

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

**Chikungunya viiruse *trans*-replikaasi süsteemi optimeerimine Aag2 ja C6/36 rakkudes  
ning Chikungunya viiruse ja Semliki Forest viiruse replikaaside võrdlus U2OS rakkudes**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Hele-Liis Aavasalu

Juhendaja MSc Kai Rausalu  
Kaasjuhendaja Prof. Andres Merits

TARTU 2017

## INFOLEHT

### **Chikungunya viiruse *trans*-replikaasi süsteemi optimeerimine Aag2 ja C6/36 rakkudes ning Chikungunya viiruse ja Semliki Forest viiruse replikaaside võrdlus U2OS rakkudes**

Hele-Liis Aavasalu

Chikungunya viirus on üheaheelalise RNA genoomiga alfaviirus, mis levib inimesele *Aedes aegypti* ja *Aedes albopictus* liiki sääskede kaudu. Alfaviiruste mittestruktuursete valkude uurimiseks imetajarakkudes kasutatakse *trans*-replikaasi süsteemi.

Käesolevas töös oli eesmärk kohaldada Chikungunya viiruse *trans*-replikatsiooni süsteemi putukarakkudes kasutamiseks ja võrrelda alfaviiruse replikaaside võimet replitseerida sama ning erineva alfaviiruse matriitse inimeserakkudes.

**Märksõnad:** alfaviirus, Chikungunya viirus, *trans*-replikaasi süsteem, sääserakud

**CERCS:** B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

### **Optimisation of Chikungunya virus *trans*-replication system for Aag2 and C6/36 cells and comparison of Chikungunya and Semliki Forest virus replicases in U2OS cells.**

Hele-Liis Aavasalu

Chikungunya virus is a single-stranded RNA alphavirus transmitted to humans by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Trans*-replication system has been previously used to study alphavirus non-structural proteins in mammalian cells.

The aim of this study was to adapt the *trans*-replication system to mosquito cells and to compare the ability of alphavirus replicases to express templates of the same or of a different alphavirus in human cells.

**Keywords:** alphavirus, Chikungunya virus, *trans*-replication system, mosquito cells

**CERCS:** B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

# SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1. Alfaviirused.....	7
1.2. Chikungunya viirus .....	7
1.3. CHIKV genoom .....	8
1.4. CHIKV mittestruktuursed valgud .....	10
1.4.1. nsP1.....	10
1.4.2. nsP2.....	11
1.4.3. nsP3.....	11
1.4.4. nsP4.....	12
1.5. CHIKV struktuursed valgud.....	12
1.5.1. Kapsiidivalk .....	12
1.1.1. E1, E2 ja E3 .....	13
1.1.2. 6K ja TF .....	13
1.2. Elutsükel.....	14
1.3. Chikungunya viiruse putukvektorid .....	14
1.4. <i>Trans</i> -replikaasi süsteem .....	15
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	17
2.1. Töö eesmärgid .....	17
2.2. Materjalid ja meetodika .....	18
2.2.1. Rakuliinid ja söötmed .....	18
2.2.2. Konstruktid .....	18
2.2.3. Rakkude transfekteeerimine .....	22
2.2.4. <i>Gaussia</i> ja jaanimardika lutsiferaasi ekspressiooni mõõtmine .....	23
2.2.5. <i>Western blot</i> .....	23
2.3. Tulemused .....	25
2.3.1. Replikaaside ekspressioon rakkudes.....	25
2.3.2. Erinevate CHIKV <i>trans</i> -replikaasi süsteemi replikaaside ja matriitside võrdlus sääserakkudes .....	26
2.3.3. SFV, CHIKV ECSA ja Car replikaaside võrdlus U2OS rakkudes.....	29
2.4. Arutelu.....	29

KOKKUVÕTE .....	31
SUMMARY .....	32
TÄNUSÕNAD .....	34
KIRJANDUSE LOETELU.....	35
LIHTLITSENTS.....	42

## KASUTATUD LÜHENDID

Car – CHIKV Kariibi mere tüvi (*Caribbean strain*)

cDNA – komplementaarne DNA (*complementary DNA*)

CHIKV – Chikungunya viirus (*Chikungunya virus*)

CMV – tsütomegaloviirus (*Cytomegalovirus*)

CSE – konserveerunud järjestuselement (*conserved sequence element*)

ECSA – CHIKV Ida/Kesk/Lõuna-Aafrika tüvi (*East/Central/South African strain*)

EEEV – Ida hobuseliste entsefaliidi viirus (*Eastern Equine Encephalitis virus*)

ER – endoplasmaatiline retiikulum

FCS – veise loote seerum (*fetal calf serum*)

Fluc – jaanimardika lutsiferaas (*firefly luciferase*)

Gluc – *Gaussia* lutsiferaas (*Gaussia luciferase*)

HRP – mädarõika peroksüdaas (*horseradish peroxidase*)

LAR II – lutsiferaasi testi reagent II (*Luciferase Assay Reagent II*)

nsP – mittestruktuurne valk (*nonstructural protein*)

ORF – avatud lugemisraam (*open reading frame*)

PBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus (*phosphate buffered saline*)

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

RLU – suhtelised valgusühikud (*relative light units*)

SAV – lõheliste alfaviirus (*Salmonide Alphavirus*)

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

TPB – trüptoos-fosfaat-puljong (*tryptose phosphate broth*)

UTR – mittetransleeritav ala (*untranslated region*)

VEEV – Venetsueela hobuseliste entsefaliidi viirus (*Venezuelan Equine Encephalitis virus*)

WT – metsiktüüpi, looduses esinev (*wild type*)

## SISSEJUHATUS

Alfaviirused on väikesed RNA genoomiga arboviirused. Neil on mitmeid erinevaid peremeesorganisme, paljud neist nakatavad ka inimesi.

Chikungunya viirus (CHIKV) on sääskede vahendusel leviv alfaviirus, mis põhjustab palavikku, löövet ja liigesepõletikku. Viimaste aastate jooksul on Chikungunya põhjustanud tõsiseid haiguspuhanguid India ookeani saartel ja suurendanud oma levikuala Mandri-Ameerikasse ning Kariibi mere piirkonda. Laialdasele levikule vaatamata pole CHIKV vastu siiani vaktsiini ega spetsiifilist ravimit. Sellepärast on väga oluline viiruspetsiifiliste protsesside põhjalikum uurimine.

CHIKV genoom kodeerib kuut struktuurset ja nelja mittestruktuurset valku. CHIKV mittestruktuurset valgud moodustavad replikatsiooni kompleksi, viivad läbi viiruspetsiifilisi protsesse ning osalevad raku immuunvastuse tekkimisel ja maha surumisel. Struktuurset valgud on vajalikud viirusosakese kokku panemiseks ja rakku sisenemiseks.

Alfaviiruste, seal hulgas CHIKV, mittestruktuursete valkude uurimiseks on välja töötatud *trans*-replikatsiooni süsteem. Siiani on seda kasutatud viiruse uurimiseks imetajarakkudes.

Selle töö eesmärk oli optimeerida CHIKV *trans*-replikatsiooni süsteemi putukarakkudes kasutamiseks, leida putukarakkudes (Aag2 ja C6/36) kasutamiseks kõige paremini sobivad matriitsid ja replikaasid ning võrrelda SFV-1 (Semliki Forest viirus, *Semliki Forest virus*) ja CHIKV-1 põhinevate replikaaside võimet replitseerida rakus samal ning erineval alfaviirusel põhinevaid matriitse.

Käesoleva töö eksperimentaalne osa teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Alfaviirused

Alfaviirused on arboviirused, mis kuuluvad sugukonda *Togaviridae* (Strauss ja Strauss, 1994). Enamik alfaviirustest kasutab levikuvektorina sääski, kuid leidub ka erandeid, näiteks kalalt-kalale leviv lõheliste alfaviirus (*Salmonide Alphavirus*, SAV) (Kongtorp *et al.*, 2010) ning Eilat viirus, mis nakatab ainult putukarakke (Nasar *et al.*, 2012). Alfaviirused jaotatakse levikuala järgi Vana ja Uue Maailma viirusteks. Vana Maailma viirused (näiteks Ross River, Barmah Forest, Mayaro, O'nyong-nyong, Semliki Forest, Chikungunya ja Sindbis viirus) põhjustavad artriiti, artralgiat ja palavikku, Uue Maailma viirused (näiteks Venetsueela hobuseliste entsefaliidi viirus (*Venezuelan Equine Encephalitis virus*, VEEV) ja Ida hobuseliste entsefaliidi viirus (*Eastern Equine Encephalitis virus*, EEEV)) entsefaliiti (Powers *et al.*, 2001; Strauss ja Strauss, 1994).

## 1.2. Chikungunya viirus

Chikungunya viirus avastati 1953. aastal Tansaaniast. Chikungunya nimi tuleb Bantu keelest ja tähendab „kõverasse tõmbama“ (*to bend up*) (Robinson, 1955). CHIKV, nagu enamik alfaviirustest levib oma selgroogsetele peremeestele, kelle hulka kuulub ka inimene, sääskede vahendusel. Sümptomid avalduvad tavaliselt umbes 3 päeva peale sääsehammustust, enamasti tekib kõrge palavik, peavalu, lööve, liigesevalu ning -põletik. Mõnel juhul võivad liigeseprobleemid püsida kuid või aastaid (Powers ja Logue, 2007). Umbes 3% – 28% CHIKV infektsioonidest on asümptomaatilised (Van Bortel *et al.*, 2014). Erandlikel juhtudel võib viirus põhjustada entsefaliiti, hepatiiti, meningiiti ja müokardiiti ning mõnikord lõppeda isegi patsiendi surmaga (Economopoulou *et al.*, 2009).

CHIKV vastu ei ole vaktsiini ega spetsiifilist ravimit. Ravi on sümptomaatiline ja keskendub palaviku ja valu vähendamisele ning vedelikupuuduse tekkimise vältimisele (Powers ja Logue, 2007).

Enne 2006. aastat levis CHIKV Aafrikas ja Aasias. 2006. aastal leidis La Reunioni saarel aset laiaulatuslik Chikungunya epideemia. Nakatusid ka mitmed sinna reisinud turistid, kes viisid

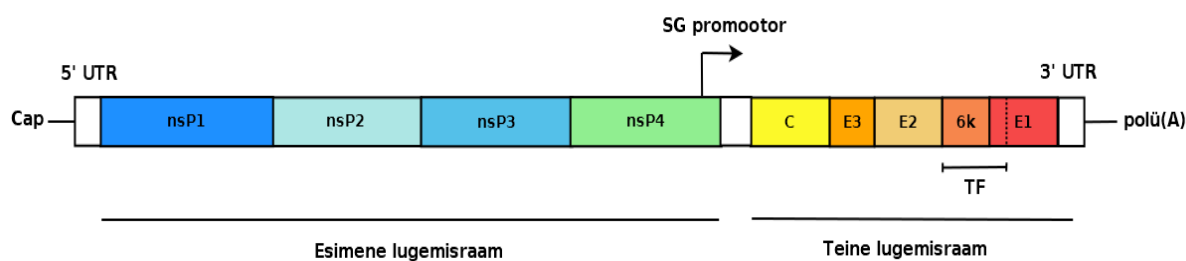
kodumaale naastes kaasa ka viiruse. Nüüdseks on CHIKV levinud Kariibi mere piirkonda ja Ameerika mandrile (Powers, 2015).

CHIKV koosneb ikosaeedrilisest nukleokapsiidist, mis on ümbritsetud peremeesraku plasmamembraanist pärineva membraaniga. Virionid on 60 – 70 nm suurused. Nukleokapsiid koosneb viiruse RNA-st, mis on seondunud 240 kapsiidivalgu koopiaga. Kapsiidivalgud on omakorda seotud membraanis asetseva viiruse glükoproteiinivalkude E1 ja E2 dimeeride trimeeridega moodustades osakese pinnale 80 ogataolist struktuuri. (Strauss ja Strauss, 1994)

CHIKV genoom on positiivse polaarsusega üheaheelaline RNA, see tähendab, et viirusvalke transleeritakse otse genoomselt RNA-lt. Genoom sisaldab kahte lugemisraami, polü(A) saba ning 5' *cap*-struktuuri (Strauss ja Strauss, 1994). CHIKV-l on kolm peamist genotüüpi: Lääne-Aafrika, Ida/Kesk/Lõuna-Aafrika (*East/Central/South African*, ECSA) ja Aasia genotüüp (Volk *et al.*, 2010).

