

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Taavi Põder

**Chikungunya viiruse mittestruktuurse valgu nsP4 ekspressiooni uurimiseks
kasutatavate konstruktide loomine ja analüüs rakukultuuris**

Bakalaureusetöö

Juhendaja professor Andres Merits, PhD

Kaasjuhendaja nooremteadur Sirle Saul, MSc

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1 Alfaviirused	5
1.2 Chikungunya viirus.....	6
1.3 Alfaviiruste genoom	7
1.4 Virion	8
1.5 Replikatsioonitsükkel.....	8
1.5.1 Viiruse sisenemine rakku	8
1.5.2 Replikatsioon.....	9
1.6 Mittestruktuursed valgud	10
1.6.1 NsP1	10
1.6.2 NsP2	11
1.6.3 NsP3	11
1.6.4 NsP4	12
1.7 CHIKV mittestruktuursete valkude märgistamine	13
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	14
2.1 Uurimistöö eesmärgid.....	14
2.2 Materjal ja meetodika	15
2.3 Tulemused ja arutelu.....	24
KOKKUVÕTE	36
SUMMARY	37
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	39
LIHTLITSENTS.....	44

KASUTATUD LÜHENDID

- Amp** – Ampitsiliin
- CFU** – tsentrifuug-filter kolonnid (*Centrifugal Filter Units*)
- BHK** – Beebi-hamstri neerurakud (*Baby hamster kidney*)
- cDNA** – komplementaarne DNA (*complementary DNA*)
- CHIKV** – Chikungunya viirus (*Chikungunya virus*)
- DAPI** – 4'-6-diamidino-2-fenüülindool (*4'-6-diamidino-2-phenylindole*)
- EEEV** – Ida-hobuseliste entsefaliidi viirus (*Eastern equine encephalitis virus*)
- EGFP** – võimendatud roheliselt helendav valk (*enhanced green fluorescence protein*)
- FCS** – veise loote seerum (*fetal calf serum*)
- Ffluc** – Jaanimardika lutsiferaas (*Firefly luciferase*)
- FS** – raaminihke element (*Frameshift element*)
- HSP** – kuumašoki valk (*Heat shock protein*)
- ICA** – Infektsioonitsentrite test (*Infectious centre assay*)
- IF** – immunoflorestentsanalüüs (*Immunofluorescence assay*)
- MOI** – infektsiooni kordsus (*multiplicity of infection*)
- NLS** – tuuma lokalisatsiooni signaal (*nuclear localization signal*)
- nsP** – mittestruktuurne valk (*nonstructural protein*)
- ONNV** – O'nyong-O'nyong viirus (*O'nyong-O'nyong virus*)
- PBS** – fosfaatpuhvriga sooladelahus (*phosphate buffered saline*)
- PCR** – polümeraasi ahelreaktsioon (*Polymerase chain reaction*)
- PERK** - PRKR –laadne endoplasmaatilise retiikulumi kinaas (*PRKR-like endoplasmic reticulum kinase*)
- RC** - Replikatsioonikompleks (*Replication complex*)
- RdRp** – RNA-st sõltuv RNA polümeraas (*RNA-dependent RNA polymerase*)
- Rluc** – *Renilla reniformis*-e lutsiferaas (*Renilla luciferase*)
- SFV** – Semliki metsaviirus (*Semliki Forest virus*)
- SIN** – Sindbis viirus (*Sindbis virus*)
- UTR** – mittetransleeritav ala (*untranslated region*)
- WEEV** - Lääne-hobuseliste entsefaliidi viirus (*Western equine encephalitis virus*)
- VEEV** – Venetsueela hobuseliste entsefaliidi viirus (*Venezuelan equine encephalitis virus*)
- VRP** – viirus-replikon partikkel (*virus-replicon particle*)
- WT** – metsiktüüp (*wild type*)

SISSEJUHATUS

Viirused on sub-mikroskoopilised objektid, millel puudub rakuline ehitus ja mis replitseeruvad vaid elusrakkudes ning eksisteerivad seetõttu elus ja eluta looduse piiril. Inimestele on viirused pakkunud huvi mitme aspekti tõttu. Osa viirustest on inimestele patogeensed, mistõttu on viiruseid uuritud eesmärgiga töötada välja nende vastaseid ravimeid ja vaktsiine. Lisaks sellele on viiruste võime muuta raku füsioloogiat ja genoomi viinud nende kasutamiseni molekulaarbiotehnoloogias.

Chikungunya viirus (CHIKV) on alfaviiruste perekonda kuuluv inimestele patogeenne viirus. CHIKV levib peamiselt troopilistes piirkondades, kus teda kannavad edasi sääsed. CHIKV infektsiooni sümptomiteks on palavik, väsimus ja artriit, mis võib halvimal juhul kesta aastaid. On dokumenteeritud ka juhtumeid, kus CHIKV nakkus on lõppenud surmaga. Huvi CHIKV uurimise vastu suurenes, kui aastatel 2004-2008 toimus Ida-Aafrikas ja India ookeanis asuvatel saartel mitmeid CHIKV puhanguid.

Käesoleva töö kirjanduse ülevaade kirjeldab CHIKV genoomi ülesehitust ning annab ülevaate viiruse kodeeritud valkudest ja replikatsioonitsüklist. Kuna töö eesmärgiks on luua konstruktid, millelt oleks võimalik sünteesida markervalguga märgistatud viiruse RNA polümeraasi, on lühidalt antud ülevaade ka töös kasutatud markervalkudest ning nende kasutamisest CHIKV märgistamisel.

Töö eksperimentaalses osas kirjeldatakse märgistatud viirusvalku tootvate konstruktide loomist ning saadud konstruktide testimist erinevate molekulaartehnoloogiliste meetoditega.

Käesolev töö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar-ja Rakubioloogia Instituudis, eksperimentaalne osa on tehtud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis. Täna oma juhendajaid Sirle Sauli ja Andres Meritsat juhendamise, kannatlikkuse, abi ja kasulike nõuannete eest. Samuti tänan Age Utti, Margus Varjakut, Margit Mutsot, Liis Karo-Astoveri ja teisi Tehnoloogiainstituudi töötajaid abi ja nõuannete eest.

Märksõnad:

RNA viirus, alfaviirus, Chikungunya

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Alfaviirused

Alfaviirused on positiivse RNA genoomiga viirused, mis koos Rubiviirustega moodustavad Togaviridae sugukonna (Strauss ja Strauss, 1994). Üle maailma on avastatud 29 erinevat alfaviiruste liiki (Powers, 2008). Laialt levinud viiruste perekonnana on alfaviiruseid leitud kõikjalt üle maailma, välja arvatud Antarktikast. Individuaalsete liikide geograafiline jaotus on piiratud spetsiifiliste ökoloogiliste piirangute ja viiruste ülekannet vahendava vektori spetsiifilisuse poolt (Powers, 2008).

Alfaviiruste vektoriteks on lülijalgseid (enamasti sääsed, kuid alfaviiruseid on avastatud ka lestades, puukides ning täides (Strauss ja Strauss, 1994)), mistõttu kuuluvad alfaviirused arboviiruste hulka (Strauss ja Strauss, 1994). Alfaviiruste vektorülekanne võib olla väga spetsiifiline. Näiteks *Venezuelan equine encephalitis* viiruse (VEEV) puhul võib viiruse kandjaks olla vaid üks kindel sääseliik. Vektor-spetsiifilisus on seetõttu tõenäoliselt üks peamisi alfaviiruste leviku piirajaid (Powers jt., 2001). Paljude alfaviiruste peamisteks selgroogseteks peremeesteks on linnud. Reeglina on lindudega seotud viirused, nagu näiteks Sindbis (SINV), *Western equine encephalitis* (WEEV) ja *Eastern equine encephalitis* (EEEV) viirused ka laiemalt levinud, võrreldes teiste alfaviiruste perekonna esindajatega (Strauss ja Strauss, 1994).

Alfaviirused nakatavad paljusid erinevaid selgroogseid peremehi. Erinevalt vektorist, kus viiruse infektsioon on latentne, põhjustavad alfaviirused selgroogsetes organismides suurel hulgal erinevaid haigusi. Paljud Vana Maailma alfaviirused nagu näiteks CHIKV, SINV, O'nyong-O'nyong (ONNV) ja Ross River viirus põhjustavad peamiselt liigesevalu ja varieeruvaid põletikke, samas kui Uue Maailma alfaviirused VEEV, EEEV ja WEEV põhjustavad enamasti entsefaliiti (Powers jt., 1997; Peiris jt., 1994). Huvitaval kombel põhjustavad erinevates ökoloogilistes tingimustes levivad alfaviirused sageli sarnaseid sümptome. Näiteks pole ONNV-d kunagi leitud väljaspoolt Aafrikat, samas on ONNV infektsiooni sümptomid identsed Mayaro viirusega, mille geograafiline levik piirdub Lõuna-Ameerikaga (Powers jt., 2001; Powers, 2008).

1.2 Chikungunya viirus

CHIKV avastati esmalt Tansaania 1953. aastal palavikus prantsuse sõduritelt (Robinson, 1955). Esmalt kirjeldati haigust kui Dengue-laadset nakkust; hiljem tõestati uudse viiruse - CHIKV - olemasolu patsientide veres (Staples jt., 2009). Viiruse nimi tuleneb Tansaania Kimakonde keelest ja tähendab „küürus kõndima“, kirjeldades ilmselt Chikungunya palaviku all kannatavat inimest. Algselt pärineb CHIKV tõenäoliselt Kesk- või Ida-Aafrikast, kus ta levib *Aedes* perekonda kuuluvate sääskede vahendusel kohalike primaatide vahel (Powers jt., 2007).

CHIKV infektsiooni sümptomid sarnanevad mõnevõrra Dengue palaviku sümptomitele. Seetõttu esineb piirkondades, kus Dengue palavik on tavaline, CHIKV infektsiooni valediagnoosimist; sellele vaatamata on seal ka hulgaliselt dokumenteeritud CHIKV juhtumeid (Borgherini jt., 2007). Esimesed suuremad teadaolevad CHIKV puhangud on dokumenteeritud kuuekümnendatel Bangkokis ning aastatel 1963-1973 Indias. 2004. aastal algas Keenia rannikul CHIKV epideemia, mille käigus levis viirus 4 aasta jooksul India ookeanis asuvatele saartele, Indiasse ja Kagu-Aasiasse. Lisaks teatasid 18 Aasia, Euroopa ja Põhja-Ameerika riiki CHIKV juhtumitest (Sergon jt., 2008; Staples jt., 2009).

2005. aasta kevadel levis CHIKV Aafrika lääneranniku lähedal asuvale La Reunioni saarele. 2006. aasta jaanuaris puhkes saarel CHIKV epideemia, mille tipp hetkel esines kuni 40 000 haigusjuhtumit nädalas (Chretien ja Linthicum., 2008). Epideemia vältel haigestus kokku 266 000 inimest (umbes 1/3 saare elanikest), kellest 228 suri. Antud viiruse puhang oli esimene kord, kui dokumenteeriti CHIKV põhjustatud neuroloogilisi kahjustusi, surma ja viiruse kandumist emalt lootele (Borgherini jt. 2007; Pialoux jt., 2007). Oluline on märkida, et La Reunionil levis CHIKV ebatüüpilise vektori vahendusel. CHIKV tavaliseks vektoriks on sääsk *Aedes aegypti*, La Reunionil oli selleks aga hoopis aasia tiigersääsk *Aedes albopictus* (Vazeille jt., 2007). Hilisemal uurimisel selgus, et vektori vahetust võimaldas punktmutatsioon viiruse struktuurses valgus E1, mis suurendas viiruse infektsioonilisust *Ae. albopictuse* suhtes (Tsetsarkin jt., 2007).

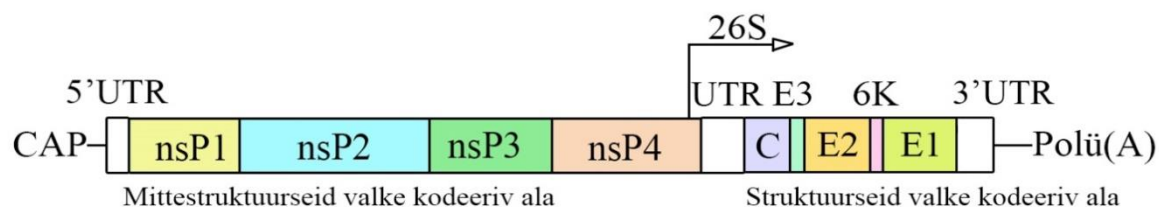
CHIKV infektsiooni peamisteks sümptomiteks on palavik, tugevad valud liigestes ning artriit (Taubiz jt., 2007). Mõningatel nakatunutel esineb nahal ka lööve, kuid kuna löövet ei esine alati, ei ole see sümptom CHIKV nakkuse diagnoosimisel usaldusväärne (Staples jt. 2009; Taubiz jt., 2007). Haiguse akuutse faasi ajal võib esineda oksendamist, peavalusid, iiveldust ning silmapõletikku (Pialoux jt., 2007; Panning jt., 2008). CHIKV nakkus lõpeb harva

surmaga, siiski on surmajuhtumite sagedus pärast 2004. aasta Keenia epideemiat tõusnud. Suurim risk CHIKV nakkuse kätte surra on vanuritel ja eelnevalt haigetel inimestel (Pialoux jt., 2007). Akuutse faasi möödudes esineb nakatunutel mitmeid nädalaid kuni kuid kestvaid sümptomeid nagu väsimus ja tugevad liigesevalud, harvematel juhtudel on sümptomid ilmnenu ka 3-5 aastat pärast infektsiooni (Sissoko jt., 2008; Brighton jt., 1983).

CHIKV infektsiooni ravi on profülaktiline, sisaldades põhiliselt puhkust, rohkelt vedeliku tarbimist ja palavikku alandavaid ravimeid (Simon jt., 2007). Kuigi *in vitro* on uuritud mõningate ravimite nagu nt ribaviriini, interferoon- α ja kortikosteroidide mõju viiruse infektsioonile, ei ole katsete tulemused piisavalt kindlad, et lõplikult kinnitada nende ravimite kasulikkust (Briolant jt., 2004; Staples jt., 2009). Otsese viiruse vastu suunatud ravi või vaktsiini puudumise tõttu on parim viis CHIKV epideemiate kontrolliks sääsehammustuste vältimine ja vektori leviku piiramine (Pialoux jt., 2007).

1.3 Alfaviiruste genoom

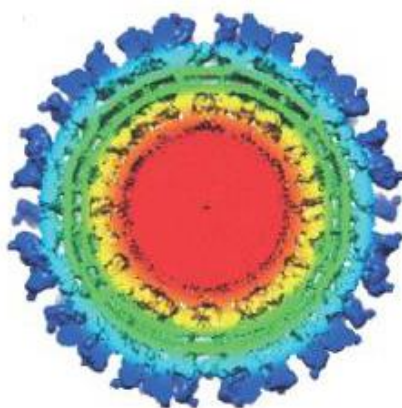
CHIKV genoomiks on 12 kb pikkune positiivse polaarsusega RNA, mille 5' otsas asub 7-metüülguanosiinist *cap*-struktuur ning 3' otsas polü(A) saba (Strauss ja Strauss, 1994; Powers, 2008) (joonis 1). Genoomne RNA on jaotatud kaheks regiooniks: 5' otsa poolne kaks kolmandikku on mittestruktuurseid (nsP) valke kodeeriv ala ning 3' otsa ühe-kolmandiku moodustab struktuurseid valke kodeeriv regioon. Lisaks neile kahele kodeerivale alale, on genoomis kolm 3' mitte-transleeritavat (*Undtranslated region*, UTR) ala – 5' otsas, mittestruktuursete ja struktuursete valkude regioonide vahel ning 3' otsas. (Strauss ja Strauss, 1994).



