

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MIKROBIOLOOGIA JA VIROLOOGIA ÕPPETOOL

Ailar Omler

**Barmah Forest viiruse mittestruktuursete valkude lokalisatsioon
imetajarakus**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendajad
Margit Mutso, PhD
Eva Žusinaite, MD, D. Sc.

Tartu 2017

INFOLEHT

Barmah Forest viiruse mittestruktuursete valkude lokalisatsioon imetajarakus

Alfaviirused on üksikahelalise RNA genoomiga arboviirused, mille hulgast mitmed kuuluvad inimpatogeenide hulka. Kuna paljud alfaviirused nakatavad inimesi ning põhjustavad seejuures ka haigusi, siis on antud viirused pälvinud viroloogide seas laia tähelepanu. Austraalias leviv Barmah Forest viirus (BFV) on võrdlemisi vähe uuritud alfaviirus, kuigi sellega seostatakse igal aastal ligi 1000 ametlikku haigusjuhtu. Käesolevas töös uuriti artriiti, lihasvalu, palavikku ja löövet põhjustava BFV mittestruktuursete valkude lokalisatsiooni imetajarakus ning tulemusi võrreldi teiste laialdasemalt uuritud alfaviiruste vastavate valkude suhtes ja loodi tööriist viiruse edasiseks uurimiseks. Töö ühe tulemusena avastati alfaviiruste seas unikaalne omadus – infektsiooni käigus lokaliseerub osa BFV nsP3 valkudest rakutuumas. Laiemad teadmised konkreetse alfaviiruse interaktsioonidest peremeesrakkudega panustavad potentsiaalsete ravimite avastamisesse kogu viiruste perekonna piires.

Märksõnad: alfaviirused, nsP3, arboviirused, Barmah Forest viirus

CERCS kood: B230

Localization of Barmah Forest virus non-structural proteins in the mammalian cell

Alphaviruses are arboviruses that possess a single-stranded RNA genome. Many of them cause disease in humans and for that very reason, alphaviruses have garnered a lot of attention from virologists. Barmah Forest virus (BFV), an Australian alphavirus, has been the subject of only a modest amount of research, even though it is linked to about a 1000 reported cases of arthritis, myalgia, rash and fever each year. The aim of this thesis was to analyse the cellular localization of individual BFV non-structural proteins and compare the results with other studied members of the genus *Alphavirus*, and to construct tools for further studies of the virus. From the experimental data, a unique feature amongst alphaviruses was found – some of the BFV nsP3 proteins synthesized during the infection are transported into the nucleus. A broader knowledge of one alphavirus's interactions with its host contribute to discoveries of potential antiviral agents within the whole genus.

Keywords: alphaviruses, nsP3, arboviruses, Barmah Forest virus

CERCS code: B230

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. ALFAVIIRUSTEST	8
1.2. VIRION	9
1.3. GENOOM	10
1.4. MITTESTRUKTUURSED VALGUD	10
1.5. ALFAVIIRUSTE INFEKTSIOONITSÜKKEL	12
1.6. BARMAH FOREST VIIRUS	15
1.6.1. BFV INFEKTSIOONI PATOGENEES	15
1.6.2. BFV LEVIK.....	16
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	18
2.1. TÖÖ EESMÄRGID.....	18
2.2. MATERJAL JA METOODIKA	18
2.3. TULEMUSED JA ARUTELU	24
2.3.1. <i>pcDNA4_TO_HA_EGFP</i> vektorisse kloneerimise tulemused.....	24
2.3.2. <i>Western blot</i> analüüsi tulemused.....	25
2.3.3. <i>BFV nsP1, nsP2 ja nsP4</i> lokaliseeruvad seni uuritud alfaviirustele sarnase mustriga	27
2.3.4. <i>BFV nsP3</i> lokalisatsioon imetajarakus on alfaviiruste seas unikaalne ...	29
2.3.5. <i>BFV nsP3</i> tuumalokalisatsioon võib sõltuda makro domeenist.....	30
2.3.6. <i>pSP6_BFVmC</i> kloneerimise ja <i>in vitro</i> transkriptsiooni tulemused.....	34
2.3.7. <i>BFV nsP3</i> lokaliseerub tuumas ka viirusega nakatades	35
KOKKUVÕTE	37
SUMMARY.....	38
KASUTATUD KIRJANDUS.....	40
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	45
LISAD	46
LIHTLITSENTS.....	47