### 1.3. CHIKV genoom

Chikungunya viiruse genoom koosneb u 12000-e aluspaari pikkusest positiivse polaarsusega RNA-st, millel on 3' polü(A) saba ja 5' *cap*-struktuur. Genoom sisaldab kahte avatud lugemisraami (*open reading frame*, ORF): 5' otsa pool asuv regioon (umbes kaks kolmandikku genoomist) kodeerib viiruse mittestruktuurseid valke (nsP1-4), sellele järgneb subgenoomne promootor ja struktureid valke kodeeriv ala (Strauss ja Strauss, 1994) (Joonis 1).



**Joonis 1. CHIKV genoom.** Genoom sisaldab kahe lugemisraami, polü(A) saba ja *cap*-struktuuri. Esimene lugemisraam kodeerib viiruse mittestruktuurseid valke (nsP, *nonstructural protein*) ja teine struktureid valke. 5' ja 3' UTR tähistavad genoomi mittetransleeritavaid alasid; SG on subgenoomne promootor.

Alfaviirustel on neli konserveerunud järjestuselementi (*conserved structural element, CSE*):

- 5' mittetransleeritav regioon (*5' untranslated region, 5' UTR*),
- vähemalt 11-12 adeniinjäägist koosnev polü(A) saba ning sellele vahetult eelnev 3' UTRi piirkond ,
- esimese lugemisraami alguses asuv replikatsiooni soodustav element (*replication enhancing element*),
- subgenoomne promootor.

5' UTR-is asub *stem-loop* struktuur, mis on oluline negatiivse ahela sünteesil (Frolov *et al.*, 2001). Ka sellega komplementaarne järjestus negatiivse ahela 3' osas moodustab sekundaarstruktuuri ning arvatavasti osaleb genoomse RNA sünteesil (Frolov *et al.*, 2001; Niesterst ja Strauss, 1990).

5'UTR järjestuse lähedal, esimest mittestruktuurset valku kodeerivas regioonis, asub veel kahest *stem-loop*'ist koosnev transkriptsiooni soodustav element (Niesterst ja Strauss, 1990).

Polü(A) saba ning sellele eelnev 3' UTR-i järjestus on samuti vajalikud RNA negatiivse ahela sünteesi algatamiseks (Hardy ja Rice, 2005). 3' UTR piirkond sisaldab mitmeid otseseid kordusjärjestusi (*direct repeats*)(Pfeffer *et al.*, 1998) ja *stem-loop* struktuure, mille abil see seondub rakkudes olevate valkudega soodustades viiruse replikatsiooni (Hardy ja Rice, 2005). 3'UTR on eriti oluline viiruse kohastumisel putukarakkudes paljunemiseks (Chen *et al.*, 2013b).

Polü(A) osaleb ka RNA stabiilsuse tagamisel ja efektiivsel mittestruktuursete valkude sünteesil (Hardy ja Rice, 2005). Replikatsiooni käigus sünteesitakse 3' polü(A)-lt negatiivse ahela 5' otsa polü(U) järjestus (Sawicki ja Gomatos, 1976).

Subgenoomne promootor asub kahe lugemisraami vahelises mittetransleerivas alas. Sellelt algab mittestruktuursete valkude süntees (Strauss ja Strauss, 1994).

CHIKV virioni kokkupanemiseks vajalik pakkimissignaali asub nsP2 valgu järjestuses (Rupp *et al.*, 2015).

## 1.4. CHIKV mittestruktuursed valgud

CHIKV-l on neli mittestruktuurset valku (*non-structural proteins*, nsP), mis transleeritakse otse genoomselt RNA-lt liitvalguna P1234, mida lõigatakse peale sünteesi lõppu ja selle käigus. Liitvalgu lõikamine on viiruse poolt rangelt kontrollitud ning mängib olulist rolli immuunvastuse kujunemisel ja viiruse elutsükli reguleerimisel (Strauss ja Strauss, 1994).

Mõnedel alfaviirustel, näiteks Ross River viirusel, VEEV-il ja EEEV-il, asub nsP3 ja nsP4 vahel stoppkoodon, selle tulemusel sünteesitakse kahte liitvalku: P123-e ja ka väiksemal hulgal P1234-e (Rupp *et al.*, 2015). CHIKV-l esineb nii stoppkoodoniga kui stoppkoodonita vorme. Võimalik, et stoppkoodoni olemasolu suurendab replikatsiooni efektiivsust (Chen *et al.*, 2013a).

Mittestruktuursetest valkudest koosnevat liitvalku lõikav proteaasidomeen asub nsP2-s (Vasiljeva *et al.*, 2003). Esimesena lõigatakse lahti nsP4 ning moodustub P123-nsP4 kompleks, mis sünteesib viiruse negatiivseid ahelaid. Seejärel toimub nsP1 lahti lõikamine ja eraldatakse ka nsP2 ja nsP3. Lahti lõigatud nsP valkude kompleks lülitub ümber positiivsete ahelate ning subgenoomse RNA sünteesile (Lemm *et al.*, 1994; Sawicki ja Sawicki, 1980; Shirako ja Strauss, 1994).

### 1.4.1. nsP1

nsP1-l on metüül- ja guanolüültransferaasne aktiivsus ja ta katalüüsib *cap*-struktuuri lisamist viiruse genoomsetele ja subgenoomsetele RNA-dele. Protsessis osaleb ka nsP2, mis eemaldab RNA 5' otsas olevalt trifosfaadilt ühe fosfaatgrupi, et võimaldada 7-metüülGMP lisamist (Karpe *et al.*, 2011; Vasiljeva *et al.*, 2000). Erinevalt teistest *cap*'i sünteesivatest süsteemidest lisab nsP1 7-metüülgrupi GTP-le enne selle sidumist RNA-ga (Ahola ja Kääriäinen, 1995).

nsP1 ankurdab nsP valkudest koosneva replikatsioonikompleksi plasmamembraanile. See võimaldab viiruse replikatsiooniks vajalike sfäärulite moodustumist. Membraaniga seondumine toimub nsP1 keskosas asuva alfaheeliks struktuuri abil (Ahola *et al.*, 1999; Lampio *et al.*, 2000; Spuul *et al.*, 2007). Sellele lisaks on nsP1 palmitüleeritud, mis tugevdab veelgi selle interaktsiooni plasmamembraaniga (Laakkonen *et al.*, 1996).

### 1.4.2. nsP2

Nakatunud raku leidub nsP2-te nii tsütoplasmas kui ka tuumas (Peränen *et al.*, 1990), kuid täpne mehhanism, mille abil see tuuma transporditakse pole selge. nsP2-l on mitmeid ensümaatilisi rolle ning ta osaleb raku immuunvastuse, transkriptsiooni ning translatsiooni maha surumisel (Rupp *et al.*, 2015).

Nagu eelpool kirjeldatud, omab nsP2 proteaasid aktiivsust. Seda vahendab valguga C-terminaalses osas olev papaiinilaadse tsüsteiini proteaasi domeen (Pastorino *et al.*, 2008). Samas regioonis asub inaktiivne Ftsj metüültransferaasi sarnane domeen, millel puudub vastava reaktsiooni läbi viimiseks vajalik aktiivtsenter (Russo *et al.*, 2006). SINV puhul on näidatud, et metüültransferaasi domeen võib osaleda negatiivse ahela sünteesi regulatsioonil ja tsütopaatilise efekti tekkimisel (Mayuri *et al.*, 2008).

nsP2-e N-terminaalsel regioonil on ATPaasne ning trifosfataasne aktiivsus (Pastorino *et al.*, 2008). Seal asuvad kaks RNA helikaasile iseloomulikku RecA-sarnast domeeni, kuid helikaasina toimib ainult täispikk nsP2, valguga C-terminaalne osa on arvatavasti vajalik RNA sidumiseks (Das *et al.*, 2014).

nsP2 interakteerub erinevate peremeesraku valkudega. Tuumas põhjustab nsP2 RNA polümeraasi II-e katalüütilise subühiku Rpb1-e ubiquitiinimärgistamise lagundamist, blokeerides sellega raku mRNA-de sünteesi (Akhrymuk *et al.*, 2012). Samuti on näidatud, et alfaviiruste nsP2 seondub ribosomaalsete valkudega ja võib sellega mõjutada translatsiooni (Atasheva *et al.*, 2007; Montgomery *et al.*, 2006). nsP2 inhibeerib interferoonide poolt indutseeritud JAK-STAT rada ja pärsib sellega raku immuunvastust (Fros *et al.*, 2010).

### 1.4.3. nsP3

nsP3 on vajalik RNA sünteesiks, kuid tema täpne roll pole teada (Wang *et al.*, 1994). Valk sisaldab mitmeid fosforüleerimissaita (Peränen *et al.*, 1988).

nsP3-e N-terminaalne osa on alfaviirustel tugevalt konserveerunud. See sisaldab makrodomeeni, mis seob ribonukleiinhappeid ja omab fosfataasid aktiivsust.

Makrodomeeni omavad ka mitmete teiste organismide valgud (Malet *et al.*, 2009). nsP3-e keskosas asub alfaviirustele unikaalse koostisega Zn<sup>2+</sup> iooni siduv domeen (Shin *et al.*, 2012).

nsP3-e C-terminaalne osa, hüpervarieeruv domeen, on varieeruva pikkuse ja koostisega ning sisaldab ilmselt kohastumisi erinevate peremeesorganismidega (Saxton-Shaw *et al.*, 2013).

nsP3 on võimeline seonduma mitmete peremeesraku valkudega (Frolova *et al.*, 2006), näiteks

G3PB-dega (Cristea *et al.*, 2006). CHIKV puhul on näidatud, et selline interaktsioon takistab stressigraanulite teket (Fros *et al.*, 2012).

#### 1.4.4. nsP4

CHIKV nsP4 on 611 aminohappejäagi pikkune valk, ta on viiruse RNA sõltuv RNA polümeraas (RdRp). Selle esimene, umbes 100 aminohappejäagi pikkune lõik, on omane alfaviirustele, ülejäänud umbes 500 aminohappejäagi pikkune järjestus moodustab polümeraasidele tüüpilise „parema käe“ struktuuri. nsP4 suudab täispikki negatiivseid ahelaid sünteesida ainult kompleksis teiste mittestruktuursete valkudega (Rubach *et al.*, 2009). nsP4 omab ka polü(A) sünteesiks vajalikku adenolülitransferaaset aktiivsust (Tomar *et al.*, 2006).

### 1.5. CHIKV struktuursed valgud

CHIKV struktuursed valgud sünteesitakse subgenoomselt mRNA-lt ühtse liitvalguna (Strauss ja Strauss, 1994). Subgenoomne RNA kodeerib kapsiidivalgu, viiruse ümbrisesse kuuluvaid glükoproteiine E1 ja E2 ning abivalke E3, 6K ja raaminihke valku TF (Firth *et al.*, 2008).

#### 1.5.1. Kapsiidivalk

Kapsiidivalk koosneb 261 aminohappe jäagist ja selle molekulmass on u 30 kDa (Strauss ja Strauss, 1994). Valgul on kolm erineva funktsiooniga piirkonda:

- N-terminaalses osas asuv regioon I sisaldab *coiled-coil  $\alpha$ -helix* motiivi, mis on oluline kapsiidi kokkupanekul (Hong *et al.*, 2006; Perera *et al.*, 2001).
- Regioon II tunneb ära nsP2-s asuva pakkimissignaali ja aitab kapsiidivalgul viiruse RNA-le seonduda (Weiss *et al.*, 1994).
- Regioon III sisaldab hüdrofoobset taskut membraanis asuva E2 glükoproteiiniga seondumiseks (Owen ja Kuhn, 1997) ning autoproteaasse aktiivsusega domeeni, mille abil kapsiidivalk lõikab ennast struktuurse polüpeptiidi küljest lahti.

Viiruse kapsiidi moodustavad 240 kapsiidivalgu koopiat ja see on T=4 ikosaedrilise sümmeetriaga (Strauss ja Strauss, 1994).

### 1.1.1. E1, E2 ja E3

Kapsiidi ümbritseb plasmamembraanist pärinev ümbris, mis sisaldab glükoproteiine E1 ja E2. Need mõlemad osalevad viiruse seandumisel ning sisenemisel rakku (Strauss ja Strauss, 1994). Peale nende sünteesitakse veel E3-e, mida valmis viirusosakestes enamasti ei leidu (Simizu *et al.*, 1984). Pärast kapsiidivalgu lahti lõikamist viiakse ümbrisevalkude polüpeptiid endoplasmaatilisse retiikulumi (ER), kus see liitub membraaniga. Transpordisignaal asub PE2-e (E2-E3) N-terminaalses järjestuses, see järjestus on vajalik ka E1-E2 trimeeride moodustumiseks (Lobigs *et al.*, 1990). ER-is lõikavad peremeesraku proteaasid 6K ümbrisevalkude kassetist lahti. Seejärel liituvad järele jäänud E1 ja PE2 heterodimeerideks, mis glükosüleeritakse ja mis moodustavad alfaviirustele iseloomulikud trimeersed ogad (Solignat *et al.*, 2009; Strauss ja Strauss, 1994).

