurseid valke efektiivselt tootma alles siis, kui translatsiooni inhibitsioon on juba eelnevalt käivitatud.

On siiski näidatud, et SFV ning Sindbise viirusega nakatatud rakkude plasmamembraanides esinevad ioone läbilaskvad kanalid, mis viivad tsütoplasma ioonse tasakaalu paigast ära (Wengler *et al.*, 2003). Neid poore moodustab struktuurne valk E1 (Nieva *et al.*, 2004). See nähtus võib mängida vähemalt osalist rolli raku translatsiooni hääbumisel. Sellele viitab ka uurimustöö, millega näidati, et kuigi peremeesraku valgusünteesi mahasurumiseks piisab vaid Sindbise viiruse mittestruktuursetest valkudest, tekkis tsütopaatiline efekt ligikaudu kaks korda kiiremini, kui rakupinnal ekspresseeriti kõrgel tasemel E1 ja E2 glükoproteiine (Frolov ja Schlesinger, 1994).

Samuti näidati, et SFV kapsiidivalk seostub ribosoomidega (Singh ja Helenius, 1992). Seega on võimalik, et viiruse hilises infektsioonifaasis väga kõrge kapsiidivalgu kontsentratsiooni juures inaktiveeritakse raku ribosoomid otseselt kapsiidivalgu poolt.

Ühtlasi on võimalik, et SFV struktuursed valgud osalevad näiteks translatsiooni mahasurumise võimendamises.

**3)** On teada, et BHK-21 rakkudes, oligodendrotsüütides ja gliiarakkudes põhjustab SFV nakkus apoptoosi (Glasgow *et al.*, 1997). Apoptoosi käigus surutakse raku translatsioon maha, tõenäoliselt kuna osa translatsiooni initsiatsioonifaktoreid läbib proteolüütilise lõikamise ja ribosoomi valgu S6 (RpS6) fosforüleerituse tase langeb (Bushell *et al.*, 2004, ja viited selles; Holcik ja Sonenberg, 2005, ja viited selles). On huvipakkuv, et on näidatud VEEV nsP2 seostumist RpS6-ga (Montgomery *et al.*, 2006). Seega on võimalik, et alfaviiruse nsP2 võib otseselt ribosoomiga interakteerudes mõjutada raku translatsiooni.

Lisaks sellele on avastatud, et mõningates rakutüüpides ilmneb apoptoosi käigus ribosomaalsete rRNA-de spetsiifiline lõikamine (Houge *et al.*, 1995; King *et al.*, 2000; Nadano ja Sato, 2000) ning mRNA-de eluea märgatav lühenemine (Bushell *et al.*, 2004, ja viited selles). Need nähtused võivad samuti osaleda apoptootilises translatsiooni inhibitsioonis.

Siiski on ebausutav, et SFV poolt põhjustatav valgusünteesi blokeerimine on vahendatud apoptootiliste signaalide poolt. Nimelt on translatsiooni mahasurumine küllalt varajane nähtus, leides aset umbes kolmandal tunnil peale nakkuse algust, samas kui apoptoosile iseloomulikud jooned (näiteks DNA fragmenteerumine) hakkavad avalduma hiljem (Glasgow *et al.*, 1997; meie grupi avaldamata andmed).

4) Kõik siiani identifitseeritud SFV ja Sindbise viiruse mittetsütotoksilistest mutantidest omavad mutatsioone nsP2 valku kodeerivas alas (Perri *et al.*, 2000; Lundström *et al.*, 2001 (A), ning viited selles; Lundström *et al.*, 2001 (B); Lundström *et al.*, 2003). Samuti on teada, et umbes 50 % nsP2 valgust lokaliseerub raku tuuma (Rikkonen, 1996). Seetõttu on peetud võimalikuks, et interakteerudes tuumas olevate rakupoolsete faktoritega, käivitab nsP2 valk raku makromolekulide sünteesi blokeerivad ja apoptoosi käivitavad signaalid.

Kokkuvõtlikult võib öelda, et tõenäoliselt on raku translatsiooni inhibeerimine SFV poolt komplitseeritud fenomen, milles võivad osaleda mitmed erinevad rakupoolsed faktorid. Kuna aga kõik SFV mittetsütotoksilised mutandid omavad mutatsiooni just nsP2 alas, siis on selge, et valgusünteesi mahasurumises mängib ühte olulist rolli SFV nsP2 valk.

## **2. Eksperimentaalne osa**

### **2.1. Uurimustöö eesmärgid**

SFV on hästi uuritud viirus, mille tsütotoksilisust põhjustavad determinandid on siiski praeguseks määramata. On teada, et viirusepoolsetest valkudest on tsütotoksilisuse tekkel kõige olulisem viiruse teine mittestruktuurne valk nsP2. nsP2 on multifunktsionaalne valk, mille üheks omaduseks on umbes poolte rakus olevate nsP2 valgu molekulide lokaliseerumine tuuma. On oletatud, et nsP2 valgu interakteerumine tuumas paiknevate rakupoolsete faktoritega võib olla tsütotoksilise efekti põhjustajaks. Käesolevas töös sooviti kontrollida seda hüpoteesi.

Doktor Inga Sarandi poolt olid konstrueeritud erinevaid tuumalokalisatsiooni signaali mutatsioone sisaldavad SFV replikonvektorid. Eelkatsetest selgus, et  $\Delta\Delta\Delta$  mutatsiooniga replikon (kolme arginiini jäägi deletsioon) ei ole elujõuline, mistõttu selle mutatsiooniga replikoni katsetesse ei kaasatud. Samuti leiti, et teised mutantsed replikonid (RDD, DDR,  $\Delta RR$ ,  $\Delta\Delta R$  ja DDD) omavad temperatuuritundlikku fenotüüpi, kuna nad ei suuda replitseeruda ja toota markergeeni 37 °C juures, kuigi 28 °C juures oli antud replikonide paljunemine normaalne. Eelkatsetest selgus ka, et RDD mutatsiooniga replikon ei ole suuteline tootma arvestataval tasemel VLP-sid. Uuriti ka mutantsete nsP2 valkude lokaliseerumist rakus (illustreerivad pildid on toodud lisas 1) – kui DDR, DDD, RDD ja  $\Delta\Delta R$  mutatsioonidega nsP2 valkude puhul ei täheldatud tuumset lokaliseerumist, siis  $\Delta RR$  mutatsiooniga nsP2 lokaliseerub rakus peamiselt tuuma.

Kuna käesoleva uurimustöö üheks eesmärgiks oli SFV mittetsütotoksiliste mutantide leidmine, sooviti kasutada katsetes kontrollina mittetsütotoksilist replikoni. Kuna kirjanduses oli kirjeldatud üks väga madala tsütotoksilisusega Sindbise viiruse mutant, SIN/G (Frolova *et al.*, 2002), siis konstrueeriti meie laboris Kaja Kiivri poolt SIN/G-le analoogilise mutatsiooniga (PG) SFV replikon, mida kasutati mittetsütotoksilise replikoni kontrollina. PG mutatsiooniga nsP2 lokaliseerub rakus peamiselt tuuma. Katsetesse kaasati ka kirjanduses kirjeldatud RRD ja RDR mutatsioonidega replikonid (Rikkonen *et al.*, 1992; RRD mutatsioon oli kloneeritud Kaja Kiivri poolt; RDR mutatsiooniga replikon saadi Tero Ahola grupilt

Helsingi Ülikoolist), mis samuti omavad mutatsioone nsP2 tuumalokalisatsiooni signaali kodeerivas alas. Kirjanduses toodud andmeil lokaliseeruvad RDR ja RRD mutatsiooniga nsP2 valgud raku tsütoplasmasse (Rikkonen *et al.*,1992). Eelkatsetest selgus aga, et 28 °C juures sarnaneb RRD mutatsiooniga nsP2 valgu rakusisene lokalisatsioon wt nsP2 valgu omale, samas kui RDR mutatsiooniga nsP2 paikneb peamiselt tsütoplasmas.

Käesoleva uurimustöö eesmärgiks oli kirjeldada ülal loetletud mutantsete SFV replikonide fenotüüpe ning koguda informatsiooni SFV poolt põhjustatud tsütotoksilisuse ning VLP-de formeerumiseks vajalike tingimuste kohta. Sooviks oli ka uurida mittetsütotoksilisust tagavate mutatsioonide mõju täispika viiruse fenotüübile.

## **2.2. Materjal ja metoodika**

### **2.2.1. Rakuliinid ja söötmed**

Antud uurimustöös kasutati hamstri neerurakuliini BHK-21. Rakke kasvatati 28 °C, 5 % CO<sub>2</sub> ja kõrge niiskusega tingimustes GMEM söötmes (*Glasgow Modified Eagle's Medium*, „Gibco BRL”), millele lisati 5 % veise loote seerumi (FCS), 0,3 % *Bacto<sup>TM</sup> Tryptose Phosphate Broth*'i („Difco”), penitsilliini 100 IU/ml ja streptomütsiini 100 ng/ml (lõppkontsentratsioonid). Rakkude nakatamiseks kasutati virionide lahjendust seerumivabas GMEM söötmes.

### **2.2.2. Kasutatud plasmiidid**

Siin ja edaspidi on kasutatud järgmiseid viiruste ja replikonide kloneeritud cDNA-sid sisaldavate plasmiidide ning abi-plasmiidide tähiseid:

pSFV1-MCS1 – replikonvektorit sisaldav plasmiid (kodeerib SFV mittestruktuurseid valke), mis sisaldab multikloneerimissaiti nr 1 (MCS1) heteroloogse geeni kloneerimiseks,

pSFV1-(RDD)-MCS1 – replikonvektorit sisaldav plasmiid, milles replikoni järjestusse on sisse viidud RRR→RDD mutatsioon,

pSFV1-(RDD)-MCS1-luc – replikonvektorit sisaldav plasmiid, milles SFV subgenoomse promooteri alla multikloneerimissaiti nr 1 on kloneeritud jaanimardika lutsiferaasi geen,

pSFV1-(RDD)-MCS1-enh-luc – replikonvektorit sisaldav plasmiid, milles SFV subgenoomse promooteri alla multikloneerimissaiti nr 1 on kloneeritud SFV kapsiidivalgu kodeeriva ala algus (translatsiooniline enhaanser), suu- ja sõrataudiviiruse 2A autoproteaasi kodeeriv järjestus ning jaanimardika lutsiferaasi geen,

pSFV1-(RDD)-MCS1-pac – replikonvektorit sisaldav plasmiid, milles SFV subgenoomse promooteri alla multikloneerimissaiti nr 1 on kloneeritud puromütsiini N-atsetüültransferaasi geen (konstrueeritud prof. Andres Meritsa poolt),

pSFV1-(RDD)-d1EGFP – replikonvektorit sisaldav plasmiid, kus SFV subgenoomse promooteri kontrolli alla on kloonitud destabiliseeritud võimendatud roheliselt helendava valgu (d1EGFP) geen (prototüüp-plasmiid: Liljeström ja Garoff, 1991),

pSFV4-(RDD) – SFV4 infektsioonilist cDNA sisaldav plasmiid (kodeerib SFV mittestruktuurseid ja struktuurseid valke), millesse on sisse viidud mutatsioon RRR→RDD (Liljeström *et al.*, 1991),

pHelper1 – abiplasmiid, mis kodeerib SFV subgenoomse promooteri kontrolli all SFV struktuurseid valke (Liljeström ja Garoff, 1991),

pHelperC – abiplasmiid, mis kodeerib SFV subgenoomse promooteri kontrolli all SFV kapsiidivalku (Smerdou ja Liljeström, 1999),

pH-SG-luc – abiplasmiid, mis kodeerib SFV subgenoomse promooteri kontrolli all jaanimardika lutsiferaasi geeni (konstrueeritud Anna Iofiku poolt) ja

pH-SG-enh-luc – abiplasmiid, milles SFV subgenoomse promooteri alla on kloonitud SFV kapsiidivalgu kodeeriva ala algus (translatsiooniline enhaanser), suu- ja sõrataudiviiruse 2A autoproteaasi kodeeriv järjestus ning jaanimardika lutsiferaasi geen (konstrueeritud Anna Iofiku poolt).

Antud töös kasutatud plasmiidid sisaldavad SP6 promooterit, *E. coli* replikatsiooni *origini*, ampitsilliini resistentsusgeeni, SFV 5' ja 3' järjestusi (cDNA kujul), mis on vajalikud plasmiidilt toodetava RNA replitseerumiseks rakus SFV replikaasi abil, ja igale plasmiidile iseloomulikke elemente. Lisas 2 on toodud prototüüp-plasmiidide kaardid. Töös kasutati ka mutantseid pSFV1-MCS1, pSFV1-MCS1-luc, pSFV1-MCS1-enh-luc, pSFV1-MCS1-pac, pSFV1-d1EGFP ja pSFV4 plasmide. Mutatsioonide kirjeldused on esitatud tabelis 1.

Plasmiidide alusel saadud replikonide ja infektsiooniliste viiruste tähistused on samad, kuid ilma tähiseta „p” (plasmiid) konstrukti ees; näiteks: SFV4 tähistab viirust, pSFV4 tähistab plasmidi.

### **2.2.3. *In vitro* transkriptsioon**

Plasmiidide lineariseerimiseks kasutati ensüümi *BcuI* (DNA kogus 2,5 µg reaktsiooni kohta; ensüüm firma „Fermentas” poolt). Lineariseeritud DNA puhastati „JetQuick PCR Purification Spin Kit”-ga („Genomed GmbH”) ja elueeriti 30 µl dietüülpürokarbonaadiga (DEPC) töödeldud vees. Külmas segati kokku *in vitro* transkriptsioonisegu: 1,5 µg

lineariseeritud ja puhastatud DNA, rNTP segu (1 mM ATP, CTP, UTP ning 0,5 mM GTP; „Promega”), 5 mM ditiotreitol (DTT), 1 mM *Ribo m<sup>7G</sup> Cap Analog* („Promega”), 1 x SP6 puhver (80 mM Hepes-KOH, pH 7,4; 12 mM MgOAc; 4 mM spermiidiin-HCl) ning 0,1 % DEPC-ga töödeldud veega viidi ruumala 50 µl-ni. Seejärel lisati 50 ühikut rekombinantset ribonukleaasi inhibiitorit (RNasin<sup>R</sup> „Promega”) ja 30 ühikut SP6 RNA polümeraasi („Promega”). Süntees viidi läbi 37 °C juures 90 minuti jooksul. Saadud RNA saagist ja kvaliteeti hinnati agarosgeel-elektroforeesil.

**Tabel 1. Töös kasutatud plasmiidides esinevad mutatsioonid.** Mutatsioonide asukoht nsP2 valgus on toodud pSFV1-MCS1, pSFV1-MCS1-luc, pSFV1-MCS1-enh-luc, pSFV1-MCS1-pac, pSFV1-d1EGFP ja pSFV4 nukleotiidse järjestuse suhtes ning on tähistatud rasvase kirjaga.

<b>Mutatsiooni nimi</b>	<b>Mutatsiooni nukleotiidne positsioon</b>	<b>Muutus koodonis</b>	<b>Aminohappeline muutus</b>
RRD	3638-3646	CGA CGC AGG → CGA CGC <b>GAC</b>	RRR → <b>RRD</b>
RDR	3638-3646	CGA CGC AGG → CGA <b>GAC</b> AGG	RRR → <b>RDR</b>
DDR	3638-3646	CGA CGC AGG → <b>GAT GAT</b> AGG	RRR → <b>DDR</b>
ΔRR	3638-3643	CGA CGC AGG → CGC AGG	RRR → <b>ΔRR</b>
ΔΔR	3638-3640	CGA CGC AGG → AGG	RRR → <b>ΔΔR</b>
RDD	3638-3646	CGA CGC AGG → CGA <b>GAT GAT</b>	RRR → <b>RDD</b>
PG	3848-3850	CCC → <b>GGA</b>	P → <b>G</b>
DDD	3638-3646	CGA CGC AGG → <b>GAT GAT GAT</b>	RRR → <b>DDD</b>

#### 2.2.4. Transfektsioon

RNA (*in vitro* transkriptsiooni produkt, ligikaudu 50 µg) transfekteriti BHK-21 rakkudesse elektroporatsiooni meetodil. Rakkudelt aspireeriti sööde, neid pesti steriilse fosfaatpuhvriga soolalahusega (PBS), trüpsiniseeriti, suspendeeriti ning koguti 15 milliliitrisesse koekultuurituubi, kuhu oli eelnevalt lisatud 4 ml GMEM söödet. Rakud sadestati tsentrifuugimisel (5 minutit, 200 g, „Eppendorf Centrifuge 5810R”). Rakusademelt aspireeriti supernatant ja rakud resuspendeeriti vajalikus koguses PBS-is. Rakususpensioon (800 µl) segati nõutava koguse RNA-ga. Elektroporatsiooniks kasutati 0,4 cm küvetti („BioRad”) ja tehti kaks pulssi 850 V (25 µF) juures („BioRad” Gene Pulser II). Küvetist kanti elektroporeeritud rakud üle GMEM söötmega tassidele.

### **2.2.5. VLP-de ja viirus-stokkide kogumine**

VLP-de tootmiseks kotransfekteeriti pSFV1-d1EGFP replikonplasmiididelt ning pHelper1 plasmiidilt sünteesitud RNA-dega BHK-21 rakke. Viirus-stokkide tootmiseks transfekteeriti BHK-21 rakke viiruste infektsioonilist cDNA sisaldavatelt plasmiididelt sünteesitud RNA-dega. Ühe transfektsiooni jaoks kasutati ligikaudu  $5 \times 10^6$  rakku (umbes 80 % konfluentne tass läbimõõduga 100 mm). Transfekteeritud rakke inkubeeriti järgnevalt 28 °C juures 5 % CO<sub>2</sub> tingimustes. 72 tunni möödudes koguti rakkudelt sööde, mida tsentrifugeeriti 2 milliliitristes tuubides 5 minutit 4000 g (Biofuge, „Heraeus instruments”), et eemalda söötmes olevad rakud. Saadud supernatant külmutati -70 °C juures.

### **2.2.6. Rakkude nakatamine d1EGFP kodeerivaid replikone sisaldavate VLP-dega ja VLP-de tiitri määramine**

VLP-de titreerimise jaoks eemaldati 24-kannulisel plaadil kasvavatelt BHK-21 rakkudelt sööde ja pesti rakke PBS-ga. Rakke nakatati 400 µl seerumvabas söötmes erinevate VLP kogustega tund aega 28 °C ja 5 % CO<sub>2</sub> juures tassi vahepeal liigutades. Seejärel lisati rakkudele GMEM söödett ning inkubeeriti rakke 48 h. Tiitri määramiseks loendati tassil olevaid helendavaid rakke, kasutades kanne, millel loendati 5-100 d1EGFP positiivset rakku.

### **2.2.7. Viirusega nakatamine ja lüüsilaikeudega titreerimine**

100 % konfluentseid 6 cm diameetriga tassidel olevaid BHK-21 rakke inkubeeriti erinevate viirus-stoki lahjendustega seerumvabas söötmes 1 h 28 °C juures, iga 15 minuti tagant tassi loksutades. Peale inkubatsiooni eemaldati sööde ja kaeti tassid eelnevalt soojendatud karboksümetüülselluloosi (CMC) ning söötme seguga (GMEM). CMC-söötme segu sisaldas 2 osa 2 % CMC lahust ja 3 osa GMEM-i, milles oli 2 % FCS. Nakatatud BHK-21 rakke inkubeeriti CMC-söötme seguga 5 ööpäeva 28 °C juures 5 % CO<sub>2</sub> tingimustel. Peale inkubatsiooni eemaldati sööde ning rakud värviti kristallviolett-fikseerimislahusega (0,25 % kristallviolett (“Merck”); 1,85 % formaldehüüd; 10 % etanool; 35 mM trishüdroksümetüülaminmetaan (Tris); 0,5 % CaCl<sub>2</sub>) 15-30 minutit. Peale värvimist pesti tasse jooksva sooja veega ja kuivatati õhu käes. Tasse, mis sisaldasid 5-100 lüüsilaiku, kasutati viiruse tiitri arvutamiseks.

### 2.2.8. Lutsiferaasi ekspressiooni kvantifitseerimine

BHK-21 rakke elektroporeeriti SFV1-MCS1-luc, SFV1-MCS1-enh-luc, SFV1-MCS1 koos H-SG-luc või SFV1-MCS1 koos H-SG-enh-luc RNA-dega eelpool kirjeldatud meetodil. Igaks elektroporatsiooniks kasutati  $2 \times 10^5$  rakku, 2 µg replikoni RNA-d ja vastavalt vajadusele ka 2 µg H-SG-luc või H-SG-enh-luc RNA-d. Elektroporatsioonisegu jagati kahesse 24-auguse koekultuuritassi auku ja inkubeeriti 24 h 28 °C ja 5 % CO<sub>2</sub> tingimustes. Lutsiferaasi analüüsiks lüüsi rakud passiivse lüüsi puhvriga (PLB) ja määrati lüsaatides sisalduva lutsiferaasi aktiivsus kasutades firma „Promega” toote „Luciferase assay system” komponente ja juhiseid ning „Turner Designes” luminomeetrit.