KASUTATUD LÜHENDID

Amp – ampitsilliin

BFV – Barmah Forest viirus

BHK-21 – *baby hamster kidney cells*, vastsündinud hamstri neeru rakuliin

CHIKV – Chikungunya viirus

CMC – *carboxy methyl cellulose*, karboksümetüütselluloos

CMV – *cytomegalovirus*, tsütomegaloviirus

CPV – *cytoplasmic vesicle*, tsütoplasmaatiline vesiikul

DPBS – Dulbecco PBS

dsRNA – *double stranded*, kaksikahelaline

EEEV – *Eastern Equine Encephalitis virus*, Ida hobuste entsefaliidi viirus

EGFP – *enhanced green fluorescent protein*

FBS – *fetal bovine serum*, vasikaloote seerum

GMEM – *Glasgow's Modified Eagle's Medium*

HVD – *hypervariable domain*, hüpervarieeruv domeen

icDNA – *infectious clone*, infektsionilise klooni

IMDM – *Iscoe's Modified Dulbecco's Medium*

Km – kanamütsiin

LB – *lysogeny broth*

MOI – *multiplicity of infection*, infektsioonilisuse kordusarv

NLS – *nuclear localization signal*, tuumalokalisatsiooni signaal

NRAMP - *natural resistance-associated macrophage protein*

nsP – *non-structural protein*, mittestruktuurne valk

NTR – *non-translated region*, mitte-transleeritav regioon

ONNV – O'nyong'nyong viirus

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

PRR – *pathogen recognition receptor*, patogeeni tuvastav retseptor

RdRp – *RNA dependent RNA polymerase*, RNA sõltuv RNA polümeraas

RRV – Ross River viirus

SAV – *Salmonid Alphavirus*, lõheliste alfaviiruse

SESV – *Southern Elephant Seal virus*, lõuna-meriveiste viirus

SDS – *sodium dodecyl sulphate*, naatriumdodetsüülsulfaat

SFV – Semliki Forest viirus

sgRNA – subgenoomne

SINV – Sindbis viirus

ssRNA – *single stranded*, üksikahelaline

ZBD – *zinc-binding domain*, tsinki seondav domeen

U2OS – inimese osteosarkoomi rakuliin

VEEV – *Venezuelan Equine Encephalitis virus*, Venetsueela hobuste entsefaliidi viirus

WEEV – *Western Equine Encephalitis virus*, Lääne hobuste entsefaliidi viirus

SISSEJUHATUS

Viiruseid iseloomustatakse bioloogiliste objektidena, mis paiknevad eluta ja eluslooduse piirimal. Oma elu- või infektsioonitsükli käivitamises ja läbimises ollakse täielikult sõltuvad peremeesorganismist – viirused on obligatoorsed parasiidid. Viiruseid on uuritud juba üle saja aasta ning nende patoloogilise iseloomu ja mitmekesisuse tõttu pälvivad ka tulevikus suurt tähelepanu. Kuna viiruste näol on tegu mõõtnetelt mikroskoopiliste parasiitidega, siis on viroloogia arenenud käsikäes erinevate tehnoloogiatega ja kaasaegne viroloogia käsitleb kõige enam viiruste interaktsioone oma peremeestega just molekulaarsel tasemel, avastamaks uusi viirusvastaseid ravimeetodeid ja vaktsiine.

Perekonna *Alphavirus* esindajad on arboviirused. Alfaviiruste selgroogsete peremeeste ring on üsna lai ning nende hulka kuuluvad ka inimesed. Alfaviiruste patoloogia inimestel avaldub laiemalt kas entsefaliidi või polüartriidi näol ning olenevalt konkreetse alfaviiruse infektsioonist, võib olla haiguskulg üsna tõsine. Nende viiruste meditsiiniline olulisus on viimase mõne kümnendi jooksul märgatavalt tõusnud. See on neile üksikahelalise RNA genoomiga viirustele toonud teadlaste ulatusliku tähelepanu, uurimaks alfaviiruste replikatsioonitsükli, nende poolt kodeeritud valkude individuaalseid omadusi ning patogeneesi kulgu ja patoloogiat nii eri organismides kui ka raku- ja molekulaartasandil.