Joonis 1. CHIKV genoomi skeem. CHIKV genoomi 5' poolne 2/3 kodeerib mittestruktuurseid valke nsP1-4; genoomi 3' poolne komandik kodeerib struktuurseid valke. Struktuursed valgud sünteesitakse subgenoomselt (26S) RNA-lt mille sünteesiks kasutatakse nsP4 lõpus paiknevat subgenoomset promooterit. Viiruse 5' otsas paikneb 7-metüülguanosiinist *cap* struktuur ning 3' otsas polü(A) saba. Märgitud on kolme UTR-i asukohad genoomis.

1.4 Virion

CHIKV virion on ikosaeedriline partikkel, mille diameeter on ligikaudu 70 nm. Virion on mitmekihiline, koosnedes nukleokapsiidist ja seda katvast lipiidsest ümbrikest (joonis 2). Viiruse genoomset RNA-d sisaldava nukleokapsiidi läbimõõt on ligikaudu 40 nm ja see koosneb 240-st kapsiidivalgu C koopiast (Cheng jt., 1995). Kapsiidi ümbritsev lipiidne kaksikiht on pärit peremehe rakumembraanist ja sisaldab viiruse glükoproteiine E1, E2, E3 ja 6K. E1 ja E2 on transmembraansed valgud, mis moodustavad dimeeri. Dimeerid läbivad viiruse ümbrikest ja on seonduvad kapsiidivalgu monomeeriga. Kolm E1-E2 dimeeri moodustavad ühe viiruse oga ehk piigi. CHIKV virion sisaldab 80-t piiki, mis on viiruse antiretseptoriteks (Paredes jt., 1993; Cheng jt., 1995).



Joonis 2. CHIKV virion. Viiruspartikkel koosneb genoomi sisaldavast nukleokapsiidist (joonisel kollane) ja seda katvast lipiidsest ümbrikest (joonisel roheline). Membraanset ümbrikest katvad glükoproteiinid on joonisel tähistatud sinisena. (Jose jt., 2009)

1.5 Replikatsioonitsükkel

1.5.1 Viiruse sisenemine rakku

CHIKV infektsioonitsükli esimeseks etapiks on rakku sisenemine. See toimub retseptorivahendatud endotsütoosi kaudu (joonis 3.1). Viiruse antiretseptoriks on E2 valk, rakupoolne retseptor ei ole täpselt identifitseeritud (Strauss ja Strauss, 1994; Smith jt., 1995; Solignat jt., 2009). Endotsütoosi tagajärjel tekivad klatriiniga kaetud endosoomid, mis sisaldavad viiruse partiklit (joonis 3.2). Raku tsütoplasmas toimub vesiikuli ja viiruse membraanide ühildumine, mis on põhjustatud endosoomis kujuneva happelise pH poolt. Madal pH tekitab konformatsioonilisi muutusi viiruse E1-E2 heterodimeerides, mille tagajärjel need lagunevad ja moodustuvad E1 homotrimeerid, mis vahendavadki endosoomi ja viiruse membraani ühildumist (Fuller jt., 1995; Schuffenecker jt., 2006). Selle protsessi tulemusena vabaneb

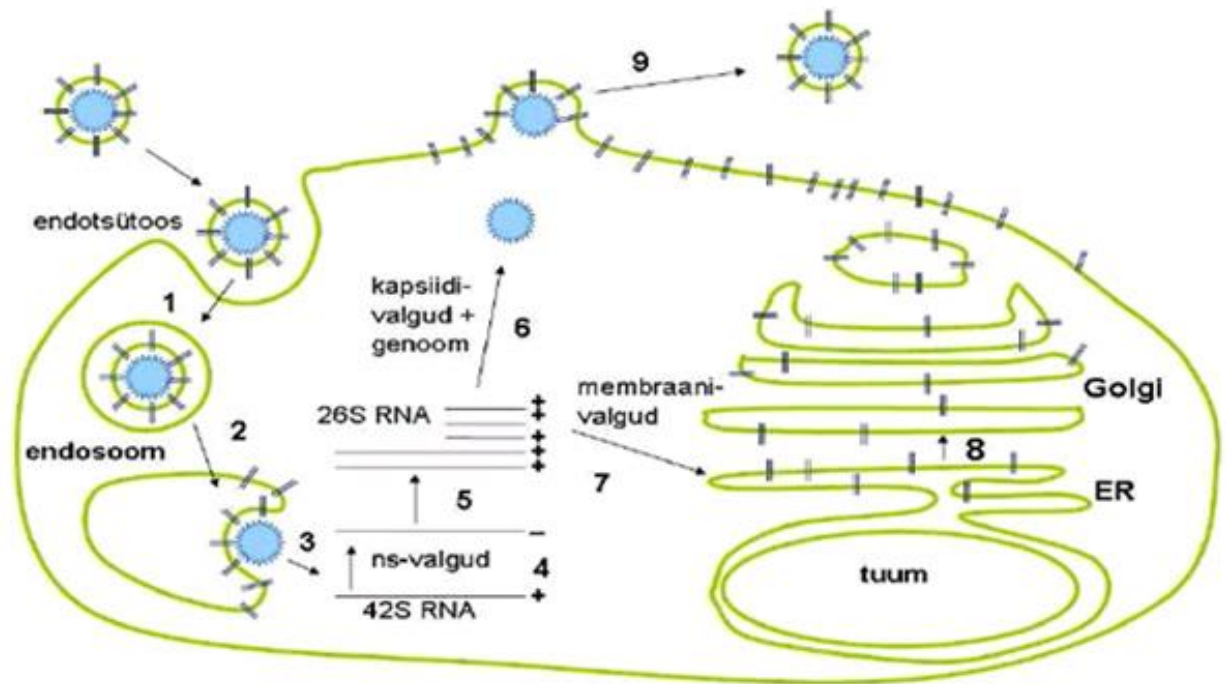
viiruse nukleokapsiid raku tsütoplasmasse (joonis 3.3), kus ta seondub ribosoomi suure subühikuga ja laguneb, vabastades nii RNA genoomi (Singh ja Helenius, 1992).

1.5.2 Replikatsioon

CHIKV replikatsioon toimub sarnaselt teiste alfaviiruste replikatsioonile. Kahes etapis toimuv replikatsiooniprotsess viiakse läbi viiruse poolt moodustatud membraansetes struktuurides (sfäärulites), mille läbimõõt on ligikaudu 50 nm (Salonen jt., 2003; Barton jt., 1991). Sfäärulid on kinnitunud raku endo- ja lüsoosomide membraanidele ja kujutavad endast viiruse replikatsioonikomplekse (Peränen., 1995). Viiruse RNA replikatsiooni saab jagada varajaseks ja hiliseks faasiks. Varajase replikatsiooni käigus toimub negatiivse RNA ahela süntees, matriitsiks on genoomne RNA. (joonis 3.4) Hilises replikatsioonietapis toimub uute positiivsete genoomsete ja subgenoomsete RNA-de moodustumine. (joonis 3.5). Mõlemas replikatsioonietapis osalevad viiruse mittestruktuursed valgud nsP1-nsP4 (Shirako ja Strauss, 1994; Strauss ja Strauss, 1994).

Infektsiooni alguses (esimese 3-4 tunni jooksul) transleeritakse viiruse genoomilt P1234 liitvalku; seelõigatakse ko-translatsiooniliselt viiruse proteaasi nsP2 poolt P123 liitvalguks ja eraldiseisvaks nsP4-ks. Koos moodustavad P123 ja nsP4 varajase replikatsioonikompleksi, mis on vajalik negatiivse polaarsusega RNA sünteesiks. (joonis 3.4) Sünteesitud negatiivne ahel jääb genoomse RNAGA dupleksisse ning moodustab kaheaheelalise RNA intermediaadi (Barton jt., 1991). Negatiivse ahela süntees on võimalik vaid infektsiooni alguses. Hilisemas faasis (4 ja enam tundi peale infektsiooni algust) suureneb viiruse proteaasi nsP2 hulk raku, mille tagajärjel lõigatakse polüpeptiid sünteesitav P1234 veel enne sünteesi lõppu P12 ja P34 liitvalkudeks, mis replikatsioonikomplekse ei moodusta; seeläbi termineeritakse negatiivsete ahelate süntees (Lemm jt., 1994).

Positiivseid genome ja subgenoomseid RNAsid sünteesitakse negatiivse polaarsusega RNA maatriitsil. Seda sünteesi teostab individuaalsetest nsP1, nsP2, nsP3 ja nsP4 valkudest ning peremeesraku valkudest koosnev kompleks (Shirako ja Strauss, 1994). (joonis 3.5) Positiivsete ahelate sünteesi läbiviiv kompleks moodustub negatiivset ahelat sünteesiva kompleksi kuuluva P123 liitvalgu lõikamise tulemusena ja on stabiilne. Seetõttu jätkub positiivsete RNA-de süntees kuni infektsioonitsükli lõpuni (Strauss ja Strauss, 1994).



Joonis 3. Alfaviiruste replikatsioonitsükkel. 1 – raku sisenemine, 2 – nukleokapsiidi vabanemine, 3 – genoomse RNA vabanemine, 4 – mittestruktuursete valkude ja negatiivse RNA ahela süntees, 5 – subgenoomse (26S RNA) ja genoomse RNA süntees, 6 – nukleokapsiidi moodustumine, 7 – membraanivalkude protsessimine endoplasmaatilises retiikulumis (ER), 8 – viirusvalkude liikumine läbi Golgi rakumembraanile, 9 – virionide vabanemine (Tamm 2007, magistritöö).

1.6 Mittestruktuursed valgud

1.6.1 NsP1

NsP1 (535aminohappe jääki) valgu funktsioonid on alfaviiruste perekonnas konserveerunud. Seetõttu võib eeldada et sarnaselt teiste alfaviiruste nsP1-le on ka CHIKV nsP1 palmitüleeritud valk, mis asub raku plasmamembraani tsütoplasmaatilisel poolel ja raku pinnal olevates filopoodi-laadsetes moodustistes. NsP1 N-terminaalne regioon käitub metüül- ja guanülültransferaasina, mis viib läbi sünteesitud genoomsetele ja subgenoomsetele RNA-dele cap-struktuuri lisamist ja metülatsiooni (Solignat jt., 2008).

Sellele lisaks on nsP1 ka oluline osa viiruse replikatsioonikompleksist (*Replication complex*, RC). NsP1 käitub ankruna, mille ülesandeks on RC-i sidumine rakumembraani külge. On näidatud, et membraaniga seostumine on vajalik nsP1 ensümaatilise aktiivsuse tagamiseks (Salonen jt., 2003; Peränen jt., 1995). Samuti osaleb nsP1 negatiivse RNA ahela sünteesi initsiatsioonil (Peränen jt., 1995).

1.6.2 NsP2

NsP2 (798 aminohappe jääki) on suurim CHIKV valk, mille multifunktsionaalsus mängib suurt rolli viiruse replikatsioonitsükli. Nukleosiidtrifosfataasne ja RNA- 5' trifosfataasne aktiivus paikneb valgu N-terminuses, samas kui proteaasne domeen paikneb karboksüülterminaalses pooles (Pastorino jt., 2008; Solignat jt., 2009). Kõik aktiivsused on omavahel seotud ja avalduvad täiel määral vaid terviklikus valgus. Veel enam, RNA helikaasne aktiivsus on omane vaid täispikale nsP2 valgule (Das jt., 2014).

NsP2-e proteolüütiline domeen kujutab endast papaiini sarnast tsüsteiini proteaasi, mille aktiivtsenter sisaldab ühte konserveerunud histidiini ja tsüsteiini jääki (Vasiljeva jt., 2003). NsP2 proteaas osaleb replikatsioonil tekkivate viiruse liitvalkude lõikamises eraldi valkudeks ja on seeläbi CHIKV replikatsioonitsükli regulaatoriks (Pastorino jt., 2008).

Tänu RNA-sõltuv 5' trifosfataassele aktiivsusele osaleb nsP2 ka *cap*-struktuuri lisamises genoomsetele ja subgenoomsetele RNA-dele. NsP2 eemaldab RNA 5' otsas asuva γ -fosfataasi, pärast mida saab nsP1 lisada RNA'le 7-metüülguanosiin *cap* stukturi (Vasiljeva jt., 2000). Lisaks sellele käitub nsP2 ka RNA helikaasina mille funktsioonid CHIKV infektsioonis ei ole selged (Das jt., 2014).

Nakatunud rakus leidub nsP2-e nii tuumas kui ka tsütoplasmas. Tsütoplasmas paiknev nsP2 võib kuuda replikatsioonikompleksidesse või paikneda iseseisvalt (ilma teiste mittestruktuursete valkudeta). Osa sünteesitud nsP2-est transporditakse tuuma, selle transpordi mehhanism pole teada, kuna CHIKV nsP2-s puudub funktsionaalne tuumalokalisatsiooni signaal (Utt jt., 2015). Tuumas inhibeerib nsP2 rakulise RNA sünteesi nagu see on omane kõikidele Vana Maailma alfaviirustele (Gorchakov jt., 2005). Antud inhibitsiooni efektiivsus sõltub suuresti nsP2 hulgast tuumas ja ilmselt nsP2 valgu ensümaatilistest aktiivsustest (Utt jt., 2015). RNA sünteesi inhibitsioon saavutatakse läbi rakulise RNA polümeraas II-e katalüütilise subühiku degradatsiooni (Akhrymuk jt., 2012).

1.6.3 NsP3

NsP3 (530 aminohappe jääki) funktsioonid on CHIKV mittestruktuursetest valkudest kõige ebaselgemad. NsP3 paikneb nii RC-ides kus ta osaleb negatiivse ahela sünteesil kui ka agregeerunult nakatunud rakkude tsütoplasmas (Salonen jt., 2003). NsP3-es on võimalik eristada kolme regiooni. N-terminaalne kolmandik kujutab endast *macro* domeeni (mida nimetatakse ka domeen X-iks) ja mis on konserveerunud alfaviiruste, coronaviiruste, rubella viiruse ja ka hepeviiruste seas (Strauss ja Strauss, 1994). See järjestus on suguluses H2A histooni makrodomääniga, mistõttu on antud domeeni leitud ka loomade, taimede ja bakterite

hulgas. *Macro* domeen seondab RNAd ja ADP-riboosi (Malet jt., 2009). *Macro* domeenile järgnev piirkond on konserveerunud vaid alfaviiruste seas ning seondab tsink-ioone (Shin jt., 2012) ning viimane, valgu C-terminaalne osa, on hüpervarieeruv, erinedes ka alfaviiruste hulgas nii järjestuse kui ka pikkuse poolest (Strauss ja Strauss, 1994; Solignat jt., 2009). On näidatud, et see regioon vahendab paljusid viirus-rakk interaktsioone.

1.6.4 NsP4

NsP4 (611 aminohappe jääki) on alfaviiruse RNA-sõltuv RNA polümeraas (RdRp). Nakatatud rakkudes paikneb nsP4 peamiselt viiruse RC-ides kui ka difuusselt tsütoplasmas (Peränen jt., 1995). NsP4 omab viiruslikele RdRp-dele omast GDD motiivi (paikneb positsioonis 464-467) (Solignat jt., 2009). Valgu N-terminuses asub türosiini jääk, mis reguleerib vaba nsP4 kogust rakus kuna sellist jääki omavad valgud degradeeritakse N-terminaalse reegli järgi (Strauss ja Strauss, 1994). RC-ides paiknev nsP4 on degradatsiooni eest kaitstud ning seda ei lagundata (Barton jt., 1991). Türosiinijäägi asendamine mittearomaatse aminohappega viib viiruse replikatsiooni efektiivsuse languseni (Shirako jt., 2000; Shirako jt., 2003).

Immunoflorestsentsmikroskoopia abil on näidatud, et CHIKV nsP4 takistab infektsiooni varajases staadiumis (3-24h) rakulise replikatsioonifaktori subühiku eIF2 α fosforülatsiooni, takistades seeläbi *PRKR-like ER resident kinase* (PERK) raja kaudu kulgevat translatsiooni mahasurumist. PERK rada on osa rakulisest stressivastusest, mis aktiveerub, kui raku endoplasmaatilisse retiikulumi kuhjub liiga palju viltumata või valesti viltunud valke. Juhul kui lineaarseid või valesti pakkunud valke on liiga palju, võib PERK käivitada ka apoptootilise raja. Tänu PERK raja deaktiveerimisele saab viiruse varjase infektsiooni vältel toimuda suures mahus viiruse RNAd ja valkude süntees ja seda ilma tsütoplasma võrgustikust algust saavat stressivastust indutseerimata (Rathore jt., 2013).

