

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIAINSTITUUT
MIKROBIOLOOGIA JA VIROLOOGIA ÕPPETOOL

Liisi Tarve

**Chikungunya viiruse mittestruktuurse valgu nsP3 ja raku valgu CD2AP
vahelise interaktsiooni uurimine**

Bakalaureusetöö

Juhendaja PhD Andres Merits
Kaasjuhendajad PhD Margus Varjak
MSc Margit Mutso

TARTU 2015

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Alfaviirused	7
1.2 CHIKV	8
1.3 Virion	10
1.4 Genoom	11
1.5 Mittestruktuursed valgud	13
1.5.1 nsP1	13
1.5.2 nsP2.....	14
1.5.3 nsP3.....	15
1.5.4 nsP4.....	17
1.6 Infektsioonitsükl.....	18
1.6.1 Viiruse kinnitumine, sisenemine ja lahtipakkumine.....	18
1.6.2 Genoomi translatsioon, transkriptsioon ja replikatsioon.....	19
1.6.3 Replikatsiooni ja transkriptsiooni regulatsioon.....	20
1.6.4 Viiruse pakkimine ja väljumine rakust.....	21
1.7 Peremeesraku ja viiruse vahelised interaktsioonid.....	22
1.8 Interaktsioonid viiruse nsP3 valgu ja raku valkude vahel.....	23
1.9 CD2AP	25
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	26
2.1 Töö eesmärgid	26
2.2 Materjalid ja meetodid	27
2.3. Tulemused.....	37
2.3.1 CHIKV mittestruktuursete valkude kolokalisatsiooni uurimine CD2AP-ga U2OS rakkudes.....	37
2.3.2 CD2AP seondub CHIKV nsP3 valgu C-terminuses asuvale järjestusele, mis sisaldab proliinirikast SH3 domääni seondavat motiivi.....	41
2.3.3 CD2AP seondub ka SFV nsP3 valgu C-terminaalsele regioonile.....	43
2.4. Arutelu	48
KOKKUVÕTE	51

SUMMARY	52
KASUTATUD KIRJANDUS	53
LISAD	63
LIHTLITSENTS.....	64

Kasutatud lühendid

aa – aminohape (*amino acid*)

C – kapsiidivalk (*capsid protein*)

CHIKV - Chikungunya viirus (*Chikungunya virus*)

CMV – tsütomegaloviirus (*Cytomegalovirus*)

CPV – tsütoplasmaatiline vesiikul (*cytoplasmic vacuole*)

C-terminus – valgu karboksüterminaalne osa

DENV – Dengue viirus (*Dengue virus*)

E – ümbrise ehk kattevalk (*envelope protein*)

EEEV - Ida hobuse entsefaliidi viirus (*Eastern Equine Encephalitis virus*)

EGFP – võimendatud roheliselt helendav valk (*enhanced green fluorescence protein*)

ER – endoplasmaatiline retiikulum (*endoplasmic reticulum*)

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

Luc – *Photinus pyralis* (jaanimardika) lutsiferaas (*firefly luciferase*)

IFN – interferoon

kb – 1000 nukleotiidi jääki (*kilobase*)

MCS – multikloneerimispiirkond

MOI – infektsiooni kordsus (*multiplicity of infection*)

nsP – mittestruktuurne valk (*nonstructural protein*)

N-terminus – valgu aminoterminalne osa

NTR – mittetransleeritav ala (*nontranslated region*)

ONNV - O`nyong-nyong viirus (*O`nyong-nyong virus*)

PBS – fosfaatpuhvriga soolalahus (*phosphate buffered saline*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

RdRp – RNA sõltuv RNA polümeraas (*RNA-dependent RNA polymerase*)

RRV – Ross River viirus (*Ross River virus*)

SG – subgenoomne (*subgenomic*)

SFV – Semliki metsaviirus (*Semliki Forest virus*)

SINV – Sindbis viirus (*Sindbis virus*)

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

VRP – viirus-replikon partikkel (*virus-replicon particle*)

WEEV – Lääne hobuse entsefaliidi viirus (*Western Equine Encephalitis virus*)

Sissejuhatus

Viirus on rakulise ehitusega biloogiline objekt, millel puudub iseseisev aine- ja energiavahetus. Selle tõttu suudavad viirused paljuneda ainult tänu elus rakus parasiteerimisele. Kuigi viiruseid ei peeta elusorganismideks, kannavad nad endas pärilikku materjali ning võtavad osa peremeesorganismis toimuvatest protsessidest. Viirusinfektsioon mõjutab tugevasti peremehe elutegevust põhjustades haigusnähte ning peremeesrakkude surma. Viirusvastaste ravimite ja vaktsiinide väljatöötamiseks on ülimalt oluline õppida tundma viiruste molekulaarbioloogiat, elutsüklit, patogeensust ja toimemehhanisme.

Alfaviirused on positiivse polaarsusega RNA genoomsed viirused, mis kuuluvad *Togaviridae* sugukonda. Perekonda *Alphavirus* kuulub ligi kolmkümmend liiki patogeene, mis omavad laia peremeeste ringi ning on võimelised paljunema erinevates rakutüüpides. Alfaviiruseid on uuritud juba mõnda aega, kõige rohkem neist Semliki Forest viirust (SFV) ja Sindbis viirust (SIN).

Chikungunya palavikku põhjustav Chikungunya viirus (CHIKV) kuulub niinimetatud Vana-Maailma alfaviiruste hulka. Chikungunya palavik on troopiline haigus, mille sümptomid võivad kesta kuid ning isegi aastaid. CHIKV vektorite (*Aedes* perekonna sääsed) levimisala laienemise ja viimase kümne aasta jooksul toimunud CHIKV epideemiate tõttu on hakatud selle viiruse uurimisele üha rohkem tähelepanu pöörama. Paraku on CHIKV molekulaarbioloogia kohta veel suhteliselt vähe teada ning praeguseni pole saadaval ühtegi selle viiruse vastast antiviraalset ravimit ega vaktsiini.

Käesoleva uurimistöö kirjandusel põhinev osa annab lühiülevaate alfaviirustest, nende genoomi ülesehitusest ning infektsioonitsüklist, keskendudes peamiselt CHIKV kohta olemasolevatele andmetele. Käesoleva töö eksperimentaalne osa keskendub viiruse mittestruktuurse valgu nsP3-e ja rakulise valgu CD2AP interaktsioonile, uurides CD2AP sendumise mehhanisme ning selle protsessi rolli viiruse replikatsioonis.

Töö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli tõestada CD2AP sendumine CHIKV nsP3 valgu C-terminuses asuvale proliinirik kale SH3 domääni seondavale järjestusele ning vaadelda nende kahe valgu lokaliseerimist rakus. Lisaks vaadeldi ka SFV nsP3-e C-terminaalse regiooni ja CD2AP seondumist ning nende rakusisest lokaliseerimist.

Käesolev töö on valminud Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis, eksperimentaalne töö on läbi viidud Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis. Antud töö kujutab endast jätku Muriel Aquiliemba ja Margus Varjaku alustatud uurimistööle. Täna oma juhendajaid Margus Varjakut, Margit Mutsot ja Andres Meritsat juhendamise, õpetuste ja abieest.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Alfaviirused

Sugukond *Togaviridae* koosneb kahest perekonnast, *Alphavirus* ja *Rubivirus*. Rubella viirus on ainus perekonna *Rubivirus* esindaja. Alfaviiruste hulka kuulub üle 30 viiruse, millel on positiivse polaarsusega umbes 12 kb suurune RNA genoom (Strauss ja Strauss, 2008). Alfaviirused on geograafiliselt laialdaselt levinud ning nende tõttu haigestub igal aastal sadu tuhandeid inimesi (Mahy ja van Regenmortel, 2008). Kõik alfaviiruste perekonna liikmed on omavahel suguluses ning isegi kõige kaugemalt suguluses olevate viiruste vahel on aminohappelise järjestuse sarnasus umbes 40% (Strauss ja Strauss, 2008).

Viiruste geograafilise leviku järgi jaotatakse „kuivamaa“ alfaviirused (kalade alfaviirused on eraldiseisev grupp) Vana - ja Uue Maailma alfaviirusteks. Vana Maailma alfaviiruste hulka kuuluvad Chikungunya (CHIKV), O`nyong-nyong (ONNV), Ross River (RRV), Sindbis (SINV) ja Semliki Forest viirus (SFV). Need viirused leiduvad Euroopas, Aafrikas, Aasias ja Austraalias ning põhjustavad reeglina palavikku, löövet ja artriiti. Uue Maailma alfaviiruste gruppi kuuluvad Western, Eastern ja Venezuelan Equine Encephalitis viirused (WEEV, EEEV ja VEEV). Need levivad Põhja- ja Lõuna-Ameerikas ning põhjustavad ensefaliiti (Strauss ja Strauss, 1994).

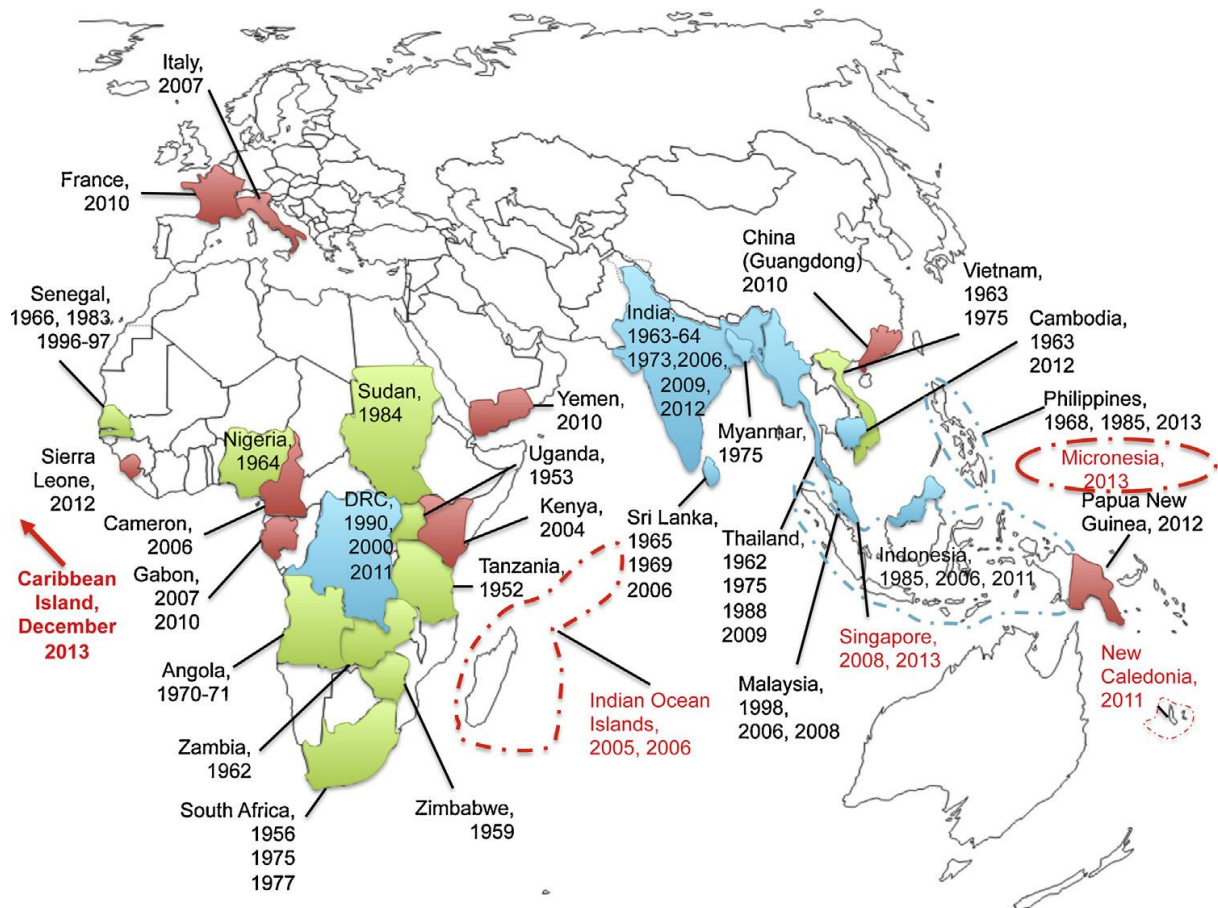
CHIKV ja selle lähedane sugulane ONNV on põhjustanud miljoneid tõsiseid haigusjuhte, mille sümptomiteks on palavik, lööve ja valulik artriit. SINV ja SFV laboratoorsed tüved on seevastu inimesele tavaliselt avirulentsed. Siiski on leitud nende looduslike tüvesid, mis põhjustavad haigusi ka inimestel (Strauss ja Strauss, 1994); muu hulgas on SINV levinud ka Eestis, põhjustades Karjala palavikuks nimetatud haigust (Kurkela *et al.*, 2004). SIN viiruse RR, BF ja OCK tüved põhjustavad inimestel epideemilist polüartriiti, mille sümptomid võivad kesta aastaid.

Alfaviirused kanduvad edasi lüljalgsete (kõige sagedamini sääskede) abil ning nakatavad nii selgroogseid peremehi (imetajaid, kalu, linde) kui ka vektorputukaid. Lüljalgsetes vektorites on infektsioon asümptomaatiline, mis väljendub püsivas eluaegses infektsioonis, millel on peremehe bioloogilistele funktsioonidele minimaalne efekt. Selgroogsetes on infektsioon tavaliselt lühike ning lõppeb viiruse hävitamisega immuunsüsteemi poolt või siis peremehe surmaga (Strauss ja Strauss, 1994; Strauss ja Strauss, 2008).

Selleks, et mõista alfaviiruste epidemioloogiat, tuleb aru saada faktoritest, mis reguleerivad lüljalgsete populatsiooni, ülekandevektoreid, looduslikke peremehi ja nendevahelisi interaktsioone. Paljudel juhtudel pole inimene üldse peamine selgroogne viiruse paljundaja, vaid hoopis juhuslik sihtmärk ning ei oma viiruse levimise seisukohalt mingit tähtsust (Fields ja Knipe, 1990).

1.2 CHIKV

CHIKV on sääskedega leviv viirus (arboviirus), mis põhjustab inimesel akuutset infektsiooni, mille sümptomiteks on palavik, lööve ja tugev liigesevalu (Robinson, 1955). CHIKV isoleeriti esimest korda palavikuga haige verest Tanzanias aastal 1953 (Ross, 1956). Hiljutised laiaulatuslikud CHIKV puhangud India Ookeanil ja Indias kinnitavad Chikungunya järjekordset esilekerkimist. Alates aastast 1953, on CHIKV-d korduvalt isoleeritud mitmetest Aafrika ja Kagu-Aasia riikidest. Aastatel 2004 - 2007 jõudis haiguspuhang uutele geograafilistele aladele – juhtumeid on nüüdseks kirjeldatud Euroopas, Hong-Kongis, Kanadas, Hiina Vabariigis, Sri Lankal ja USAs. Aastal 2007 teatati Chikungunya puhangust Kirde-Itaalias, kus haigestus üle 200 inimese (Joonis 1) (Watson, 2007; Pardigon, 2008). See näitab, et CHIKV pole nüüdseks enam vaid troopiliste maade probleem. Varem ei vaadeldud CHIKV-d kui kõrgelt patogeenset arboviirust, see muutus aga pärast mitme nakatunud inimese surma La Reunioni saarel (Rougeron *et al.*, 2015; Solignat *et al.*, 2009). Epideemia La Reunionil algas 2005.nda aasta detsembris ning 4 kuud hiljem oli CHIKV infektsiooni nakatunud üle 30% La Reunioni saare elanikkonnast. Kuigi informatsiooni hulk CHIKV kohta kasvab üsnagi kiiresti, ollakse veel kaugel mõistmaks täielikult selle replikatsiooni, interaktsioone selgroogse peremehe ja lüljalgse vektori vahel, selle geneetilist evolutsiooni ning strateegiaid, mis tagavad viirusele ökoloogilise edu (Solignat *et al.*, 2009). Kuigi 2010 alguses näitasid CHIKV puhangud vähenemise märke, muutus olukord taas aastal 2013, kui viirus levis kõigepealt Vaikse Ookeani saartel ja jõudis 2013.nda aasta detsembris Kariibi mere saartele. Töö kirjutamise ajaks on CHIKV infektsiooni dignoositud enam kui 40-s Uue Maailma riigis ja territooriumil ning kokku on pooleteise aasta jooksul seal haigestunud enam kui 1,5 miljonit inimest (paljude ekspertide arvates oluliselt enam) ja dokumenteeritud on ligi 200 surmajuhtumit (Van Bortel *et al.*, 2014).



Joonis 1. CHIKV puhangute geograafiline jaotus Vanas Maailmas. Rohelisega on tähistatud riigid, kus toimus viiruspuhang enne aastat 2004. Sinisega riigid, kus toimunud mitmeid haiguspuhanguid ning punasega on tähistatud riigid, kus CHIKV puhangud on toimunud alles hiljuti. (Rougeron *et al.*, 2015)

CHIKV levib kahe erineva ülekandetsükli kaudu. Esimeseks on metsatüüpi (*sylvatic*) ülekandetsükkel, mis toimub metsas elutsevate *Aedes* moskiitode ja metsikute primaatide vahel. Selline tsükkel leiab aset vaid Aafrikas ning sealsed epideemiad on enamasti väiksema ulatusega. Linnatüüpi (*urban*) ülekandetsükli puhul levib viirus aga linnas elavate moskiitode (*Aedes aegypti*) ja inimese vahel ning selline tsükkel on esindatud põhiliselt Aasias ja nüüd siis ka Kesk- ja Lõuna-Ameerikas. Kuna *Ae. aegypti* moskiitod elutsevad inimese vahetus läheduses ja vajavad paljunemiseks mitut toitumiskorda, on epideemiad selle ülekandetsükli puhul tunduvalt suuremad ja globaalsemad (Diallo *et al.*, 1999; Her *et al.*, 2009).

Nagu kõigi arboviiruste puhul, on CHIKV puhangud väga tugevasti sõltuvuses sääskede tihedusest, mis suureneb eriti peale pikki vihmaperioode. Hiljutiste epideemiade põhjuseks on kindlasti ka kaubanduse ja reisimise globaliseerumine (Her *et al.*, 2009). Samuti on tähelepanuväärne CHIKV võime adapteeruda alternatiivsele vektorile, nii levis India Ookeani

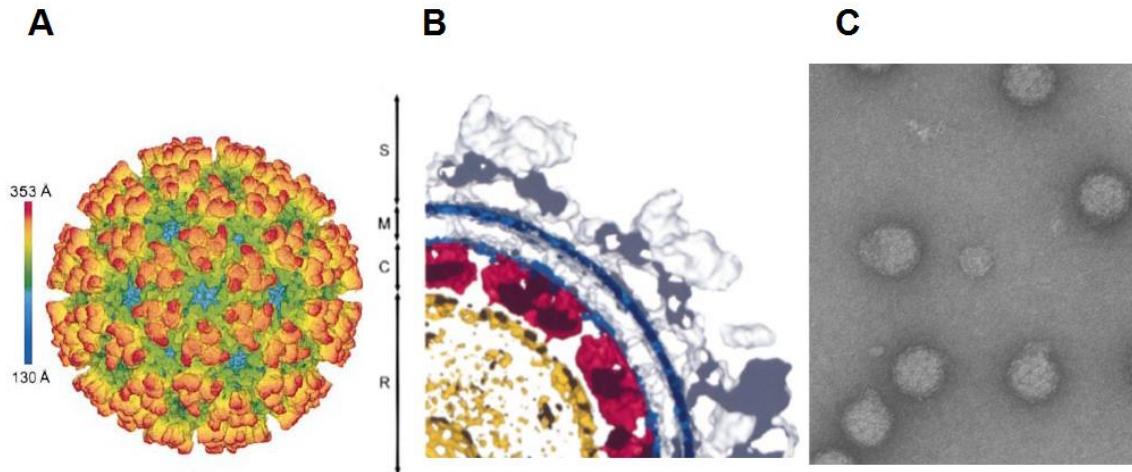
epideemia (sh La Reunioni saarel) põhjustanud viirus aasia tiigersääskede (*Ae. albopictus*) vahendusel. Vektori vahetust võimaldas üks aminohappe jäägi muutus viiruse ümbrise valgus ja seda võimendasid hiljem täiendavad üksteisest sõltumatud mutatsioonid (de Lamballerie *et al.*, 2008; Vazeille *et al.*, 2007).

CHIKV tüüpiline inkubatsiooniperiood inimesel on 2-4 päeva (Lam *et al.*, 2001). Akuutne infektsioon kestab 2-7 päeva ning sümptomiteks on külmavärinad ja kõrge palavik (39-40 kraadi), peavalu (70% patsientidest), iiveldus ja oksendamine (60% patsientidest), püsiv lihas- ja liigesevalu (40% patsientidest) ning kõrgeenenud punaste laikudena avalduv lööve (60% patsientidest) (Solignat *et al.*, 2009). CHIKV poolt põhjustatud sümptomid on kliiniliselt sarnased Dengue viirusele (DENV; sugukond *Flaviviridae*), mis on veelgi laiemalt levinud ja nakatab umbes 80 miljonit inimest aastas. Kliiniliste sümptomite identsuse tõttu esineb ka palju valediagnoosimisi ning arvatavasti jääb hulgaliselt CHIKV juhtumeid seetõttu diagnoosimata (Carey, 1971).