Barmah Forest viirus (BFV) kuulub alfaviiruste hulka, mis põhjustavad inimeste infektsiooni korral artriiti, lihasvalu, löövet ning palavikku ja igal aastal esineb üle tuhande registreeritud haigusloo. BFV-d seostati inimpatoloogiaga esmalt kaheksakümnendatel ning seni teadaolevalt on viirus levinud vaid Austraalias. Kuna antud viiruse vektoriks on moskiitod ja selgroogseteks kandjateks arvatakse lindusid, siis pole välistatud BFV tegelik veelgi laiem levik. Võrreldes teiste alfaviiruste, näiteks Chikungunya viiruse (CHIKV), Semliki Forest viiruse (SFV) ja Austraalias leviva Ross River viirusega (RRV) on BFV kohta vähe uuritud ning laialdasemad teadmised BFV molekulaarsete mehhanismide vallas võiksid tulevikus luua paremaid võimalusi viirusnakkuse raviks ja ennetamiseks.

Antud uurimistöö eesmärgiks oli uurida, kas BFV mittestruktuursed valgud on imetajarakus sama või sarnase lokalisatsioonimustriga kui seni uuritud alfaviiruste vastavad valgud. Katsete läbiviimisel koondus saadud tulemuste valguses suurem tähelepanu nsP3 valgule, mille puhul täheldati alfaviiruste kontekstis iseäralikku rakulist lokalisatsiooni. Uurimistöö käigus loodi ka markervalku ekspresseeriv rekombinantne BFV, mis on antud viiruse edasises uurimises tähtsaks tööriistaks.

Töö on valminud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis RNA viiruste uurimisgrupis. Suurimad tänuavaldused juhendajatele Margit Mutsole ja Eva Žusinaitele ning tänan kõiki TÜTI RNA viiruste uurimisgrupi liikmeid nõu ja abi eest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Alfaviirustest

Alfaviirused (perekond *Alphavirus*) moodustavad koos perekonnaga *Rubivirus* sugukonna *Togaviridae*. Kui alfaviirustena on klassifitseeritud ligi 30 viirust, siis perekonna *Rubivirus* ainus liige on punetisi põhjustav rubella viirus (Powers *et al.*, 2001; Luers *et al.*, 2005). Alfaviirused kuuluvad arboviiruste hulka ning levivad putukvektori vahendusel. Peamisteks vektoriteks on sääselised, kuid alfaviiruseid kannavad ka täid, lestad ning puugid (Strauss ja Strauss, 1994). Alfaviiruste lõpp peremeesorganismideks on peamiselt imetajad ja linnud, aga esineb ka kalu nakatavaid alfaviiruseid (Griffin, 2013). Erandina on teada Eilat viirus, mis on võimeline nakatama vaid putukaid (Nasar *et al.*, 2012).

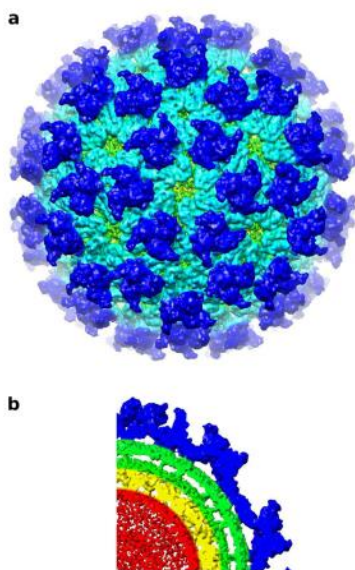
Alfaviirused on laia levikuga ning neid võib leida kõikidelt mandritelt peale Antarktika. Erinevate alfaviiruste levik võib olla üsna piiratud ja sõltub konkreetse alfaviiruse lüljalgsete vektorite eelistatud elupaikadest (Strauss ja Strauss, 1994). Laialdasemalt levivad rändlinde nakatavad alfaviirused, kelle verest toituvad erinevate sääseliste perekondade esindajad. Näiteks käituvad Ida hobuste entsefaliidi viiruse (*Eastern Equine Encephalitis virus*, EEEV) puhul sildvektorina *Aedes* perekonna moskiitod, kes toituvad nii lindude kui imetajate verest.