Immunosadestamise ning konfokaalmikroskoopia abil on tõestatud interaktsioon CHIKV nsP4 ja rakulise *chaperoni*, kuumašoki valgu *heat-shock protein 90 α* subühiku (HSP-90 α) vahel (Rathore jt., 2014). Kuna HSP-90 α on peamiselt tsütosoolne valk, on põhjust uskuda, et rakuline HSP-90 α stabiliseerib viiruse nsP4-ja ja osaleb CHIKV RC-ide moodustamises. Ekspresseerides nakatunud rakkudes HSP-90 α vastaseid siRNA-sid, on märgata viiruse replikatsiooni inhibitsiooni. Siiski vajab nsP4 ja HSP-90 α subühiku vaheliste seoste kindlakstegemine täiendavaid uuringuid (Rathore jt., 2014).

Koos nsP1 ja nsP2-ga katalüüsib nsP4 viiruse negatiivse ahela sünteesi initsiatsiooni ja viib läbi selle elongatsiooni. NsP4 on esimene valk, mis P1234 liitvalgust lahti lõigatakse (Barton jt., 1991). NsP4 N-terminaalne osa (ligikaudu 100 aminohappe jääki) on iseloomulikud vaid alfaviirustele ning ei oma sarnasust teiste viiruste RdRp-dega. Antud piirkond võib olla vajalik ülejäänud mittestruktuursete valkude või tuvastamata rakuliste faktorite seondumiseks RC-is. Peale RdRp aktiivsuse omab nsP4 ka terminaalset adenosüül transferaas-aktiivsust, mis on oluline genoomsete ja subgenoomsete RNA-de polü(A) järjestuste reparatsioonil/elongatsioonil (Tomar jt., 2006).

1.7 CHIKV mittestruktuursete valkude märgistamine

Viiruste valkude märgistamine markervalgudega abil võimaldab uurida ja analüüsida viiruse valkude ekspressiooni ja lokalisatsiooni elusates rakkudes. Selle saavutamiseks kasutatakse erinevaid markergeene. Laialt levinud markervalgudeks on erinevad fluorestseeruvad valgud - *Enhanced Green Fluorescence Protein* (EGFP), ZsGreen, mCherry või dtTomato (Vandlandingham jt., 2005; Kümmerer jt. 2012). Teisalt märgistatakse valke ka mittefluorestseeruvate valkudega nagu näiteks jaanimardika lutsiferaas (*Firefly* luciferase; (Ffluc) või *Renilla* lutsiferaas (Rluc), mille abil on võimalik kvantifitseerida valgu kogust rakkudes (Ziegler jt., 2011).

Markervalgude suuruseks on umbes 200–550 aminohappe jääki, st alfaviiruse kodeerimisvõimet arvestades on nad suhteliselt suured. Selliste järjestuste lisamine aeglustab viiruse replikatsiooni ja juhul kui neid liita viiruse valkudele, võib selle tulemuseks olla viiruse valkude funktsioonide muutus. Seetõttu ei saa markervalke lisada kaugeltki suvalistesse kohtadesse. Potentsiaalseid ja huvipakkuvaid asukohti markervalke kodeerivate järjestuste sisestamiseks on CHIKV genoomis siiski mitmeid. Nii on CHIKV-st valmistatud rekombinante, kus nsP3-e C-terminaalsesse alasse on viidud nii mCherry, EGFP kui ka Rluc ja Ffluc järjestusi (Fros jt., 2012; Varjak jt., 2013). Samuti on EGFP-d ja Rluc-i sisestatud nsP3 ja nsP4 vahelisse alasse. Sellisel juhul oli sisestatud inserdi mõlemasse otsa lisatud nsP2 proteaasi poolt äratuntavad järjestused (Tamberg jt., 2007; Gad jt., 2012). Tihti asetatakse markervalke kodeerivaid järjestusi viiruse 26S subgenoomse promooteri või selle duplitseeritud koopias kontrolli alla. Nii on valmistatud ka infektsioonilisi CHIKV kloone, kus genoomi on sisestatud teine subgenoomne promooter, millelt toimub markervalgude süntees (Vanlandingham jt., 2005).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Uurimistöö eesmärgid

Võrreldes teiste alfaviirustega nagu Semliki Forest viirus (SFV) või SIN, on CHIKV molekulaarbioloogilisi mehhanisme uuritud suhteliselt vähe. Üks CHIKV uurimist mõjutav faktor on selle patogeensus inimestele, mistõttu ohutuse ja lihtsuse huvides eelistatakse uurida mittepatogeenseid mudelviiruseid. Lisaks eelnevale on CHIKV olnud pigem arengumaades leviv viirus. Samas on nii viiruse kui seda levitavate sääskede levikuala kiiresti suurenenas, mistõttu on hakatud CHIKV-d hindama kui tõsisemat riskiallikat ka väljaspool troopilist regioone. Samuti mõistetakse järjest rohkem, et isegi väga sarnased viirused kasutavad erinevaid molekulaarseid mehhanisme, mistõttu ei pruugi mudelviirustega saadud tulemused kehtida CHIKV jaoks.

Käesolevas töös kasutati nsP4-ja märgistamiseks EGFP ja teiste markervalkudega uudet, nii CHIKV kui ka teiste alfaviiruste puhul katsetamata meetodit. Eelnevast oli teada, et nsP4-ja C-terminusse saab lisada lühikesi järjestusi, kuid markervalkude lisamine muudab viiruse geneetiliselt ebastabiilseks. Seetõttu kavandati lähenemine, mille eesmärgiks oli saada viirus (replikon), mis samal ajal toodaks nii markervalku sisaldavat (eeldatavasti väheaktiivset) kui ka lühikest täiendavat järjestust sisaldavat (eeldatavasti aktiivset) nsP4 valku. Saavutamaks nende nsP4 vormide erinevaid vahekordi, kasutati kahte erinevat raaminihkeelementi (*Frameshift element*, FS), mis paigutati nsP4 valku ja markervalku kodeerivate alade vahele.

Töö eesmärgid:

- 1) Luua CHIKV-PL replikon vektori põhjal konstruktid, mis oleks võimelised ekspresseerima viiruse RdRp-d, millele on liidetud valguline marker.
- 2) Analüüsida ja iseloomustada saadud replikon vektorite omadusi ja käitumist rakukultuuri tingimustes.

2.2 Materjal ja metoodika

Bakteritüved ja söötmed

Transformatsiooniks kasutati *Escherichia coli* tüve XL10 kompetentseid bakterirakke. Baktereid kasvatati 37°C juures loksutis LB (*Lysogeny Brothi*, „Difco”) või SOY söötmes (*BactoTM Tryptic Soy Broth*, „Difco”), kuhu lisati ampitsilliini (Amp) lõppkontsentratsiooniga 100µg/ml.

Algplasmiidid

pCHIKV-PL – plasmiid, mis sisaldab faagi SP6 RNA polümeraasi promooterjärjestust, Amp resistentsusgeeni ning modifitseeritud CHIKV cDNAd millest on eemaldatud struktuurvalke kodeeriva ala. Selle plasmidi põhjal on valmistatud kõik antud töös kasutatud plasmiidid.

pSP6-SFV4-nsP4-EGFP – SFV4 infektsiooniline kloon, milles nsP4 valku kodeeriva järjestuse külge on lisatud EGFP valku kodeeriv järjestus. Plasmiid sisaldab faagi SP6 RNA polümeraasi promooterit ning Amp resistentsusgeeni.

pHelperC – abiplasmiid, mis sisaldab CHIKV cDNAd, milles on olemas replikatsiooniks ja transkriptsiooniks vajalikud alad ning kapsiidivalgu C kodeeriv regioon. Kasutatakse VRP-de valmistamisel.

pHelperE – abiplasmiid, mis sisaldab CHIKV cDNAd, milles on olemas replikatsiooniks ja transkriptsiooniks vajalikud alad ning viiruse membraanvalke (E3-E1) kodeeriv regioon). Kasutatakse VRP-de valmistamisel.

pBluescript II KS („Fermentas“) - kloneerimisvektor, mis on vajalik vahepealseks kloneerimiseks. Sisaldab Amp resistentsusgeeni ning multikloneerimispiirkonda.

Süntetiline plasmiid – plasmiid, mis sisaldab kanamütsiinivastast resistentsusgeeni ja raaminihke elemente FSI ja FSII, mis on kavandatud nii, et neid saab liita markerile ja CHIKV nsP4 valku kodeerivale järjestusele pCHIKV-PL plasmiidis.

Rekombinantsete plasmiidide valmistamisel kasutatud meetodid

DNA restrikteerimine viidi läbi, kasutades firma „*Thermo Scientific*“ *fast digest* restriksiooniensüüme ja puhvreid vastavalt tootjapoolsetele instruktsioonidele. Restrikteeritud lõikude defosforüleerimiseks kasutati aluselist fosfataasi FastAP (*Fast Alkaline Phosphatase*, „*Thermo scientific*“).

Restriksioonifragmentide puhastamiseks kasutati *JetQuick Purification Spin Kit-i* („*Genomed*“). Restriksioonil saadud DNA fragmentide või PCR-i produktide puhastamiseks agarosgeelist kasutati *JetQuick Gel Extraction Spin Kit-i* („*Genomed*“), kasutades tootjapoolseid juhiseid. DNA fragmentide kokku liitmiseks kasutati bakteriofaag T4 DNA ligaasi („*Thermo scientific*“),

Bakterirakkude transformeerimiseks rekombinantsete plasmiididega kasutati kuumaehmatuse (*heat shock*) meetodit. Selleks inkubeeriti kompetentseid bakterirakke, mida oli eelneval jääl inkubeeritud ligatsiooni seguga, 42°C juures 90 sekundit. Jägnevalt transformatsiooni segu jahutati jääl, lisati sellele 1 ml SOY söödet, inkubeeriti 45 minutit 37°C juures ja seejärel külvati transformandid LB tassidele, kus Amp lõppkontsentratsioon oli 100µl/ml kohta.

Valitud kolooniad külvati ümber Amp sidaldavasse LB söötmesse ja inkubeeriti üleöö 37°C loksutil. DNA eraldamiseks kasutati aluselise lüüsi meetodit (minipreparatsioon, kasutati „*Thermo scientific*“ kit-i). Valminud konstruktidele sooritati suurema koguse DNA saamiseks midipreparatsioon, kasutades *Nucleobond PC 100* („*Macherey-Nagel*“) kit-i. Mini- ja midipreparatsioon viidi läbi vastavalt kit-ide tootjate poolsetele juhistele. DNA preparaate kontsentratsiooni määramiseks kasutati spektrofotomeetrit (*NanoDrop^R ND 1000 Spectrophotometer*). Plasmiidide õigsust kontrolliti restriksioonianalüüsi ja Sangeri sekveneerimise abil.

Polümeraasi ahelreaktsioon

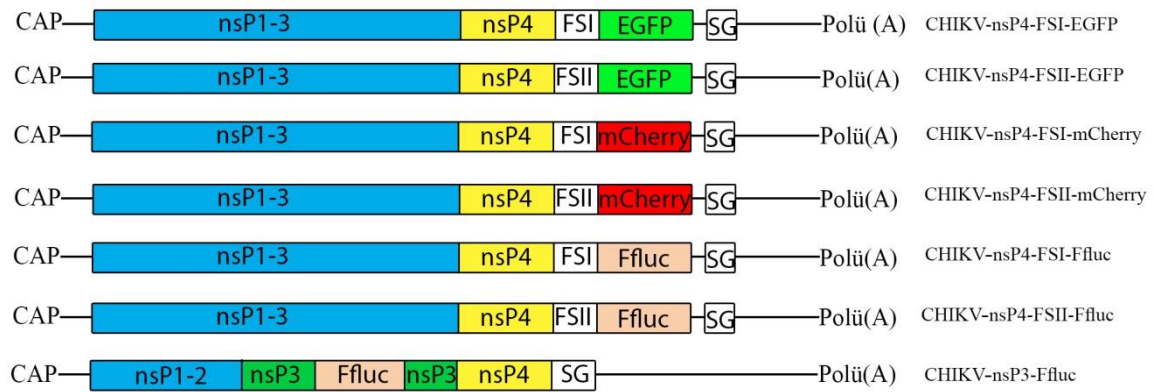
Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) viidi läbi, kasutades „*Eppendorf Mastercycler gradient*“ termotsüklerit. PCR reaktsioonid viidi läbi 20µl-ses mahus ning reaktsioonisegu sisaldas 1x GC reaktsioonipuhvrit, 0,2 mM dNTP segu, 0,2 µM kumbagi praimerit, amplifitseeritavat DNA-d ning *Phusion*® *High-Fidelity DNA* polümeraasi („*Thermo Scientific*“). PCR programmid koostati vastavalt kasutatud praimerite sulamistemperatuuridele ning *Phusion*® *High-Fidelity DNA* polümeraasi tootja poolt antud instruktsioonidele.

PCR produktide kloonimiseks ligeeriti PCR fragmendid pJET 1.2 kloonimisvektoriga (*CloneJET PCR Cloning Kit* „Life Technologies“) ning kohe pärast seda transformeeriti saadud ligatsiooniseguga bakterirakke. PCR fragmendi viimine pJET vektorisse oli vajalik kloonimise vaheetapina, sest otsene kloonimine lõppvektorisse, kasutades selles PCR produkti otstesse sisse viidud lõikamissaite, ei olnud efektiivne. Ilmselt oli selle põhjuseks asjaolu, et lõigates lineaarset PCR fragmenti oli kasutatud restriksiooniensüümide efektiivsus madal ning restriksiooniensüümiga töödeldud fragmentide otsad ei sobinud seetõttu kokku samade ensüümidega lõigatud vektorplasmidi otstega.

Plasmiidide kavandamine ja valmistamine

Esimese sammuna tõsteti CHIKV-PL plasmidist nsP4 valku kodeeriv järjestus vahevektorisse pKS(+)-i kasutades selleks restriksiooniensüümi HindIII. Järgnevalt viidi pKS(+) vektoris asuvasse nsP4 järjestusse sisse sünteetilise DNA lõik, mis sisaldas *frameshift* element I-te (FSI) kasutades selleks *NheI* ja *XmaII* restriktase. Seejärel viidi modifitseeritud nsP4 järjestus tagasi CHIKV-PL replikoni sisaldavasse plasmidi, kasutades selleks restriksiooniensüüme *BshTI* ja *XmaII*, saadud plasmidi nimetati CHIKV-FSI. Teist *frameshift* elementi (FSII) sisaldava konstrukti saamiseks vahetati CHIKV-FSI plasmidis asuv FSI element välja FSII elemendi vastu; selline vahetus viidi läbi, kasutades restriksiooniensüümi *XhoI*. NsP4 ekspressiooni ja rakusisese lokaliseerimise jälgimiseks sisestati viiruse replikoni järgnevalt ka markervalgu järjestus. Antud töös kasutati kolme erinevat markervalgu, milleks olid Ffluc, EGFP ja mCherry. Valke kodeerivad järjestused amplifitseeriti PCR-i abil, kasutades selleks primereid, mille otstesse oli viidud ensüümide *ApaI* ja *SacI* äratundmisjärjestused; lisaks sellele sisaldas *sense* primer markergeeni startkoodoni ATG. Saadud plasmide nimetati CHIKV-nsP4-FSI-EGFP, CHIKV-nsP4-FSII-EGFP, CHIKV-nsP4-FSI-mCherry, CHIKV-nsP4-FSII-mCherry, CHIKV-nsP4-FSI-Ffluc1 ja CHIKV-nsP4-FSII-Ffluc1 (Joonis 4),

CHIKV replikatsiooni käigus toodetava lutsiferaasi ekspressiooni kontrollimiseks loodi lisaks ka CHIKV replikon, mille cDNAs asuvasse *SpeI* äratundmissaiti (paikneb nsP3 valku kodeeriva ala lõpus) paigutati Ffluc järjestus. Erinevalt ülaltoodud konstruktidest oli eelnevalt teada, et selline replikon on võimeline replitseeruma ja markervalgu ekspresseerima; seega oli see kavandatud positiivseks kontrolliks. Saadud plasmid nimetati CHIKV-nsP3-Ffluc1-nsP3 (Joonis 4)



Joonis 4. NsP4-markervalk liitvalgu uurimiseks valmistatud konstruktid. Pildil on kujutatud 7 CHIKV-PL replikoni põhjal valmistatud plasmidi. NsP1-3 ja nsP4 on viiruse mittestruktuursed valgud; FSI ja FSII on kasutatavad raaminihkeelemendid, mis asuvad markervalgu ja nsP4 vahel; SG on subgenoomne promooter; antud konstruktid selle kontrolli all kodeerivad järjestusi ei ole.