### 2.2.9. Valkude ekspressiooni määramine *Western blot* meetodil

Valkude detekteerimiseks transfekteeritud BHK-21 rakkudes lüüsi rakud lisades neile 50 µl 1 x Laemmli puhvrit (50 mM TrisHCl, 100 mM DTT, 2 % naatriumdodetsüülsulfaat (SDS), 0,1 % broomfenoolsinine, 10 % glütserooli) ning koguti kogu viskoosne materjal 1,5 ml tuubi. Rakulüsaati kuumutati 100 °C 10 minutit. Supernatandis olevad valgud lahutati geelelektroforeesil 12 % SDS-poliakrüülamiidgeelis. Valgud kanti üle firma “Amersham” nitrotselluloosfiltrile (Hybond<sup>TM</sup>-ECL<sup>TM</sup>) kasutades poolkuiva ülekandemeetodit ja “Bio-Rad Instruments” aparati. Ülekanne toimus 30 minutit ülekandepuhvris (48 mM Tris; 39 mM glütsiin; 0,037 % SDS; 20 % etanool) voolutugevusega 0,55 mA/cm<sup>2</sup>. Filter blokeeriti ühe tunni jooksul toatemperatuuril 5 % lõssipulbri lahuses (5 % lõssipulber; 1 x PBS; 0,1 % Tween20). Järgnevalt inkubeeriti filtrit huvipakkuva valgu vastase antikehaga üks tund 2 % lõssipulbri lahuses (2 % lõssipulber; 1 x PBS; 0,1 % Tween20) ja seejärel pesti 3 x 10 minutit pesulahuses (50 mM TrisHCl; 0,1 % Tween20). Sekundaarse antikehaga, mis oli konjugeeritud peroksüdaasiga, toimiti analoogiliselt. Signaal detekteeriti, kasutades ECL<sup>TM</sup> Kit'i (“Amersham Pharmacia Biotech”). Töödeldud filter eksponeeriti röntgenfilmile.

### 2.2.10. Metaboolne märgistamine

Metaboolseks märgistamiseks kasutati BHK-21 rakke, mida kas kotransfekteeriti eelpool kirjeldatud meetodil SFV1-d1EGFP ning HelperC RNA-dega, transfekteeriti

infektsioonilise RNA-ga või nakatati viirusega infektsiooni kordsuses (MOI) 1 tingimustes. Ühe transfektsiooni jaoks kasutati ligikaudu  $5 \times 10^6$  rakku (umbes 80 % konfluentne tass läbimõõduga 100 mm). Elektroporatsioonisegu jagati kuuele (replikonide korral) või neljale (infektsioonilise RNA korral) 3,5 cm diameetriga tassile. Nakatamine toimus ühe tunni jooksul seerumvabas söötmes 28 °C ja 5 % CO<sub>2</sub> tingimustel ja selleks kasutati  $2 \times 10^5$  rakku ühe metaboolse määrgistamise ajapunkti kohta. Peale nakatamist ja elektroporatsiooni inkubeeriti rakke 28 °C ja 5 % CO<sub>2</sub> juures tavalises GMEM söötmes. SFV1-d1EGFP ja HelperC RNA-de koelektroporatsiooni efektiivsust kontrolliti visuaalselt markergeeni ekspressiooni järgi. Katsespetsiifilistel ajapunktidel pesti rakke PBS-ga ning lisati rakkudele 0,5 ml metioniini ja tsüsteiini vaba MEM (*Modified Eagle's Medium*) söödett ("Sigma") ning jätkati inkubeerimist tunni aja jooksul. Selle järel lisati rakkudele 15 µCi <sup>35</sup>S-metioniini ja <sup>35</sup>S-tsüsteiini segu ("Amersham", Redivue<sup>TM</sup> PRO-MIX). Tunni aja pärast eemaldati rakkudelt määrgisega sööde ja lüüsi rakud 50 µl-s 1 x Laemmleri puhvris. Saadud viskoosne materjal koguti 1,5 ml tuubi ja kuumutati 10 minutit 100 °C juures. Supernatandis olevad valgud lahutati geelelektroforeesil 12 % SDS-poliakrüülamiidgeelis. Signaali võimendati leotades geeli 30 minutit 1 M naatriumsaltsülaadi lahuses ning seejärel geel kuivatati ja eksponeeriti röntgenfilmile.

### **2.2.11. UV-kiiritatud viiruse tootmine ja UV-kiiritatud viirusega nakatatud rakkude valgusünteesi uurimine**

BHK-21 rakkudes toodeti SFV4 viirus eelpool kirjeldatud meetodil. Viirusega sööde pipeteeriti koekultuuri tassile, kindlustades, et sööde katab tassi põhja õhukese kihina. UV-inaktiveerimist sooritati firma „Stratagene” masinas „Stratalinker 1800” kolme minuti jooksul 700 µJ/cm<sup>2</sup> tingimustel.

Uurimaks UV-kiiritatud viiruse mõju BHK-21 rakkude translatsioonile, elektroporeeriti SFV4-RDD RNA BHK-21 rakkudesse eelpool kirjeldatud meetodil. Üheks elektroporatsiooniks kasutati  $8 \times 10^5$  rakku ja 25 µg RNA-d. Elektroporatsioonisegu jagati neljale 3,5 cm diameetriga tassile. Rakke inkubeeriti 37 °C ja 5 % CO<sub>2</sub> tingimustes rakkude kinnitumiseni koekultuuri tassi põhjale. 3 h peale transfektsiooni nakatati rakke UV-kiiritatud viirusega eelpool kirjeldatud meetodil. 5 h peale transfektsiooni langetati rakkude inkubeerimise temperatuur 28 °C-ni. Huvipakkuvatel ajapunktidel sooritati rakkudele metaboolne määrgistamine eelpool kirjeldatud meetodil.

### **2.2.12. Replikonide tsütotoksilisuse määramine**

Rakkude elulemuse katse sooritati vastavalt kirjanduses avaldatud skeemile (Frolov *et al.*, 1999). BHK-21 rakke elektroporeeriti SFV1-MCS1-pur RNA-ga eelpool kirjeldatud meetodil. Üheks elektroporatsiooniks kasutati  $1 \times 10^6$  rakku ja 5 µg RNA-d. Iga elektroporatsioonisegu jagati kaheksasse 24-auguse koekultuuritassi auku. Rakke inkubeeriti 28 °C ja 5 % CO<sub>2</sub> juures. 16 h peale transfektsiooni lisati söötmesse puromütsiin lõppkontsentratsiooniga 10 µg/ml. Söödet vahetati iga kolme päeva tagant puromütsiini selektsiooni jätkamisega. Soovitud ajapunktidel värviti surnud rakud trüpaansinisega ja loendati elusate rakkude arv.

### **2.2.13. Rakkude rakutsükli uurimine läbivoolu tsütomeetrial**

Rakutsükli uurimiseks elektroporeeriti BHK-21 rakke SFV1-MCS1 replikonidega eelpool kirjeldatud meetodil. Üheks elektroporatsiooniks kasutati ligikaudu  $2,5 \times 10^6$  rakku ja 50 µg RNA-d. Rakke inkubeeriti seejärel 28 °C ja 5 % CO<sub>2</sub> tingimustel. 48 h peale transfektsiooni eemaldati rakkudel sööde, pesti rakke PBS-ga, trüpsiniseeriti ja tsentrifuugiti kogutud sööde ja rakud (5 minutit, 200 g, „Eppendorf Centrifuge 5810R”). Sadenenud rakud pesti PBS-ga ning korrati tsentrifugeerimist. Seejärel eemaldati supernatant ja rakud fikseeriti jääkülmas 70 %-lises etanoolilahuses üleöö. Järgneval päeval sadestati rakud tsentrifuugimisega (10 minutit, 800 g, „Eppendorf Centrifuge 5810R”) ja pesti sadenenud rakke PBS-ga ning korrati tsentrifuugimist. Rakkudes oleva RNA lagundamiseks töödeldi rakke PBS-i lahuses RNAasA-ga (30 µg/ml RNAas A, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) kaks tundi 37 °C juures. Rakutsükli määramiseks värviti rakkudes sisalduv DNA propiidiumjodiidiga (lõppkontsentratsioon 45 µg/ml) 15 minuti jooksul pimedas jää peal inkubeerimisega. Rakupopulatsiooni rakutsükli profiili analüüsimiseks kasutati läbivoolutsütomeetria meetodit (“Becton-Dickinson” FACSCalibur). Katses mõõdeti kolme parameetrit, millega sai kindlaks teha osakeste (rakkude) suurust, pinnastruktuuri ja oranži helendumist. Saadud andmeid analüüsiti programmiga „CellQuest”.

#### 2.2.14. Northern blot analüüs

BHK-21 rakke kotransfekteeriti eelpool kirjeldatud meetodil replikoni ja SG-enh-luc RNA-dega. Ühe transfektsiooni jaoks kasutati ligikaudu  $5 \times 10^6$  rakku (umbes 80 % konfluentne tass läbimõõduga 100 mm), 6 µg replikoni RNA-d ja 6 µg SG-enh-luc RNA-d. Rakud külvati kolmele koekultuuri tassile ja neid inkubeeriti 28 °C 5 % CO<sub>2</sub> tingimustel. Kindlatel ajapunktidel puhastati rakkudest totaalne RNA kasutades „Trizol” reagenti („Invitrogen”) tootja juhendi järgi. Võrdsed kogused totaalset RNA-d denatureeriti 1 x formamiid-formaldehüüdpuhveris (5 x puhver: 4 mM etüleendiamiintetraädikhape (EDTA) pH 8, 0,9 M formaldehüüd, 20 % glütserool, 31 % formamiid, 4 x 3-(N-morfoliino)propaansulfoonhape (MOPS) puhver; 10 x MOPS puhver: 0,2 M MOPS pH 7,0, 20 mM NaAc, 10 mM EDTA), kuhu oli lisatud etiidumbromiidi lõppkontsentratsioonini 13 µg/ml, 10 min 65 °C juures ja lahutati koheselt agarosgeel-elektroforeesil (0,2 M formaldehüüdi sisaldav 1,5 % agarosgeel). RNA kanti geelilt „Hybond-N+” filtrile („Amersham Biosciences”) ja fikseeriti UV-krosslinkimisega („Stratagene” UV Stratalinker 1800).

Radioaktiivsete proovidenä kasutati SFV1-MCS1 positiivse polaarsusega RNA ahela 3' mittetransleerivale osale ning lutsiferaasi geeni RNA-le komplementaarseid RNA proove, mis sünteesiti *in vitro* transkriptsiooni käigus, kasutades matriitsina T7 promoteri alla kloneeritud fragmenti pHelper1-st või lutsiferaasi geenist. Märkisenä kasutati 50 µCi [ $\alpha^{32}$  P] rUTP („Amersham Biosciences”). Filtreid prehübridiseeriti 1,5 h 65 °C juures järgmises lahuses: 6 x naatriumkloriidi ja naatriumtsitraadi lahus (SSC) (1 x SSC: 0,15 M NaCl; 0,015 M naatriumtsitraat), 5 x Denhardti lahus („Sigma”), 0,5 % SDS, 50 % formamiid, 10 % dekstraan ja 100 µg/ml kandja-DNA (*carrier* DNA). Radioaktiivne proov lisati prehübridisatsiooni segule ja lasti hübridiseeruda filtrile 12 h 65 °C juures. Seejärel pesti filtrit 65 °C juures kaks korda 30 minutit 0,1 % SDS sisaldavas 2 x SSC-s ning kaks korda 30 min 0,1 % SDS sisaldavas 1 x SSC-s. Seejärel filter kuivatati õhu käes ja eksponeeriti röntgenfilmile.

#### 2.2.15. Pöördranskriptsioon, PCR ja sekveneerimine

Sisseviidud mutatsioonide kontrollimiseks sooritati pöördranskriptsioon-polümeraas-ahelreaktsioon (RT-PCR) uuritavatele RNA-dele. Selleks eraldati kogutud viirusstokkidest totaalne RNA firma “Macherey-Nagel” *Nucleospin*<sup>®</sup> *RNA II Kit*-ga vastavalt tootja

protokollile. Pöördtranskriptsiooniks võeti 5 µl puhastatud RNA-d (umbes 50 ng), lisati järjestus-spetsiifilist *antisense* praimerit 15-20 pmol ning DEPC-ga töödeldud vett 11 µl-ni. Segu inkubeeriti 70 °C juures 5 minutit ning jahutati jääl. Seejärel lisati segusse veel 1 x transkriptsioonipuhvrit (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT), dNTP-d 1 mM lõppkontsentratsiooniga, 20 ühikut rekombinantset ribonukleaasi inhibiitorit (*RNasin*<sup>®</sup>, “Promega”) ning DEPC vett 19 µl-ni. Segu inkubeeriti 37 °C juures 5 minutit ning viimasena lisati 40 ühikut pöördtranskriptaasi (*M-MuLV Reverse Transcriptase*; “Fermentas”). Reaktsioon toimus 37 °C juures 60 minutit ning see peatati, kuumutades 70 °C juures 10 minutit.

Saadud cDNA-lt tehti polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) SFV mittestruktuurse ala spetsiifiliste praimeritega. PCR viidi läbi 20 µl-s ja sisaldas 5 µl pöördtranskriptsiooniga saadud cDNA, 0,2 mM dNTP segu, 0,4 µM primereid, 1 x reaktsioonipuhvrit (10 mM Tris-HCl; pH 8,8; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM KCl; 0,1 % Triton<sup>®</sup> X-100) ja ühte ühikut polümeraasi (“Finnzymes” Dynazyme Pol II). Peale esialgset denaturatsiooni 95 °C 4 minutit toimus amplifikatsioon tingimustel: denaturatsioon 95 °C 30 sekundit, praimerite seondumine 30 sekundit (temperatuur sõltus erinevate praimerite seondumistemperatuurist ja oli vahemikus 50-60 °C), ekstensioon 72 °C (võttes arvesse, et polümeraasi sünteesikiirus on 1000 nt/minut), korrates sama tsüklit 33 korda. Amplifikatsioonile järgnes lõppekstensioon 72 °C juures 10 minutit. PCR-i reaktsioonisegu puhastamiseks kasutati *JetQuick PCR Purification Spin Kit* (“Genomed GmbH”) vastavalt tootja protokollile. Saadud produktid sekveneeriti kasutades kommertsiaalset sekveneerimisteenust ja saadud sekveneerimisjärjestuste analüüsimiseks kasutati programmi „BioEdit“.

SFV1-PG-MCS1 replikonis tekkinud deletsioonide leidmiseks viidi läbi eelpool kirjeldatud meetodil rakkudest eraldatud totaalse RNA pöördtranskriptsioon, kasutades oligo(dT)18 praimerit (koosneb vaid dT jääkidest ja seondub mRNA 3' polü-A sabaga). Saadud cDNA-lt tehti PCR kasutades SFV spetsiifilisi primereid. Kuna see PCR reaktsioon andis saaduseks palju erineva pikkusega DNA fragmente, siis kloneeriti PCR produktid esmalt pJET1/blunt vektorisse („Fermentas”) vastavalt tootja protokollile. Plasmiidiga transformeeriti *Escherichia coli* tüve DH5α kuumašoki meetodil. Bakterid külvati agariga Luria-Bertani (LB) söötmele („Difco”). Erinevatest bakterikloonidest eraldati plasmiid minipreparatsiooniga ja sekveneeriti saadud produkti huvipakkuv ala pJET1/blunt vektori spetsiifiliste praimeritega („Fermentas”).

### **2.2.16. Statistiline analüüs**

Statistiliseks analüüsiks kasutati <http://graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm> aadressil asuvat paardumata t-testi („unpaired t-test”). Kahe valimi vaheline erinevus loeti tõestatuks, kui vastav tõenäosus (p-väärtus) oli alla 0,05.

## **2.3. Tulemused**

### **2.3.1. SFV replikonis sisalduvate mutatsioonide mõju VLP-tootlikkusele**

Eelkatsed SFV1-RDD-d1EGFP replikoniga näitasid, et vastava *in vitro* sünteesitud RNA rakkudesse elektroporeerimise tagajärjel toodetakse märkimisväärselt vähem VLP-sid kui wt SFV1-d1EGFP replikoniga transfekteeritud rakkudes. Seetõttu oli oluline uurida, kas need tulemused on korratavad ja kuidas käituvad samades tingimustes SFV1-RRD-d1EGFP, SFV1-RDR-d1EGFP, SFV1-DDR-d1EGFP, SFV1- $\Delta$ RR-d1EGFP, SFV1- $\Delta\Delta$ R-d1EGFP, pSFV1-PG-d1EGFP ja pSFV1-DDD-d1EGFP replikonid. Selleks toodeti kõikidele nendele replikonidele uued VLP-de stokid identseid tingimusi kasutades.

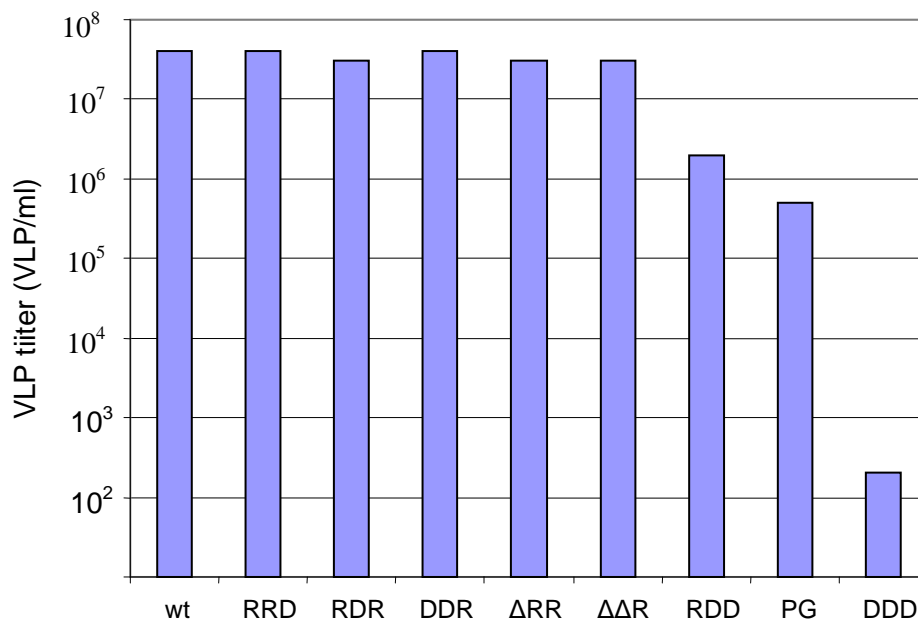
VLP-d titreeriti nakatades BHK-21 rakke erinevate VLP-sid sisaldavate söötmekogustega. Kuna kõigil replikonidel oli subgenoomse promooteri alla paigutatud d1EGFP, oli võimalik eristada nakatunud rakke roheline fluorestsentsi järgi. 48 tunni möödudes loendati helenduvate rakkude arv. Määratud VLP tiitrid on koondatud joonisele 6, millelt võib näha, et SFV1-RRD-d1EGFP, SFV1-RDR-d1EGFP, SFV1-DDR-d1EGFP, SFV1- $\Delta$ RR-d1EGFP, SFV1- $\Delta\Delta$ R-d1EGFP VLP tiitrid kühündivad wt SFV1-d1EGFP tasemeni. SFV1-DDD-d1EGFP puhul võib täheldada praktiliselt olematut VLP produktsiooni, kuid tuleb märkida, et antud konstrukti korral märgati juba peale esialgset elektroporatsiooni, et vaid väga üksikud rakud ekspresseerivad markergeeni. Samal ajal ekspresseerisid kõigi ülejäänud replikonidega elektroporeeritud rakkudest vähemalt 90 % d1EGFP markergeeni. Järelikult muudab DDD mutatsioon replikoni peaaegu võimetuks replitseeruma ja ilmselt vaid üksikud reversioone või kompensatoorseid mutatsioone sisaldavad replikonid suudavad paljuneda. Sellist fenomeni on kirjeldatud mitmete SFV mutantide puhul (Žusinaite *et al.*, 2007), kuid arvestades selle nähtuse uurimise komplitseeritust ei seatud eesmärgiks vastavate mutatsioonide identifitseerimist ja analüüsi.

SFV1-RDD-d1EGFP ja SFV1-PG-d1EGFP replikonide kasutamise korral täheldati peale esmast elektroporatsiooni wt replikoniga võrdsel tasemel markergeeni d1EGFP ekspressiooni. Sellegipoolest osutus VLP produktsioon üks kuni kaks suurusjärku madalamaks SFV1-d1EGFP omast, mis on heas kooskõlas eelkatsete andmetega. Seega,

erinevalt DDD mutatsiooni kandvast replikonist ei ole need replikonid defektsed infektsioonilisuse poolest vaid spetsiifiliselt VLP-de moodustamise poolest.

VLP-de moodustumine on kompleksne protsess ja defekt nende formeerumises võib olla põhjustatud mitmetest faktoritest:

- 1) defekt genoomse (replikoni) paljunemises, mistõttu on vähe genome, mida saab VLP-desse pakkida,
- 2) defekt helper-RNA paljundamises ja vastava subgenoomse RNA sünteesis, mistõttu on puudus struktuursetele valkudele vastavast mRNA-st ja/või
- 3) defekt struktuursete valkude sünteesil, mistõttu pole struktureid valke VLP-de moodustumiseks.



**Joonis 6. VLP-de tiitrid.** BHK-21 rakke transfekteriti pSFV1-d1EGFP („wt“), pSFV1-RRD-d1EGFP („RRD“), pSFV1-RDR-d1EGFP („RDR“), pSFV1-DDR-d1EGFP („DDR“), pSFV1-ΔRR-d1EGFP („ΔRR“), pSFV1-ΔΔR-d1EGFP („ΔΔR“), pSFV1-RDD-d1EGFP („RDD“), pSFV1-PG-d1EGFP („PG“) ja pSFV1-DDD-d1EGFP („DDD“) plasmiididelt toodetud RNA-ga. Iga replikoni RNA kotransfekteriti rakkudesse Helper1 RNA-ga. Rakke kasvatati 28 °C juures 72 h, sööde koguti ning VLP-d titreeriti BHK-21 rakke erinevate VLP-de lahjendustega nakatades ja 48 h möödudes helenduvaid rakke loendades.