Alfaviirused on jaotatud peamise leviala alusel Uue ja Vana Maailma viirusteks. Geneetiliste ja seroloogiliste analüüside alusel on alfaviirused jaotatud vähemalt kaheksaks seroloogiliseks kompleksiks (Griffin, 2013). Lääne hobuste entsefaliidi viiruse (*Western Equine Encephalitis virus*, WEEV), EEEV ja Venezuela hobuste entsefaliidi viiruse (*Venezuelan Equine Encephalitis virus*, VEEV) kompleksid hõlmavad peamiselt Uue Maailma alfaviiruseid. Erandina kuulub WEEV kompleksi ka Vana Maailma alfaviiruste tüüpesindaja Sindbis viirus (SINV) (Luers *et al.*, 2005). Vana Maailma viirused kuuluvad Semliki Forest viiruse (SFV), Middelburgi, Ndumu ja Barmah Foresti viiruse (BFV) kompleksidesse, ka siin leiab Semliki Foresti kompleksist Uue Maailma viiruseid: Mayaro viirus ja Una viirus. SFV kompleksi on klassifitseeritud ka patoloogiliselt olulised Chikungunya viirus (CHIKV) ja O'nyong'nyong viirus (ONNV). Eelmainitud gruppidest jäävad välja alfaviirused, mille peremehed on veelise eluviisiga: näiteks lõuna-meriveiste viirus (*Southern Elephant Seal virus*, SESV) ja lõheliste alfaviirus (*Salmonid alphavirus*, SAV) (Griffin, 2013). Esineb ka hüpoteese, et alfaviirused pärinevadki just maailmameredest ning on hiljem leidnud uued peremehed ja vektorid maismaal Uues ja Vanas Maailmas, kummas enne, pole aga tõestatud (Forrester *et al.*, 2012).

Inimesele patogeensed alfaviirused on haigussümptomite alusel jaotatud entsefaliiti põhjustavateks, polüartriiti ning löövet põhjustavateks ja muudeks alfaviirusteks. Entsefaliiti põhjustavad alfaviirused on EEEV, VEEV, WEEV ja teised WEEV kompleksi kuuluvad viirused. Polüartriit ja lööve on sümptomid, mis iseloomustavad näiteks Chikungunya viiruse, Barmah Forest viiruse, Sindbis viiruse, Ross River viiruse (RRV) ning osade teiste Vana Maailma alfaviiruste infektsioone. SFV infektsioon on inimestel üsna levinud, kuid haigussümptomid on ülimalt haruldased. Küll põhjustab SFV entsefaliiti näiteks hiirtel, hamstritel, merisigadel ja muudel loomadel, mistõttu on see olnud laialdaselt kasutusel alfaviiruste uurimismudelina (Griffin, 2013).

1.2. Virion

Alfaviiruste virioni diameeter on ligikaudu 70 nm. Virioni ehitusse kuuluvad viiruse glükoproteiinid, peremeesraku päritolu membraan, kapsiidivalk ja viiruse positiivse polaarsusega RNA genoom (Kuhn, 2013). Alfaviiruste rakulist päritolu membraan on lipiidne kaksikkiht, millesse on ankurdatud viiruse glükoproteiinid E1 ja E2 nende C-terminaalsete domeenide kaudu. E1 ja E2 valgud moodustavad omavahel stabiilseid heterodimeere, mis omakorda ühinevad iseloomulikeks trimeerideks ning moodustavad 80 ogalaadset struktuuri virioni välispinnal (Strauss ja Strauss, 1994). Lipiidne kaksikmembraan katab viiruse kapsiidivalgu C poolt moodustatud nukleokapsiidi, mis omakorda katab viiruse genoomi. T=4 sümmeetriaga ikosaedri moodustavad nii membraani katvad glükoproteiinid kui ka C-valgu 240 koopiat. E1-E2 heterodimeeride ja kapsiidivalkude tõhus interaktsioon on tänu nende 1:1 suhtele virionis ning on oluline pungumisel peremeesrakust (Vaney *et al.*, 2013). Väiksemas hulgas leidub küpsetes virionides veel väikest hüdrofoobset valku 6K, valku TF ning mõnede alfaviiruste puhul ka valku E3 (Strauss ja Strauss, 1994).