RNA *in vitro* transkriptsioon

In vitro transkriptsiooni läbiviimiseks kasutati *mMessage mMachine SP6 kit-i* („Ambion“). Transkribeeritavate plasmiidide lineariseerimiseks kasutati restriksiooniensüümi *NotI* (CHIKV puhul) või *SpeI* (SFV4 korral). Seejärel puhastati lineariseeritud DNA *JetQuick Purification Spin Kit-iga* („Genomed“); lõikamise ja puhastamise efektiivsust kontrolliti agarosgeel-elektroforeesil. *In vitro* transkriptsiooniks segati kokku reaktsioonisegu, mis koosnes 2X NTP/CAP segust, 10X reaktsioonipuhvrst, ensüümisegust („Ambion“) ja DNA-st (reaktsioonisegu maht viidi nõutavani, kasutades nukleaside vaba vett). Reaktsioonisegu inkubeeriti 90 minutit 37°C juures. Sünteesitud RNA olemasolu ja intaktsust kontrolliti agarosgeel-elektroforeesil. RNA kontsentratsiooni määramiseks valmistati eelnevalt teadaoleva kontsentratsiooniga referents RNAdest lahjendused (0,25; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,5 µg), need kanti 1,2% agarosgeelile koos *in vitro* transkriptsioonil sünteesitud RNA-dega ja lahutati elektroforeesil. Jooksutatud geel skanneeriti „*Typhoon scanneriga*“ ning RNA kogused kvantifitseeriti *Image Quant* programmiga.

Kasutatud rakuliinid ja söötmed

Antud töös kasutati hamstri neerurakuliini BHK-21 (*Baby Hamster Kidney cells*), ning selle modifitseeritud versiooni Swe-BHK rakke. Rakke kasvatati 37°C juures, 5%-lise CO₂ sisaldusega niiskes inkubaatoris.

BHK-21 rakke kasvatati GMEM (*Glasgow Minimum Essential Medium*, „Lonza“) söötmes, millele lisati 10% veise loote seerumit (*Fetal Calf Serum*, FCS), 2% TPB-d (*Bacto™ Tryptose Phosphate Broth*, „Difco“), 200mM HEPES-t (pH 7,2) ning penitsiliini ja streptsomütsiini 100U/ml kohta.

Swe-BHK rakke kasvatati GMEM söötmes, millele lisati 5% FSC-i, 10% TBP-d, 200mM HEPES-t (pH 7,2) ning penitsiliini ja streptsomütsiini 100U/ml kohta.

RNA transfektsioon rakkudesse

RNA transfektsioon BHK-21 rakkudesse viidi läbi elektroporatsiooni teel. Selleks kasutati eelnevalt 10cm läbimõdduga petri tassidel 75-95% konfulentsuseni kasvatatud BHK-21 või swe-BHK rakke. Rakkudelt aspireeriti sööde ja seejärel pesti rakud 1x PBS-iga (*Phosphate Buffered Saline*, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1.8 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.4). Rakud eemaldati tassilt trüpsiiniga, tõsteti GMEM söötmesse ja sadestati tsentsifuugides 1000 rpm juures 5 minutit. Sadenenud rakkudelt eemaldati sööde ning rakud resuspendeeriti külmas 1x PBS-is. Suspensioon kanti eelnevalt külmas hoitud 0,4 cm elektroodide vahega küveti („BioRad“), kuhu lisati ka RNA, segu segati pipeteerimise teel. Seejärel asetati küvett elektroporaatorisse („BioRad“ Gene Pulser XceII), kus sellele anti kaks pulssi 850V ja 25µF juures. Seejärel lisati küveti PBS-iga võrdne maht GMEM söödelt ning rakud külvati uutele GMEM söötmega tassidele.

Viiruslaadsete replikon partiklite (*Virus-like replicon particles*, VRP) tootmine

VRP-de valmistamiseks sünteesiti *in vitro* transkriptsioonil RNA järgnevatele replikon-konstruktidele:

- CHIKV-nsP4-FSI-EGFP
- CHIKV-nsP4-FSII-EGFP
- CHIKV-nsP4-FSI-mCherry
- CHIKV-nsP4-FSII-mCherry
- CHIKV-nsP4-FSI-Ffluc1
- CHIKV-nsP4-FSII-Ffluc1
- CHIKV-nsP3-Ffluc1-nsP3

Lisaks sünteesiti RNA-d ka helper E ja C helper plasmiididelt.

Valminud RNA-d segati kokku nii, et katseklaasis oleks ühe konstrukti, helper E ja helper C RNA-de segu. Seega saadi kokku 7 erinevat konstrukt-helper E-helper C suspensiooni, mis kotransfekteriti swe-BHK rakkudesse ülalpool kirjeldatud protokoll järgi. Transfekteritud rakke inkubeeriti 72 tundi 28°C ja 5% CO₂ juures. Seejärel koguti rakkudelt sööde ning viidi see üle 50ml falconitesse, mida tsentifuugiti 10 minutit 4000g juures. Saadud supernatant kanti üle *Centrifugal Filter Units* (CFU, „Merck Millipore“) kolonnidele. Kasutatud CFU kolonnid sisaldavad filtreid, mis hoivaid kinni üle 75kDa osakesi võimaldades sellega VRP-de kontsentreerimist. Seelleks fuugiti CFU kolonne 1500g juures 10 minutit, misjärel kontrolliti kolonnides olevate VRP-de suspensioonide ruumalasisid. Tsentrifugimist jätkati samal kiirusel 5-minutiliste tsüklitega, kuni kolonnidesse jäi 200-250µl VRP-sid sisaldavat supernatanti. Valminud ning kontsentreeritud VRP-sid hoiustati alikvootidena -80°C juures.

Immunoflourestsentsanalüüs

Immunoflourestsentsanalüüsiks (IF) kasvatati eelpool loetletud RNAde segudega transfekteritud BHK-21 rakke 6-augulistel plaatidel, mille pesadesse oli asetatud 3 katteklaasi. 8 tundi pärast transfektsiooni eemaldati rakkudelt sööde ning rakke pesti 2 korda 1× PBS-iga. Rakud fikseeriti 4% PFA-ga 15 minutit, millele järgnes 15 minutit töötlust 50mM ammooniumkloriidiga ning lõpuks rakud permeabiliseeriti 0,1% Triton X-100-ga 2 minutit. Kõik 3 etappi viidi läbi toatemperatuuril. Fikseeritud ja permeabiliseeritud rakke pesti 3 korda 1x Dulbecco PBS-iga (DPBS). Katteklaasid võeti 6-augulise plaadi pesast ning asetati 24-augusele plaadile, kus esmalt blokeeriti rakke 5% FCS-DPBS lahuses 30 minutit toatemperatuuril. Seejärel aspireeriti rakkudelt blokk-lahus ja lisati rakkudele primaarse antikeha lahendus. Primaarset antikeha sisaldavat lahust pipeteeriti katteklaasile 100µl ja inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Inkubatsioonile järgnes katteklaaside pesu 3 korda 1x DPBS-iga. Pesu lõppedes inkubeeriti rakke 1 tund toatemperatuuril 100µl sekundaarse antikeha lahuses ning pesti taas 3 korda 1x DPBS-iga. Järgnevalt pesti klaasi destilleeritud vees ning lasti õhu käes kuivada. Kuivad klaasid asetati alusklaasidele, millele eelnevalt oli kantud 5µl sulundusvedelikku (Mowiol 4-88, 2.5% DABCO (1,4-diazabitsüklo(2,2,2)-oktaan)), mis sisaldas ka tuumade värvimiseks mõeldud DAPI (4'-6-diamidino-2-fenüülindool, lõppkontsentratsioon 0.2 µg/ml) värvi. Katteklaasid asetati alusklaasidele rakud allpool, et rakud jääksid klaaside vahele. Rakkude vaatlemiseks kasutati „Zeiss LSM 710“ konfokaal- ja „Nikon Eclipse TS100“ mikroskoopi.

VRP-de tiitri määramine

Valminud VRP-de tiitri määramine teostati IF-i abil. Selleks tehti VRP-de suspensioonid lahjendusread 10^{-2} kuni 10^{-5} -ni. Antud lahjendused tehti seerumivabasse söötmesse (lõppmahuga 400 μ l). Tiitri määramiseks kasutati BHK-21 rakke, mida kasvatati 6-augulistel plaatidel (igasse pesasse oli asetatud 3 katteklaasi) 50-60% konfluentsuseni. Rakkudelt aspireeriti sööde, rakke pesti 1x PBS-iga ning nakatati seejärel VRP-de lahjendustega. Rakke inkubeeriti nakatamissöötmega 37°C ja 5% CO₂ juures 1 tund, neid iga 10 minuti tagant loksutades. Inkubatsiooni lõppedes eemaldati rakkudelt VRP-sid sisaldav sööde ning selle asemel kanti rakkudele peale 2 ml seerumivabat söödet. Järgnevalt inkubeeriti rakke 8 tundi, misjärel rakud fikseeriti, töödeldi nsP2 vastase primaarse ja flourestseeruvate sekundaarsete antikehadega ning vaadeldi flourestsentsmikroskoobiga, nagu seda on kirjeldatud ülal. VRP-de tiitri määramiseks vaadeldi 20 erinevat suvaliselt valitud kohta katteklaasil, loendati ära vaateväljas olevate helendavate rakkude arv ning arvutati nende aritmeetiline keskmine. Võttes arvesse arvutatud helendavate rakkude arvu, kasutatud suurendust (20x) ja lahjendusfaktoreid, arvutati kõigi seitsme replikon vektoritelt toodetud VRP-de tiitrid.

Western blot analüüs

Detekteerimaks viiruse valkude olemasolu rakkudes kasutati western blot analüüsi. Selleks lüüsi 6-augulisel plaadil kasvanud nakatatud või transfekteeeritud BHK-21 rakud 100 μ l 1x Laemmli puhvris (50 mM TrisHCl, 100 mM DTT, 2% naatriumdodetsüülsulfaat (SDS), 0,1% broomfenoolsinine, 10% glütserool). Lüüsitud raku suspensiooni inkubeeriti 100°C juures 5 minutit valkude denatureerimiseks. Valgud lahutati geelelektroforeesil 10% SDS-polüakrüülamiidgeelis, valkude suuruse hindamiseks kasutati *Prestained Protein Ladder* („PageRuler“) markerit. Geelile kanti 10 μ l igat rakulüsaati, mis vastab ligikaudu 10⁵ rakule. Lahutatud valgud kanti üle nitrotselluloosfiltrile („Amersham“, *ProtamTM-ECLTM*), kasutades *Trans-Blot® Semi-Dry* aparati („Bio-Rad“). Ülekanne viidi läbi 15V juures 1 tunni vältel Semi-Dry puhvris (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% etanool). Ülekande lõppedes asetati valke sisaldav nitrotselluloosfilter blokeerima 5% lõssipulbrilahusesse (5% lõssipulber, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween20) 1 tunniks toatemperatuuril või 4°C juurde üleöö. Blokeeritud nitrotselluloosfilter asetati seejärel primaarset antikeha sisaldavasse 2% lõssipulbrilahusesse, kus seda inkubeeriti toatemperatuuril 1 tund. Pärast inkubeerimist primaarse antikehaga pesti filtrit 3 korda 10 minutit pesulahuses (50 mM TrisHCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween20). Pestud filter asetati 2% lõssipulbrilahusesse, mis sisaldas sekundaarset antikeha ning inkubeeriti 1 tund

toatemperatuuril. Inkubatsiooni lõppedes pesti nitrotselluloosfiltrit jällegi 3 korda 10 minutit pesulahusega. Seejärel detekteeriti antikeha signaal *ECL™ Kit*-i („*Amersham Pharmacia Biotech*”) abil ning ilmutati röntgenfilmil.

RNA eraldamine VRP-dest ja cDNA süntees

RNA eraldamiseks VRPdest kasutades RNeasy® Mini Kit-i („*Qiagen*“) vastavalt tootjapoolsetele juhistele. Lühidalt, 100µl VRP-dele lisati 250µl RLT puhvrit, mis sisaldas β-merkaptopetanolooli (10µl/1ml RLT kohta). Suspensioonile lisati võrdne maht 70% etanooli ja segati suspendeerides. Järgnevalt eraldati VRP-dest RNA kasutades RNeasy Mini kolonne; saadud RNA võteti üles 30µl RNAasi vabas vees.

VRP-dest eraldatud RNA-dele vastava komplementaarse DNA (*complementary DNA*, cDNA) süntees viidi läbi kasutades *First Strand cDNA Synthesis Kit*-i („*Fermentas*“). cDNA sünteesiks võeti 10µl VRP-dest eraldatud RNA-d ning lisati sellele 1 µl *Random hexamer* praimerit („*Fermentas*”). Reaktsioon viidi läbi vastavalt tootjapoolsetele juhistele, inkubeerides segu esmalt 25°C juures 5 minutit ning seejärel 37°C juures 60 minutit. Reaktsioon termineeriti hoides segu 5 minutit 70°C juures. Saadud cDNA-ga sooritati PCR, kasutades järgnevaid praimerite paare:

Tabel 1. cDNA-lt PCR-i läbiviimiseks kasutatud praimerid

	<i>Sense</i> primer	<i>Antisense</i> primer
1)EGFP	NsP4 lõpus; EGFP keskel	3' otsas
2)mCherry	NsP4 lõpus; mCherry keskel	3' otsas
3)Ffluc1	NsP4 lõpus; Ffluc1 keskel	3' otsas

Saadud produktide pikkust hinnati agaros-geelelektroforeesil. Tulemusi hinnati visuaalselt UV valguse all.

Ffluc-i ekspressiooni kvantifitseerimine

Lutseferaasi aktiivuse mõõtmiseks kasvatati BHK-21 rakke 90% konfultentsuseni. Seejärel kasutati neid rakke *in vitro* sünteesitud RNAdega transfekteeerimiseks, nagu seda on kirjeldatud ülal, või nakatati rakke VRP-dega 1 tund 37°C juures. Nakatamiseks kasutatud VRP-de kogus arvestati nii, et iga 10 raku kohta oleks üks VRP ehk $MOI=0,1$ (*multiplicity of infection*, MOI). Inkubatsiooni lõppedes VRP-sid sisaldav sööde aspireeriti ning selle asemele lisati rakkudele GMEM sööde. Nakatunud või poreeritud BHK-21 rakke inkubeeriti

37°C juures; valitud ajapunktidel rakud lüüsi ja mõõdeti neis sisalduv Ffluc-i aktiivsus. Rakkude lüüsimine viidi läbi, kasutades *Luciferase Assay System-i Passive Lysis Buffer* lüüsi puhvrit („Promega“). Järgnevalt segati kokku 4 µl lüüsitud rakususpensiooni ja 20 µl 1x LARII-e (*Luciferase Assay Reagent*, „Promega“). Ffluc katalüüsib LARII-es oleva lutsiferiini oksüdeerimist oksülutsiferiiniks. Selle reaktsiooni käigus vabanevat valgust detekteeriti *Glomax SIS* detektoriga.