1.3 Virion

CHIKV virioni elektronmikroskoopilised uuringud on näidanud sarnasusi SFV virioniga (Powers ja Logue, 2007). Alfaviiruste (sh. CHIKV) virionid on väikesed 60-70 nm diameetriga ikosaedriline osakesed, millel on T=4 sümmeetria. Üheaheelaline RNA genoom on pakitud nukleokapsiidi (Mahy ja van Regenmortel, 2008). Nukleokapsiid koosneb 240 koopiast 30 kDa suurusest kapsiidivalgust C (Strauss ja Strauss, 2008). Nukleokapsiid on omakorda ümbritsetud peremehe raku plasmamembraanist pärineva lipiidse kaksikkihiga (Joonis 2). Lipiidne kaksikkiht sisaldab 240 koopiat viiruse poolt kodeeritud E1 ja E2 glükoproteiinide heterodimeeri, mis on paigutunud trimeeridena virioni pinnale (Mahy ja van Regenmortel, 2008). E1 ja PE2 (E2 glükoproteiini prekursor) moodustavad heterodimeeri vahetult pärast sünteesi ning mõlemad paigutuvad lipiidse kaksikkihti kui Tüüp I integraalsed membraanvalgud (Strauss ja Strauss, 2008; Simizu *et al.*, 1984). Virioni moodustumisel interageerub PE2 valguga C-terminaalne (tsütoplasmaatiline) osa kapsiidivalguga. 240 glükoproteiini heterodimeeri moodustavad omavahel ja kapsiidivalgudega interakteerudes partikli pinnale ikosaedriline muster. Hiljem virioni moodustumise käigus PE2 lõigatakse E3-ks ja E2-ks. E1 ja E2 jäävad omavahel heterodimeerina seotuks, E3 kas eemaldatakse (SINV) või jääb seotuks virioniga (SFV, CHIKV). Kolm E1-E2 heterodimeeri seonduvad ning moodustavad virioni pinnale trimeerse

piigi (Strauss ja Strauss, 2008). Kokku moodustub virioni pinnale 80 piigikompleksi (Forsell *et al.*, 2000). E2 on virioni pinnal kõige rohkem eksponeeritud ning interakteerub rakuliste retseptoritega (Mahy ja van Regenmortel, 2008).



Joonis 2. Alfaviiruse virioni ehitus. A) Semliki Forest viiruse virion krüo-elektronmikroskoopiliselt. B) SFV virioni sisemine struktuur. **S** - E1:E2 valkude piigid, **M** – kaksikliidkiht, **C** – kapsiidivalk, **R** – RNA. C) Elektronmikroskoopiline foto CHIKV virionidest. (Mancini *et al.*, 2000; Powers ja Logue, 2007)

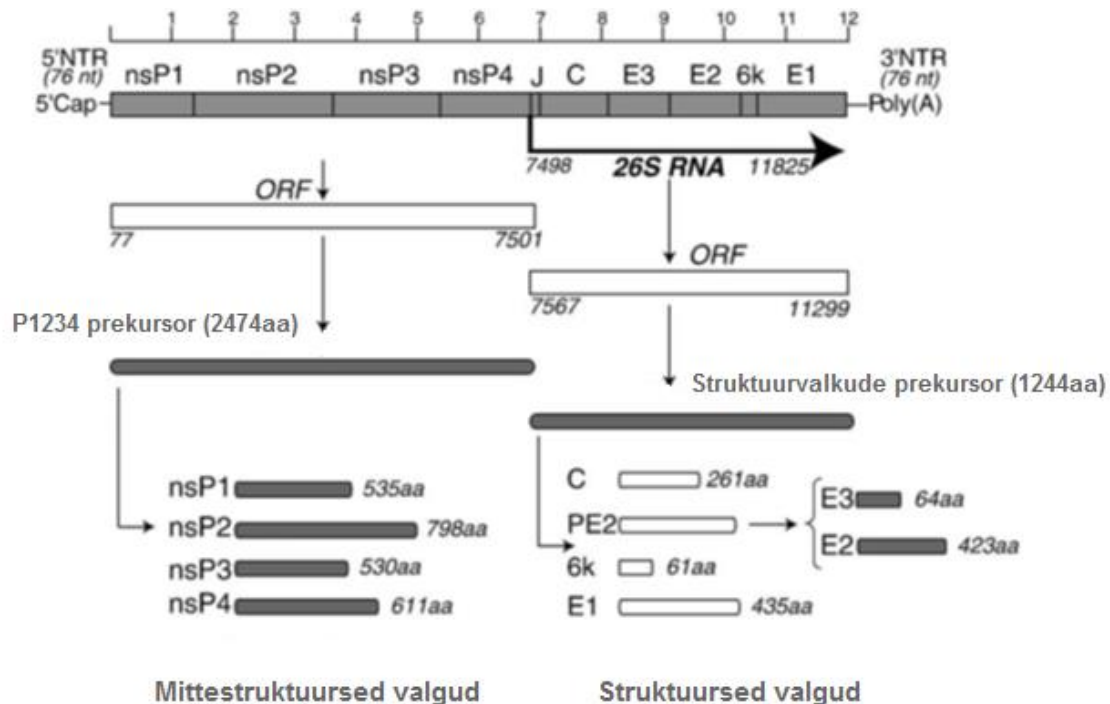
1.4 Genoom

CHIKV genoomiks on 11,8-12 kb pikkune positiivse polaarsusega RNA (Khan *et al.*, 2002). Genoomi 5' otsas on 7-metüülguanosiinist *cap*-struktuur, RNA 3' ots on polüadenüleeritud. Replikatsiooniks vajalikud mittestruktuursed valgud (nsP1-4) on kodeeritud genoomi 5' - terminaalse kahe kolmandiku poolt, 3' - terminaalne kolmandik kodeerib aga struktuurseid valke (C, E3, E2, 6K, E1) (Mahy ja van Regenmortel, 2008). Genoomil on ka 5' ja 3' mittetransleeritavad regioonid (NTR) ning kodeerivate alade vahele jääv sisemine NTR (Mahy ja van Regenmortel, 2008). 5' ja 3' NTR-id sisaldavad RNA replikatsiooniks vajalikke signaale (Strauss ja Strauss, 1994). CHIKV 5'NTR koosneb ca 75 nukleotiidist, 3'NTR on aga varieeruva pikkusega (400 – 650 nukleotiidi pikk) ning sisemise mittetransleeritava ala pikkuseks on tüüpiliselt ca 70 nukleotiidi (Khan *et al.*, 2002).

CHIKV genoom sisaldab kahte avatud lugemisraami. Esimene avatud lugemisraam (*ORF*, *open reading frame*) on >7400 nukleotiidi pikk, ning kodeerib mittestruktuurseid valke (nsP1,

2, 3 ja 4). Mittestruktuursed valgud transleeritakse genoomselt RNA-lt ühe polüproteiinina, mille pikkuseks on 2474 aminohappe jääki (Khan *et al.*, 2002). Enamikel alfaviirustel asub nsP3 valgus lõpus stopp-koodon, mis aga „lekib” ning seetõttu sünteesitakse kaks erinevat mittestruktuurset polüproteiini: P123 ja P1234. CHIKV tüved S27 ja Ross omavad antud positsioonis aminohapet kodeerivat koodonit, kuid näiteks India Ookeani isolaatide puhul esineb samas positsioonis enamasti stopp-koodon (Khan *et al.*, 2002; Scuffenecker *et al.*, 2006; Scholte *et al.*, 2013). Polüproteiinide P123 ja P1234 lõikamisel tekivad nii individuaalsed nsP1, nsP2, nsP3 ja nsP4 valgud kui ka lõikamise intermediaadid, millel on teistsugused ülesanded kui lõppproduktidel (Strauss ja Strauss, 1994).

CHIKV subgenoomse (26S) RNA pikkuseks on ca 4400 nukleotiidi. Struktuursed valgud transleeritakse teiselt ORF-ilt, mis on >3700 nukleotiidi pikk. Vastav polüproteiin on ligikaudu 1250 aminohappe jäägi pikkune; selle protsessimisel tekivad kapsiidivalk C, glükoproteiinid E1 ja E2 ning kaks väikest polüpeptiidi E3 ja 6K (Khan *et al.*, 2002; Strauss ja Strauss, 1994). 26S RNA omab samuti cap-struktuuri ja on polüadenüleeritud (Strauss ja Strauss, 1994).



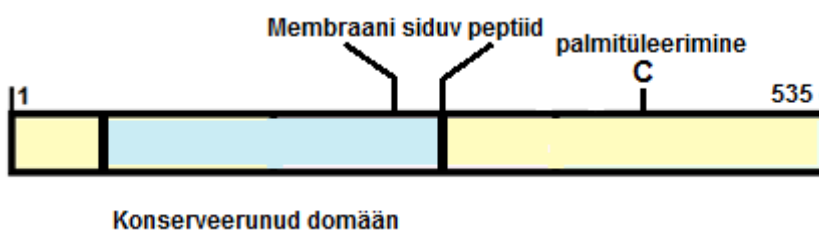
Joonis 3. CHIKV genoomi (isolaat LR 2006-OPY1, ECSA (East/Central/South African) genotüüp) organisatsioon ja geeniproduktid. Sarnaselt eukarüootsele mRNA-le omab CHIKV genoom 5' cap-struktuuri ja 3' polü(A) saba. Genoomi 5' and 3' otstes asuvad

mittetransleeritavad alad (NTR). Genoomis asub ka sisemine NTR (J). Subgenoomne (+) mRNA (26S RNA) on transkribeeritud (-) RNA intermediaadilt ning sellelt sünteesitakse struktuursed valgud. Iseisivad mittestruktuursed (nsP1-nsP4) ja struktuursed (C, E1, E2, E3, 6K) valgud tekivad vastavate polüproteiinide proteolüütilisel lõikamisel. (Solignat *et al.*, 2009).

1.5 Mittestruktuursed valgud

1.5.1 nsP1

N-terminaalne nsP1 (535 aa jääki, 64 kDa) on multifunktsionaalne valk, millel on metüültransferaasne ja guanüülültransferaasne aktiivsus ning mis osaleb viraalsele (+) RNA-le cap-struktuuri lisamises (Laakkonen *et al.*, 1994; Ahola ja Kääriäinen, 1995; Ahola *et al.*, 1997). Lisaks on nsP1 vastutav replikatsioonikomplekside seondamise eest raku membraanidele (Salonen *et al.*, 2003). Membraanile seondumine aktiveerib nsP1 valgu ensümaatilised aktiivsused (Ahola *et al.*, 1999). Plasmamembraanile seondumine toimub algselt nsP1 aminohapejääkide 245-264 vahendusel (Joonis 4.). See 22 aminohappe jääki pikk peptiid moodustab amfipaatilise alfa-heeliksi, mille üks pool on hüdrofoobne ja teine hüdrofiilne, seetõttu paikneb selline peptiid põhiliselt rakumembraani sees (Ahola *et al.*, 1999; Spuul *et al.*, 2007). Lisaks võimendab membraanidele seostumist veel nsP1 valgu tsüsteiini jääkide post-translatsiooniline palmitüleerimine (Laakkonen *et al.*, 1996; Ahola *et al.*, 2000). Palmitüleerimine muudab nsP1 interaktsioonid membraanidega veelgi tugevamaks, sarnanedes integraalsetele membraanvalkudele (Laakkonen *et al.*, 1996). Samuti vastutab nsP1 filopoodi-sarnaste struktuuride indutseerimise eest raku pinnale, mis on alfaviirusega nakatunud rakkude üks tunnusjoontest, ning omab olulist rolli negatiivse polaarsusega RNA sünteesi initsiatsioonil ja elongatsioonil (Laakkonen *et al.*, 1998; Zusinaite *et al.*, 2007; Strauss ja Strauss, 1994).



Joonis 4. nsP1 valgu ehituse skeem. Joonisel on näidatud konserveerunud domään, millel on metüültransferaasne ja guanüülültransferaasne aktiivsus, membraani siduv peptiid ning palmitüleeritud tsüsteiinijääkide piirkond.

1.5.2 nsP2

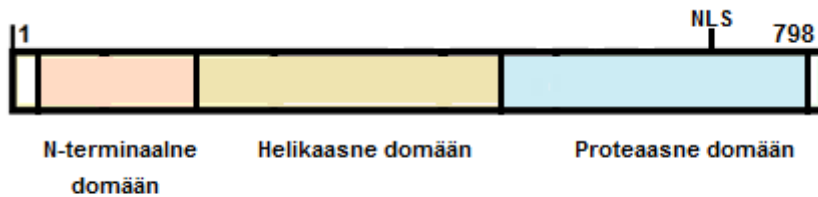
nsP2 (798 aa jääki, 86 kDa) on suurim ja multifunktsionaalne mittestruktuurne valk. nsP2 valgul on hulgaliselt ensümaatilisi aktiivsusi, mis on väga olulised viiruse infektsioonis ja viraalse RNA sünteesil. Täispikk nsP2 on RNA helikaas (Das *et al.*, 2014). nsP2 N-terminaalne poolsisaldab nukleosiid-trifosfataasid ja RNA trifosfataasid aktiivsust (Joonis 5.) (Rikkonen *et al.*, 1994; Gomez *et al.*, 1999; Vasiljeva *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002). Sarnaselt teistele alfaviirustele, omab CHIKV nsP2 suurt positiivset laengut (+ 21) (Khan *et al.*, 2002).

RNA helikaasne aktiivsus on arvatavasti oluline RNA duplekside või sekundaarstruktuuride lahtiharutamiseks replikatsiooni ajal (Strauss ja Strauss, 1994) ja võib olla seotud nsP2 valgu võimega inhibeerida raku transkriptsiooni (Utt *et al.*, 2015). RNA trifosfataasne aktiivsus on vajalik cappimis-reaktsioonides, et eemaldada viraalselt positiivse polaarsusega RNAlt 5' γ -fosfaat enne, kui nsP1 valgu guanüülültransferaasne aktiivsus jõuab RNAle lisada m⁷GMP struktuuri (Karpe *et al.*, 2011).

nsP2 valgu C-terminaalne osa kujutab endast proteaasi, mille ülesandeks on ns-polüproteiini protsessimine (Joonis 5.) (Hardy ja Strauss, 1989). Mutatsioonid, mis kaotavad ära proteolüütilise aktiivsuse, on viirusele letaalsed, sest proteaas osaleb nii replikatsioonikomplekside moodustamises kui ka replikatsioonitsükli reguleerimisel (Strauss *et al.*, 1992). Lisaks sisaldab nsP2 C-terminaalne regioon metüültransferaasid domääni, mis pole küll ensümaatiliselt aktiivne, kuid mängib siiski negatiivse ahela sünteesis ja rakuliste tsütopaatiliste efektide tekkimises olulist rolli (Mayuri *et al.*, 2008). Samuti on nsP2 spetsiaalselt vajalik 26S subgenoomse mRNA sünteesiks, arvatavasti just transkriptsiooni initsiatsiooniks (Strauss ja Strauss, 1994).

Uuringud on näidanud, et nakatunud rakus asub umbes 50% nsP2 valgust tuumas (Peränen *et al.*, 1990). SFV nsP2 valgu C-terminaalses domäänis asub arvatav tuuma lokaliseerimise signaal (Joonis 5.) ning nsP2 transport tuuma leiab aset juba varajases infektsioonis (Rikkonen *et al.*, 1992). CHIKV nsP2 valgu vastav regioon aga funktsionaalset tuumalokaliseerimise signaali ei sisalda, samuti pole funktsionaalsed SINV nsP2 valgu

tuumalokalisatsiooni signaalidele sarnanevad järjestused (Utt *et al.*, 2015; Frolov *et al.*, 2009). Sellele vaatamata transporditakse ka SINV ja CHIKV puhul osa nsP2 valgust raku tuuma. See on viirusele väga oluline, sest on näidatud, et Vana Maailma alfaviiruste (SFV, SINV, CHIKV) korral inhibeerib tuumas olev nsP2 peremeesraku mRNA transkriptsiooni põhjustades RNA polümeraas II katalüütilise subühiku degradatsiooni (Akhrymuk *et al.*, 2012).



Joonis 5. nsP2 valgus ehituse skeem. nsP2 valgus on eristatavad järgmised funktsionaalsed domäänid: N-terminaalne domään, helikaasne domään ja proteasne domään. Märgitud on ka SFV nsP2 C-terminuses asuv oletatav NLS, CHIKV (ja SINV) nsP2 valkudes see puudub.

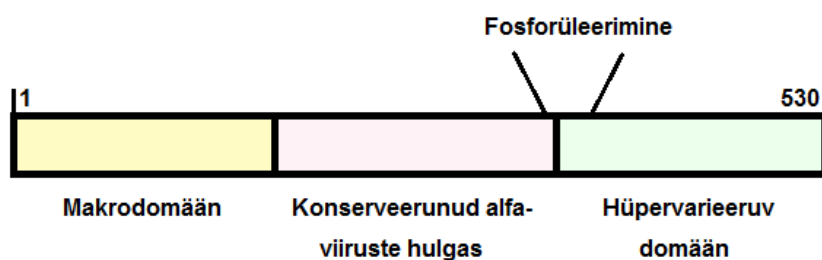
1.5.3 nsP3

nsP3 (530 aa jääki, 61 kDa) fosfoproteiini rolli alfaviiruse on tunduvalt vähem mõistetud kui teiste nsP-de omi. Kuigi nsP3 on seotud transkriptsiooniprotsessi ja varajase infektsiooniga, ei ole sellele omastatud veel ühtegi kindlat ensümaatilist aktiivsust, mida saaks seostada viiruse infektsiooniga (Wang *et al.*, 1994; Malet *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2002). nsP3 koosneb kolmest domäänist (Joonis 6.). nsP3 aminoterminuse esimesed 160 aminohapet moodustavad konserveerunud makrodomääni, mida kutsutakse ka X-domääniks. See on konserveerunud alfaviiruste, coronaviiruste, Hepatiit E ja Rubella viiruse hulgas (Koonin ja Dolja, 1993; Pehrson ja Fuji, 1998). Teine domään on konserveerunud ainult alfaviiruste seas ja seondab tsink-ioone (Shin *et al.*, 2012) ning kolmas C-terminaalne domään on hüpervarieeruv nii järjestuselt kui pikkuselt ning ei oma ilmselt fikseeritud ruumilist struktuuri. See regioon on ka tugeva negatiivse laenguga ja lisaks sellele sisaldab see ka tugevalt fosforüleeritud seriini ja treoniini jääke. Kuigi fosforüleerimise rolli pole veel väga täpselt kirjeldatud, on teada, et fosforüleeritud jääkide deleteerimine vähendab viiruse RNA sünteesi (Strauss ja Strauss, 1994; Peränen *et al.*, 1988; Vihinen *et al.*, 2000).

Hüpervarieeruv domään sisaldab lisaks happelistele aminohappe jääkidele veel ka rohkesti seriini ja treoniini (fosforüleerimise saidid) jääke ning hulgaliselt lühikesi korduvjärjestusi. Tõenäoliselt on tegemist lühikeste lineaarsete interaktsioonimotiividega, mis seonduvad mitmete rakuliste valkudega. Nii on näidatud, et raku valk amfifüsiin interakteerub nsP3 valgu proliinirikka elemendiga (Neuvonen *et al.*, 2011; Varjak *et al.*, 2010) ja raku valgud G3BP1 ja G3BP2 interageeruvad CHIKV ja SFV (kuid mitte VEEV) nsP3 C-terminuses paiknevate korduvmotiividega (Panas *et al.*, 2012). Lisaks on leitud, et SINV nsP3 seondab 14-3-3 valke ja mitmed hnRNP valke (Cristea *et al.*, 2006; Frolova *et al.*, 2006).

nsP3 on vajalik replikatsioonikomplekside korrektseks moodustumiseks ja lokaliseerimiseks. Uuringud on näidanud, et nsP3 vahendab SFV replikatsioonikomplekside liikumist plasmamembraanilt rakusisestele vesiikulitele (Salonen *et al.*, 2003). Peale replikatsioonikomplekside leidub nsP3 valku ka veel tsütoplasmas, kus see moodustab erineva suuruse ja ebaregulaarse kujuga agregate, osa nsP3-st lokaliseerub ka tuumaümbrisel (Salonen *et al.*, 2003; Cristea *et al.*, 2006; Gorchakov *et al.*, 2008).

Ainus ensümaatiline aktiivsus, mida on nsP3 puhul täheldatud, on ADP-riboos 1^o-fosfaat fosfataasne aktiivsus, mis asub nsP3 valgu makrodomäänis; samas on see aktiivsus väga nõrk (paljude alfaviiruste puhul detekteerimatu) ja ei ole aru saada, millist rolli (kui üldse) see viiruse infektsioonis omab. Alfaviiruste makrodomään seondab polü(ADP-riboosi) (PAR), RNA-d ja mõningatel juhtudel ka ADP-riboosi (Malet *et al.*, 2009; Neuvonen ja Ahola, 2009).



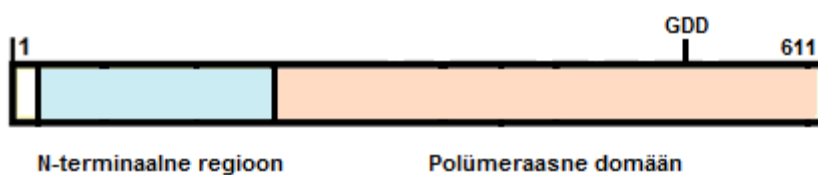
Joonis 6. nsP3 valgu ehituse skeem. nsP3 valk jaguneb kolmeks domääniks. Esimene on N-terminaalne conserveerunud makrodomään, teine, tsink ioone seondav domään, on conserveerunud ainult alfaviiruste hulgas ning viimase kolmandiku moodustab hüpervarieeruv domään. Ära on märgitud ka peamiste fosforüleerimiskohade paiknemine.