E1 ja E2 sisaldavad mõlemad C-terminaalse otsa lähedal asuvat transmembraanset regiooni ja on N-glükosüleeritud. E2 on retseptorit siduv valk. Viirusosakeste kokkupanekul on E2 vajalik ümbrisevalkude rakusiseseks transpordiks ja õigeks kokku pakkimiseks (Strauss ja Strauss, 1994). E1 on viiruse fusioonvalk. CHIKV siseneb rakku klatriin-sõltuva endotsütoosi teel. Endosoomisisene madal pH põhjustab E1-E2 dimeeri struktuuri muutuse, moodustuvad E1 trimeerid, viiruse ja endosoomi membraanid ühinevad ja nukleokapsiid liigub tsütoplasmasse (Jose *et al.*, 2009; Tomar *et al.*, 2006). E3 ja PE2 stabiliseerivad vastavalt E2-E1 ja PE2-E1 komplekse ja aitavad vältida E1 enneaegset aktiveerimist viirusosakese kokkupanemise käigus. E3 lõigatakse PE2-e küljest lahti trans-Golgi süsteemis, aga jääb E2-ga mittekovalentselt seotuks kuni selle jõudmiseni välismembraanile (Uchime *et al.*, 2013).

### 1.1.2. 6K ja TF

6K on väike hüdrofoobne valk, mis sisaldab ER transpordi signaali. ER-is lõigatakse see teiste ümbrisevalkude küljest lahti, kuid jääb kompleksi PE2-E1-ga (Strauss ja Strauss, 1994). 6K translatsioonil subgenoomselt RNA-lt toimub u 10 – 18% tõenäosusega raaminihe, mille tulemusel sünteesitakse TF valk. TF ja 6K osalevad viiruse pungumisel rakust ning virioni korrektsel moodustumisel, kuid nende täpne töömehhanism pole veel teada (Firth *et al.*, 2008).

## 1.2. Elutsükkel

Imetajarakkudes on CHIKV replikatsioon kiire ja tugeva tsütopaatilise efektiga, toodetakse suurel hulgal viiruse valke ja RNA-d, peremehe makromolekulide süntees on inhibeeritud. Sääskedel põhjustab viirus eluaegse kroonilise nakkuse. Putukarakkudes viirus raku translatsiooni ja transkriptsiooni ei peata ning viirusele omaseid molekule sünteesitakse väiksemas koguses (Strauss ja Strauss, 1994).

Kuigi CHIKV suudab paljuneda nii imetaja- kui putukarakkudes pole tema retseptorid teada (Her *et al.*, 2009; Solignat *et al.*, 2009). Retseptoriga seondub viiruse E2 glükoproteiin, interaktsioonis võib osaleda ka E1. Nagu eelpool kirjeldatud siseneb viirus raku klatriin-sõltuva endotsütoosi teel, endosoomis tekkiva happelise keskkonna mõjul vabaneb nukleokapsiid tsütoplasmasse (Jose *et al.*, 2009).

Alfaviiruste replikatsioon toimub kahes etapis. Alguses sünteesitakse viiruse RNA-lt negatiivne ahel, millelt seejärel toodetakse suurel hulgal genoomseid ja subgenoomseid RNA-sid. Negatiivsete ahelate süntees toimub ainult esimese 3-4 tunni jooksul pärast raku nakatumist (Sawicki ja Sawicki, 1980). Replikatsioon toimub tsütoplasmis rakumembraanist välja sopistunud sfäärulites. RNA-d sünteesivad nsP valkudest koosnevad replikatsioonikompleksid asuvad sfäärulite sisemust tsütoplasmaga ühendavates avaustes (Frolova *et al.*, 2010).

Nukleokapsiid pannakse kokku tsütoplasmis. Kapsiidivalgu dimeerid seonduvad genoomse RNA ning üksteisega moodustades nukleokapsiidi (Perera *et al.*, 2001), mis interakteerub rakumembraanil asuvate E2-E1 valkude trimeeride koosseisus olevate E2 valkudega (Owen ja Kuhn, 1997). Moodustunud virionid punguvad rakust välja (Ekström *et al.*, 1994).

## 1.3. Chikungunya viiruse putukvektorid

CHIKV-l on kaks erinevat levimisviisi: metsa- (*enzootic/sylvatic cycle*) ja linnatsükkel (*urban cycle*). Metsatsükkel esineb Aafrikas. Viirust levitavad mitmed erinevad primaatide verest toituvad lehestikus elavad *Aedes* 'e liigid (Diallo *et al.*, 1999). Need sääsed elavad suuremast inimasustusest eemal ja põhjustavad seega enamasti väiksema ulatusega epideemiaid (Powers

ja Logue, 2007).

Linnatsükliis tekkivad epideemiad on ulatuslikumad ning neid põhjustavad inimese verest toituda eelistavad sääsed (Powers ja Logue, 2007). Kuni 2005. aastani oli peamiseks viiruse levitajaks troopikas ja subtroopikas elav *Ae. aegypti*. Kuid 2005. aasta La Reunioni saarel epideemia põhjustanud CHIKV tüvi kasutas vektorina *Ae. albopictus*. Sellel tüvel on E1 glükoproteiinis mutatsioon (E1-A226V mutatsioon), mis parandab tema võimet *Ae. albopictus*'t nakatada ning seal replitseeruda (Tsetsarkin *et al.*, 2007; Vazeille *et al.*, 2007). *Ae. albopictus*'e leviala on laiem kui *Ae. aegypti*'l ulatudes ka parasvöötmesse. CHIKV Aasia tüvi on levinud ka Ameerikasse, põhjustades epideemiaid peamiselt Kariibi mere piirkonnas ja Lõuna-Ameerikas (Sahadeo *et al.*, 2017).

*Aedes aegypti*'l ja *Aedes albopictus*'el on mõnevõrra erinevad elutsüklid. *Ae. aegypti* elab ning paljuneb eluasemete vahetus läheduses ja toitub peamiselt inimeste verest. *Ae. aegypti*'l esineb ka metsikus looduses elav alamliik *Ae. aegypti formosus*, kuid teda ei peeta oluliseks CHIKV levitajaks (Diallo *et al.*, 1999). *Ae. albopictus* leidub nii linnakeskonnas kui ka asulaid ümbritsevates metsastes piirkondades, sellepärast on tema arvukust keerulisem kontrollida kui *Ae. aegypti* oma (Her *et al.*, 2009).

#### **1.4. *Trans*-replikaasi süsteem**

Alfaviiruste mittestruktuursed valgud moodustavad viiruse replikatsioonikompleksi, nende ekspressioon rakus on seotud neid endid kodeeriva RNA replikatsiooniga. See teeb replikatsiooni efektiivsust vähendavate mutatsioonidega nsP-de uurimise keeruliseks, sest infektsiooni käigus sellised mutatsioonid reverteeruvad, pseudoreverteeruvad või kompenseeritakse mõne muu spontaanselt tekkinud mutatsiooni poolt (Utt *et al.*, 2016). Nende uurimiseks on loodud *trans*-replikaasi süsteem, kus mittestruktuurseid valke kodeeriv cDNA on viidud plasmiidvektorisse peremeesrakule sobiva promootori kontrolli alla. *Trans*-replikaasi süsteemis transkribeeritakse nsP-d seega raku enda poolt ning on võimalik uurida ka replikatsiooni oluliselt mõjutavaid mutatsioone (Frolova *et al.*, 2010; Spuul *et al.*, 2011; Utt *et al.*, 2016). Samuti saab süsteemi abil viirusele omaseid protsesse uurida ohutult, infektsioonilist viirust kasutamata. Selliseid replikaase kasutatakse rakus viiruse genoomil põhinevate matriitside ekspresseerimiseks. Nendes on viiruse struktuursete ja mittestruktuursete valkude geenid vahetatud mõne hästi detekteeritava markergeeni vastu (Frolova

et al., 2010; Spuul et al., 2011; Utt et al., 2016).

Alfaviiruste *trans*-replikaasi süsteemi loomine on viinud mitmete oluliste avastusteni. Nende abil on näidatud, et sfäärulite suurus sõltub replitseeritava RNA pikkusest (Kallio et al., 2013), leitud, et Semliki Forest viiruse (SFV, *Semliki Forest virus*) replikaas toodab rakulist päritolu RNA-de baasil interferoonvastust indutseerivaid RNA-sid (Nikonov et al., 2013) ning uuritud sfäärulite moodustumist rakus (Frolova et al., 2010; Spuul et al., 2011).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Viimastel aastatel on Chikungunya viirus oma leviala suurendanud ning põhjustanud tõsiseid epideemiaid Kariibi mere piirkonnas. Seal levib CHIKV Aasia genotüüp (Sahadeo et al., 2017). ECSA tüve poolt põhjustatud epideemia La Reunioni saarel põhjustas tavapärasest suurema arvu ebatüüpiliselt tõsiste sümptomitega Chikungunya juhtumeid (Renault et al., 2007). Et vältida viiruse edasist levikut ning töötada välja selle vastased ravimid või vaktsiin, tuleks põhjalikumalt uurida CHIKV nakkust nii looma- kui ka putukarakkudes.

CHIKV-d on uuritud vähem kui SFV-d või alfaviiruste mudelina kasutatavat Sindbis viirust. Enamik teadustöid kirjeldavad viirusinfektsiooni loomarakkudes. Chikungunya viirus ei levi otse inimeselt inimesele vaid vajab ülekandeks nakatunud sääski. Seetõttu on oluline mõista viiruse elutsüklit ka putuka organismis.

*Trans*-replikaasi süsteemi kasutades on tehtud mitmeid olulisi avastusi alfaviiruste poolt nakatatud loomarakkudes toimuvate bioloogiliste protsesside kohta. Selline süsteem on välja töötatud ka CHIKV jaoks (Utt et al., 2016). CHIKV-l on kolm erinevat genotüüpi, kaks neist, ECSA ja Aasia genotüüp, põhjustavad suuri linnalise levikuga epideemiad (Powers ja Logue, 2007). Need genotüübid on üksteisest mõnevõrra erinevad. Näiteks on Aasia genotüübiga CHIKV omandanud mutatsiooni, mille tulemusel see saab levimiseks kasutada lisaks *Ae. aegypti*-le ka *Ae. albopictus* liigi sääski (Tsetsarkin et al., 2007; Vazeille et al., 2007). Need sääsed on evolutsiooniliselt üksteisest võrdlemisi kauged, sellepärast on oluline kirjeldada mõlemat tüüpi CHIKV nakkusele omaseid protsesse tema mõlemas peamises putukvektoris.

Töö eesmärgid:

- Optimeerida eelnevalt loomarakkudes kasutatud CHIKV *trans*-replikaasi süsteemi putukarakkudes.
- Võrrelda CHIKV ja SFV replikaaside võimet replitseerida samal ning erineval viirusel põhinevaid matriitse inimeserakkudes.

## 2.2. Materjalid ja meetodika

### 2.2.1. Rakuliinid ja söötmed

Töös kasutati inimese osteosarkoomi rakuliini U2OS, *Ae. albopictuse* rakuliini C6/36 ja *Ae. aegypti* rakuliini Aag2. U2OS rakke kasvatati IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes, mis sisaldas 10% FCS-i (*fetal calf serum*, veise loote seerum). Neid hoiti 37°C-ses 5% CO<sub>2</sub>-e sisaldusega keskkonnas.

C6/36 ja Aag2 kasvatati 28°C-i juures. Kasutati L-15 (*Leibovitz's Medium*) söödet, mis sisaldas 10% inaktiveeritud FCS-i (*Life Technologies*), 10% TPB-d (*tryptose phosphate broth*, trüptoos-fosfaat-puljong) ja 100 U/ml penitsilliini ja 0,1 mg/ml streptomütsiini.