Infektsioonitsentrite test (*infectious center assay*, ICA)

RNA infektsioonilisuse määramiseks elektroporeeriti BHK-21 rakkudesse ($\sim 8 \times 10^6$ rakku; 850V, 25 µF, 2 pulssi) 2,28 µg RNAd mis oli sünteesitud kas pSFV4-nsP4-EGFP plasmiidilt või *wild type* (WT) SFV4 cDNAd sisaldavalt plasmiidilt. 10% transfekteeeritud rakkudest tehti lahjendused 10^{-1} kuni 10^{-5} ning need külvati eelnevalt 6-augulistel plaatidel umbes 90-100% konfidentsuseni kasvatatud BHK-21 rakkudele. Rakke inkubeeriti 2-3 tundi 37°C, 5% CO₂ juures, misjärel kanti rakkudele peale 2 ml GMEM sööde, mis sisaldas 0,8% CMC-d (karboksümetüülselluloos). Rakke inkubeeriti 72 tundi 37°C ja 5%-lise CO₂ tingimustes. Seejärel värviti rakke kristallviolett-fikseerimislahusega (0.25% kristallviolett („Merck“), 1.85% formaldehüüd, 100% etanool, 35 mM Tris, 0.5% CaCl₂) 30 min jooksul. Kristallviolettsegu värvib vaid elusaid rakke, viirusnakkuse tagajärjel surnud rakkude klastrid (lüüsilagud) jäävad värvituks. Lüüsilagud loeti üle ning, võttes arvesse elektroporatsiooni segu lahjendust, arvutati mõlema analüüsitud RNA infektsioonilisus.

2.3 Tulemused ja arutelu

Eelnevalt valmistatud pSP6-SFV4-nsP4-EGFP konstruktilt pärinevate transkriptide infektsioonilisuse hindamine

Huvi uurida uusi meetodeid CHIKV nsP4 valgu märgistamiseks tekkis, kuna puudus replikatsioonivõimeline ja stabiilne CHIKV replikon või genoom, mis ekspresseeriks markervalguga märgistatud nsP4 valku. Veelgi enam, sellised konstruktid puuduvad ka muudel alfaviirustel. Siiski oli eelnevalt Andres Meritsa uurimisgrupis loodud SFV4 konstrukti, mis sisaldas EGFP markervalguga märgistatud nsP4 valgu järjestust; selles konstruktis on EGFP liidetud nsP4 C-terminusele lühikese Gly-Pro-Gly linkeri kaudu. Vastava viirusega varem sooritatud uurimustest järeldus, et konstrukti ei ole kasutatav, kuna viirus oli ebastabiilne; arvatavasti selle pärast, et nsP4 külge kinnitatud EGFP segab nsP4. Selle kinnitamiseks otsustati võrrelda pSP6-SFV-nsP4-EGFP konstruktilt pärinevate transkriptide infektsioonilisust pSP6-SFV4 (wt) konstruktilt pärinevate transkriptidega kasutades selleks *ICA-d*. Selle katse tulemused näitasid, et WT konstruktilt pärinevate transkriptide infektsioonilisus oli $1,33 \times 10^6$ pfu-d (*plaque-forming unit*) ühe μg RNA kohta, samas kui rekombinantset plasmiidil pärinevatel transkriptidel oli see $3,1 \times 10^4$ pfu/ μg . Seega on rekombinantne RNA ligikaudu 100 korda vähem infektsiooniline kui on WT viiruse RNA. Selline infektsioonilisuse vähenemine näitab sügavat defekti replikatsioonis ja peaaegu alati toob kaasa geneetilise ebastabiilsuse – järjestused, mis põhjustavad infektsioonilisuse vähenemist eemaldatakse viiruse genoomist. Seega kattub saadud tulemus eelnevalt läbiviidud katsetes nähtuga (seal täheldati, et rekombinantse viirusega nakatatud rakudes ja rakulüsaatides nsP4-EGFP-de ei ole; nsP4 C-otsa külge jääb alles väike jupp algsest inserdist), mistõttu on korrektne väita, et antud SFV-nsP4-EGFP konstrukti ei saa usaldusväärselt kasutada nsP4 lokaliseerimise ja ekspressiooni uurimiseks. Samas näitab see veel kord et nsP4 C-otsa on võimalik mingeid järjestusi lisada – nsP4-EGFP pidi olema funktsionaalne (sest ainult sellisel juhul on võimalik lüüsilaikude moodustumine ICAs); selleks et saada kasutatav konstrukti on vaja otsida paremaid lähenemisi.

CHIKV mittestruktuurse valgu nsP4 ekspressiooni ja lokaliseerimise uurimiseks kasutatavate plasmiidide loomine

CHIKV mittestruktuurse valgu nsP4 lokaliseerimise ja ekspressiooni uurimiseks oli vaja luua 7 erinevat CHIKV-PL plasmiidil põhinevat replikoni. Töö eesmärgiks oli luua neli erinevat

fluorestseeruva markeriga vektorit, kaks Ffluc-i sisaldavat vektorit ja üks Ffluc-i sisaldav kontrollvektor (joonis 4 ja ülal toodud kirjeldus).

Iga markervalgu järjestust sisaldavast vektorist valmistati 2 varianti – üks mis sisaldab FSI-te ning teine, mis sisaldab FSII-te. FSII on SARS-i viirusest pärinev, samas kui FSI on sünteetiline, looduses mitteleiduv järjestus, kuid SARSi frameshift elemendil põhinev looduses mitteleiduv järjestus.

Erinevate FS-elementide kasutamise eesmärgiks oli luua replikonid, millelt transleeritaks nii nsP4 (täpsemalt, nsP4 valku mille C-terminuses on lühike peptiid mis vastab raaminihke elemendile) kui nsP4-markervalk liitvalku, kuid seda kontrollitud vahekorras. Erinev nsP4 ja nsP4-markervalkude vahekord saavutati kasutades *stem-loop* struktuuri, mis põhjustab umbes 15% kordadest raaminihke ning 85% kordadest loetakse sellest läbi lugemisraami muutmata. Kuna FSI ja FSII on sarnast päritolu toimub translatsioonil raaminihke mõlemal elemendil umbes 15% tõenäosusega. Samas on need elemendid paigutatud erinevalt:

- loomuliku SARSi elemendi (FSII) puhul paikneb lugemisraamis frameshift elemendi sees stopp-koodon ning sünteesitav valk termineerub (tulemusek on lühikese „sabaga“ nsP4), kui aga toimub „-1“ raaminihke (15%), siis muutub lugemisraam ning sünteesitakse pikem valk nsP4-EGFP liitvalk.
- FSI element baseerub FSII-l, kuid on muudetud sel moelraaminihke puudumisel sünteesitakse nsP4-EGFP liitvalk, raaminihke toimumisel sünteesitakse aga lühem nsP4 valk.

Seega, FSII elemendi korral sünteesitakse umbes 85% nsP4 valku ja 15% nsP4-EGFP valku ning FSI korral on olukord vastupidine (Baranov jt., 2005). Lisaks, arvestades kogemust pSP6-SFV4-nsP4-EGFP konstruktiga paigutati nsP4 C-terminuse ja raaminihke elemendi vahele 15 aminohappe jäägi pikkune paindlik linker (struktuur 3x(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser). Selle elemendi mõte seisnes selles et vältida kompaksete valgulistest struktuuride (RdRp ja EGFP) jäika seondamist teineteise külge mille tulemuseks või olla RdRp funktsiooni inhibeerimine.

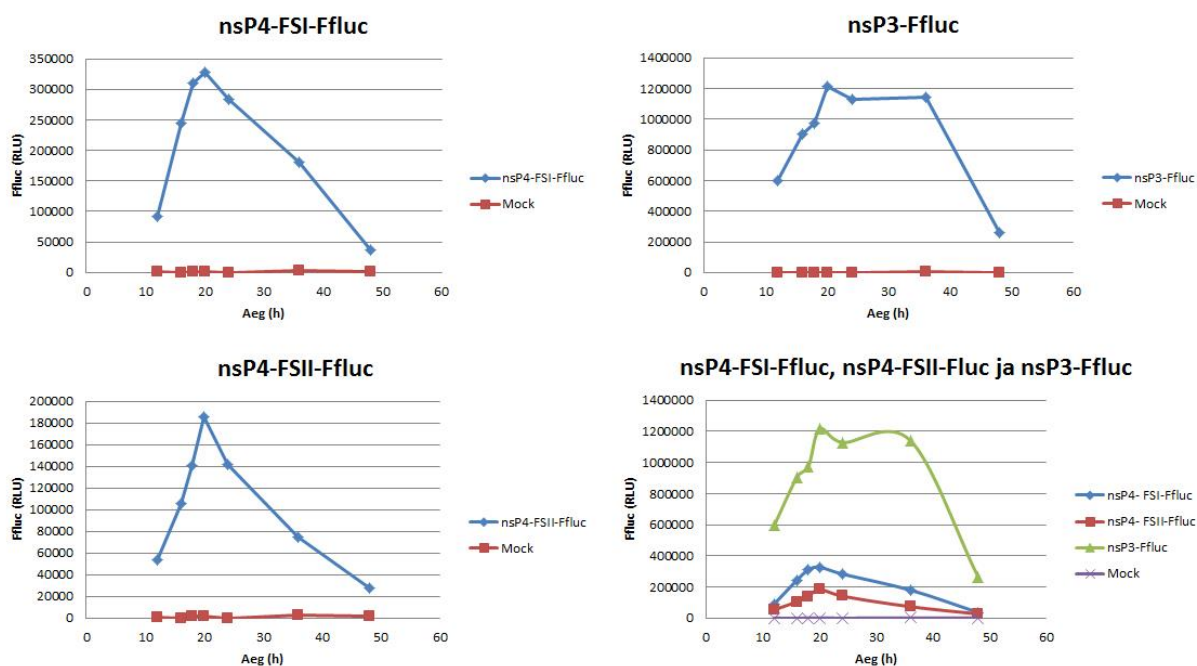
Transfekteritud rakkudes nsP4-markervalgu ekspressiooni detekteerimine ja kvantifitseerimine

Markergeenide liitmine viiruse valgu järjestuse külge võib tekitada mitmeid probleeme. Markervalk võib segada viiruse replikatsiooni, eriti kui see on kinnitatud viiruse polümeraasi (või mõne muu olulise valgu) külge; markervalgu liitmisel viiruse valgu sisse on riskid veelgi suuremad, sest võib olla rikutud kogu viiruse valgu struktuur. Seega võib markervalk takistada viiruse komponendi tööd piisavalt suurel määral, et viiruse replikatsioon on häiritud. Lisaks olid ka antud uurimutöös kasutatud FS elemendid eelnevalt CHIKV puhul katsetamata, st puudusid varajasemad andmed FS elementide funktsioneerimisest alfaviiruse genoomi kontekstis.

Kontrollimaks loodud konstruktide replikatsioonivõimet, viidi esmalt läbi *in vitro* RNA transkriptsioon; saadud transkriptidega elektroporeeriti BHK-21 rakke, nagu seda on kirjeldatud ülal. Rakud külvati välja 24- ja 6-augustele koekultuuri plaatidele.

Esimese analüüsina hinnati NsP4-Ffluc liitvalgu hulga rakkudes mõõdetes Ffluc-i kogust erinevatel ajahetkedel. See katse teostati esimesena, sest Ffluc aktiivsuse mõõtmine on oluliselt täpsem ja tundlikum fluorestseerivate valkude detekteerimisest (siin tuleb arvestada, et kuna need valgud on liidetud nsP4-le, mis on rakkudes ebastabiilne ja seetõttu esinev väikesel hulgal, on ebastabiilsed ka nsP4-marker liitvalgus). Selleks katseks kasutati konstrukte CHIKV-nsP4-FSI-Ffluc, CHIKV-nsP4-FSII-Ffluc ja kontrolliks konstrukti CHIKV-nsP3-Ffluc. Lutsiferaasi aktiivsuse kvantifitseerimiseks lüüsi 24-augustele plaatidele külvatud rakud 12, 16, 18, 20, 24, 36 ja 48 tundi pärast elektroporatsiooni. 12 tunnil eelnevaid ajapunkte ei kasutatud, kuna elektroporatsioonil antav elektriimpulss tekitab rakkudes stressi, mistõttu on varajastes ajapunktides viiruses ja/või replikoni RNA replikatsioon rakkudes häiritud. Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmise tulemustest järeldus, et suurim hulk nsP4-Ffluc valku on rakkudes 20 tundi pärast elektroporatsiooni. 20 tunni punktis toodetakse nsP4-Ffluc valku FSI replikonilt 1,77 korda rohkem kui FSII replikonilt. Teoreetiliselt peaks FSI elementi sisaldav replikon ekspresseerima 85% nsP4-Ffluc valku, samas kui FSII peaks seda tootma vaid 15%, st eeldatav vahe võiks olla 5,6-kordne. Antud mõõtmistulemused nii suurt erinevust esile ei too, samas on 1,77 kordne vahe selgelt kvantifitseeritav suurus. Oodatust väiksem vahe võib olla tingitud nsP4-Ffluc valkude degradatsioonist proteasoomides. See on võimalik, eriti kui eeldada, et RC-desse liidetakse (ja selle kaudu stabiliseeritakse) eelistatult nsP4, mitte nsP4-Ffluc valku. Sellisel juhul jääb viimane tsütoplasmasse, kus toimub selle kiire degradatsioon ja algsed vahed valkude

hulkades (FS1 ja FS2 konstruktid) vähenevad. Seda võimalust toetab ka fakt, et mõõdetud erinevus CHIKV-nsP3-Ffluc kontrolli ja mõlema FS-elementidega replikonide vahel on veelgi suurem: CHIKV-nsP3-Ffluc replikonilt sünteesitakse 3,7 korda rohkem lutsiferaasi kui CHIKV-nsP4-FSI-Ffluc ning 6,6 korda rohkem kui CHIKV-nsP4-FSII-Ffluc replikonilt. Antud tulemused on oodatavad, kuna nsP3-e kogus rakus on tavapärase viirusinfektsiooni korral palju suurem kui nsP4 hulk: nsP3 on oluliselt stabiilsem valk kui seda on nsP4. Kontrolliks mõõdeti ka lutsiferaasi aktiivsust *mock* e transfekteeerimata rakkudes. Saadud tulemuse (foon) võrdlemine kõigi kolme konstruktiga transfekteeeritud rakkudest saadud tulemustega näitas, et Ffluc foon transfekteeerimata rakkudes on väga madal; sellest võib järeldada, et transfitseeritud rakkude puhul saadud mõõtmistulemused kajastavad replikon-RNAde vahendatud nsP4-Ffluc (või nsP3-Ffluc) ekspressiooni. Mõõtmistulemuste põhjal koostatud graafikud on kujutatud joonisel 5.



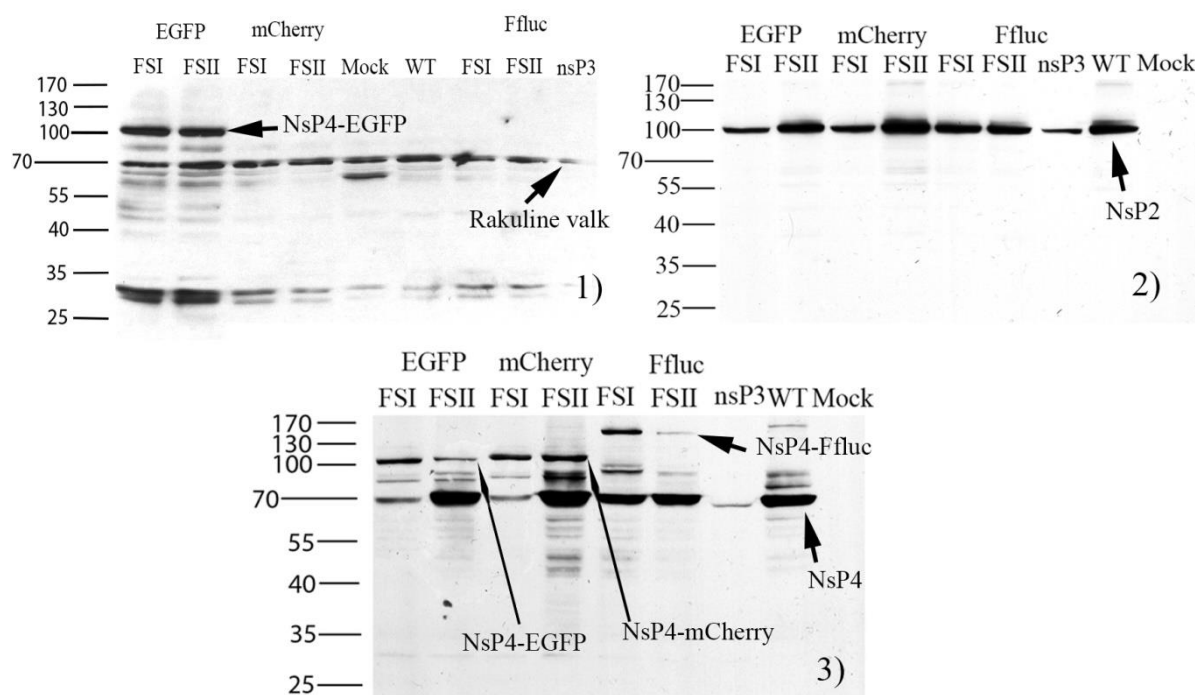
Joonis 5. Ffluc-i mõõtmistulemused transfekteeeritud BHK-21 rakkudest. Graafikute Y-teljel on rakkudest mõõdetud Ffluc aktiivsus, mille ühikuks on *Relative light unit* e. RLU. X-teljel on aeg, mis on märgitud tundides. Katse sooritamisel on kasutatud replikone CHIKV-nsP4-FSI-Ffluc, CHIKV-nsP4-FSII-Ffluc, CHIKV-nsP3-Ffluc.

