

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

Mona Teppor

**Vahetatud domeenidega alfaviirustes tekkinud kompensatoorsete mutatsioonide mõju
uurimine**

Magistritöö geenitehnoloogia erialal (30 EAP)

Juhendaja MD, DSc Eva Žusinaite

TARTU 2016

INFOLEHT

Vahetatud domeenidega alfaviirustes tekkinud kompensatoorsete mutatsioonide mõju uurimine

Eelnevalt oli leitud 10 kompensatoorset mutatsiooni, mis tekkisid vahetatud domeenidega alfaviiruste adapteerimisel. Need mutatsioonid viidi ükshaaval esialgsesse viirusesse, et uurida, kuidas leitud asendused mõjutavad viiruse elujõulisust ja omadusi. Võrreldi viiruste infektsioonilisust, nakkuse käiku, virionide moodustamise võimet, replikatsiooniefektiivsust ja kasvudünaamikat. Identifitseeriti 5 mutatsiooni, mis taastasid algse nõrga viiruse infektsioonilisuse, olles kasulikud erinevates nakkustsükli etappides. Leiti mutatsioonialdis piirkond, mis võis ühe viiruse kontekstis oluliselt tõsta viiruse edukust. Saadud tulemuste ja avaldatud kirjanduse põhjal arutleti kompensatoorsete mutatsioonide võimaliku rolli ja tähtsuse üle, pakkudes välja oletusi selle kohta, kuidas asendused viiruse elutsükli eri samme mõjutavad.

Märksõnad: alfaviirused, mittestruktuursed valgud, domeenide vahetamine, kompensatoorsed mutatsioonid.

CERCS kood: Biomeditsiin B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Studying the effects of compensatory mutations found in alphaviruses with swapped domains

Previously, 10 adaptive compensatory mutations were described in alphaviruses with swapped domains. These mutations were introduced individually to original viruses, to study their effects on virus viability and characteristics. Infectivity, infection traits, virion production, replication efficiency, and growth dynamics were compared. 5 mutations were identified which rescued the initial virus' infectivity and were useful in different stages of the infection cycle. A mutational hotspot possibly aiding one swapped virus was found. The results were discussed in the light of literature, proposing possible ways in which the mutations affect certain steps in the viral life cycle.

Keywords: alphaviruses, nonstructural proteins, domain swapping, compensatory mutations.

CERCS code: Biomedicine B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1. Alfaviirused	6
1.1. Üldiseloomustus	6
1.2. Virion.....	7
1.3. Genoom	8
1.4. Infektsioonitsükkel	9
1.5. Mittestruktuursed valgud.....	12
EKSPERIMENTAALNE OSA	14
1. Töö eesmärgid	14
2. Materjalid ja meetodid.....	15
3. Tulemused ja arutelu	24
KOKKUVÕTE	43
SUMMARY	44
KASUTATUD KIRJANDUS	46
LISAD	53
LIHTLITSENTS.....	55

LÜHENDID

ah – aminohappejääk

BHK – *baby hamster kidney*, beebihamstri neerurakud

CHIKV – Chikungunya viirus

CMC – *carboxymethyl cellulose*, karboksümetüülselluloos

CPE – *cytopathic effect*, tsütopaatiline efekt

CPV – *cytopathic vacuole type I*, I tüüpi tsütopaatiline vakuool

ER – endoplasmaatiline retiikulum

FCS – *fetal calf serum*, veise loote seerum

Fluc – *Firefly* lutsiferaas

Gluc – *Gaussia* lutsiferaas

GMEM – *Glasgow Modified Eagle's medium*

ICA – *infectious center assay*, infektsioonitsentrite analüüs

icDNA – *infectious complementary DNA*, infektsiooniline komplementaarne DNA

kb – *kilobase*, kiloalus

nsP – *nonstructural protein*, mittestruktuurne valk

NTD – N-terminaalne domeen

ORF – *open reading frame*, avatud lugemisraam

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

pfu – *plaque forming unit*, lüüsilaiaku moodustav ühik

PIPE-PCR – *Polymerase Incomplete Primer Extension PCR*, polümeraasi ebatäieliku praimeriekstensiooni PCR

polü(A) – polü-adenosiini järjestus

RC – *replicase complex*, replikaasi kompleks

RLU – *relative light unit*, suhteline valgusühik

SFV – Semliki Forest viirus

sg – subgenoomne

SINV – Sindbis viirus

ZBD – *zinc-binding domain*, tsingiga seondumise domeen

UTR – *untranslated region*, mittetransleeritav ala

wt – *wild-type*, metsiktüüpi

SISSEJUHATUS

Viirused on objektid elus ja eluta looduse piiril. Nad on rakusisesed parasiidid, olles võimetud iseseisvalt paljunema. Samas sisaldavad viirused geneetilist materjali, mis paljunemisel evolutsioneeruda võib. Viiruseid on kordades rohkem kui teisi eluslooduse riikide esindajaid ja nad nakatavad neist pea kõiki.

Alfaviirused on perekond üheaahelalise positiivse polaarsusega RNA genoomiga viiruseid. Nende sekka kuulub üle 30 liigi, millest paljud on inimesele ja loomadele ohtlikud patogeenid. Alfaviirused nakatavad nii kalu, linde, imetajaid kui selgrootuid, kasutades viimaseid vektorina pärisperemeeste vahel levimiseks. Alfaviiruste lihtne ehitus ja väike genoom võimaldab uurida neid mudelobjektidena viroloogias ja molekulaarbioloogias.

Alfaviiruste elutsükli üks olulisemaid osi on mittestruktuursete valkude süntees ja töötlemine replikaasi kompleksiks, mis viiruse RNAd paljundab. Valkude vaheliste interaktsioonide uurimiseks konstrueeriti varasemalt vahetatud valgudomeenidega viirused, mida adapteeriti ja milles tehti kindlaks 10 kompensatoorset mutatsiooni eri kombinatsioonides.

Antud töö teoreetilises osas kirjeldatakse alfaviiruste omadusi, sealhulgas virioni, genoomi, infektsioonitsükli ja mittestruktuurset valke. Eksperimentaalne osa käsitleb kompensatoorsete mutatsioonide mõju analüüsimist esialgsetele vahetatud domeenidega viirustele. Lisaks arutletakse mutatsioonide võimaliku rolli üle viiruse elutsükli. Töö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis RNA-viiruste uurimisgrupis.

Töö eesmärk on võrrelda kompensatoorsete mutatsioonidega viiruseid ja pakkuda tulemuste põhjal välja oletusi selle kohta, mida ja millises etapis mutatsioonid viiruse jaoks muuta võiksid.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. Alfaviirused

1.1. Üldisloomustus

Perekonna *Alphavirus* liikmetel on üheaheelalise positiivse polaarsusega RNA genoom, mis on 11–12 kb (*kilobase*, kiloalus) suurune. Alfaviirused kuuluvad togaviiruste sugukonda, olles praegu esindatud 31 liigi poolt, millest paljud on inimestele ja loomadele ohtlikud patogeenid (King jt, 2012).

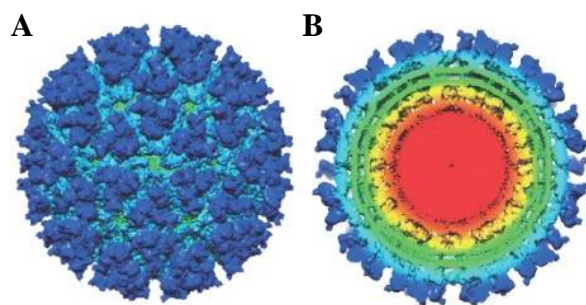
Enamasti levivad alfaviirused oma selgroogsete pärisperemeeste vahel lüljalgsete vektorite kaudu – nad on *arthropod-borne* ehk arboviirused. Vektoriks on tavaliselt *Aedes* või *Culex* perekonna sääsed ja peremeesteringi kuuluvad nii imetajad kui ka linnud ja kalad. Selgrootutes alfaviirused haigusnähte ei põhjusta, viirus vaid paljuneb putuka organismis ja kandub hammustuse kaudu järgmisele selgroogsele peremehele, kelles tekivad nakkuse järel aga erineva raskusastmega sümptomid ja kelle puhul infektsioon võib lõppeda organismi surmaga.

Geograafilise leviku alusel jaotatakse soojaverelisi loomi nakatavad alfaviirused Vana Maaailma ja Uue Maaailma alfaviirusteks. Vana Maaailma viiruseid leidub Euroopas, Aasias, Aafrikas ja Austraalias ning nende hulka kuuluvad näiteks tüüpviirus Semliki Forest viirus (SFV), inimest ohustav patogeen Chikungunya viirus (CHIKV) ja laialt levinud Sindbis viirus (SINV) (Strauss ja Strauss, 1994). Selle rühma viiruste põhjustatud haiguseid iseloomustab küll suhteliselt madal suremus, samas aga põhjustavad need viirused kurnavaid sümptomeid, nagu palavik, pea-, lihas- ja liigesvalu ning lööve, kusjuures tüsistused võivad kesta kuid või aastaid. Varem vaid piiratud aladel Aafrikas ja Aasias ringelnud CHIKV on viimase kümnendi jooksul levinud nii Kagu-Aasiasse, Indiasse, Kariibi mere riikidesse kui Euroopasse ja Ameerikasse (Waggoner ja Pinsky, 2015; Weaver, 2014). Need epideemiad mõjutasid miljoneid inimesi ja kliimamuutuste tõttu suurenev vektori levila tähendab, et CHIKV meditsiiniline tähtsus aina suureneb (Waggoner ja Pinsky, 2015). Uue Maaailma alfaviirused levivad Põhja- ja Lõuna-Ameerikas ning nende nakkus võib peremehes põhjustada surmavat entsefaliiti. Siia rühma kuuluvad näiteks *Western Equine Encephalitis* viirus (WEEV), *Venezuelan Equine Encephalitis* viirus (VEEV) ja inimesele eriti ohtlik *Eastern Equine Encephalitis* viirus (EEEV). Kuna alfaviiruste epideemiaid ei peetud enne nende levila märgatavat suurenemist eriti suureks tervishoiuprobleemiks, pole siiani olemas efektiivseid vaktsiine ega ravimeid (Ahola jt, 2015).

Antud töös kasutatakse kolme Vana Maailma alfaviirust: põhiliselt SFVd, sellele fülogeneetiliselt suhteliselt lähedast CHIKVd ja veidi kaugemat sugulast SINVd (Luers jt, 2005). Neist esimest ja viimast on pikka aega uuritud mudelobjektina nii viroloogias kui laiemalt näiteks rakubioloogias paljude molekulaarsete protsesside mõistmiseks. Suhteliselt väike ja lihtne genoom, võime nakatada erinevaid rakutüüpe ja inimesele ohutute laboritüvede olemasolu kergendab oluliselt alfaviirustega töötamist. Nende uurimine on andnud palju teadmisi viiruste replikatsioonimehhanismide, infektsioonitsükli ja peremeesorganismis toimuva kohta. Samuti kirjeldati tänu just SFV uurimisele, kuidas viirused võivad raku siseneda endotsütoosi ja membraanide sulandumise abil (Helenius jt, 1980). Veel põhineb alfaviirustel mitmeid vektorsüsteeme ja vaktsiinikandidaate (Berglund jt, 1993; Atkins jt, 1999; Modrow jt, 2013).

1.2. Virion

Alfaviiruste virionid on 65–70 nm diameetriga kerajad osakesed (Joonis 1). Virion koosneb üheaheelalisest RNAst ja kapsiidist, mis moodustavad nukleokapsiidi, ning neid ümbritsevast lipiidsest kaksikkihist ehk ümbriest. Ikosaedriline nukleokapsiid sisaldab genoomiga seostunud 240 kapsiidivalgu (C) koopiat. Ümbriis pärineb peremeesraku membraanist, mistõttu selle koostises on hulgaliselt sfingolipiide ja kolesterooli. Ümbriist läbistavad viiruse glükoproteiinid E1 ja E2, mis koonduvad ogataolitesse heterodimeeride kolmikutesse (Voss jt, 2010). Selliseid heterodimeere on samuti 240, võimaldades E2 valgu interakteerumist kapsiidivalguga virioni moodustumiseks (Jose jt, 2009; Jose jt, 2012). Lisaks seondub E2 rakulise retseptoriga ning abistab viiruse ja peremehe membraanide sulandumise protsessi, mida vahendab E1 valk (Helenius jt, 1980; Omar ja Koblet, 1988; Wahlberg, 1992; Li jt, 2010). Alfaviiruste virionid sisaldavad veel ka väiksemaid valke E3 (sõltuvalt liigist), 6K ja TF (*Transframe*), mis reguleerivad E1-E2 ogade moodustumist (McInerney jt, 2004; Snyder jt, 2013), kusjuures TF sünteesitakse translatsioonilise raaminihke tagajärjel.

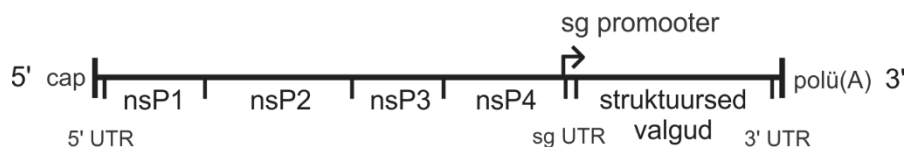


Joonis 1. Alfaviiruste virion. Näidatud on krüo-elektronmikroskoopia andmetel põhinev SINV struktuuri rekonstruktsioon. **A.** Radiaalselt värvitud 9 Å lahutusega virioni mudel. Siniseks on tehtud glükoproteiinide trimeeride ogad, rohelisena paistab ümbris. **B.** Ristlõige virioni keskelt. Sinisega on näidatud ümbrise glükoproteiinid, rohelisega ümbrise lipiidne kaksikkiht. Kollane märgib kapsiidivalgu kihti, oranžis alas on kapsiidivalk seostunud viiruse RNAGA, mis täidab ka virioni ülejäänud sisemuse ehk punase ala. (Jose jt, 2009; muudetud)

1.3. Genoom

Alfaviiruste genoom on 11,5–11,8 kb pikkune üheaheelaline lineaarne RNA molekul, millel on sarnaselt rakulistele mRNAdele olemas 5' *cap*-struktuur ja 3' polü(A) polü-adenosiini järjestuse saba (Joonis 2) (Strauss ja Strauss, 1994). Genoom sisaldab kahte avatud lugemisraami (ORF, *open reading frame*). Esimene ORF hõlmab genoomi 5' kaht kolmandikku ja kodeerib RNA sünteesi eest vastutavate mittestruktuursete valkude nsP1–4 (nsP, *nonstructural protein*) eellasvalku. See transleeritakse esmalt polüproteiinina, mis hiljem infektsioonitsükli käigus kindlate vaheastmete kaudu neljaks individuaalseks mittestruktuurseks valguks protsessitakse. nsP3 ja nsP4 kodeerivate järjestuste vahele jääb enamikel alfaviirustel opaal-stoppkoodon UGA, mis aga ümbritsevate sekundaarstruktuure moodustavate alade mõjul mõnikord vahele jäetakse. Selle tulemusena tehakse kaht sorti liitvalke: P123 ja P1234 (Strauss jt, 1983; Firth jt, 2011). Genoomi 3' kolmandikult ehk teiselt ORFilt saadakse struktuursete valkude eellane, kusjuures selle mRNAks on subgenoomne sgRNA, mille süntees algab negatiivse polaarsusega RNAI asuvalt sisemiselt promooterilt (Strauss jt, 1984). Ka sgRNAI on 5' *cap*- ja 3' polü(A) struktuurid.

Nii genoomi 5' ja 3' otsas kui kahe lugemisraami vahel on mittetransleeritavad järjestused (UTR, *untranslated region*), mis sekundaarstruktuuride moodustamise kaudu viiruse replikatsiooni ja transkriptsiooni reguleerivad, töötades muuhulgas promooteritena (Strauss ja Strauss, 1994).



Joonis 2. Alfaviiruste genoom ja sellelt kodeeritavad valgud. Alfaviiruste genoom on 11,5–11,8 kb pikkune üheaheelaline lineaarne RNA molekul. 5' otsas on *cap*-struktuur ja 3' otsas polü(A) saba. Genoomi 5' kaks kolmandikku kodeerib mittestruktuurseid valke nsP1–4, 3' kolmandik aga subgenoomse promooteri alt struktuurseid valke. Mõlemas genoomi otsas ja kodeerivate järjestuste vahel on mittetransleeritavad UTR alad.

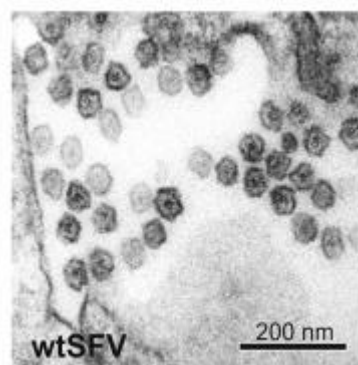
1.4. Infektsioonitsükkel

Sisenemine

Alfaviiruste infektsioonitsükkel algab viiruse seondumisega rakulisele retseptorile E2 valgu kaudu (Helenius jt, 1980). Täpne retseptor peremehes on enamike alfaviiruste jaoks teadmata ja võib liigiti ning nakatatava raku tüübiti erineda. Pärast kinnitumist siseneb viirusosake raku, kasutades klatriin-sõltuvat endotsütoosi (Helenius jt, 1980; DeTulleo ja Kirchhausen, 1998). Seejärel langeb endosoomides pH ja happelise keskkonna mõjul toimuvad viiruse ümbrise glükoproteiinide konformatsiooni muutused, mis viivad viiruse ja endosoomi membraanide ühinemiseni, vabastades nukleokapsiidi tsütoplasmasse (Wahlberg jt, 1992; Li jt, 2010). Kapsiid seotakse raku ribosoomidega ja lagundatakse kiirelt, millega ongi RNA genoom valmis käitumaks mRNA na viirusvalkude esimeseks sünteesiks (Singh ja Helenius, 1992).