### 2.2.2. Konstruktid

Töös kasutati CHIKV *trans*-replikaasi süsteemi. Kõik konstruktid olid inimeserakkudele optimeeritud koodonkasutusega. Katseid tehti SFV ja CHIKV ECSA ning Aasia genotüübil (*Car, Caribbean*) põhinevate konstruktega (Tabel 1). Car viirus pärineb Aasia genotüübi CHIKV-st, mis isoleeriti Kariibi mere piirkonnast. Töö käigus ekspresseeriti jaanimardika (*Fluc, firefly luciferase*) ja *Gaussia* lutsiferaase (*Gluc, Gaussia luciferase*) kodeerivaid viiruse cDNA-l põhinevaid konstrukte (matriitse) rakkudes viiruse mittestruktuurseid valke kodeeriva konstrukti (replikaas) abil. Ekspressiooni hindamiseks kasutati lutsiferaasi signaali tugevust. Matriitsides asus Fluc geen esimeses lugemisraamis ja sellele eelnes replikatsiooni soodustavat elementi sisaldav (Niesters ja Strauss, 1990) viiruse nsP1 valgu algusjärjestus. Gluc geen oli teises lugemisraamis peale subgenoomset promootorit (Joonis 2).

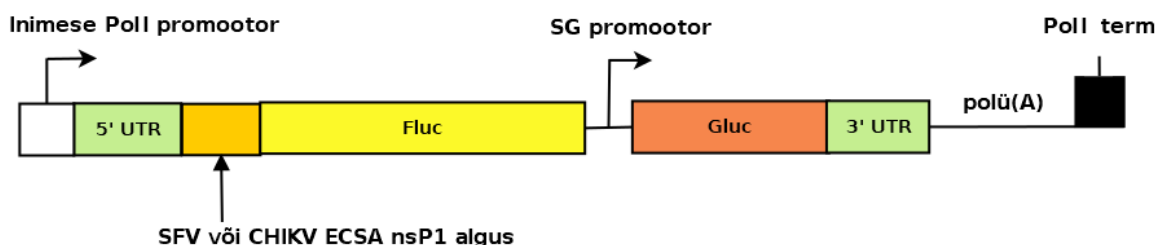
**Tabel 1. Töös kasutatud konstruktid.**

<b>Aag2 ja C6/36 rakkude transfekterimiseks kasutatud konstruktid</b>		
<b>Konstrukti nimi</b>	<b>Promootor</b>	<b>Viiruse tüvi</b>
ECSA replikaas	Ubikvitiini promootor	ECSA
Car replikaas	Ubikvitiini promootor	Car
GAA replikaas	Ubikvitiini promootor	ECSA
ECSA Ubi matriits	Ubikvitiini promootor	ECSA
Car Ubi matriits	Ubikvitiini promootor	Car
ECSA <i>Aae</i> Pol 1 matriits	<i>Ae. aegypti</i> RNA polümeraas I promootor	ECSA
ECSA <i>Alb</i> Pol 1 matriits	<i>Ae. albopictus</i> 'e RNA polümeraas I promootor	ECSA
Car <i>Aae</i> Pol 1 matriits	<i>Ae. aegypti</i> RNA polümeraas I promootor	Car
Car <i>Alb</i> Pol 1 matriits	<i>Ae. albopictus</i> 'e RNA polümeraas I promootor	Car
<b>U2OS rakkude transfekterimiseks kasutatud konstruktid</b>		
<b>Konstrukti nimi</b>	<b>Promootor</b>	<b>Viiruse tüvi</b>
ECSA replikaas	CMV promootor	ECSA
Car replikaas	CMV promootor	Car
SFV replikaas	CMV promootor	SFV
ECSA Pol 1 matriits	Inimese RNA polümeraas I promootor	ECSA
SFV Pol 1 matriits	Inimese RNA polümeraas I promootor	SFV

U2OS rakkudes võrreldi SFV, Car ning ECSA replikaase, kõik need omasid tsütomegaloviiruse (CMV, *cytomegalovirus*) promootorit (Joonis 3). U2OS rakkude transfekteerimiseks kasutati CHIKV ECSA ja SFV viirusel põhinevaid matriitse, mis olid inimese RNA polümeraas I promootoriga.

## MATRIITSID

### ECSA ja SFV matriitsid



## REPLIKAASID

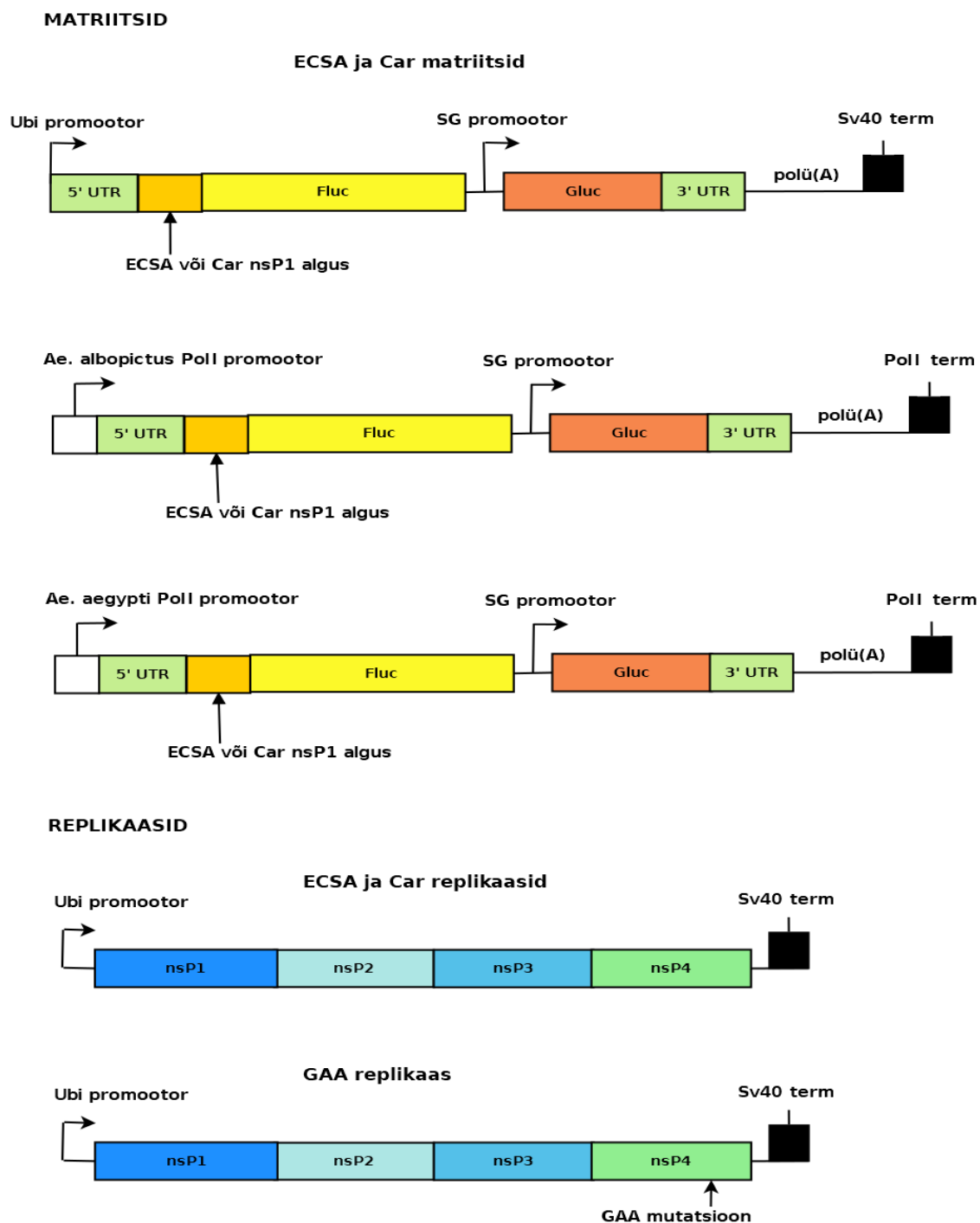
### ECSA, Car ja SFV repikaasid



**Joonis 2. U2OS rakkudes kasutatud matriitsid ja replikaasid.** U2OS rakke transfekteeriti inimese RNA polümeraas I promootoriga ECSA ja SFV matriitsiga. Replikaasid olid tsütomegaloviiruse promootoriga ning põhinesid CHIKV ECSA või Aasia genotüübil (Car) või SFV-l. Matriitsid kodeerisid jaanimardika (Fluc) ja Gaussia lutsiferaase (Gluc). Ubi – ubikvitiini promootor; CMV – tsütomegaloviiruse promootor; Pol I – RNA polümeraas I promootor; SG – subgenoomne promootor, term – terminaator.

Sääserakkudes kasutatud matriitsid olid kas ubikvitiini, *Ae. albopictus*'e või *Ae. aegypti* RNA polümeraas I promootoriga. RNA polümeraas I sünteesib rakus ribosomaalseid RNA-sid. Erinevalt RNA polümeraas II-st puudub RNA polümeraas I-e sünteesitud RNA-del *cap*-struktuur ning raku ribosoomid neid ei transleeri. See võiks vähendada ebaspetsiifilist taustasignaali lutsiferaasi luminesentsi mõõtmisel. Erinevaid replikaase oli kolm: ECSA ja Car tüve replikaas ning inaktiveeritud ECSA tüve replikaas, mille aktiivtsentris oli tavapärase Gly-Asp-Asp (GDD) järjestuse asemel Gly-Ala-Ala (GAA) järjestus. Replikaasid omasid

ubikvitiini promootorit. Katsetes kasutati täispikkuses 3'UTR-iga Car matriitsi, ECSA matriitsi 3'UTR oli loodusliku viiruse omast lühem (Joonis 2).



**Joonis 3. Sääserakkudes kasutatud matriitsid ja replikaasid.** Sääserakke transfekteriti kahe erineva genotüübiga matriitsidega: Car ja ECSA. Mõlema genotüübiga oli kolm erineva promootoriga konstrukti. Kõik replikaasid olid ubikvitiini promootoriga, kasutati ECSA, Car ja inaktiveeritud GAA replikaase. Matriitsid kodeerisid jaanimardika (Fluc) ja Gaussia lutsiferaase (Gluc). Ubi – ubikvitiini promootor; Pol I – RNA polümeraas I promootor; SG – subgenoomne promootor, term – terminaator.

### 2.2.3. Rakkude transfekterimine

*Western blot* analüüsi jaoks transfekteriti 6-augulistel plaatidel kasvatatud Aag2, C6/36 ja U2OS rakke 2 ng SFV ning CHIKV ECSA ja Car replikaase ekspresseerivate plasmiididega.

Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks kasvatati eelpool nimetatud rakuliine 12-augulistel plaatidel ning need transfekteriti matriitsi (ECSA või Car tüvi, ubikvitiini või RNA polümeraas I promootriga) ja replikaasi (ECSA, Car või inaktiveeritud replikaas) kodeerivate plasmiididega või ainult matriitsi plasmiidiga. Transfekterimiseks kasutati Lipofectamine LTX (Invitrogen) reagente.

Lutsiferaasi mõõtmiseks sääserakkudes võeti ühe transfektsiooni kohta iga plasmidi 0,5 µg, 60 µl-le Opti-MEM-ile (vähendatud seerumisaldusega sööde, *reduced serum media*) lisati ainult matriitsi või matriitsi ja replikaasi plasmiidid ning 1 µl *Plus* reagenti 1 µg-i DNA kohta. Sellele lisati Opti-MEM-i (60 µl) ja Lipofectamine LTX-i (2,8 µl) segu ning lasti 5 minutit seista. Rakkudelt eemaldati vana sööde ja lisati 800 ml L-15 söödet. DNA ja reagentide segu tilgutati rakkudele. 4 tundi hiljem reagente sisaldav sööde eemaldati ning asendati uue L-15 söötmega.

Lutsiferaasi mõõtmiseks U2OS rakkudes võeti iga plasmidi 1 µg. 60 µl-le Opti-MEM-ile lisati ainult matriitsi või matriitsi ja replikaasi plasmiidid ning 1 µl *Plus* reagenti 1 µg-i DNA kohta. Sellele lisati Opti-MEM-i (60 µl) ja Lipofectamine LTX-i (3,5 µl) segu ning lasti 5 minutit seista. Rakkudelt eemaldati vana sööde ja lisati 800 µl-t IMDM söödet. DNA ja reagentide segu tilgutati rakkudele.

*Western blot* analüüsi jaoks transfekteriti rakke 2 µg DNA-ga. Aag2 ja C6/36 rakkude puhul lisati 150 µl-le Opti-MEM-ile 2 µg replikaasi plasmidi ning 2 µl *Plus* reagenti. See segati Opti-MEM-i (150 µl) ja Lipofectamine LTX-i (7 µl) seguga ning lasti 5 minutit seista. Rakkudelt eemaldati vana sööde ja lisati 2 ml L-15 söödet. DNA ja reagentide segu tilgutati rakkudele. 4 tundi hiljem reagente sisaldav sööde eemaldati ning asendati puhta L-15 söötmega.