1.5.4 nsP4

nsP4 (611 aa, 68 kDa) on alfaviiruste RNA-sõltuv RNA polümeraas (RdRp), mis osaleb matriitsahela äratundmisel ja RNA elongatsioonil. nsP4 valgu C-terminus on homoloogne teiste viiruste RNA polümeraasidega ning sisaldab konserveerunud GDD motiivi (Gly-Asp-Asp), mis on esindatud paljudes viiruslikes RNA-sõltuvates RNA polümeraasides (Kamer ja Argos, 1984; Kahn *et al.*, 2002). nsP4 valgu esimesed 100 N-terminaalset aminohappe jääki ei oma teiste viiruste ja rakkude teadaolevate järjestustega mingit homoloogiat ning on konserveerunud ainult alfaviiruste seas (Joonis 7.) (Rupp *et al.*, 2009).

Nakatunud rakus on nsP4 tase võrreldes teiste ns valkudega oluliselt madalam. Selle esimeseks põhjuseks on asjaolu, et osade CHIKV tüvede puhul (sama kehtib ka enamuse teiste alfaviiruste puhul) asub nsP3 valku kodeeriva ala lõpu lähedal stop-koodon. Seepärast sünteesitakse P1234 vaid juhul, kui toimub stop-koodoni ülelugemine (Strauss ja Strauss, 1994; Schuffenecker *et al.*, 2006). Teiseks põhjuseks on see, et nsP4 valgu esimene aminohappe jääk on konserveerunud Tyr-jääk. N-lõpu reegli kohaselt on türosiin destabiliseeriv aminohape ning sellest lähtuvalt degradeeritakse vaba nsP4 kiiresti proteosoomide poolt. Kui nsP4 paigutatakse replikaasikomplekside koostisse, on ta sellise degradeerimise eest kaitstud (Groot *et al.*, 1991). N-terminuses asuv türosiini jääk on vajalik nsP4 valgu polümeraasiks aktiivsuseks, selle asendamine mittearomaatse jäägiga surub RNA replikatsiooni maha ja põhjustab adaptatiivsete mutatsioonide tekkimist (Shirako ja Strauss, 1998).

Uuringud on näidanud, et nsP4 N-terminaalne regioon võib mängida rolli (-) ahela sünteesil osaledes genoomse ahela 3`otsas asuva promootori äratundmisel (Rubach *et al.*, 2009). nsP4 sisaldab subgenoomse ja genoomse promootori äratundmiseks vajalikke saite. Individuaalne nsP4 tunneb ära vaid genoomse promootori ning ei suuda seonduda subgenoomsele promootorile. RdRp seondumiseks SG promootorile on vajalik kõigi nelja ns valgu kohalolu (Li ja Stollar, 2004; Li ja Stollar, 2007).

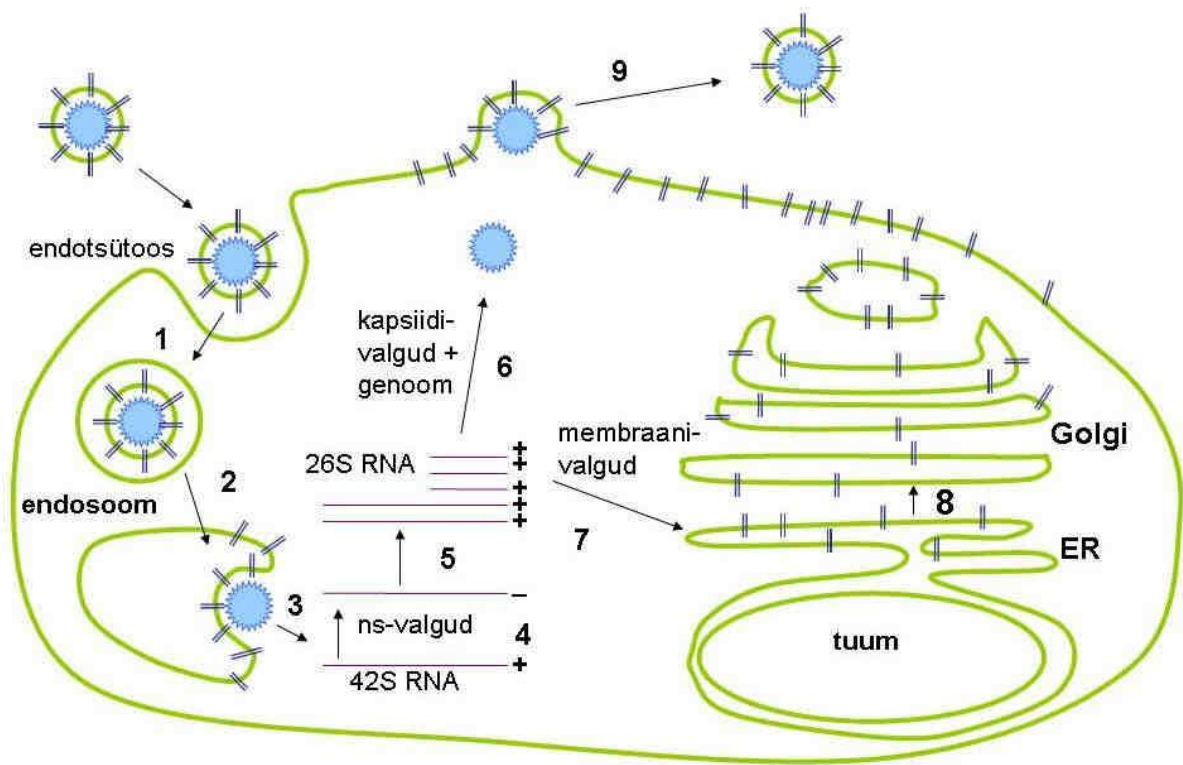


Joonis 7. nsP4 valgu ehituse skeem. Joonisel on märgitud N-terminaalne ainult alfaviiruste seas konserveerunud domään, polümeraasne domään ja konserveerunud polümeraasi motiiv GDD.

1.6 Infektsioonitsükkel

1.6.1 Viiruse kinnitumine, sisenemine ja lahtipakkumine

Alfaviiruse infektsioon algab raku pinnal asuvale retseptorile kinnitumisega. Selle eest vastutab E2 valk – viiruse antireseptor (Tucker ja Griffin, 1991; Salminen *et al.*, 1992). CHIKV retseptorid on praeguseks veel teadmata. On vägagi tõenäoline, et CHIKV kasutab raku sisenemiseks mitmeid alternatiivseid retseptoreid, sest viirus suudab nakatada paljusid eri rakutüüpe (epiteliaalseid ja endoteliaalseid rakke, primaarseid fibroblaste, makrofaage) (Sourisseau *et al.*, 2007). Alfaviirused sisenevad raku klatriin-sõltuva endotsütootilise raja abil, mille käigus tekivad klatriiniga kaetud vesiikulid (Helenius *et al.*, 1980; DeTulleo ja Kirchhausen, 1998). pH langus endosoomis viib E1/E2 heterodimeerides konformatsiooniliste muutusteni, mille tulemusena moodustuvad E1 homotrimeerid. E1 valgu fusogeenne domään interakteerub rakumembraaniga ning peremeesraku endosomaalne membraan ja virioni ümbris fuseeruvad, mille tulemusena vabaneb nukleokapsiid tsütoplasmasse (Mahy ja van Regenmortel, 2008). Kapsiidivalgul on afiinsus ribosoomide suhtes. Nukleokapsiidi sisenemisel tsütoplasmasse seonduvad ribosoomid kapsiidivalgu ning aitavad nukleokapsiidi lahti pakkida. Genoomne RNA vabaneb tsütoplasmasse (Strauss ja Strauss, 2008).



Joonis 8. Alfaviiruste replikatsioonitsükkel. 1 – retseptor-vahendatud rakku sisenemine ja klatriin-sõltuv endotsütoos; 2 – endosomaalse membraani ja virioni ümbrise fuseerumine ning nukleokapsiidi vabanemine; 3 – genoomse RNA vabanemine; 4 – mittestruktuursete valkude ja (-) ahela süntees; 5 – subgenoomse ja genoomse RNA süntees; 6 – nukleokapsiidi moodustumine; 7 – membraanivalkude protsessimine endoplasmaatilises retiikulumis; 8 – glükoproteiinide liikumine läbi Golgi kompleksi rakumembraanile; 9 – virioni vabanemine (Tamm 2007, magistritöö)

1.6.2 Genoomi translatsioon, transkriptsioon ja replikatsioon

Viiruse genoomse RNA, mis omab cap-struktuuri ja polü(A) saba, vabanemisele tsütoplasmas järgneb selle translatsioon mittestruktuurseks polüproteiiniks P1234, mis lõigatakse viraalse proteaasi poolt neljaks polüpeptiidiks (Strauss ja Strauss, 2008). Nukleokapsiidist vabanev genoomne RNA käitub nagu tavaline rakuline mRNA (Fields ja Knipe, 1990). Kui ns valgud on positiivse polaarsusega genoomselt RNA-lt transleeritud, sünteesitakse täispikk (-) RNA, mis on komplementaarne genoomsele RNAle ja moodustab sellega dupleksi. Tekivad kaheaahelised (ds) RNA replikatiivsed intermediaadid (Mahy ja van Regenmortel, 2008).

Peale negatiivse ahela sünteesi toimuvad RdRp kompleksides muudatused, mis lülitavad selle ümber (+) RNA-de sünteesile. Selline kompleks on stabiilne ja (+) RNAde süntees jääb kestma kogu infektsioonilise replikatsioonitsükli jooksul. Negatiivse polaarsusega RNA-de süntees toimub vaid infektsiooni alguses ja lakkab hiljem täielikult; seda põhjustavad nsP2 proteaasi kogunemine ja mRNAde (kaasa arvatud genoomse RNA) translatsiooni mahasurumine viiruse poolt. Negatiivselt ahelalt sünteesitakse kahte sorti (+) RNA-d, mis mõlemad on poliadenüleeritud ja omavad cap-struktuuri. Nendeks on täispikk genoom, mis pakitakse virionidesse, ja subgenoomne (26S) RNA, mis on vastavuses genoomi 3'otsa ühe kolmandikuga ning mis kodeerib struktureid valke (Mahy ja van Regenmortel, 2008). Viimase sünteesiks kasutab replikaas subgenoomset promootorit, mis suures osas kattub nsP4 valguga C-terminaalset otsa kodeeriva järjestusega. Selle promootori aktiivsust suurendab 100 nukleotiidi ülevalpool asuv (*upstream*) enhanserjärjestus (Strauss ja Strauss, 2008).

Alfaviiruste RNA replikatsioon on seotud modifitseeritud intratsellulaarsete membraanidega ning leiab aset membraani sissesopistumisel tekkinud struktuurides (sfäärulites), kus asuvad ns valgud ja vast sünteesitud RNA (Froshauer *et al.*, 1988; Kujala *et al.*, 2001; Mahy ja van Regenmortel, 2008). Sfäärulid moodustuvad esmalt raku plasmamembraanile. Hiljem, infektsiooni jätkudes, sisenevad need raku tsütoplasmasse. Sõltuvalt viirusest võivad need infektsiooni lõpus asuda suuritel happelistel tsütoplasmaatilistel vesiikulitel, mida kutsutakse tüüp I tsütoplasmaatilisteks vakuoolideks (*type I cytoplasmic vacuoles*, CPV-I); sellise viiruse näiteks on SFV (Kujala *et al.*, 2001; Spuul *et al.*, 2010). CHIKV ja SINV replikatsioonikompleksid jäävad aga enamasti paiknema raku plasmamembraani lähedusse. Nende viiruste CPV-d ilmuvad 6-8 tunni jooksul pärast infektsiooni (Chen *et al.*, 2013) ja on oluliselt väiksemad kui SFV-l. Lisaks viiruse valkudele on sfäärule moodustavate replikatsioonikompleksidega tihedalt seotud ka mitmed rakulised valgud (Frolova *et al.*, 2010).

1.6.3 Replikatsiooni ja transkriptsiooni regulatsioon

Alfaviiruse genoomi replikatsioon ja transkriptsioon on tihedalt seotud ns valkude valmimisega, mis toimub P1234 liitvalgu protsessimise teel (Mahy ja van Regenmortel, 2008). Translatsiooni ajal või vahetult peale seda lõikab P1234 end *in cis* ning tekivad P123 liitvalk ja nsP4. P123 ja nsP4 moodustavad koos rakuliste valkudega RNA süntetaasi, mis

sünteesib genoomselt RNA ahelalt komplementaarse (-) RNA. P123 lõikamine nsP1 ja nsP2 valguks käivitab lõikamise nsP2 ja nsP3 vahelt; need sündmused viivad replikaasi, mis suudab sünteesida ainult (+) RNAd, moodustumiseni (Strauss ja Strauss, 2008).

Infektsiooni alguses on nii positiivse kui ka negatiivse polaarsusega RNAd süntees eksponentsiaalse kasvuga, tõenäoliselt tähendab see seda, et igale sünteesitud positiivsele genoomile sünteesitakse vastav negatiivne ahel. Selle tulemusena suureneb kaheaahelaliste RNA intermediaatide hulk, ulatudes (sõltuvalt raku suurusest) 5000-20000 koopiani raku kohta. Umbes 4 tundi pärast nakatumist lakkab negatiivse ahela süntees ning positiivse ahela süntees jätkub püsival kiirusel kogu infektsioonitsükli vältel (Strauss ja Strauss, 1994). Selline kontrollmehhanism muudab infektsiooniprotsessi efektiivsemaks, sest genoomset RNA-d (pakitakse uutesse virionidesse) ning subgenoomset RNA-d (sellelt transleeritakse virionide kokkupanekuks vajalikud struktuurvalgud) on vaja palju suuremates hulkades kui negatiivseid RNA ahelaid (Strauss ja Strauss, 2008).

1.6.4 Viiruse pakkimine ja väljumine rakust

Virioni ümbrise glükoproteiinid liiguvad plasmamembraanile sama rada pidi, mida rakk tavaliselt kasutab pinnaretseptorite ja sekretoorsete valkude transportimiseks (Fields ja Knipe, 1990). Nukleokapsiidi pakitakse ainult genoomne RNA (Strauss ja Strauss, 1994); see tuleneb sellest, et subgenoomses RNAs puudub pakkimiseks vajalik signaal. Esmalt tunneb kapsiidivalg C ära genoomses RNAs oleva pakkimissignaali, millelele järgneb kapsiidivalgude vahelised interaktsioonid ning nukleokapsiidi moodustumine (Linger *et al.*, 2004). Virioni küpsemine toimub, kui kokkupakitud nukleokapsiid, mis sisaldab genoomset RNA-d ja 240 C-valgu koopiat, liigub rakumenbraanile. Pungumise käigus toimuvad kapsiidivalgu ja membraanvalkude vahelised interaktsioonid. Enamikes rakutüüpides (erandiks on arvatavasti neuronid ja vektroputuka rakud) pungub viirus raku plasmamembraanilt ja omandab lipiidse ümbrise koos 240 koopia E1-E2 heterodimeeriga (Strauss ja Strauss, 2008).

1.7 Peremeesraku ja viiruse vahelised interaktsioonid

CHIKV infektsiooni edukus sõltub suuresti viiruse võimest pöörata raku masinavärk enda kasuks tööle. Infektsiooni vältel peab viirus manipuleerima molekulaarsel tasandil rakuliste protsessidega, et tagada enda säilimine, replikatsioon ja edasikandumine. See toimub läbi osalt valk-valk interaktsioonide (Rana *et al.*, 2013). Alfaviirused inhibeerivad rakulise RNA ja valkude sünteesi. On tõestatud et transkriptsiooniline ja translatsiooniline inhibeerimine on kaks eraldiseisvat protsessi (Gorchakov *et al.*, 2005). Rakuliste makromolekulide sünteesi mahasurumine võimaldab suunata kõik ressursid viiruslike komponentide sünteesiks. Samuti vähendab see antiviraalsete valkude, kaasaarvatud tüüp I interferoonide, produktsiooni (Frolova *et al.*, 2002). Rakulise antiviraalse vastuse mahasurumises mängib suurt rolli nsP2. On kindlaks tehtud, et infektsiooni varajases etapis põhjustab nsP2 RNA polümeraas II kompleksi RpbI katalüütilise subühiku degradatsiooni. RpbI on nsP2 juuresolekul ubikvineeritud ning selle tõttu lagundatakse see kiiresti. Tulemusena lakkab raku mRNA transkriptsioon (Akhrymuk *et al.*, 2012). Translatsioonilises inhibitsioonis mängib osaliselt rolli raku enda kaisemehhanism. Arvatakse, et viraalse dsRNA tunneb ära raku PKR (*protein kinase R*), mille tulemusena toimub eIF2 α fosforülatsioon ning rakulise translatsiooni initsiatsiooni inhibeerumine. Samas ei ole PKR kaudu kulgev translatsiooni inhibeerimine mitte ainuke ja isegi mitte peamine raku translatsiooni mahasurumise rada (Gorchakov *et al.*, 2004; Barry *et al.*, 2009). Samuti on teada, et alfaviiruste võime raku translatsiooni inhibeerida on erinev: SFV ja SINV infektsioonis toimub see varajases, CHIKV infektsiooni aga oluliselt hilisemas staadiumis. Erinevusi põhjustab arvatavasti CHIKV nsP4 toime (Rathore *et al.*, 2013).

CHIKV indutseerib nakatunud rakus apoptoosi, mida seostatakse viiruse patogeensusega. Nimelt sisaldavad apoptootilised kehakesed CHIKV partikleid, mille abil saab viirus kergesti nakatada naaberrakke (Krejlich-Trotot *et al.*, 2011a). Lisaks indutseerib CHIKV infektsioon ka autofagotsütoosi. See on kaasasündinud immuunsüsteemi osa, mis on seotud patogeenide elimineerimisega organismist (Kuballa *et al.*, 2012). CHIKV on aga suutnud selle protsessi enda kasuks tööle panna, et replikatsiooni veelgi efektiivsemaks muuta (Jackson *et al.*, 2005). Uuringud näitavad, et autofagotsütoosi inhibeerimisel väheneb ka CHIKV replikatsioon (Krejlich-Trotot *et al.*, 2011b). SFV puhul puhul aga ei avaldanud autofagotsütoosi inhibeerimine mõju ei viraalsele replikatsioonile ega replikatsioonikomplekside moodustumisele (Eng *et al.*, 2012). CHIKV puhul on näidatud, et autofagotsütoosi pro- või antiviraalne efekt sõltub ka rakutüübist. Nii on leitud, et CHIKV nsP2 seondab inimese (kuid

mitte hiire) autofaagotsütoosi retseptorit NDP52 ja et just see seondamine soodustab viiruse paljunemist inimese rakkudes (Judith *et al.*, 2013).

1.8 Interaktsioonid viiruse nsP3 valgu ja raku valkude vahel

Viraalsed infektsioonid põhjustavad nakatunud rakus ulatuslikke ümberkorraldusi (Cristea *et al.*, 2006). Alfaviirused vajavad mitmeid raku poolt sünteesitud komponente (valke, lipiide, energiat jne.) näiteks genoomi replikatsiooniks, geeniekspressiooniks ning uute virionide moodustamiseks (Varjak, 2013). Lisaks ensümaatilistele aktiivsustele, mis osalevad otseselt viiruse genoomi paljundamises, interakteervuvad alfaviiruste mittestruktuursed valgud ka mitmete raku komponentidega. Viraalsete ns valkude ja rakuliste faktorite interaktsioonide uurimine on oluline mõistmaks, kuidas viirus saavutab kontrolli raku protsesside üle ning kuidas suudab see blokeerida antiviraalse vastuse (Bourai *et al.*, 2012).

Immunosadestamise ja mass-spektromeetria abil on tuvastatud mitmeid nsP3-ga seonduvaid rakulisi valke. Praeguseks pole aga paljude nende interaktsioonide olulisust ja vastavate valkude seondumiskohti põhjalikult veel kirjeldatud (Cristea *et al.*, 2006; Gorchakov *et al.*, 2008). Lisaks sellele, et nsP3-e leidub replikatsioonikompleksides ja plasmamembraanil, on suur osa nsP3-st väljaspool replikatsioonikompleksi (Salonen *et al.*, 2003). Seega võib oletada, et replikatsioonikompleksides ja tsütoplasmaatilistes graanulites on nsP3 seondunud erinevate rakuliste valkudega (Gorchakov *et al.*, 2008). Samuti on vähe informatsiooni, millised viiruse järjestusmotiivid on interaktsioonideks olulised. Erandiks on G3BP1/G3BP2 valkude seondumine, mille puhul on täpselt teada seondumise sait (FGDF motiivid nsP3 C-terminuse lähedal), seondumise mehhanism ja ka mitmed selle seondumise tagajärjed rakule ja viirusele (Panas *et al.*, 2012, 2014, 2015; Scholte *et al.*, 2015).

Kuigi nsP3 karboksüterminaalne osa on alfaviiruste seas üsna halvasti konserveerunud, on üheks sarnaseks omaduseks proliini jääke sisaldavate regioonide esinemine (Joonis 9). Nendes proliinirikastes piirkondades leidub ka arginiini jääke, mis on motiivide tunnusjooneks, mille tunnevad ära SH3 domääni (*SRC Homology 3 Domain*) sisaldavad valgud (Kaneko *et al.*, 2008). See andis põhjust oletada, et nsP3 võib olla SH3 domääni sisaldavatele rakulistele valkudele ligandiks (Neuvonen *et al.*, 2011).