Replikatsioonitsükkel

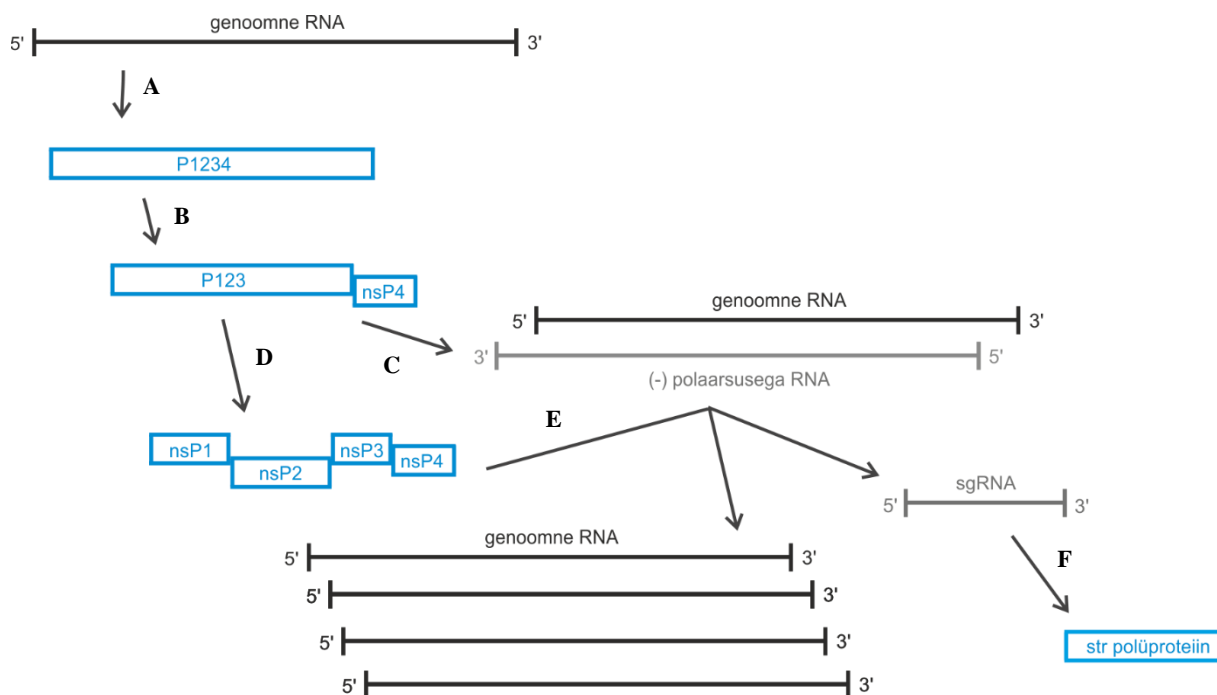
Alfaviiruste replikatsioon toimub tsütoplasmas rakulistel membraanidel, millega seondumist vahendab nsP1 (Salonen jt, 2005). Viiruse RNA ja nsPde mõjul korralduvad membraanid ümber iseloomulikeks endo- ja lüsoosomaalseteks struktuurideks, mida nimetatakse tüüp I tsütopaatilisteks vakuoolideks (CPV-I, *type I cytopathic vacuole*) (Froshauer jt, 1988; Spuul jt, 2011). Nende pinnale sopistuvad ümarad sfäärulid, kuhu kogunevad mittestruktuursed valgud ja teised viiruse RNA sünteesiks vajalikud komponendid, moodustades replikaasi kompleksi (RC, *replicase complex*) (Kujala jt, 2001). Arvatakse, et sfäärulid on vajalikud replikatsiooni vaheühendi, kaheaheelalise RNA kaitseks raku kaitsemehhanismide vastu ja ka replikatsioonifaktorite koondamiseks ühte piirkonda. Tekkemehhanism, tähtsus viiruse jaoks ning RNA, valkude ja peremehe toodetud molekulide täpne paigutus ja dünaamika nendes struktuurides pole aga täielikult selge. Tänu suurema lahutusvõimega meetodite arenemisele, näiteks elektronmikroskoopia abil, saab sfääruleid aina detailsemalt visualiseerida (Joonis 3) (Kallio jt, 2013), kuid viiruse elutsükli reaajas jälgimiseks pole veel piisavalt häid vahendeid.



Joonis 3. SFV sfäärulid. Metsiktüüpi ehk wt (*wild-type*) SFV nakkusega tekkinud sfäärulid on visualiseeritud korrelatiivse valgus- ja elektronmikroskoopia abil. (Kallio jt, 2013; muudetud)

Replikatsioonitsükli esimese sammuna transleeritakse virionist vabanenud genoomselt mRNAlt mittestruktuursete valkude eellasmolekul – P1234 polüproteiin (Joonis 4A). Liikides, kus enne nsP4 kodeerivat järjestust esineb stoppkoodon, sünteesitakse palju suuremal hulgal P123 liitvalku ja täispika P1234 kogust reguleeritakse terminaatori läbilugemise kaudu (Strauss jt, 1983). See liitvalk protsessitakse edasi kindlas ajalisel ja etappide järgnevuses määratud vahemolekulide kaudu individuaalseteks mittestruktuurseteks valkudeks nsP1–4 (Vasiljeva jt, 2003; Merits jt, 2001). Need vahe- ja lõppühendid teostavad ja reguleerivad viiruse RNA sünteesi.

Polüproteiini töötlemine algab autokatalüütilise lõikamisega nsP3 ja nsP4 vahel (Joonis 4B) (Takkinen jt, 1991). Nii seda kui järgmisi lõikereaktsioone viib läbi viiruse proteaas nsP2. Vabanenud nsP4 – viiruse RNA polümeraas – moodustab järelejäänud P123 liitvalguga varajase replikaasi kompleksi, mis sünteesib viiruse genoomilt negatiivse polaarsusega RNAd, kusjuures tulemusena tekib kaheaahelaline RNA (Sawicki ja Sawicki, 1980) (Joonis 4C). Ilma selle lõikeetapita ei suuda polüproteiinid RNAd teha ja seega on nii üksik P123 kui protsessimata P1234 mõlemad võimetud RNAd sünteesima (Shirako ja Strauss, 1994). Varajase replikaasi eluiga on lühike ja see töödeldakse nsP2 poolt suhteliselt ruttu edasi individuaalseteks nsPdeks, mis ühinevad positiivseid ahelaid sünteesivaks RCks (Takkinen jt, 1991; Shirako ja Strauss, 1994; Vasiljeva jt, 2003) (Joonis 4D). Nüüd transkribeeritakse suurel hulgal nii täispikkasid uusi viiruse genoome, mis koos struktuursete valkudega uutesse virionidesse pakitakse, kui sg RNAsid, millelt neid valke transleeritakse (Joonis 4E ja F). Kasutatav promooter negatiivsel ahelal valitakse nsP4 poolt, mis seondub neile erinevate saitide kaudu (Li ja Stollar, 2007).



Joonis 4. Alfaviiruste replikatsioonitsükkel. Skemaatiliselt on näidatud mittestruktuursete valkude translatsioon ja töötlemine funktsionaalseteks replikaasi kompleksideks, viiruse RNAde süntees ja struktuurse polüproteiini teke. Hallides toonides on kujutatud viiruse RNAd, sinistes valgud. **A.** Esmalt sünteesitakse viiruse geoomselt mRNAlt mittestruktuursete valkude eellasmolekul – polüproteiin P1234. **B.** Polüproteiin lõigatakse katalüütiliselt ja vabaneb viiruse polümeraas nsP4, mis P123ga kompleksis moodustab varajase replikaasi. **C.** Varajane replikaas sünteesib negatiivse polaarsusega RNA, kasutades matriitsina viiruse geoomi. **D.** Varajane replikaas protsessitakse individuaalseteks nsPdeks (1–4), mis moodustavad positiivseid ahelaid sünteesiva replikaasi kompleksi (RC). **E.** RC sünteesib negatiivselt RNA ahelalt subgeoomset sgRNAd, kasutades sg promooterit, ja täispikka geoomset RNAd, mis virioni pakitakse. **F.** sgRNAlt transleeritakse viiruse struktuursete valkude eellane, joonisel tähistatud kui str polüproteiin, mis töödeldakse virioni moodustumises osalevateks valkudeks.

Polüproteiinide, vaheühendite ja varajase replikaasi hulka reguleeritakse lõikamise kiiruse ja järjekorra kaudu, mis sõltub nsP2 kogusest. Nagu mainitud, püsib P123+nsP4 kompleks vaid lühikest aega aktiivsena ja iga selline kompleks sünteesib ilmselt vaid ühe negatiivse ahela. Üldse sünteesivad alfaviirused negatiivseid ahelaid vaid vähesel hulgal ja lühikese aja jooksul. Infektsioonitsükli edenedes lõpetatakse täielikult varajase replikaasi ja sellega koos ka negatiivsete ahelate tegemine. Kõik positiivse ahela replikaasid pärinevad seega nakkuse algul toodetud varajastest RCdest, kuid on erinevalt nendest stabiilsed ja püsivad aktiivsetena kuni infektsiooni lõpuni (Sawicki ja Sawicki, 1980).

Virioni pakkimine ja väljumine

Virioni moodustumiseks vajalikud struktuursed valgud transleeritakse sgRNAlt polüproteiinina, millelt autoproteolüütiliselt vabaneb kapsiidivalk C (Melancon ja Garoff, 1987). C interakteerub geoomse RNA pakkimissignaali, misjärel valk multimeriseerub ja

moodustub ikosaedriline nukleokapsiid (Weiss jt, 1994; Frolova jt, 1997). Ülejäänud liitvalgu otsas paljastub lõikamisega endoplasmaatilisele retiikulumile (ERile) saatmise signaaljärjestus (Garoff jt, 1990). ERis töötlevad struktureid valke raku ensüümid – toimub glükosüleerimine, palmitoüleerimine ja lõikamine. Tekib E2 ja E3 eelvalk p62, mis saadetakse koos vaba E1ga edasi Golgi kompleksi. E3 lõigatakse lahti ning E1 ja E2 moodustavad heterodimeere, mis liiguvad koos teiste virionis sisalduvate ümbrisevalkudega rakumembraanile (Zhang jt, 2003). Seal tekivad ümbrise glükoproteiinidega rikastatud piirkonnad, kuhu liiguvad E2ga seonduma uued nukleokapsiidid. Lõpuks algab viirusosakeste pungumine: plasmamembraan kaardub ümber nukleokapsiidi, kuni ümbris sulgub ja virion vabaneb raku pinnalt väliskeskkonda.

1.5. Mittestruktuursed valgud

Alfaviiruste neli mittestruktuurset valku täidavad mitmesuguseid unikaalseid ja vajalikke ülesandeid nii eelkõige viiruse replikatsioonis kui ka infektsioonitsükli laiemalt. Need valgud on modulaarse ülesehitusega – nad koosnevad struktuursetest ja funktsionaalsetest üksustest ehk domeenidest. nsPde ülesanded ja ensümaatilised aktiivsused on tänu põhjalikule uurimistegevusele suhteliselt hästi teada, kuid siiski on mõne domeeni rollid ja ka valkude täpsed omavahelised interaktsioonid jäänud mõnevõrra ebaselgeks.

nsP1 on SFV puhul 537 aminohappejäägi (ah) pikkune ja vastutab eelkõige positiivsetele RNA ahelatele *cap*-struktuuri lisamise ning replikaasi kompleksi rakulistele membraanidele seondamise eest. Esimest ülesannet neist võimaldab valgul täita tema N-terminaalse osa metüül- ja guanüülültransferaasne aktiivsus (Ahola jt, 1997), RC ankurdamisel on oluline aga sellele domeenile järgnev amfipaatne heeliks ning palmitoüleerimissait (Spuul jt, 2007). Lisaks interakteerub nsP1 viiruse polümeraasi ehk nsP4ga, osaledes negatiivsete ahelate sünteesil promooteri äratundmises (Wang jt, 1991).

nsP2 (SFV näitel 798 ah) osaleb paljudes olulistes etappides viiruse elutsükli. Valgu üks olulisemaid funktsioone on mittestruktuursete polüproteiinide lõikamine, seda teostav proteaasne Pro domeen asub nsP2 C-terminaalses osas (Ding ja Schlesinger, 1989; Hardy ja Strauss, 1989). N-terminaalne pool töötab RNA-trifosfaasina *cap*-struktuuri lisamisel ja NTPaasina ning helikaasina RNA replikatsioonil (Rikkonen jt, 1994; Gomez de Cedron jt, 1999; Vasiljeva jt, 2000). Kõige äärmine N-terminaalne domeen NTD aitab arvatavasti teisi domeene nende rolle täita, näiteks võimaldab proteaasil saavutada suuremat ensümaatilist aktiivsust (Das jt, 2014). Veel osaleb nsP2 transkriptsioonifaktorina sgRNA sünteesil ja liigub ka raku tuuma, kus pärsib peremeesraku transkriptsiooni (Suopanki jt, 1988; Rikkonen jt, 1992; Akhrymuk jt, 2012).

nsP3 (SFV puhul 482 ah) funktsioonide kohta on seni kõige vähem teada. Valgul on kolm domeeni: N-terminaalne macro domeen, keskosa tsingiga seondumise domeen (ZBD, *zinc-binding domain*) ja C-terminaalne hüpervarieeruv domeen. Macro domeeni järjestus on alfaviiruste ja ka mõnede teiste viiruste seas suhteliselt konserveerunud ja selle homolooge leidub kõigis eluslooduse riikide esindajates (Strauss jt, 1988; Pehrson ja Fuji, 1998). Leitud ensümaatiliste aktiivsuste ja struktuuri alusel arvatakse, et macro domeeni funktsioon on RNA sidumine (Malet jt, 2009). Macro domeeni on vaja nsP2 ja nsP3 vaheliseks lõikamiseks ning lisaks osaleb see interaktsioonides peremehega, täpsemalt neuronite nakatamise ja seal paljunemise tagamises (Lulla jt, 2012; Park ja Griffin, 2009). ZBD järjestus on samuti alfaviirustes äärmiselt ühtne ja seda domeeni vajatakse viiruse elutsükli erinevate etappide toimimiseks, kuigi täpsemad töömehhanismid veel selged pole (Shin jt, 2012). Viiruse ja peremehe vahelisi kokkupuuteid reguleerib tõenäoliselt ka nsP3e hüpervarieeruv domeen. On teada, et selle struktuur on organiseerimata ja järjestus varieerub alfaviiruste seas suuresti. Ainsa alfaviiruste nsPna fosforüleeritakse nsP3e, mis eri viiruste ja peremeeste puhul täidab erinevaid varieeruva tähtsusega rolle (Peränen jt, 1988).

nsP4 (SFV näitel 614 ah) on viiruse RNA sõltuv RNA polümeraas, mis sünteesib kõiki viiruse RNAsid, kasutades matriitsina nii negatiivse polaarsusega ahelat kui positiivset genoomset RNAd. Valgu ~100 N-terminaalset ah-d ja ka C-terminaalse polümeraasi osa järjestused on alfaviiruste seas konserveerunud (O'Reilly ja Kao, 1998). Vaba nsP4 leidub rakus märgatavalt vähem kui teisi nsPsid, sest esiteks sünteesitakse enamikel alfaviirustel teda vaid eelnevat stoppkoodonit ignoreerides ja teiseks lagundatakse üksik nsP4 kiiresti N-otsa reegli rajas (Strauss jt, 1983; de Groot jt, 1991; Gonda jt, 1989). Replikaasi kompleksis valk stabiliseeritakse ja samuti on teisi nsPsid vaja selleks, et nsP4 suudaks RNAd sünteesida (Rubach jt, 2009). N-terminaalne osa valgust osaleb mitmesugustes interaktsioonides nii teiste nsPdega, näiteks nsP1ga negatiivsete ahelate sünteesil ja nsP2ga sg promooteri äratundmisel, kui ka peremeesorganismi faktoritega (Wang jt, 1991; Suopanki jt, 1998; Li ja Stollar, 2007; Rupp jt, 2011).

EKSPERIMENTAALNE OSA

1. Töö eesmärgid

Alfaviiruste mittestruktuurset valke ja replikaasi kompleksi tööd on suhteliselt palju uuritud, kuid valkude omavaheliste interaktsioonide kohta on teada veel väga vähe. Samuti on oluline täpsemalt mõista, kuidas toimub viiruse nsPde eellasvalgu töötlemine ja mille jaoks on vajalikud mõned vähem uuritud domeenid.

Antud töös uuriti vahetatud domeenidega viirustes adapteerimise tulemusena tekkinud kompensatoorsete mutatsioonide mõju viiruse infektsiooni omadustele. Selleks viidi leitud asendused ükshaaval algsetesse viirusesse. Niimoodi muudetud viiruseid võrreldi omavahel ja ka originaalsete variantidega, analüüsid nende nakatamis- ja replikatsiooninäitajaid. Täpsemalt taheti leida,

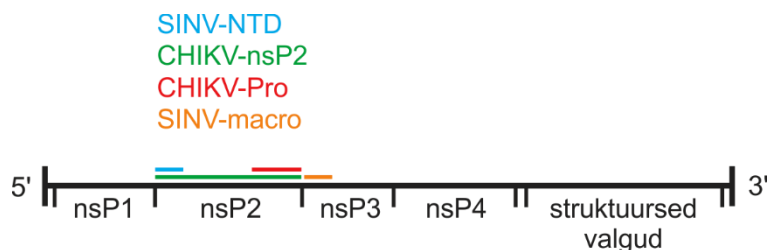
- 1) milline on muudetud viiruste infektsioonilisus;
- 2) kui edukalt moodustavad viirused uusi virione ehk mis on viiruste tiitrid;
- 3) kui efektiivsed on viiruste replikaasid;
- 4) milline on infektsiooniliste viiruste nakkuse dünaamika;
- 5) kas ja millised sekundaarsed mutatsioonid nakatamistsükli jooksul tekkisid.

Saadud tulemuste ja kirjanduses avaldatu põhjal sooviti arutleda analüüsitud mutatsioonide võimaliku rolli üle viiruse elutsükli erinevates etappides.

2. Materjalid ja meetodid

Vahetatud domeenidega viiruskonstruktid

Kõik algsed *swap*’itud viirused kavandati ja konstrueeriti Aleksei ja Valeria Lulla poolt. Kõik need rekombinandid valmistati icDNAd (*infectious complementary DNA*, infektsiooniline komplementaarne DNA) sisaldavate plasmiidide kujul, mille põhja moodustas SFV4 tüve täispikk järjestus pSP6 vektoris. Selles vektoris on olemas SP6 RNA polümeraasi promooter, ampitsilliini resistentsusgeen ja viiruse genoomi 3’ otsale vastav polü(A) saba. SFV4 genoomis olid valitud domeenide järjestused vahetatud kas CHIKV-st või SINV-st pärineva järjestuse vastu. Domeene oli kokku 4: nsP3 N-terminaalne osa, kogu nsP2, selle C-terminaalne proteaasi osa ja N-terminaalne domeen, mis olid vastavalt tähistatud kui macro, nsP2, Pro ja NTD. Vahetatud domeenide piirid koos viiruste elujõulisust ja omadusi uurivate eksperimentidega on täpsemalt kirjeldatud autori bakalaureusetöös (Teppor, 2014). Käesolevas töös kasutati neist nelja *swap*-konstrukti, mis tähistati järgnevalt: CHIKV-st pärineva proteaasi domeeni või nsP2-ga konstruktid CHIKV-Pro ja CHIKV-nsP2 ning SINV-st pärineva macro või nsP2 N-terminaalse domeeniga konstruktid SINV-macro ja SINV-NTD (Joonis 5). Nende viiruste ja metsiktüüpi SFV icDNAdega plasmiidide kaardid on toodud lisas (Lisa 1). Antud uurimuse jaoks tuletati neist konstruktidest üksikute nukleotiidsede asendustega viirused, mida järgnevalt kirjeldatakse.