U2OS rakkudega transfekterimiseks *Western blot*'i jaoks lisati 150 µl-le Opti-MEM-ile 2 µg replikaasi plasmidi ning 2,5 µl *Plus* reagenti. See segati Opti-MEM-i (150 µl) ja Lipofectamine LTX-i (9 µl) seguga ning lasti 5 minutit seista. Rakkudelt eemaldati vana

sööde ja lisati 2 ml IMDM söödet. DNA ja reagentide segu tilgutati rakkudele.

Aag2 ja C6/36 rakud lüüsi 48 tundi pärast transfektsiooni, U2OS rakud 18 tundi pärast transfektsiooni.

#### 2.2.4. *Gaussia* ja jaanimardika lutsiferaasi ekspressiooni mõõtmine

*Gaussia* ja jaanimardika lutsiferaaside aktiivsus mõõdeti *Dual Luciferase Reporter Assay system*’i (Promega) abil *GlowMax SIS* luminomeetriga. 12-augulistel plaatidel kasvatatud ja transfekteeritud rakud pesti 500 µl-i PBS-iga (*phosphate buffered saline*, fosfaatpuhverdatud soolalahus), seejärel pipeteeriti rakkudele 250 µl-t 1x PLB-d (*passive lysis buffer*). U2OS rakud lüüsi 18 tundi pärast transfekteerimist, Aag2 ja C6/36 rakud 48 tundi pärast transfekteerimist. PLB-ga plaate hoiti 15 minutit loksutil ning lüsaat suspendeeriti ühtlaseks. Jaanimardika lutsiferaasi (Fluc) signaali mõõtmiseks segati 4 µl proovi 20 µl *Dual Luciferase Reporter Assay system*’i LAR II (lutsiferaasi testi reagent II, *Luciferase Assay Reagent II*) reagentiga, *Gaussia* lutsiferaasi (Gluc) mõõtmiseks lisati 20 µl 1x *Stop and Glo* reagenti (*Dual Luciferase Reporter Assay system*). Lutsiferaasi luminesentsi mõõtmisel saadud tulemuste edasiseks töötlemiseks kasutati Microsoft Excel programmi.

#### 2.2.5. *Western blot*

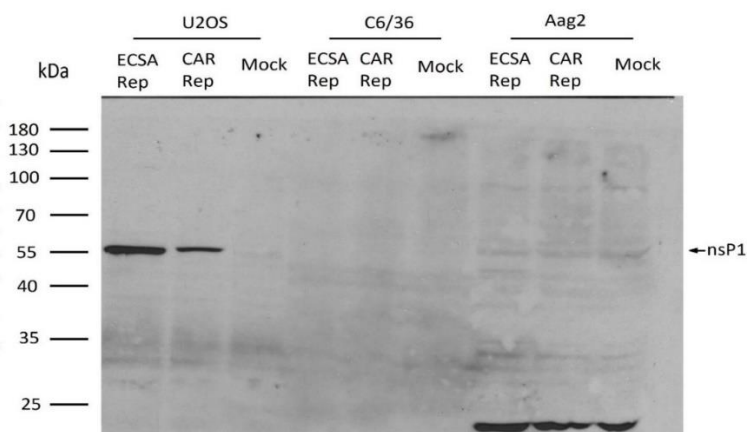
Viiruse replikaasi nsP1 valgu ekspressiooni kontrollimiseks rakkudes kasutati *Western blot* meetodit. 6-augulistel plaatidel kasvatatud ja transfekteeritud rakud lüüsi 50 µl-s 1x Laemmli lüüsi puhvris (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 100 mM DTT, 2% SDS, 10% glütserool, 0.02% broomfenoolsinine). U2OS rakud lüüsi 18 tundi pärast transfekteerimist, Aag2 ja C6/36 rakud 48 tundi pärast transfekteerimist. Lüsaate kuumutati valkude denatureerimiseks 10 minutit 100°C juures. 15 µl igast proovist kanti 10%-le SDS-polüakrüülamiidgeelile ja valgud lahutati geelelektroforeesil 1x SDS puhvris (25 mM Tris, 0.25 M glütsiin, 0.1% SDS, pH 8.3). Seejärel kanti valgud *Trans-Blot Semi-Dry* aparadi (*Bio-Rad*) abil üle nitrotselluloosmembraanile (*Amersham, Prototam-ECL*). Ülekandel kasutati *Semi-dry* puhvrit (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% etanool). Membraanid blokeeriti üleöö 4°C-i juures 5% lõssilahuses, mille valmistamiseks kasutati *Western blot*’i pesulahust (50 mM TrisHCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20). Pärast blokeerimist asetati membraanid

ühiks tunniks CHIKV või SFV nsP1-e vastase primaarse antikehaga segatud 2%-sse lõssilahusesse. Seejärel pesti neid kolm korda 10 minutit loksutades *Western blot*'i pesulahusega. Pärast seda inkubeeriti membraane tund aega HRP-ga (*horseradish peroxidase*, mädarõika peroksüdaas) konjugeeritud sekundaarse antikehaga 2%-s lõssilahuses. Membraane pesti peale sekundaarse antikehaga inkubeerimist 3 korda 10 minutit, tundlikumate reagentide korral 5 korda 5 minutit. Valgud visualiseeriti *ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham)* või tundlikumate *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific)* reagentide abil röntgenfilmil 1 – 5 minutit.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Replikaaside ekspressioon rakkudes

Uurimaks erinevate replikaasikonstruktid ekspressiooni rakus, tehti *Western blot* analüüs viiruste (SFV ja CHIKV) anti-nsP1 antikehadega. Tulemuste visualiseerimiseks kasutati *ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham)* reagente. Erinevalt loomarakkudest, põhjustab CHIKV putukarakkudes kroonilise infektsiooni, mis ei sega oluliselt raku enda elutegevust, seetõttu toodetakse seal viiruse mittestruktuurseid valke palju väiksemal hulgal kui loomarakkudes. Joonisel 4 on näha, et nii oli võimalik vaadelda valgu ekspressiooni ainult U2OS rakkudes. Sellepärast korrati katsed tundlikumate reagentidega.



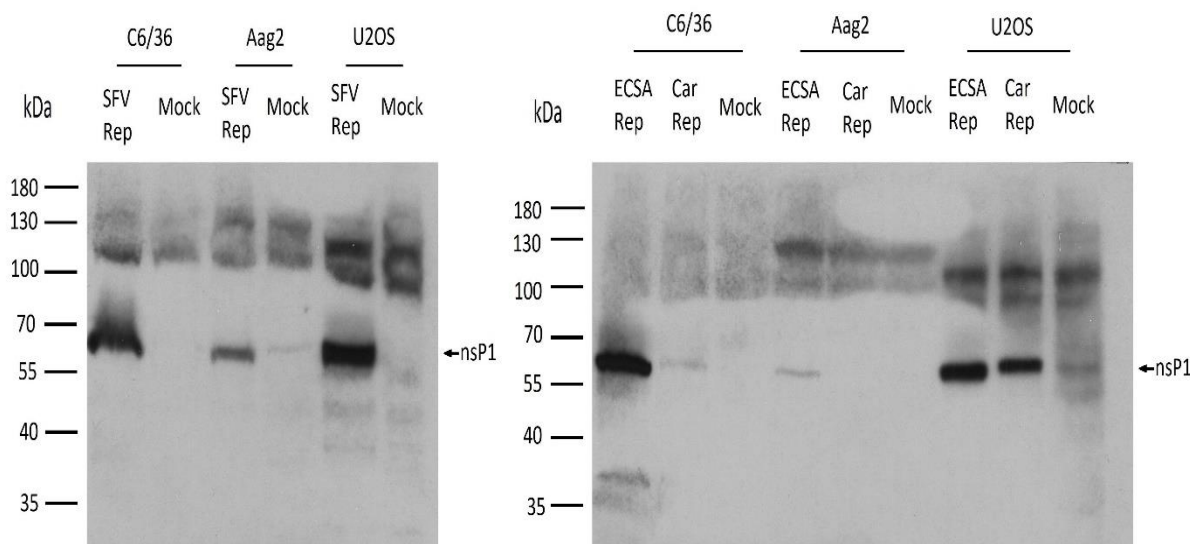
#### Joonis 4. CHIKV ECSA ja Car replikaaside ekspressioon sääse ja inimese rakkudes.

U2OS, Aag2 ja C6/36 rakke transfecteeriti ECSA ja Car replikaasidega, rakud lüüsi ning nsP1 valgu ekspressioon visualiseeriti *Western blot* meetodi abil. Pildil on selgelt näha nsP1-le vastav vöö nii ECSA kui Car replikaasiga transfecteeritud U2OS rakkudes. Aag2 rakkudes on näha antikeha ebaspetsiifilise seondumise poolt põhjustatud vöö. Mock tähistab kontrolliks kasutatud ilma DNA-ta transfectiooniseguga inkubeeritud rakkude lüsaati. Rep – replikaas.

Tundlikuma *kit-i (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific))* abil tulid nähtavale nsP1-le vastavad vöödid ka Aag2 ja C6/36 rakkudes. Jooniselt 5 on näha, et Car replikaasi ekspressioon, eriti putukarakkudes, on oluliselt madalam kui ECSA ja SFV replikaasi ekspressioon. Aag2 rakkude puhul pole vastavat vööti üldse näha. Viga võib olla replikaasi järjestuses. Võimalik, et töös kasutaud Car replikaasi järjestus erineb loodusliku viiruse omast ning see mõjutab selle ekspressiooni putukarakkudes. Seega vajab eelnimetatud konstrukti täiendavat tööd.

Replikaasi, nii SFV, Car kui ECSA, ekspressioon on Aag2 rakkudes madalam kui C6/36

rakkudes. Tugevam ekspressioon C6/36 rakkudes võib olla tingitud sellest, et C6/36 rakkudel on defektne immuunvastus (Brackney et al., 2010).

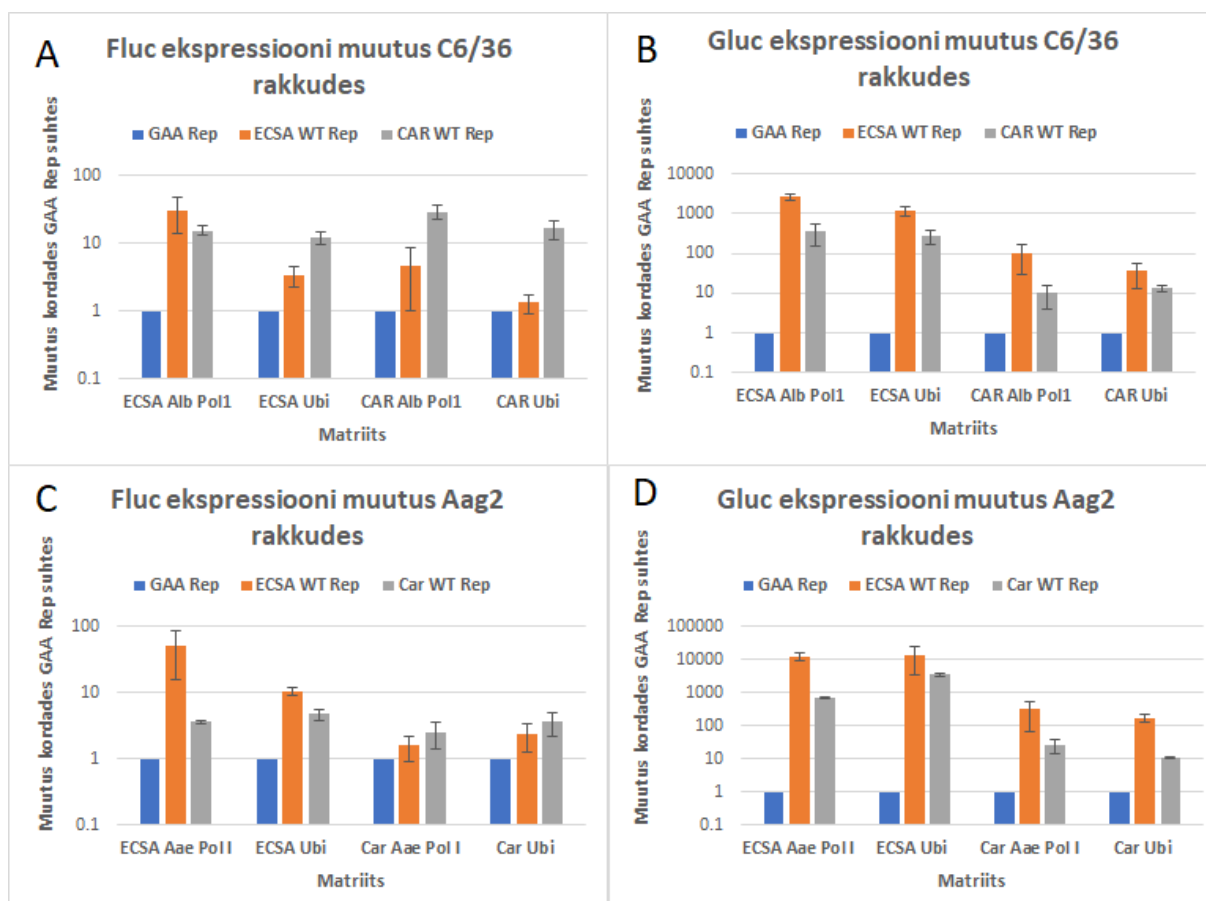


**Joonis 5. SFV ja CHIKV ECSA ning Car replikaaside ekspressioon sääse ja inimese rakkudes.** U2OS, Aag2 ja C6/36 rakke transfekteeriti SFV ning CHIKV ECSA ja Car replikaasidega, rakud lüüsi ning nsP1 valgu ekspressioon visualiseeriti Western blot meetodi abil. Rep – replikaas.