### 2.3.2. Transgeeni ekspressioon replikonidega transfekteritud rakkudes

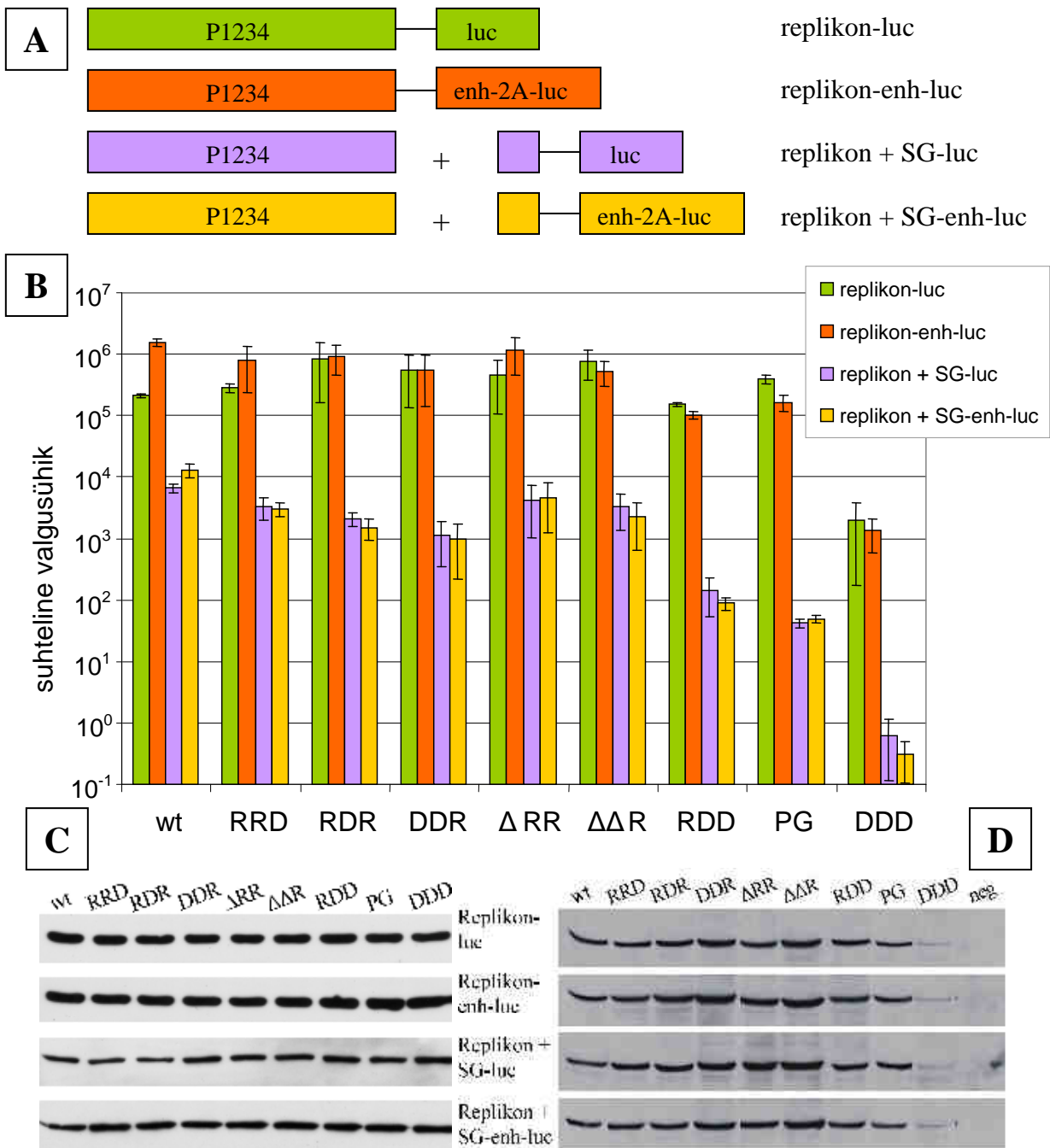
Lähtudes ülal loetletust oli antud töö järgneva eesmärgiks välja selgitada, kas RDD ja PG mutantide võimetust toota suurtes kogustes VLP-sid oli põhjustatud madalatasemelisest struktuursete valkude tootmisest.

Nagu ülal märgitud, ei täheldatud RDD ja PG vektoritega transfekteeritud rakkudes defekte d1EGFP tootmises (pigem oli see aktiveeritud). Samas on oluline märkida, et selles katses erines d1EGFP ekspresseerimine viiruse struktuursete valkude ekspresseerimisest kahe olulise tunnuse poolest. Esiteks, d1EGFP kodeeriv geen viidi raku samal RNA molekulil kui viiruse replikaasi valke kodeeriv järjestus (replikaasi geeni suhtes *in cis*), samas kui struktuurset valke kodeeriv järjestus oli eraldi RNA molekulil (replikaasi geeni suhtes *in trans*). Teiseks, kapsiidivalgu kodeeriva ala alguses asub SFV translatsiooniline enhaanser, d1EGFP kodeeriva ala alguses see puudub. Seega on võimalik, et mutantsed replikaasid ei ole suutelised paljundama RNA-d *in trans* (ja/või vastavat subgenoomset RNA-d sünteesima) või et mingil põhjusel ei avalda SFV translatsiooniline enhaanser antud mutantide puhul positiivset mõju. Seetõttu oli järgneva katse eesmärgiks välja selgitada, millist mõju avaldab subgenoomse promoteri abil ekspresseeritava markervalgu tootmisele translatsiooniline enhaanser ning markergeeni asumine replikonist erineval RNA molekulil. Uurimisse kaasati peale RDD ja PG mutatsioone sisaldavate replikonide ka teised mutandid, et teha kindlaks, kuidas on ülal nimetatud funktsioonid mõjutatud nende mutatsioonide poolt. Markervalguks valiti jaanimardika lutsiferaas, sest, erinevalt d1EGFP-st, on seda võimalik lihtsalt ja täpselt kvantifitseerida.

Markergeeni ekspressiooni kvantifitseerimine sooritati erinevate mutatsioonide kontekstis kasutades järgnevaid katseskeeme:

- 1) markergeen on kodeeritud replikoni RNA-s (*in cis* paiknemine; SFV1-MCS1-luc) ilma SFV translatsioonilise enhaanserita,
- 2) markergeen on kodeeritud replikoni RNA-s, kuid markergeenile eelneb SFV kapsiidivalgu kodeeriva järjestuse algus ehk translatsiooniline enhaanser (SFV1-MCS1-enh-luc),
- 3) markergeen on kodeeritud *in trans* eraldi RNA molekulilt (SFV1-MCS1 koelektroporatsioon H-SG-luc RNA-ga) ja
- 4) markergeen on kodeeritud *in trans* eraldi RNA molekulilt koos SFV translatsioonilise enhaanseriga (SFV1-MCS1 koelektroporatsioon H-SG-enh-luc RNA-ga).

Nendel konstruktidel, mis sisaldasid SFV translatsioonilist enhaanserit, asus translatsioonilise enhaanseri ja markergeeni vahel suu- ja sõrataudiviiruse 2A autoproteaasi kodeeriv järjestus, selleks et eraldada markervalgu kapsiidivalgu algusjärjestusest. Katses kasutatud konstruktide skeemid on toodud joonisel 7A.



**Joonis 7. Lutsiferaasi ekspressiooni kvantifitseerimine.** BHK-21 rakke elektroporeeriti metsik-tüüpi („wt“) ning mutantsete SFV1-MCS1 (replikon), SFV1-MCS1-luc (replikon-luc), SFV1-MCS1-enh-luc (replikon-enh-luc), H-SG-luc (SG-luc) ja H-SG-enh-luc (SG-enh-luc) RNA-dega joonise **A**) osas kujutatud kombinatsioonides. Rakkudega elektroporatsioonisegu külvati kahte 24-auguse tassi auku ja inkubeeriti 28 °C juures 24 h. **B**) Rakud lüüsi PLB-ga. 10 % lüsaadist kasutati lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks luminomeetrial. Graafikul on kujutatud kolme sõltumatu katseseeria aritmeetiline keskmine koos standardhälvetega. **C**) ja **D**) Rakke lüüsi ühekordses Laemmli puhvris. Valgud lahutati 12 %-lises SDS-poliakrüülamiidgeelis ja detekteeriti *Western blot* analüüsiga: **C**) hiire  $\beta$ -aktiini vastase antikehaga (firmalt „Abcam“; sekundaarne antikeha: küüliku hiire IgG-vastane peroksüdaasiga konjugeeritud antikeha, firmalt „Lab As“) ning **D**) küülikus toodetud nsP1 vastase antikehaga (sekundaarne antikeha: kitses toodetud küüliku IgG-vastane peroksüdaasiga konjugeeritud antikeha, firmalt „Lab As“). Negatiivse kontrollina (joonisel „neg“) kasutati tühi-elektroporeeritud rakke.

Kõikides katsetes elektroporeeriti BHK-21 rakke võrdse koguse mutantide ja kontrollkonstruktide RNA-ga. Elektroporatsioonisegu külvati võrdselt kahele tassile. Rakke kasvatati 24 h, millele järgnevalt rakud lüüsi. Ühe elektroporatsiooni kahte paralleeli lüüsi erinevalt – ühte kasutati lutsiferaasi kvantifitseerimiseks, teist aga valkude analüüsimiseks *Western blot* meetodil.

Lutsiferaasi kvantifitseerimise tulemused on esitatud joonisel 7B. Jooniselt on näha, et DDD mutatsiooniga konstruktide korral ekspresseeritakse rakkudes tuhat või enam korda vähem lutsiferaasi kui teiste konstruktide puhul. Seega kinnitavad need andmed DDD mutandi elujõetust ja seetõttu jäeti ta järgnevatest katsetest välja. Võrreldes joonisel 7B SFV1-MCS1-luc ja SFV1-MCS1-enh-luc tüüpi RNA-delt toodetud lutsiferaasi hulka (joonisel: „replikon-luc” ning „replikon-enh-luc” andmeseeriad), võib märgata, et ülejäänud mutandid erinevad üksteisest. Wt replikoni korral avaldab translatsiooniline enhaanser valgu ekspresseerimisele positiivset mõju (ligikaudu kümnekordne aktivatsioon; t-test:  $p=0,0003$ ). RRD, RDR, DDR,  $\Delta$ RR ja  $\Delta\Delta$ R mutatsioonidega konstruktide korral ei ole saadud andmete põhjal võimalik translatsioonilise enhaanseri mõju statistiliselt usaldusväärselt detekteerida. Seetõttu võib oletada, et nende mutantide puhul puudub translatsioonilisel enhaanseril efekt temale järgneva valgu ekspresseerimise tasemele. RDD ja PG konstruktide korral võib aga märgata translatsioonilise enhaanseri negatiivset mõju (t-testi p-väärtused on vastavalt 0,0098 ja 0,0068). Seega jagunevad replikonid *in cis* paikneva markergeeni ekspressiooni alusel kolme gruppi: translatsioonilise enhaanseri poolt aktiveeritava, represseritava või translatsioonilisele enhaanserile neutraalne markergeeni ekspressioon. Huvitav on märkida, et SFV1-MCS1 ja H-SG-luc või H-SG-enh-luc koelektroporeeritud rakkude lüüsiandmetest analüüsitud lutsiferaasi aktiivsuste vahel (vastavalt „replikon + SG-luc” ja „replikon + SG-enh-luc” andmeseeriad joonisel 7B) on erinevused, mis tulenevad translatsioonilise enhaanseri olemasolust või puudumisest, oluliselt väiksemad. Samas on ka sellel juhul wt konstruktid ainsad, mille puhul võib märgata translatsioonilise enhaanseri aktiveerivat efekti (t-test:  $p=0,0338$ ).

Samal ajal võib märgata teistsuguseid erinevusi kontrollide ja erinevate mutantide vahel võrreldes omavahel „replikon-luc” ja „replikon + SG-luc” või „replikon-enh-luc” ja „replikon + SG-enh-luc” andmeseeriad joonisel 7B (markergeeni paigutus *in cis versus in trans*). Wt konstruktide puhul on markergeeni *in trans* paigutuse tagajärjel markervalgu tase ligikaudu 70 korda madalam kui *in cis* paigutuse korral. RRD, RDR, DDR,  $\Delta$ RR ja  $\Delta\Delta$ R mutatsioonidega konstruktide puhul on sama vahe ligikaudu 300-kordne. RDD ja PG

konstruktiide korral võib aga märgata ligikaudu 3000-kordset lutsiferaasi ekspressiooni tasemete erinevust.

Võttes arvesse VLP-tootlikkust ja translatsioonilise enhaanseri ning markergeeni *in trans* paigutuse mõju markervalgu tootmise efektiivsusele, jagati antud töös kasutatud mutandid kahte gruppi:

- 1) „keskmise grupi” mutandid – RRD, RDR, DDR,  $\Delta$ RR ja  $\Delta$ AR mutatsioonidega konstruktiid, mis on oma omadustelt suhteliselt sarnased wt replikonile ja
- 2) RDD ning PG, mis eristuvad eelmistest selgelt.

Katse usaldusväärsuse kinnitamiseks sooritati *Western blot* analüüs kasutades  $\beta$ -aktiini vastaseid antikehi. Nagu jooniselt 7C näha, oli erinevate konstruktiide puhul lüüsimiseks võetud rakkude hulk võrdne. *Western blot* meetodiga analüüsiti ka mittestruktuurse valgu nsP1 olemasolu rakulüsaatides (joonis 7D). Nagu jooniselt näha, on nsP1 valgu tase erinevate konstruktiidega elektroporeeritud rakkudes sarnasel tasemel, välja arvatud DDD-mutatsiooni kandvate replikonidega elektroporeeritud rakkudes. See tulemus kinnitab DDD mutatsiooni pärssivat mõju SFV replikoni paljunemisele.

Kokkuvõtvalt näitavad lutsiferaasi markergeeni kasutamise teatud katsete tulemused kahe erineva efekti olemasolu:

- 1) translatsioonilise enhaanseri efekt temale järgneva geeni transleerimisele on positiivne wt, negatiivne RDD ja PG mutatsiooniga replikonide ning neutraalne ülejäänud mutantide puhul,

- 2) PG ja RDD mutatsioonidega replikonide võime ekspresseerida valke *in trans* paiknevalt RNA-lt on ligikaudu 50 korda madalam kui wt replikoni puhul.

Need tulemused ei võimalda siiski üheselt kindlaks teha, kumb nendest efektidest on vastutav PG ja RDD replikonidele omase madala VLP-tootlikkuse eest. Samuti on võimalik, et rakkudes on väga madalal tasemel replikoni RNA-d, mis raskendaks VLP-de moodustumist veelgi.

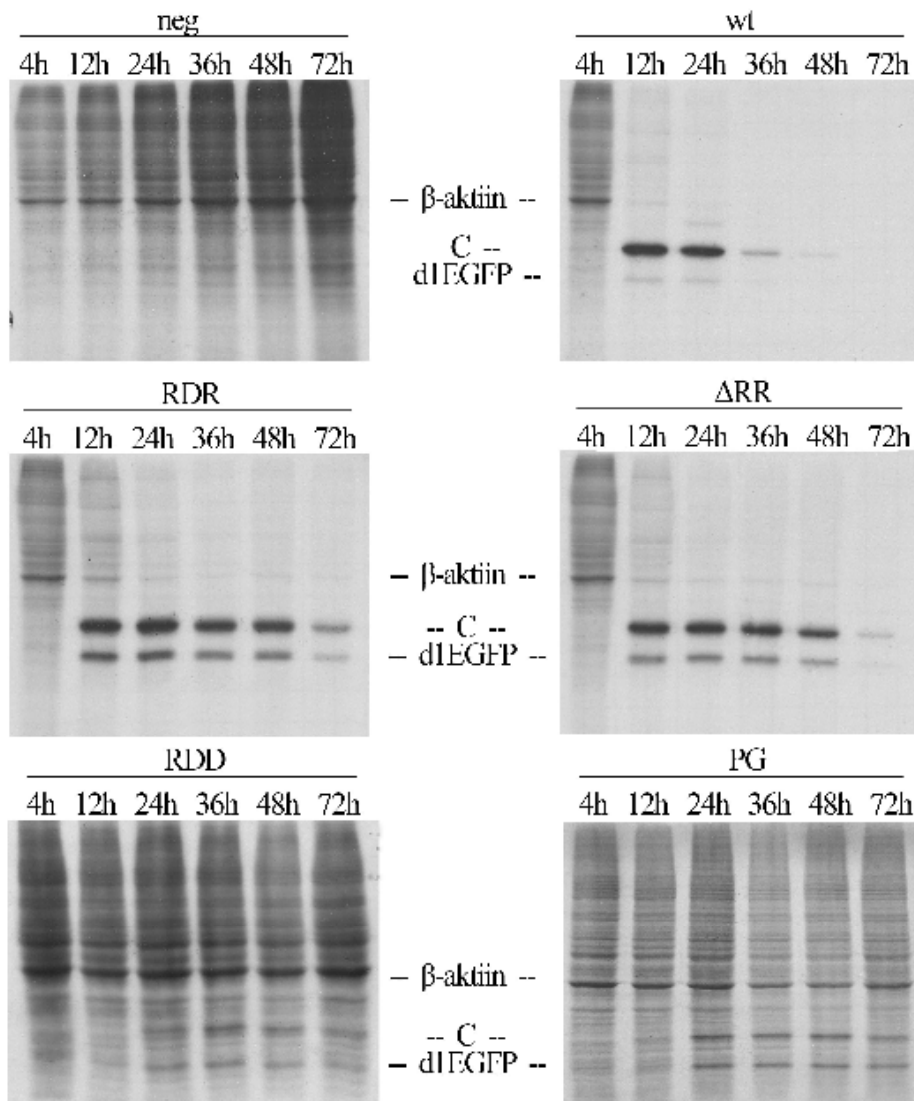
### **2.3.3. Mutantsete replikonide mõju peremeesraku valgusünteesile**

VLP-de titreerimise ning transgeeni ekspressiooni kvantifitseerimise katsete tulemustest oli näha, et uuritavad mutandid toodavad väga erineval hulgal viiruse struktuurseid valke ning markervalgu (joonised 6 ja 7B), samas kui erinevused mittestruktuursete valkude tootmises on oluliselt väiksemad (joonis 7D). Seetõttu oli käesoleva töö järgmiseks eesmärgiks viiruse ja rakuspetsiifiliste valkude ekspressiooni

dünaamika kirjeldamine SFV replikone sisaldavates rakkudes. Kirjanduses on näidatud, et mitmed erinevad SFV mutandid, mis sisaldavad mutatsioone nsP2 valku kodeerivas alas, on defektsed raku metabolismi mahasurumisel (Perri *et al.*, 2000; Lundström *et al.*, 2001 (A), ning viited selles; Lundström *et al.*, 2001 (B); Lundström *et al.*, 2003). Omandamaks antud uurimuseks vajalikku translatsiooni mitteinhibeerivat kontroll-mutanti, oli konstrueeritud mutantne SFV1-PG-d1EGFP analoogiliselt Sindbise viiruse SIN/G mutandile, mis on kirjanduse põhjal võimetu translatsiooni inhibeerima (Gorchakov *et al.*, 2004). Katses jäeti kõrvale DDD mutant, kuna vastav mutatsioon muudab SFV replikoni võimetuks replitseeruma (vt alapeatükke 2.3.1. SFV replikonis sisalduvate mutatsioonide mõju VLP-tootlikkusele ja 2.3.2. Transgeeni ekspressioon replikonidega transfekteeritud rakkudes). Samuti ei analüüsitud kõiki „keskmise grupi” mutante, sest ülaltoodud tulemustest lähtuvalt eeldati, et need käituvad sarnaselt.

Kuna mitmeid analüüsitud mutante iseloomustab ebapiisav VLP-de tootmine, siis uuriti raku translatsiooni mõjutamist replikonide poolt replikon-RNA-ga elektroporeeritud rakkudes, mitte VLP-dega nakatatud rakkudes. Eeldades, et kotransfektsioonil helper-RNA-ga on võimalik detekteerida ka struktuurseid valke ja seega saada lisainformatsiooni subgenoomselt promooterilt toimuva ekspressiooni kohta (d1EGFP *in cis versus* kapsiidivalk *in trans*), kasutati antud katses lisaks replikon-RNA-le veel HelperC RNA-d, mis ekspresseerib subgenoomse promooteri kaudu vaid SFV kapsiidivalgu. HelperC valiti, kuna kõiki struktuurseid valke kodeeriva Helper1 kasutamine oleks muutnud tulemuste interpreteerimise ülemäära keeruliseks mitmete erinevate valkude produktsiooni ja sekundaarse infektsiooni võimaluse tõttu. Elektroporatsiooni efektiivsust hinnati visuaalselt markergeeni d1EGFP ekspressiooni järgi (iga konstrukti korral vähemalt 90 %).

SFV replikonide mõju raku translatsioonile uuriti metaboolset märgistamist kasutades. Selle katse tulemused on esitatud joonisel 8, millelt on näha, et SFV1-d1EGFP replikoni ja HelperC RNA-dega kotransfekteeritud rakkudes on peremehe valgusüntees suures osas blokeeritud juba 12 tundi peale transfektsiooni. Jooniselt 8 on võimalik detekteerida ka SFV kapsiidivalgu ja d1EGFP poolt tekitatud signaale. Võib märgata, et wt replikoni korral on kapsiidivalgu ekspressioon oluliselt efektiivsem d1EGFP omast – tõenäoliselt on see efekt seotud kapsiidivalgu kodeeriva järjestuse alguses asuva translatsioonilise enhaanseri aktiveeriva mõjuga kapsiidivalgu translatsioonile (d1EGFP geeni ees translatsioonilise enhaanseri järjestus puudub). Kapsiidivalgu ekspressioon jätkub kuni 48 tundi peale transfektsiooni ja lõpeb tõenäoliselt seoses peremeesraku surmaga.