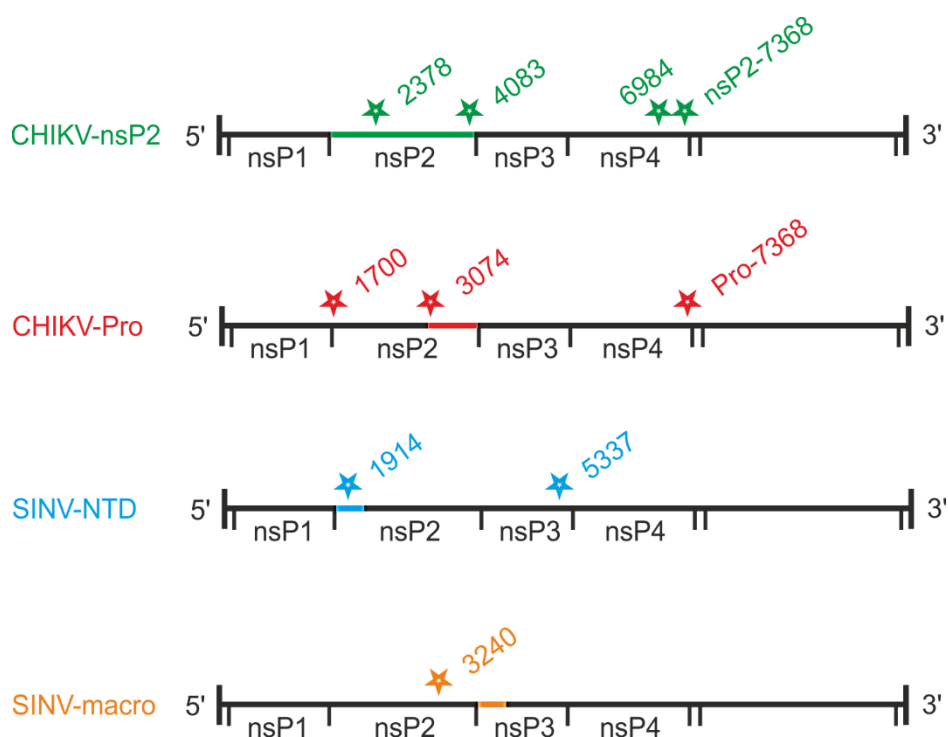
Joonis 5. Käesolevas töös kasutatud *swap*-viirused. SFV genoomi skemaatilisel kujutisel on näidatud sellelt transleeritavad valgud, nendes vahetatud nelja domeeni kodeerivate järjestuste asukohad ja vastavate *swap*-viiruste tähised.

Kompensatoorste mutatsioonidega viiruskonstruktid klonereimine

Eelnevas töös leiti kompensatoorsete mutatsioonide kombinatsioonid, mis tekkisid, kui *swap*’itud viiruseid vastavalt toodud protokollile adapteeriti (Teppor, 2014). Käesolevas uurimuses analüüsiti igat asendust eraldi, viies need ükshaaval selle algse *swap*-viiruse genoomi, kust need leitud olid. Mutatsioonide päritolu, asukohad, vastavad nukleotiidsed ja aminohappelised muutused ning saadud viiruste tähised on näidatud tabelis 1. Joonisel 6 on skemaatiliselt kujutatud asenduste positsioonid *swap*-viiruste genoomis.

Tabel 1. Kompensatoorsete mutatsioonide asukohad, nukleotiidsed ja aminohappelised asendused ning saadud viiruste tähised. Näidatud on esialgne *swap*-viirus, kust mutatsioonid leiti; asenduste nukleotiidsed ja aminohappelised asukohad ning muutused; pärast mutatsioonide tagasi viimist saadud viiruste lühendid ja paksu kirjaga märgistatud tähised.

<i>Swap</i> -viirus	Nukleotiidne asukoht ja asendus	Aminohappeline asukoht ja asendus	Viiruse lühend ja tähis
CHIKV-nsP2	2378 G→A	765 Glu→Arg	CHIKV-nsP2- 2378
	4083 C→T	1333 Ala→Val	CHIKV-nsP2- 4083
	6984 G→C	2300 Cys→Tyr	CHIKV-nsP2- 6984
	7368 G→A	2427 Arg→Lys	CHIKV-nsP2- 7368
CHIKV-Pro	1700 G→T	538 Val→Phe	CHIKV-Pro- 1700
	3074 G→A	997 Gly→Ser	CHIKV-Pro- 3074
	7368 G→A	2427 Arg→Lys	CHIKV-Pro- 7368
SINV-NTD	1914 C→T	610 Ala→Val	SINV-NTD- 1914
	5337 A→T	1751 Lys→Met	SINV-NTD- 5337
SINV-macro	3240 T→A	1052 Val→Glu	SINV-mac- 3240



Joonis 6. Leitud kompensatoorsete mutatsioonide asukohad *swap*-viiruste genoomis. Kujutatud on genoomi skeem ja sellelt transleeritavad mittestruktuursed valgud, vahetatud domeeni kodeeriv järjestus SFV genoomis iga esialgse viiruse puhul ja selles *swap*'is esinenud asendused koos vastava tuletatud viiruse tähisega.

Mutatsioonide viimiseks esialgsetesse *swap*-viirustesse kavandas töö autor kõik kloneerimisskeemid, sealhulgas otsis sobivad restriksioonikohad, -ensüümid, praimerid ja disainis mutageneesipraimerid. Praktiline kloneerimine ise teostati koostöös uurimisrühma teiste liikmetega.

Punktmutsatsioonidega konstruktid saadi ühel kahest viisist: adapteeritud viiruse genoomist mutatsiooni sisaldavat fragmenti amplifitseerides ja ümber tõstes või algse *swap*-viiruse genoomi koopiat sisaldava klooni mutageneesiga. Esimesel juhul paljundati asendust sisaldav ala PCRiga viiruse klooni mittestruktuurseid valke kodeeriva genoomi osa cDNAs, mis laboris varem sünteesitud oli. Selleks kasutati *Phusion High-Fidelity* polümeraasi komplekti alltoodud reaktsioonisegu ja programmiga:

<u>PCR reaktsioonisegu</u>		<u>PCR programm</u>		
1×	<i>Phusion HF</i> puhver	98 °C	3 min	
200 µM	dNTPde segu	98 °C	10 sek	} 35×
500 nM	<i>sense</i> praimer	55 °C	15 sek	
500 nM	<i>antisense</i> praimer	72 °C	1 min	
3%	DMSO	72 °C	10 min	
3 µl	DNA			
50 µl-ni	vesi			

Järgmisena ligeeriti PCRi produkt *pJET1.2/blunt* vektoriga, lisades 1× puhvrile, 50 ng vektorile ja 5 U T4 DNA ligaasile 8 µl 25st µl-st *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit*'iga (*Macherey-Nagel*) puhastatud PCRi produktist (kõik reagentid *Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit*'ist; reaktsiooni lõppmaht 20 µl). Segu inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril või üleöö 4 °C juures, misjärel ühinenud rõngasmolekuli sisaldavast lahusest 10 µl segati 100 µl XL10-*Gold* kompetentsete *E. coli* bakterirakkudega (*Stratagene*). Transformeerimiseks hoiti baktereid jääl 30 minutit ja tehti kuumašokk 90 sekundit 42 °C juures. Siis lisati rakkudele 900 µl LB söödet (10 g/l trüptooni, 10 g/l NaCl ja 5 g/l pärmiekstrakti) ja loksutati 220 rpm ja 37 °C tingimustes poolteist tundi. Lõpuks külvati bakterid LB-agari ja ampitsilliiniga (100 µg/ml) Petri tassidele ja inkubeeriti 37 °C juures 18 tundi. Kolooniatest puhastati minipreparaadi *kit*'i juhiste järgi (*FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit, Favorgen Biotech Corp*) plasmiidne DNA. Selle õigsust kontrolliti restriksioonanalüüsi ja agarosgeelelektroforeesi abil ning seejärel Sangeri sekveneerimisega (Eesti Biokeskuse tuumiklabor). Proovi DNA kontsentratsioon mõõdeti *NanoDrop 2000* spektrofotomeetriga (*Thermo Scientific*). Järgmisena lõigati DNA preparaadis välja soovitud asendust sisaldav ala, kasutades restriктаase, millel on viiruse icDNAd sisaldavas plasmiidis unikaalsed lõikesaidid. Samade ensüümidega eemaldati mutatsioonita icDNA konstrukti algne fragment. Saadud vektor ning asendust sisaldav insert

lahutati geelelektroforeesiga teistest lõikereaktsiooni saadustest. Õige pikkusega fragmendid lõigati geelist välja ja puhastati *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit*'iga (*Macherey-Nagel*), misjärel vektorit töödeldi FastAP aluselise fosfataasiga (*Thermo Scientific*), et eemaldada ahela otstes olevad fosfaatrühmad. Vektor ja insert liideti kokku T4 DNA ligaasi abil, misjärel reaktsioonisegu kasutati bakterirakkude transformeerimiseks. Saadud transformeeritud bakteritest puhastati plasmiidse DNAd, mida analüüsiti eelkirjeldatud viisil.

Juhtudel, kui PCRi reaktsioon näiteks praimerite seondumise probleemide või cDNA madala kvaliteedi tõttu ei toiminud, kasutati teist viisi. Nimelt paljundati muteerida soovitav ala sama PCRi protokollil alusel algsest *swap*-viiruse icDNAst ja ligeeriti taas *pJET1.2/blunt* vektoriga. Saadud reaktsiooniseguga transformeeriti bakterid ja neist puhastati rekombinantse DNAd samamoodi kui ülal kirjeldatud. Seejärel viidi kloneeritud fragmenti sisse soovitud nukleotiidne asendus, kasutades selleks PIPE-PCR (*Polymerase Incomplete Primer Extension PCR*, polümeraasi ebatäieliku praimeriekstensiooni PCR) meetodit. PCR reaktsioonis kasutati spetsiaalselt disainitud ja kommertsiaalselt teenusepakkujalt tellitud primereid, mille 5' otsa kolmas või neljas lämmastikalus oli punktmutatsioonile vastav ehk mittekomplementaarne algse matriitsiga. Reaktsioonisegu koosnes samadest komponentidest, mis eelnevalt kirjeldatud, kuid programm oli muutuva seondumistemperatuuriga – esimestes tsüklites kasutati madalamat temperatuuri, mis tuletati praimerite täielikult komplementaarse fragmendi ehk 3' otsa sulamistemperatuurist. Sellega kindlustati, et primerid seonduks kindlalt alusahelale ja sisalduks uutest molekulides. Seejärel tõsteti seondumistemperatuuri, et kokku jääksid ainult täispikkuses praimerite kompleksid matriitsiga, mille tagajärjel paljundataks asendusega DNAd. Programm ja kasutatud temperatuurid olid järgmised:

PIPE-PCR programm

98 °C	3 min	
98 °C	10 sek	} 10×
45 °C	15 sek	
72 °C	2,5 min	
98 °C	10 sek	} 25×
57 °C	15 sek	
72 °C	2,5 min	

Seejärel puhastati PCRi produkt jälle *kit*'iga ja saadud DNAGA transformeeriti bakterid, milles plasmiidid siis paljundati ja millest puhastati. Nii tehtud miniprepis sekveneeriti kõigepealt asenduse koht ja mutageneesi õnnestumise korral ka ülejäänud järjestused. Järgnevalt lõigati plasmiidist ümberkloneerimiseks sobiv ala välja ning viidi esialgsesse konstrukti samamoodi, nagu eelpool kirjeldatud cDNAst paljundatud lõigudki.

Lõpuks saadud punktmutatsioonidega icDNAd kontrolliti osalise sekveneerimise teel üle (asendusekohad ja kloonimiseks kasutatud restriksiooniensüümide lõikekohad), et veenduda plasmiidide õigsuses.

***In vitro* transkriptsioon**

Koekultuuri rakkude nakatamiseks sünteesiti viiruste icDNAdelt infektsiooniline viiruse genoomile vastav RNA. Selleks lineariseeriti 4 µg plasmidi *BcuI* restriiktaasiga (*Thermo Scientific*) ja DNA puhastati reaktsioonisegust eelpool mainitud PCRi produkti puhastamise kit'iga. *In vitro* transkriptsiooniks kasutati *mMESSAGE mMACHINE SP6 Transcription Kit*'i reagente ja juhiseid (*Thermo Scientific*). Saadud RNA kvaliteeti ja kogust kontrolliti geelelektroforeesil. RNA kvantifitseerimiseks sünteesiti referents-RNA, mida puhasti *Zymo Research RNA Clean & Concentrator Kit*'iga ja mille kontsentratsioon mõõdeti *NanoDrop*'iga. Kõikide RNAdega geel skaneeriti *Typhoon FLA 9500* skänneriga (*GE Healthcare*) ja õige pikkusega RNAd suhteline kogus määrati *ImageQuant TL* (*GE Healthcare*) tarkvara abil.

Rakuliinid

Et uurida rekombinantsete viiruste infektsioonilisust ehk nakatamisvõimet (kui efektiivselt vabanevad viirused infektsioonilistest transkriptidest) või juba valmis viiruse võimet toota uusi funktsionaalseid virione, vastavalt transfekteeriti viiruse RNAGA või nakatati viirusvarudega BHK-21 rakke (*baby hamster kidney*, beebihamstri neerurakud). Rakke inkubeeriti 37 °C ja 5% CO₂ tingimustes GMEM söötmes (*Glasgow Modified Eagle's medium*, *Gibco*), millesse oli lisatud 10% FCSi (*fetal calf serum*, veise loote seerum, *PAA*), 20 mM HEPESi, 2% TPBd (*tryptose phosphate broth*, trüptoos-fosfaat-puljong, *Difco*), 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. Olenevalt eksperimendist kasutati veel ka nakatamissöödet ehk NSi, mis sisaldas seerumi asemel 0,2% BSAd (*bovine serum albumin*, veise seerumi albumiin, *Sigma*), või 2% seerumisaldusega GMEMi. Rakkude passeerimisel pesti neid esmalt PBSiga (*phosphate buffered saline*, fosfaat-puhverdatud soolalahus), mille pH oli 7,4 ja koostises 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,8 mM KH₂PO₄ ja 10 mM Na₂HPO₄. Seejärel võeti rakud trüpsiini abil tassidelt lahti ja tsentrifugeeriti GMEMis põhja. Sadestunud rakkudelt eemaldati sööde ja nad suspendeeriti uuesti GMEMis, misjärel külvati uuele tassile soovitud arv rakke.

Rakkude transfektsioon ja *infectious center assay* (ICA)

BHK-21 rakke transfekteeriti icDNAdelt sünteesitud RNAGA, kasutades elektroporatsiooni. Selleks pesti, koguti ja tsentrifugeeriti 100 mm diameetriga tassil kasvanud rakud, nagu eelnevalt kirjeldatud. Rakud suspendeeriti 800 µl-s jääkülmas PBSis ja pipeteeriti *BioRad* 4 mm

elektroodide vahega küvetti, mida samuti enne jääb jahutati. Küvetti lisati 10 µg RNAd ja rakke elektroporeeriti kahe 850 V pulsiga 25 µF juures *BioRad Xcell Gene Pulser*'iga. ICA (*infectious center assay*, infektsioonitsentrite analüüs) jaoks lisati 60 µl poratsioonisegust 540 µl NSile, millest omakorda 60 µl võeti edasi järjestikkusteks kümnekordseteks lahjendusteks NSis. Valitud lahjendustest 500 µl külvati 6-augustel plaatidel eelkasvatatud BHK-21 rakkudele. Plaatide inkubeeriti 3 tundi, misjärel sööde eemaldati ja rakkudele lisati 7:3 suhtes segatud 2% seerumiga GMEMi ja 2% CMC (*carboxymethyl cellulose*, karboksümetüülselluloos) vesilahust. Pärast 72 tunni pikkust inkubeerimist eemaldati söötmesegu ja rakke värviti 30 minutit 0,25% kristallvioleti lahusega, milles oli veel 1,85% formaldehüüdi, 10% etanooli, 35 mM Trisi ja 0,5% CaCl₂. Lahus eemaldati ja auke pesti sooja veega, seejärel loendati värvumata laigud ehk surnud rakkude piirkonnad, mis pärinevad igaüks ühest pfu-st (*plaque forming unit*, lüüsilaiku moodustav ühik).

ICAst üle jäänud rakkudele lisati GMEMi ja need külvati 100 mm läbimõõduga tassile. Iga 24 tunni tagant jälgiti rakkude morfoloogiat ja suremust. 72 tunni möödudes koguti rakkudelt sööde, kuhu olid vabanenud järgmiste põlvkondade viirusosakesed, saades nii esmased viirusvarud.

Rakkude nakatamine esmaste viirusvarudega

Esmate viirusvarudega nakatati 35 mm läbimõõduga tassidel ette kasvatatud BHK-21 rakke. Selleks pandi rakkudele 250 µl NSi ja 100 µl esmase viirusvaru segu ja inkubeeriti tase tund aega iga 10 minuti tagant loksutades, seejärel vahetati segu 2 ml GMEMi vastu ja tassid pandi tagasi inkubaatorisse kaheks ööpäevaks, misjärel koguti virionidega sööde ehk teisene viirusvaru.

Lüüsilaik-tiitrimine

Esmased viirusvarud tiitriti, et selgitada välja nakatamisvõimeliste viirusosakeste kontsentratsioon. Selleks nakatati 6-augustel plaatidel ette kasvatatud BHK-21 rakke viirusvarude kümnekordsete lahjendustega (maht 350 µl). Plaatide inkubeeriti 1 h, mille vältel neid loksutati iga 10 minuti tagant. Siis sööde eemaldati ja rakkudele lisati eelnevalt kirjeldatud GMEM-CMC segu. Pärast 72 tunni inkubeerimist värviti rakud kristallvioletiga nagu varemgi ja loeti kokku lüüsilaigud. Katse tulemustena arvutati pfu-de hulk ühes milliliitris viirusvarus.

Transreplikaasi katse

Transreplikaasi katses kasutati esialgsete ja mutatsioonidega *swap*'ide replikaasikonstrukte, milles sisaldus ainult viiruse replikaasi ehk mittestruktuurseid valke kodeeriv järjestus. nsPsid

ekspresseeritakse peremeesrakus, sest neid kodeeriv järjestus oli paigutatud sellise promooteri kontrolli alla, mida tunneb ära raku mRNAde sünteesi süsteem (antud juhul inimese tsütomegaloviiruse varajane promooter). Lisaks wt SFV replikaasi ja mutantseid replikaase ekspresseerivatele konstruktidele kasuti töös kontrollina ka polümeraas-negatiivset replikaasi tootvat konstrukti GAA. Süsteemi teises osaks oli raku *template*-RNAd ekspresseeriv plasmiid. Selles RNAs on olemas viiruse UTRid, mida viiruse replikaas promooteritena ära tunneb, kuid nendevahelised kodeerivad alad on asendatud reportervalke kodeerivate järjestustega: nsPde ORFi asemel on *Fluc* (*Firefly* lutsiferaas) ja sg promooteri järel *Gluc* (*Gaussia* lutsiferaas) kodeeriv järjestus. Seega toodetakse sellelt plasmiidilt *template*-RNA, mida teise plasmidi vahendusel toodetud viiruse replikaas saab paljundada ning transkribeerida, sünteesides vastavalt genoomset ja sgRNAd. Tulemuseks on kergesti mõõdetavate markervalkude *Fluc*-i ja *Gluc*-i sünteesi aktiveerumine. Kõik plasmiidid olid laboris varem tehtud ja replikaasi- ning *template*'i plasmidi näited on toodud lisas (Lisa 2). Transreplikaasi süsteemi ja konstruktide ülesehitust on täpsemalt kirjeldatud Utt jt 2016. aasta artiklis.