SH3 domään on väike (umbes 60 jääki) globulaarne domään, mille ülesandeks on vahendada interaktsioone raku signaliseerimises, membraanitranspordis ja tsütoskeleti organiseerimises

osalevate valkude vahel (Kaneko *et al.*, 2008; Mayer, 2001). SH3 domään seondab proliinirikkaid järjestusi, mis sisaldavad PxxPxR motiivi, kus x tähistab ükskõik missugust aminohapet (Ren *et al.*, 1993). Alfaviiruste, kaasaarvatud CHIKV, nsP3 sisaldab konserveerunud SH3 domääni seondavat motiivi (**PIPPPR** motiiv; CHIKV puhul **PVAPPR**), mis seondub rakuliste valkude SH3 domääniga. On tõestatud, et see motiiv seondab amfiüsiin-1 ja -2 valke. PIPPPR motiivis on kõige olulisem roll arginiini jäägil. Kui vahetada selles motiivis välja teised aminohapped, ei toimu amfiüsiini seonudumisel erilisi muutusi. Kui asendada aga arginiin, kaob amfiüsiini seondu mine täielikult (Neuvonen *et al.*, 2011).

Peale nsP3-e seondavad rakulisi valke ka ülejäänud CHIKV ns valgud, sh. nsP2 ja nsP4. Hiljutises uuringus identifitseeriti 22 rakulist valku, mis seonduvad CHIKV nsP2 või nsP4-ga. Pole kahtlust, et raku valke seondab ka nsP1, kuid selliseid valke pole seni veel identifitseeritud (Bourai *et al.*, 2012).

SFV	AADVHPEPADHVDLEN	PIPPPRPKRAAY	LASRAAERPVVPAPRKPTAPRTAFR	392-444
SINV	RRQVVVADVHAVQEPA	PIPPPR	LKKMARLAAARKEPTPPASNSSESLHLSFGG	405-457
CHKV	ATGNLAAVSDWVMSTV	PVAPPRRRR	GRNLTVTCDEREGNITPMASVRFRAEL	382-434
BAR	PRTFTVRAEVHQAPPT	PVPPPRPKRAAK	LAREMHGFTFGDFGEHEVEELTAS	391-443
AURA	QKLSWMREDRTPRQPP	PVPPPRPKRAAK	LSRLANQLNELRRHATISSVQAEVH	400-452
ONYO	ILLDSEDTSISRVS	PIAPPRRR	LGRNTINVTCDEREGKILPMASDRFFTAKP	433-485
MAYARO	EPDDHQPTPTAELATH	PVPPPRPNR	ARRLAAARVQVQVEVHQPPSNQPTKPIP	372-424
WEEV	TPSVQDLTAECARPRGLAEIMQDFNT	APFQ	FLSDHRPVVPAPRRRPIPSRSTA	436-488

Joonis 9. Erinevate alfaviiruste nsP3 C-terminuses asuv proliinirikas ala, mis seondab SH3 domääne sisaldavaid valke. Joondatud on omavahel lõigud SFV (Semliki Forest), SINV (Sindbis), CHIKV (Chikungunya), BAR (Barmah Forest), Aura, ONYO (O’nyong-nyong), Mayaro ja WEEV (Western Equine Encephalomyelitis) viiruste nsP3 C-terminaalset regioonist. Joonduse aluseks on võetud proliinirikas ala („PIPPPR motiiv“), mis on märgitud punase kastiga. Aminohapped, mis esinevad vähemalt neljas erinevas järjestuses, on välja toodud paksemas kirjas. (Neuvonen *et al.*, 2011)

1.9 CD2AP

Margus Varjaku ja Muriel Aquilimeba poolt Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis läbi viidud CHIKV nsP3 C-terminaalset piirkonda seondavate rakuliste interaktsioonipartnerite otsimiseksperiment, kasutades mass-spektromeetria võimalusi, tuvastas terve rea valke, mis sellele järjestusele seonduvad (avaldamata andmed). Nende hulgas oli nii tuntud nsP3 interaktsioonipartnereid (nt. G3BP1 ja G3BP2 valgud) kui ka raku valke, mille seondumist nsP3 C-terminaalsele regioonile polnud varem näidatud. Ühe sellise potentsiaalse kandidaadina identifitseeriti valk CD2AP (*CD2-associated protein*), teise nimega ka CMS (*Cas ligand with multiple Src homology (SH) 3 domains*). CD2AP on 80 kDa suurune ja 639 aminohappe jäägi pikkune valk, mis sisaldab kolme järjestikkust SH3 domääni (Dustin *et al.*, 1998; Kirsch *et al.*, 1999). SH3 domäänid asuvad valgu N-terminuses ning neile järgneb proliinirikas domään. C-terminuse lähedal paikneb *coiled-coil* domään ning potentsiaalne aktiini seondav ala. CD2AP-d leidub kõigis kudedes, kuid peamiselt on see ekspresseeritud epiteelrakkudes (Li *et al.*, 2000).

CD2AP reguleerib aktiini tsütoskeletti interakteerudes otseselt filamentse aktiiniga. Lisaks interakteerub see läbi mitmete aktiini seondumissaitide, SH3 domäänide ning proliinirikaste SH3 domääne seondavate motiivide veel paljude raku membraanvalkudega (Lehtonen *et al.*, 2002; Monzo *et al.*, 2005). CD2AP on seotud dünaamilise aktiini remodelleerimise ning membraantranspordiga, mis leiavad aset retseptor-vahendatud endotsütoosis ning tsütokineesis. Seega on CD2AP seotud struktuuride ja funktsioonidega, millel on oluline roll ka CHIKV infektsioonitsükli.

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Uurimistöö eesmärgid

Võrreldes teiste alfaviiruste mittestruktuursete valkudega on nsP3-e funktsioonide kohta kõige vähem teada. Kuigi nsP3-e karboksüterminaalne osa on alfaviiruste seas vähe konserveerunud, jagavad mitmed alfaviirused sarnast proliinirikast järjestust, mis on potentsiaalseks märklauaks SH3 domääni sisaldavatele valkudele. Varasemad uurimused on kindlaks teinud, et amfifüsiin-1 ja -2 seondavad SFV nsP3-e C-terminuses asuvat proliinirikast SH3 domääni seondavat järjestust ning kolokaliseeruvad rakusiseselt nsP3 valguga. Samas uurimuses leiti, et lisaks amfifüsiinile seondub SFV nsP3-ga ka CD2AP, antud uurimus viidi läbi kasutades *phage-display*-d (Neuvonen *et al.*, 2011). Muriel Aquiliemba ja Margus Varjaku poolt läbi viidud uurimus tuvastas mitmeid CHIKV nsP3 valgu C-terminusega interakteeruvaid inimese valke, mille hulgas oli ka CD2AP; samas ei näidanud see analüüs CHIKV nsP3 seondumist amfifüsiinile (avaldamata andmed). Need andmed panid aluse käesolevale uurimistööle tekitades lahendamist vajava küsimuse – kas ja kuidas CHIKV nsP3 seondab raku CD2AP valku?

Käesoleva uurimistöö eesmärkideks oli:

1. Uurida CHIKV nsP3 ja CD2AP ko-lokalisatsiooni CHIKV replikonidega nakatunud rakus
2. Valmistada CHIKV nsP3 C-terminaalset osa ekspresseerivad konstruktid, mille abil kindlaks määrata, kas CD2AP seondub nsP3 proliinirikale SH3 domääni seondavale järjestusele
3. Konstrueerida rakuliin, mis ekspresseeriks SFV nsP3 C-terminust ning teha kindlaks, kas SFV nsP3 seondab CD2AP valku
4. Uurida, kas SFV nsP3 seondub CD2AP-le SFV-ga nakatunud rakus.

2.2 Materjal ja metoodika

Bakteritüved

Konstruktide loomiseks ja plasmiidide paljundamiseks kasutati *Escherichia coli* (*E.coli*) tüve XL10. Rakke kasvavati LB (*Lysogeny Broth*) söötmes (10g/l bakto-trüpooni, 5g/l pärmiekstrakti, 10g/l NaCl), millele lisati ampitsilliini (Amp) lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml.

Rakuliinid ja söötmed

Hamstri neerurakuliini BHK-21 (*Baby Hamster Kidney cells*) kasvatati GMEM (*Glasgow's modified Eagle's medium, "Gibco BRL"*) söötmes, mis sisaldas 10% FCS-i (veise loote seerum, "*Sebak*"), penitsilliini 100 I/ml ja streptomütsiini 100ng/ml (lõppkontsentratsioonid). Rakkude nakatamiseks kasutati seerumivaba GMEM söödet. Rakke kasvatati 37°C ja 5% CO₂ juures.

Inimese osteosarkoomi rakuliini U2OS kasvatati DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, "Gibco BRL"*) söötmes, mis sisaldas 10% FCS-i (veise loote seerum, "*Sebak*"), penitsilliini 100IU/ml ja streptomütsiini 100ng/ml (lõppkontsentratsioonid). Rakke kasvatati 37°C ja 5% CO₂ juures.

Inimese embrüonaalse neerurakuliini Flp-In™ T-REx™ 293 ("*Invitrogen*"), mis ekspresseerib stabiilselt lacZ-Zeocin™ geeni ja tetratsükliini (tet) repressorit, kasvatamiseks kasutati IMDM söödet (*Iscove Modified Dulbecco's Medium, "Gibco BRL"*), millele oli lisatud 10% FCS-i, penitsilliini 100IU/ml ja streptomütsiini 100ng/ml (lõppkontsentratsioonid), lisaks juures zeocin 100 µg/mL ja blasticidin 10 µg/mL (lõppkontsentratsioonid). Rakke kasvatati 37°C ja 5% CO₂ juures.

Algplasmiidid

Käesolevas töös kasutatud algplasmiidide kaardid on toodud lisas 1.

pcDNA4/TO – ekspressioonivektor, mis sisaldab *Cytomegaloviruse* (CMV) varajast promootorit, pUC ja Simian Virus 40 (SV40) replikatsiooni alguspunkte, tetratsükliini operaatorit, ampitsilliini ja zeocini resistentsusgeene ja multikloneerimispiirkonda (MCS).

pHelperC – abiplasmiid, mis sisaldab CHIKV replikatsiooniks ja transkriptsiooniks vajalikke *cis*-järjestusi ja kapsiidivalgu kodeerivat ala.

pHelperE - abiplasmiid, mis sisaldab CHIKV replikatsiooniks ja transkriptsiooniks vajalikke *cis*-järjestusi ja ümbrise valke kodeerivat ala.

pCAGGS-flpE-puro – vektor, mis ekspresseerib CAGGS promootori all FLPe rekombinaasi, mis on vajalik sait-spetsiifiliseks rekombinatsiooniks.

pEF5-HA-EGFP-CHIKV-P3end – sisaldab CHIKV nsP3 valgu C-terminaalset osa kodeerivat ala, pEF5 promootorit, EGFP (võimendatud roheliselt fluoreseeruv valk, *enhanced green fluorescent protein*) markergeeni, HA-tag`i ja ampitsilliini resistentsusgeeni.

pEF5-HA-EGFP-SFV-P3end - sisaldab SFV nsP3 valgu C-terminaalset osa kodeerivat ala, pEF5 promootorit, EGFP (võimendatud roheliselt fluoreseeruv valk, *enhanced green fluorescent protein*) markergeeni, HA-tag`i ja ampitsilliini resistentsusgeeni.

pCHIKV-SG-FFluc - CHIKV replikonvektori cDNAd sisaldav plasmiid, mis sisaldab mittestruktuurseid valke ja Firefly lutsiferaasi (Luc) (toodetakse sg promootori alt) kodeerivaid järjestusi.

Kloneerimine

DNA restrikteerimisel, ligeerimisel, defosforüleerimisel, fosforüleerimisel ja ahelate täissünteesimisel kasutati “*Thermo Scientific*” ensüüme ja puhvreid vastavalt tootja poolt antud juhistele. Restriksioon toimus 37°C juures 2 tundi ensüümi spetsiifilises puhvris. Ensüümi kogus valiti sõltuvalt DNA hulgast. Lahtilõigatud vektorite defosforüleerimiseks kasutati aluselist fofataasi (*FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase*) 1 ühik 1µg DNA kohta. Reaktsioon toimus restriksioonipuhvris 37°C juures 1 tund. Vajadusel kasutati 5’ üleulatuvate otstega DNA otste täissünteesimiseks *Klenow* fragmenti 2 ühikut 1µg DNA kohta. Reaktsioon viidi läbi 10 min jooksul 37°C juures ensüümi spetsiifilises puhvris (*10X reaction buffer for Klenow Fragment*), millele lisati dNTP-de segu lõppkontsentratsiooniga 0,1 mM iga nukleotiidi kohta. Reaktsioon peatati DNA puhastamisega (*NucleoSpin DNA, RNA, and protein purification*). Vajadusel kasutati DNA 5’ otste fosforüleerimiseks faagi T4 polünukleotiidi kinaasi (*T4 Polynucleotide Kinase*). Reaktsioon toimus ensüümspetsiifilises

puhvril (*10X reaction buffer A for T4 Polynucleotide Kinase*), kuhu lisati ATP lõppkontsentratsiooniga 10 mM, 37°C juures 20 minutit. Reaktsiooni inaktiveerimiseks kasutati 10 minutit kuumutamist 75°C juures.

Restriksioonil saadud DNA fragmentide ja PCR-i produktide puhastamiseks agarosgeelist kasutati vastavalt tootja poolsele juhendile „*DNA, RNA, and protein purification/NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kit*“-i („*Machery-Nagel*“).

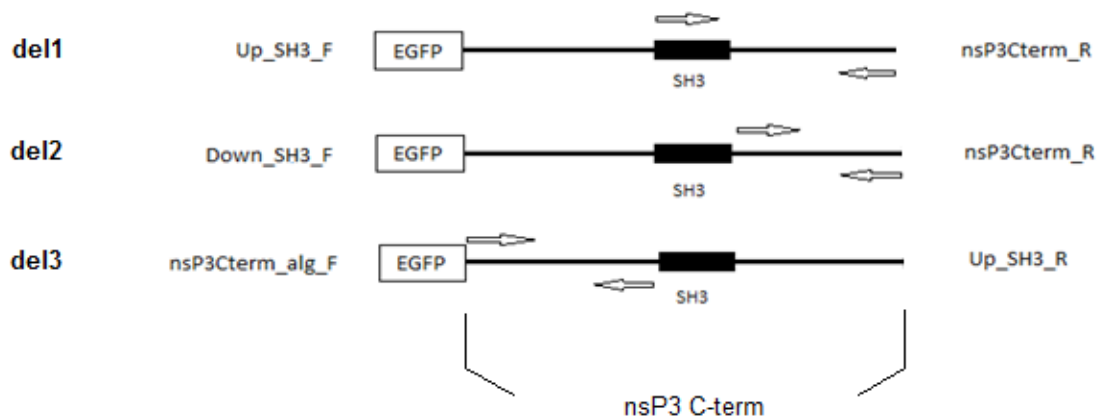
Ligeerimiseks kasutati faagi T4 DNA ligaasi, ensüümspetsiifilist puhvrit ning ning ekvimolaarsetes kogustes võetud vektorit ja inserti, reaktsioon toimus üleöö 16°C juures. Ligeerimisega transformeeriti kompetentseid *E.coli* tüve XL10 rakke, kasutades kuumaehmatust (*heat shock*) meetodit. Selleks võeti 150 µL kompetentseid rakke, lisati need reaktsioonisegule ning inkubeeriti 30 min jääl. Järgnes kuumashokk 42°C juures 1 minut ning jahutamine jääl 2 minutit. Rakkudele lisati 800 µl SOC söödet ning rakke inkubeeriti 37°C juures 45 minut. Järgnevalt tsentrifugeeriti rakud lauatsentrifuugiga põhja (3000g, 3minutit), resuspendeeriti 100 µl SOC söötmes ning külvati *Novagen ColiRoller™ Plating Beads*-e kasutades LB agarostassidele, kuhu oli lisatud ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml. Tasse inkubeeriti 37°C juures umbes 18 tundi. Moodustunud kolooniatega inokuleeriti 3 ml LB söödet, millele lisati 100 µg/ml ampitsilliini (lõppkontsentratsioon). Transformeeritud rakke kasvatati 37°C juures loksutil (220 rpm, 18 h). Järgnevalt fuugiti rakud lauatsentrifuugis põhja (13 000, 20 sek). Rakkudelt eemaldati sööde ning rakud resuspendeeriti 200 µl SOL I (15 mM Tris-HCl (~pH 8.0); 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A). Segamiseks kasutati Vortex-it. Järgnevalt lisati segule 200 µl aluselise lüüsilahust SOL II (0.2 M NaOH, 1% SDS), segati õrnalt ning inkubeeriti 5 min toatemperatuuril. Lüüsilahuse neutraliseerimiseks lisati segule 200 µl SOL III (3 M K-atsetaat pH 4.5) ning segati ettevaatlikult. Plasmiidse DNA eraldamiseks rakkude valkudest ja plasmamembraanist fuugiti segu lauatsentrifuugiga täispöretel (13 000 g, 10 min). Saadud supernatant kanti üle uude katseklaasi ning fuugiti veel kord täispöretel 6 minutit. Supernatant kanti uuesti üle katseklaasi ning plasmiidse DNA sadestamiseks lisati 650 µl 96% etanooli. Järgnes fuugimine täispöretel 4°C juures 20 min (*Eppendorf Centrifuge 5415 R*). Saadud sadet pesti 400 µl 70% etanooliga ning kuivatati 37°C juures umbes 10 minutit. Viimasena lisati kuivanud sademele 50 µl vett.

Plasmiidide konstrueerimine

Selleks, et asendada nõrk EF5 promootor tugevama CMV promootoriga, lõigati plasmide pEF5-HA-EGFP-CHIKV P3end ja pcDNA/TO restriктаasidega *NotI* ja *Acc65I* ning ligeeriti HA-EGFP-d ja CHIKV nsP3 C-terminust sisaldav fragment pcDNA/TO vektorisse. pcDNA/TO-HA-EGFP-CHIKV P3end plasmidi põhjal loodi spetsiaalselt disainitud praimeripaaride (Tabel 1) ja PCR-i abil kolm erinevat konstrukti: pcDNA/TO-HA-EGFP-CHIKV P3end-del1, pcDNA/TO-HA-EGFP-CHIKV P3end-del2 ja pcDNA/TO-HA-EGFP-CHIKV P3end-del3 (edaspidi tähistatud del1, del2 ja del3). Kloneerimise tulemusena saadi üks konstrukti, mis sisaldab proliinirikast SH3 domääni seondavat järjestust ning kaks konstrukti, mis seda järjestust ei sisalda (Joonis 10.). Kõikide PCR-iga loodud konstruktide järjestuse õigsust kontrolliti sekveneerimisega.

Tabel 1. Konstruktide loomiseks kasutatud praimerite järjestused. Praimerite järjestuses on alla joonitud *BamHI* restriктаasi lõikesait.

Nimi	Sense/antisense	Järjestus: (5' → 3')
Up_SH3_F	Sense	5'-GTGGATCC TCTGATTGGGTAATGAGCACCG-3'
nsP3Cterm_R	Antisense	5'-TAGGATCC TTAGTTTAAACTCACCCACC-3'
Down_SH3_F	Sense	5'-GTGGATCC GTCGTACAAGAAACAGCGGAGAC-3'
nsP3Cterm_alg_F	Sense	5'-GTGGATCC TCCCAGGAGTCTGCACAGG-3'
Up_SH3_R	Antisense	5'-GTGGATCC CGGTGCTCATTACCCAATCAGA-3'



Joonis 10. Loodud konstruktid (del1, del2, del3) valmistamise näitlik skeem. Nooltega on tähistatud *sense* ja *antisense* praimerid, mida kasutati valitud nsP3 C-terminaalse ala lõikude eemaldamiseks ekspressioonikonstruktidest.

PCR

PCR viidi läbi ruumalas 20 μL , milles sisaldus matriits-DNA, 2mM dNTP segu, sobivad praimerid kontentratsiooniga 0,5 μM , reaktsioonipuhver (*5x Phusion GC Reaction Buffer* või *10x Buffer for DyNAzyme DNA Polymerase*, Finnzymes) ja 2 ühikut DNA polümeraasi (*Phusion DNA Polymerase* või *DyNAzymeTM II DNA Polymerase*, Finnzymes). Esmane denaturatsioon toimus 98 °C juures 5 minut. Järgnes 30 amplifikatsioonitsükli, mis sisaldas järgmisi etappe: 94 °C 15-25 sekundit, 15-25 sekundit 50-55 °C juures praimerite seondumine (temperatuur valiti sõltuvalt kasutatud praimerite sulamistemperatuurist), 20-75 sekundit 72 °C juures ekstensioon (eag valiti sõltuvalt sünteesitava fragmendi suurusest). PCR viidi läbi *Eppendorf Mastercycler Gradient Thermal Cycler*-iga.

In vitro transkriptsioon

pCHIKV-SG-FFluc plasmidi lineariseerimiseks kasutati restriктаasi *NotI*. Lineariseeritud DNA puhastati *NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kit*-iga („Machery-Nagel“) ja elueeriti 25 μl vees. Lõikumise efektiivsust kontrolliti agaros geelelektroforeesiga. *In vitro* transkriptsioon viidi läbi *mMESSAGE mMACHINE[®] Transcription Kit*-i („Ambion Inc“)

kasutades ja tootja poolset protokoli järgides. Transkriptsiooni segu (20 µl) sisaldas: 2x NTP/CAP segu (10 mM ATP, CTP, UTP, 2 mM GTP ja 8 mM cap analoog), 10x reaktsioonipuhver, enzyme mix (SP6 RNA polümeraas) ning lineariseeritud DNA, maht viidi 20 µl-ni nukleaaaside vaba veega. Süntees toimus 37°C juures 90 minutit, RNA saagist kontrolliti geelelektroforeesil.