**Joonis 8. Replikonidega elektroporeeritud rakkude metaboolne märgistamine.** SFV1-d1EGFP („wt“), SFV1-RDR-d1EGFP („RDR“), SFV1-ΔRR-d1EGFP („ΔRR“), SFV1-RDD-d1EGFP („RDD“) ja SFV1-PG-d1EGFP („PG“) ning HelperC RNA-ga kotransfekteeritud BHK-21 rakke inkubeeriti 28 °C juures ja märgistati <sup>35</sup>S-metioniini ja <sup>35</sup>S-tsüsteiiniga erinevatel ajapunktidel peale elektroporatsiooni. Märgistatud rakud lüüsi. Valgud lahutati SDS-poliakrüülamiidgeelis, mis kuivatati ja eksponeeriti röntgenfilmile. Näidatud on viiruse kapsiidivalgu (C), markergeeni d1EGFP ja β-aktiini eeldatavad asukohad. Negatiivse kontrollina (neg) on kasutatud BHK-21 rakke, mis olid transfekteeritud HelperC RNA-ga.

SFV1-RDR-d1EGFP ning SFV1-ΔRR-d1EGFP replikonide ja HelperC RNA-dega kotransfekteeritud rakkudes toimub peremehe valgusünteesi mahasurumine veidi aeglasemalt kui SFV1-d1EGFP puhul (joonis 8). Märgata võib, et viiruse kapsiidivalgu ning d1EGFP ekspresseeritakse pikemat aega kui SFV1-d1EGFP puhul. Samuti võib täheldada, et d1EGFP ekspressioon on antud mutantidel wt replikoniga võrreldes võimendatud. Tõenäoliselt

võimaldab peremeesrakkude valgusünteesi aeglasem blokeerimine pikemaajalist viiruse valkude sünteesi, kuna rakk püsib kauem elus, ning SFV translatsioonilist enhaanseri mitte sisaldavatel RNA-del asuvate geenide (d1EGFP) võimendatud ekspressiooni võrreldes wt replikoniga.

SFV1-RDD-d1EGFP ja SFV1-PG-d1EGFP puhul peremehe translatsiooni mahasurumist ei toimu. Vastavad autoradiogrammid on väga sarnased negatiivse kontrolli omale, välja arvatud asjaolu, et SFV1-RDD-d1EGFP ja SFV1-PG-d1EGFP RNA-dega transfekteeritud rakkudest pärinevatel piltidel on alates 24 h ajapunktist detekteeritavad signaalid kapsiidi- ja d1EGFP valgust. Viiruse kapsiidivalgust tekkiv signaal on antud mutantidel märkimisväärselt nõrgem kui wt replikoni korral. See tulemus on heas kooskõlas VLP-de titreerimisel (joonis 6) ning transgeeni ekspressiooni kvantifitseerimise katsel (joonis 7B, replikon + SG-enh-luc andmeseeria) saadud tulemustega. Selle põhjuseks on tõenäoliselt RDD ja PG mutatsioonidega replikaaside võimetus paljundada *in trans* paiknevat RNA-d (HelperC RNA) ja SFV translatsioonilise enhaanseri paiknemine kapsiidivalgu kodeeriva järjestuse alguses – raku translatsiooni blokeerimise korral on võimalik initsieerida valgusünteesi translatsioonilise enhaanseri abil; valgusünteesi normaalse funktsioneerimise korral mõjub stabiilne RNA-sekundaarstruktuur selle RNA transleerimisele pärssivalt, kuna takistab ribosoomi vaba liikumist mööda seda RNA-d. d1EGFP ekspressiooni võimaldamise osas on PG ja RDD mutatsioonidega replikonid võrreldavad wt replikoni ja „keskmise grupi“ mutantidega. Sarnaselt kapsiidivalgule kestab ka d1EGFP ekspressioon RDD ja PG mutatsioone sisaldavate replikonidega transfekteeritud rakkudes olulisel määral muutumata tasemel katse lõpuni (kuni 72 h peale transfektsiooni).

Oluline on ka märkida, et SFV1-RDD-d1EGFP ja SFV1-PG-d1EGFP korral ei toimu tõenäoliselt olulist rakkude paljunemist, kuna rakuspetsiifiliste valkude ekspressioon (näiteks  $\beta$ -aktiin) püsib enam-vähem muutumatul tasemel, samas kui negatiivse kontrolli rakkudes vastav ekspressioonitase rakkude paljunemise tõttu suureneb (joonis 8).

#### **2.3.4. Mutantsete replikonide tsütotoksilisuse hindamine**

Eelnevas katses saadud tulemused näitavad selgelt, et analüüsitud mutandid erinevad oluliselt rakuspetsiifilise translatsiooni inhibeerimise võime poolest. Sellest lähtuvalt analüüsiti järgnevalt mutantsete replikonide mõju rakkude elulemusele. Selleks elektroporeeriti BHK-21 rakkudesse SFV1-MCS1-pac, SFV1-RRD-MCS1-pac, SFV1-RDR-

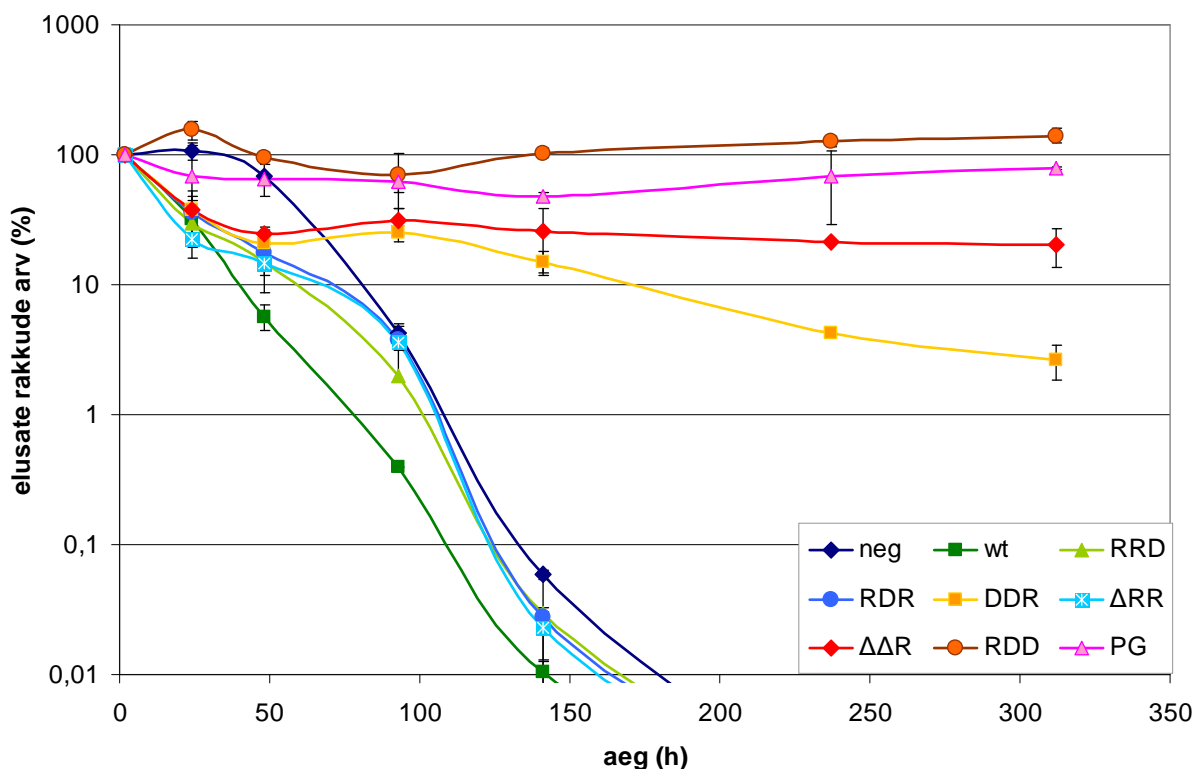
MCS1-pac, SFV1-DDR-MCS1-pac, SFV1- $\Delta$ RR-MCS1-pac, SFV1- $\Delta\Delta$ R-MCS1-pac, SFV1-RDD-MCS1-pac ja SFV1-PG-MCS1-pac replikonide RNA. Rakke inkubeeriti 28 °C juures. Soovitud ajahetkedel peale elektroporatsiooni loendati elusate rakkude arv trüpaansinise abil. Konstruktides sisalduv *pac* geen kodeerib puromütsiini N-atsetüültransferaasi, mis muudab rakud resistentseks puromütsiinile. Puromütsiini selektsiooni alustati 16 h peale elektroporatsiooni, eesmärgiga elimineerida rakud, mis polnud elektroporatsiooniga replikoni RNA-d omandanud või olid suutnud sellest hiljem vabaneda.

Tsütotoksilisuse hindamise katse tulemused on esitatud joonisel 9. Nagu tulemustest järeldub, hakkavad tühi-elektroporeeritud rakud (joonisel: „neg”) surema üks kuni kaks päeva peale transfektsiooni. Selle põhjuseks on puromütsiini selektsioon, kuna tühi-elektroporeeritud rakkudel puudub puromütsiini resistentsusgeen. SFV replikonidega elektroporteeritud rakkude surma põhjuseks võib aga pidada replikonide tsütotoksilisust. Kõige kiiremini surevad wt replikoniga transfekteeritud rakud – kaks päeva peale elektroportatsiooni on nendest rakkudest elus alla kümne protsendi. Suhteliselt sarnaselt wt replikonidega transfekteeritud rakkudele käituvad ka SFV1-RRD-MCS1-pac, SFV1-RDR-MCS1-pac ja SFV1- $\Delta$ RR-MCS1-pac replikonide RNA-ga transfekteeritud rakud. Kümme päeva peale elektroportatsiooni on tühi-elektroporeeritud ning SFV1-MCS1-pac, SFV1-RRD-MCS1-pac, SFV1-RDR-MCS1-pac ja SFV1- $\Delta$ RR-MCS1-pac replikonide RNA-dega elektroporteeritud elusate rakkude hulk detekteerimise piirist madalam.

SFV1-DDR-MCS1-pac, SFV1- $\Delta\Delta$ R-MCS1-pac, SFV1-RDD-MCS1-pac ning SFV1-PG-MCS1-pac replikonide RNA-dega transfekteeritud rakud on elujõulisemad. Kõige madalamat tsütotoksilisust näitab RDD mutatsiooni sisaldav replikon, mille korral on viimasel ajapunktil (13 päeva peale transfektsiooni) elusate rakkude arv ligikaudu 40 % suurem kui esimesel ajapunktil. PG mutatsioon avaldab sarnast mõju, kuigi seda mutatsiooni sisaldava replikoniga elektroporteeritud rakkude elujõulisus on madalam, mis avaldub selles, et elusate rakkude arv katses ei suurene, vaid langeb mõnevõrra. Samuti näitavad suhteliselt madalat tsütotoksilisust eelnevalt „keskmisesse gruppi” liigitatud DDR ja  $\Delta\Delta$ R mutatsiooni sisaldavad replikonid. Siiski erinevad need replikonid tunduvalt RDD ja PG mutatsiooni sisaldavatest replikonidest, kuna näiteks SFV1-DDR-MCS1-pur replikoniga rakkudest on viimaseks ajapunktiks elus vaid ligi 2,5 % algsest rakkude hulgast. Siiski näitab antud katse selgelt, et „keskmine grupp“ ei ole homogeenne, vaid rühmasisene varieeruvus tsütotoksilisuse osas on suhteliselt suur.

Sindbise viiruse mutantide tsütotoksilisust saab puromütsiini selektsiooni kasutades hinnata ka kolooniate tekkimise järgi (kolooniate arv/ $\mu$ g transfekteeritud replikoni RNA

kohta). Meie katsed seda analüüsiskeemi kasutada ei andnud tulemust, kuna ühegi uuritud replikoni korral ei täheldatud kolooniate moodustumist. Need andmed on kooskõlas ülalkirjeldatud tulemustega (joonis 8), mis näitavad, et ka mittetsütotoksilised SFV replikonid pärsivad rakkude jagunemist. Kuna Sindbise viiruse mutandid võimaldavad rakkude jagunemist, siis võib oletada, et mittetsütotoksilised Sindbise viiruse mutandid erinevad oluliselt käesolevas töös kasutatud SFV mutantidest rakkude jagunemisele avaldatava võime poolest.



**Joonis 9. Replikonidega elektroporeeritud rakkude elulemuse hindamine.** SFV1-MCS1-pac („wt“), SFV1-RRD-MCS1-pac („RRD“), SFV1-RDR-MCS1-pac („RDR“), SFV1-DDR-MCS1-pac („DDR“), SFV1-ΔRR-MCS1-pac („ΔRR“), SFV1-ΔΔR-MCS1-pac („ΔΔR“), SFV1-RDD-MCS1-pac („RDD“) või SFV1-PG-MCS1-pac („PG“) replikonide RNA-ga elektroporeeritud BHK-21 rakke inkubeeriti 28 °C juures. Joonisel näidatud ajahetkedel määrati elusate rakkude hulk. Negatiivse kontrollina (neg) on kasutatud BHK-21 rakke, mis olid tühi-elektroporeeritud. 100 %-ks loeti esimesel ajapunktil detekteeritud elusate rakkude arv. Graafikul on kujutatud kahe sõltumatu katseseeria aritmeetiline keskmine koos standardhälvetega.

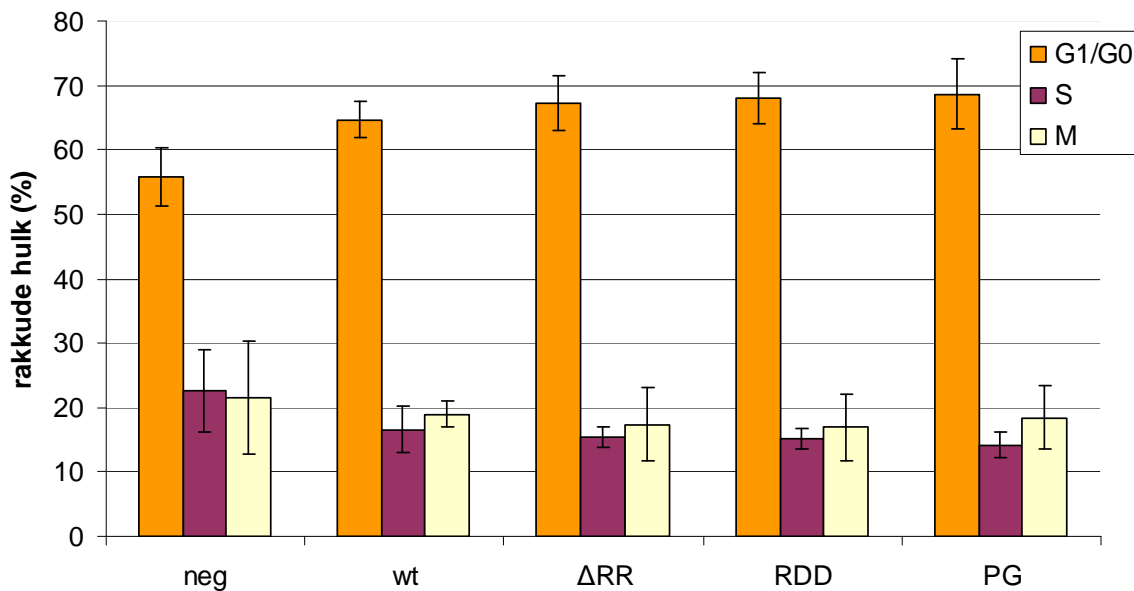
### 2.3.5. SFV replikonide mõju rakutsüklile

Kuna metaboolse märgistamise ning rakkude elulemuse katsetest võib järeldada, et ka mittetsütotoksilisust tagavate mutatsioonidega (RDD ja PG) SFV replikonid mõjutavad

rakkude võimet paljuneda, oli oluline uurida, kas ja kuidas mõjutavad SFV replikonid rakutsükli. Selle uurimiseks elektroporeeriti BHK-21 rakkudesse SFV1-MCS1, SFV1- $\Delta$ RR-MCS1, SFV1-RDD-MCS1 või SFV1-PG-MCS1 replikonide RNA ja transfekteeritud rakke inkubeeriti 28 °C juures. 48 h peale elektroporatsiooni rakud fikseeriti, permeabiliseeriti, nendes sisalduv DNA värviti propiidiumjodiidiga ja neid rakke analüüsiti läbivoolu tsütomeetrit kasutades.

Eksperimendi lihtsustamiseks ei uuritud kõiki „keskmise grupi” mutante, vaid võeti nende esindajaks  $\Delta$ RR mutatsioonida replikon, mis, lähtuvalt tsütotoksilisuse hindamise katse tulemustele (joonis 9), kuulub tsütotoksiliste „keskmise grupi“ mutantide hulka.

Katse tulemused (joonis 10) näitavad, et kõik katses kasutatud replikonid mõjutavad rakutsükli G1/G0 faasi suunas. Efekt osutus ka statistiliselt oluliseks – tühi-elektroporeeritud rakkude populatsiooni (joonisel „neg” andmeseeria) G1/G0 rakkude hulk võrrelduna „wt”, „ $\Delta$ RR”, „RDD” või „PG” andmeseeriatega t-testi abil annab p-väärtused alla 0,05. Rakutsükli S ja M faasides olevate rakkude osakaal oli SFV replikonidega elektroporeeritud rakkude puhul madalam kui elektroporeerimata rakkudel, kuid ei erinenud statistiliselt erinevate andmeseeriade lõikes.



**Joonis 10. Replikonidega elektroporeeritud rakkude rakutsükli uurimine DNA värvimise meetodil.** SFV1-MCS1 („wt“), SFV1- $\Delta$ RR-MCS1 („ $\Delta$ RR“), SFV1-RDD-MCS1 („RDD“) või SFV1-PG-MCS1 („PG“) replikonide RNA-ga elektroporeeritud BHK-21 rakke inkubeeriti 28 °C juures. 48 h möödudes värviti rakkude DNA propiidiumjodiidiga ning analüüsiti rakke läbivoolu tsütomeetriga. Saadud andmeid analüüsiti programmiga „CellQuest”. Negatiivse kontrollina (neg) on kasutatud BHK-21 rakke, mis olid tühi-elektroporeeritud. Graafikul on kujutatud kolme sõltumatu katseseeria aritmeetiline keskmine koos standardhälvetega.

Seega näitavad saadud andmed, et kõik analüüsitud SFV replikonid takistavad rakutsükli „külmutades“ selle G1/G0 faasis. Need tulemused on kooskõlas eelnevatest katsetest saadud andmetega, mis samuti näitavad rakkude paljunemise peatamist kõikide uuritud SFV replikonide poolt.

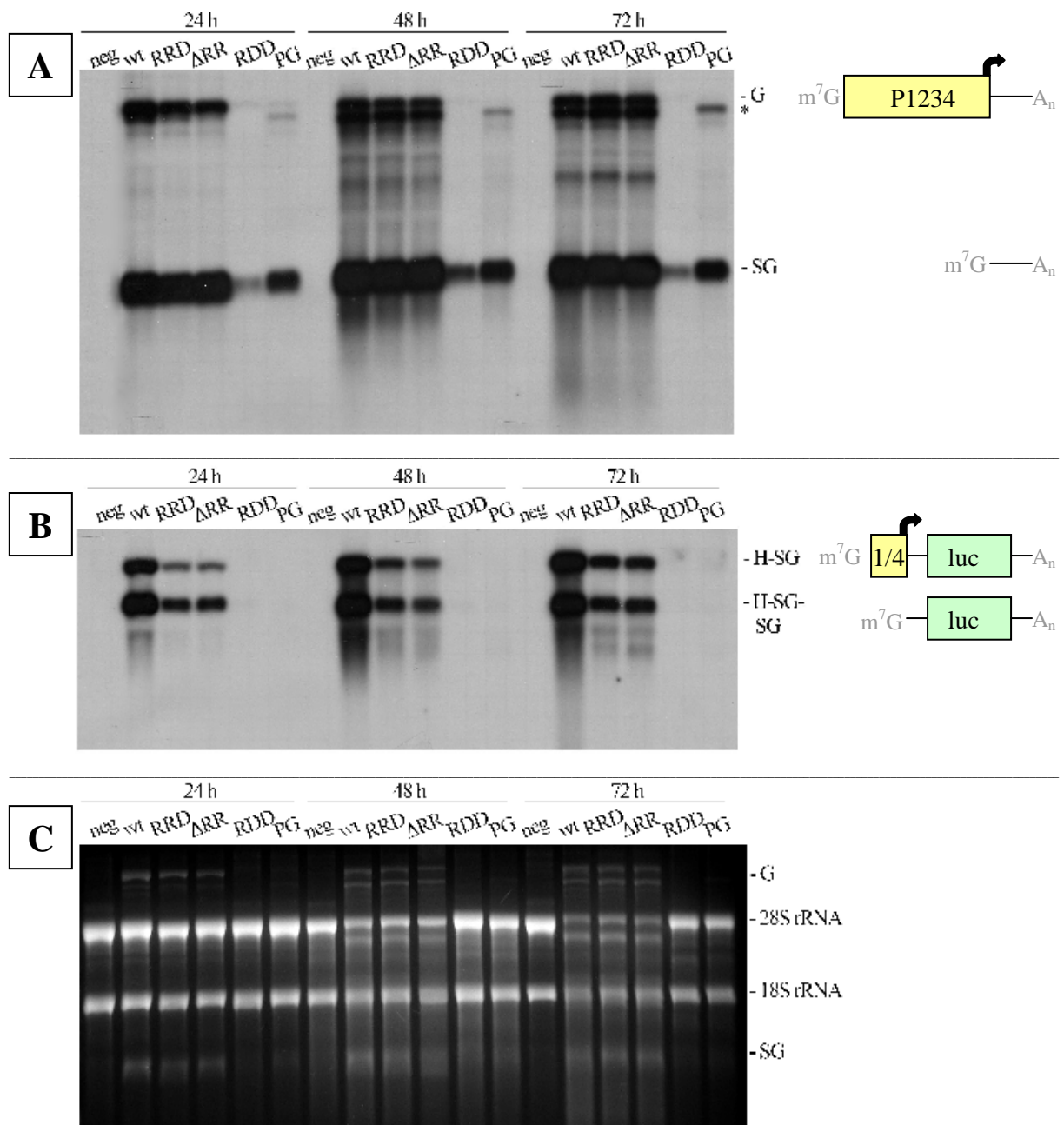
### 2.3.6. Replikonide positiivse polaarsusega RNA akumulatsioon rakkudes

Antud töö järgneva eesmärgiks oli välja selgitada, kas mittetsütotoksiliste mutantide (RDD ja PG) fenotüüpi võib põhjustada madalatasemeline viiruse genoomse ja/või subgenoomse RNA tootlikkus. Ka antud katses ei analüüsitud kõiki „keskmise grupi“ mutante, vaid valiti seda gruppi esindama RRD ja  $\Delta$ RR mutatsiooniga replikonid. BHK-21 rakkudesse elektroporeeriti SFV1-MCS1, SFV1-RRD-MCS1, SFV1- $\Delta$ RR-MCS1, SFV1-RDD-MCS1 või SFV1-PG-MCS1 koos H-SG-enh-luc RNA-ga, et omandada teavet nii *in cis* kui ka *in trans* toimuva RNA replikatsiooni ja transkriptsiooni kohta.