Transreplikaasi katsega võrreldi replikaaside võimet paljundada ja transkribeerida *template*'ilt sünteesitavat RNAd, määrates sgRNAlt transleeritava *Gluc*-i aktiivsuse suurenemist võrreldes negatiivse kontrolli, GAA replikaasi juuresolekul toodetud *Gluc*-i aktiivsusega. Esmalt transfekteeriti 6-augustel plaatidel kasvatatud BHK-21 rakke seguga, mis sisaldas 1 µg replikaasiplasmidi ja 1 µg *template*'i plasmidi. Kontrollideks olid kas ainult vesi (*mock*), *template*'i plasmiid üksi või GAA konstrukti ja *template*'i plasmidi segu. DNA viidi rakkudesse lipofektsiooniga, kasutades *Lipofectamine LTX with Plus Reagent* komplekti reagente ja protokoll (Thermo Scientific). Rakkudele lisati 1,5 ml GMEMi augu kohta ja inkubeeriti 18 tundi. Siis eemaldati sööde, rakud pesti PBSiga ja lüüsi *Promega Dual-Luciferase Reporter Assay System kit*'i lüüsipuhvriga ning seal toodud juhiste järgi. Kogutud lüsaadi rakkude tsentrifugiti põhja ja supernatant segati *Gluc*-i substraadiga, misjärjel määrati luminesentsisignaali *GloMax 20/20* luminomeetriga (*Promega*). Katset tehti kaks kordust, mõlemad kahes paralleelis.

Kasvukõverad

Viiruste paljunemise dünaamika jälgimiseks nakatati BHK-21 rakke esmaste viirusvarudega ja koguti määratud ajapunktide järel söödet, milles määrati sinna vabanenud viirusosakeste hulk. Nakatamiseks kasutati 35 mm läbimõõduga tassidel kasvanud rakke, mille arvu hinnati samades tingimustes referentstassil kasvatatud rakkude loendamise kaudu. Järgmisena arvutati vajaminev pfu-de hulk $MOI=0,1$ tingimuse täitmiseks (*multiplicity of infection*, infektsiooni

kordsus) ehk kümne raku kohta võeti 1 nakatav viirusosake. Esmase viirusvaru sobiv kogus lahjendati NSis 250 µl mahuni ja rakke nakatati eelpool kirjeldatud viisil tunniajase inkubeerimisega. Seejärel pesti rakke kaks korda NSiga, et eemaldada kinnitumata virionid. Nakatunud rakkudele lisati 1 ml 2% seerumiga GMEMi. Tassid pandi inkubaatorisse ja poole tunni pärast alustati ajapunktide võtmisega – see oli nullpunkt, kui kõik kinnitunud virionid olid eeldatavasti sisenenud. 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h ja 48 h möödudes koguti rakkudelt selleks punktiks vabanenud viirusosakestega sööde ja asendati värske 2% GMEMiga. Kõik viirusvarud tiitriti varem kirjeldatud viisil ja iga ajahetke puhul liideti kokku kõigi seni võetud punktide tiitrid, et väljendada uute virionide tekke dünaamikat.

Sekundaarsete mutatsioonide otsimine

Eelnevalt leiti, et adapteeritud *swap*-viirustes paiknevad kompensatoorsed mutatsioonid enamasti erinevate kombinatsioonidena (Teppor, 2014). Seetõttu taheti antud töös kontrollida, kas lisaks sisse viidud üksikutele asendustele tekkis uute nakatamistsüklitega juurde ka teisi mutatsioone, mis samas originaalviiruses algul esinesid. Et kindlaks teha, kas ja milliseid sekundaarseid mutatsioone võis tehtud katsete jooksul kogunenud olla, eraldati teisestest viirusvarudest totaalne RNA, kasutades selleks *QIAGEN RNeasy Mini Kit*'i. Saadud RNAde segu kasutati viiruste järjestustele vastavate komplementaarsete cDNAde sünteesil; seda tehti mittestruktuurse osa järele seonduvat viiruse genoomiga komplementaarset praimerit ja *Thermo Scientific First Strand cDNA Synthesis Kit*'i kasutades. cDNA sünteesi protokoll oli järgmine:

5 µl	totaalse RNA lahus
2 µM	praimer
12 µl-ni	vesi
65 °C	5 min → jääl 2 min

Segule lisati:

1×	reaktsioonipuhver
20 U	<i>RNasin</i> ribonukleaasi inhiiitor
1 mM	dNTPde segu
200 U	<i>M-MuLV</i> pöördtranskriptaas
42 °C	1 h

Et viirusvarus sisaldunud mitmekesisist erinevate genoomide populatsiooni paremini esindada, tehti igast totaal-RNAst 4 cDNAde, nii et reaktsiooni viidi sõltumatult läbi neljas korduses. cDNAde kasutati edasi PCR reaktsioonis, millega paljundati potentsiaalsetele mutatsioonidele vastavaid genoomi alasid, kasutades selleks nende lähiümbrusesse seonduvaid praimeripaare. Õigete pikkustega PCR produktid puhastati, ligeeriti *pJet1.2/blunt* vektoriga ja kioneeriti ning

paljundati nagu eelpool kirjeldatud. Seejärel sekveneeriti saadud plasmiidides asenduste kohad mõlemas suunas üle. Igast üksiku mutatsiooniga viiruse varu pealt tehtud cDNAst otsiti kõiki ülejäänud asendusi, mis algselt samas *swap*-viiruses pärast adapteerimist esinesid (Tabel 2). Sama skeemi järgides kontrolliti üle ka primaarse mutatsiooni koht, mis oli oluline selgitamaks välja, kas sisseviidud asendus on alles ja pole muutunud kas tagasi esialgseks või mõneks uueks variandiks.

Tabel 2. Mutatsioonide kohad, mida iga üksiku asendusega viiruse varus üle kontrolliti. Välja on toodud algne *swap*-viirus, kust muutus leitud oli; viiruste tähis, mida kontrolliti ja mutatsioonid, mida selles viiruses otsiti.

<i>Swap</i> -viirus	Kompensatoorse mutatsiooniga viirus	Otsitud asendused	
CHIKV-nsP2	2378	4083	
		6984	
		7368	
	4083	2378	6984
			7368
			7368
	6984	2378	4083
			4083
			7368
	nsP2-7368	2378	4083
			4083
			6984
CHIKV-Pro	1700	3074	
		7368	
	3074	1700	7368
			7368
	Pro-7368	1700	3074
			3074
SINV-NTD	1914	5337	
	5337	1914	

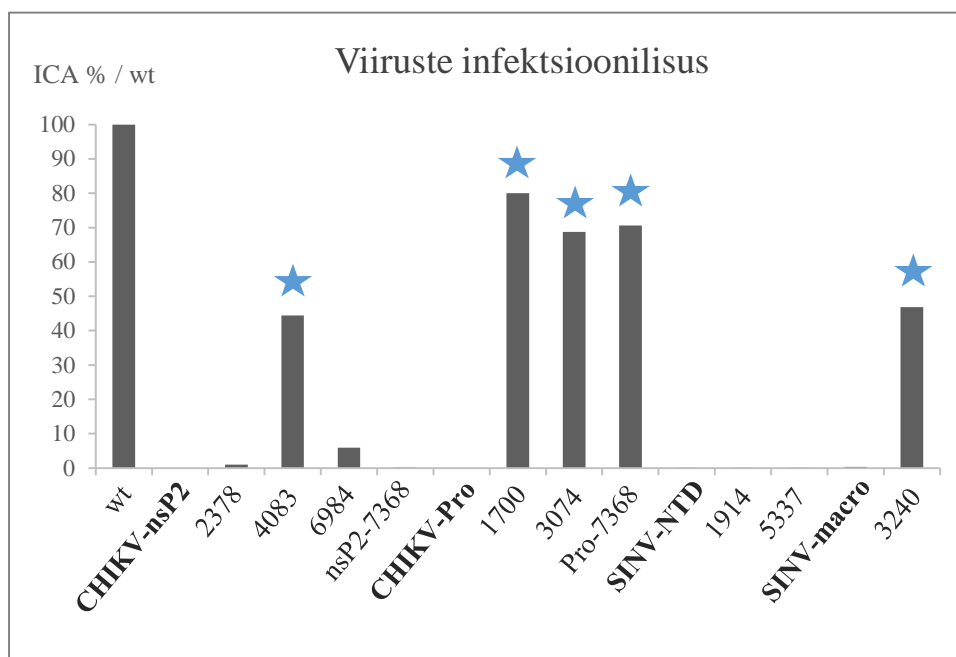
3. Tulemused ja arutelu

Kompensatoorsete mutatsioonide mõju uurimine

Viiruste nakatamisvõime võrdlemine

Pärast individuaalsete mutatsioonide viimist esialgsetesse *swap*-konstruktidesse analüüsiti esmalt asenduste mõju viiruste nakatamisvõimele. Selleks kasutati ICAd, millega saab määrata lüüsilaiku moodustavate ühikute ehk pfu-de arvu ühe mikrogrammi viiruse RNA kohta. Paralleelselt tehti ICA ka SFV metsiktüüpi tüvega ja originaalsete *swap*-viirustega ning paremaks võrdlemiseks väljendati kõigi konstruktide infektsioonilisust protsendina wt-st. Saadud tulemused on kokku võetud joonisel 7 ja lisaks on välja toodud lüüsilaikude kuju (Tabel 3).

ICAst selgus, et viis mutatsiooni – nende asukohtade järgi tähistatud lühenditega 4083, 1700, 3074, Pro-7368 ja 3240 – parandasid märgatavalt nende esialgsete genoomide nakatamisvõimet, kus nad adapteerimisega tekkinud olid. Ülejäänud asendustel oli seevastu palju väiksem või olematu mõju (Joonis 7). Veel ilmnes, et kui CHIKV-Pro puhul suurendas infektsioonilisust iga sisse viidud muutus, siis CHIKV-nsP2 korral tegi seda vaid üks proovitutest. Mutatsioonil 7368 oli erinevas kontekstis erinev efekt: see mutatsioon tõstis küll CHIKV-Pro, kuid mitte CHIKV-nsP2 *swap*'i infektsioonilisust. Lisaks on näha, et SINV-NTD jaoks ei olnud abi kummastki individuaalsest asendusest. Selline tulemus on küllaltki hästi põhjendatav, kuna algselt leiti kompensatoorsed mutatsioonid just erinevate kombinatsioonidena, mistõttu on võimalik, et adaptatiivsete mutatsioonide mõju viiruste omadustele võib avalduda vaid kindlates kombinatsioonides (Teppor, 2014). Seega on oodatav, et eraldi võetuna ei pruugi sellised asendused olulist mõju avaldada ja üllatav on pigem asjaolu, et väga madala infektsioonilisusega CHIKV-Pro-d aktiveerisid kõik sisse viidud ühenukleotiidilistest vahetustest.



Joonis 7. Esialgsete ja kompensatoorsete mutatsioonidega *swap*-viiruste ICA tulemused. Pfu-de arv mikrogrammi viiruse RNA kohta arutati protsendiks wt SFV vastavast näitajast. Paksus kirjas on esialgsete *swap*-viiruste nimed, millele järgnevad kõik sellest viirusest tuletatud mutatsiooniga konstruktid tähised. Tähekesega on märgistatud mutatsiooniga viirused, mille puhul asenduse sisse viimine märgatavalt nakatamisvõimet tõstis.

Lüüsilaikude morfoloogiat vaadeldes võib sageli saada tähtsat infot viiruse edukuse ja paljunemise kohta. Näiteks on võrreldes metsiktüüpi SFV suurte ja ümmarguste plaagidega nõrgematel viirustel tihti palju väiksemad ja teistsuguse kujuga lüüsilaigud. Mõnikord ei ole need koguni silmaga nähtavad või puuduvad täielikult, mis võib tähendada, et viirus ei suuda katse vältel piisavalt paljudesse kõrvalolevatesse rakkudesse levida, ei moodustagi uusi virione või siis ei surma katse jooksul nakatunud rakke. Tabelis 3 on kirjeldatud algsete ja muteeritud *swap*-viiruste lüüsilaikude suurust ja kuju. CHIKV-nsP2 gruppi kuuluvaid viiruseid analüüsides võib märgata, et kvantitatiivselt nakatamisedukust tõstnud 4083 asendus muutis lüüsilaike küll veidi suuremaks, kuid samasugust mõju omasid ka mutatsioonid 6984 ja 7368, mis viiruste infektsioonilisust ei parandanud (ICA tulemus, Joonis 7). Samuti ilmneb, et kui kõik CHIKV-Pro konstrukti viidud mutatsioonid andsid olulise arvilise efekti nakatamisvõime kasvus (Joonis 7), siis plaagide morfoloogiale avaldasid nad erinevat mõju. Näiteks jäid Pro-7368 tekitatud lüüsilaigud sama väikseks kui originaal-*swap*'il (Tabel 3), samal ajal kui viiruse infektsioonilisus oli tõusnud peaaegu wt SFV tasemeni (Joonis 7). SINV rühma puhul plaagide kuju ega suurus üldsegi ei varieerunud, mistõttu võib järeldada, et viirusele nakatamiseelise andnud mutatsioon ei mõjuta alati rakust rakku liikumise kiirust või viisi. See pole tingimata vastuoluline tulemus, kuna viiruse elutsüklil sisaldab paljusid parameetreid, mille muutumine avaldub erinevates etappides ja katsetega mõõdetavates näitajates.

Tabel 3. Esialgsete ja kompensatoorsete mutatsioonidega *swap*-viiruste tekitatud lüüsilaiikude kuju. Välja on toodud, milline oli lüüsilaiikude suurus ja kuju võrdluses metsiktüüpi SFVga. Paksus kirjas on esialgsete *swap*-viiruste nimed, millele järgnevad kõik sellest viirusest tuletatud mutatsiooniga konstruktidde tähised. Suurusgrupid – väga väike, väike, keskmine ja suur – määratleti lüüsilaiikude suurima diameetri järgi (vastavalt 0,5; kuni 1; kuni 2 ja kuni 3 mm).

Viirus	Lüüsilaiikude suurus ja kuju
wt	suured, ümarad
CHIKV-nsP2	väga väikesed, täkkekujulised
2378	väga väikesed, täkkekujulised
4083	väikesed, täkkekujulised
6984	väikesed, täkkekujulised
nsP2-7368	väikesed, täkkekujulised
CHIKV-Pro	väga väikesed, täkkekujulised
1700	keskmised, täkkekujulised
3074	väikesed, täkkekujulised
Pro-7368	väga väikesed, täkkekujulised

Viirus	Lüüsilaiikude suurus ja kuju
SINV-NTD	keskmised, ümarad
1914	keskmised, ümarad
5337	keskmised, ümarad
SINV-macro	keskmised, ümarad
3240	keskmised, ümarad

Infektsiooni käigu jälgimine

Viirustega transfekteeritud rakke külvati tassidele, et vaadelda nakkuse mõju rakkude elujõulisusele, mida iseloomustati eelkõige CPE ehk tsütopaatilise efekti (*cytopathic effect*) ulatuse abil. CPE tähendab rakkude morfoloogia muutumist viirusinfektsiooni käigus – jätked lühenevad, rakud muutuvad ümaramaks – , samuti tulevad nad tassi pinnalt lahti. 24 tundi pärast nakatamist olid kõik transfekteeritud rakud tavapärase kujuga, kuid 48 h ajapunktis nähti esimesi märke viiruste põhjustatud kahjust, nimelt oli märgata kerget CPEd 2378, 4083, nsP2-7368 ja 3074 *swap*'idega transfekteeritud rakkudes, veidi rohkem olid häiritud 1700-ga ja tugevalt Pro-7368-ga nakatatud rakud. 72 tunni möödudes ilmnes madal CPE 6984 puhul, 2378 ja 3074 olid tekitanud keskmise efekti ja pea kõik rakud, millesse oli viidud 4083, nsP2-7368, 1700, Pro-7368, 5337 või 3240 viirused, olid nakkuse tagajärjel surnud. Ülejäänud konstruktid ega mutatsioonideta *swap*'id vaatlusperioodi jooksul märgatavat CPEd ei tekitanud.

Infektsiooni mõju visuaalse vaatlemise tulemused on ICAs leituga suhtelises heas kooskõlas. Kõik CHIKV-Pro-st tuletatud viirused suutsid katse vältel nähtavalt rakke kahjustada, samuti surid enamik 3240-ga nakatatud rakkudest. SINV-NTD-sse viidud mutatsioonid küll ICAs nakatamisvõimet ei tõstnud, kuid 5337 asendus võimaldas siiski viirusel rakke kahjustada.

CHIKV-nsP2 grupile keskendudes ilmneb, et kõik uuritud järjestusemuutused võimaldasid *swap*'il rakkudes vähemalt nõrka CPed tekitada, sealjuures oli suurimat mõju märgata 4083 ja nsP2-7068 puhul, millest esimene ka ICAs algsest variandist kõrgemat nakatamisvõimet näitas, kuid teine seevastu mitte.

Esmaste viirusvarude tiitrimine

Pärast transfektsiooni koguti ja tiitriti kõigi viiruste varud, et leida infektsiooniliste osakeste kontsentratsioon. See meetod aitab võrrelda, kui edukalt suutsid viirused moodustada uusi nakatamisvõimelisi virione ja samuti võib järjestikkuste põlvkondade tiitrite suurenemine viidata adapteerumisele kasulike mutatsioonide tekke abil. Töös analüüsitud viiruste esmaste varude tiitrid on välja toodud tabelis 4.

Tabel 4. Esialgsete ja mutatsiooniga *swap*-viiruste esmaste varude tiitrid. Paksu kirjaga on tähistatud asendusteta *swap*'id, millele järgnevad neist tuletatud variandid; siniseks on tehtud viirused, mis olid ICAs algsest variandist palju edukamad. Tiitrite väärtused on esitatud pfu-de arvuna milliliitris viirusvarus.

Viirus	Tiiter pfu/ml
wt	1,04E+09
CHIKV-nsP2	1,84E+08
2378	3,80E+08
4083	1,36E+08
6984	6,80E+07
nsP2-7368	2,88E+09
CHIKV-Pro	1,36E+07
1700	1,12E+08
3074	2,40E+06
Pro-7368	1,64E+08
SINV-NTD	8,40E+08
1914	8,00E+08
5337	7,60E+08
SINV-macro	2,16E+08
3240	3,12E+09

Tabelist võib näha, et ICAs määratud infektsioonilisust tõstnud asendused ei pruugi suurendada viiruse tiitrit ehk söötmesse vabanenud virionide hulka. Näiteks jäi 4083 muutusega tiiter originaal-*swap*'iga võrreldes pea samale tasemele, samal ajal kui pea olematu nakatamisvõimega nsP2-7368 rohkem kui kümnekordistas pfu-de kontsentratsiooni viirusvarus. Seega on nsP2-7368 puhul selle katsega korrelatsioonis pigem transfekeeritud rakkude vaatlemisel nähtud tugev CPE kui konstrukti algne infektsioonilisus. Ka CHIKV-Pro

tuletiste puhul varieerub mutatsioonide efekt tiitritele: ülejäänud kaks küll tõstavad, kuid 3074 hoopis langetas viiruse edukust nakatamisvõimelisi osakesi toota, kuigi algse viiruse infektsioonilisust parandasid selgelt kõik asendused (Joonis 7). Nagu ICAski, puudus erinevus esialgse SINV-NTD ja selle muudetud variantide tulemuste vahel. SINV-macro-sse mutatsiooni viimine aitas taas viirusel paremini toime tulla, mis on suhteliselt ootuspärane, sest see oli ainuke asendus, mis SINV-macros adapteerimisega tekkis ja on tõenäoline, et sellest piisas *swap*'i elujõulisuse taastamiseks.