RNA transfektsioon BHK-21 rakkudesse

In vitro transkriptsioonil saadud RNA transfekteeriti BHK-21 rakkudesse elektroporatsiooni teel. 100 mm tassil umbes 70% konfluentsuseni (5×10^6 BHK-21 rakku) kasvatatud rakukultuurilt eemaldati sööde ja neid pesti 1 ml PBS-iga. Peale pesu lisati rakkudele 1,5 ml trüpsiini lahust, rakud suspendeeriti ning koguti 15 ml tuubi, kuhu oli eelnevalt lisatud 7 ml GMEM söödet. Rakud sadestati tsentrifugimisel (5minutit, 1000 rpm, “Eppendorf Centrifuge 5810R”). Rakusademelt eemaldati supernatant ja rakud resuspendeeriti külmas $1 \times$ PBS-is. Rakususpensioon (800 µl) segati RNA-ga. Elektroporatsiooniks kasutati 0,4 cm elektrodide vahega küveti („BioRad”), mis oli eelnevalt jääl jahutatud, ja anti kaks pulssi 850 V ja 25 µF juures („BioRad Gene Pulser Xcell”). Küvetist kanti elektroporeeritud rakud üle GMEM söötmega tassidele ning rakud pandi kasvama 37°C juurde.

DNA transfektsioon U2OS rakkudesse

DNA transfekteeriti U2OS rakkudesse elektroporatsiooniga. 100 mm läbimõõduga tassidel kasvatatud 70% konfluentset U2OS rakukulutuari (5×10^6 rakku) pesti 1 ml PBS-iga. Peale pesu lisati rakkudele 1,5 ml trüpsiini, rakud suspendeeriti ning koguti 15 ml tuubi, kuhu oli eelnevalt lisatud 7 ml DMEM söödet. Rakud sadestati tsentrifugimisel (5minutit, 1000 rpm, “Eppendorf Centrifuge 5810R”). Rakusademelt eemaldati supernatant ja rakud resuspendeeriti vajalikus koguses söötmes. Rakususpensioon (250 µl) segati vajaliku koguse plasmiidse DNA ja 50 µg *carrier*-DNA-ga (lõhe spermi DNA). Elektroporatsiooniks kasutati 0,4 cm elektrodide vahega küveti („BioRad”) ja anti üks pulss 180 V ja 975 µF juures („BioRad Gene Pulser Xcell”). Elektroporeeritud rakud kanti 15 ml tuubi, kuhu oli eelnevalt lisatud umbes 2,5 ml söödet. Rakud sadestati tsentrifugimisel (5minutit, 1000 rpm,

“Eppendorf Centrifuge 5810R”), eemaldati supernatant ning resuspendeeriti 1 ml söötmes. Rakususpensioon kanti tassidele, kuhu oli eelnevalt lisatud 7 ml DMEM söödet, ning pandi kasvama 37°C juurde.

Rakuliini valmistamine

Plasmiidne DNA transfekteeriti Flp-In™ T-REx™ 293 rakkudesse lipofektsiooni meetodiga. Flp-In™ T-REx™ 293 rakud kasvatati 100 mm läbimõõduga tassil konfluentsuseni 70-80% ning transfekteeriti *Lipofectamine 2000* („Life Technologies”) reagenti kasutades. Võeti kaks tuubi, kuhu kumbagi lisati 500 µl OptiMEM-i. Esimesse tuubi lisati 2 µg pEF5-HA-EGFP-SFV-P3end ja 6 µg pCAGGS-flpE-puro plasmide, teise aga 40 µl *Lipofectamine 2000* reagenti. Kaks lahust segati kokku ning inkubeeriti 10 min toatemperatuuril. Flp-In™ T-REx™ 293 rakukultuuriga plaadile lisati kogu segu ning rakke kasvatati 37°C juures. Transfektsiooni õnnestumist kontrolliti fluorestsents-mikroskoobiga (*Nikon Eclipse 200 TE-U*). Rakud, mis sisaldasid inserti, helendasid ekspresseeritud EGFP tõttu roheliselt. 48 tunni möödudes kanti rakkudele 100 µg/ml *hygromycin*-i sisaldav sööde (1:10 000), mis selekteeris välja rakud, mis ei sisaldanud SFV inserti. Rakkude kasvatamist jätkati *hygromycin*-i sisaldaval söötmel 37°C juures, ilma zeocini juuresolekuta

VRP-de tootmine ja kogumine

VRP-de tootmiseks elektroporeeriti replikon-vektorilt pCHIKV-SG-FFluc tehtud *in vitro* transkripte koos pHelperC ja pHelperE plasmiidilt *in vitro* sünteesitud RNA-dega BHK-21 rakkudesse. Transfektsiooni jaoks kasutati umbes 5×10^6 BHK-21 rakku (70-80% konfluentne rakukultuur 100 mm läbimõõduga tassil). Transfekteeritud rakke inkubeeriti 28°C juures 5% CO₂ tingimustes. 72 tunni pärast koguti rakkudelt VRP-sid sisaldav sööde, konsentreerimiseks kanti see kogumisfiltrile (*Centrifugal Filter Units 100K*, „Millipore Amicon“) ning tsentrifugeeriti 2000-2400 rpm juures, kuni filtrile jäi umbes 500 µl partikleid sisaldavat sööde. Saadud VRP-sid säilitati -80°C juures.

U2OS rakkude nakatamine VRP-de või viirusega

Nakatamiseks kasvatati U2OS rakud tassil konfluentsuseni 90%. Rakkudelt eemaldati sööde ning neid pesti 0,5 ml seerumvaba söötmega. Rakukultuurile lisati seerumvaba GMEM-i ja VRP-de/viiruspartiklite segu ning inkubeeriti tase iga 15 min tagant loksutades üks tund (37°C ja 5% CO₂ juures). Rakud fikseeriti 4 ja 8 h peale nakatamist 4% PFA-ga (paraformaldehüüd) edasiseks analüüsiks IF-mikroskoopiaga.

Immunofluoresentsanalüüs

Rakkudelt eemaldati sööde ja pesti neid 3 korda 1× PBS-iga. Rakud fikseeriti erinevatel ajapunktidel 4% paraformaldehüüdi (PFA) lahusega Dulbecco PBS-is toatemperatuuril 20 minuti jooksul. Järgnes 2 korda pesu Dulbecco PBS-iga, rakkudele lisati 50mM NH₄Cl lahus PBS-is ning inkubeeriti 15 min toatemperatuuril. Rakke pesti 2 korda Dulbecco PBS-iga ning kanti peale 0,1% TritonX-100 lahust PBS-is, mida hoiti peal 5 minutit. Viimase etapina pesti rakke 3 korda Dulbecco PBS-iga. Blokeerimiseks kanti rakkudele 5% veise loote seerum Dulbecco PBS-is ning inkubeeriti toatemperatuuril 1 tund. Järgnevalt inkubeeriti preparaati Dulbecco PBS-i ja seerumi lahuses lahjendatud primaarse antikehaga 1 tund, vastavalt eksperimendile olid kasutusel järgnevad antikehad: küüliku polükloonaalne CHIKV nsP1, CHIKV nsP2, CHIKV nsP3 või SFV nsP1-spetsiifilised antikeha, merisea polükloonaalne SFV nsP3-spetsiifiline antikeha, hiire monokloonaalne CD2AP („*Santa Cruz Biotechnology*“) või dsRNA-spetsiifiline antikeha (*Scicons*). Seejäral pesti preparaati kolm korda Dulbecco PBS-iga ja inkubeeriti Dulbecco PBS-i ja seerumi lahuses lahjendatud sekundaarse antikehaga 1 tund, kasutati hiire antikehade vastast Alexa 405-ga konjugeeritud, küüliku antikehade vastast Alexa 488-ga konjugeeritud ning merisea vastast Alexa 568-ga konjugeeritud sekundaarset antikeha („*Life Technologies*“). Preparaati pesti uuesti kolm korda Dulbecco PBS-iga, loputati destilleeritud veega ning kuivatati õhu käes. Alusklaasi ja kattedklaasi vahele lisati 5 µl sulundusvedelikku (*Mowiol 4-88*, 2,5%; „*DABCO*“), kattedklaasid asetati alusklaasidele nii, et rakud jääksid klaaside vahele. Preparaatide vaatamiseks ja pildistamiseks kasutati konfokaalmikroskoopi *Zeiss LSM710*.

Valkude ekspressiooni detekteerimine western blot meetodil

100 mm läbimõõduga tassidel kasvatatud rakkudelt eemaldati sööde, rakke pesti PBS-iga ning neile lisati 150 µl Laemmli lüüsimislahust. Viskoosne lüsaat koguti 1,5 ml tuubi ning kuumutati 100°C juures 10 minutit. Rakumaterjal lahutati geelelektrofooresiga 10% SDS-polüakrüülamiidgeelis (90 V juures markeri eristumiseni, edasi 160 V juures umbes 45 minutit). Valgud kanti üle nitrotselluloosfiltrile (*“Amersham”, Hybond™-ECL™*), kasutades poolkuiva ülekandemeetodit ja *“Bio-Rad Instruments”* aparati. Ülekanne toimus 45 minutit Semi-dry puhvris (48mM Tris, 39mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% metanool) pingega 12 V. Filter blokeeriti üleöö westerni pesupuhvrise (50mM TrisHCl (pH 7,5), 150mM NaCl, 0,1% Tween20) tehtud 5% lõssipulbrilahuses. Järgnevalt inkubeeriti filtrit 1 tund toatemperatuuril huvipakkuva valgu vastase antikehaga 2% lõssipulbrilahuses, vastavalt eksperimendile kasutati kas küülikus toodetud polükloonaalseid CHIKV nsP3, SFV nsP3, EGFP-spetsiifilisi antikehi või hiires toodetud monokloonaalset CD2AP-spetsiifilist antikeha (*„Santa Cruz Biotechnology“*). Filtrit pesti 3 korda 10 minutit westerni pesulahuses ning inkubeeriti seejärel 1 tund 2% lõssipulbrilahuses, kuhu oli lisatud sekundaarne küüliku või hiire antikehade vastane mädarõika peroksidaasiga konjugeeritud antikeha (*„LabAs“*). Filtrit pesti uuesti 3 korda 10 minutit westerni pesulahuses. Ilmutamiseks kasutati *ECL™ Western Blotting Detection* reagente 1 ja 2 (*“Amersham”*). Töödeldud filtrit analüüsiti *ImageQuant RT ECL-i* abil.

Immunosadestamine

Rakkudelt eemaldati sööde, neid pesti külma PBS-iga ning rakud kraabiti 1 ml-is külmas PBS-is kraapepulgaga lahti. Rakkude ja PBS-i segu tõsteti 15 ml tuubi ning rakkude sadestamiseks tsentrifuugiti segu 1000 rpm juures 5 minutit (*“Eppendorf Centrifuge 5810R”*). Tuubi põhja sadestunud rakkudelt eemaldati PBS ning lisati 700 µl jääl hoitud lüüsipuhvrit (150 mM NaCl, 20 mM Hepes (pH=7,2), 100 mM K-atsetaat, 2 mM MgCl₂, 0,1% Tween-20, 1% TritonX-100, destilleeritud H₂O, 1 tk Protease Inhibitor Cocktail Tablets (*„Roche Diagnostics GmbH“*)). Rakud resuspendeeriti lüüsipuhvris ning hoiti 30 min jääl. Lüsaati tsentrifuugiti täispööretel (13 000 rpm) 4°C juures 10 minutit. *Magnetbeads*-id (*GFP-trap-M Gtm-20*) tasakaalustati 3 korda lüüsipuhvris, *magnetrack-i* kasutades kallati lüüsipuhver ära ning lisati rakulüsaat. *Magnetbeads*-ide ja lüsaadi segu inkubeeriti 1 tund 4°C juures loksutil,

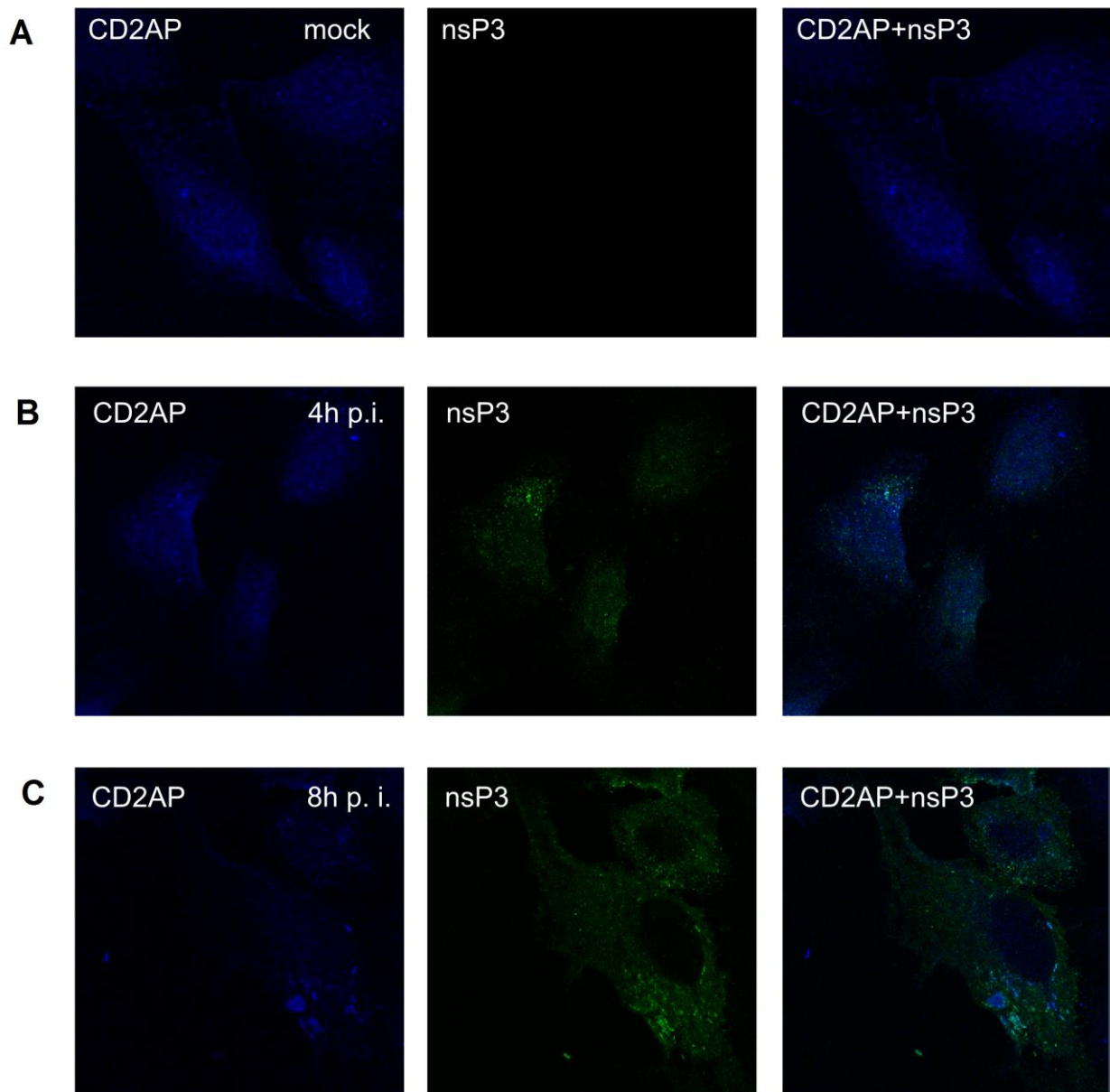
asetati *magnettrack*-ile ning kallati segu ära. *Beads*-e pesti 3 korda 3 minutit 4°C juures loksutil IP-puhvriga ning peale viimast pesu eemaldati puhver täielikult. *Beads*-idele kanti 40 µl 2xLaemmli puhvrit, proove hoiti 10 minutit 100°C juures ning asetati peale seda jääle, edasine analüüs viidi läbi western blot-iga.

2.3 Tulemused

2.3.1 CHIKV mittestruktuursete valkude kolokalisatsiooni uurimine CD2AP-ga U2OS rakkudes

Tulenevalt CHIKV ohtlikkusest ei teostatud antud uurimistöö raames töid infektsioonilise viirusega. Selle asemel kasutati ohutut CHIKV VRP süsteemi, mille abil uuriti CD2AP ja CHIKV nsP3 valgu kolokalisatsiooni. VRP-de tootmine on ohutu, kuna selleks kasutatakse *split-helper* süsteemi. Lineariseeritud plasmiididelt pCHIKV-SG-FFluc (replikon RNA tootmiseks, sisaldab CHIKV mittestruktuurseid valke kodeerivaid järjestusi), pHelperC (kapsiidi valgu tootmiseks) ja pHelperE (ümbrise valkude tootmiseks) sünteesiti *in vitro* transkriptsiooniga vastavad RNA-d ja viidi need BHK-21 rakkudesse elektroporatsiooni teel. Virionide moodustamiseks vajalikud struktuursed valgud sünteesitakse selles süsteemis eraldi RNA-delt, sel moel toimides on viidud miinimumi võimalus, et replikon RNA rekombineerudes saaks omandada nii kapsiidi kui ümbrise valkude sünteesiks vajalikud geenid. VRP-dega nakatunud rakkudes kulgeb infektsioon sarnaselt viirusele (v.a. struktuursete valkude süntees ja virionide moodustamine), mis võimaldab jälgida viiruse replikatsiooniga seotud sündmusi.

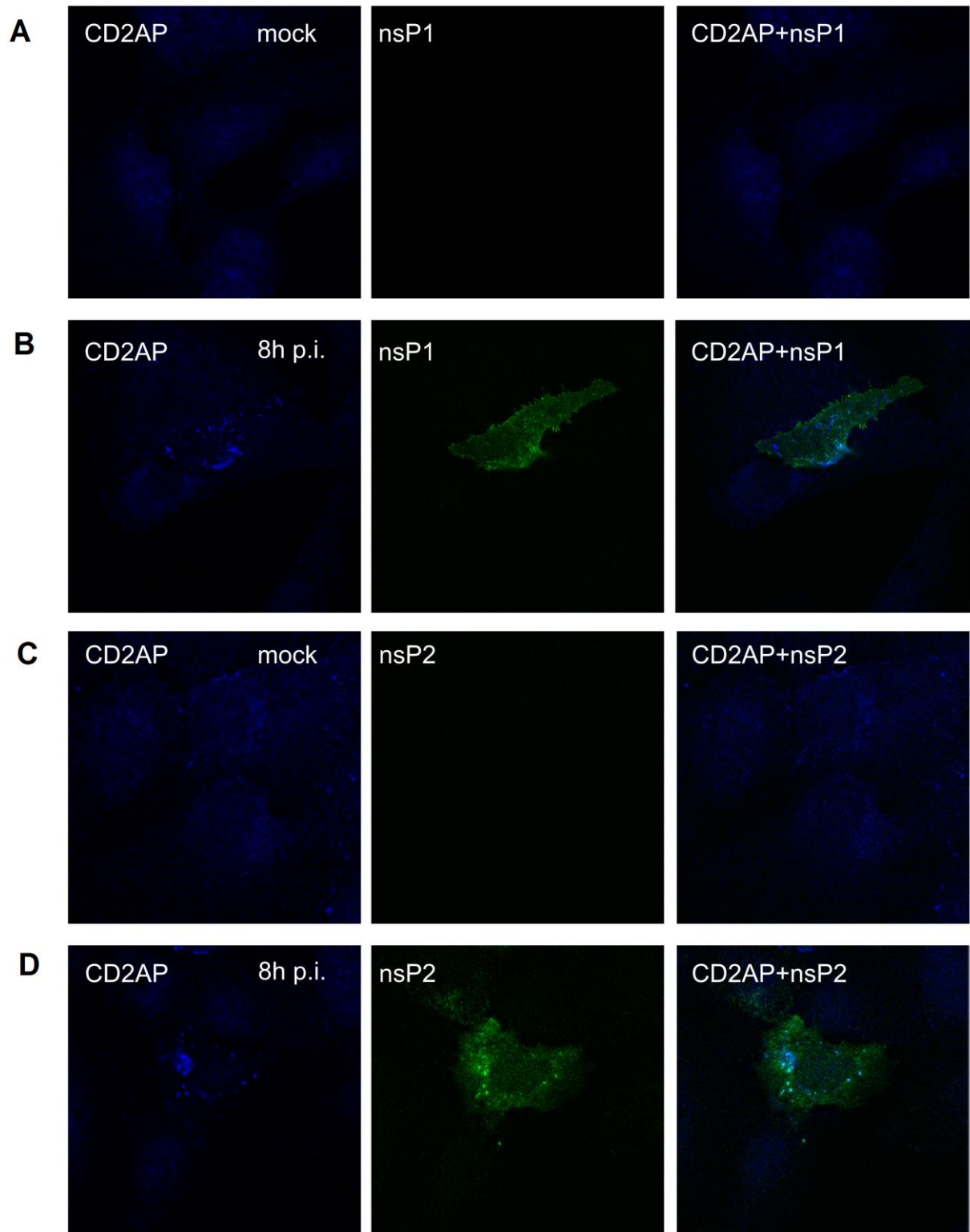
Toodetud VRP-dega nakatati U2OS rakke ning rakud fikseeriti 4 ja 8 tundi peale nakatamist. Immunofluoresentsanalüüs teostati kasutades nsP3 ja CD2AP vastaseid primaarseid antikehi ning fluorofooridega konjugeeritud sekundaarseid antikehasid. Saadud piltidel on selgesti näha nsP3 ja CD2AP lokaliseerimine rakkudes. Nakatamata rakkudes (*mock*) on näha, et CD2AP paikneb difuusselt üle kogu raku (Joonis 11.A). CD2AP ja nsP3 kolokalisatsioon oli paremini nähtav rakkudes, mis fikseeriti 8 tundi peale nakatamist; see on tingitud asjaolust, et 8h peale nakatamist on viiruse nsP3 valgu hulk rakkudes suurem (võrrelduna 4 tundi peale infektsiooni fikseeritud rakkudega). Selgelt on näha, et CD2AP lokaliseerimine raku on muutunud märgatavalt vähem difuusseks ja ta kolokaliseerub nsP3-e sisaldavate struktuuridega (Joonis 11.C). On üsnagi tõenäoline, et hilisemas infektsioonis on CD2AP koos nsP3-ga lokaliseerunud replikatsioonikompleksidesse.