Rakkudes toodetakse replikoni ning H-SG-enh-luc positiivse polaarsusega RNA-delt negatiivse polaarsusega täispikad RNA-d, millelt omakorda sünteesitakse nii täispikki positiivse polaarsusega RNA-sid kui ka lühikesi subgenoomseid RNA-sid, mis samuti omavad positiivset polaarsust. Positiivse polaarsusega RNA-sid on sellistes rakkudes seega nelja tüüpi (joonis 11A ja 11B, skeemid). Nendele RNA-dele ei olnud kahjuks võimalik sünteesida piisava pikkusega ühist radioaktiivset RNA-proovi. Seetõttu kasutati analüüsiks kahte erinevat proovi: üks replikoni 3' mittetransleeritava alaga komplementaarne (seondub replikoni RNA ning replikonilt sünteesitava subgenoomse RNA-ga) ja teine lutsiferaasi geeni RNA-ga komplementaarne (seondub H-SG-enh-luc RNA ning sellelt sünteesitava subgenoomse RNA-ga). Kuna negatiivse polaarsusega RNA on võrreldes positiivse polaarsusega RNA-ga rakkudes suures alahulgas ning seetõttu on selle sünteesi analüüsimine tehniliselt väga keerukas, otsustati negatiivse polaarsusega RNA analüüsi antud töösse mitte kaasata.

Katse tulemused, mis on esitatud joonisel 11, näitavad, et replikaasi tootva RNA (replikoni) ja tema subgenoomse RNA akumulatsioon on RRD ning  $\Delta$ RR konstruktidel puhul ligikaudu sama kõrgetasemeline kui wt replikoni korral (joonis 11A). Suuremaid erinevusi wt konstrukstist võib RRD ning  $\Delta$ RR mutatsiooniga konstruktidel märgata *in trans* paiknevate RNA-de akumulatsioonis (joonis 11B).

Jooniselt 11A ja 11B on näha, et wt konstruktiga võrreldes on RDD ja PG konstruktidel võime akumulatsioon rakkudes täispikka replikoni RNA-d praktiliselt olematu



**Joonis 11. SFV1-MCS1 ning mutantsete replikonide positiivse polaarsusega RNA akumulatsioon rakkudes.** BHK-21 rakke koelektroporeeriti pSFV1-MCS1 („wt”), pSFV1-RRD-MCS1 („RRD”), pSFV1-ΔARR-MCS1 („ΔARR”), pSFV1-RDD-MCS1 („RDD”) või pSFV1-PG-MCS1 („PG”) ja pH-SG-enh-luc konstruktidelt toodetud RNA-dega. 24 h, 48 h ja 72 h möödudes eraldati rakkudest totaalne RNA ja viidi läbi *Northern blot* analüüs. Negatiivse kontrollina on kasutatud H-SG-enh-luc RNA-ga transfecteeritud rakke. **A)** *Northern blot* analüüs <sup>32</sup>P-ga märgistatud RNA prooviga, mis on komplementaarne replikoni 3’ mittetransleerivale osale. Joonise kõrvale on kujutatud replikoni (G) ja replikonilt toodetava subgenoomse RNA (SG) skeem. Tärniga on tähistatud uudetsete, replikoni RNA-st kiiremini migreeruvate RNA-de asukoht. Kõver nooleke tähistab SFV subgenoomse promoteri asukohta. **B)** *Northern blot* analüüs <sup>32</sup>P-ga märgistatud RNA prooviga, mis on komplementaarne lutsiferaasi geeni RNA-le. Joonise kõrvale on kujutatud H-SG-enh-luc (H-SG) ning sellelt toodetava subgenoomse RNA (H-SG-SG) skeem. **C)** Katse standardiseeriti totaalse RNA kontsentratsiooni järgi. Joonise kõrvale on märgitud replikoni RNA (G), replikonilt toodetava subgenoomse RNA (SG) ning 18S ja 28S rRNA oletatavad asukohad.

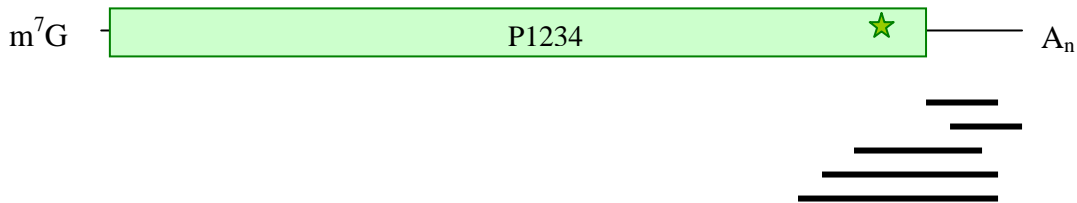
(pikemaajaliselt eksponeeritud pildilt võis signaale siiski detekteerida). Samuti ei ole nende konstruktidel puhul märgata, et rakkudes olev viiruslike RNA-de kogus ajas märkimisväärselt kasvaks.

Üllataval kombel võib wt, RRD,  $\Delta$ RR ja PG konstruktidel puhul täheldada signaali ka replikonist kiiremini migreeruvast RNA-st. Wt ning RRD ja  $\Delta$ RR mutatsioonidega replikonid on rakkudele tsütotoksilised ja 48 ning 72 tundi peale transfektsiooni on nende replikonidega elektroporeeritud rakkudest elus vähesed (joonis 9). On teada, et SFV kutsus BHK-21 rakkudes esile apoptoosi (Glasgow *et al.*, 1997). Samas on leitud, et mõningates rakutüüpides ilmneb apoptoosi käigus ribosomaalsete rRNA-de spetsiifiline lõikamine (Houge *et al.*, 1995; King *et al.*, 2000; Nadano ja Sato, 2000) ning mRNA-de eluea märgatav lühenemine (Bushell *et al.*, 2004, ja viited selles). Nagu võib märgata jooniselt 11C, toimub SFV1-MCS1, SFV1-RRD-MCS1 ja SFV1- $\Delta$ RR-MCS1 replikoni RNA-ga elektroporeeritud rakkudes tõenäoliselt rRNA lagunemine. Seega on võimalik, et apoptoosi käigus hakkab toimuma ka SFV RNA lagunemine ja joonisel 11A detekteeritav uudne RNA on selle lagundamise produkt.

Antud seletust ei ole aga võimalik laiendada PG konstruktile, kuna PG mutatsiooniga replikon on rakkudele suhteliselt mittetsütotoksiline (joonis 9). On huvitav märkida, et ka SFV mutantne replikon SFV2C, mis omab mutatsiooni PG mutatsioonist viie aminohappejäägi kaugusel põhjustab sarnast efekti: kui selle replikoniga elektroporeeritud rakkudest eraldati viiruse RNA ning teostati sellele *Northern blot* analüüs, siis märgati samuti uude, replikonist kiiremini migreeruva RNA-tüübi teket (Perri *et al.*, 2000). Seetõttu seati käesolevas töös hüpotees, et SFV2C ja PG mutatsioonid mõjutavad replikonide võimet moodustada deletsioonide tekitamise teel interferentseid replikoni RNA-sid. Seda hüpoteesi kontrolliti SFV1-PG-MCS1 ja H-SG-enh-luc RNA-dega koelektroporeeritud rakkudest eraldatud RNA RT-PCR-ga ning järgneva sekveneerimisega. Replikoni 3' otsa lähedase ala spetsiifiline RT-PCR andis SFV1-PG-MCS1 konstrukti puhul täispikkadest produktidest lühemaidprodukte (kontrollina analüüsitud wt konstrukti korral saadi vaid täispikad produktid). RT-PCR lühemad produktid kloneeriti ning sekveneeriti. Sekveneerimistulemuste analüüsil avastati mitmeid erineva pikkusega deletsioone SFV1-PG-MCS1 RNA 3' otsa lähedal (joonis 12). Osa deletsioone hõlmas vaid replikoni 3' mittetransleeritavat ala, mõnel juhul oli deleteerunud ka osa nsP4 valku kodeerivast alast, kaasa arvatud RNA-polümeraase aktiivsuse eest vastutav GDD motiiv.

Seega on PG replikoni puhul tõesti tegemist defektsete interfereerivate genoomide moodustamisega, kusjuures kõigil detekteeritud juhtudel on deleteerunud regioon, kus

paikneb kapsiidivalgu translatsioonilise enhaanseri järjestus ehk stabiilne RNA „juuksenõela“ struktuur.



**Joonis 12. Skeem SFV1-PG-MCS1 replikonist ja tema identifitseeritud deletsioonidest.** SFV1-PG-MCS1 ja H-SG-enh-luc RNA-dega koelektroporeeriti BHK-21 rakke. Rakkudest eraldati totaalne RNA. SFV1-PG-MCS1 deletsioonid identifitseeriti RT-PCR ning sekveneerimisega. Leitud deletsioonid on kujutatud mustade joontena. Ristkülikuga (P1234) on kujutatud replikoni ainus avatud lugemisraam ning tähekesega on tähistatud RNA-sõltuva RNA polümeraasi GDD aminohappeline järjestus.

Antud analüüs näitas ka (joonis 11), et subgenoomsete RNA-de süntees on PG ja RDD mutantidel võrreldes genoomide sünteesiga oluliselt aktiivsem – *in cis* sünteesitava subgenoomse RNA puhul on tema vahekord genoomse RNA-ga oluliselt suurem kui standardne 2:1 vahekord (mõningane subgenoomse RNA sünteesi aktivatsioon genoomse RNA suhtes on iseloomulik ka teistele mutantidele). Selline subgenoomse RNA süntees seletab ka *in cis* paiknevate markergeeni ekspressiooni kõrget taset nende replikonide poolt (joonis 7B, andmeseeriad „replikon-luc” ning „replikon-enh-luc”). Samas on näha, et nii täispika kui ka subgenoomse *in trans* asuva RNA süntees on RDD ja PG mutantidel äärmiselt ebaefektiivne. Taas korreleeruvad need andmed hästi markergeeni ekspressiooni analüüsi tulemustega (joonis 7B) näidates, et nende viiruste replikatsiooni defekt on eriti hästi märgatav *in trans* kulgeva replikatsiooni korral.

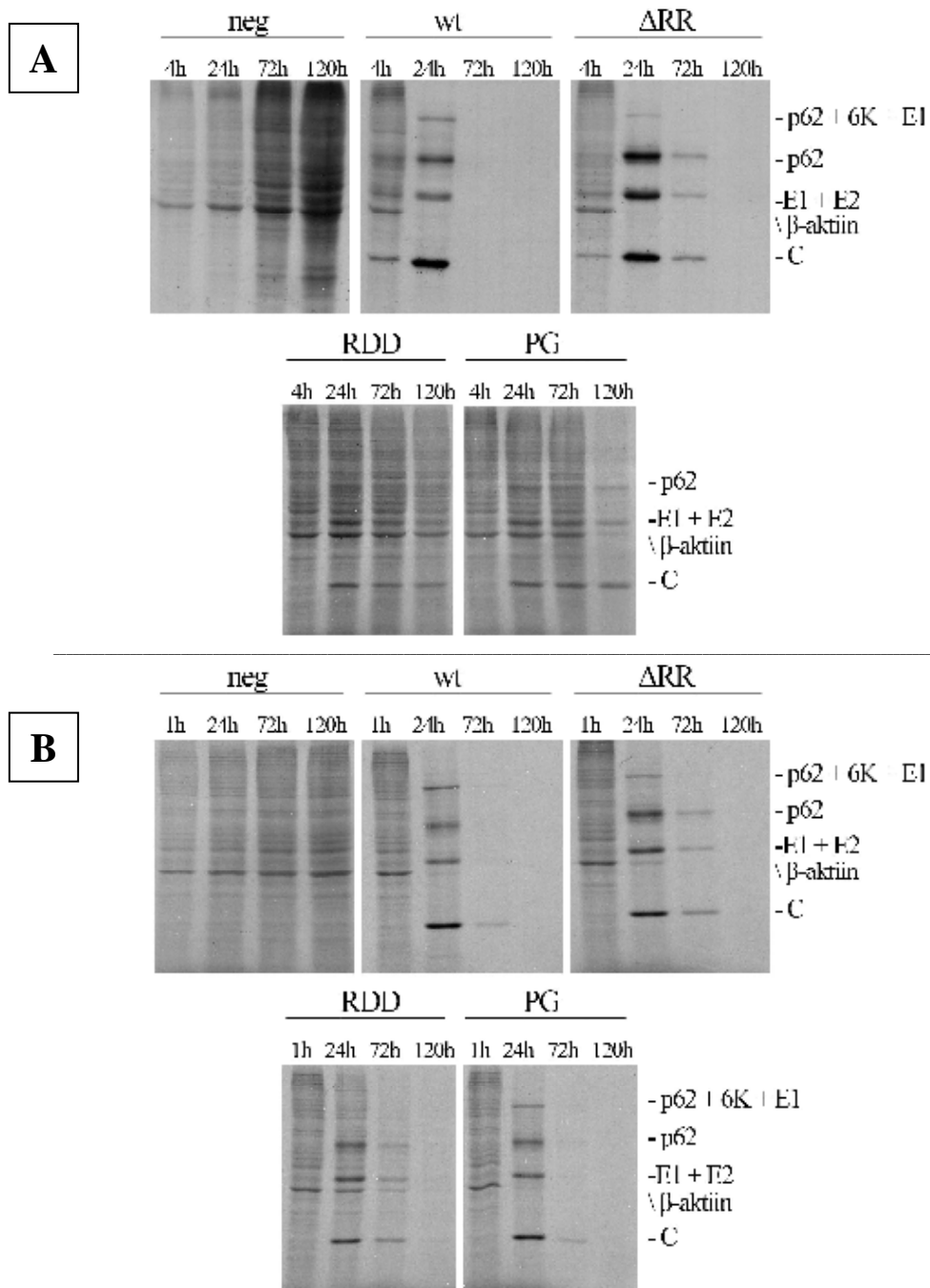
Kokkuvõtlikult näitavad saadud andmed, et PG ja RDD replikonidele iseloomulik madal VLP-de saagis ja *in trans* paikneva markergeeni ekspressioon on mõjutatud sügavast defektist *in trans* paikneva RNA (Helper1, H-SG-luc või H-SG-enh-luc) replikatsioonis ja transkriptsioonis. Samas omavad RDD ja PG mutandid ka hälbinud võimet akumulleerida rakkudes täispikka replikoni RNA-d. Seega on antud mutantide võimetus toota VLP-sid tingitud nii replikonide RNA-de kui ka viiruse struktuursete valkude madalast kontsentratsioonist rakkudes.

### **2.3.7. SFV4- $\Delta$ RR, SFV4-RDD ja SFV4-PG viiruste mõju peremeesraku metabolismile**

Selleks, et teha kindlaks, kas RDD ja PG mutatsioonide poolt põhjustatud mittetsütotoksiline fenotüüp ilmneb ka täispika SFV viiruse kontekstis, uuriti esmalt viiruse genoomse RNA-ga elektroporeeritud rakkudes toimuvat valgusünteesi metaboolset märgistamist kasutades. Ka selles analüüsis võeti „keskmise grupi” esindajaks  $\Delta$ RR mutatsiooni kandev konstrukt. Katse tulemustest (joonis 13A) võib näha, et nii wt SFV4 kui ka SFV4- $\Delta$ RR käituvad sarnaselt SFV1-d1EGFP ja SFV1- $\Delta$ RR-d1EGFP konstruktidelt (joonis 8) – nende konstruktidega transfekteeritud rakkudes blokeeritakse rakuspetsiifiline translatsioon 24. tunniks peale elektroporatsiooni. Samuti on mõlema katse korral (joonised 8 ja 13A) märgata, et viiruse struktuurseid valke sünteesitakse  $\Delta$ RR mutatsiooniga konstruktidelt korral kauem kui wt konstruktidelt puhul. Lisaks leiti, et RDD või PG mutatsioone sisaldavate viiruste genoomide rakkudesse transfekteerimine toob kaasa samasuguse efekti nagu samade mutatsioonidega replikonide transfekteerimine – rakuspetsiifilise translatsiooni mahasurumist ei toimu ja viiruse struktuurseid valke toodetakse oluliselt madalamal tasemel kui SFV4 või SFV4- $\Delta$ RR RNA-dega transfekteeritud rakkudes.

Järgnevalt analüüsiti, kas ka SFV4-RDD ja SFV4-PG viirustega nakatatud rakkudes ei toimu rakuspetsiifilise translatsiooni inhibeerimist. Selleks koguti viiruse genoomse RNA-ga transfekteeritud rakkudelt 72 h peale elektroporatsiooni söödet, söötmes olev viirus titreeriti ning uusi BHK-21 rakke nakatati saadud rekombinantsete virionidega MOI 1 tingimustes. Analoogiliselt eelmise katsega viidi läbi rakkudes sünteesitavate valkude metaboolne märgistamine. Selle katse tulemused on esitatud joonisel 13B, millelt võib näha, et wt ning  $\Delta$ RR mutatsiooni kandvate viirustega nakatatud rakkudes toimuv valgusünteesi profiil on sarnane vastavate replikonide ning viiruse genoomiga transfekteeritud rakkude omale. Erinevalt infektsiooniliste RNA-dega transfekteeritud rakkudest toimus RDD ja PG mutatsioone kandvate viirustega nakatades samuti rakuspetsiifilise translatsiooni mahasurumine (seda eriti jõuliselt SFV4-PG puhul).

Lihtsaim seda näivat vastuolu seletav hüpotees on: erinevalt replikonidest on infektsioonilised viirused võimelised produktiivselt nakatama uusi rakke ja tootma seal uusi infektsioonilisi virione. Kuna SFV RNA replikatsiooni viib läbi ilma *proofreading* funktsioonita viiruse ensüüm, siis võib infektsioonilise viiruse paljundamisel väga kergesti aset leida genoomi sisse viidud mutatsioonidele suunatud vastu-selektsiooni tulemusena punktmutatsioonide reverteerumine ja/või kompensatoorsete mutatsioonide tekkimine. See



**Joonis 13. Viiruse genoomiga elektroporeeritud ning viirustega nakatatud rakkude metaboolne märgistamine.** BHK-21 rakke inkubeeriti 28 °C juures ja märgistati <sup>35</sup>S-metioniini ja <sup>35</sup>S-tsüsteiiniga erinevatel ajapunktidel peale elektroporatsiooni või nakatamist. Märgistatud rakud lüüsi, valgud lahutati SDS-poliakrüülamiidgeelis, mis kuivatati ja eksponeeriti röntgenfilmile. Näidatud on viiruse kapsiidivalgu (C), β-aktiini, viiruse glükoproteiinide E1 ja E2 ning viiruse struktuurse polüproteiini protsessingu vaheproduktide (p62 + 6K + E1; p62) eeldatavad asukohad. Negatiivse kontrollina (neg) on kasutatud BHK-21 rakke, mis olid tühi-elektroporeeritud või -nakatatud. **A**) SFV4 („wt“), SFV4-ΔARR („ΔARR“), SFV4-RDD („RDD“) ja SFV4-PG („PG“) RNA-ga transfekteeritud rakkude metaboolne märgistamine. Metaboolseks märgistamiseks kasutatud rakkudelt koguti sööde ja määrati söötmes oleva viiruse tiiter. **B**) BHK-21 rakke nakatati joonise A osas kirjeldatud viirustega MOI 1 tingimustes ning seejärel analüüsiti rakkudes sünteesitavaid valke metaboolse märgistamisega.

võiks olla ka põhjuseks, miks SFV4-RDD ning SFV4-PG viirustega nakatatud rakkude valgusünteesi profiil erineb SFV4-RDD ja SFV4-PG RNA-dega elektroporeeritud rakkude valgusünteesi profiilist. Sellepärast oli äärmiselt oluline välja selgitada, kas infektsioonilistesse DNA-desse sisse viidud mutatsioonid on säilinud ka moodustunud rekombinantsete viiruste genoomides. Selle kinnitamiseks eraldati SFV4-RDD ja SFV4-PG viiruste virionidest RNA, mille peal viidi läbi RT-PCR ja saadud fragmendid, mis vastavad esialgseid mutatsioone sisaldavatele regioonidele sekveneeriti. Sekveneerimise tulemuste põhjal selgus, et nii RDD kui ka PG viiruse genoomis olid sisseviidud mutatsioonid säilinud. Seega ei olnud fenotüübi muutus põhjustatud sisseviidud mutatsioonide reverteerumisest.