Selle katse tulemuste analüüsil tuleb aga arvestada, et viirusvaru tekkimine on erineva algse infektsioonilisusega viiruste puhul erinev. Kui algne infektsioonilisus on kõrge ehk võrreldav wt SFVga, nakatuvad transfektsiooni tulemusena praktiliselt kõik BHK rakud. Seega kujutab saadud viirusvaru ühe infektsioonitsükli tagajärge. See vähendab tunduvalt võimalust täiendavate adaptatiivsete mutatsioonide tekkimiseks. Täpsemalt adaptatsioonid küll tekivad, kuid vastavad viirused ei saa täiendavalt paljuneda, sest juba nakatatud rakkude uuesti nakatamine pole võimalik superinfektsiooni blokeerimise nähtuse tõttu. Kui algne infektsioonilisus on madal, siis on esmane viirusvaru mitme infektsioonitsükli tagajärg, mis tähendab, et enamik viiruseid on moodustunud rakkudes, mis ei nakatunud transfektsiooni käigus, vaid mida nakatasid vähestest algselt nakatatud rakkudest pärinevad teise või isegi kolmanda põlvkonna viirused. Sel juhul leiab aset viiruse levik rakust rakku, mistõttu igasuguseid täiendavaid adaptatsioone omavad viirused saavad suure konkurentsieelise.

Kõikide märgatava positiivse mõjuga mutatsioonide korral huvipakkuv, et vaid üks nukleotiidimuutus võib terve valgudomeeni asendamisega tehtud kahju nii suures osas korvata. Kui varem on pea kõigis uurimustes adapteeritud ainult mõne punktmutatsiooniga nõrgestatud viiruseid, on leitud samas suurusjärgus kompensatoorseid asendusi kui *swap*-eksperimentides, kuigi viimasel juhul muudetakse viirust tunduvalt rohkem ja seetõttu võiks eeldada, et infektsioonilisuse taastamiseks on vaja palju enam kohastumuslikke nukleotiividvahetusi. Näiteks tekkis ühes SFVs kolme aminohappejäagi muutmise katses kuni kaks kompensatoorset asendust genoomi kohta (Žusinaite jt, 2007), kuid kogu proteaasi kodeeriva järjestuse vahetamisel homoloogse domeeni vastu indutseeriti vaid kolme adaptatiivse mutatsiooni kogunemine, millest igaüks ka individuaalselt viiruse nakatamisvõimet tõstis. Selline efektiivne kohanemine võib anda aimu replikaasi osade omavahelise interakteerumise viisist – mingi funktsionaalse üksuse täpsest järjestusest olulisem võib olla domeeni struktuurne terviklikkus. Nii ongi võimalik, et ühe või paari õiget konformatsiooni lõhkuva aminohappejäagi asendamisest võib piisata selleks, et eri liikidest pärit domeenidest kokku pandud replikaasi töö õnnestuks. Kui infektsioonilisus taastub *swap*'itud alast kaugele välja jäävate mutatsioonide

tulemusena, on sobiv eeldada, et sellised muudatused puudutavad vahetatud valgudomeeni interaktsioonipartnereid. Samuti tuleb arvestada võimalusega, et madala infektsioonilisuse kompenseerimiseks tekivad täiendavad muudatused, mis võimendavad viiruse paljunemist, olles seejuures mitte seotud ei *swap*'itud domeeni konformatsiooniga ega selle interaktsioonipartneritega.

Viiruste replikatsiooniefektiivsuse võrdlemine

Mutantsete viiruste replikatsiooniefektiivsuse hindamine viirusvaru tiitri järgi on probleemne. Nagu eelpool mainitud, kompenseerivad viirused replikatsiooni ebaefektiivsusest tulenevad probleemid adaptatsioonide tekitamisega ja mida madalama infektsioonilisusega on viirus, seda enam infektsioonitsükleid ta enne viirusvaru kogumist läbib. See aga suurendab adaptiivsete asenduste kogunemise võimalusi. Selleks, et uurida mutatsioonidega viiruste replikaaside efektiivsust substraadi paljundamisel tingimustes, mis välistavad täiendavate adaptatsioonide tekkimise, tuleb kasutada trans-replikatsiooni süsteemi. Nii võrreldigi analüüsitavatele viirustele vastavate replikaasikonstruktid võimet paljundada reporterplasmiidilt sünteesitavat *template*-RNAd, mille hulka saab määrata luminesseeruva produkti kogunemise kaudu. Neis konstruktidest puudub struktuurseid valke kodeeriv osa, mis muidu sg promooteri järel transkribeeritakse ja transleeritakse, samuti ka replikaasi mRNA enese replitseerumist võimaldavad viiruse UTR järjestused. Need UTRid on transreplikaasi katses viidud teise molekuli, kus nad võimaldavad RNA replitseerimist, ja sg promooter kontrollib reporter molekuli sünteesiks vajaliku mRNA transkriptsiooni, peegeldades viiruse replikatsioonitsükli sgRNA sünteesi sammu. Antud töös analüüsiti just sellise reporteri, milleks oli Gluc, suhtelist kogust rakus, mõõtes selle ensüümi suhtelist aktiivsust, võrreldes negatiivse kontrolliga. Seega näitab Gluc-i ekspressiooni võimendamise määr seda, kui edukalt uuritav replikaas *template*-RNAd replitseerib ja sg promooterit kasutades selle kontrolli all olevat järjestust transkribeerib.

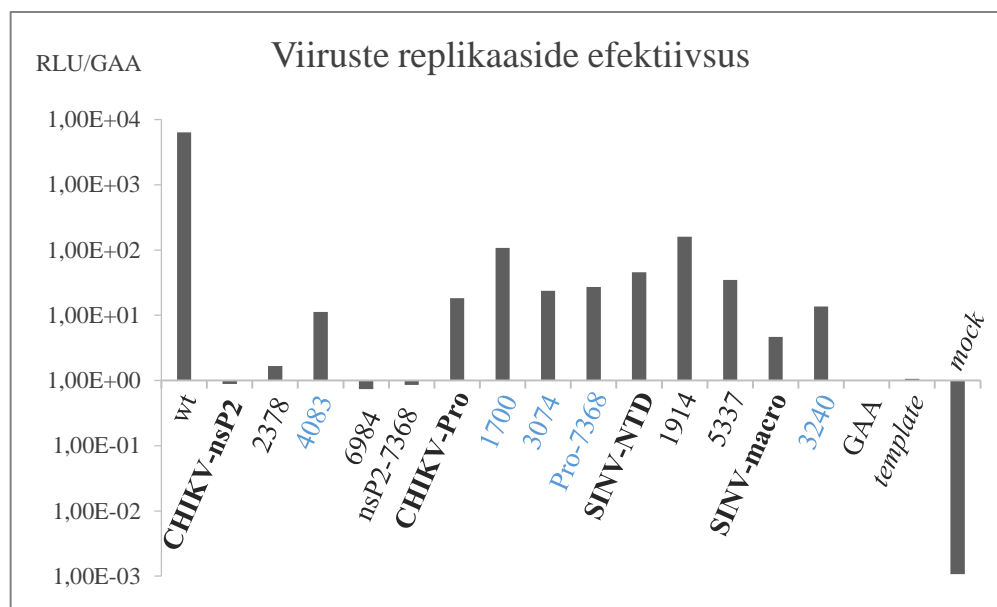
Esialgsete ja mutatsioonidega viiruste replikaaside efektiivsust võrreldi, leides suhte nende ja inaktiivse replikaasi (GAA konstrukti) juuresolekul genereeritud RLUde vahel (Joonis 8). RLU (*relative light unit*) ehk suhteline valgusühik on proportsionaalne toodetud Gluc-i hulgaga. Vaadeldes muutmata *swap*'e, võib näha, et ainsana saab sügavalt defektseks lugeda CHIKV-nsP2 replikaasi, mis ei ole võimeline Gluc-i tootmist üldse võimendama. Teiste viiruste replikaaside poolt tekitatud näidud on küll palju väiksemad metsiktüüpi SFV omast, kuid siiski selgelt kõrgemad negatiivsest kontrollist. See tulemus on mõnevõrra üllatav, sest meie grupi senised viiruse valkude kriitiliste alade punktmutatsioonidega katsed on näidanud, et sellised muudatused mõjutavad transreplikatsiooni aktiivsust oluliselt suuremal määral. Seega säilib

swap'e sisaldavatel replikatsioonikompleksidel arvestatav aktiivsus, kuid sellest üksi ei piisa RNA genoomi infektsioonilisuse tagamiseks; see on omakorda üheks, kuid ilmet mitte ainsaks põhjuseks, miks vajatakse täiendavaid kompensatoorseid muutusi. Kooskõlas selle eeldusega näitaski adaptiivseid mutatsioone sisaldavate replikaasidega läbiviidud katse, et kõik tekkinud ja ICA järgi toimivad kompensatoorsed asendused ei pruugi tingimata olla seotud replikatsiooniefektiivsuse suurendamisega. Nii võib CHIKV-Pro-3074 ja -7368 puhul märgata, et vastavad mutatsioonid RNA replikatsiooni eriti ei suurendanud, samal ajal kui antud viiruste nakatamisvõime selgelt paranes (Joonis 7). Siit võib järeldada, et need mutatsioonid ei ole otseselt seotud replikatsioonivõime taastamisega, vaid mõjutasid mingit muud olulist infektsiooni etappi, näiteks virionide moodustamist. Teised adaptiivsed mutatsioonid olid aga selgelt seotud replikatsiooni defektsuse kompenseerimisega: 1700 ja 3240 positsiooniga nukleotiidide vahetamised mõjusid vastavate algsete *swap*'ide edukusele taas positiivselt, säilitades oma efekti igas seni tehtud eksperimendis.

CHIKV-nsP2 grupi võrdlemisel tuleb välja, et infektsioonilisust parandanud 4083 asendus tõstis ka replikatsiooniefektiivsust. Samal ajal pidi ainus tiitrit suurendanud mutatsioon – 7368 – viirust mõjutama mingis muus etapis kui replikatsioonil, sest antud katses jäi tulemus muutumatuks. Siin on selge kokkulangevus ICA tulemustega, kus 4083 RNAd infektsioonilisust oluliselt tõstab, mutatsioon 7368 aga mitte (Joonis 7). Veel võib näha, et kui siiani ei erinenud SINV-NTD variantide mõõdetud näitajad teineteisest pea üldse, siis replikaasi aktiivsust 1914 asendus kindlasti tõstis. Kuna sellega ei kaasne infektsioonilisuse suurenemist (Joonis 7), saab järeldada, et SINV-NTD puhul pole sellest efektist üksi viiruse nakatamisvõime suurendamiseks küllalt.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et transreplikaasi katse tulemused illustreerivad taas tõsiasja, et nõrk viirus võib oma edukust kasvatada paljude mehhanismide modifitseerimise kaudu, mis kõik annavad olulise panuse infektsioonitsükli toimimisse ja avalduvad erinevatel etappidel eri määral. Huvitav on märkida, et saadud tulemused erinevad varasematest meie laboris saadud tulemustest. Nimelt on siiani pea eranditult täheldatud, et transreplikaasi aktiivsus korreleerub otseselt vastava viiruse RNA infektsioonilisusega. Samas on kõikidel juhtudel uuritud viiruseid, mis sisaldavad punktmutatsioone, insertioone või väikeseid deletsioone. Kuna antud töös on seos replikatsiooniaktiivsuse ja ICA tulemuste vahel oluliselt nõrgem, siis võib oletada, et domeenide vahetamisel tekkinud defektid on oma olemuselt keerulisemad kui punktmutatsioonide tekitatud defektid. Viiruse reaktsioon nii ühele kui teisele on sama ja viiruse ainuvõimalik variant – adaptatsioonide tekitamine. Samas ei ole *swap*'imise vastusena tekkinud mutatsioonide eesmärgiks ühemõtteliselt replikatsiooni taastamine, mida võib

seletada terviklike domeenide vahetamise väiksema mõjuga replikaasi toimimisele, vaid pigem on tegemist kompleksse vastusega erinevatele *swap*'imisest tingitud probleemidele.



Joonis 8. Transreplikaasi katse tulemused. Katses määratud viiruste replikaaside efektiivsused substraadi paljundamisel on välja toodud RLUde suhteliste väärtustena polümeraas-negatiivse GAA konstrukti RLUST. Paksus kirjas on esialgsed *swap*-viirused, millele järgnevad nende mutatsioonidega tuletiste tähised, kusjuures sinisega on märgitud taastatud infektsioonilisusega viirused. Skaala on logaritmiline.

Oluline on välja tuua, et antud töös kasutatud transreplikaasi katseskeemi alusel mõõdetakse otseselt ainult sg promooterile alluva järjestuse paljundamist, mis on aga vaid üks osa kogu alfaviiruste replikatsioonitsüklist. Näiteks ei vaadata selles eksperimendis üldse negatiivse ahela sünteesi efektiivsust. Tingimata võib eeldada, et hästi töötavate replikaaside puhul peab see toimuma küllaltki efektiivselt, sest miinus-ahelate tootmiseta genoomse ja sgRNA tegemiseni üldse ei jõutagi. Samas on võimalik, et mutantse viiruse replikaas võib säilitada oma võime näiteks sgRNAd transkribeerida, mida eelnevalt kirjeldatud katses lutsiferaasi kaudu mõõta saaks, kuid olla samas defektne negatiivse polaarsusega matriitsi tootmisel. Selle olukorra tagajärjeks viiruse infektsioonitsükli oleks muidugi ka sgRNA sünteesi puudumine. Kui aga negatiivse RNA ahela sünteesimise defekt pole täielik, võib replikaasi suurenenud aktiivsus sg promooteril tunduda kui replikatsiooni suurenemine, kuid viirus jääks ikkagi defektseks. Selliselt on seletatav näiteks 1914 mutatsiooniga replikaasi aktiivsus sg promooterile alluva järjestuse paljundamisel. Samuti leidub veel palju teisi etappe, kus sellel viirusel probleeme võib olla. Neid samme, sealhulgas negatiivse ahela sünteesi, saab uurida edasiste täiendavate eksperimentidega.

Erinevused viiruste edukuses võivad tuleneda ka muutustest genoomse ja sg promooteri eelistamises ja nende aktiivsuste vahekorras, mida määravad replikaasi seondumise ja

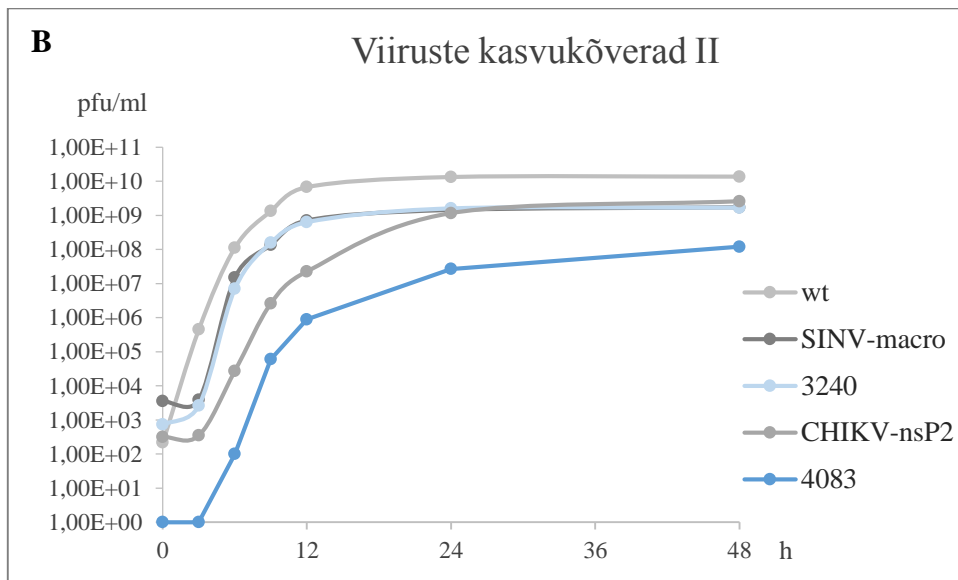
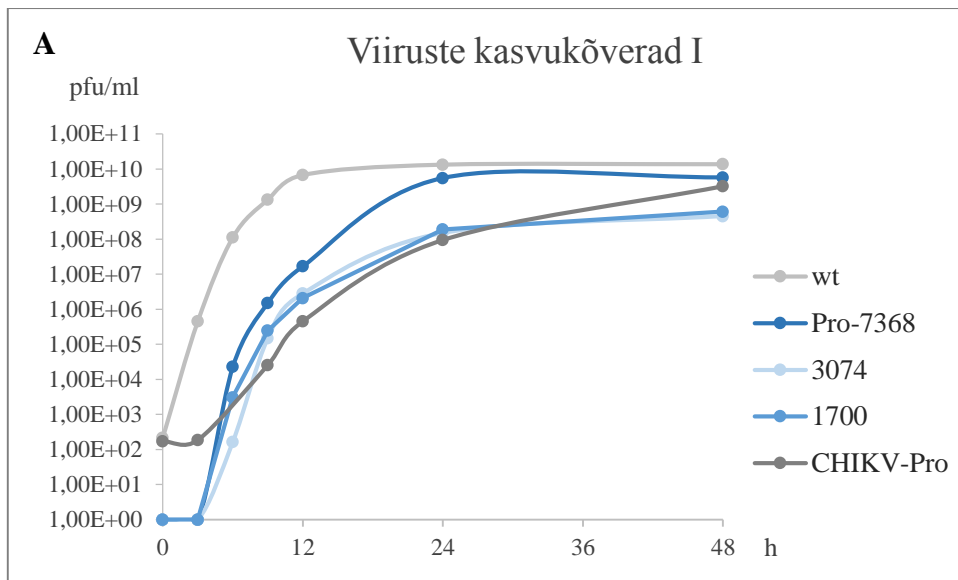
initsiatsiooni võimekused. Kuna selles on tähtis osa mittestruktuursete valkude omavahelisel suhtlusel, võib domeenide vahetamine viirusele sobivat tasakaalu häirida. Genoomse promooteri kontrolli alla on replikaasikonstruktiivsuses pandud teinegi reporterjärjestus, mille produkti mõõtes saab ka seda sünteesi etappi hõlpsasti analüüsida. Paraku on selle katse tundikkus oluliselt väiksem suurema tausta tõttu, mida meie laboris eelnevalt tehtud katsed on näidanud (Utt jt, 2016). Nende katsete põhjal võib suure kindlusega eeldada, et sg promooterile keskendumine aitab käesolevas töös uuritavaid viiruseid paremini võrrelda, kuna tulemuseks on selgemalt eristatavad luminescentsisignaale. Samuti on sgRNA süntees kahtlemata oluline, sest lisaks sellele, et see sõltub genoomse RNA replikatsioonist, kujutab see endast ka vajalikku osa viiruse infektsioonitsükli. Seetõttu annab tehtud transreplikaasi eksperiment asendamatu infot mutantsete viiruste replikaaside toimimisest ja selle seosest vastavate viiruste infektsioonilisusega.