Kuigi Ffluc talub hästi liitmist mitmete valkude külge (või ka nende sisse), võib see siiski mõjutada tema aktiivsust; seega ei pruugi erinevatele valkudele liidetud Ffluc aktiivsus täpselt kajastada nende valkude hulki rakus. Sellepärast oli oluline uurida replikonide poolt toodetud valkude ekspressiooni elektroporatsiooni teel transfekteeeritud rakkudes ka *western blot*

analüüsi abil. Selleks lüüsi 6-augulistele plaatidele külvatud transfekteeeritud BHK-21 rakud 16 tundi peale transfektsiooni. *Western blot* analüüs viidi läbi 8 erineva replikoniga transfitseeritud rakkudele (CHIKV-nsP4-FSI-EGFP, CHIKV-nsP4-FSII-EGFP, CHIKV-nsP4-FSI-mCherry, CHIKV-nsP4-FSII-mCherry, CHIKV-nsP4-FSI-Ffluc, CHIKV-nsP4-FSII-Ffluc, CHIKV-nsP3-Ffluc, CHIKV-PL replikon (positiivne WT kontroll)), negatiivseks kontrolliks olid *mock* transfekteeeritud BHK-21 rakud. Primaarsete antikehadena kasutati EGFP, CHIKV nsP2 ja CHIKV nsP4 vastaseid antiseerumeid, nendest nsP2 vastane antikeha oli mõeldud kontrollina: viiruse nsP2 valku ei ole üheski uuritavas konstruktis muudetud, mistõttu peaks see olema kõikidel juhtudel ühe ja sama suurusega. EGFP antikeha abil nsP4-EGFP liitvalku (CHIKV-nsP4-FSI-EGFP, CHIKV-nsP4-FSII-EGFP) samal ajal kui nsP4 vastase antikehaga detekteeritakse markeerimata nsP4 ja ka nsP4-markervalgu olemasolu rakus.

Saadud tulemused (joonis 6) näitavad, et kõigi replikonide korral toimub ootuspäraselt ühesuguse suurusega nsP2 süntees (joonis 6.2). EGFP vastast antikeha kasutades oli kõikide proovide puhul, kaasa arvatud ka transfekteeerimata BHK-21 rakkudes, detekteeritav ligi 70kDa suurune valk (joonis 6.1). Seega on tegemist rakulise produktiga. Lisaks nimetatud valgule on selgelt tuvastatav ~100kDa suuruse valgu signaal rakkudes, mida transfekteeeriti nsP4-EGFP valgu sünteesivate replikonidega. NsP4 vastase antikehaga töödeldud membraanil on kõikidel juhtudel (v.a. *mock* kontroll) näha ~70kDa suurust nsP4 valku (joonis 6.3). Samuti on tuvastatavad kõik oodatud nsP4-marker liitvalgud. NsP4-EGFP ja nsP4-mCherry on ligikaudu 100kDa suurusel, samas kui nsP4-Ffluc on 140kDa suurune. Antud tulemus vastab täpselt oodatule, kuna Ffluc on ca 40 kDa võrra suurem kui mCherry või EGFP (mis on omavahel ligikaudu sama suurusega). Lisaks sellele on näha FSI ja FSII signaale sisaldavate replikonide vahelisi erinevusi. Nii ekspresseerivad FSI signaali sisaldavad replikonid nsP4-ja väiksemal hulgal, kui seda teevad FSII-signaali sisaldavad replikonid (eriti selgelt näha EGFP ja mCherry replikonide puhul, joonis 6.3). Märkatav on ka erinevus nsP4-marker valgu hulkades, mis on FSI signaali sisaldavatel replikonidel selgelt suurem kui FSII signaali sisaldavatel replikonidel (eriti selgesti on see nähtav EGFP ja Ffluc replikonide puhul, joonis 6.3). Antud tulemus on teooriaga kooskõlas, kuna FSI on kavandatud tootma rohkem nsP4-marker valku ja vähem puhast nsP4-ja kui FSII. Samas on oluline märkida, et need erinevused võivad tuleneda mitte ainult valkude (nsP4 versus nsP4-marker) sünteesi proportsioonidest, vaid ka konstrukti erinevast replitseerumise efektiivsusest, mis mõjutab valkude sünteesiks kasutatavate RNAde hulka rakkudes. Seda saaks paremini hinnata northern blot meetodil, kuid teatud ettekujutuse annab ka analüüs nsP2 antikeha abil. Jooniselt 6.2 on selgesti näha, et

nsP2 hulga rakkudes, mida on transfekteeritud FSI replikonidega, on oluliselt väiksemad kui nsP2 hulga FSII replikonidega transfekteeritud rakkudes. Üsna kindasti on selle põhjuseks asjaolu, et FSI replikonid replitseeruvad halvemini (sünteesivad vähem RNAd) kui FSII replikonid. Väga tõenäoliselt on selle põhjuseks asjaolu, et FSI replikonid sünteesivad vähem aktiivset nsP4 valku ja rohkem nsP4-marker valku, mille võime teostada viiruse RNA replikatsiooni on väiksem kui nsP4 valgul. Samuti on jooniselt näha, et ka CHIKV-nsP3-Ffluc replitseerub halvasti (madalad nsP2 ja nsP4 tasemed), mis näitab, et Ffluc lisamine nsP3 valgu sisse vähendab viimase võimet toetada viiruse RNA replikatsiooni (joonis 6.2, 6.3).



Joonis 6. Replionide kodeeritud valkude ekspressioon transfekteeritud BHK-21 rakkudes. Valkude ekspressiooni uurimiseks lüüsi rakud 16 tundi pärast transfektsiooni. Rakkude lüsaate analüüsiiti western blot meetodil, kasutades EGFP (1), CHIKV nsP2 (2) ja CHIKV nsP4 (3) vastaseid antikehi.

Viiruse-replikon partiklite tootmine ning saadud stockide tiitrite määramine

Viiruse-replikon partiklid e VRP-d on levimisdefektsed osakesed, kus viiruse kapsiidi on pakitud replikon RNA, mis kodeerib viiruse replikatsiooniks olulisi mittestruktuurseid valke, kuid milles puuduvad struktuurseid valke kodeerivad järjestused. Viirusinfektsiooni uurimine VRP-de abil on eelistatud elektroporatsioonile, kuna VRP-dega nakatamine imiteerib viiruse infektsioonitükli loomulikku kulgu; samal ajal on VRPd võimetud tootma uusi virone ja on seetõttu inimesele ohutud. VRP-de valmistamiseks elektroporeeriti swe-BHK rakkudesse

segud, millest igauks sisaldas ühelt joonisel 4 kujutatud konstruktilt sünteesitud RNAd ning helper E ja helper C plasmiididelt sünteesitud RNAsid. Transfekteritud rakkudel kogutud ja kontsentreeritud VRP-de tiitrid olid järgmised:

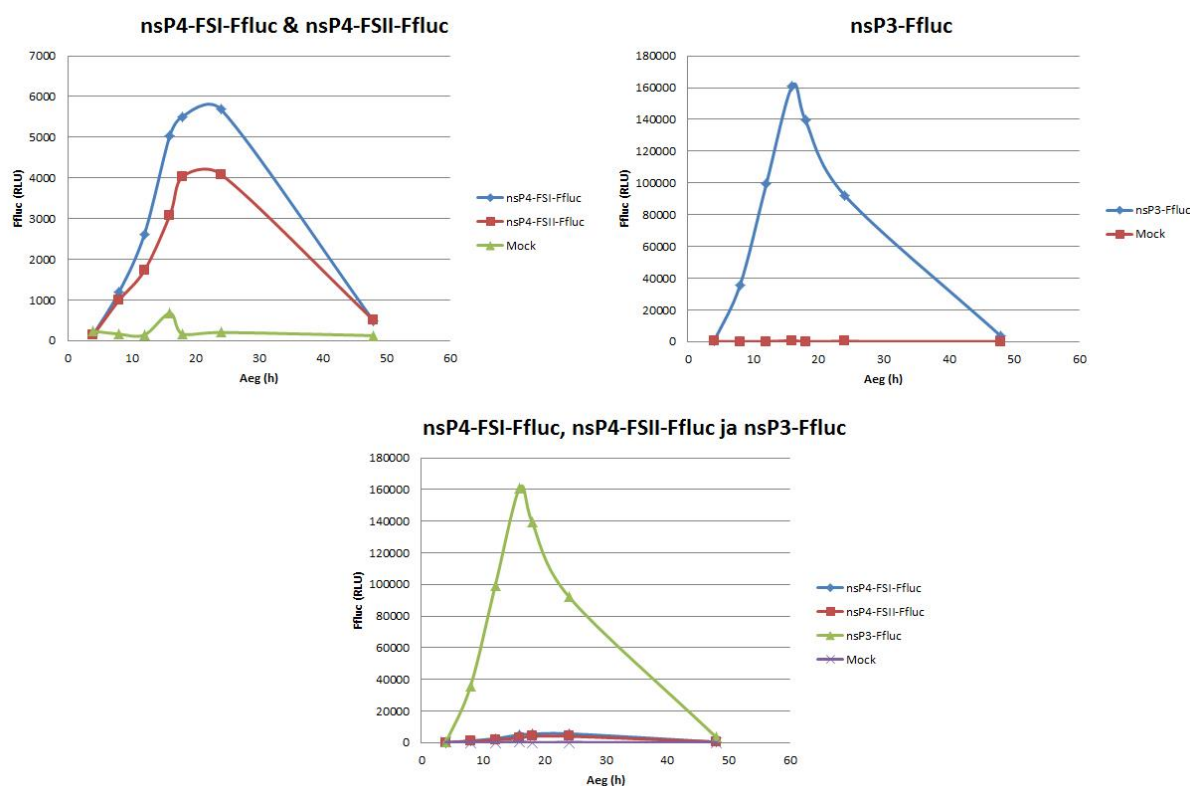
- CHIKV-nsP4-FSI-EGF=1,22 x 10⁷ IU/ml
- CHIKV-nsP4-FSII-EGFP =7,19 x 10⁷ IU/ml
- CHIKV-nsP4-FSI-mCherry=1,46 x 10⁷ IU/ml
- CHIKV-nsP4-FSII-mCherry=2,56 x 10⁷ IU/ml
- CHIKV-nsP4-FSI-Ffluc=1,65 x 10⁷ IU/ml
- CHIKV-nsP4-FSII-Ffluc=2,56 x 10⁷ IU/ml
- CHIKV-nsP3-Ffluc=1,53 x 10⁷ IU/ml

Tulemused on ühikutes IU/ml (*Infectious unit/ml*). Saadud tulemused näitavad, et kõik konstrueeritud replikonid on võimelised tootma VRPsid, samas on nende kogused oluliselt väiksemad kui wt CHIKV-PL puhul (tüüpiliselt >10⁹ IU/ml). Samuti on taas näha, et kõik FSI signaali sisaldavad konstruktid toodavad vähem VRPsid kui vastavad FSII signaali sisaldavad replikonid; see kinnitab ülal toodud oletust, et FSI signaal, mis vähendab tugevasti nsP4 valgu osakaalu (ja suurendab nsP4-marker valgu osakaalu) vähendab selle tõttu ka vastava RNA replitseerimist. Samuti on CHIKV-nsP3-Ffluc VRP-de madal tiiter kooskõlas oletusega, et see Ffluc lisamine nsP3 valgu sisse vähendab viimase võimet osaleda viiruse RNA replikatsioonil.

NsP4-Ffluc valgu koguse kvantifitseerimine VRP-dega nakatatud rakkudes

Ffluc-i aktiivsust mõõdeti, et kvantifitseerida nsP4-Ffluc valgu kogust rakkudes erinevatel ajahetkedel. BHK-21 rakke nakatati CHIKV-nsP4-FSI-Ffluc, CHIKV-nsP4-FSII-Ffluc, CHIKV-nsP3-Ffluc VRP-dega MOI 0,1 tingimustes: 1,56 x 10⁵ raku kohta (rakkude arv 24 auguste plaadi pesas) võeti 1,56 x 10⁵ IU VRP-sid. Lutsiferaasi aktiivsust mõõdeti 4, 8, 12, 16, 18, 24 ja 48 tundi pärast infektsiooni. VRP-dega nakatamisel oli lutsiferaasi aktiivsus suurim 24 tunni ajapunktis ning selles ajapunktis erinesid FSI ja FSII replikonide toodetud Ffluc aktiivsused ligikaugu 1,5 korda. Võrdluseks kasutatud CHIKV-nsP3-Ffluc toodetud Ffluc aktiivsus oli aga ligikaudu 20 korda suurem kui CHIKV-nsP4-FSI-Ffluc, CHIKV-nsP4-FSII-

Ffluc puhul. Antud tulemus on oodatav, kuna nsP3 kogus rakus on suurem kui nsP4. Ka on saadud tulemused üsna sarnased transfitseeritud rakkude analüüsil saadud tulemustele (joonis 5).



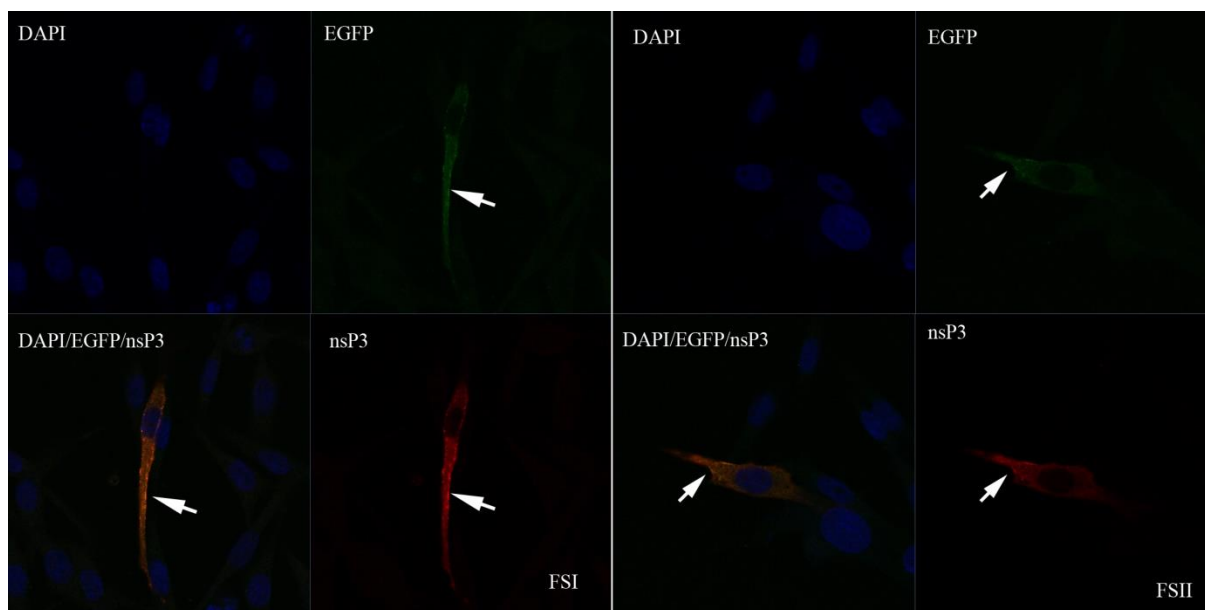
Joonis 7. VRP-dega nakatatud rakkudes sisalduva Ffluc-i aktiivsuse mõõtmise tulemused. Graafikute Y-teljel on nakatatud rakkudest detekteeritud heleduse tugevus, mille ühikuks on *Relative light unit* e. RLU. X-teljel on aeg, mis on märgitud tundides. Rakke nakatati CHIKV-nsP4-FSI-Ffluc, CHIKV-nsP4-FSII-Ffluc ja CHIKV-nsP3-Ffluc VRP-dega MOI 0,1 juures ning mõõtmised teostati seitsmel ajapunktil. .