Joonis 11. nsP3 ja CD2AP kolokalisatsioon U2OS rakkudes. U2OS rakke nakatati CHIKV-SG-FFluc VRP-dega, rakud fikseeriti 4 ja 8 tunni ajapunktidel peale nakatumist ning teostati immunofluoresentsanalüüs. **A)** Nakatamata U2OS rakud (*mock*). **B)** rakud, mis fikseeriti 4 tundi pärast nakatamist CHIKV VRP-dega. **C)** rakud mis fikseeriti 8 tundi pärast nakatamist CHIKV VRP-dega. Sinisega (Alexa 405) näidatud CD2AP lokaliseerimine, rohelisega (Alexa 488) nsP3-e paiknemine rakkudes.

Eelmistest katsetest selgus, et CD2AP ja nsP3 kolokaliseeruvad nakatatud rakkudes. Järgmiseks oli vaja kindlaks määrata, kus täpsemalt see kolokalisatsioon aset leiab. See on oluline, sest nsP3-e võib leida peale replikatsioonikomplekside veel ka tsütoplasmaatilistest

graanulitest (Salonen *et al.*, 2003). Järgneva katse eesmärgiks oligi tuvastada, kas nsP3 ja CD2AP kolokalisatsioon võib leida aset replikatsioonikompleksides. Selle jaoks nakatati U2OS rakke CHIKV VRP-dega ning rakud fikseeriti 8 tundi peale nakatamist ja värviti nsP1 ja CD2AP või nsP2 ja CD2AP vastaste antikehadega. Saadud piltidelt on näha, et CD2AP kolokalisatsioon nsP1-ga oli vähene (Joonis 12.B), nsP1 ise paiknes eeldatult plasmamembraanil. Samal ajal oli CD2AP kolokalisatsioon nsP2-ga selgesti eristatav (Joonis 12.D). Selle ja eelmise katse põhjal võib järeldada, et CD2AP kolokaliseerub nii nsP2 kui ka nsP3-ga (ja osaliselt ka nsP1-ga); ainsad kompleksid rakkudes, mis sisaldavad neid kolme viiruse valku, on aga replikatsioonikompleksid. Selles järeldub, et CD2AP seondub CHIKV replikatsioonikompleksidega.



Joonis 12. CD2AP kolokalisatsioon nsP1 ja nsP2 valkudega. U2OS rakke nakatati CHIKV VRP-dega. Valkude lokaliseerimiseks rakud fikseeriti 8 tundi peale nakatamist ning inkubeeriti nsP1 ja CD2AP või nsP2 ja CD2AP vastaste antiikehadega: lokaliseerimise

vaadeldi konfokaalmikroskoobiga. **A, C)** Nakatamata U2OS rakud (*mock*). **B)** CD2AP ja nsP1 kolokalisatsioon CHIKV VRP-dega nakatatud rakkudes **D)** CD2AP ja nsP2 kolokalisatsioon CHIKV VRP-dega nakatatud rakkudes. Sinisega (Alexa 405) näidatud CD2AP lokaliseerimine, rohelisega (Alexa 488) nsP1 (B) ja nsP2 (D) paiknemine rakus.

2.3.2 CD2AP seondub CHIKV nsP3 valgu C-terminuses asuvale järjestusele, mis sisaldab proliinirikast SH3 domääni seondavat motiivi

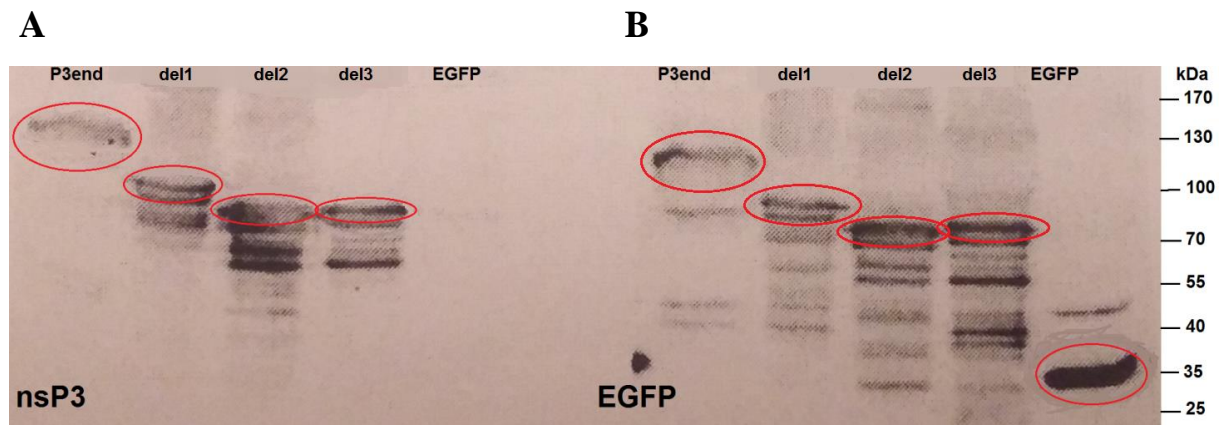
CD2AP seondumist nsP3 C-terminaalsele regioonile rakus on näidanud varem Muriel Aquiliemba ja Margus Varjaku poolt läbi viidud eksperimendid. Samas kasutati nende katses tervet C-terminaalse regiooni järjestust, seega ei olnud teada, kuhu täpselt see valk seondub. Kuna CD2AP ise omab SH3-domääni, oli põhjust arvata, et CD2AP seondub nsP3 valgu C-terminuses asuvale proliinirikale SH3 domääni seondavale järjestusele. Proliinirikas alas on esindatud ka arginiini jäägid, mis on omased SH3 domääni seondavatele motiividele (Kaneko *et al.*, 2008). Kuna CD2AP sisaldab kolme järjestikkust SH3 domääni, peeti üsnagi tõenäoliseks, et seondumine toimub nende domäänide ja nsP3 C-terminuses asuva proliinirikka järjestuse kaudu. Järgnevate katsete eesmärgiks oligi kindlaks teha, kas CD2AP seondub nsP3 proliinirikale järjestusele.

CD2AP seondumiskoha tuvastamiseks loodi pEF5-HA-EGFP-CHIK-P3end põhjal kolm konstrukti: pcDNA4/TO-HA-EGFP-CHIK-P3end-del1 (del1), pcDNA4/TO-HA-EGFP-CHIK-P3end-del2 (del2) ja pcDNA4/TO-HA-EGFP-CHIK-P3end-del3 (del3) (Joonis 10.). Del1 sisaldab ala proliinirikka järjestuse algusest kuni nsP3-e lõpuni, del2 ala proliinirikka järjestuse lõpust nsP3-e lõpuni ning del3 sisaldab ala nsP3 hüpervarieeruva regiooni algusest kuni proliinirikka järjestuse alguseni. Seega sisaldab del1 SH3 domääni seondavat järjestust, del2 sellele järgnevat ning del3 sellele eelnevat ala.

Järgnevalt poreeriti U2OS rakkudesse 5 eri konstrukti:

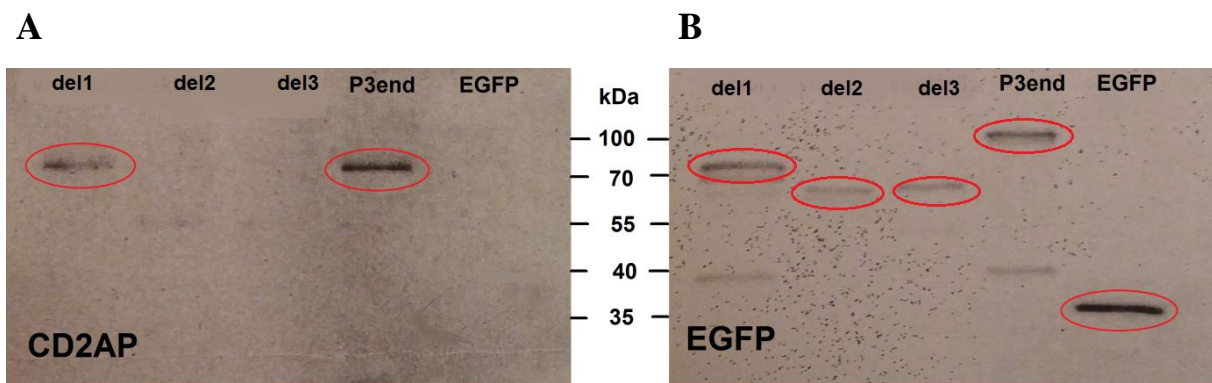
- 1) pcDNA4/TO-HA-EGFP-CHIK- P3end
- 2) EGFP
- 3) del1
- 4) del2
- 5) del3

Antud konstruktidega elektroporeeritud U2OS rakud lüüsi ning ning teostati western blot analüüs kasutades nsP3 ja EGFP vastaseid antikehi. See analüüs näitas, et CHIKV nsP3 valku ekspresseeritakse nii pcDNA4/TO-HA-EGFP-CHIK-P3end konstrukti kui ka kolme deletsiooniga konstrukti korral (Joonis 13.)



Joonis 13. EGFP-nsP3 C-terminaalne domeen, liitvalkude ekspressioon U2OS rakkudes. U2OS rakke elektroporeeriti erinevate plamiididega: p3end, del1, del2, del3 ja EGFP. 24 h möödudes rakud lüüsi ning saadud lüsaati analüüsiiti western blot meetodil kasutades anti-CHIKV nsP3 (A) ja anti-EGFP (B) antikehi. Uuritud valkudele vastavad kohad on tähistatud punase ringiga.

Järgmise etapina elektroporeeriti samad konstruktid taas U2OS rakkudesse. Edasi viidi läbi immunosadestamine kasutades selleks GFP seondavaid magneetilisi kerakesi (*GFP-trap-M Gtm-20 magnetbeads*). Sadestatud materjali western blot analüüs näitas, et nii del1 (sisaldab proliinirikast järjestust) kui pcDNA4/TO-HA-EGFP-CHIK-P3end seondavad CD2AP-d (Joonis 14.A), samas del1 ja del3 seda ei tee. Võttes arvesse, et immunosadestamine toimus kõikide konstruktidel edukalt (Joonis 14.B), siis saab nende esialgsete andmete põhjal väita, et CD2AP seondub suure tõenäosusega CHIKV nsP3 C-terminuses asuvale proliinirikale SH3 domääni seondavale järjestusele. Samas oli see regioon oluliselt pikem kui tüüpiline lineaarne interaktsioonimotiiv. Seega on edaspidi vajalik läbi viia detailsem analüüs kasutades täiendavat deletsioonanalüüsi. Peale seda on võimalik, luues punktmutatsioonidega konstrukte, teha kindlaks CD2AP seondamise eest vastutavad aminohappejäägid.

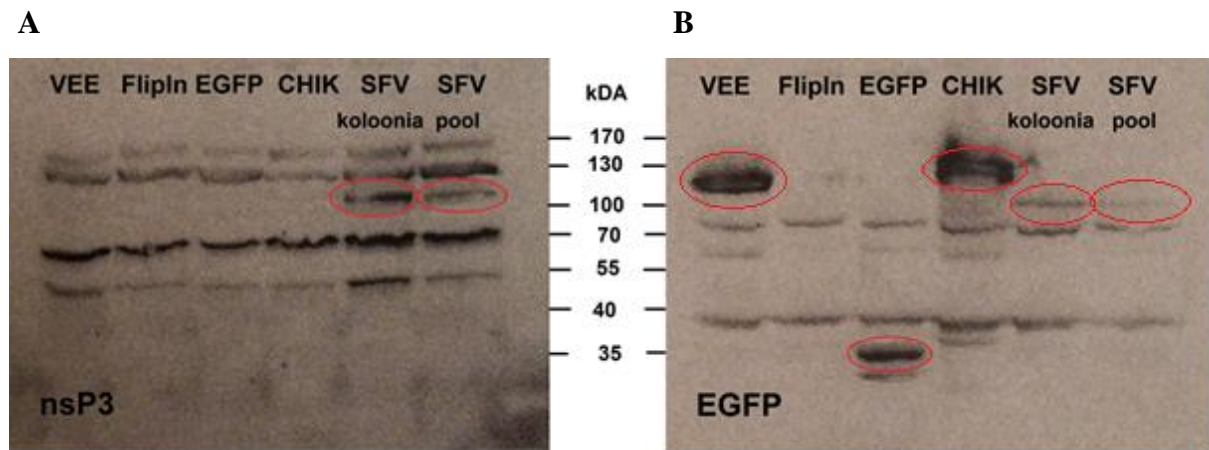


Joonis 14. CD2AP interageerub CHIKV nsP3 SH3 domääni sisaldava järjestusega. Rakkudesse elektroporeeriti plasmiidid pcDNA4/TO-HA-EGFP (joonisel P3end) del1, del2, del3 ja pcDNA4/TO-HA-EGFP (EGFP). Ekspresseeritud kimäärne valk immunosadestati EGFP kaudu, CD2AP seondumine/mitte seondumine tuvastati western blot abil kasutades CD2AP vastaseid antikehi (A) ja EGFP vastatseid antikehi (B). Paneelil A on CD2AP-le vastav signaal tähistatud punase ringiga, paneelil B tähistab punane ring EGFP signaali asukohta.

2.3.3 CD2AP seondub ka SFV nsP3 valgu C-terminaalsele regioonile

Kuna CD2AP seondub suure tõenäosusega CHIKV nsP3 C-terminuses asuvale proliinirikkale järjestusele, siis on ka võimalik, et SFV nsP3 C-terminaalne kolmandik seondab CD2AP-d, sest see omab sarnast proliinirikast motiivi (Joonis 9). Sellele küsimusele vastuse saamiseks transfekteeriti plasmiid pEF5-HA-EGFP-SFV-P3end koos pCAGGS-flpE (ekspresseerib vajalikku rekombinaasi) lipofektsiooni meetodiga Flp-In™ T-REx™ 293 rakkudesse. Eesmärgiks oli saada rakuliin, mis ekspresseeriks stabiilselt EGFP külge fuseeritud SFV nsP3 valgu C-terminaalset regioon. Flp-In™ T-REx™ 293 rakkudes toimub flpE rekombinaasi juuresolekul huvipakkuva konstrukti integreerumine raku genoomi kohtspetsiifiliselt. Rakuliini tegemiseks lisati söötmesse hügomütsiini ning mõne aja möödudes eraldati algsest rakukultuurist (*pool*) koloonia, mida kasvatati sarnastes tingimustes *pool*-ist sõltumatult. Lisaks SFV nsP3 C-terminust sisaldavale rakukultuurile kaasati katsesse ka CHIKV (pEGFP-CHIKV-nsP3Cterm, valmistatud Valeria Lulla poolt) ja VEEV (pEGFP-VEE-nsP3Cterm,

valmistatud Muriel Aquiliemba poolt) nsP3 C-terminust ning ainult EGFP-d (valmistatud Margus Varjaku poolt) sisaldavad T-REx rakuliinid. Samuti võeti katsetesse ilma inserdita algne T-REx rakukultuur (edaspidi tähistatud *FlipIn*). NsP3 ekspressiooni rekuliinides uuriti western blot analüüsil kasutades SFV nsP3 ja EGFP vastaseid antikehi. Saadud pildilt on näha, et nii EF5-HA-EGFP-SFV-P3end-i sisaldav *pool* kui ka eraldatud koloonia ekspresseerivad EGFP külge fuseeritud SFV nsP3 C-terminaalset domääni (Joonis 15.).

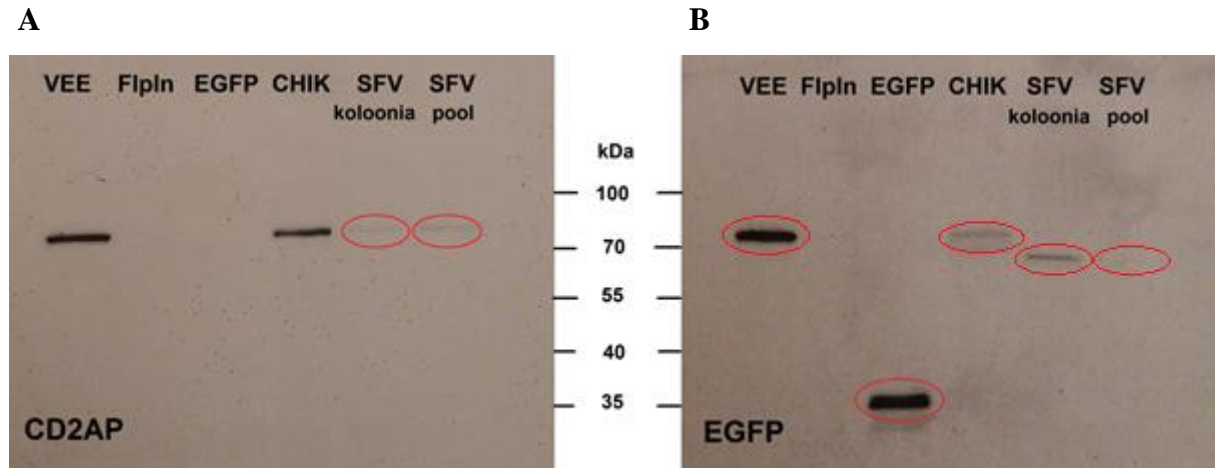


Joonis 15. EGFP-nsP3 ekspressioon rakuliinides. Uuritud rakuliinid ekspresseerivad EGFP külge fuseeritud VEEV, CHIKV või SFV nsP3 C-terminaalset domääni, joonisel tähistatult vastavalt VEE, CHIK, SFV. Kontrollina on kasutatud algset Flp-InTM T-RExTM (joonisel FlpIn) rakuliini ning ainult EGFP-d ekspresseeriv T-RexTM-EGFP (joonisel EGFP) rakuliini. Rakkude lüsaate analüüsiti kasutades SFV nsP3 vastast (A) ja EGFP vastast antikeha (B). Õige suurusega kimääsetele valkudele vastavad kohad on tähistatud punase ringiga.

Järgnevalt on vaja kindlaks teha, kas SFV nsP3 C-terminaalne regioon seondab sarnaselt CHIKV-le CD2AP-d, kasutades selleks loodud rakuliini. Sarnaselt CHIKV CD2AP valku siduva piirkonna määramisele teostati immunosadestamine kasutades samuti *GFP-trap-M Gtm-20 magnetbeads*-e, kuid seekord teostati immunosadestamine olemasolevatele rakuliinidele.

Saadud tulemustest oli näha, et lisaks juba teadaolevale VEEV ja CHIKV nsP3 valgu C-terminuse võimele seondada CD2AP-d, seondub CD2AP ka SFV nsP3 valgu C-terminaalsele kolmandikule (Joonis 16A). Samast lähtearvust rakkudest õnnestus alla sadestada sarnane hulk CHIKV nsP3 C-terminust ja SFV nsP3 C-terminust kandvat EGFP-d (Joonise 16B).

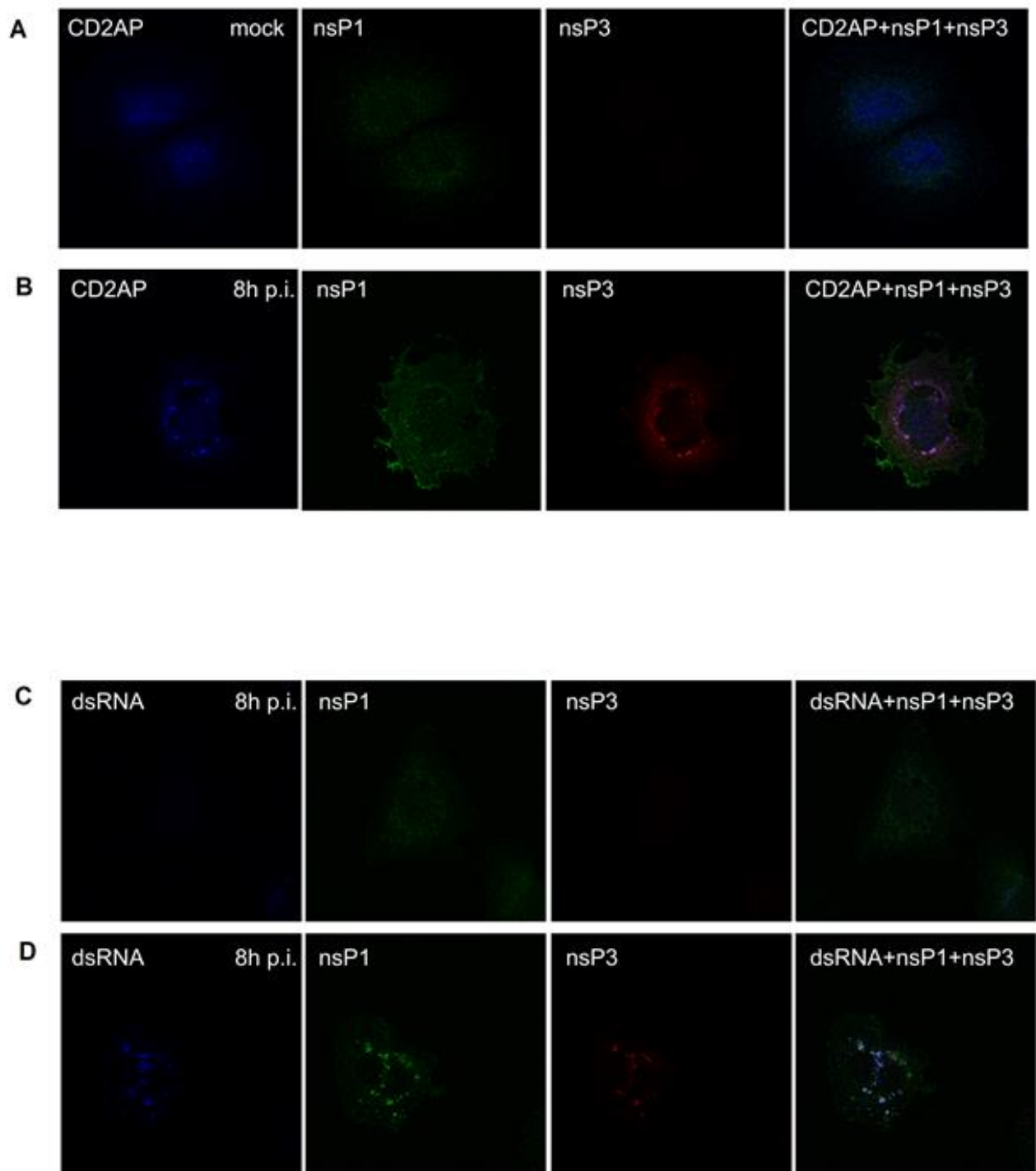
Seepärast võib saadud andmetest oletada, et võrreldes CHIKV nsP3 C-terminuse domääni sidumisega oli CD2AP seondumine SFV nsP3 valguga C-terminaalse domääniga märgatavalt nõrgem (Joonis 16.).