Viiruste infektsioonidünaamika võrdlemine

Esialgsete ja mutatsioonidega *swap*-viiruste infektsioonidünaamikat võrreldi kasvukõverate konstrueerimise abil. Rakke nakatati esmaste viirusvarudega ja graafikule kanti kahe ööpäeva vältel juurde tekkinud nakatamisvõimeliste virionide hulga tõus. Kõverate tõusu ja maksimumväärtust analüüsides võib teha oletusi viiruse kohanemise kohta – järjestikkuste infektsioonitsüklitega kogunevad uued adaptiivsed mutatsioonid ja paljunemiseelise populatsioonid saavutavad ülekaalu. Tiitri aeglasem kasv võib viidata probleemidele mõnes nakatamisringi etapis, mis takistavad viirusel edukalt uute rakkudeni jõuda ja seal paljuneda.

Kasvukõverad tehti viie viiruse jaoks, mille mutatsioonid ICA põhjal infektsioonilisust tõstsid: 4083, 1700, 3074, Pro-7368 ja 3240. Neid võrreldi eelnevalt leitud graafikutega vastavate esialgsete *swap*'ide ja metsiktüüpi SFV kohta (Teppor, 2014). Joonis 9A kujutab CHIKV-Pro grupi viiruseid ja joonisel 9B-l on näidatud CHIKV-nsP2 ja SINV-macro tuletised. Esimeselt graafikult on näha, et kui kõikide vahetatud domeeniga viiruste kiireima kasvu faas hilineb märgatavalt võrreldes metsiktüüpi SFVga, siis Pro-7368 kõver tõuseb kõige kiiremini ja jõuab juba 24 tunni möödudes wt-ga sarnasele platoole. 1700 ja 3074 järgivad peaaegu identset kasvudünaamikat, omades küll selgelt logaritmilist kasvufaasi, kuid jõudes palju madalamale platoole, kus viiruse tiiter stabiliseerub ehk uusi virione enam eriti juurde ei tehta. Kõikide nende viiruste kasvukõverate kuju on sarnane wt SFV omale. Ka asendusetä *swap*'i tiiter kasvab 24 tunniks umbes sama suurusjärguni ja 48 tunniks isegi wt viiruse omani. Samas on sellele viirusele saadud graafik palju laugem ehk viiruse paljunemine on pikemat aega väga aeglane. Graafiku lauge vorm viitab kaudselt sellele, et algselt adaptatsioonideta viirus muutub paljunemistsükli käigus, tekitades uusi ja paremini paljunevaid genoomide variante.

9B jooniselt selgub, et 3240 asendus ei mõjuta SINV-macro infektsioonidünaamikat põhimõtteliselt üldse, sest vastavad graafikud kattuvad pea täies ulatuses. Igas teises seni tehtud katses andis see mutatsioon viirusele selge eelise, nii et kasvukõvera samaks jäämine on mõnevõrra üllatav. On võimalik, et *swap* omandas selle kasuliku asenduse väga kiiresti pärast nakatamist ja paljunes seetõttu sama edukalt edasi. CHIKV-nsP2 jaoks tähendas uuritud muutus 4083 positsioonis aga koguni kasvu pidamajäämist madalamal platool, mille põhjus võib seletada ka tiitrimise tulemust, mida asenduse sisseviimine ei mõjutanud. Kuna 4083 replikaas osutus algse *swap*'i omast selgelt edukamaks ja ka infektsioonilisus tõusis selle mutatsiooniga viirusel märgatavalt, on huvitav, et teistes katsetes puudub asendusel efekt või langetab see hoopiski virionide juurde tegemise võimet. Ilmselt on 4083 mutatsiooni näol tegemist asendusega, mis mõjutab paljusid viiruse omadusi samaaegselt, kuid erineval moel – näiteks suurendades RNA replikatsiooni, nagu selgus ICAsT ja tranreplikaasi katsest, kuid vähendades samal ajal viiruse kasvu jooksul leitavat tiitrit (Joonis 9B). Arvestades, et nii *swap* kui ka mutatsioon ise hõlmavad nsP2 regiooni, mis on üks alfaviiruste multifunktsionaalsemaid alasid, pole selline tulemus iseenesest ei võimatu ega koguni eriti üllatav.



Joonis 9. Viie infektsioonilisust tõstnud mutatsiooniga viiruse, nende muutuseta variantide ja metsiktüüpi SFV kasvukõverad. Kujutatud on viiruse tiitrid kindlates ajapunktides 48 tunni jooksul pärast nakatamist MOI=0,1 tingimustes. Hallides toonides on esialgsete ja wt viiruste ning sinistes kompensatoorsete asendustega tuletiste graafikud. **A.** CHIKV-Pro grupi viirused. **B.** SINV-macro ja CHIKV-nsP2 grupi viirused.

Lähtudes nähtud erinevustes kasvukõverate ja eelnevate katsete vahel, samuti mõne teise viiruse edukuse varieeruvusest eri eksperimentides, võib kasulikku infot saada ka ülejäänud *swap*'ide kasvugraafikute konstrueerimisel. Näiteks oleks huvitav uurida, kuidas käituvad muud CHIKV-nsP2 tuletised, eriti nsP2-7368, mida madala infektsioonilisuse tõttu praegu ei kaasatud, kuid mis oli väga kõrge tiitriga. Samuti tõstis sama mutatsioon CHIKV-Pro-sse viiduna nii selle tiitrit kui andis selge eelise infektsioonidünaamikas. Kuna 7368. nukleotiidi asendamine mõjutas algseid viiruseid erinevalt, aidates sõltuvalt vahetatud domeenist *swap*'e erineval moel ja etappidel, on oluline täpsemalt uurida, mida see mutatsioon võib viiruse jaoks muuta ja miks selle vahetuse tagajärjed samad pole.

Kokkuvõte viiruste omaduste võrdlemisest

Järgnevalt antakse kokkuvõtlik ülevaade viiruste omaduste võrdlemise tulemustest. CHIKV-nsP2-st tuletatud viiruseid vaadeldes võib näha, et kui muutus 4083. positsioonis parandas selgelt viiruse edukust nii ICAs kui transreplikaasi katses, siis tiitrit see ei mõjutanud ja kasvukõvera järgi oli mutatsiooniga *swap* isegi nõrgem kui esialgne. Teiste CHIKV-nsP2-te viidud asenduste tagajärjed olid pealtnäha vastupidised – infektsioonilisus ja replikatsiooniefektiivsus jäid samaks, kuid teistes katsetes võis märgata mõne mutatsiooni positiivset mõju. Näiteks suutsid kõik tuletised, nagu ka 4083, tekitada rakkudes CPED, kusjuures nsP2-7368 häiris rakke 4083-ga võrreldaval määral. Sellel viirusel oli ka märgatavalt kõrgem tiiter kui esialgsel *swap*'il ja teistelgi grupiliikmetel, mis võib viidata adapteerumisele katsete vältel ehk uute kasulike mutatsioonide tekkele. Sama 7368. nukleotiidi mutatsioon esines ka adapteeritud CHIKV-Pro-s, avaldades selle kontekstis aga veidi teistsugust mõju. Sarnaselt ülejäänutele sellesse *swap*'i viidud asendustele tõstis 7368 märgatavalt viiruse infektsioonilisust, mida oli näha ICA tulemustest. CHIKV-Pro grupi puhul ilmneb veel, et kui näiteks 1700 ja Pro-7368 tiitrid olid mõlemad kõrgemad kui algsel viirusel, siis 3074 muutusega kaasnes hoopis tiitri langus. Efektiivseim replikaas oli 1700-l, kuid kasvukõveratest on näha, et 7368. positsiooni mutatsioon mõjub kõige positiivsemalt viiruse kasvukiirusele.

SINV-*swap*'ide võrdlemisel tuleb välja, et SINV-NTD-st leitud asendused ei suurenda individuaalselt viiruse edukust pea üldse, kuigi 5337 puhul võis märgata tsütopaatilist efekti ja 1914 replikaas oli selgelt aktiivsem kui algse *swap*'i oma. On tõenäoline, et need mutatsioonid võivad viirust abistada vaid koos, mitte üksikult. SINV-macro-s 3240. mutatsiooni tegemine tõstis nii viiruse infektsioonilisust ICAs, võimet tekitada CPED, tiitrit kui replikatsiooniefektiivsust, kuid ei avaldanud pea mingit mõju kasvudünaamikale. See on kindlasti vastuoluline, aga võib seletuda algse *swap*'i adapteerumisega katse jooksul, võttes arvesse 3240 uurimisel juba selgunud asjaolu, et vaid üks muutus suudab viiruse edukust niivõrd palju tõsta.

Sekundaarsete mutatsioonide otsimine

Algselt tekkisid kompensatoorsed mutatsioonid adapteeritud viirustes erinevate kombinatsioonidena (Teppor, 2014), mis antud töös üksikuteks asendusteks lahutati, et uurida iga individuaalse muutuse mõju. Kuna kohastumuslik eelis võib aga tuleneda just mutatsioonide koosesinemisest, näiteks võib mingi interaktsiooni toimimise taastamiseks olla vaja kohandada mitme komponendi järjestust, taheti leida, kas analüüsitud *swap*'ides tuli nakatamistsükliatega juurde uusi asendusi kohtades, mis pärast sama algviiruse adapteerimist

samuti muutunud olid. Selleks otsiti teisest viirusvarude populatsioonidest sekundaarseid mutatsioone, keskendudes kõigile neile aminohappevahetustele, mis alguses *swap*'is esinenud olid. Uuritud kombinatsioonid on välja toodud metoodika peatükis (Tabel 2).

Uusi asendusi leiti CHIKV-nsP2-st tuletatud viirustes (Tabel 5): nsP2-7368-s oli juurde tekkinud sama mutatsioon 4083 positsioonis. Veel avastati nii 2378-s kui 6987-s teisi muutusi uuritud 4083 koha lähiumbruses, nimelt oli 2378-s vahetunud kas 4089. või 4092. nukleotiidijääk (vastavalt G→T ja C→A) ning 6987-s ilmnes 4091. positsiooni G→C mutatsioon. Aminohappelises järjestuses vastavad neile 1335 Cys→Phe, 1336 Ala→Glu ja 1336 Ala→Pro muutused. Sekundaarsete mutatsioonide kogunemine näitab, et selle regiooni modifitseerimine on antud *swapi*'ga viirusele oluline ning võib seletada, miks nende viiruste edukus katsetes, mille tulemuste kogumise ajal olid juba uued replikatsioonitsüklid toimunud, eeldatust suuremad olid. Näiteks võib meenutada, et kõik CHIKV-nsP2 grupi muudetud viirused suutsid CPed tekitada ja samuti oli nsP2-7368 tiiter esialgse *swap*'iga võrreldes palju kõrgem.

Tabel 5. Kompensatoorsete mutatsioonidega viirustes leitud sekundaarsed asendused. Välja on toodud viirus, kust muutusi otsiti ning leitud mutatsioonide nukleotiidne ja aminohappeline asendus. Sinisena on märgitud käesolevas töös juba uuritud muutus 4083. positsioonis, ülejäänud on uued seni mitte esinenud mutatsioonid.

Viirus	Leitud sekundaarne mutatsioon	
	Nukleotiidne asendus	Aminohappeline asendus
2378	4089 G→T	1335 Cys→Phe
	4092 C→A	1336 Ala→Glu
6984	4091 G→C	1336 Ala→Pro
nsP2-7368	4083 C→T	1333 Ala→Val

Väärrib tähelepanu, et üheski teises viiruses taoliseid sekundaarseid asendusi ei leitud, sealjuures ka sama 7368. positsiooni asendusega CHIKV-Pro tuletises mitte. Seega on ilmne, et 7368 mutatsioon avaldab erinevatele *swap*'idel erinevat mõju: CHIKV-Pro puhul on see infektsioonilisuse tõstmiseks piisav, CHIKV-nsP2 puhul aga mitte (Joonis 7). On väga huvitav, et kõik CHIKV-nsP2-st pärinevate viiruste lisamutatsioonid toimusid samas, infektsioonilisust tõstnud 4083. nukleotiidijäägi muutust ümbritsevas alas, kuid erinevates kohtades, kusjuures vahetunud aminohappejäägid varieerusid samuti. Võib oletada, et see piirkond on oluline uuritud nsP2 asendamise toimunud kahju korvamiseks, omades erilist tähtsust just terve mittestruktuurse valgu muutmisel. Samuti on viirusele arvatavasti olulisem just regiooni modifitseerimine algsest erinevaks, mitte täpne järjestus ise, sest toimunud mutatsioonid ei

esinenud samas kohas ega viinud sarnaste aminohappeliste tulemusteni. Nii selle piirkonna kui kõigi teiste uuritud mutatsioonide võimaliku tähtsuse ja rolli üle viiruse elutsükli arutletakse alljärgnevas peatükis.

Veel tasub märkida, et kuigi antud töös oli eesmärgiks leida sekundaarseid asendusi just neis positsioonides, mis esialgu kombinatsioonidena esinesid, avastati mutatsioone ka mainitud teistes, uutes kohtades. Seega võib olla kasulik üle kontrollida kogu viiruse genoom, kuna seni kohtamata asendusi võib ilmnedagi veelgi. Samas on selge, et leitud mutatsioonid asusid kõik ühes kitsas alas, mis viitab selle regiooni olulisusele ja kinnitab taas interaktsioonide tõenäolisust nende osade vahel, millele uurimuses keskendutud on.

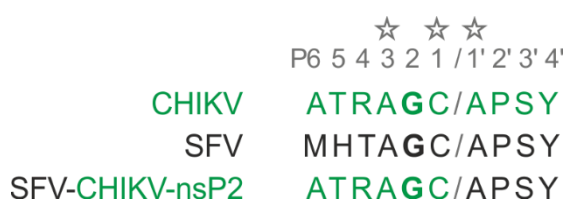
Analüüsitud mutatsioonide võimalik roll

Saadud tulemuste ja kirjanduses avaldatud artiklite põhjal saab arutleda uuritud mutatsioonide võimaliku rolli üle viiruse elutsükli etappides ja toimuvates interaktsioonides, mida asendused mõjutada võivad. Jooniselt 6 võib näha, et suur osa muutustest olid toimunud mittestruktuursete valkude või domeenide piiridel ja tihti näiteks viiruse ühes olulisimas valgus nsP2-s. Asendusi tekkis ka ensümaatilise aktiivsusega alades, sealhulgas proteaasis ja polümeraasis (vastavalt nsP2 ja nsP4 C-terminaalsetes osades).

CHIKV-nsP2-s tekkis enim mutatsioone, millest viirusele kõige kasulikum tundus olevat 4083. nukleotiidi asendus. 2378 ei olnud eriti edukam kui algne viirus, mida võib seletada asjaoluga, et kuigi see positsioon asub mitme ensümaatilise aktiivsusega nsP2 kodeerivas järjestuses, jääb see katalüütiliselt oluliste motiivide vahele ja on näidatud, et neist motiividest nsP2 NTPaasi ja trifosfaati aktiivsuseks piisab (Karpe jt, 2011). Seega on mutatsiooni 2378 mõju viiruse valgus olulistele aktiivsustele suhteliselt väike ja see kajastub ka mutantse viiruse omadustes.

Mutatsioon positsioonis 4083 on uuritustest üks huvitavamaid, sest annab viirusele selge eelise ja selle lähiümbruses tekkisid teistes CHIKV-nsP2 tuletistes muudki sekundaarsed mutatsioonid (Tabel 5). *Swap*'i järjestuse vaatlusel selgub, et need muutused asuvad nsP2 lõpus: 4083. nukleotiidijätk kuulub nsP2/nsP3 lõikesaidist tagasi lugedes kolmanda koodoni koosseisu, mida lõikesaidis tähistatakse kui P3 ah jääki (Joonis 10), uued asendused vahetasid aga nsP2 viimast (P1) ja nsP3 esimest (P1') aminohappejääki. Nende muudatuste vahele jäänud eelviimane (P2) aminohape, glütsiin, on kõigis alfaviirustes absoluutselt konserveerunud ja selle muutmise mistahes aminohappeks tooks kaasa nsP2 ja nsP3 vahelise lõikamise täieliku ära kadumise. Samas P3alaniin ja P1 tsüsteiin alfaviirustes konserveerunud pole, mis seletab, kuidas nii olulises kohas asendusi taluti (Strauss ja Strauss, 1994). Samas on varem kirjeldatud katset, kus selle tsüsteiini vahetamine muutis proteaasi võimetuks nsP2 ja nsP3 vahekohta

lõikama (Lulla jt, 2006). Sel juhul oli aga kogu järjestus SFV oma ja kuna käesolevas töös uuritud viirus oli CHIKV proteaasiga rekombinant, ei lähe saadud tulemused vastuollu. Lisaks takistas 4083-s esinenud mutatsioon ehk P3alaniini asendumine valiiniga SFV proteaasil nsP2/nsP3 saidi protsessida (Lulla jt, 2012). Ka lõikesaidile vahetult järgnevalaniin on konserveerunud, mis teeb tähelepanuväärseks selle asendumise struktuurilt väga erinevate aminohapetega. On võimalik, et leitud mutatsioonid jälgivad ühte ja sama loogikat – nad kõik muudavad nsP2/nsP3 saidi protsessimise ebaefektiivseks või, mis on siiski vähem tõenäoline, koguni võimatuks. Võib üsna kindlalt oletada, miks viirusel sellist efekti vaja on. Nimelt asub SFV-1 nsP2/nsP3 vahelise saidi P4 positsioonis treoniin, CHIKV-1 ja antud töö *swap*-viirustel aga arginiin. Meie laboris parallelselt teostatud uurimistöö on näidanud, et ehkki SFV tegelikult isegi talub selles positsioonis arginiini jääki, toob see kaasa viiruse replikaasi toimimise efektiivsuse mitmesaja kordse languse. Seega on loogiline oletada, et P4 arginiin on probleemiks ka *swap*-itud viirustel ja adaptiivsed mutatsioonid aeglustavad selle saidi lõikamist. Seetõttu tasub järgmisena neid asendusi edasi uurida eelkõige lõikereaktsiooni toimumisaktiivsuse määramise katsetega, seda enam, et nagu juba näidatud, ei pruugi vähem edukam lõikamine sugugi tähendada viiruse infektsioonilisuse langust (Lulla jt, 2006), samal ajal kui kiirem lõikamine võib kaasa tuua soovimatuid ja negatiivseid tagajärgi. Lisaks teeb selle lõikesaidi võrreldes teistega eriliseks nähtus, et efektiivseks proteaasi tööks ei piisa saidi enda lühikesest järjestusest, vaid vajatakse ka lisainteraktsioone näiteks macro domeeniga ja nsP2 NTD-ga (Lulla jt, 2012). Nende kontaktide olulisus võibki tingida antud töös käsitletud mutatsioonide tekke – kui terve nsP2 on vahetatud, muutub taust, sealhulgas NTD, mille osalemine reaktsiooni koordineerimisel on oluline proteaasi aktiivsuse tagamiseks.



Joonis 10. Alfaviiruste lõikesaitide ah-de tähistamine nsP2/nsP3 saidi näitel. Joonisel on näidatud 10 ah-d nsP2/nsP3 lõikesaidi järjestusest, mille tähised on ülemises reas (P6–1, P1'–4'). Välja on toodud CHIKV ja SFV järjestused ning antud töös kasutatud CHIKV-nsP2 rekombinandi järjestus, mis selles piirkonnas langeb kokku wt CHIKV-s esineva järjestusega. Paksus kirjas on märgitud konserveerunud glütsiini jääk. Tähekesega on märgitud saidi P3, P1 ja P1' aminohape, mille mutatsioonid käesolevas töös käsitletakse.