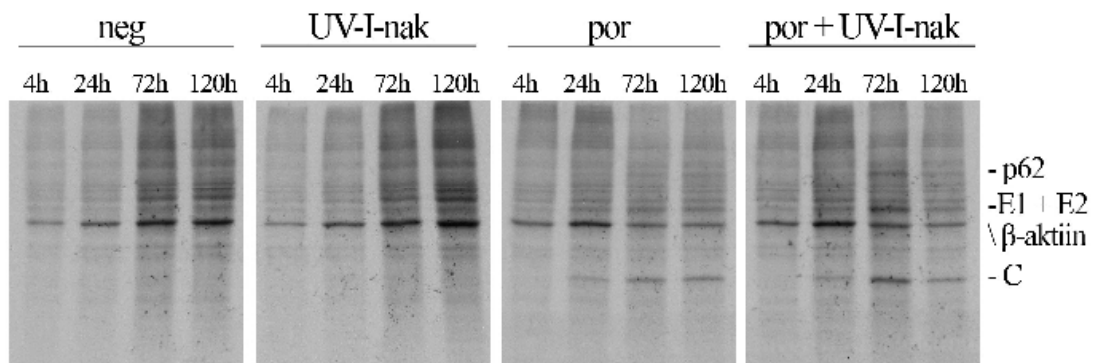
### **2.3.8. Rakku sisenemise tee ei mõjuta SFV4-RDD viiruse tsütotoksilisust**

Teiseks võimaluseks, miks SFV4-RDD ning SFV4-PG viirustega nakatatud rakkude valgusünteesi profiil erineb SFV4-RDD ja SFV4-PG RNA-dega elektroporeeritud rakkude valgusünteesi profiilist, võib olla seotud erinevustega viiruse genoomi rakku sisenemise teedes. Teoreetiliselt on võimalik, et SFV virioni seondumine raku pinnale või mõni virioni rakku sisenemise etappidest kutsub rakus esile signaaliradade kaskaadi, mille tulemuseks on rakuspetsiifilise translatsiooni inhibeerimine või sellise inhibeerimise soodustamine koostoimes viiruse teiste tsütotoksilisuse mehhanismidega.

Eristamaks viiruse replikatsioonil tekkivate mutatsioonide mõju rakku sisenemise tee poolt avaldatavast mõjust, koostati järgnev katse skeem: BHK-21 rakke elektroporeeriti pSFV4-RDD plasmiidilt toodetud RNA-ga, rakud külvati koekultuuri tassidele ja inkubeeriti 37 °C juures; peale rakkude kinnitumist koekultuuri tassi põhjale ning taastumist elektrišokist nakatati neid UV-inaktiveeritud SFV virionidega; mõne tunni möödudes langetati rakkude inkubeerimise temperatuur 28 °C-ni, mis võimaldas SFV4-RDD replikatsiooni alustamist. Kuna SFV4-RDD on temperatuuritundliku fenotüübiga ja ei suuda replitseeruda 37 °C juures, siis välistati 37 °C juures inkubeerimisega superinfektsiooni blokeerimine ajaks, kui toimus UV-inaktiveeritud viirusega nakatamine. Lisaks sellele initsieeriti antud katses viiruse elutsükli etappe õiges järjekorras: esmalt toimusid interaktsioonid virioni ja rakupinna retseptorite vahel, siis virioni sisenemine rakku ning alles seejärel käivitati viiruse RNA replikatsioon.

Elektroporeeritud ja UV-inaktiveeritud viirusega nakatatud rakkude metaboolne märgistamine (joonis 14) näitas, et SFV4-RDD RNA-ga elektroporeeritud ja seejärel UV-inaktiveeritud viirusega nakatatud rakkudes toimuv valgusünteesi profiil ei erine oluliselt

SFV4-RDD RNA-ga elektroporeeritud rakkude translatsiooni profiilist (joonis 13A, joonis 14). Mõlemal juhul ei ole täheldatav peremeesraku valgusünteesi blokeerimist, mis on iseloomulik SFV4-RDD viirusega nakatatud rakkudele (joonis 13B). Sellest võib järeldada, et tõenäoliselt ei põhjusta SFV4-RDD viiruse tsütotoksilist fenotüüpi virioni seondumine raku pinnale. Samas ei saa kindel olla, et kasutatud katse skeem imiteerib täielikult infektsioonil toimuvaid sündmusi ja tsütotoksilise efekti puudumine võib olla seotud nende erinevustega. Võttes arvesse kõiki ülal toodud tulemusi, on siiski loogilisem oletada, et tsütotoksilise fenotüübi taastekkimine SFV4-RDD ja SFV4-PG viiruste puhul on seotud viiruse replikatsiooni ja struktuursete valkude ekspressiooni võimendavate kompensatoorsete mutatsioonide tekkimisega viiruse genoomis. Selliste genoomide aktiivsem replikatsioon ja struktuursete valkude süntees annab piisava selektsioonilise eelise, et need viirused saavutaksid kõrge tiitri ja põhjustaksid muutusi viiruse fenotüübis.



**Joonis 14. UV-kiiritatud viirusega „nakatamise“ mõju SFV4-RDD RNA-ga transfekteeritud BHK-21 rakkudes toimuvale translatsioonile.** BHK-21 rakud elektroporeeriti SFV4-RDD RNA-ga ja inkubeeriti 37 °C juures. 3 h peale transfektsiooni nakatati elektroporeeritud rakke UV-inaktiveeritud viirusega. 5 h peale transfektsiooni alustati rakkude inkubeerimist 28 °C juures. Soovitud ajapunktidel (4 h, 24 h, 72 h või 120 h peale elektroporatsiooni) märgistati rakus sünteesitavad valgud <sup>35</sup>S-metioniini ja <sup>35</sup>S-tsüsteiiniga. Märgistatud rakud lüüsi ja valgud lahutati SDS-polüakrüülamiidgeelis, mis kuivatati ja eksponeeriti röntgenfilmile. Näidatud on viiruse kapsiidivalgu (C), β-aktiini, viiruse glükoproteiinide E1 ja E2 ning viiruse struktuurse polüproteiini protsessingu vaheprodukti p62 eeldatavad asukohad. Negatiivse kontrollina (neg) on kasutatud BHK-21 rakke, mis olid tühi-elektroporeeritud ja nakatamata. „UV-I-nak“ – tühi-elektroporeeritud ja seejärel UV-inaktiveeritud viirusega nakatatud rakud. „por“ –SFV4-RDD RNA-ga elektroporeeritud ja nakatamata rakud. „por + UV-I-nak“ – SFV4-RDD RNA-ga elektroporeeritud ning UV-inaktiveeritud viirusega nakatatud rakud.

## **2.4. Arutelu**

SFV mittetsütotoksilisuse põhjuseid on uuritud kaua, kuid vähese eduga. On hästi teada, et tsütotoksilisuse tekitamisel on viiruse valkudest kõige olulisem nsP2 valk (Perri *et al.*, 2000; Lundström *et al.*, 2001 (A), ning viited selles; Lundström *et al.*, 2001 (B); Lundström *et al.*, 2003) ning et umbes 50 % rakus olevast nsP2 valgust kogusest on transporditud tuuma (Rikkonen, 1996). Seetõttu on oletatud, et nsP2 valk võib just raku tuumas paiknevate rakupoolsete faktoritega interakteerudes põhjustada raku makromolekulide sünteesi blokeerimise ja/või apoptootiliste signaalide käivitamise. Käesoleva uurimustöö üheks eesmärgiks oli analüüsida mõju, mida avaldab SFV nsP2 valgu tuumne lokaliseerimine viiruse ja replikonide replitseerumisele ning viiruse indutseeritud tsütotoksilistele efektidele. Selleks uuriti mitmeid erinevaid NLS-mutante. Kuna selgus, et mitmed konstrueeritud mutantid olid kas replitseerumisvõimetud või temperatuuritundliku fenotüübiga, siis sooritati katsed 28 °C juures. Nagu eelkatsetest teada oli, lokaliseerub enamiku nende mutantide nsP2 valgust raku tsütoplasmasse, aga üks ( $\Delta$ RR) mutatsioon muudab nsP2 valgu lokaliseerimise peamiselt tuumseks (sama efekt on nsP2 valgu rakusisesele lokaliseerimisele ka PG mutatsioonil; vaata illustratsioone lisast 1). Seetõttu oli võimalik kontrollida, kas nsP2 valgu tuuma lokaliseerumisel on efekt viiruse ja replikoni fenotüübile.

Kui nsP2 valgu tuumne lokaliseerimine oleks SFV tekitatud tsütotoksilisuse ainsaks või peamiseks põhjuseks, siis peaksid RDR, DDR,  $\Delta$ DR, RDD ja DDD mutandid, mille nsP2 valk lokaliseerub raku tsütoplasmasse, olema kõik mittetsütotoksilise fenotüübiga ja PG ning  $\Delta$ RR mutandid, mille nsP2 valk lokaliseerub peaaegu täielikult raku tuuma, võimendatud tsütotoksilisusega. Tulemustest selgus aga, et NLS-mutantide fenotüübid 28 °C juures on grupeeritavad sootuks replikoni introductseeritud mutatsioonide arvu järgi. Ühe mutatsiooniga replikonid (RRD, RDR ja  $\Delta$ RR mutatsioonidega) on suhteliselt sarnased wt replikonile – nad tagavad kõrgetasemelise markervalgu ning viirusspetsiifiliste valkude ja RNA tootmise, põhjustavad peremeesraku translatsiooni blokeerimise ja peremeesraku surma. Wt replikonist eristab neid mutante ainult kõigi eelpool nimetatud protsesside aeglase toimumine. Kaksik-mutandid (DDR ja  $\Delta$ DR mutatsioonidega replikonid) toodavad viirus-spetsiifilisi ja markervalgu ligikaudu sama edukalt kui RRD, RDR ja  $\Delta$ RR mutatsioonidega replikonid, kuid omavad vähenenud tsütotoksilisusega fenotüüpi. Kolmas kaksik-mutant, RDD, omab uuritud

elujõulistest mutantidest kõige madalama tsütotoksilisusega fenotüüpi ja sarnaneb PG mutandile, kuna mõlemaid iseloomustab väga madal viiruse RNA- ja VLP-tootlikkus. Eelkatsetest oli teada, et üks doktor Inga Sarandi poolt konstrueeritud kolmik-mutant –  $\Delta\Delta\Delta$  (kolme arginiinjäägi deletsioon) on elujõuetu. Käesolevast tööst selgus, et samuti muudab teine kolmik-mutant, DDD, SFV replikoni võimetuks replitseeruma ka 28 °C juures ja et vaid juhuslikud pöörd- või kompensatoorsed mutatsioonid suudavad DDD mutatsiooni mõju tasakaalustada.

Seega ei esine mingit otsesest korrelatsiooni SFV replikoni tsütotoksiliste omaduste ja nsP2 valgu rakusisese lokalisatsiooni vahel, kuigi on selge, et nsP2 NLS järjestus on viirusele väga oluline, tõenäoliselt näiteks viiruse replikaasi funktsioneerimisel. Selle väite kaudseks tõestuseks on mitmete SFV nsP2 valgu NLS-mutantide temperatuuritundlik või replitseerumisvõimetu fenotüüp. Mutatsioonide poolt põhjustatud temperatuuritundlik fenotüüp lubab oletada, et vastavad NLS-mutatsioonid võivad muuta replikaasi kompleksi koospüsivuse ebastabiilsemaks. Seetõttu ei suuda ka antud mutandid funktsioneerida 37 °C juures, samas kui madalam temperatuur (28 °C) lisab valkude kompleksile stabiilsust. Mutantsete replikaaside ebastabiilsuse hüpotees seletab ka seda, miks iga järgneva mutatsiooni introductseerimine NLS järjestusse põhjustab veelgi madalama infektsioonilisusega replikonide tekke – iga järgnev mutatsioon häirib replikaaside stabiilsust (valgukomplekside koospüsivust) veelgi. Teoreetiliselt on ebastabiilsed replikatsioonikompleksid eriti ebaefektiivsed *in trans* RNA paljundamisel, kuna vastava funktsiooni täitmiseks peaksid replikatsioonikompleksid püsima koos pikemat aega või suutma peale lagunemist uuesti assambleeruda, et kohata *in trans* asuvat RNA-d, mis võib rakus paikneda suhteliselt kaugel mittestruktuursete valkude sünteesi kohast. Selle hüpoteesiga on kooskõlas tulemus, et RDD ja PG mutatsioonidega replikonid, mille võime akumulereerida rakkudes viiruse RNA-d on häiritud, on eriti ebaefektiivsed *in trans* paikneva RNA paljundamises.

Lisaks sellele on oletatud, et alfaviiruste nsP2 valgu proteaasi domeeni C-terminaalne aladomeen osaleb viiruse RNA sidumisel viiruse replikaasi poolt (Russo *et al.*, 2006). Kuna NLS signaal ja PG mutatsioon paiknevad just selles aladomeenis, siis on võimalik, et nii NLS-mutatsioonide kui ka PG mutatsiooni mõju viiruse replikaasile on nsP2 valgu ja RNA-matriitsi interakteerumise häirimine. Kuna SFV nsP2 valgu NLS koosneb põhiliselt positiivse laenguga aminohappejääkidest, siis on ta seetõttu heaks kandidaadiks negatiivse laenguga RNA sidumisel. Ka selle hüpoteesiga ühildub tulemus, et mutantsete SFV replikonide infektsioonilisus ja elujõulisus on seotud NLS järjestusse sisse viidud mutatsioonide arvuga,

kuna on loogiline oletada, et mida rohkem mutatsioone introductseerida NLS järjestusse, seda halvema RNA-sidumise võimega nsP2 valk oleks. Tähelepanuväärne on ka see, et VEEV nsP2 valgu proteaasi domeeni kristallstruktuuri põhjal võib oletada, et SFV nsP2 valgu NLS ja PG mutatsiooni asukoht paiknevad valgus ruumiliselt üksteisele väga lähedal ning kuuluvad mõlemad valgu pinnale eksponeeritud „pöörete“ (inglise keeles: „turn“) koosseisu, mis kinnitab oletusi, et antud aminohappejäägid võivad osaleda kas viiruse RNA või teiste replikaasi komponentidega interakteerumisel. PG mutatsiooni asukoha olulisust nsP2 valgu koosseisus kinnitab fakt, et vastav proliin on alfaviiruste seas väga konserveerunud. Huvipakkuv on aga tulemus, et SFV kaks kaksik-mutanti – RDD ja DDR on üksteisest suhteliselt erinevad (RDD mutant evib tunduvalt madalamat tsütotoksilisust ja VLP-tootlikkuse võimet; joonised 6 ja 9). Erinevate alfaviiruste nsP2 valgu järjestuste võrdlemisest (Russo *et al.*, 2006) on näha, et RRR motiivi esimene aminohappejääk pole eriti konserveerunud, kuid kahes viimases positsioonis paikneb peaaegu alati positiivse laenguga aminohappejääk (lüsiin või arginiin), mistõttu võib arvata, et RRR motiivi esimene positsioon pole nsP2 valgu funtsioneerimiseks nii oluline kui kaks viimast. Tõenäoliselt seetõttu erineb RDD mutant, milles on muteeritud just kaks „olulisemat“ aminohappejääki, wt SFV replikonist rohkem, kui DDR mutant, milles on muteeritud üks „mitteoluline“ aminohappejääk ja üks „olulisem“ aminohappejääk.

Mutantsete nsP2 valkude defekt replikaasi koosseisus võib olla põhjustatud ka nsP2 valgu proteaase aktiivsuse häiritusest, mis muudaks tugevalt ka replikaasi moodustumist ning sellega koos ka RNA sünteesimise võimet. VEEV nsP2 valgu proteaase domeeni kristallstruktuuri kohaselt on see küll suhteliselt ebatõenäoline, kuna SFV NLS järjestuse ja PG mutatsiooni asukohtadele vastavad aminohappejäägid paiknevad VEEV nsP2 valgu korral nsP2 proteaase aktiivsuse eest vastutavatest ja proteaasi substraati siduvatest aminohapetest suhteliselt kaugel. Sellegipoolest on võimalik, et uuritud mutandid mõjutavad SFV nsP2 valgu proteaaseid omadusi.

RDD ja PG mutantide puhul sünteesitakse täispika replikoni RNA suhtes palju rohkem subgenoomset RNA-d kui wt replikoni korral. Tõenäoliselt on ka see nähtus põhjustatud nsP2 valgu muutunud omadustest. On välja pakutud teooria, mille kohaselt nsP2 reguleerib 26S RNA transkriptsiooni (Suopanki *et al.*, 1998) olles subgenoomsele promooterile seonduv faktor. Käesolevas töös toodud tulemused lubavad oletada, et tänu nsP2 muutunud omadustele võivad RDD ja PG mutatsioonidega replikaasid seonduda halvemini replikoni genoomi negatiivse polaarsusega koopia 3' otsale (replikoni genoomi promooter) kui subgenoomsele

promooterile. See seletaks nende mutantide omadust sünteesida täispika replikoni RNA suhtes palju rohkem subgenoomset RNA-d kui wt replikoni.

Kokkuvõtlikult võib öelda, et pole selge, milliste mehhanismide häirimine põhjustab NLS-mutantide ja PG mutatsiooniga replikaaside vähenenud võime paljundada viiruse RNA-d. Seejuures on võimalik, et NLS-mutantide ja PG mutandi puhul võivad põhjused olla ka erinevad: PG mutandi puhul võib probleemiks olla näiteks liiga suure koguse nsP2 valgu lokaliseerumine tuuma, mistõttu ei jätku tsütoplasmas piisavalt nsP2 valku replikaaside jaoks. Sellest lähtuvalt oleks käesoleva uurimustöö huvipakkuvaks jätkuks käsitletud mutantide replikaaside stabiilsuse analüüsimine ning mutantsete nsP2 valkude RNA-sidumise võime uurimine ja proteaase aktiivsuse kvantifitseerimine.

Käesolevast uurimustööst võib teha ka mitmeid oletusi uuritud mutantide tsütotoksilisust mõjutavate omaduste kohta. Esiteks kinnitati seost SFV mutantide (RDD ja PG) vähetsütotoksilise fenotüübi (joonised 8 ja 9) ning viiruse RNA madalatasemelise akumulatsioonivõime vahel (joonised 11A ja 11B), mida on varem kirjeldatud ka kirjanduses (Frolov *et al.*, 1999; Sawicki *et al.*, 2006). Siit võib järeldada, et üheks põhjuseks mittetsütotoksiliste SFV replikonide fenotüübi tekkimisel on madalatasemeline viiruse RNA kontsentratsioon rakkudes, tänu millele ei käivitata PKR-lt lähtuvat rada, mistõttu omakorda ei blokeerita ka raku valgusünteesi ja ei käivitata apoptootilisi signaale. On selge, et RDD ja PG mutantide puhul see nii peab olema, sest nende mutantidega nakatatud rakkudes translatsiooni mahasurumist (ja seega ka PKR aktivatsiooni) ei toimu. Kuna aga on näidatud, et PKR-lt lähtuv rada ei ole alfaviirustega nakatatud rakkudes ainus ja isegi mitte peamine (Gorchakov *et al.*, 2004, Ventoso *et al.*, 2006), siis peab osa mittetsütotoksilisuse põhjuseid peituma ka mujal.

Üheks võimaluseks on SFV mõne mittestruktuurse valgu võimetus mingi tsütoplasmas paikneva rakupoolse faktoriga interakteeruda, mistõttu ei käivitata tsütotoksilisusega kulmineeruvaid signaale. See omakorda võiks olla tingitud mittestruktuursete valkude madalast kontsentratsioonist rakkudes, mutantse nsP2 valgu muutunud konformatsioonist või PG mutandi puhul ka nsP2 valgu peamiselt tuumsest lokaliseerumisest. Mittetsütotoksiliste RDD ja PG mutatsioonidega replikonide korral toimub tõenäoliselt võrreldes wt replikoniga aeglasem viiruse mittestruktuursete valkude süntees, sest vastavaid valke kodeerivate viiruse genoomsete RNA-de kontsentratsioon on raku madalam kui wt replikonidega nakatatud rakkudes. Kuna aga raku translatsiooni blokeerimist ei toimu, on võimaldatud ka pikemaajsem mittestruktuursete valkude ekspresseerumine. Vähemalt 24. tunniks peale

transfektsiooni jõuab nende mutantide korral mittestruktuursete valkude kontsentratsioon rakus wt replikoniga transfekteeritud rakkudes oleva kontsentratsiooniga sarnasele tasemele (joonis 7D). Seega ei ole mittetsütotoksilise fenotüübi tekitajaks madal viirus-spetsiifiliste mittestruktuursete valkude hulk rakus. On aga võimalik, et mutantse, mittetsütotoksilist fenotüüpi põhjustava nsP2 valgu võime interakteerumine rakupoolsete faktoritega (näiteks ribosoomi valkudega) on võrreldes wt nsP2-ga muutunud valgu uue konformatsiooni ja/või asendatud aminohappejääkide keemiliste omaduste tõttu. Kirjanduses on näidatud, et VEEV nsP2 valk interakteerub ribosoomi valgu RpS6-ga (Montgomery *et al.*, 2006), mis on oluline apoptootilise valgusünteesi mahasurumise tekitamisel (Bushell *et al.*, 2004, ja viited selles; Holcik ja Sonenberg, 2005, ja viited selles). Edaspidise töö käigus oleks huvitav uurida, kas ka SFV nsP2 valk moodustab sama interaktsiooni ja kas antud töös uuritud mutantsetel nsP2 valkudel on selle interaktsiooni moodustamises puudusi.