Joonis 16. nsP3 C-terminaalset domääni kandva EGFP immunosadestamine

püsiliiinidest. EGFP külge fuseeritud VEEV, CHIKV või SFV nsP3 valguga C-terminaalset domääni ekspresseerivad rakud lüüsiiti, rekombinatsiooniga sadestati EGFP-spetsiifiliste kerakeste ja analüüsiti CD2AP (A) ja EGFP (B) vastaste antikehadega. Negatiivse kontrollina on kasutatud originaalset rakuliini (tähistatud FIpIn) ja EGFP-d ekspresseerivat rakuliini (tähistatud EGFP).

Kuna ilmnes, et ka SFV nsP3 võib potentsiaalselt siduda CD2AP-d, on võimalik, et ka SFV puhul on mittestruktuursete valkude ja CD2AP kolokalisatsioon rakus samasugune kui CHIKV puhul. Kuna SFV ei ole inimesele patogeene, oli võimalik seda interaktsiooni uurida ka viirusega nakatunud rakkudes. Selle jaoks nakatati U2OS rakke SFV4 viiruspartiklitega MOI 10 juures, rakud fikseeriti 8 h peale nakatamist ning teostati immunofluoresentsanalüüs kasutades küüliku nsP1-spetsiifilist ja merisea nsP3-spetsiifilist antikeha ning sõltuvalt katsest, kas hiire CD2AP-spetsiifilist või hiire dsRNA vastast antikeha. Sel moel oli võimalik vaadelda kolme valguga lokaliseerumist rakus. Saadud pildid tõestavad, et CD2AP kolokaliseerub SFV-ga nakatunud rakkudes nii nsP1 kui ka nsP3-ga (Joonis 17.). Seal, kus nsP1 ja nsP3 valk omavahel kolokaliseeruvad, esineb ka kaheaheline RNA, seega on ainuüksi nsP1 ja nsP3 omavaheline kolokalisatsioon heaks indikaatoriks replikatsioonikomplekside olemasolu kohta. Selle ja eelnevate katsete põhjal võib järeldada, et CD2AP seondub nsP3 valguga C-terminaalsele ning neid mõlemaid valke võib leida replikatsioonikompleksidest.



Joonis 17. CD2AP, nsP1 ja nsP3 ning dsRNA, nsP1 ja nsP3 kolokalisatsioon SFVga nakatatud U2OS rakkudes. Rakud fikseeriti 8 tundi peale nakatamist ning teostati immunofluoresentsanalüüs kasutades CD2AP-, nsP3- ja nsP1-spetsiifilisi või dsRNA-, nsP3-

ja nsP1-spetsiifilisis antikehi Rakud olid kas *mock*-nakatatud (A, C) või nakatatud SFV4-ga (B, D).

2.4 Arutelu

Alfaviiruste mittestruktuursetest valkudest on kõige vähem informatsiooni nsP3-e funktsioonide kohta. Eriti vähe on informatsiooni nsP3 C-terminaalse osa, mida nimetatakse hüpervarieeruvaks domääniks, kohta. Samas võib see region olla oluliseks viiruse bioloogiliste omaduste määrajaks, kuna see pole alfaviiruste seas konserveerunud. Ka puudub sellel järjestusel konkreetne sekundaarstruktuur ja see on küllalt pikk (sõltuvalt viirusest 150-250 aa jääki) võimaldamaks seondumist arvukate peremeesraku valkudega (Neuvonen *et al.*, 2011). Karboksüterminaalse osa algus on seriini ja treoniini jääke pidi tugevalt fosforüleeritud. Kui SFV nsP3 C-terminaalsest osast deleteeriti fosforüleeritud region, suutis viirus küll paljuneda rakukultuuris, kuid oli hiirtes apatogeenne (Vihinen *et al.*, 2000). Ka muud suuremad või väiksemad deletsioonid selles regionis mõjutavad viiruse fenotüüpi *in vitro* (Panas *et al.*, 2012; Varjak *et al.*, 2010) ja *in vivo* (Neuvonen *et al.*, 2011). Need andmed räägivad sellest, et see ruumilise struktuurita ja mittekonserveerunud järjestus on viirusele oluline. Tõsi, see ei ole absoluutne, sest isegi kogu selle ala eemaldamine ei too kaasa viiruse infektsioonilisuse kadumist (Foy *et al.*, 2013). See annab taas tunnistust, et see region ei osale mitte otseselt RNA replikatsioonis (sellisel juhul oleks selle eemaldamine viirusele letaalne), vaid vahendab muid, viirusele olulisi, kuid mitte absoluutselt vajalikke, interaktsioone.

Praeguseks on leitud mitmeid nsP3 C-terminaalse osaga seonduvaid rakulisi valke, kuid lähemalt uuritud on neist vaid mõnda, nt G3BP valke. Enamikel juhtudel pole teada, mis võiks olla tuvastatud interaktsioonide tähtsus, määramata on ka raku valkude täpsed seondumissaidid. On kindlaks tehtud, et amfifüsiin-1 ja -2 seonduvad nsP3 C-terminuses asuvale proliinirikmale SH3 domääni seondavale järjestusele ja et mutatsioonid selles motiivis vähendasid viraalse RNA sünteesi efektiivsust 40% võrra (Neuvonen *et al.*, 2011). Võrrelduna paljude muude mutatsioonidega nii nsP3 C-terminaalses alas ja eriti sellest väljaspool, on see väike efekt, kuid siiski avaldab see mõju viiruse replikatsioonile ning patogeensusele. Kuna raku valke, mida viirus kasutab, on kahtlemata palju rohkem kui viiruse enda kodeeritud valke, võib rakuliste valkude ja viiruse valkude (sh. nsP3) interaktsioonide uurimine anda ülimalt olulist informatsiooni, mida saaks rakendada alfaviiruste vastase ravi väljatöötamisel.

Varem meie laboris läbiviidud katsetes, milles kombineeriti immunosadestamist ja mass-spektromeetriat, identifitseeriti umbes 20 inimese valku, mis seonduvad CHIKV nsP3 C-terminaalse regiooniga. Kõige efektiivsem (kõige suurema rikastusastmega) nendest oli CD2AP, mille kohta oli juba teada, et see valk seondub ka SFV nsP3 karboksüterminaalse osaga. Siiski ei olnud seda interaktsiooni lähemalt uuritud ei nakatatud rakkudes ega ka detailset analüüsi (seondumiskoha määramine) kasutades. Siin töös toodud andmed kinnitasid, et CD2AP ja SFV kui ka CHIKV nsP3 valgud seonduvad; nakatatud rakkudes on näha CD2AP seondumist viiruse replikatsioonikompleksi. Läbi viidud deletsioonanalüüs näitas, et nsP3 seondumisaidiks võib sobida nsP3 C-terminaalne proliinirikas SH3 domääni seondav järjestus. Kuna deleteeritud ala oli ulatuslik, siis edasiseks analüüsiks tuleks deleteerida väiksemaid lõike nsP3 valgust, samuti luua punkt-mutatsioone kandvaid versioone. On võimalik, et erinevalt amfifüsiinidest ei seonu CD2AP mitte PVAPPR motiivile, vaid mingile muule selle elemendi läheduses asuvale järjestusele.

Kahtlemata on kõige huvitavam – ja veel vastuseta – küsimus: mis on CD2AP ja nsP3 vahelise interaktsiooni mõte? Kas viirus kaasab oma replikatsioonikompleksi talle vajalikku faktori või kasutab ta CD2AP abi replikatsioonikomplekside ümberpaigutamiseks rakkudes. Võimalik on ka see, et seondades CD2AP-d seisab viirus vastu mingitele raku viirusvastastele mehhanismidele, milles CD2AP osaleb. Mis iganes see põhjus (või põhjused) ei ole, on selge, et CD2AP, mis nakatamata rakkudes paikneb difuusselt üle kogu raku, moodustab nakatunud rakkudes komplekseid struktuure, milles paiknevad nii nsP3, nsP2 ja nsP1 valgud; kuna need struktuurid sisaldavad ka dsRNAd, peavad need olema viiruse replikatsioonikomplekse sisaldavad vesiikulid. CD2AP on seotud aktiini remodelleerimise ja membraantranspordiga, mis leiavad aset endotsütoosis ja tsütokineesis (Lehtonen *et al.*, 2002) ja mis mõlemad on olulised alfaviiruse replikatsioonikomplekside moodustamisel ja rakusisesel liikumisel (Salonen *et al.*, 2003, Varjak *et al.* 2010, Spuul *et al.*, 2011). On aga ka võimalik, et CD2AP liikumine replikatsioonikompleksidesse takistab retseptor-vahendatud endotsütoosi toimimist ja viiruse nsP3 neutraliseerib seda toimet. Ka on võimalik, et olukord on oluliselt keerulisem – nsP3 seondab kahtlemata kas järjestikku või samaaegselt mitmeid erinevaid raku valke ja nendest mitmekesisest interaktsioonidest tulenevad efektid võivad erineda individuaalsete valkude seondamisest tulenevatest efektidest.

Otsustades immunosadestamise efektiivsuse järgi seondub CD2AP SFV nsP3 C-terminaalsele osale vähem efektiivselt kui CHIKV nsP3 valgu analoogsele regioonile. See võib tuleneda

erinevustest CD2AP seondumissaitides, kuid selle oletuse kinnitamiseks või ümberlukkamiseks on vaja täpne seondumiskoht kõigepealt kindlaks määrata. Seda, kas seondumissaidiks on sama proliinirikas järjestus kui CHIKV puhul, sellest töös ei testitud, kuid on vägagi tõenäoline, et ka SFV puhul on seondumiskohaks SH3 domääni seondav regioon. Kuna ka VEEV nsP3 C-terminaalne regioon seondab CD2AP-d, siis võiks arvata, et selline interaktsioon leiab aset ka teistel alfaviirustel; taas on selle väljaselgitamiseks vajalikud täiendavad katsed. Uurimuses jäi veel käsitemata ka mitu muud väga olulist küsimust. Kindlasti oleks vaja uurida, kuidas mõjutab CD2AP seondamine/mitte seondamine viiruse patogeensust ja RNA sünteesi, või kuidas muutub viiruse infektsioon, kui CD2AP ekspressioon rakus vaigistada. Oluline oleks ka läbi viia katsed CD2AP *knock-out* hiirtes, mis näitaks CD2AP tegelikku mõju viiruse patogeensusele. Saadud informatsioon võib olla abiks CHIKV vastase ravimimisstrateegia väljatöötamisel.

Kokkuvõte

Chikungunya viirus (CHIKV) on positiivse polaarsusega RNA genoomne viirus, mis kuulub perekonda *Alphavirus* (sugukond *Togaviridae*). CHIKV põhjustab pikalt kulgevat ja valulikku artriiti ning infektsioon võib mõningatel juhtudel lõppeda isegi surmaga. Praegusel hetkel puudub selle vastane spetsiifiline ravim või vaktsiin. Kuna CHIKV levikuala on aina suurenenud, kasvab koos sellega ka vajadus ravi järele.

Alfaviiruste genoom kodeerib nelja mittestruktuurset ja viite struktuurset valku. Struktuursete valkude funktsioonid on üsnagi hästi teada. Samuti leidub kirjanduses hulgaliselt informatsiooni mittestruktuursete valkude nsP2, nsP2 ja nsP4 kohta. Kõige vähem on aga mõistetud aga nsP3 valgu funktsioone. Üheks teadaolevaks nsP3 rolliks on seondada mitmeid rakulisi valke. Praeguseks on mitmed neist valkudest identifitseeritud, kuid interaktsioonide olulisus ja spetsiifilised seondumissaidid, millega need valgud interageeruvad, on reeglina teadmata. Varasemad meie laboris läbi viidud katsed on oluliselt pikendanud nsP3-ga interakteeruvate valkude nimekirja, lisades sinna ka CD2AP, mille seondumine toimub eriti efektiivselt.

Käesoleva töö esmaseks eesmärgiks oli kontrollida neid tulemusi erinevaid meetode kasutades, samuti tuvastada CD2AP seondumiskoht CHIKV nsP3 C-terminaalses alas. Saadud tulemused näitavad, et CHIKV nsP3 võib seondada CD2AP-d oma proliinirikka SH3 domääni siduva regiooni abil. Lisaks leiti, et CHIKV nsP3 ja CD2AP kolokaliseeruvad nakatunud rakkudes, interaktsioon leiab aset ka replikatsioonikompleksidel. Kuna nimetatud proliinirikas motiiv on alfaviiruste seas tugevasti konserveerunud, siis ilmnes edasise uurimustöö käigus, et ka SFV nsP3 valgu C-terminaalne domään seondab CD2AP-d, kuigi SFV seondab CD2AP valku võrreldes CHIKV-ga nõrgemini. Need tulemused on samm edasi mõistamaks alfaviiruse nsP3 valgu rolli infektsiooniprotsessis.

The interactions between Chikungunya virus non-structural protein nsP3 and cellular protein CD2AP

Liisi Tarve

Summary

Chikungunya virus (CHIKV) belongs to genus *Alphavirus* family *Togaviridae* and has a positive RNA genome. CHIKV is a human pathogen, that causes incapacitating arthralgia and in some cases, the infection may even result in death. So far there is no effective treatment or licensed vaccine available.

Alphaviruses genome codes four non-structural and five structural proteins. The functions of structural proteins are quite well understood, there is also a lot of information about non-structural proteins nsP1, nsP2 and nsP4. In contrast, little is known about the functions of nsP3. However, earlier experiments in different laboratories (including ours) have shown that nsP3 interacts with many cellular proteins. The proteins are numerous (nearly 20 of them have been identified in our research group) but in general the importance of these interactions and specific binding sites are not yet recognized. One of most interesting among of these proteins is CD2AP which was a top hit in our proteomic screening experiments.

The aim of the present study was to confirm the results of a formerly performed mass spectrometry analysis. The second objective was to identify CD2AP binding site in CHIKV nsP3 C-terminal domain of nsP3. The obtained results showed that CD2AP binds to CHIKV nsP3 via C-terminal proline-rich SH3 binding region. It was also confirmed, that CHIKV nsP3 and CD2AP co-localize in infected cells and this interaction can be seen in vicinity of replication complexes. The proline-rich motif is conserved among alphaviruses and indeed it was demonstrated that C-terminal region of nsP3 of Semliki Forest virus also binds to CD2AP, though compared to CHIKV the binding was significantly weaker. These results represent a step forward in understanding the role of nsP3 in the infection process.

Kasutatud kirjandus

- Rainey, P. B., Heithoff, D. M. and Mahan, M. J. (1997). Single-step conjugative cloning of bacterial gene fusion involved in microbe-host interaction. *Mol. Gen. Genet.* 256: 84-87.
- Ahola, T. and Kääriäinen, L. (1995). Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 507–511.
- Ahola, T., Laakkonen, P., Vihinen, H. and Kääriäinen, L. (1997). Critical Residues of Semliki Forest Virus RNA Capping Enzyme Involved in Methyltransferase and Guanylyltransferase Like Activities. *J. Virol.* 71: 392-397.
- Ahola, T., Lampio, A., Auvinen, P. and Kääriäinen, L. (1999). Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *Embo J.* 18: 3164–3172.
- Ahola, T., Kujala, P., Tuittila, M., Blom, T., Laakkonen, P., Hinkkanen, A. and Auvinen, P. (2000). Effects of palmitoylation of replicase protein nsP1 on alphavirus infection. *J. Virol.* 74: 6725-6733.
- Akhrymuk, I., Kulemzin, S.V. and Frolova, E.I. (2012). Evasion of the Innate Immune Response: the Old World Alphavirus nsP2 Protein Induces Rapid Degradation of Rpb1, a Catalytic Subunit of RNA Polymerase II. *J. Virol.* 86: 7180–7191.
- Barry, G., Breakwell, L., Fragkoudis, R., Attarzadeh-Yazdi, G., Rodriguez-Andres, J., Kohl, A. and Fazakerley, J.K. (2009). PKR acts early in infection to suppress Semliki Forest virus production and strongly enhances the type I interferon response. *J. Gen. Virol.* 90: 1382–1391.
- Bourai, M., Lucas-Hourani, M., Gad, H.H., Drosten, C., Jacob, Y., Tafforeau, L., Cassonnet, P., Jones, L.M., Judith, D., Couderc, T., Lecuit, M., Andre, P., Kümmerer, B. M., Lotteau, V., Despres, P., Tangy, F. and Vidalain, P. O. (2012). Mapping of Chikungunya virus interactions with host proteins identified nsP2 as a highly connected viral component. *J. Virol.* 86: 3121–3134.
- Carey, D.E. (1971). Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *J. Hist. Med. Allied.* 26: 243-62.
- Chen, K. C., Kam, Y. W., Lin, R. T. P., Ng, M. M., Ng, L. F. and Chu, J. J. H. (2013). Comparative analysis of the genome sequences and replication profiles of chikungunya virus isolates within the East, Central and South African (ECSA) lineage. *Virol. J.* 10: 169.
- Cristea, I.M., Carroll, J.-W.N., Rout, M.P., Rice, C.M., Chait, B.T. and MacDonald, M.R. (2006). Tracking and elucidating alphavirus-host protein interactions. *J. Biol.*

Chem. 281: 30269–30278.

Das, P. K., Merits, A. and Lulla, A. (2014). Functional cross-talk between distant domains of Chikungunya virus non-structural protein 2 is decisive for its RNA-modulating activity. *J. Biol. Chem.* 289(9): 5635-5653.

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

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

Dustin, M. L., Olszowy, M. W., Holdorf, A. D., Li, J., Widder, P., Rosenberger, F., van der Merwe, P. A., Allen, P. M. and Shaw, A. S. (1998). A Novel Adaptor Protein Orchestrates Receptor Patterning and Cytoskeletal Polarity in T-Cell Contacts. *Cell.* 94: 667-677

Eng, K.E., Panas, M.D., Murphy, D., Karlsson Hedestam, G.B. and McInerney, G.M. (2012). Accumulation of autophagosomes in Semliki Forest virus infected cells is dependent on the expression of the viral glycoproteins. *J. Virol.* 86: 5674–5685.

Fields, B. N., Knipe, D. M. 1990. *Togaviridae*, p. 697-751. In: *Fields Virology*, 2nd ed. Raven Press, New York.

Forsell, K., Xing, L., Kozlovska, T., Cheng, R.H. and Garoff, H. (2000). Membrane proteins organize a symmetrical virus. *EMBO J.* 19: 5081-5091.

Foy, N. J., Akhrymuk, M., Akhrymuk, I., Atasheva, S., Bopda-Waffo, A., Frolov, I. and Frolova E. I. (2013). Hypervariable domains of nsP3 proteins of New World and Old World alphaviruses mediate formation of distinct, virus-specific protein complexes. *J. Virol.* 87(4): 1997-2010.

Frolov, I., Garmashova, N., Atasheva, S. and Frolova E. I. (2009). Random insertion mutagenesis of sindbis virus nonstructural protein 2 and selection of variants incapable of downregulating cellular transcription. *J. Virol.* 83(18): 9031-9044.

Frolova, E.I., Fayzulin, R.Z., Cook, S.H., Griffin, D.E., Rice, C.M. and Frolov, I. (2002). Roles of nonstructural protein nsP2 and Alpha/Beta interferons in determining the outcome of Sindbis virus infection. *J. Virol.* 76: 11254–11264.

Frolova, E., Gorchakov, R., Garmashova, N., Atasheva, S., Vergara, L.A. and Frolov, I. (2006). Formation of nsP3-specific protein complexes during Sindbis virus replication. *J. Virol.* 80: 4122–4134.