CHIKV-nsP2-s uuritud 6984. nukleotiidijärgi asendus viiruse edukust eriti ei mõjutanud. Seetõttu on loogiline oletada, et CPE tekitamine võis tuleneda kogunenud sekundaarsetest mutatsioonidest, näiteks juba käsitletud vahetustest nsP2/nsP3 lõikesaidis. Samuti jääb muutus välja nsP4 C-terminaalse polümeraasi katalüütilisest keskusest (O'Reilly ja Kao, 1998), aga

tasub märkida, et selle muudatusega vahetus aminohappejääk tsüsteiinist, mis esineb nii SFV kui CHIKV wt viirustes, türosiiniks. Selline mutatsioon on suhteliselt radikaalne ja võib rolli mängida interaktsioonides teiste domeenidega ja/või valkudega, kuigi üksi mõju ei pruugi avaldada.

nsP2- ja Pro-7368-s esinenud mutatsioon muudab küll nsP4 lõpust 4. aminohappejääki, kuid märksa olulisem on selle asumine sg promooteri alas. Nimelt on 7368. nukleotiidijääk sg RNA algusest arvestades -52 positsioonis, jäädes nii mittestruktuurse polüproteiini kui sg promooteri koosseisu (Ou jt, 1982). Täpsemalt on tegemist sg promooteri -1 positsiooniga ehk viimase nukleotiidiga, mida sgRNAse ei kaasata. Peaaegu kõikidel alfaviirustel, sealhulgas CHIKV-l, on selles positsioonis adeniini jääk. Ka mõnedel SFV tüvedel, nagu A7(74), on samas kohas adeniin (Saul jt, 2015). Seega on SFV4, millel põhinevad *swap*'itud viirused, erandiks, kuna omab selles positsioonis guanosiini. See jääk muudab minimaalse sg promooteri tavalisest pikemaks (Rausalu jt, 2009) ja selle vahetamine adensiini vastu, nagu juhtus antud töös tekkinud mutatsiooni puhul, kiirendab SFV paljunemist, suurendab viiruse tiitrit ja lüüsilaikude mõõtmeid ning muudab viiruse vastupidavamaks interferooni viirusvastasele toimele (meie labori avaldamata andmed). Seega toob nimetatud muudatus *swap*'itud viirustes kaasa enamikele alfaviirusele (sealhulgas CHIKV-le) omase nukleotiidijäägi tekkimise. Võimalik, et sellega kaasnavad eelpool loetletud viiruse paljunemist mõjutavad efektid. Samuti võib asjaolu, et taoline vahetus toimus vastusena nsP2 *swap*'ile, olla seotud sellega, et nsP2 proteaas abistab viiruse polümeraasi sg promooterile seondumisel (Suopanki jt, 1998). Huvitav on ka see, et sama asendus mõjutas *swap*'e erinevalt, kuid see on oodatav, arvestades eri määral muudetud ja nõrgestatud algviiruseid. Võib oletada, et CHIKV-nsP2 vajas domeeni vahetumise tulemusel tekkinud kahju korvamiseks lisamutatsioone mõnd muud etappi, näiteks polüproteiini lõikamist, mõjutavas positsioonis. Samuti võis näha, et sg promooterit ei muudetud teiste asendustega viirustes sekundaarselt.

CHIKV-Pro 1700. nukleotiidijäägi mutatsioon asub taas lõikesaidis, seekord on tegu nsP1/nsP2 vahekohaga ja muutunud on nsP2 teine aminohape (P2' jääk) (Joonis 10). On näidatud, et nsP3/nsP4 saidi lõikamisel on olulised lõikekohale vahetult eelnevad ja üks järgnev ah (Lulla jt, 2006). Samas on andmeid nsP1/nsP2 saidi lõikamise kohta vähe ja siin võivad kehtida teistsugused reeglid. Meie laboris saadud uued andmed näitavadki, et nsP2 regioon on protsessinguks oluline. Positsioon P3' mõjutab oluliselt nsP1/nsP2 saidi lõikamist, samal ajal kui positsioon P7' mõjutab nsP2/nsP3 saidi lõikamist. Nii et siin uuritud asendusel ei pruugi nsP1/nsP2 saidi lõikamisel suurt tähtsust olla, seda enam, et see jääk pole alfaviirustel tugevalt konserveerunud. Samas toodi juba eespool välja, et nsP2/nsP3 saidi protsessimisel vajatakse

interaktsioone mõlema valgu N-terminaalse osaga, lisaks ei toimu seda lõikamist üldse, kui nsP2-1 pole vaba algotsa (Vasiljeva jt, 2003). Arvestades P7' positsiooni mõju nsP2/nsP3 saidi lõikamisele tundub vägagi tõenäoline, et 1700. nukleotiidijäägi (P2' ah) vahetumisega reguleeritakse taas nsP2/nsP3 lõikereaktsiooni efektiivsust ja kiirust. Kui see nii on, siis saavutab viirus ühte ja sedasama tulemust, milleks on nsP2/nsP3 saidi lõikamise efektiivsuse muutmine, kahel väga erineval moel: muutes saiti ennast (vahetused 4083 ja selle lähedal) või siis muutes ühte selle saidi lõikamises osalevat kofaktorit (vahetus 1700); igal juhul vajab nende vahetuste täpne mõju kindlakstegemine edasist uurimist.

Järgmine CHIKV-Pro-s esinenud asendus, 3074, asub nsP2-s proteaasi alguses, kuid kodeeritav aminohappejääk ei kuulu kindlaks tehtud ensümaatilise tsentri moodustajate hulka (Russo jt, 2010). Mutatsioon tõstis aga paljudes katsetes viiruse edukust ja seetõttu on oluline selle tagamaid lähemalt uurida. Selle asendusega replikaas polnud esialgse *swap*'i omast märgatavalt aktiivsem, mistõttu tundub jällegi usutavam, et mutatsioon mõjutab polüproteiini töötlemist (mida veelgi toetab selle asukoht nsP2-s proteaasis) või siis on seotud mingi teise nsP2 funktsiooniga, mis ei mõjuta samas viiruse RNA replikatsiooni.

SINV-NTD kompensatoorsed mutatsioonid ei avaldanud individuaalselt viirusele eriti suurt mõju. Üksikute katsete tulemustes võis küll näha mõningaid erinevusi esialgse ja muudetud *swap*'i vahel, kuid on võimalik, et need asendused on replikatsiooni jaoks suuresti neutraalsed ja on olulised mõnes vähemkriitilises viiruse elutsükli etapis. Mutatsioon positsioonis 1914 muudab aminohappejääki nsP2 N-terminaalse domeeni algusosas ehk domeenis, mis sellel *swap*'il SINV-st pärit oli. NTD-1 endal ensümaatilisi aktiivsusi teadaolevalt ei ole, kuid ta aitab tervel nsP2-1 aktiivsuseks vajalikku konformatsiooni saavutada ja hoida (Das jt, 2014). Antud mutatsiooni seni kirjeldatud pole, saab vaid öelda, et struktuurselt on muutus suhteliselt väike –alaniin vahetub pikema, kuid endiselt hüdrofoobse kõrvalahelaga valiini vastu. 5337. nukleotiidijäägi muutus asub ebaselge ülesandega hüpervarieeravas domeenis nsP3 lõpus, mille järjestus alfaviiruste vahel väga tugevalt erineb. Siiski ilmneb lähemal vaatlusel, et see konkreetne asendus tekkis lühikeses järjestusemotiivis, mis on erinevalt seda ümbritsevatest järjestustest suhteliselt hästi konserveerunud. On leitud, et see motiiv seob rakulist amfifüsiini ja motiivi deleteerimisel viiruse RNA süntees langeb ning virulentsus loomkatsetes väheneb märgatavalt (Neuvonen jt, 2011). Samas on nii SFV kui SINV järjestuses antud positsioonis just mutatsioonieelne lüsiin ja põhjus, miks see vahetus metioniiniga, jääb veel ebaselgeks. Tõenäoliselt ei ole see otseselt seotud amfifüsiinide seondamise või mitteseondumisega, sest selle ah vahetamine glutamiinhappe jäägi vastu ei mõjuta nsP3 valgu võimet amfifüsiinidega seonduda (Neuvonen jt, 2011)

SINV-macro-s tekkinud 3240. nukleotiidijäägi asendus, mis aminohappelises järjestuses vastab 1052. positsiooni Val→Glu muutuseni proteaasi kodeerivas genoomi osas, vähendab seniste andmete põhjal proteaasi aktiivsust. Täpsemalt kirjeldati selle aminohappejäägi võimalikku rolli SFV infektsioonis Saul jt 2015. aastal avaldatud artiklis, kus näidati, et see ja üks nsP1 lõpus olev sellega interakteeruv aminohape (P4 arginiin; Joonis 10) määravad koos viiruse neurovirulentsuse. Sealjuures annavad 1052. positsiooni valiin ja glutamiinhape kombinatsioonis sobiva nsP1 lõpu aminohappesega vastavalt mittevirelense ja virulentsena fenotüübi. Leiti, et Glu1052 aeglustab nsP3 ja nsP4 vahelist lõikamist proteaasi poolt, mis tõenäoliselt tuleneb proteaasi aktiivsuse vähenemisest, ja kompenseerib P4 arginiini jäägist tingitud nsP1/nsP2 saidi liiga kiiret lõikamist, mis viiruse infektsioonilisust sellise kompensatsiooni puudumisel tugevalt kahjustab. Lisaks on võimalik, et polüproteiini töötlemise dünaamika kontrollimisega nii 1052. kui eelnevalt välja toodud aminohappejääkide poolt reguleeritakse muu hulgas ka viiruse interaktsioone peremeesrakuga, näiteks on leitud, et nsP1/nsP2 saidi lõikamise kiirus võib rakus mõjutada interferooni tootmise signaalirada (Simmons jt, 2010). Sedasama kinnitavad ka mitmed meie labori andmed. Samas on ebaselge, kas see võiks omada mingit efekti viiruse paljunemisel BHK rakkudes, mis ei ole võimelised interferoone tootma ega nendele reageerima. See, et proteaasi aktiivsust vähendav mutatsioon tekkis vahetatud macro domeeniga viiruses, võib tuleneda selle domeeni osalemisest nsP2 ja nsP3 vahelises saidi lõikamises (Lulla jt, 2012). Kui see on nii, siis on see kaudseks tõendiks, et SINV macro-domeen põhjustab mingi (tõenäoliselt nsP2/nsP3) saidi liiga kiiret lõikamist ja selle vältimiseks on viirusel kasulik omada tavapärasest vähem aktiivset proteaasi. Samas võib olukord olla ka keerulisem. Kuna selles protsessinguetapis vabaneb nsP2, millest suur osa tuuma raku elutegevust häirima läheb, peab selle ja teiste arvatavasti nsP2/nsP3 lõikereaktsiooni reguleerivate mutatsioonide mõju mõistmiseks jällegi arvestama viiruse ja peremehe vaheliste suhete võimaliku olulisusega.

Edasised uurimissuunad

Antud töös saadi ülevaade, kuidas uuritud mutatsioonid mõjutavad viiruste infektsioonilisust, paljunemist ja RNA replikaasi aktiivsust ning tehti oletusi asenduste rolli kohta viiruse elutsükli. Tulenevalt leitud infost saab järgnevalt keskenduda täpsematele uuringutele, mis mutatsioonide võimalikku olulisust mõista aitaksid. Samuti oleks vajalik teha veel mõned üldisemad eksperimendid, näiteks analüüsida viiruste käitumist putukarakkudes, sest peremeesorganismide suur erinevus avaldab alfaviirustele kohati vastandlikku kohastumuslikku survet. Veel võib konstrueerida kasvukõverad nende *swap*'ide jaoks, mis seni katsest välja jäid, aga varem kohati edukad näisid. Sekundaarsete mutatsioonide otsimisel

selgus, et nsP2/nsP3 lõikesaidi lõikamise kiirus on CHIKV-nsP2-le sedavõrd oluline, et viirus kontrollib seda erinevate järjestuste kaudu, mistõttu järgmisena on kavas võrrelda topeltnutatsioonidega konstrukte, kuhu leitud asenduste kombinatsioonid sisse on viidud. Mitme asenduse koosesinemist võiks vaadelda ka teiste viiruste puhul, kuid kuna teistes positsioonides algul esinenud asendusi uuesti ei tekkinud, ei pruugi see põhjendatud olla.

Seni tegemata katsetest on üks tähtsamaid peremeesraku interferoonvastuse uurimine. Viirus interakteerub alati nakatatud organismiga ja nendevaheliste suhete mõistmine on nii molekulaarbioloogias kui meditsiinis üks tähtsamaid ja keerulisemaid ülesandeid. Interferooni sünteesi aktiivsuse vaatlemine on üks üldisemaid viise, kuidas neid interaktsioone vaadelda saab. Näiteks 3240 puhul oli välja toodud, et leitud on spetsiifilisem mõju raku signaaliradadele, mille kindlaks tegemine kõigi viiruste jaoks on kaugem eesmärk. Selliste uurimistööde jaoks on vaja katsed läbi viia primaarsetes rakkudes, kus on olemas terviklik interferoonide süsteem, samas kui BHK rakkudes pole see funktsionaalne. Viirus-peremees suhteid tasub uurida ka loomudelisel, mis sageli viirusele teistmoodi reageerivad kui seda võiks koekultuuris läbi viidud eksperimentide tulemuste põhjal oodata.

Kuna paljud asendused seostusid polüproteiini töötlemise regulatsiooniga, mis on alfaviiruste elutsükli äärmiselt tähtis komponent (ja ajalooliselt meie labori üks peamised uurimisvaldkondi), võib selle täpsem analüüsimine anda väärtuslikke andmeid mutatsioonide rolli kohta. Ka negatiivse ahela sünteesi vaatlemine aitaks viiruste käitumisest paremini aru saada. Seda võimaldavad teha radioaktiivse märkimise ja hübriidsatsiooni eksperimendid; proteaasi aktiivsust polüproteiini lõikamisel saab uurida nii rakuvabas keskkonnas kui ka nakatatud rakkudes isotoop-märgistamist kasutades.

Antud töös leitule on võimalik rajada suur hulk uusi spetsiifilisemaid uuringuid, mille tulemused koos senistega aitaksid paremini aru saada alfaviiruste infektsiooni käigust, replikatsioonitsüklist ja peremeesorganismiga interakteerumisest.

KOKKUVÕTE

Antud töös sooviti uurida vahetatud domeenidega alfaviirustes nende adapteerimise käigus tekkinud kompensatoorsete mutatsioonide mõju viirusele ja arutleda nende võimaliku rolli üle viiruse elutsükli.

Uurimuse käigus identifitseeriti kokku viis mutatsiooni, mis oluliselt suurendasid *swap*'itud genoomide infektsioonilisust. Viiruste tiitrimisel selgus, et need asendused ei pruugi virionide moodustamise võimet sama märgatavalt tõsta. Samas tõstsid mõned teised, genoomi infektsioonilisust mitte mõjutanud mutatsioonid viiruse tiitrit ootamatult palju. Replikaaside aktiivsusi analüüsides leiti, et mõni infektsioonilisust parandanud asendus mõjus replikatsioonile selgelt positiivselt, samas kui teiste mõju oli piiratud või puudus hoopis. Selliste mutatsioonide puhul pakuti välja, et mutatsiooni põhjustatud infektsioonilisuse tõus tulenes mingi muu infektsiooni etapi reguleerimisest. Viiruste kasvudünaamika vaatlemisel ilmnes, et algul kindlaks tehtud viiest märgatavalt kasulikust asendusest muutis vaid üks viiruse paljunemist tunduvalt edukamaks. Üksikute kompensatoorsete mutatsioonide sisseviimine oli üldjuhul kirjeldatud efektide tekkimiseks piisav; erandiks oli sekundaarsete mutatsioonide tekkimine ühe uuritud asenduse lähiümbrusse. Uued muutused selles regioonis olid erinevad ja tekkisid erinevaid primaarseid mutatsioone sisaldavates viirustes. Kuna seda piirkonda – mis kujutab endast nsP2/nsP3 lõikamissiati – puudutav asendus oli üks viirusele positiivselt mõjunutest primaarsetest mutatsioonidest, võib arvata, et vahetatud domeeniga viiruse jaoks on selle ala modifitseerimine millegipärast tähtis.

Saadud tulemusi tõlgendati, võrreldes neid kirjanduses avaldatud ja muude meie laboris saadud tulemustega. See võimaldas välja pakkuda oletusi uuritud mutatsioonide rolli ja toime kohta viiruse elutsükli. Torkab silma, et suur osa asendustest muutis kas mittestruktuursete valkude vaheliste lõikesaitide järjestust või osales arvatavasti interaktsioonides, mis on seotud nende järjestuste lõikamise regulatsiooniga. See tulemus pole väga üllatav, arvestades et kahes *swap*'itud genoomis oli vahetatud proteaasi kodeeriv regioon ja kõikides *swap*'ides oli muudetud vähemalt ühte proteaasi äratundmise/lõikamise järjestust. Lisaks modifitseeris üks leitud asendus viiruse subgenoomset promooterit; mutatsiooni tekkimise taust kinnitas kirjanduses esitatud oletust sg promooteri äratundmise mehhanismide kohta.

Katsetes leitud ja arutlus esitatust lähtuvalt loetleti võimalikke edasisi uurimissuundi ja eksperimente, mis võiksid aidata mutatsioonide tagapõhja ja sellega ka mittestruktuursete valkude interaktsioone täpsemalt mõista.

Studying the effects of compensatory mutations found in alphaviruses with swapped domains

Mona Teppor

SUMMARY

Alphaviruses are a genus of single-stranded positive-sense RNA viruses. They include several medically relevant human and animal pathogens, and are mostly transmitted by arthropod vectors. Alphaviruses are studied as model systems for viral replication, host-pathogen interactions and several cellular processes.

Alphaviral genomic RNA replicates in the replicase complex, which consists of virus-encoded nonstructural proteins nsP1–4. These proteins are extensively studied, as they are needed for and regulate viral infection, having unique and specific functions during replication and are involved in multiple interactions with the host cell. While the roles of individual nsP-s are quite well, although not entirely, understood the interactions between them and the exact infection mechanisms largely remain a field of continuous investigation.

For this study, 10 adaptive mutations found in alphaviruses with swapped nonstructural protein domains were analyzed. The aim was to characterize their effects on the infectivity of viral genomes, the properties of infection, RNA replication efficiency, and viral growth dynamics. Additionally, re-accumulation of secondary mutations in other originally discovered sites was screened for.

It was found that 5 of the studied mutations rescued virus infectivity, affecting different stages of the virus' life cycle. More specifically, some of them improved the efficiency of viral replication, while not necessarily bettering viral growth, and vice versa. Moreover, several substitutions, which did not rescue infectivity, had a noticeable positive effect on other infection properties, mainly seen in increased viral titers. This might be due to new secondary mutations, which were subsequently screened for. Sequencing revealed a few additional substitutions in derivatives of one swap virus. All of them appeared in the same specific region close to one of the previously described rescue-mutations. As this region overlaps with the cleavage site between nsP2 and nsP3, it indicates that this particular area and very likely the efficiency of cleavage itself, are important for the virus.