On huvipakkuv märkida, et kuna kõrgeist mittestruktuursete valkude kontsentratsioonist hoolimata ei toimu PG ja RDD mutantide korral rakkudes olulist viiruse RNA akumulierumist, siis leiab kaudset kinnitust eelpool püstitatud hüpotees, et nsP2 valgu NLS-mutandid ja PG mutant põhjustavad viiruse replikaasi funktsioonide häirimist.

Kuna eelkatsetest oli teada, et RDD mutatsiooniga replikon toodab madalal tasemel VLP-sid, siis oli käesoleva töö üheks eesmärgiks ka SFV VLP-tootlikkust mõjutavate faktorite välja selgitamine. Käesolevas uurimustöös kinnitati RDD ja avastati PG mutatsioonidega replikonide hälbunud VLP-tootmise võime ning leiti, et sellel fenomenil on mitu põhjust. Esiteks, RDD ja PG mutatsioonidega replikonide võime toota rakkudes replikonide genomset RNA-d on häiritud ja seetõttu ei ole viiruse RNA rakkudes piisavas kontsentratsioonis, et seda efektiivselt VLP-desse pakkida. Teiseks, nende mutatsioonide korral paljundatakse ja transkribeeritakse *in trans* asuvat helper-RNA-d palju madalama efektiivsusega kui wt replikoni korral. Kolmandaks, SFV translatsiooniline enhaanser avaldab nende mutantide puhul temale järgnevate valkude sünteesil negatiivset mõju. Kuna VLP-de tootmise katses oli struktuurset valke kodeeriv RNA (Helper1) transfekteeritud rakku replikoni RNA-st eraldi molekulina ja kuna kapsiidivalgu kodeeriva järjestuse alguses asub translatsiooniline enhaanser, on loogiline, et RDD ja PG mutatsioonidega replikonide korral on rakusisene struktuursete valkude kontsentratsioon väga madal ja VLP moodustumine seetõttu väga keeruline.

Madal VLP-tootlikkus teeb SFV replikonidega töötamise keeruliseks, kuna suure hulga rakkude nakatamine muutub peaaegu võimatuks. Sellepärast sooviti teada saada, kas

mittetsütotoksilist fenotüüpi tagavate mutatsioonide introductseerimine täispika viiruse genoomi põhjustab mittetsütotoksiliste viiruste tekke, kuna viirust on lihtsam paljundada. Selle katse tulemused näitasid aga, et juba esimene viiruse põlvkond põhjustab peremeesrakkude translatsiooni blokeerimise (joonis 13B). Selle nähtuse põhjused jäävad mõnevõrra ebaselgeks, aga võib arvata, et tegemist on ilmselt kompensatoorsete mutatsioonide kogunemisega viiruste genoomi. See on loogiline, kuna me välistasime struktuursete valkude ekspresioonist ja viiruse seondumisest tulenevad efektid. RNA-genoomsete viiruste genoomidesse kiiresti kuhjuvad mutatsioonid on tüüpiline nähtus, kuna RNA-sõltuv RNA-polümeraas on *proofreading* aktiivsusetu. Kui RDD või PG mutatsioonidega viiruste genoomi tekivad juhuslikult mutatsioonid, mis võimaldavad kõrgemasemelist RNA replikatsiooni ja struktuursete valkude sünteesi, siis saavutab see uudne viirus kiiresti ülekaalu originaalse viiruse suhtes. Võib arvata, et kompensatoorsed mutatsioonid tekivad vaid vähestes rakkudes ja seetõttu pole viiruste genoomidega transfekteeritud rakkudes translatsiooni blokeerimist (ja kõrgemasemelist viiruse struktuursete valkude tootmist) metaboolse märgistamise meetodil märgata. Vabanenud virionidest sisaldab tõenäoliselt suhteliselt suur hulk kompensatoorseid mutatsioone sisaldavaid genome ja seetõttu võib selle viiruse stokiga nakatatud uutes rakkudes täheldada tsütotoksilisema efekti olemasolu. Märkimisväärne on, et PG mutatsiooniga SFV-le analoogiline Sindbise viiruse mutant SIN/G viirus on nakatatud rakkudele mittetsütotoksiline (Frolov *et al.*, 1999). Põhjuseks, miks SIN/G viirusel ei teki kompensatoorseid mutatsioone, mis tema fenotüüpi nii drastiliselt mõjutaks kui SFV4-RDD ja SFV4-PG mutandid, on tõenäoliselt originaalse SIN/G viiruse piisavalt efektiivne replikatsioon ja struktuursete valkude tootmine, mistõttu potentsiaalsed kompensatoorsed mutatsioonid ei tooks nii suurt eelist kui SFV4-RDD ja -PG viiruste korral.

Publitseeritud kirjanduses puuduvad viited sellele, et varem oleks täheldatud SFV mittetsütotoksiliste mutantide mõju rakutsüklile. Veelgi enam, on eraldatud SFV mutantseid replikone, mis tagasid BHK-21 rakkudes persistentse infektsiooni rakkude jagunemisvõime säilimisega (Perri *et al.*, 2000). Käesoleva uurimustöö tulemustest (joonis 10) võib aga näha, et sarnaselt wt SFV replikonile põhjustavad ka mittetsütotoksilised RDD ja PG mutatsioone sisaldavad replikonid rakutsükli kaldumist G1/G0 faasi suunas. Tulemus on loogiline, kuna just G1/G0 faasis toimub enamuse raku valgusünteesist ja seega võimaldavad selles rakutsükli etapis olevad rakud kõige kiiremat viiruse paljunemist. Siiski on intrigeeriv, et ülimaldala tsütotoksilisusega RDD ja PG replikonid sellist nähtust põhjustavad ja erinevad selle omaduse

poolest ülalmainitud persistentset infektsiooni tagavatest mittetsütotoksilistest SFV replikoni mutantidest. On tähelepanuväärne, et ka persistentset infektsiooni tagavad mutatsioonid kaardistati nsP2 valku kodeerivasse regiooni, nendest üks vaid viie aminohappejäägi kaugusele PG mutatsiooni asukohast.

Käesoleva uurimustöö üheks huvipakkuvaks tulemuseks oli PG mutandi mitmete erineva pikkusega spontaansete deletsioonide identifitseerimine nakatatud rakkudest eraldatud viiruse RNA-s. Sellised deletsioonid paiknesid replikoni 3' otsa lähedal (skeem on kujutatud joonisel 12). Osade selliste deletsioonide puhul olid eemaldatud viiruse replikonile mittevajalikud järjestused, kuid üllataval kombel hõlmavad mitmed nendest deletsioonid ka nsP4 valku kodeeriva ala lõppu ning ühtlasi ka RNA-polümeraasse aktiivsuse eest vastutavat GDD motiivi. Seetõttu on selge, et sellistelt RNA-delt sünteesitavad SFV mittestruktuursed valgud ei saa käituda funktsionaalse replikaasina. Need RNA-d saavad paljuneda vaid siis, kui neid replitseerib *in trans* terviklik replikaas või peavad nendelt toodetavad replikaasid selleks „laenama“ nsP4 valgu samas rakus sünteesitavatelt terviklikelt replikaasidelt (juhul, kui rakus leidub ka replikone, mille nsP4 valku kodeeriv osa ei ole deleteerunud). Kuna PG mutatsiooniga replikaaside *in trans* aktiivsus on häirunud, siis on tõenäolisem „laenamise“ mehhanism. Seega kujutavad sellised replikonid endast defektseid interfereeruvaid genome. Uudsed replikonid, mille deletsioonid hõlmavad vaid 3' mittetransleeritava ala replikatsiooniks mittevajalikke järjestusi, replitseeruvad aga rakkudes tõenäoliselt iseseisvalt, kuna replikaasi kodeeriv ala on neil terviklik. Samuti võib oletada, et need replikonid paljunevad algsest SFV-PG replikonist kiiremini, kuna need on „mittevajaliku“ regiooni võrra lühemad. Kirjanduses on kirjeldatud vähese tsütotoksilisusega SFV2C mutant, mille mutatsioon asub SFV-PG mutatsioonile väga lähedal ning mille puhul täheldati samuti *Northern blot* analüüsil replikonist veidi kiiremini migreeruvast RNA-tüübist tekkivat signaali (Perri *et al.*, 2000). Tõenäoliselt tekivad ka selle mutandi puhul rakkudes spontaansed deletsioonid. Kuidas põhjustavad PG ja 2C mutatsioonid RNA deletsioonide teket, jääb esialgu selgusetuks.

## **Kokkuvõte**

Semliki Forest viirus (SFV) kuulub juba pikemat aega enimuuritud mudelviiruste hulka, seda eelkõige oma lihtsuse ja kõrge bio-ohutuse tõttu. Kuna SFV nakatab väga erinevaid rakutüüpe, on temal baseeruvaid vektoreid võimalik kasutada transgeeni efektiivseks ekspresseerimiseks erinevates peremeesrakkudes näiteks geeniteraapias või SFV-l põhinevate konstruktide kasutamisel geenivaktsiini kandjatena. Sõltuvalt soovitud eesmärgist võib negatiivseks küljeks olla nii SFV kui ka tema replikonide poolt põhjustatud raku metabolismi mahasurumine ning apoptoosi või nekroosi esilekutsumine. Kuigi SFV infektsiooni kohta on tänapäevaks juba üpris palju teada, on siiski mitmed SFV ja peremeesraku interaktsioone puudutavad küsimused suurel määral ebaselged.

Kirjanduses on näidatud seost SFV mittestruktuurse valgu nsP2 ja tsütotoksilisuse tekitamise vahel. Ühtlasi on teada, et nsP2 valgust lokaliseerub ligikaudu 50 % tuuma, mistõttu on oletatud, et SFV poolt põhjustatud tsütotoksilisus võib olla tingitud nsP2 valgu interaktsioonidest tuumas asuvate rakupoolsete faktoritega. Seetõttu oli käesoleva uurimustöö üheks eesmärgiks uurida SFV poolt peremeesrakus põhjustatud tsütotoksilise efekti seost viiruse mittestruktuurse valgu nsP2 rakusisese lokalisatsiooniga. Selleks sooritati katsed SFV mutantsete replikonide ja viirustega, mis omasid mutatsioone nsP2 valgu tuumalokalisatsioonisignaali järjestuses ja mille nsP2 valgu rakusisene lokalisatsioon oli tunduvalt erinev metsik-tüüpi nsP2 lokalisatsioonist, kirjeldamaks nende konstruktide fenotüüpe. Kuna eelkatsetest oli teada, et ühe replikoni võime toota viiruslaadseid partikleid (VLP-sid) oli häiritud, sooviti kindlaks teha ka selle nähtuse põhjused. Kuna mitmed uuritavatest replikonidest omasid temperatuuritundlikku fenotüüpi, sooritati katsed 28 °C juures. Katsetes kasutati mittetsütotoksilise replikoni ja viiruse kontrollina PG mutatsiooniga konstrukte, mis olid disainitud Sindbise viiruse mittetsütotoksilise SIN/G mutandi järgi.

Uurimustöö käigus saadud tulemused näitasid, et mitmed konstrueeritud mutantsetest replikonidest (PG, RDD, DDR ja  $\Delta\Delta R$  mutatsioonidega) omavad erineval määral vähenenud tsütotoksilisusega fenotüüpe ning et üks (DDD mutatsiooniga) ei ole võimeline replitseeruma ka 28 °C juures. Mingit seost nsP2 valgu rakusisese lokalisatsiooni ja tsütotoksilisuse vahel aga ei täheldatud. Kuna väga mitmed nsP2 valgu tuumalokalisatsioonisignaali mutantidest osutusid kas replitseerumisvõimetuteks või omasid temperatuuritundlikku fenotüüpi, võib

oletada, et antud signaalile vastav valgu motiiv on tõenäoliselt oluline nsP2 valgu funktsioneerimiseks viiruse replikaasi koosseisus. Kaudselt tõestab seda oletust ka vastavate RNA-de madal replikatsioonitase.

Huvitaval kombel ei täheldatud mittetsütotoksiliste mutantide mittestruktuursete valkude madalamat ekspressiooni võrreldes metsik-tüüpi replikoniga. Samuti leiti, et ka mittetsütotoksilised SFV replikonid tekitavad peremeesraku rakutsükli nihkumist G1/G0 faasi suunas metsik-tüüpi replikoniga sarnasel tasemel. Seevastu näidati aga, et vähenenud tsütotoksilisus korreleerub positiivselt madalatasemelise viiruse RNA akumulatsiooniga ja vähenenud VLP-de tootlikkusega. Tõenäoliselt on hääbinud VLP-de tootmine tingitud replikoni genoomide madalast kontsentratsioonist rakkudes ja struktuursete valkude madalatasemelisest ekspressioonist, kuna mutandid, mis ei suru maha rakuspetsiifilist translatsiooni, ekspresseerivad *in trans* raku viidud RNA-del paiknevaid geene väga madalal tasemel. Samuti avaldab SFV translatsiooniline enhaanser raku valgusünteesi toimimise korral temale järgnevate geenide transleerimisele negatiivset mõju.

Katsetest selgus veel, et mittetsütotoksilisuse eest vastutavate mutatsioonide viimisel viiruse genoomi saadakse transfekteeritud rakkudest juba esimeses põlvkonnas tsütotoksiliste omadustega viirused. See fenomen on tõenäoliselt tingitud viiruse genoomi kiiresti kogunevatest kompensatoorsetest mutatsioonidest, mis taastavad metsik-tüüpi SFV-ga sarnase fenotüübi. Meie andmed lubavad oletada, et selliste mutatsioonide kiiret kogunemist ja selektsiooni tingib originaalset mutatsiooni sisaldavate RNA-de madal replikatsioonitase ja/või struktuursete valkude ekspresseerimist.

# **Phenotypes of Semliki Forest Virus Mutants Harboring Mutations in the Nuclear Localization Signal of the Non-structural Protein NsP2**

Kristi Tamm

## **Summary**

Semliki Forest virus (SFV, genus Alphavirus), is one of the most thoroughly investigated viruses, mainly due to its simplicity and a high bio-safety level. SFV can infect very many different cell types; therefore the vectors based on SFV can be used for efficient expression of a transgene in different host cell types: a property useful for example for gene therapy or vaccine development. Depending on the desired goal, the drawbacks of the alphavirus-based vectors can be the blocking of cell metabolism and induction of apoptosis or necrosis. Although much is known about the life cycle of SFV, the molecular bases of the interactions between the virus and the host cell remain to be mostly uncovered.

It has been shown in the literature that the viral non-structural protein nsP2 is involved in the causation of the cytotoxic effects. Additionally, it is known that approximately 50 % of the nsP2 protein is localized in the cell nucleus. Due to this, it has been proposed that the cytotoxic phenotype of SFV may be caused by interactions between nsP2 and some nuclear factors of the cell. Therefore, one of the aims of this study was to investigate the connection between the nuclear localization of nsP2 and cytotoxic effect caused by SFV. To achieve this, the experiments were made to characterize the phenotypes of mutant SFV and SFV-based replicons which contained mutations in the nuclear localization signal (NLS) of the nsP2 protein and possessed cellular distribution of nsP2 that was significantly different from the wild type nsP2. Since it was also known from preliminary results that at least one mutant replicon had an impaired ability to produce virus-like particles (VLP-s), one of the aims of this study was also to discover the reasons behind this phenomenon. The experiments were made at 28 °C, because many mutants analyzed in this work had a temperature sensitive phenotype. SFV PG mutant, which was constructed according to the Sindbis virus mutant SIN/G, was used as a control of the noncytotoxic replicon and virus.

The results of this study revealed, that many novel mutant replicons (with PG, RDD, DDR and  $\Delta\Delta R$  mutations) have phenotypes with decreased cytotoxicity and that one (with DDD mutation) is not capable of replication even at 28 °C. At the same time, no correlation between the intracellular localization of the nsP2 and replicon-inflicted cytotoxicity was observed. However, it can still be concluded from the results obtained in this study, that the NLS sequence of the nsP2 is most probably important for the correct functioning of the nsP2 as a subunit of the viral replicase complex, because many NLS-mutants had a replication-impaired or temperature sensitive phenotype. This hypothesis is indirectly confirmed by the low replication rate of the corresponding RNA-s.

Curiously, in the case of the noncytotoxic replicons, no decrease in the level of the expression of the non-structural proteins compared to that of the wild type replicon was observed. It was also found that even the noncytotoxic SFV replicons cause the shift of the host cell cycle towards G1/G0 phase similarly to the wild type replicon. Nevertheless, a clear correlation between decreased cytotoxicity and impaired ability to replicate viral RNA and produce VLP-s was found. The latter effect is most probably caused by low levels of the replicon RNA and viral structural proteins inside the infected cells.

It was also found that if the mutations responsible for the noncytotoxic phenotype of the SFV replicons were introduced into the viral genomes, viruses with cytotoxic properties were produced. This phenomenon is probably caused by the compensatory mutations accumulating in the viral genomes which regenerate the wild type-like phenotype of the virus. Our results indicate that the gathering of these compensatory mutations is most likely caused by the low level of RNA replication and defects in the expression of structural proteins by the original mutant virus.

## **Kasutatud kirjandus**

**Agapov, E. V., I. Frolov, B. D. Lindenbach, B. M. Prágai, S. Schlesinger, C. M. Rice.** 1998. Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:12989-94.

**Ahola, T., A. Lampio, P. Auvinen, L. Kääriäinen.** 1999. Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *EMBO. J.* 18: 3164-72.

**Ahola, T., L. Kääriäinen.** 1995. Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 507-11.

**Atkins, G. J., B. J. Sheahan, P. Liljeström.** 1999. The molecular pathogenesis of Semliki Forest virus: a model virus made useful. *J. Gen. Virol.* 80: 2287-2297.

**Brzeski, H., S. I. T. Kennedy.** 1977. Synthesis of alphavirus-specified RNA. *J. Virol.* 25: 630-40.

**Bushell, M., M. Stoneley, P. Sarnow, A. E. Willis.** 2004. Translation inhibition during the induction of apoptosis: RNA or protein degradation? *Biochem Soc Trans.* 32: 606-10.

**Charrel, R. N., X. de Lamballerie, D. Raoult.** 2007. Chikungunya outbreaks--the globalization of vectorborne diseases. *N. Engl. J. Med.* 356: 769-71.

**Fazakerley, J. K., A. Boyd, M. L. Mikkola, L. Kääriäinen.** 2002. A single amino acid change in the nuclear localization sequene of the nsP2 protein affects the neurovirulence of Semliki Forest virus. *J. Virol.* 76: 392-6.

**Frolov, I.** 2004. Persistent infection and suppression of host response by alphaviruses. *Arch Virol Suppl.* 18: 139-47.

**Frolov, I., E. Agapov, T. A. Hoffman, Jr, B. M. Pragai, M. Lippa, S. Schlesinger, C. M. Rice.** 1999. Selection of RNA replicons capable of persistent noncytopathic replication in mammalian cells. *J. Virol.* 73: 3854-65.

**Frolov, I., S. Schlesinger.** 1996. Translation of Sindbis virus mRNA: analysis of sequences downstream of the initiating AUG codon that enhance translation. *J. Virol.* 70: 1182-90.

**Frolov, I., S. Schlesinger.** 1994. Comparison of the effects of Sindbis virus and Sindbis virus replicons on host cell protein synthesis and cytopathogenicity in BHK cells. *J. Virol.* 68: 1721-27.

**Frolova, E. I., R. Z. Fayzulin, S. H. Cook, D. E. Griffin, C. M. Rice, I. Frolov.** 2002. Roles of nonstructural protein nsP2 and Alpha/Beta interferons in determining the outcome of Sindbis virus infection. *J. Virol.* 76: 11254-64.

**Garcia, M. A., J. Gil, I. Ventoso, S. Guerra, E. Domingo, C. Rivas, M. Esteban.** 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 1032-60.

**Garmashova, N., R. Gorchakov, E. Volkova, S. Paessler, E. Frolova, I. Frolov.** 2007. The Old World and New World alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. *J. Virol.* 81: 2472-84.

**Glanville, N., M. Ranki, J. Morser, L. Kääriäinen, A. E. Smith.** 1976. Initiation of translation directed by 42S and 26S RNAs from Semliki Forest virus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 3059-63.

**Glasgow, G. M., M. M. McGee, B. J. Sheahan, G. J. Atkins.** 1997. Death mechanisms in cultured cells infected by Semliki Forest virus. *J Gen Virol.* 78: 1559-63.

**Gomez de Cedron, M, N. Ehsani, M. L. Mikkola, J. A. Garcia, L. Kääriäinen.** 1999. RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. *FEBS Lett.* 448: 19-22.

**Gorchakov, R., E. Frolova, I. Frolov.** 2005. Inhibition of transcription and translation in Sindbis virus-infected cells. *J. Virol.* 79: 9397-409.

**Gorchakov, R., E. Frolova, B. R. Williams, C. M. Rice, I. Frolov.** 2004. PKR-dependent and -independent mechanisms are involved in translational shutoff during Sindbis virus infection. *J. Virol.* 78: 8455-67.