### 2.3.2. Erinevate CHIKV *trans*-replikaasi süsteemi replikaaside ja matriitside võrdlus sääserakkudes

*Trans*-replikaasi süsteemi toimimist uuriti sääserakuliinides. Aag2 rakuliin on saadud *Ae. aegypti* sääskedest ning C6/36 rakuliin on saadud *Ae. albopictus* sääskedest. Neid transfekteeriti ubikvitiin või vastava RNA polümeraas I promootoriga konstruktid (kasutati *Ae. albopictus* ja *Ae. aegypti* polümeraas I promootorit) ning Car, ECSA või inaktiveeritud ECSA tüve replikaasikonstruktidega. Inaktiveeritud ECSA konstrukti nsP4 aktiivtsentris on polümeraasse aktiivsuse rikkumiseks Gly-Asp-Asp (GDD) järjestus vahetatud Gly-Ala-Ala (GAA) järjestuse vastu. Jooniselt 6 on näha, et tulemused olid erinevates katsetes väga erinevad ja veapiirid tulid kohati suured. Praeguste tulemuste põhjal tundub, et Aag2 ja C6/36 rakkudes töötasid kõige paremini vastava sääseliigi RNA Pol I promootoriga konstruktid. Ubikvitiini promootoriga konstrukti ekspresseerimine üsna hästi mõlemas rakuliinis. Car tüüpi replikaas oli madalama efektiivsusega kui ECSA replikaas. ECSA replikaas suurendas subgenoomselt promootorilt loetava *Gaussia* lutsiferaasi ekspressiooni isegi Car matriitsi puhul rohkem kui Car tüvel põhinev replikaas. Eelpool kirjeldatud *Western blot*-i analüüsist

selgub, et see on ilmselt põhjustatud Car replikaasi oluliselt väiksemast hulgast rakkudes. Ka Car matriitsidelt tulev lutsiferaasi signaal rakkudes on madalam kui vastavate ECSCA matriitsidelt tulev signaal. Põhjus võib olla Car matriitsi täispikkuses 3' UTR. Selles töös kasutatud ECSCA matriitsi 3'UTR on vastavast looduslikust järjestusest oluliselt lühem. Eelnevates uuringutes on selgunud, et pudelikaela efekti tõttu on ka ECSCA tüve täispikk 3' UTR paremini kohastunud nii imetaja kui *Ae. aegypti* rakkudes paljunemiseks kui Aasia tüve oma (Chen et al., 2013b).

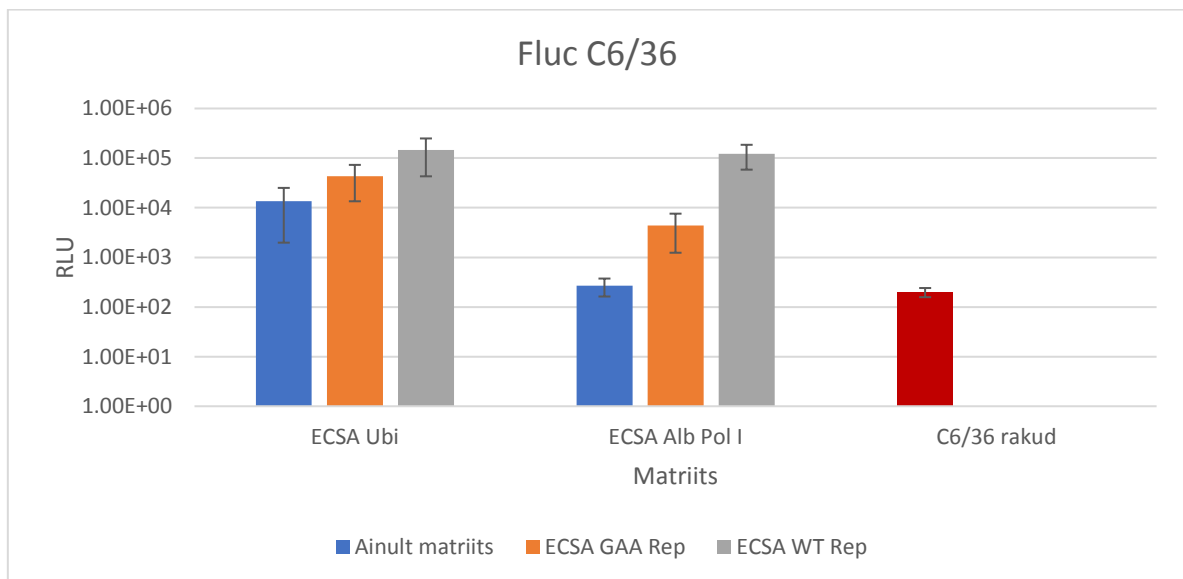


**Joonis 6. Lutsiferaasi ekspressioon putkarakkudes, ECSCA ja Car replikaaside võrdlus.**

Joonisel on näidatud Fluc ja Gluc lutsiferaaside aktiivsused replikaasi ning matriitsiga transfekteeritud rakkudes. Matriitsi ja Car või ECSCA replikaasiga transfekteeritud rakkudes mõõdetud lutsiferaasi luminesents (RLU-des) on jagatud lutsiferaasi luminesentsiga (RLU-des) sama matriitsi ja GAA replikaasiga transfekteeritud rakkudes. A – Fluc (jaanimardika lutsiferaasi) signaal C6/36 rakkudes; B – Gluc (*Gaussia* lutsiferaasi) signaal C6/36 rakkudes; C – Fluc signaal Aag2 rakkudes; D – Gluc signaal Aag2 rakkudes. Katset korrati vähemalt kaks korda. Veapiiridena on kasutatud standardhälvet. Rep – replikaas; Aae Pol I – *Ae. aegypti* RNA polümeraas I promootoriga matriits; Alb Pol I – *Ae. albopictuse* RNA polümeraas I promootoriga matriits; RLU – suhtelised valgusühikud; Ubi – ubikvitiini promootoriga matriits; WT – metsik tüüp (*wild type*).

Ubikvitiini promootoriga matriitsid, mida võib transkribeerida ka raku RNA polümeraas II, ekspresseerivad rakus *Fluc*-i ilma replikaasi juuresolekuta kõrgemal tasemel kui RNA polümeraas I promootoriga matriitsid. Järelikult toimub rakkudes ubikvitiini promootoriga matriitsidelt mingil määral *Fluc*-i süntees ka ilma viiruse replikaasi abita. Polümeraas I promootoriga matriitsiga transfekteeritud rakkudes on *Fluc*-i hulk samal tasemel kui kontrolliks kasutatud transfekteerimata rakkudes (Joonis 7). Nagu eespool mainitud ei oma RNA polümeraas I-e sünteesitud RNA-d *cap*-struktuuri ja raku ribosoomid neid ei transleeri. *Cap*-ga jaanimardika lutsiferaasi RNA-d toodetakse vaid siis kui rakus on ka viiruse replikaas. Nagu jooniselt 7 näha, siis RNA Pol I promootoriga matriitsi puhul jaanimardika lutsiferaasi taustasignaali suurenemist ei toimu. Seega on RNA polümeraas I promootoriga matriitsid katseteks sobivamad.

Huvitaval kombel selgub, et inaktiivne ECSA GAA replikaas suurendab jaanimardika lutsiferaasi geeni ekspressiooni C6/36 rakkudes (Joonis 7). Põhjus pole selge.

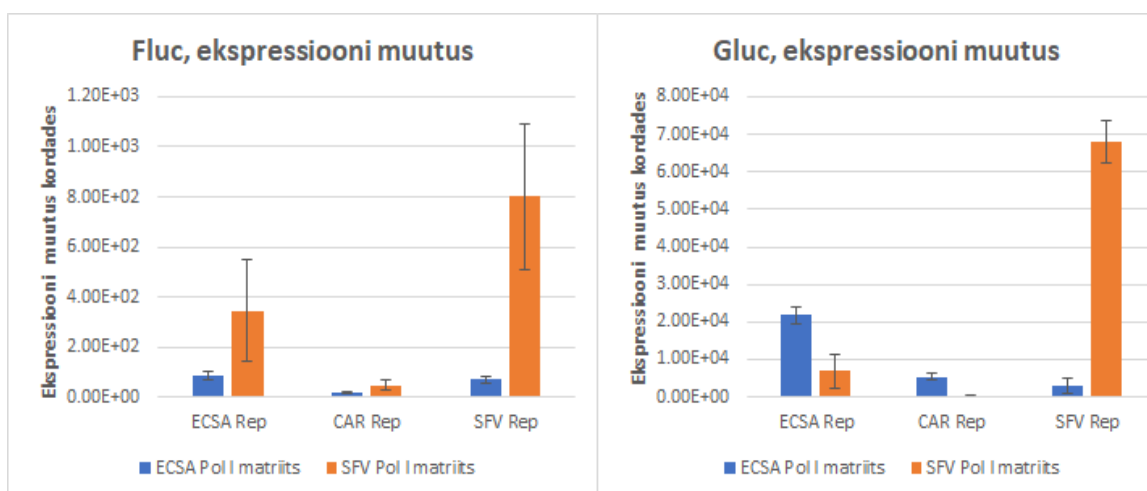


**Joonis 7. Jaanimardika (*Fluc*) lutsiferaasi ekspressioon C6/36 rakkudes, ECSA ning GAA replikaasi ja matriitsiga ning ainult matriitsiga transfekteeritud rakud.** Joonisel on näidatud ainult matriitsi ja matriitsi ning GAA replikaasi põhjustatud jaanimardika lutsiferaasi signaali tõus rakkudes, võrdluseks on joonisele lisatud lutsiferaasi signaali väärtus matriitsiga ja ECSA replikaasi transfekteeritud rakkudes ning transfekteerimata rakkudes. Signaali tugevus on mõõdetud suhtelistes valgusühikutes (RLU, *Relative Light Units*). Katset korrati neli korda. Veapiiridena on kasutatud standardhälvet. Rep – replikaas; Alb Pol I – *Ae. albopictuse* RNA polümeraas I promootoriga matriits; Ubi – ubikvitiini promootoriga matriits; WT – metsik tüüp (*wild type*).

### 2.3.3. SFV, CHIKV ECSA ja Car replikaaside võrdlus U2OS rakkudes

U2OS rakkudes võrreldi CHIKV-I ja SFV-I põhinevate replikaaside võimet ekspresseerida SFV ja CHIKV ECSA genotüübiga matriitse.

U2OS rakke transfekteeriti inimese RNA polümeraas I promootoriga Gluc ja Fluc lutsiferaase kodeerivate konstruktide ning CMV promootoriga SFV ja CHIKV ECSA ning Car replikaasidega (Joonis 8). Jooniselt 8 on näha, et Kariibi mere tüve replikaas (Car) töötab kolmest võrreldud replikaasist kõige halvemini, sellega sai kõige nõrgema lutsiferaasi signaali. SFV matriitsiga tehtud katsete jaanimardika lutsiferaasi signaali tulemuste kõikumine on suur, oleks vaja teha täiendavaid korduskatseid. Kõige suurem jaanimardika lutsiferaasi aktiivsus saadi mõlema matriitsi puhul SFV replikaasiga, eriti hästi töötas see talle vastava SFV matriitsiga. *Gluc* geeni ekspressioonil töötasid SFV ning ECSA replikaasid kõige paremini sama genotüübiga matriitsiga.