The possible role of the mutations was discussed in the light of gathered results, these from other studies carried out by our research group or available from published literature. One

substitution of those analyzed here, has been described and studied beforehand, and found to affect virus replicase maturation and virus pathogenesis in animal models. Not surprisingly, many other studied mutations seemed to be associated with regulation of the speed and manner of nonstructural protein processing, which provides basis for planning further research. A mutation changing the subgenomic promoter of viruses with a swapped protease supports published evidence on the interactions of these regions.

KASUTATUD KIRJANDUS

Ahola T, Couderc T, Ng LF, Hallengård D, Powers A, Lecuit M, Esteban M, Merits A, Roques P, Liljeström P. 2015. Therapeutics and Vaccines Against Chikungunya Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 15(4):250–257.

Ahola T, Laakkonen P, Vihinen H, Kääriäinen L. 1997. Critical residues of Semliki Forest virus RNA capping enzyme involved in methyltransferase and guanylyltransferase-like activities. *J Virol* 71(1):392–397.

Akhrymuk I, Kulemzin SV, Frolova EI. 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(13):7180–7191.

Atkins GJ, Sheahan BJ, Liljestrom P. 1999. The molecular pathogenesis of Semliki Forest virus: a model virus made useful? *Journal of General Virology* 80:2287–2297.

Berglund P, Sjöberg M, Garoff H, Atkins GJ, Sheahan BJ, Liljeström P. 1993. Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology (N Y)* 11(8):916–920.

Das PK, Merits A, 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(9):5635–5653.

de Groot RJ, Rümenapf T, Kuhn RJ, Strauss EG, Strauss JH. Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. 1991. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(20):8967–8971.

DeTulleo L, Kirchhausen T. 1998. The clathrin endocytic pathway in viral infection. *EMBO J* 17(16):4585–4593.

Ding MX, Schlesinger MJ. 1989. Evidence that Sindbis virus NSP2 is an autoprotease which processes the virus nonstructural polyprotein. *Virology* 171(1):280–284.

Firth AE, Wills NM, Gesteland RF, Atkins JF. 2011. Stimulation of stop codon readthrough: frequent presence of an extended 3' RNA structural element. *Nucleic Acids Res* 39(15): 6679–6691.

Frolova E, Frolov I, Schlesinger S. 1997. Packaging signals in alphaviruses. *Journal of Virology* 71(1):248–258.

Froshauer S, Kartenbeck J, Helenius A. 1988. Alphavirus RNA Replicase Is Located on the Cytoplasmic Surface of Endosomes and Lysosomes Free-flow Electrophoresis

- Immunoprecipitation of Sindbis Nonstructural Proteins. *The Journal of Cell Biology* 107(6):2075–2086.
- Garoff H, Huylebroeck D, Robinson A, Tillman U, Liljeström P. 1990. The signal sequence of the p62 protein of Semliki Forest virus is involved in initiation but not in completing chain translocation. *J Cell Biol* 111(3):867–876.
- Gomez de Cedrón M, Ehsani N, Mikkola ML, García JA, Kääriäinen L. 1999. RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. *FEBS Lett* 448(1):19–22.
- Gonda DK, Bachmair A, Wüning I, Tobias JW, Lane WS, Varshavsky A. 1989. Universality and structure of the N-end rule. *J Biol Chem* 264(28):16700–16712.
- Hardy WR, Strauss JH. 1989. Processing the nonstructural polyproteins of sindbis virus: nonstructural proteinase is in the C-terminal half of nsP2 and functions both in cis and in trans. *J Virol* 63(11):4653–4664.
- Helenius A, Kartenbeck J, Simons K, Fries E. 1980. On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *J Cell Biol* 84(2):404–420.
- Jose J, Przybyla L, Edwards TJ, Perera R, Burgner JW 2nd, Kuhn RJ. 2012. Interactions of the cytoplasmic domain of Sindbis virus E2 with nucleocapsid cores promote alphavirus budding. *J Virol* 86(5):2585–2599.
- Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ. 2009. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol* 4(7):837–856.
- Kallio K, Hellström K, Balistreri G, Spuul P, Jokitalo E, Ahola T. 2013. Template RNA length determines the size of replication complex spherules for Semliki Forest virus. *J Virol* 87(16):9125–9134.
- Karpe YA, Aher PP, Lole KS. 2011. NTPase and 5'-RNA Triphosphatase Activities of Chikungunya Virus nsP2 Protein. Ng Fong Poh L, ed. *PLoS ONE* 6(7):e22336.
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. 2012. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier.
- Kujala P, Ikaheimonen A, Ehsani N, Vihinen H, Auvinen P, Kaariainen L. 2001. Biogenesis of the Semliki Forest Virus RNA Replication Complex. *J Virol* 75(8):3873–3884.
- Li L, Jose J, Xiang Y, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2010. Structural Changes of Envelope Proteins During Alphavirus Fusion. *Nature* 468(7324):705–708.

- Li M, Stollar V. 2007. Distinct Sites on the Sindbis Virus RNA-Dependent RNA Polymerase for Binding to the Promoters for the Synthesis of Genomic and Subgenomic RNA. *J Virol* 81(8):4371–4373.
- Luers AJ, Adams SD, Smalley JV, Campanella JJ. 2005. A phylogenomic study of the genus Alphavirus employing whole genome comparison. *Comp Funct Genomics* 6(4):217–27.
- Lulla A, Lulla V, Merits A. 2012. Macromolecular Assembly-Driven Processing of the 2/3 Cleavage Site in the Alphavirus Replicase Polyprotein. *J Virol* 86:553–565.
- Lulla A, Lulla V, Tints K, Ahola T, Merits A. 2006. Molecular Determinants of Substrate Specificity for Semliki Forest Virus Nonstructural Protease. *Journal of Virology* 80(11):5413–5422.
- Malet H, Coutard B, Jamal S, Dutartre H, Papageorgiou N, Neuvonen M, Ahola T, Forrester N, Gould EA, Lafitte D, Ferron F, Lescar J, Gorbalenya AE, de Lamballerie X, Canard B. 2009. The Crystal Structures of Chikungunya and Venezuelan Equine Encephalitis Virus nsP3 Macro Domains Define a Conserved Adenosine Binding Pocket. *Journal of Virology* 83(13):6534–6545.
- McInerney GM, Smit JM, Liljeström P, Wilschut J. 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(2):200–206.
- Melancon P, Garoff H. 1987. Processing of the Semliki Forest Virus Structural Polyprotein: Role of the Capsid Protease. *J Virol* 61(5):1301–1309.
- Merits A, Vasiljeva L, Ahola T, Kääriäinen L, Auvinen P. 2001. Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein by nsP2 protease. *J Gen Virol* 82(Pt 4):765–773.
- Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. 2013. Viruses with Single-Stranded, Positive-Sense RNA Genomes, p 437–520. In S. Modrow, D. Falke, U. Truyen, and H. Schätzl, *Molecular Virology*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Neuvonen M, Kazlauskas A, Martikainen M, Hinkkanen A, Ahola T, Saksela K. 2011. SH3 Domain-Mediated Recruitment of Host Cell Amphiphysins by Alphavirus nsP3 Promotes Viral RNA Replication. Rey FA, ed. *PLoS Pathogens* 7(11):e1002383.
- Omar A, Koblet H. 1988. Semliki Forest virus particles containing only the E1 envelope glycoprotein are infectious and can induce cell-cell fusion. *Virology* 166(1):17–23.

- O'Reilly EK, Kao CC. 1998. Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology* 252(2):287–303.
- Ou JH, Rice CM, Dalgarno L, Strauss EG, Strauss JH. 1982. Sequence studies of several alphavirus genomic RNAs in the region containing the start of the subgenomic RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(17):5235–5239.
- Park E, Griffin DE. 2009. The nsP3 Macro Domain is Important for Sindbis Virus Replication in Neurons and Neurovirulence in Mice. *Virology* 388(2):305–314.
- Pehrson JR, Fuji RN. 1998. Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Research* 26(12):2837–2842.
- Peränen J, Takkinen K, Kalkkinen N, Kääriäinen L. 1988. Semliki Forest virus-specific non-structural protein nsP3 is a phosphoprotein. *J Gen Virol* 69(Pt 9):2165–2178.
- Rausalu K, Iofik A, Ülper L, Karo-Astover L, Lulla V, Merits A. 2009. Properties and use of novel replication-competent vectors based on Semliki Forest virus. *Virology Journal* 6:33.
- Rikkonen M, Peränen J, Kääriäinen L. 1992. Nuclear and nucleolar targeting signals of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Virology* 189(2):462–473.
- Rikkonen M, Peränen J, Kääriäinen L. 1994. ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *J Virol* 68(9):5804–5810.
- Rubach JK, Wasik BR, Rupp JC, Kuhn RJ, Hardy RW, Smith JL. 2009. Characterization of purified Sindbis Virus nsP4 RNA-dependent RNA Polymerase activity in vitro. *Virology* 384(1):201–208.
- Rupp JC, Jundt N, Hardy RW. 2011. Requirement for the Amino-Terminal Domain of Sindbis Virus nsP4 during Virus Infection. *Journal of Virology* 85(7):3449–3460.
- Russo AT, Malmstrom RD, White MA, Watowich SJ. 2010. Structural basis for substrate specificity of alphavirus nsP2 proteases. *Journal of molecular graphics & modelling* 29(1):46–53.
- Salonen A, Ahola T, Kääriäinen L. 2005. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol* 285:139–173.
- Saul S, Ferguson M, Cordonin C, Fragkoudis R, Ool M, Tamberg N, Sherwood K, Fazakerley JK, Merits A. 2015. Differences in Processing Determinants of Nonstructural Polyprotein and

in the Sequence of Nonstructural Protein 3 Affect Neurovirulence of Semliki Forest Virus. *J Virol* 89(21):11030–11045.

Sawicki DL, Sawicki SG. 1980. Short-Lived Minus-Strand Polymerase for Semliki Forest Virus. *J Virol* 34(1):108–118.

Shin G, Yost SA, Miller MT, Elrod EJ, Grakoui A, Marcotrigiano J. 2012. Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(41):16534–16539.

Shirako Y, Strauss JH. 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(3):1874–1885.

Simmons JD, Wollish AC, Heise MT. 2010. A Determinant of Sindbis Virus Neurovirulence Enables Efficient Disruption of Jak/STAT Signaling. *Journal of Virology* 84(21):11429–11439.

Singh I, Helenius A. 1992. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *J Virol* 66(12):7049–7058.

Snyder JE, Kulcsar KA, Schultz KL, Riley CP, Neary JT, Marr S, Jose J, Griffin DE, Kuhn RJ. 2013. Functional characterization of the alphavirus TF protein. *J Virol* 87(15):8511–8523.

Spuul P, Balistreri G, Hellstro K, Golubtsov A V, Jokitalo E, 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(10):4739–4751.

Spuul P, Salonen A, Merits A, Jokitalo E, Kaariainen L, Ahola T. 2007. Role of the Amphipathic Peptide of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP1 in Membrane Association and Virus Replication. *J Virol* 81(2):872–883.

Strauss EG, Levinson R, Rice CM, Dalrymple J, Strauss JH. 1988. Nonstructural proteins nsP3 and nsP4 of Ross River and O’Nyong-nyong viruses: sequence and comparison with those of other alphaviruses. *Virology* 164(1):265–274.

Strauss EG, Rice CM, Strauss JH. 1983. Sequence coding for the alphavirus nonstructural proteins is interrupted by an opal termination codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(17):5271–5275.

Strauss EG, Rice CM, Strauss JH. 1984. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Sindbis virus. *Virology* 133(1):92–110.

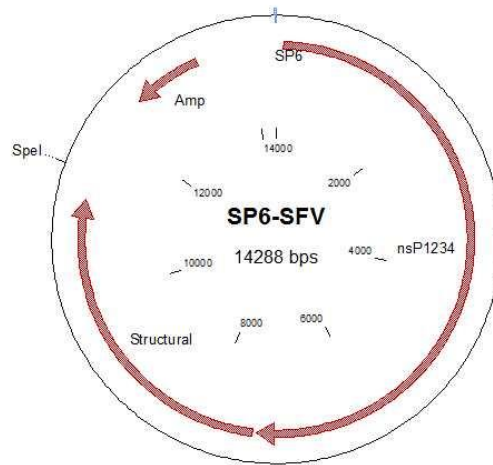
- Strauss JH, Strauss EG. 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews* 58:491–562.
- Suopanki J, Sawicki DL, Sawicki SG, Kääriäinen L. 1998. Regulation of alphavirus 26S mRNA transcription by replicase component nsP2. *J Gen Virol* 79(Pt 2):309–319.
- Zhang X, Fuge M, Day R, Kielian M. 2003. Furin Processing and Proteolytic Activation of Semliki Forest Virus. *J Virol* 77(5):2981–2989.
- Žusinaite E, Tints K, Kiiver K, Spuul P, Karo-Astover L, Merits A, Sarand I. 2007. Mutations at the palmitoylation site of non-structural protein nsP1 of Semliki Forest virus attenuate virus replication and cause accumulation of compensatory mutations. *The Journal of General Virology* 88(Pt 7):1977–1985.
- Takkinen K, Peränen J, Kääriäinen L. 1991. Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein. *J Gen Virol* 72(Pt 7):1627–1633.
- Teppor M. 2014. Alfaviiruste replikaasi kompleksi struktuuri uurimine valkude homologsete domeenide vahetamisega. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikooli Loodus- ja Tehnoloogiateaduskond.
- Utt A, Quirin T, Saul S, Hellström K, Ahola T, Merits A. 2016. Versatile Trans-Replication Systems for Chikungunya Virus Allow Functional Analysis and Tagging of Every Replicase Protein. *PLoS One* 11(3):e0151616.
- Waggoner JJ, Pinsky BA. 2015. How Great is the Threat of Chikungunya Virus? *Expert Rev Anti Infect Ther* 13(3):291–293.
- Wahlberg JM, Bron R, Wilschut J, Garoff H. 1992. Membrane fusion of Semliki Forest virus involves homotrimers of the fusion protein. *J Virol* 66(12):7309–7318.
- Wang YF, Sawicki SG, Sawicki DL. 1991. Sindbis virus nsP1 functions in negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 65(2):985–988.
- Vasiljeva L, Merits A, Auvinen P, Kääriäinen L. 2000. Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *J Biol Chem* 275(23):17281–17287.
- Vasiljeva L, Merits A, Golubtsov A, Sizemskaja V, Kaariainen L. 2003. Regulation of the Sequential Processing of Semliki Forest Virus Replicase Polyprotein. *The journal of biological chemistry* 278(43):41636–41645.
- Weaver S. 2014. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8(6):e2921.

Weiss B, Geigenmuller-Gnirke U, 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(5):780–786.

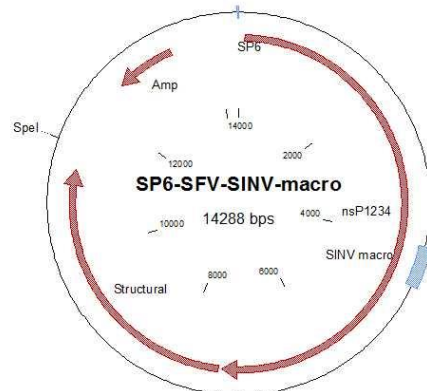
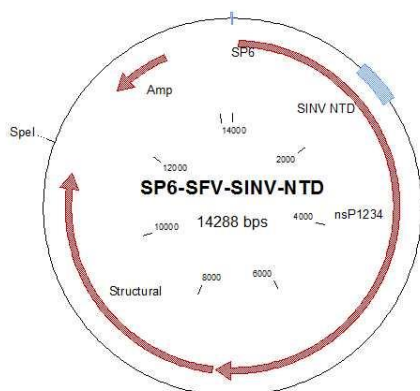
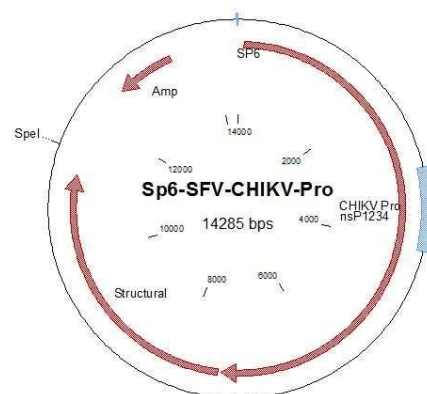
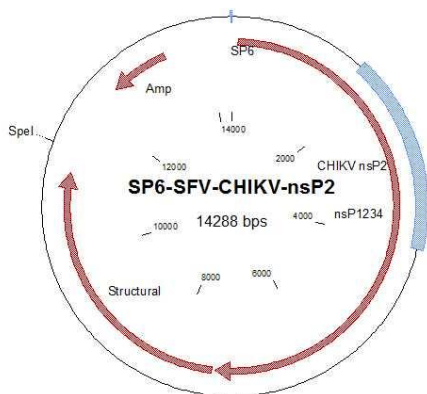
Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vonrhein C, Girard-Blanc C, Crublet E, Thompson A, Bricogne G, Rey FA. 2010. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 468(7324):709–712.

LISAD

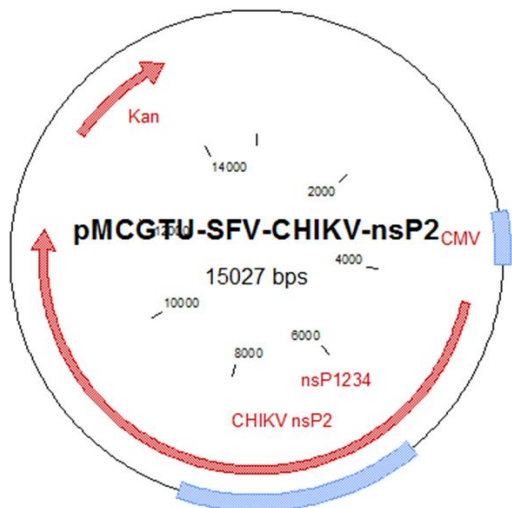
Lisa 1. Kasutatud icDNAdega plasmiidide kaardid



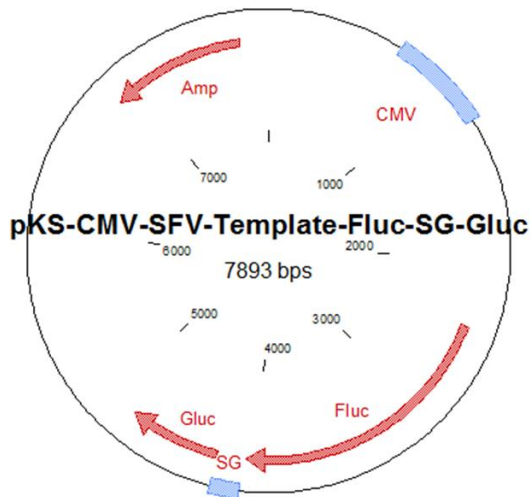
Metsiktüüpi SFV



Lisa 2. Kasutatud replikaasikonstruktide kaart CHIKV-nsP2 näitel ja *template*'i plasmidi kaart



CHIKV-nsP2 replikaasikonstrukt



template'i plasmiid

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mona Teppor,

(sünnikuupäev: 20.09.1992)

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

Vahetatud domeenidega alfaviirustes tekkinud kompensatoorsete mutatsioonide mõju uurimine,

mille juhendaja on Eva Žusinaite,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016