**Helenius, A., B. Morein, E. Fries, K. Simons, P. Robinson, V. Schirmacher, C. Terhorst, J. L. Strominger.** 1978. Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2K and H-2D) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki Forest virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 3846-50.

**Holcik, M., N. Sonenberg.** 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6: 318-27.

**Houge, G., B. Robaye, T. S. Eikhom, J. Golstein, G. Mellgren, B. T. Gjertsen, M. Lanotte, S. O. Doskeland.** 1995. Fine mapping of 28S rRNA sites specifically cleaved in cells undergoing apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2051-62.

**Keränen, S., L. Kääriäinen.** 1974. Isolation and basic characterization of temperature sensitive mutants from Semliki Forest virus. *Acta path. Microbiol. Scand. Sect.B.* 82: 810-20.

**Kim, K. H., T. Rümenapf, E. G. Strauss, J. H. Strauss.** 2004. Regulation of Semliki Forest Virus RNA replication: a model for the control of alphavirus pathogenesis in invertebrate hosts. *Virology.* 323: 153-163.

**King, K. L., C. M. Jewell, C. D. Bortner, J. A. Cidlowski.** 2000. 28S ribosome degradation in lymphoid cell apoptosis: evidence for caspase and Bcl-2-dependent and -independent pathways. *Cell. Death. Differ.* 7: 994-1001.

**Kujala, P., A. Ikäheimonen, N. Ehsani, H. Vihinen, P. Auvinen, L. Kääriäinen.** 2001. Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. *J. Virol.* 75: 3873-84.

**Liljeström, P., H. Garoff.** 1991. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology.* 12:1356-61.

**Liljeström, P., S. Lusa, D. Huylebroeck, H. Garoff.** 1991. In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest virus: the small 6,000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. *J. Virol.* 65: 4107-13.

**Lulla, V., A. Merits, P. Sarin, L. Kääriäinen, S. Keränen, T. Ahola.** 2006. Identification of mutations causing temperature-sensitive defects in Semliki Forest virus RNA synthesis. *J. Virol.* 80: 3108-11.

**Lundström, K., A. Abenavoli, A. Malgaroli, M. U. Ehrengruber.** 2003. Novel Semliki Forest virus vectors with reduced cytotoxicity and temperature sensitivity for long-term enhancement of transgene expression. *Mol. Therapy.* 7: 202-09.

**Lundström, K., C. Schweitzer, D. Rotmann, D. Hermann, E. M. Schneider, M. U. Ehrengruber.** 2001 (A). Semliki Forest virus vectors: efficient vehicles for in vitro and in vivo gene delivery. *FEBS Lett.* 504: 99-103.

**Lundström, K., D. Rotmann, D. Hermann, E. M. Schneider, M. U. Ehrengruber.** 2001 (B). Novel mutant Semliki Forest virus vectors: gene expression and localization studies in neuronal cells. *Mol. Therapy.* 7: 202-9.

**McInerney, G. M., N. L. Kedersha, R. J. Kaufman, P. Anderson, P. Liljeström.** 2005. Importance of eIF2 $\alpha$  phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation. *Mol. Biol. Cell.* 16: 3753-63.

**McInerney, G. M., J. M. Smit, P. Liljeström, J. Wilschut.** 2004. Semliki Forest virus produced in the absence of the 6K protein has an altered spike structure as revealed by decreased membrane fusion capacity. *Virology.* 325: 200-06.

- Merits, A., L. Vasiljeva, T. Ahola, L. Kääriäinen, P. Auvinen.** 2001. Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein by nsP2 protease. *J. Gen. Virol.* 82: 765-73.
- Montgomery, S. A., P. Berglund, C. W. Beard, R. E. Johnston.** 2006. Ribosomal protein S6 associates with alphavirus nonstructural protein 2 and mediates expression from alphavirus messages. *J. Virol.* 80: 7729-39.
- Nadano, D., T. A. Sato.** 2000. Caspase-3-dependent and -independent degradation of 28 S ribosomal RNA may be involved in the inhibition of protein synthesis during apoptosis initiated by death receptor engagement. *J. Biol. Chem.* 275: 13967-73.
- Nieva, J. L., M. A. Sanz, L. Carrasco.** 2004. Membrane-permeabilizing motif in Semliki forest virus E1 glycoprotein. *FEBS Lett.* 576: 417-22.
- Pahl, H. L.** 1999. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. *Physiol Rev.* 79: 683-701.
- Perri, S., D. A. Driver, J. P. Gardner, S. Sherrill, B. A. Belli, T. W. Dubensky, Jr., J. M. Polo.** 2000. Replicon vectors derived from Sindbis virus and Semliki forest virus that establish persistent replication in host cells. *J. Virol.* 74: 9802-07.
- Peränen, J., L. Kääriäinen.** 1991. Biogenesis of type I cytopathic vacuoles in Semliki Forest virus-infected BHK cells. *J. Virol.* 65: 1623-27.
- Peränen, J, M. Rikkonen, P. Liljeström, L. Kääriäinen.** 1990. Nuclear localization of Semliki Forest virus-specific nonstructural protein nsP2. *J. Virol.* 64: 1888-96.
- Peränen, J., K. Takkinen, N. Kalkkinen, L. Kääriäinen.** 1988. Semliki Forest virus-specific non-structural protein nsP3 is a phosphoprotein. *J Gen Virol.* 69: 2165-78.
- Rao, R. V., H. M. Ellerby, D. E. Bredesen.** 2004. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ.* 11: 372-80.
- Rikkonen, M.** 1996. Functional significance of the nuclear targeting and NTP-binding motifs of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Virology.* 218: 352-61.
- Rikkonen, M., J. Peränen, L. Kääriäinen.** 1994. ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *J. Virol.* 68: 5804-10.
- Rikkonen, M., J. Peränen, L. Kääriäinen.** 1992. Nuclear and nucleolar targeting signals of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Virology.* 189: 462-73.
- Russo, A. T., M. A. White, S. J. Watowich.** 2006. The crystal structure of the Venezuelan equine encephalitis alphavirus nsP2 protease. *Structure.* 14: 1449-58.

- Salonen**, A., L. Vasiljeva, A. Merits, J. Magden, E. Jokitalo, L. Kääriäinen. 2003. Properly folded nonstructural polyprotein directs the Semliki Forest virus replication complex to the endosomal compartment. *J. Virol.* 77: 1691-702.
- Sanz**, M. A., A. Castello, L. Carrasco. 2007. Viral translation is coupled to transcription in Sindbis virus-infected cells. *J. Virol.* *In press.*
- Saunders**, L., G. N. Barber. 2003. The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *FASEB J.* 17: 961-83.
- Sawicki**, D. L., S. Perri, J. M. Polo, S. G. Sawicki. 2006. Role for nsP2 proteins in the cessation of alphavirus minus-strand synthesis by host cells. *J. Virol.* 80: 360-71.
- Singh**, I., A. Helenius. 1992. Role of the ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *J. Virol.* 66: 7049-58.
- Smerdou**, C., P. Liljeström. 1999. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki forest virus particles. *J. Virol.* 73: 1092-8.
- Strauss**, J. H., E. G. Strauss. 1994. The Alphaviruses: gene expression, replication and evolution. *Microbiol. Rev.* 58(3): 491-562.
- Suopanki**, J., D. L. Sawicki, S. G. Sawicki, L. Kääriäinen. 1998. Regulation of alphavirus 26S mRNA transcription by replicase component nsP2. *J. Gen. Virol.* 79: 309-19.
- Žusinaite**, E., K. Tints, K. Kiiver, P. Spuul, L. Karo-Astover, A. Merits, I. Sarand. 2007. Mutations at the palmitoylation site of non-structural protein nsP1 of Semliki Forest virus attenuate virus replication and cause accumulation of compensatory mutations. *J. Gen. Virol.* *In press.*
- Vasiljeva**, L., A. Merits, A. Golubtsov, V. Sizemskaja, L. Kääriäinen, T. Ahola. 2003. Molecular mechanism for the sequential processing of alphavirus nonstructural polyprotein. *J. Biol. Chem.* 278: 41636-45.
- Vasiljeva**, L., L. Valmu, L. Kääriäinen, A. Merits. 2001. Site-specific protease activity of the carboxyl-terminal domain of Semliki Forest virus replicase protein nsP2. *J. Biol. Chem.* 276: 30786-93.
- Vasiljeva**, L., A. Merits, P. Auvinen, L. Kääriäinen. 2000. Identification of a novel function of the *Alphavirus* capping apparatus. *J. Biol. Chem.* 275: 17281-87.
- Ventoso**, I., M. A. Sanz, S. Molina, J. J. Berlanga, L. Carrasco, M. Esteban. 2006. Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes. Dev.* 20: 87-100.
- Wengler**, G., A. Koschinski, G. Wengler, F. Dreyer. 2003. Entry of alphaviruses at the plasma membrane converts the viral surface proteins into an ion-permeable pore that can

be detected by electrophysiological analyses of whole-cell membrane currents. *Gen. Virol.* 84: 173-81.

**White**, C. L., M. Thomson, N. J. Dimmock. 1998. Deletion analysis of a defective interfering Semliki Forest virus RNA genome defines a region in the nsP2 sequence that is required for efficient packaging of the genome into virus particles. *J Virol.* 72: 4320-6.

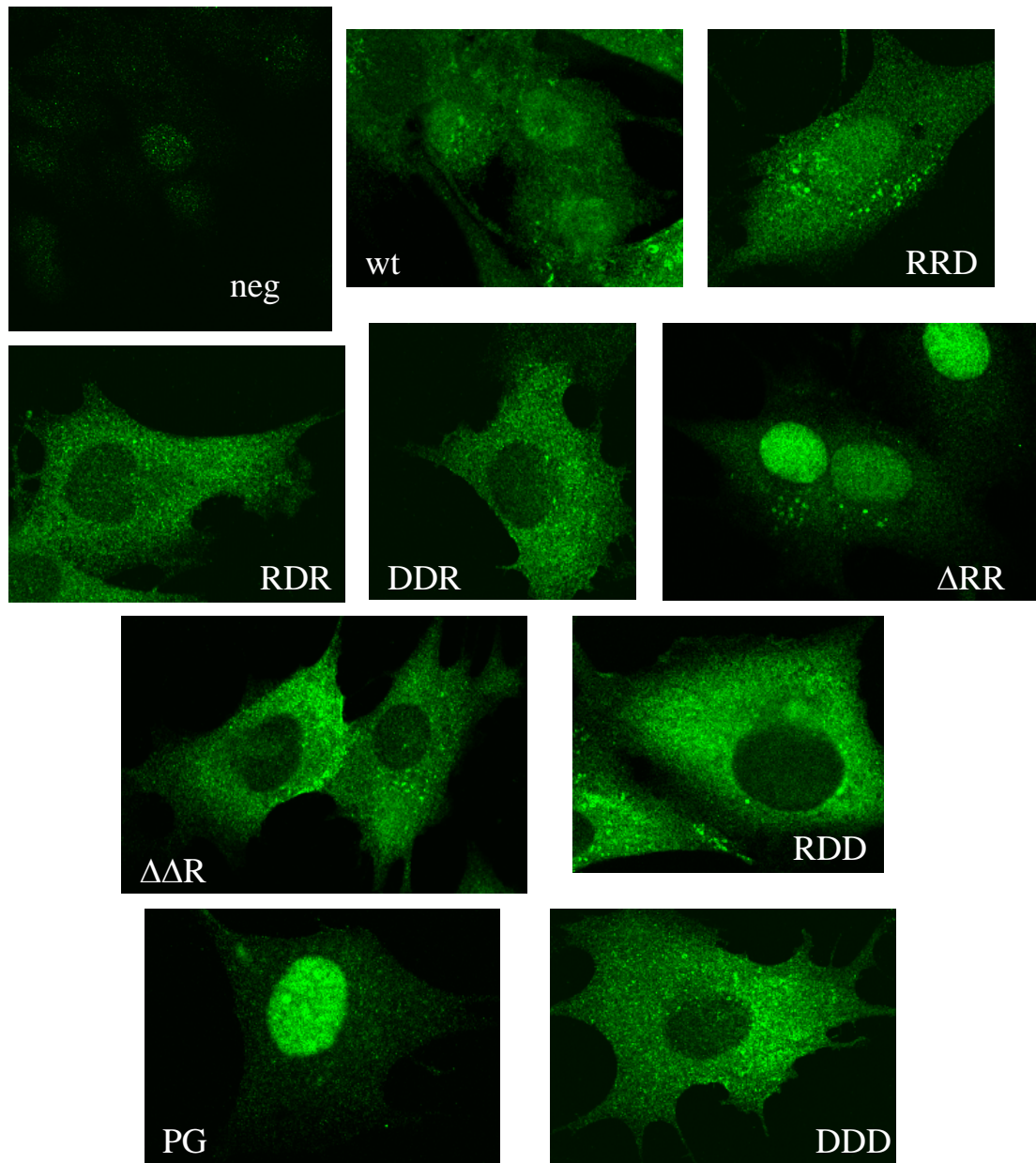
## **Kasutatud internetileheküljed**

MFOLD (3.1.2) programm:

<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>

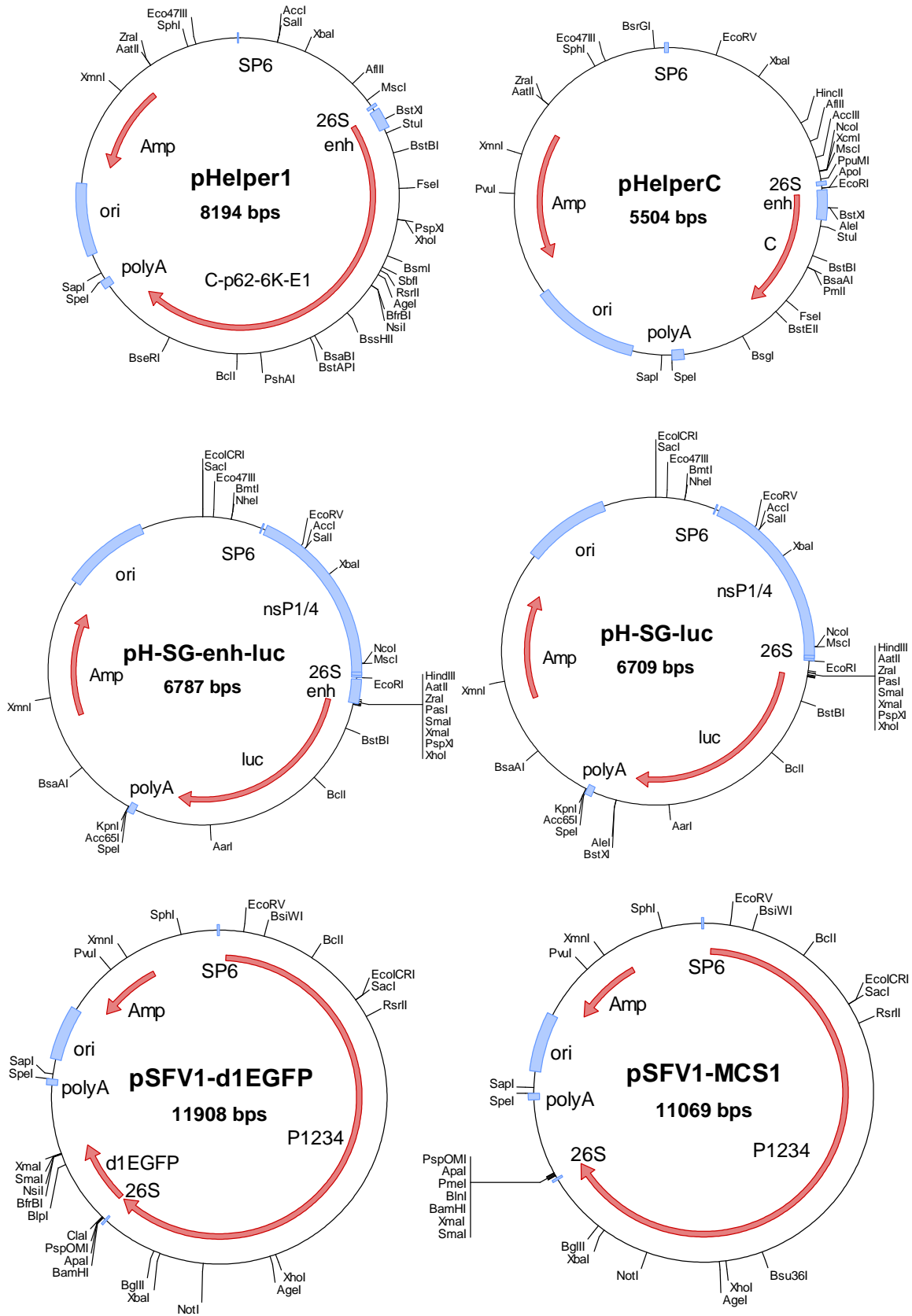
T-testi programm: <http://graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>

## Lisa 1

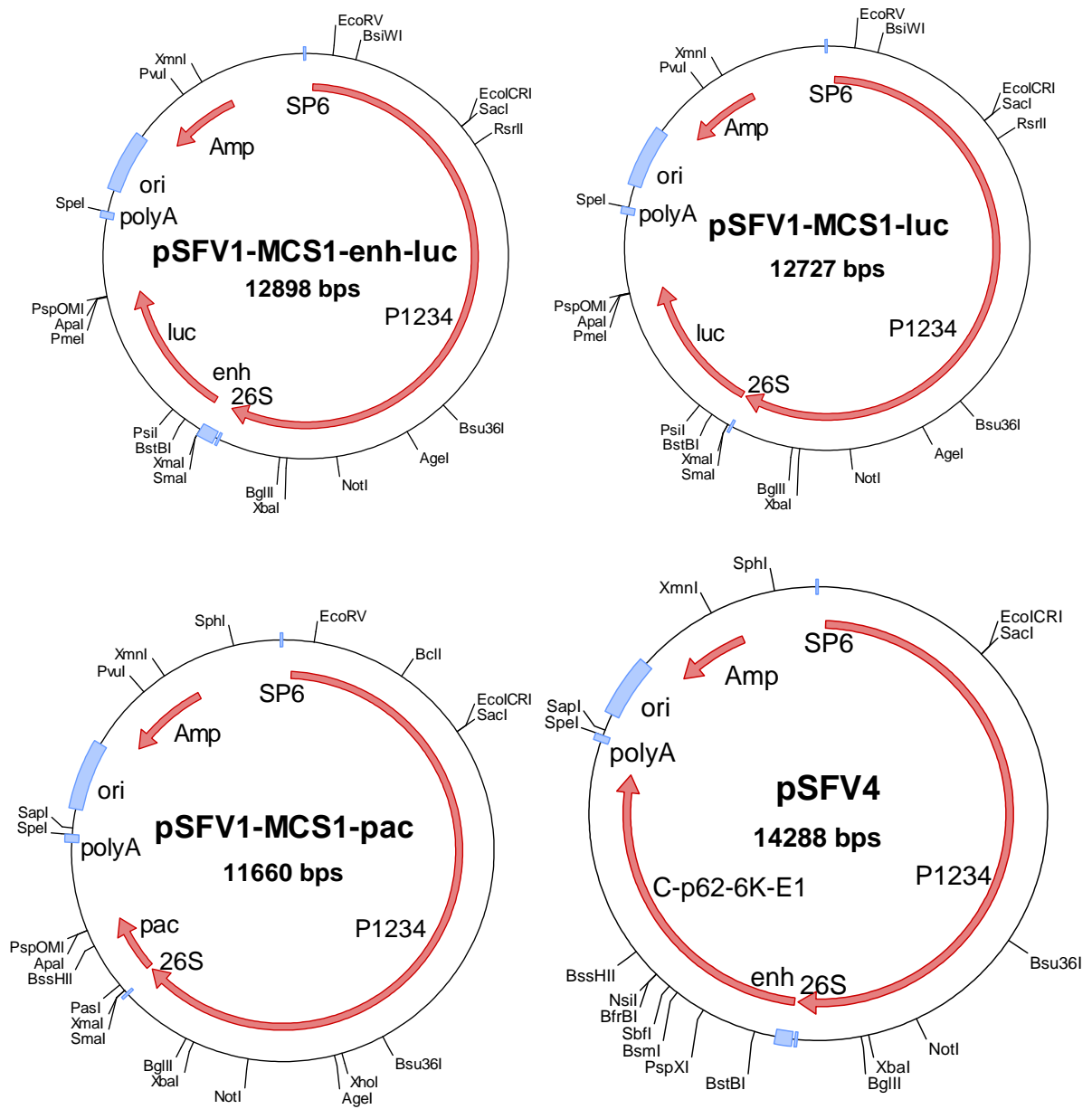


**Lisa 1. Töös kasutatud mutantsete nsP2 valkude lokalisatsioon rakus.** BHK-21 rakke nakatati SFV4 (joonisel "wt"), SFV4-RRD, SFV4-RDR, SFV4-DDR, SFV4-ΔRR, SFV4-ΔΔR, SFV4-RDD, SFV4-PG ja SFV4-DDD viirusega MOI 1 tingimustes. Rakke inkubeeriti 28 °C juures 8h, peale mida rakud fikseeriti ja permeabiliseeriti. Immunofluorestsentsanalüüsiks inkubeeriti rake nsP2 valgu vastase antikehaga ja sekundaarse antikehaga, mis oli konjugeeritud FITC-ga. Pildid on tehtud käesoleva töö autori ja doktor Inga Sarandi koostöös (avaldamata andmed).

# Lisa 2



## Lisa 2 (järg)



**Lisa 2. Töös kasutatud prototüüp-plasmiidide kaardid.** Kaardid on konstrueeritud programmiga “Clone Manager Professional Suite version 8” (“Sci Ed Software”).