NsP4-EGFP ja nsP4-mCherry valkude ekspressiooni ja lokaliseerimise uurimine VRP-dega nakatatud rakkudes IF-i abil

IF-i abil on võimalik määrata valgu ekspressiooni ja lokaliseerimise rakus. Antud töös viidi IF läbi 4 konstrukti (CHIKV-nsP4-FSI-EGFP, CHIKV-nsP4-FSII-EGFP, CHIKV-nsP4-FSI-mCherry ja CHIKV-nsP4-FSII-mCherry) VRP-dega nakatatud rakkudes, kasutades nsP3 vastast antikeha primaarse antikehana ja Alexa Fluor® 568 (EGFP-d ekspresseerivad konstruktid) või Alexa Fluor® 488 (mCherry't ekspresseerivad konstruktid) märgistatud antikehi sekundaarsete antikehadena. Rakkude tuumad värviti DAPI abil .

CHIKV-nsP4-FSI-EGFP VRP-dega nakatatud rakkude puhul on selgelt näha nii punast (nsP3) kui ka rohelist (nsP4-EGFP) helendust (joonis 8). Nakatumata rakkude taustfluorestsents on tunduvalt väiksem kui nakatunud rakkudel. Raku plasmamembraani vahetus läheduses on märgata nsP4-EGFP ning nsP3-e kolokalisatsiooni. Lähtudes teoriast on nsP3 ja nsP4 valkude kolokalisatsioon võimalik vaid viiruse RC-ides (või P1234 liitvalgus, see on aga väga lühikese poolelueaga), mistõttu võib kolokalisatsiooni olemasolu võtta kui tõendit, et nsP4-FSI-EGFP valku esineb moodustunud RC-ide koosseisus. Arvestades selle konstrukti nõrgemat replikatsiooni, pole välistatud, et sellised kompleksid on vähem aktiivsed kui WT viirus (replikoni) moodustatavad replikatsioonikompleksid.

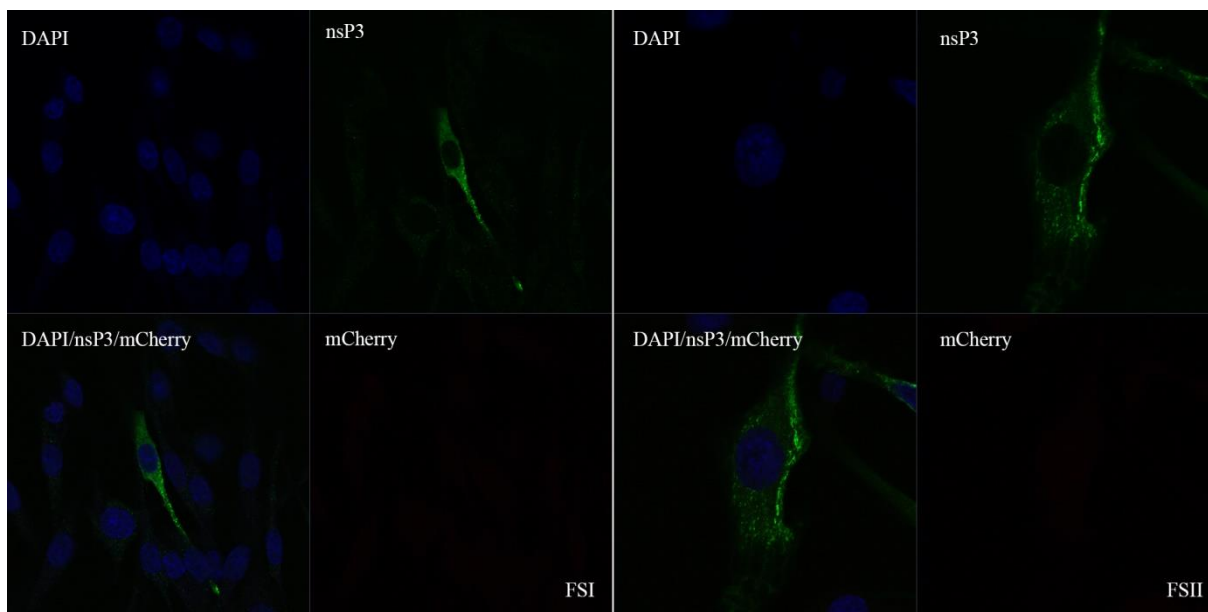
CHIKV-nsP4-FSII-EGFP VRP-dega nakatatud rakkude korral on näha, et EGFP fluorestsentsi tase on (võrreldes nsP4-FSI-EGFP VRP-dega nakatatud rakkudega) väiksem, mis on kooskõlas eelnevate katsete tulemustega. Taas on EGFP ja nsP3 fluorestsents on kõige tugevam raku plasmamembraani läheduses ja viitab mõlema valgu olemasolule replikatsioonikompleksides



Joonis 8. Konfokaalmikroskoobiga tehtud pilt rakkudest, mida on nakatatud CHIKV-nsP4-FSI-EGFP ja CHIKV-nsP4-FSII-EGFP replikone sisaldavate VRP-dega. Vasakpoolsed 4 pilti on tehtud CHIKV-nsP4-FSI-EGFP VRPdega nakatatud rakkudest ja parempoolsed 4 on CHIKV-nsP4-FSII-EGFP VRPdega nakatatud rakkudest. Mõlemal pildil on DAPI-ga siniseks värvitud rakutuomad DAPI lahtris, roheliselt värvunud EGFP valk EGFP lahtris ning punasega värvitud nsP3 valk nsP3 lahtris. Viimasel, DAPI/EGFP/nsP3, pildil on kujutatud kolme eelneva lahtri kombineeritud pilti. Valgete nooltega näidatud kohad märgivad nsP3 ja nsP4-EGFP valkude kolokalisatsiooni.

CHIKV-nsP4-FSI-mCherry ja CHIKV-nsP4-FSII-mCherry VRP-dega nakatatud rakkudest tehtud pildidel on näha tugevat nsP3-e signaali, samal ajal kui mCherry punane fluorestsents

aga puudub (ei ületa fooni, joonis 9). Vaadeldes nsP3 hulka ja lokalisatsiooni rakus, võib järeldada, et viiruse replikatsioon siiski toimub, mis tähendab funktsionaalse nsP4 valguga olemasolu rakus. Kahtlemata on rakkudes olemas ka nsP4-mCherry liitvalgud (Joonis 6.3) kuid paraku ei ole mCherry fluoretsents antud tingimustel nende valkude detekteerimiseks piisav.



Joonis 9. Konfokaalmikroskoobiga tehtud pilt rakkudest, mida on nakatud CHIKV-nsP4-FSI-mCherry ja CHIKV-nsP4-FSII-mCherry replikone sisaldavate VRP-dega. Vasakpoolsed 4 pilti on tehtud CHIKV-nsP4-FSI-mCherry VRP-dega nakatunud rakkudest ja parempoolsed 4 on CHIKV-nsP4-FSII-mCherry VRP-dega nakatunud rakkudest. Mõlemal pildil on DAPI lahtris DAPI abil siniseks värvitud rakutuumad. NsP3 lahtris on roheliselt fluorestseeruva antikehaga värvitud nsP3 valgud ning mCherry lahtris peaks olema mCherry punase spektri helendus, mis paraku ei ületa fooni. Viimases, DAPI/nsP3/mCherry lahtris on kolme eelneva pildi kombineeritud versioon.

Valmistatud konstruktidelt geneetilise stabiilsuse analüüs.

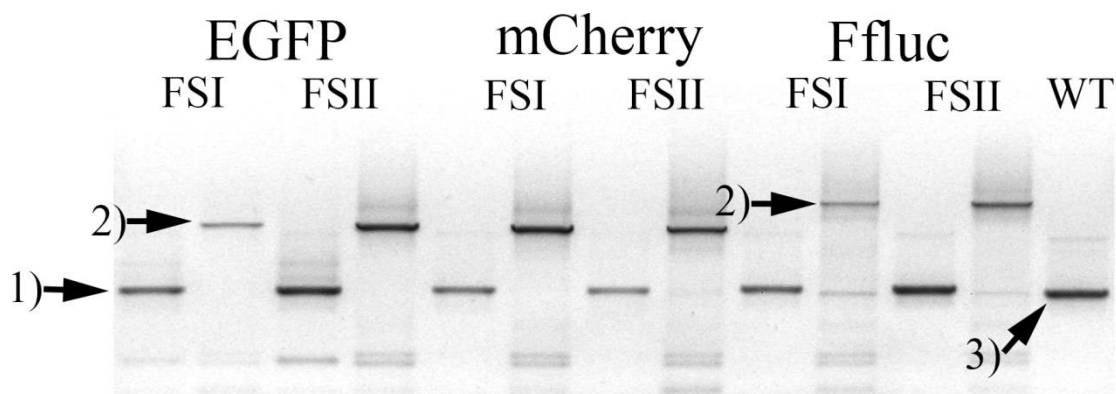
Viirused, mille valkudele on lisatud markerid, on sageli geneetiliselt ebastabiilsed; enamasti väljendub see markerit kodeerivate järjestuste kaotsiminekus (Rausalu jt., 2009). IF analüüsi tulemused tekitavad küsimuse, kas mCherry'it ekspresseerima pidanud konstruktide VRP-des on vastav kodeeriv järjestus säilinud või mitte. Selle uurimiseks viidid läbi RT-PCR analüüs, mille skeem on toodud joonisel 10.



Joonis 10. Teostatud RT-PCR-i skeem. PCR-iks kasutati joonisel märgitud primereid 1, 2 ja 3. Praimer 1 asub nsP4 lõpus, praimer 2 markergeeni sees ning praimer 3 on 3' UTR-is asuv reverse primer. Iga cDNA-ga viidi läbi 2 reaktsiooni: üks reaktsioon kasutades praimer 1 ja praimer 3-e ning teine reaktsioon praimer 2 ja praimer 3-ga.

RNA eraldati kõikidest rekombinantseid replikone (v.a. CHIKV-nsP3-Ffluc) ja WT CHIKV-PL replikoni sisaldavatest VRP-dest. Iga konstruktiga viidi läbi 2 RT-PCR-i. Esimene reaktsioon sisaldas ligikaudu 100 nukleotiidi enne nsP4 lõppu seonduvat *forward* praimerit ning 3'UTR-iga komplementaarset *reverse* praimerit. Teise reaktsioonina viidi läbi reaktsioon, kus *forward* praimer seondub markergeeni keskele (EGFP ja mCherry konstruktid) või selle viimasele 1/3-le(Ffluc konstruktid) ning *reverse* praimer oli sama, 3' UTR-iga komplementaarne praimer.

Tulemustest selgus, et kõigis VRP-des paiknavates replikon-RNAdes (kaasa arvatud ka mCherry markerit sisaldavates konstruktid) on selgelt olemas markergeeni järjestus (joonis 11). Kõik saadud fragmenid on oodatava suurusega, mis välistab suuremate deletsioonide olemasolu markergeeni sisaldavas regioonis. Punktmutatsioonid markergeenides on küll võimalikud, kuid kuna need on juhuslikku laadi ja VRP-de tootmiseks on vajalik vaid üks RNA paljundamise tsükkel, ei ole tõenäoline, et sellised mutatsioonid võiksid põhjustada mCherry fluoretsentsi kadumist; pigem on valgu tase selle detekteerimiseks mikroskoobis liiga madal. Sellise võimaluse tõestamiseks (või ümberlukkamiseks) on vaja teha korduskatseid (IF) nsP4-mCherry valke ekspresseerivate replikonidega.



Joonis 11. VRP-des eraldatud RNAdel läbi viidud RT-PCR-i tulemused. 1) Fragmendid, mis vastavad järjestusele markergeeni keskmisest osast kuni 3' UTR-ini. 2) Fragmendid, mis vastavad järjestusele nsP4 lõpust 3'UTR-ini. 3) WT replikonile vastavalt cDNAlt sünteesitud fragment, mis vastab järjestusele nsP4 lõpust 3'UTR-ini.

Edaspidises töös oleks vajalik määrata, kas ja kuidas nsP4 küljes olev markervalk segab nsP4 tööd rakus. FSI ja FSII signaale sisaldavate konstruktide omadused lubavad teha oletuse, et markeri mõju nsP4 valgule on märkimisväärne ja nsP4-marker valgud on kas inaktiivsed või on nende aktiivsus polümeraasina minimaalne. Kui see oletus saab kinnituse, siis ei ole rakendatud uudne lähenemine praktiliselt kasutatav. Kui aga see oletus paika ei pea, oleks võimalik valmistatud konstrukte kasutades luua mitme markervalguga märgistatud replikonvektoreid nt nsP3-mCherry-nsP4-FSI/II-EGFP, millega saaks uurida korraga mitme viiruse valgu ekspressiooni, hulka ja lokalisatsiooni rakus. Lisaks sellele on konstruktid vaba ka subgenoomne promooter, kuhu saab kloneerida soovi korral lisa markervalke kodeerivaid järjestusi.

KOKKUVÕTE

CHIKV on alfaviiruste perekonda kuuluv, positiivse polaarsusega RNA genoomiga viirus, mis levib *Aedes* perekonna sääskede kaudu. Inimestel põhjustab CHIKV artriiti ning harvematel juhtudel võib infektsioon lõppeda ka surmaga. Kuigi CHIKV avastati juba 1953. aastal, on seda siiski vähe uuritud. Huvi CHIKV uurimise vastu tõusis, kui aastatel 2004-2008 toimus mitu viirusepideemia puhangut Aafrika idaosas ja India ookeani piirkonnas. 2013. aasta talvel algas uus puhang Uues Maailmas.

CHIKV mittestruktuurne valk nsP4 on viiruse RdRp, mis vastutab viiruse genoomi replikatsiooni eest. Käesoleva töö eesmärgiks oli luua CHIKV replikonid, mille abil saaks uurida nsP4 ekspressiooni, aga eriti just selle lokalisatsiooni nakatatud rakkudes. Selleks liideti nsP4 järjestuse külge (valgu C-terminusele) mCherry, EGFP või Ffluc markergeenid. Võimaldamaks aktiivse (ilma markerita) nsP4 sünteesi ja reguleerimaks nsP4-markeri liitvalgu hulka, paigutati nsP4 ja markervalke kodeerivate järjestuste vahele kahte tüüpi raaminihke elemente FSI tagab peamiselt nsP4-marker liitvalgu valgusünteesi; FSII aga peamiselt markervalguta nsP4-ja ekspressiooni.