- Frolova, E.I., Gorchakov, R., Pereboeva, L., Atasheva, S. and Frolov, I. (2010). Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *J. Virol.* 84: 11679–11695.
- Fros, J. J., van der Maten, E., Vlak, J. M. and 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: 10394-10400.
- Froshauer, S., Kartenbeck, J. and Helenius, A. (1988). Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes. *J. Cell. Biol.* 107: 2075–2086.
- Gomez de Cedrón, M., Ehsani, N., Mikkola, M.L., García, J.A. and Kääriäinen, L. (1999). RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. *FEBS Letters* 448: 19–22.
- Gorchakov, R., Frolova, E. and Frolov, I. (2005). Inhibition of transcription and translation in Sindbis virus-infected cells. *J. Virol.* 79: 9397-9409.
- Gorchakov, R., Frolova, E., Williams, B.R.G., Rice, C.M. and Frolov, I. (2004). PKR-Dependent and -Independent Mechanisms Are Involved in Translational Shutoff during Sindbis Virus Infection. *J. Virol.* 78: 8455–8467.
- Gorchakov, R., Garmashova, N., Frolova, E. and Frolov, I. (2008). Different types of nsP3-containing protein complexes in Sindbis virus-infected cells. *J. Virol.* 82: 10088–10101.
- de Groot, R.J., Rümenapf, T., Kuhn, R.J., Strauss, E.G. and Strauss, J.H. (1991). Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 8967–8971.
- Hardy, W. R. and Strauss, J. H. (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: 4653-4664.
- Helenius, A., Kartenbeck, J., Simons, K. and Fries, E. (1980). On the entry of Semliki Forest virus into BHK-21 cells. *J. Cell. Biol.* 84: 404–420.
- Her, Z., Kam, Y. W., Lin, R. T. P. and Ng, L. F.P. (2009). Chikungunya: a bending reality. *Microb. Infect.* 11: 1165-1176.
- Jackson, W.T., Giddings, T.H., Taylor, M.P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R.R., *et al.* (2005). Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* 3: e156.

Judith, D., Mostowy, S., Bourai, M., Gangneux, N., Lelek, M., Lucas-Hourani, M., Cayet, N., Jacob, J., Prevost, M. C., Pierre, P., Tangy, F., Zimmer, C., Vidalain, P. O., Couderc, T. and Lecuit, M. (2013). Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. *EMBO Rep.* 14(6): 534-544.

Kamer, G. and Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.* 12: 7269-7282.

Kaneko, T., Li, L. and Li S. S. (2008). The SH3 domain--a family of versatile peptide- and protein-recognition module. *Front. Biosci.* 13: 4938-4952.

Karpe, Y. A., Aher, P. P. and Lole, K. S. (2011). NTPase and 59-RNA Triphosphatase Activities of Chikungunya Virus nsP2 Protein. *PLoS ONE* 6(7): e22336.

Khan, A.H., Morita, K., Parquet, M.C., Hasebe, F., Mathenge, E.G.M. and Igarashi, A. (2002). Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J. Gen. Virol.* 83: 3075-3084.

Kirsch, K. H., Georgescu, M.-M., Ishimaru, S. and Hanafusa, H. (1999). CMS: An adapter molecule involved in cytoskeletal rearrangements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 6211-6216

Koonin, E.V. and Dolja, V.V. (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28: 375-430.

Krejbich-Trotot, P., Denizot, M., Hoarau, J.J., Jaffar-Bandjee, M.C., Das, T., Gasque, P., *et al.* (2011a). Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. *FASEB. J.* 25: 314–325.

Krejbich-Trotot, P., Gay, B., Li-Pat-Yuen, G., Hoarau, J.J., Jaffar-Bandjee, M.C., Briant, L., *et al.* (2011b). Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication. *Virol. J.* 8: 432.

Kuballa, P., Nolte, W.M., Castoreno, A.B. and Xavier, R.J. (2012). Autophagy and the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 30: 611–646

Kujala, P., Ikäheimonen, A., Ehsani, N., Vihinen, H., Auvinen, P. and Kääriäinen, L. (2001). Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. *J. Virol.* 75: 3873-3884.

- Kurkela, S., Manni, T., Vaheri, A. and Vapalahti, O. (2004). Causative agent of Pogosta disease isolated from blood and skin lesions. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 889-894.
- Laakkonen, P., Ahola, T. and Kääriäinen, L. (1996). The effects of palmitoylation on membrane association of Semliki forest virus RNA capping enzyme. *J. Biol. Chem.* 271: 28567-28571.
- Laakkonen, P., Auvinen, P., Kujala, P. and Kääriäinen, L. (1998). Alphavirus replicase protein NSP1 induces filopodia and rearrangement of actin filaments. *J. Virol.* 72: 10265–10269.
- Laakkonen, P., Hyvönen, M., Peränen, J. and Kääriäinen, L. (1994). Expression of Semliki Forest virus nsP1-specific methyltransferase in insect cells and in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 68: 7418–7425.
- Lam, S. K., Chua, K. B., Hooi, P. S., Rahimah, M. A., Kumari, S., Taharmaratnam, M., Chuah, S. K., Smith, D. W. and Sampson, I. A. (2001). Chikungunya infection – an emerging disease in Malaysia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.* 32: 447-451.
- De Lamballerie, X., Leroy, E., Charrel, R. N., Tsetsarkin, K., Higgs, S. and Gould, E. A. (2008). Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Viol. J.* 5:33.
- Lehtonen, S., Zhao, F. and Lehtonen, E. (2002). CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 283: 734-743.
- Li, C., Ruotsalainen, V., Tryggvason, K., Shaw, A. S. and Miner, J. H. (2000). CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 279: 785-792.
- Li, M.-L. and Stollar, V. (2004). Identification of the amino acid sequence in Sindbis virus nsP4 that binds to the promoter for the synthesis of the subgenomic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10: 9429–9434.
- Li, M.-L. and Stollar, V. (2007). Distinct sites on the Sindbis virus RNA-dependent RNA polymerase for binding to the promoters for the synthesis of genomic and subgenomic RNA. *J. Virol.* 81: 4371–4373.
- Linger, B. R., Kunovska, L., Kuhn, R. J. and Golden, B. L. (2004). Sindbis virus nucleocapsid assembly: RNA folding promotes capsid protein dimerization. *RNA.* 10: 128-138.
- Mahy, B. W. J., van Regenmortel, M. H. V. 2008. Togaviruses, p 74-124. In: *Encyclopedia of Virology*, 2nd ed., vol.3. Elsevier, Slovenia.

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

Mancini, E.J., Clarke, M., Gowen, B.E., Rutten, T. and Fuller, S.D. (2000). Cryo-Electron Microscopy Reveals the Functional Organization of an Enveloped Virus, Semliki Forest Virus. *Molecular Cell.* 5: 255–266.

Mayer, B. J. (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *J. Cell Sci.* 114: 1253-1263.

Mayuri., Geders, T. W., Smith, J. L. and Kuhn, R. J. (2008). Role for Conserved Residues of Sindbis Virus Nonstructural Protein 2 Methyltransferase-Like Domain in Regulation of Minus-Strand Synthesis and Development of Cytopathic Infection. *J. Virol.* 82: 7284–7297.

Monzo, P., Gauthier, N. C., Keslair, F., Loubat, A., Field, C. M., Le Marchand-Brustel, Y. and Cormont, M. (2005). Clues to CD2-associated protein involvement in cytokinesis. *Mol. Biol. Cell.* 16: 2891–2902.

Neuvonen, M., Kazlauskas, A., Martikainen, M., Hinkkanen, A., Ahola, T. and Saksela, K. (2011). SH3 domain-mediated recruitment of host cell amphiphysins by alphavirus nsP3 promotes viral RNA replication. *PLoS Pathog.* 7: e1002383.

Neuvonen, M. and Ahola, T. (2009). Differential activities of cellular and viral macro domain proteins in binding of ADP-ribose metabolites. *J. Mol. Biol.* 385: 212–225.

Panas, M. D., Varjak, M., Lulla, A., Eng, K. E., Merits, A., Karlsson Hedestam, G.B. and McInerney, G. M. (2012). Sequestration of G3BP coupled with efficient translation inhibits stress granules in Semliki Forest virus infection. *Mol. Biol. Cell.* 23(24): 4701-4712.

Panas, M. D., Ahola, T. and McInerney, G. M. (2014). The C-terminal repeat domains of nsP3 from the Old World alphaviruses bind directly to G3BP. *J. Virol.* 88: 5888-5893.

Panas, M. D., Schulte, T., Thaa, B., Sandalova, T., Kedersha, N., Achour, A. and McInerney, G. M. (2015). Viral and cellular proteins containing FGDF motifs bind G3BP to block stress granule formation. *PLoS Pathog.* 11(2): e1004659.

Pardigon, N. (2008). The biology of chikungunya: A brief review of what we still do not know. *Pathol. Biol. (Paris).* 57: 127-132.

Park, E. and Griffin, D.E. (2009). Interaction of Sindbis virus non-structural protein 3 with poly(ADP-ribose) polymerase 1 in neuronal cells. *J. Gen. Virol.* 90: 2073–2080.

- Pehrson, J. R. and Fuji, R. N. Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res.* 26: 2837-2842.
- Peränen, J., Rikkonen, M., Liljeström, P. and Kääriäinen, L. (1990). Nuclear localization of Semliki Forest virus-specific nonstructural protein nsP2. *J. Virol.* 64: 1888-1896.
- Peränen, J., Takkinen, K., Kalkkinen, N. and Kääriäinen, L. (1988). Semliki Forest Virus-specific Non-structural Protein nsP3 Is a Phosphoprotein. *J. Gen. Virol.* 69: 2165-2178.
- Powers, A.M. and Logue, C.H. (2007). Changing patterns of chikungunya virus: reemergence of a zoonotic arbovirus. *J. Gen. Virol.* 88: 2363-2377.
- Rana, J., Sreejith, R., Gulati, S., Bharti, I., Jain, S. and Gupta, S. (2013). Deciphering the host-pathogen protein interface in chikungunya virus-mediated sickness. *Arch. Virol.* 158: 1159-1172.
- Rathore, A. P., Nq, M. L. and Vasudevan, S. G. (2013). Differential unfolded protein response during Chikungunya and Sindbis virus infection: CHIKV nsP4 suppresses eIF2a phosphorylation. *Virol. J.* 10: 36.
- Ren, R., Mayer, B. J., Cicchetti, P. and Baltimore, D. (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science.* 259: 1157-1161.
- Rikkonen, M., Peränen, J. and Kääriäinen, L. (1992). Nuclear and nucleolar targeting signals of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Virology.* 189: 462-473.
- Rikkonen, M., Peränen, J. and Kääriäinen, L. (1994). ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *J. Virol.* 68: 5804–5810.
- Robinson, M. C. (1955). An Epidemic of Virus Disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.* 49: 28-32.
- Ross, R. W. (1956). The Newala Epidemic III. The Virus: Isolation, Pathogenic Properties and Relationship to the Epidemic. *J. Hyg. (Lond).* 54: 177-191.
- Rougeron, V., Sam. I-C., Caron, M., Nkoghe, D., Leroy, E. and Roques, P. (2015). Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *J. Clin. Virol.* 64: 144-152
- Rubach, J.K., Wasik, B.R., Rupp, J.C., Kuhn, R.J., Hardy, R.W. and Smith, J. L. (2009). Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro. *Virology.* 384: 201–208.

- Rupp, J.C., Jundt, N. and Hardy, R.W. (2011). Requirement for the amino-terminal domain of sindbis virus nsP4 during virus infection. *J. Virol.* 85: 3449–3460.
- Salminen, A., Wahlberg, J. M., Lobigs, M., Liljeström, P. and Garoff, H. (1992). Membrane Fusion Process of Semliki Forest Virus II : Cleavage-dependent Reorganization of the Spike Protein Complex Controls Virus Entry. *J. Cell. Biol.* 116: 349-357.
- Salonen, A., Vasiljeva, L., Merits, A., Magden, J., Jokitalo, E. and Kääriäinen, L. (2003). Properly folded nonstructural polyprotein directs the semliki forest virus replication complex to the endosomal compartment. *J. Virol.* 77: 1691–1702.
- Scholte, F. E., Tas, A., Martina, B. E. E., Cordioli, P., Narayanan, K., Makino, S., Snijder, E. J. and van Hemert, M. J. (2013). Characterization of Synthetic Chikungunya Viruses Based on the Consensus Sequence of Recent E1-226V Isolates. *PLoS ONE* 8(8): e71047.
- Scholte, F. E., Tas, A., Albuлесcu, I. C., Zusinaite, E., Merits, A. Snijder, E. J. and Hemert, M. J. (2015). Stress granule components G3BP1 and G3BP2 play a proviral role early in chikungunya virus replication. *J. Virol.* 89(8): 4457-4469.
- Schuffenecker, I., Itean, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M.-C., Lavenir, R., Pardigon, N., Reynes, J.-M., Pettinelli, F., et al. (2006). Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* 3: e263.
- Shin, G., Yost, S. A., Miller, M. T., Elrod, E. J., Grakoui, A. and Marcotrigiano, J. (2012). Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109(41): 16534-16539.
- Shirako, Y. and Strauss, J.H. (1998). Requirement for an aromatic amino acid or histidine at the N terminus of Sindbis virus RNA polymerase. *J. Virol.* 72: 2310–2315.
- Simizu, B., Yamamoto, K., Hashimoto, K. and Ogata, T. (1984). Structural Proteins of Chikungunya Virus. *J. Virol.* 51: 254–258.
- Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L. and Devaux, C. (2009). Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virology.* 393: 183-197
- Sourisseau, M., Schilte, C., Casartelli, N., Trouillet, C., Guivel-Benhassine, F., Rudnicka, D., Sol-Foulon, N., Le Roux, K., Prevost, M.C., Fsihi, H., Frenkiel, MP., Blanchet, F., Afonso, P.V., Ceccaldi, P.E., Ozden, S., Gessain, A., Schuffenecker, I., Verhasselt, B., Zamborlini, A., Saïb, A., Rey, F.A., Arenzana-Seisdedos, F., Desprès, P., Michault, A., Albert, M.L. and Schwartz, O. (2007). Characterization of reemerging chikungunya virus. *Plos. Pathog.* 3: e89.

- Spuul, P., Balistreri, G., Kääriäinen, L. and Ahola, T. (2010). Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. *J. Virol.* 84: 7543–7557.
- Spuul, P., Salonen, A., Merits, A., Jokitalo, E., Kääriäinen, L. and Ahola, T. (2007). Role of the amphipathic peptide of Semliki forest virus replicase protein nsP1 in membran association and virus replication. *J. Virol.* 81: 872–883.
- Strauss, E.G., de Groot, R.J., Levinson, R. and Strauss, J.H. (1992). Identification of the active site residues in the nsP2 proteinase of Sindbis virus. *Virology.* 191: 932-940.
- Strauss, J.H. and Strauss, E.G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58: 491–562.
- Strauss, J.H., Strauss, E.G. 2008. Alphaviruses, p 89-105. In: *Viruses and Human Diseases*, 2nd ed. Elsevier Academic Press, Canada.
- Zusinaite, E., Tints, K., Kiiver, K., Spuul, P., Karo-Astover, L., Merits, A. and 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. *J. Gen. Virol.* 88: 1977–1985.
- Tamm, K. (2007). Semliki Forest viiruse mittestruktuurse valgu nsP2 tuumalokalisatsiooni mutantide fenotüüpide kirjeldamine. Tartu Ülikool, Bioloogia-ja Geograafiateaduskond, Molekulaar-ja Rakubioloogia Instituut, Mikrobioloogia javioloogia õppetool. Magistritöö.
- Tucker, P.C. and Griffin, D.E. (1991). Mechanism of altered Sindbis virus neurovirulence associated with a single-amino-acid change in the E2 Glycoprotein. *J. Virol.* 65: 1551–1557.
- Utt, A., Das, P. K., Varjak, M., Lulla, A. and Merits, A. (2015). Mutations conferring a noncytotoxic phenotype on chikungunya virus replicons compromise enzymatic properties on nonstructural protein 2. *J. Virol.* 89(6): 3145-3162.
- Wang, Y.F., Sawicki, S.G. and Sawicki, D.L. (1994). Alphavirus nsP3 functions to form replication complexes transcribing negative-strand RNA. *J. Virol.* 68: 6466-6475.
- Van Bortel, W., Dorleans, F., Rosine, J., Blateau, A., Rousset, D., Matheus, S., Leparc-Goffart, I., Flusion, O., Prat, C. M., Cesaire, R., Najioullah, F., Ardillon, V., Balleydier, E., Carvalho, L., Lemaitre, A., Noel, H., Servas, V., Six, C., Zurbaran, M., Leon, L., Guinard, A., van den Kerkhof, J., Henry, M., Fanoy, E., Braks, M., Reimerink, J., Swaan, C., Georges, R., Brooks, L., Freedman, J., Sudre, B. and Zeller, H. (2014). Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. *Euro Surveill.* 19:20759.

Varjak, M., Žusinaite, E. and Merits, A. (2010). Novel Functions of the Alphavirus nonstructural protein nsP3 C-terminal region. *J. Virol.* 84: 2352-2364.

Varjak, M. (2013). Functional analysis of viral and host components of alphavirus replicase complexes. Tartu Ülikool, Loodus- ja Tehnoloogiateaduskond, Tehnoloogiainstituut. Doktoritöö.

Vasiljeva, L., Merits, A., Auvinen, P. and Kääriäinen, L. (2000). Identification of a novel function of the Alphavirus capping apparatus - RNA 5' triphosphatase activity of Nsp2. *J. Biol. Chem.* 275: 17281-17287.

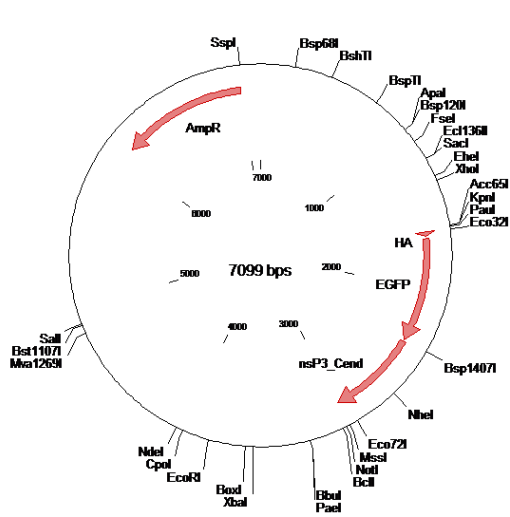
Vazeille, M., Moutailler, S., Coudrier, D., Rousseaux, C., Khun, H., Huerre, M., Thiria, J., Dehecq J.-S., Fontenille, D., Schuffenecker, I., Despres, P. and Failloux A.-B. (2007). Two Chikungunya Isolates from the Outbreak of La Reunion (Indian Ocean) Exhibit Different Patterns of Infection in the Mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS ONE.* 14;2(11): e1168.

Vihinen, H., Ahola, T., Tuittila, M., Merits, A. and Kääriäinen, L. (2001). Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3. *J. Biol. Chem.* 276: 5745–5752.

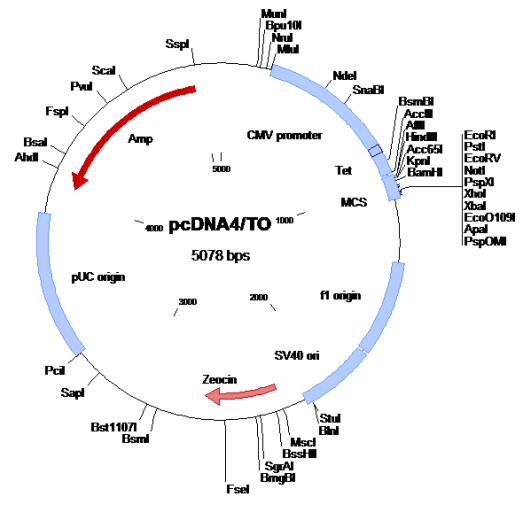
Watson, R. (2007). Europe witnesses first local transmission of chikungunya fever in Italy. *BMJ.* 335: 532-533

Lisa 1.

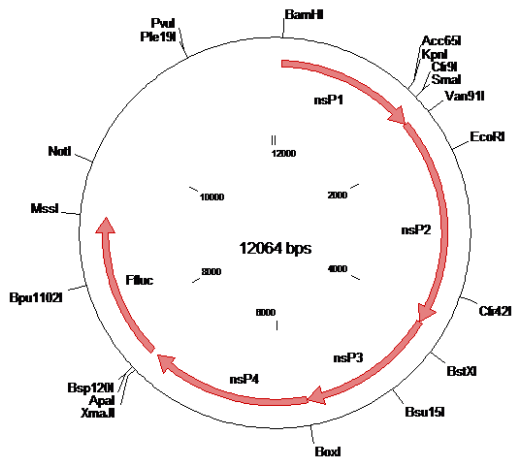
Käesolevas töös kasutatud plasmiidide kaardid. Kaardid on konstrueeritud programmiga „Clone Manager Professional Suite version 8“ („Sci Ed Software“).



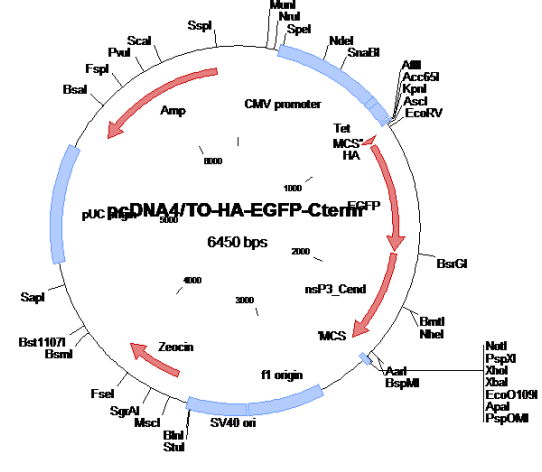
pEF5-HA-EGFP-CHIK-P3end



pcDNA



pCHIKV-SG-FFluc



pcDNA4/TO-HA-EGFP-CHIKV-P3end

LIHTLITSENTS

Mina, Liisi Tarve

(sünnikuupäev: 12.05.1991)

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

Chikungunya viiruse mittestruktuurse valgu nsP3 ja raku valgu CD2AP vahelise interaktsiooni uurimine,

mille juhendajad on Andres Merits, Margus Varjak, Margit Mutso

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

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 10.08.2015 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