**Joonis 8. Lutsiferaasi ekspressioon U2OS rakkudes.** Joonisel on näidatud lutsiferaasi aktiivsus replikaasi ning matriitsiga transfekteeritud rakkudes jagatuna aktiivsusega ainult matriitsiga transfekteeritud rakkudes. Katset korrati kaks korda. Veapiiridena on kasutatud standardhälvet. Rep – replikaas; Pol I – inimese RNA polümeraas I promootor

## 2.4. Arutelu

Tulemustest selgub, et CHIKV Aasia genotüübil põhinev (Car) replikaas ekspresseerub rakkudes halvasti. Kariibi mere replikaasiga transfekteeritud rakkudes on oluliselt vähem sellelt transleeritavat nsP1 valku kui ECSA genotüübi replikaasiga transfekteeritud rakkudes

(Joonis 5). Põhjus pole selge, kuid võimalik, et Car replikaasi järjestuses on mõni viga, mis eristab seda looduslikust viirusest ja pärsib selle ekspressiooni rakus.

Loomarakkudes sobib iga matriitsi ekspresseerimiseks kõige paremini sellele vastav replikaas. Kõige kõrgemad lutsiferaasi signaalid saadi SFV replikaasi ja matriitsi kooslusest.

Sääserakkudes pole võimalik erinevaid replikaase võrrelda sest Car replikaasi toodetakse rakus vähem kui ECSA oma (Joonis 5). Peale selle on veapiirid sääserakkudega katsetes kohati suured ja tulemuste paremaks analüüsimiseks oleks vaja läbi viia korduskatseid.

Paistab, et rakuliinile vastava sääseliigi RNA polümeraas I promootoriga matriitsid ekspresseeruvad vastavas rakus kõige paremini ning jaanimardika lutsiferaasi taustasignaali on selle promootoriga matriitsi kasutades väiksem. Samas, RNA polümeraas I promootor on liigi-spetsiifiline. Ubikvitiini promootor on universaalsem sellega matriits sobib kasutamiseks nii Aag2 kui C6/36 rakuliinis, kuid ubikvitiini promootoriga matriits annab ka suurema jaanimardika lutsiferaasi taustasignaali.

Edasise töö käigus peaks uurima, miks Car replikaas rakkudes halvemini ekspresseerub ning miks on Car matriitsilt tulev lutsiferaasi signaal nõrgem kui ECSA matriitsilt tulev signaal. Car replikaas tuleks sekveneerida ja kontrollida, kas selle järjestusse on kloneerimise käigus tekkinud mõni viga. Car matriitsidelt tuleva lutsiferaasi madala ekspressiooni põhjus võib olla ka nende matriitside ECSA matriitsidest oluliselt pikem 3' UTR. Selle välja selgitamiseks peaks valmistama Car/ECSA hübriid-matriitsid, kus omavahel on ümbervahetatud erinevatest genotüüpidest pärinevad alad ning uurima kuidas need mõjutavad lutsiferaasi signaali rakkudes.

Peale selle võiks välja selgitada, miks inaktiivne ECSA GAA replikaas suurendab C6/36 rakkudes lutsiferaasi ekspressiooni. Võimalik, et see replikaas stabiliseerib matriitsi rakus või muudab selle konformatsiooni viisil, mis teeb matriitsi raku RNA polümeraasile kättesaadavamaks.

## KOKKUVÕTE

CHIKV on perekonda *Alphavirus* kuuluv RNA viirus, mis põhjustab kõrget palavikku, löövet ja tõsist artriiti. CHIKV mittestruktuursete valkude ning nendega seotud protsesside uurimiseks rakus on välja töötatud *trans*-replikaasi süsteem, kus viiruse genoomi mittestruktuurseid valke kodeeriv osa on eraldatud struktuursete valke kodeerivast osast. Seda süsteemi on edukalt kasutatud viirusinfektsiooni uurimiseks loomarakkudes.

Käesolevas töös kasutatud *trans*-replikaasi süsteem koosnes *Fluc* ja *Gluc* gene kodeerivast viiruse genoomil põhinevast matriitsplasmiidist, mida avaldati rakkudes viiruse replikaasi cDNA-d sisaldava plasmidi abil.

Töö üheks eesmärgiks oli katsetada eelkirjeldatud süsteemi sääserakkudes ning leida seal kõige paremini töötavad matriitsid ning replikaasid. Saadud tulemused olid kohati suure varieeruvusega ja tuleks teha korduskatseid. Kõrgeima ekspresseerimisega olid rakutüübile vastava RNA polümeraas I promootoriga ECSA genotüübi matriitsid. Erinevalt ECSA matriitsidest omasid Car matriitsid täispikka 3'UTR järjestus, mis võis mõjutada nende avaldumist rakkudes.

ECSA tüve replikaas ekspresseerus rakkudes paremini kui Car tüve oma. *Western blot* analüüsist selgus, et Car tüve replikaasi toodetakse rakus oluliselt vähem kui ECSA replikaasi. Seega on võimalik, et kloneerimise käigus on Car replikaasi järjestusse tekkinud mõni viga, mis mõjutab selle ekspresseerimist ja konstrukti vajab täiendavat tööd.

Sellele lisaks uuriti U2OS rakkudes SFV ning CHIKV ECSA ning Car tüve replikaaside võimet ekspresseerida SFV ja CHIKV ECSA viirusel põhinevaid matriitse. Ka selles katses töötas Car replikaas võrreldud replikaasidest kõige halvemini. Kõige kõrgem signaal saadi SFV replikaasi ja SFV matriitsiga transfekteeritud rakkudes. SFV replikaas töötas hästi ka ECSA matriitsiga, andes isegi kõrgema *Fluc* signaali kui ECSA enda replikaas. Subgenoomselt promootorilt loetava *Gluc*-i ekspresseerimiseks oli siiski iga matriitsi jaoks kõige sobivam sama genotüübiga replikaas.

## **Optimisation of Chikungunya virus *trans*-replication system for Aag2 and C6/36 cells and comparison of Chikungunya and Semliki Forest virus replicases in U2OS cells.**

Hele-Liis Aavasalu

### **SUMMARY**

Chikungunya virus (CHIKV) is an alphavirus transmitted to humans by mosquitos. It causes fever, rash and debilitating joint pain. Historically CHIKV has been known to cause epidemics in Africa and Asia, but in recent years it has spread to Southern and Central America, generated major outbreaks in Asia and produced small autochthonous epidemics in Southern Europe. To date there is no vaccine or cure for Chikungunya virus, therefore further research is needed to better understand the virus and its interactions with host cells.

Most of the research involving CHIKV has concentrated on the infection in mammalian cells, however to successfully infect humans the virus needs to pass through its arthropod hosts. Insight into the lifecycle of Chikungunya virus in mosquito cells could provide valuable information to prevent future epidemics in human populations.

CHIKV *trans*-replication system has been developed to mimic the infection in mammalian cells. The system consists of a cDNA of the viral replicase (non-structural proteins) and a template DNA constructed from the viral genome in which the structural and non-structural proteins have been replaced with reporter genes. This allows researchers to work safely without involving the “live” virus as well as providing a useful way to investigate CHIKV non-structural proteins and processes involving them in the cells separately from the structural proteins and viral replication.

The aim of this study was to adapt the system to mosquito cells (Aag2 and C6/36) and to compare the ability of alphavirus replicases belonging to the same serotype, namely Semliki Forest virus (SFV) and CHIKV (2 genotypes), to cross-boost the replication of templates belonging to the other virus/genotype in human osteosarcoma cell-line (U2OS). Templates and replicases belonging to the CHIKV ECSA (East/Central/South African) and Asian (Caribbean, Car) genotypes and Semliki Forest virus were used. In mosquito cells ECSA and Car templates with ubiquitin and cell specific RNA polymerase I promoters were compared.

It was shown that replicases based on the CHIKV strain isolated in the Caribbean region are not expressed well in cells. There might be an error in the sequence. Expression of luciferase from Caribbean templates is also low. This might be caused by the much longer 3' UTR those templates have compared to ECSA templates.

The results from the experiment with mosquito cells are inconclusive. Templates with cell specific RNA polymerase I promoter seem to be expressed at a higher level than templates with ubiquitin promoter, however RNA polymerase I promoters are species-specific and ubiquitin templates may be more versatile and suited for use in both Aag2 and C6/36 cell lines.

In conclusion, the results in mammalian cells indicate that although the replicases have an ability to boost templates of a different virus/genotype each replicase works best with its own template. Further experiments are needed to successfully use *trans*-replication system in mosquito cells.

## **TÄNUSÕNAD**

Soovin tänada oma juhendajaid Kai Rausalu ja professor Andres Meritsat nõuannete, abi ja juhendamise eest.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Ahola, T., ja Kääriäinen, L. (1995). Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 507–511.
- Ahola, T., Lampio, A., Auvinen, P., ja Kääriäinen, L. (1999). Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *EMBO J.* *18*, 3164–3172.
- Akhrymuk, I., Kulemzin, S. V, ja Frolova, E.I. (2012). Evasion of the Innate Immune Response: The Old World Alphavirus nsP2 Protein Induces Rapid Degradation of Rpb1, a Catalytic Subunit of RNA Polymerase II. *J. Virol.* *86*, 7180–7191.
- Atasheva, S., Gorchakov, R., English, R., Frolov, I., ja Frolova, E. (2007). Development of Sindbis viruses encoding nsP2/GFP chimeric proteins and their application for studying nsP2 functioning. *J. Virol.* *81*, 5046–5057.
- Van Bortel, W., Dorleans, F., Rosine, J., Bateau, A., Rousseau, D., Matheus, S., Leparcoffart, I., Flusin, O., Prat, C.M., Césaire, R., et al. (2014). Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. *Euro Surveill.* *19*.
- Brackney, D.E., Scott, J.C., Sagawa, F., Woodward, J.E., Miller, N.A., Schilkey, F.D., Mudge, J., Wilusz, J., Olson, K.E., Blair, C.D., et al. (2010). C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *4*, 24–27.
- Chen, K.C., Kam, Y.-W., Lin, R.T.P., Ng, M.M.-L., Ng, L.F., ja Chu, J.J.H. (2013a). Comparative analysis of the genome sequences and replication profiles of chikungunya virus isolates within the East, Central and South African (ECSA) lineage. *Virol. urnal* *10*.
- Chen, R., Wang, E., Tsetsarkin, K.A., ja Weaver, S.C. (2013b). Chikungunya Virus 3' Untranslated Region: Adaptation to Mosquitoes and a Population Bottleneck as Major Evolutionary Forces. *PLoS Pathog.* *9*, 1–11.
- Cristea, I.M., Carroll, J.W.N., Rout, M.P., Rice, C.M., Chait, B.T., ja MacDonald, M.R. (2006). Tracking and elucidating Alphavirus-host protein interactions. *J. Biol. Chem.* *281*, 30269–30278.
- Das, P.K., Merits, A., ja Lulla, A. (2014). Functional cross-talk between distant domains of chikungunya virus non-structural protein 2 is decisive for its RNA-modulating activity. *J.*

Biol. Chem. 289, 5635–5653.

Diallo, M., Thonnon, J., Traore-lamizana, M., ja Fontenille, D. (1999). Vectors of chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 281–286.

Economopoulou, A., Dominguez, M., Helynck, B., Sissoko, D., Wichmann, O., Quenel, P., Germonneau, P., ja Quatresous, I. (2009). Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Réunion. *Epidemiol. Infect.* 137, 534–541.

Ekström, M., Liljeström, P., ja Garoff, H. (1994). Membrane protein lateral interactions control Semliki Forest virus budding. *EMBO J.* 13, 1058–1064.

Firth, A.E., Chung, B.Y., Fleeton, M.N., ja Atkins, J.F. (2008). Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. *Virol J* 5, 108.

Frolov, I., Hardy, R., ja Rice, C.M. (2001). Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA* 1638–1651.

Frolova, E., Gorchakov, R., Garmashova, N., Atasheva, S., Vergara, L.A., ja Frolov, I. (2006). Formation of nsP3-Specific Protein Complexes during Sindbis Virus Replication Formation of nsP3-Specific Protein Complexes during Sindbis Virus Replication. *J Virol* 80, 4122–4134.

Frolova, E.I., Gorchakov, R., Pereboeva, L., Atasheva, S., ja Frolov, I. (2010). Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *J. Virol.* 84, 11679–11695.

Fros, J.J., Liu, W.J., Prow, N. a, Geertsema, C., Ligtenberg, M., Vanlandingham, D.L., Schnettler, E., Vlak, J.M., Suhrbier, A., Khromykh, A. a, et al. (2010). Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. *J. Virol.* 84, 10877–10887.

Fros, J.J., Domeradzka, N.E., Baggen, J., Geertsema, C., Flipse, J., Vlak, J.M., ja Pijlman, G.P. (2012). Chikungunya virus nsP3 blocks stress granule assembly by recruitment of G3BP into cytoplasmic foci. *J. Virol.* 86, 10873–10879.