Konstrueeritud replikonide uurimine BHK-21 rakkudes näitas, et kõik 6 uutset replikoni on paljunemisvõimlised. Western blot analüüs näitas, et kõikidel juhtudel ekspresseeruvad eeldatud valgud; samuti vastasid nsP4/nsP4-marker valkude vahekorrad eeldatule. Erinevad katsed näitasid, et FSI elementi sisaldavad replikonid paljunevad halvemini kui FSII elementi sisaldavad konstruktid. See viitab sellele, et RNA replikatsiooni seisukohast on nsP4-marker liitvalk väheaktiivne. Funktsionaalsed katsed näitasid, et nsP4-Ffluc aktiivsus on rakkudes selgelt määratav, samuti on detekteeritan nsP4-EGFP (paraku mitte nsP4-mCherry) fluorents. Saadud andmete põhjal võib öelda, et loodud konstruktid on potentsiaalsed kandidaadid nsP4 ekspressiooni ja lokalisatsiooni uurimiseks rakus; selle kinnitamiseks (või ümberlukkamiseks) tuleb aga viia läbi lisakatseid.

Construction and characterization of replicon vectors that are necessary for the study of Chikungunya virus nonstructural protein 4

Taavi Põder

SUMMARY

CHIKV is a member of the *Alphavirus* genus. It has a positive sense RNA genome and is transmitted by *Aedes* mosquitoes.. Although CHIKV was discovered in 1953, the research involving the virus has been scarce..However, recently CHIKV has become a more common research subject after the La Reunion epidemic, during which 266 000 people were infected and following epidemics in Indian Ocean region as well as ongoing epidemics in Caribbean islands and Americas. The symptoms of a CHIKV infection include potentially chronic arthritis and in rare cases even death.

NsP4 is the RNA dependent RNA polymerase of CHIKV and is responsible for virus RNA replication. The aim of this project was to create CHIKV replicon vectors, which could be used to study the expression and localization of nsP4. In order to achieve that three different marker proteins– EGFP, mCherry and Ffluc – were fused to the C-terminus of nsP4 via flexible linker. To regulate the amount of fusion protein synthesized from the replicons, two frameshift elements were used – FSI and FSII. FSII is a *stem-loop* structure found in the SARS virus. FSI is a synthetic sequence. Replicon with FSI element should express 85% nsP4-reporter fusion protein and 15% of unmarked nsP4 protein. FSII element has the opposite effect, creating 15% fusion protein and 85% unmarked nsP4. Thus, altogether 6 different CHIKV-nsP4-FSI/II-reporter plasmids were created.

All of the replicon plasmids were used as a template for *in vitro* transcription and the synthesized RNAs were transfected into BHK-21 cells. All constructs were capable to initiate replication, thus virus-replicon particles (VRP-s) were also produced using all of the constructs, and used subsequently to infect BHK-21 cells. RT-PCR confirmed that all constructs were sufficiently genetically stable to allow production and packaging of marker-encoding RNAs to VRPs. Using *western blot* analysis expression of all expected forms of nsP4 and nsP4-reporter was detected. Functional assay revealed activity of nsP4-Ffluc fusion protein in infected/transfected cells and auto-fluoresence of nsP4-EGFP (but not nsP4-mCherry) in VRP-infected cells. These results are promising and suggest that the replicon

vectors are all viable candidates to study nsP4 expression and localization but in order to confirm that conclusively, further research is needed. Indeed, in current study indirect evidences that nsP4-reporter fusion proteins have compromised RNA dependent RNA polymerase activity were obtained.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Akhrymuk, I., Kulemzin, SV., Frolova, E. I.** 2012. Evasion of the innate immune response: the Old World alphavirus nsP2 protein induces rapid degradation of Rpb1, a catalytic subunit of RNA polymerase II. *J. Virol.* 86:7180–7191.
- Atasheva, S., Gorchakov, R., English, R., Frolov, I., Frolova E.,** 2007. Development of Sindbis viruses encoding nsP2/GFP chimeric proteins and their application for studying nsP2 functioning. *J. Virol.* 81:5046–5057.
- Baranov, P.V., Henderson, C.M., Anderson, C.B., Gesteland, R.F., Atkins, J.F., Howard, M.T.** 2005. Programmed ribosomal frameshifting in decoding the SARS-CoV genome. *Virology.*; 332(2):498-510
- Barton, D.J., Sawicki, S.G., Sawicki, D.L.** 1991. Solubilization and immunoprecipitation of alphavirus replication complexes. *J. Virol.* 65:1496-1506.
- Borgherini, G., Poubeau, P., Staikowsky, F., Lory, M., Le Moullec, N., Becquart, J.P., Wengling, C., Michault, A., Paganin, F.** 2007. Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. *Clin. Infect. Dis.* 44 (11), 1401–1407.
- Brighton, SW., Prozesky, OW., de la Harpe AL.** 1983. Chikungunya virus infection. A retrospective study of 107 cases. *S. Afr. Med. J.* ;63(9):313–315.
- Briolant, S., Garin, D., Scaramozzino, N., Jouan, A., Crance, J.M.** 2004. In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon- α and ribavirin combination. *Antivir. Res.* 61: 111-117.
- Burchard, G.D., Löscher, T.** 2007. Chikungunya fever in travelers: clinical presentation and course. *Clin Infect Dis*; 45:e1–4.
- Das, I., Basantray, I., Mamidi, P., Nayak, T.K., Pratheek, B. M., Chattopadhyay, S., jt.** 2014. Heat Shock Protein 90 Positively Regulates Chikungunya Virus Replication by Stabilizing Viral Non-Structural Protein nsP2 during Infection. *PLoS ONE* 9(6): e100531.
- Cheng, R. H., Kuhn, R. J., Olson, N. H., Rossmann, M. G., Choi, H. K., Baker, T. S.** 1995. Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. *Cell.* 80: 621-630
- Fros, JJ., Domeradzka, NE., Baggen, J., Geertsema, C., Flipse, J., Vlak, J. M., Pijlman G. P.,** 2012. Chikungunya virus nsP3 blocks stress granule assembly by recruitment of G3BP into cytoplasmic foci. *J. Virol.* 86:10873–10879.

- Fros, J.J., van der Maten, E., Vlak, J. M., Pijlman, G.P.,** 2013. The C-terminal domain of chikungunya virus nsP2 independently governs viral RNA replication, cytopathicity and inhibition of interferon signaling. *J. Virol.*87:10394–400.
- Fuller, S.D., Berriman, J.S., Butcher, S.J., Gowen, B.E.** 1995. Low pH induces swiveling of the glycoprotein heterodimers in the Semliki forest virus spike complex. *Cell*; 5: 715-725
- Gad, H., Paulous, S., Belarbi, E., Diancourt, L., Drosten, C., Kummerer, B. M., Plate, A., Caro, V., Despres, P.** 2012. The E2-E166K substitution restores Chikungunya virus growth in OAS3 expressing cells by acting on viral entry. *Virol.* ;434:27–37.
- Gorchakov, R., Frolova, E., Frolov, I.** 2005. Inhibition of transcription and translation in Sindbis virus-infected cells. *J. Virol.* 79: 9397-9409.
- J.P. Chretien, K.J. Linthicum.** 2007. Chikungunya in Europe: what's next? *Lan.*: 1805-1806.
- Jose, J., Snyder, J. E., Kuhn, R. J.,** 2009. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.*; 4: 837–856.
- Kummerer, B.M., Grywna, K., Glasker, S., Wieseler, J., Drosten, C.** 2012. Construction of an infectious Chikungunya virus cDNA clone and stable insertion of mCherry reporter genes at two different sites. *J. Gen. Virol.*93:1991–5.
- Lemm, J.A., R umenapf, T., Strauss, E.G., Strauss, J.H., Rice, C.M.** 1994. Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *EMBO J.* 13:2925-34.
- Malet, H., Coutard, B., Jamal, S., Dutartre, H., Papageorgiou, N., Neuvonen, M., Ahola, T., Forrester, N., Gould, E.A., Lafitte, D., Ferron, F., Lescar, J., Gorbalenya, A.E., 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. *J. Virol.* 83 (13): 6534–6545.
- Panning, M., Grywna, K., van Esbroeck, M., Emmerich, P. & Drosten, C.** 2008. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 416–422.
- Paredes, A. M., Brown, D. T., Rothnagel, R., Chiu, W., Schoepp, R. J., Johnston, R. E., and Prasad, B. V. V.** 1993 . Three-dimensional structure of a membrane-containing virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9095-9099
- Pastorino, A. M. B., Peyrefitte, C. N., Almeras, L., Grandadam, M., Rolland, D., Tolou, H. J., Bessaud, M.** 2008. Expression and biochemical characterization of nsP2

- Peiris, J. S., P. H. Amerasinghe, F. P. Amerasinghe, C. H. Calisher, L. P. Perera, C. K. Arunagiri, N. B. Munasingha, and S. H. Karunaratne.** 1994. Viruses isolated from mosquitoes collected in Sri Lanka. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51:154–161.
- Peränen, J., P. Laakkonen, M. Hyvönen, and L. Kääriäinen.** 1995. The alphavirus replicase protein nsP1 is membrane-associated and has affinity to endocytic organelles. *Viol.* 208:610–620.
- Pialoux, G., Gauzere, B.A., Jaureguiberry, S., Strobel, M.** 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect. Dis.* 7: 319-327.
- Powers, A.M.** 2008 Togaviruses: Alphaviruses p. 96-100. In Mahy, B.W.J. and van Regenmortel, M.H.V. (ed.), *Encyclopedia of Virology*, 3rd ed. Vol 5. Elsevier Ltd.
- Powers, A. M., Oberste, S., Brault, A.C., Hesse, R. R., Schmura, S. M., Smith, J., F., Kang, W., Sweeney, W., Weaver, S. C.** 1997. Repeated Emergence of Epidemic/Epizootic Venezuelan Equine Encephalitis from a Single Genotype of Enzootic Subtype ID Virus. *J. Virol.* 71(9): 6697-6705
- Powers, A.M., Brault A.C., Shirako, Y., Strauss, E.G., Kang, W., Strauss, J.H., Weaver, S.C.** 2001. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *J. Virol.* 75: 10118-10131.
- Powers, A.M., Logue, C.H.** 2007. Changing patterns of chikungunya virus: reemergence of a zoonotic arbovirus. *J. Gen. Virol.* 88: 2363-2377.
- Rathore, A. P., Ng, M. L., Vasudevan, S. G.** 2013. Differential unfolded protein response during Chikungunya and Sindbis virus infection: CHIKV nsP4 suppresses eIF2alpha phosphorylation. *Virol. J.*;10:36.
- Rathore, P. S. A., Haystead, T., Das, P.K., Merits, A., Ng, M.L., Vasudevan, S. G.** 2014. Chikungunya virus nsP3 & nsP4 interacts with HSP-90 to promote virus replication: HSP-90 inhibitors reduce CHIKV infection and inflammation *in vivo*. *Antivir. Res.* 103: 7-16.
- Robinson MC.** 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–53. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*; 49:28–32.
- Salonen, A., Vasiljeva, L., Merits, A., Magden, J., Jokitalo, E., Kääriäinen, L.** 2003. Properly folded nonstructural polyprotein directs the semliki forest virus replication complex to the endosomal compartment. *J. Virol.* 77: 1691-702.
- Schuffenecker, I., Itean, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, MC., Lavenir, R., Pardigon, N., Reynes, JM., Pettinelli, F., Biscornet, L., Diancourt, L., Michel, S., Duquerroy, S., Guigon, G., Frenkiel, MP., Bréhin, AC., Cubito, N., Desprès, P., Kunst, F., Rey, FA., Zeller, H., Brisse, S.** 2006. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *Plos. Med.* 3: e263.

- Sergon, K., Njuguna, C., Kalani, R., Ofula, V., Onyango, C., Konongoi, L.S., Bedno, S., Burke, H., Dumilla, A.M., Konde, J., Njenga, M.K., Sang, R., Breiman, R.** 2008. Seroprevalence of chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 78:333–7.
- Shin, G., Yosta, S.A., Millera, M.T., Elrodb, E.J., Grakouib, A., Marcotrigiano, J.** 2012. Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis. *PNAS*. 109; (41): 16534-16539
- Shirako, Y. ja Strauss, J.H.** 1994. Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *J. Virol.*68:1874–1885.
- Shirako, Y., E. G. Strauss, and J. H. Strauss.** 2000. Suppressor mutations that allow Sindbis virus RNA polymerase to function with nonaromatic amino acids at the N-terminus: evidence for interaction between nsP1 and nsP4 in minus-strand RNA synthesis. *Virol.* 276:148–160.
- Shirako, Y., E. G. Strauss, and J. H. Strauss.** 2003. Modification of the 5' terminus of Sindbis virus genomic RNA allows nsP4 RNA polymerases with nonaromatic amino acids at the N terminus to function in RNA replication. *J. Virol.* 77:2301–2309.
- Simon, F., Parola, P., Grandadam, M., Fourcade, S., Oliver, M., Brouqui, P., Hance P., Kraemer, P., Mohamed, A. A., Lamballerie, X., Charrel, Rémi., Tolou, H.** 2007. Chikungunya infection: An emerging rheumatism among travelers returned from Indian Ocean islands. Report of 47 cases. *Medicine (Baltimore)* 86: 123–137.
- Singh, I. ja A. Helenius, A.** 1992. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *J. Virol.* 66:7049–7058.
- Sissoko, D., Malvy, D., Ezzedine, K., Renault, P., Moscetti, F., Ledrans, M., Pierre, V.** 2009. Post-Epidemic Chikungunya Disease on Reunion Island: Course of Rheumatic Manifestations and Associated Factors over a 15-Month Period. *PLoS Negl Trop Dis* 3(3): e389.
- Smith, T.J., Cheng, R.H., Olson, N.H., Peterson, P., Chase, E., Kuhn, R.J., Baker, T.S.** 1995. Putative receptor binding sites on alphaviruses as visualized by cryoelectron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (23), 10648–10652.
- Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L., Devaux, C.** 2009. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virol.* 393: 183-197
- Staples, JE., Breiman, RF., Powers, AM.,** 2009. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clin. Infect. Dis.* 49: 942–948.

- Strauss, J.H., Strauss, E.G.** 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58: 491-562.
- Tamberg, N., Lulla, V., Fragkoudis, R., Lulla, A., Fazakerley, J.K., Merits, A.** 2007. Insertion of EGFP into the replicase gene of Semliki Forest virus results in a novel, genetically stable marker virus. *J. Gen. Virol.* 88: 1225-1230
- Taubitz, W., Cramer, J.P., Kapaun, A., Pfeffer, M., Drosten, C., Dobler, G., Tomar, S., Hardy, R.W., Smith, J.L. And Kuhn, R.J.** 2006. Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsP4 possesses terminal adenylyltransferase activity. *J Virol.* 80(20):9962-9.
- Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E., Higgs, S.** 2007. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 3:, e201.
- Utt, A., Das, P.K., Varjak, M., Lulla, V., Lulla, A., Merits, A.** 2015. Mutations Conferring a Noncytotoxic Phenotype on Chikungunya Virus Replicons Compromise Enzymatic Properties of Nonstructural Protein 2. *J. Virol.* 89, 3145-3162 March
- Varjak, M., Saul, S., Arike, L., Lulla, A., Peil, L., Merits, A.** 2013. Magnetic fractionation and proteomic dissection of cellular organelles occupied by the late replication complexes of semliki forest virus. *J. Virol.* 87, 10295–10312.
- Vasiljeva, L., Merits, A., Auvinen, P. and Kääriäinen, L.** 2000. Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *J. Biol. Chem.* 275:17281-7.
- Vasiljeva, L., Merits, A., Golubtsov, A., Sizemskaja, V., Kaariainen, L., Ahola, T.** 2003. Regulation of the sequential processing of Semliki Forest virus replicase polyprotein. *J. Biol. Chem.*; 278: 41636–41645.
- Vazeille, M., Moutailler, S., Coudrier, D., Rousseaux, C., Khun, H., Huerre, M., Thiria, J., Dehecq J. S., Fontenille, D., Schuffenecker, I., Despres, P., Failloux, A. B., D.** 2004. Two chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS ONE.* 2: e1168.

LIHTLITSENTS

Mina, Taavi Pöder (sünnikuupäev: 09.04.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Chikungunya viiruse mittestruktuurse valgu nsP4 ekspressiooni uurimiseks kasutatavate konstruktide loomine ja analüüs rakukultuuris“, mille juhendajad on Andres Merits ja Sirle Saul,

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

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

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

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

Tartus, 10.08.2015