Hardy, R.W., ja Rice, C.M. (2005). Requirements at the 3' End of the Sindbis Virus Genome for Efficient Synthesis of Minus-Strand RNA. *J. Virol.* 79, 4630–4639.

Her, Z., Kam, Y., Lin, R.T.P., ja Ng, L.F.P. (2009). Chikungunya: a bending reality. *Microbes*

Infect. 11, 1165–1176.

Hong, E.M., Perera, R., ja Kuhn, R.J. (2006). Alphavirus capsid protein helix I controls a checkpoint in nucleocapsid core assembly. *J. Virol.* 80, 8848–8855.

Jose, J., Snyder, J., ja Kuhn, R. (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Futur. Microbiol* 4, 30.

Kallio, K., Hellström, K., Balistreri, G., Spuul, P., Jokitalo, E., ja Ahola, T. (2013). Template RNA length determines the size of replication complex spherules for Semliki Forest virus. *J. Virol.* 87, 9125–9134.

Karpe, Y.A., Aher, P.P., ja Lole, K.S. (2011). NTPase and 5'-RNA triphosphatase activities of chikungunya virus nsP2 protein. *PLoS One* 6.

Kongtorp, R.T., Stene, A., Andreassen, P.A., Aspehaug, V., Graham, D.A., ja Lyngstad, T.M. (2010). Lack of evidence for vertical transmission of SAV 3 using gametes of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., exposed by natural and experimental routes. *J. Fish Dis.* 33, 879–888.

Laakkonen, P., Ahola, T., ja Kääriäinen, L. (1996). The effects of palmitoylation on membrane association of Semliki Forest virus RNA capping enzyme. *J. Biol. Chem.* 271, 28567–28571.

Lampio, A., Kilpeläinen, I., Pesonen, S., Karhi, K., Auvinen, P., Somerharju, P., ja Kääriäinen, L. (2000). Membrane binding mechanism of an RNA virus-capping enzyme. *J. Biol. Chem.* 275, 37853–37859.

Lemm, J.A., Rumenapf, T., Strauss, E.G., Strauss, J.H., ja Rice, C.M. (1994). Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *EMBO J.* 13, 2925–2934.

Lobigs, M., Zhao, H.X., ja Garoff, H. (1990). Function of Semliki Forest virus E3 peptide in virus assembly: replacement of E3 with an artificial signal peptide abolishes spike heterodimerization and surface expression of E1. *J. Virol.* 64, 4346–4355.

Malet, H., Coutard, B., Jamal, S., Dutartre, H., Papageorgiou, N., Neuvonen, M., Ahola, T., Forrester, N., Gould, E. a, Lafitte, D., et al. (2009). The crystal structures of Chikungunya and Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket. *J. Virol.* 83, 6534–6545.

Mayuri, Geders, T.W., Smith, J.L., ja Kuhn, R.J. (2008). Role for conserved residues of sindbis virus nonstructural protein 2 methyltransferase-like domain in regulation of minus-strand synthesis and development of cytopathic infection. *J. Virol.* 82, 7284–7297.

Montgomery, S. a., Berglund, P., Beard, C.W., ja Johnston, R.E. (2006). Ribosomal protein S6 associates with alphavirus nonstructural protein 2 and mediates expression from alphavirus messages. *J. Virol.* *80*, 7729–7739.

Nasar, F., Palacios, G., Gorchakov, R. V., Guzman, H., Da Rosa, a. P.T., Savji, N., Popov, V.L., Sherman, M.B., Lipkin, W.I., Tesh, R.B., et al. (2012). Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 14622–14627.

Niesterst, H.G.M., ja Strauss, J.H. (1990). Mutagenesis of the conserved 51-nucleotide region of Sindbis virus. *J. Virol.* *64*, 1639–1647.

Niesterst, H.G.M., ja Strauss, J.H. (1990). Defined mutations in the 5' nontranslated sequence of Sindbis virus RNA. Defined Mutations in the 5' Nontranslated Sequence of Sindbis Virus RNA. *J. Virol.* *64*, 4162–4168.

Nikonov, A., Mölder, T., Sikut, R., Kiiver, K., Männik, A., Toots, U., Lulla, A., Lulla, V., Utt, A., Merits, A., et al. (2013). RIG-I and MDA-5 Detection of Viral RNA-dependent RNA Polymerase Activity Restricts Positive-Strand RNA Virus Replication. *PLoS Pathog.* *9*.

Owen, K.E., ja Kuhn, R.J. (1997). Alphavirus budding is dependent on the interaction between the nucleocapsid and hydrophobic amino acids on the cytoplasmic domain of the E2 envelope glycoprotein. *Virology* *230*, 187–196.

Pastorino, B.A.M., Peyrefitte, C.N., Almeras, L., Grandadam, M., Rolland, D., Tolou, H.J., ja Bessaud, M. (2008). Expression and biochemical characterization of nsP2 cysteine protease of Chikungunya virus. *Virus Res.* *131*, 293–298.

Peränen, J., Takkinen, K., Kalkkinen, N., ja Kaariainen, L. (1988). Semliki Forest virus-specific non-structural protein nsP3 is a phosphoprotein. *J. Gen. Virol.* *69*, 2165–2178.

Peränen, J., Rikkonen, M., Liljeström, P., ja Kääriäinen, L. (1990). Nuclear localization of Semliki Forest virus-specific nonstructural protein nsP2. *J. Virol.* *64*, 1888–1896.

Perera, R., Owen, K.E., Timothy, L., Gorbalenya, A.E., Richard, J., Tellinghuisen, T.L., ja Kuhn, R.J. (2001). Alphavirus Nucleocapsid Protein Contains a Putative Coiled Coil  $\alpha$ -Helix Important for Core Assembly. *J. Virol.* *75*, 1–10.

Pfeffer, M., Kinney, R.M., ja Kaaden, O.-R. (1998). The Alphavirus 3'-Nontranslated Region:

Size Heterogeneity and Arrangement of Repeated Sequence Elements. *Virology* 108, 100–108.

Powers, A.M. (2015). Risks to the Americas associated with the continued expansion of chikungunya virus. *J. Gen. Virol.* 96, 1–5.

Powers, A.M., ja Logue, C.H. (2007). Changing patterns of chikunya virus: Re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J. Gen. Virol.* 88, 2363–2377.

Powers, A.N.N.M., Brault, A.C., Shirako, Y., Ellen, G., Kang, W., Strauss, J.H., Scott, C., Powers, A.N.N.M., ja Strauss, E.G. (2001). Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. *J. Virol.* 75, 10118–10131.

Renault, P., Solet, J.L., Sissoko, D., Balleydier, E., Larrieu, S., Filleul, L., Lassalle, C., Thiria, J., Rachou, E., De Valk, H., et al. (2007). A major epidemic of chikungunya virus infection on Réunion Island, France, 2005-2006. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 727–731.

Rubach, J.K., Wasik, B.R., Rupp, J.C., Kuhn, R.J., Richard, W., ja Smith, J.L. (2009). Characterization of purified Sindbis Virus nsP4 RNA-dependent RNA Polymerase activity in vitro. *Virology* 384, 201–208.

Rupp, J.C., Sokoloski, K.J., Gebhart, N.N., ja Hardy, R.W. (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J. Gen. Virol.* 96, 2483–2500.

Russo, A.T., White, M.A., ja Watowich, S.J. (2006). The Crystal Structure of the Venezuelan Equine Encephalitis Alphavirus nsP2 Protease. *Structure* 14, 1449–1458.

Sahadeo, N.S.D., Allicock, O.M., De Salazar, P.M., Auguste, A.J., Widen, S., Olowokure, B., Gutierrez, C., Valadere, A.M., Polson-Edwards, K., Weaver, S.C., et al. (2017). Understanding the evolution and spread of chikungunya virus in the Americas using complete genome sequences. *Virus Evol.* 3, 1–10.

Sawicki, D.L., ja Gomatos, P.J. (1976). Replication of Semliki Forest Virus : Polyadenylate in Plus- Strand RNA and Polyuridylylate in Minus-Strand RNA. *J. Virol.* 20, 446–464.

Sawicki, D.L., ja Sawicki, S.G. (1980). Short-lived minus-strand polymerase for Semliki Forest virus. *J. Virol.* 34, 108–118.

Saxton-Shaw, K.D., Ledermann, J.P., Borland, E.M., Stovall, J.L., Mossel, E.C., Singh, A.J., Wilusz, J., ja Powers, A.M. (2013). O’nyong nyong Virus Molecular Determinants of Unique Vector Specificity Reside in Non-Structural Protein 3. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7.

- Shin, G., Yost, S. a., Miller, M.T., Elrod, E.J., Grakoui, a., ja Marcotrigiano, J. (2012). Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 16534–16539.
- Shirako, Y., ja Strauss, J.H. (1994). Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *J. Virol.* *68*, 1874–1885.
- Simizu, B., Yamamoto, K., Hashimoto, K., ja Ogata, T. (1984). Structural proteins of Chikungunya virus. *J Virol* *51*, 254–258.
- Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L., ja Devaux, C. (2009). Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virology* *36*, 490–499.
- Spuul, P., Salonen, A., Merits, A., Jokitalo, E., Kääriäinen, L., ja Ahola, T. (2007). Role of the amphipathic peptide of Semliki forest virus replicase protein nsP1 in membrane association and virus replication. *J. Virol.* *81*, 872–883.
- Spuul, P., Balistreri, G., Hellström, K., Golubtsov, A. V, Jokitalo, E., ja Ahola, T. (2011). Assembly of alphavirus replication complexes from RNA and protein components in a novel trans-replication system in mammalian cells. *J. Virol.* *85*, 4739–4751.
- Strauss, J.H., ja Strauss, E.G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* *58*, 491–562.
- Tomar, S., Hardy, R.W., Smith, J.L., ja Kuhn, R.J. (2006). Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsP4 possesses terminal adenylyltransferase activity. *J. Virol.* *80*, 9962–9969.
- Tsetsarkin, K.A., Vanlandingham, D.L., Mcgee, C.E., ja Higgs, S. (2007). A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLoS Pathog.* *3*, 1895–1906.
- Uchime, O., Fields, W., ja Kielian, M. (2013). The role of E3 in pH protection during alphavirus assembly and exit. *J. Virol.* *87*, 10255–10262.
- Utt, A., Quirin, T., Saul, S., Hellström, K., Ahola, T., ja Merits, A. (2016). Versatile Trans-Replication Systems for Chikungunya Virus Allow Functional Analysis and Tagging of Every Replicase Protein. *PLoS One* *11*, 1–27.
- Vasiljeva, L., Merits, A., Auvinen, P., ja Kääriäinen, L. (2000). Identification of a novel

function of the Alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *J. Biol. Chem.* 275, 17281–17287.

Vasiljeva, L., Merits, A., Golubtsov, A., Sizemskaja, V., Kääriäinen, L., ja Ahola, T. (2003). Regulation of the Sequential Processing of Semliki Forest Virus Replicase Polyprotein. *J. Biol. Chem.* 278, 41636–41645.

Vazeille, M., Moutailler, S., Coudrier, D., Rousseaux, C., Khun, H., Huerre, M., Thiria, J., Fontenille, D., Schuffenecker, I., Despres, P., et al. (2007). Two Chikungunya Isolates from the Outbreak of La Reunion (Indian Ocean) Exhibit Different Patterns of Infection in the Mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One* 11, 1–9.

Volk, S.M., Chen, R., Tsetsarkin, K.A., Adams, A.P., Garcia, T.I., Sall, A.A., Nasar, F., Schuh, A.J., Holmes, E.C., Higgs, S., et al. (2010). Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates. *J. Virol.* 84, 6497–6504.

Wang, Y.F., Sawicki, S.G., ja Sawicki, D.L. (1994). Alphavirus nsP3 functions to form replication complexes transcribing negative-strand RNA. *J. Virol.* 68, 6466–6475.

Weiss, B., Geigenmüller-gnirke, U., ja Schlesinger, S. (1994). Interactions between Sindbis virus RNAs and a 68 amino acid derivative of the viral capsid protein further defines the capsid binding site. *Nucleic Acids Res.* 22, 780–786.

## LIHTLITSENTS

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

Mina Hele-Liis Aavasalu

(sünnikuupäev: 16.10.1989)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

**Chikungunya viiruse *trans*-replikaasi süsteemi optimeerimine Aag2 ja C6/36 rakkudes ning Chikungunya viiruse ja Semliki Forest viiruse replikaaside võrdlus U2OS rakkudes,**

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **29.05.2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 29.05.2017