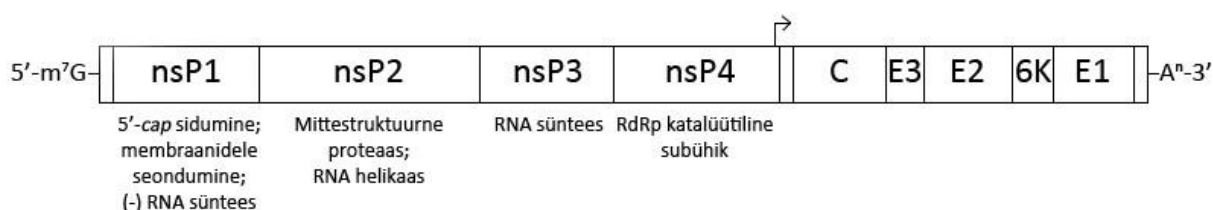


Joonis 1. BFV virion. (a) Virioni üldine ehitus eemalt vaadates (b) Sektor virioni ristlõikest, kus sinine tähistab glükoproteiine, roheline lipiidset kaksikmembraani, kollane kapsiidivalke ning punane genoomi paigutust. Joonis on võetud ja adapteeritud (Kostychenko *et al.*, 2011)

1.3. Genoom

Alfaviiruste genoom on positiivse polaarsusega ssRNA (*single stranded*, üheahelaline) molekul, millel on 5' otsas *cap*-struktuur ning 3' polüadenüleeritud saba. Genoomi mõõtmed on ligikaudu 11–12 kb ning see jaotub kodeeritud valkude funktsioonide alusel kaheks regiooniks. 5'-terminaalne segment, mittestruktuurseid valke (nsP) kodeeriv regioon, moodustab umbes kaks kolmandikku genoomist ning kodeerib replikatsiooniks olulisi valke. Ülejäänud 3'-terminaalne kolmandik kodeerib struktuurseid valke (Joonis 2). Mittestruktuursed valgud transleeritakse otse genoomselt RNA-lt polüproteiini kujul, mis lõigatakse funktsionaalseteks vahevormideks ja individuaalseteks mittestruktuurseteks valkudeks nsP1, nsP2, nsP3 ja nsP4. Struktuurset polüproteiini otse genoomilt ei transleerita, hoopis subgenoomselt 26S mRNA molekulilt (sgRNA). Struktuurne polüproteiin lõigatakse valkudeks E1, E2, C, E3, 6K ja TF (Strauss ja Strauss, 1994; Kuhn, 2013).

Genoomi otstes on mitte-transleeritavad alad (*non-translating region*, NTR), mille pikkused erinevatel alfaviirustel varieeruvad. Alfaviiruste NTR-dest on tuvastatud 4 replikatsiooniks vajalikku *cis*-elementi. Kaks neist jäävad genoomi 5'-otsa, üks on struktuurse ja mittestruktuurse lugemisraami vahel ning neljas vahetult polüadenüleeritud regioonist 3' suunas (Kuhn, 2013).



Joonis 2. Alfaviiruste genoomi üldine ehitus ja organiseeritus. Välja on toodud mittestruktuursete valkude põhilised funktsioonid. Noolega on tähistatud subgenoomne promooter.

1.4. Mittestruktuursed valgud

Mittestruktuursed valgud sünteesitakse esmalt polüproteiinidena P123 või P1234, kusjuures rohkem sünteesitakse esimest varianti. Põhjuseks on UGA stoppkoodoni või opaal-stoppkoodoni asetsemine nsP3 ja nsP4 vahel, millest aeg-ajalt siiski üle transleeritakse ning tulemuseks ongi pikem P1234 polüproteiin. Selle mehhanismiga reguleeritakse infektsiooni käigus viirusliku RNA polümeraasi nsP4 tootmist. SFV ja ONNV mõnede isolaatide genoomis selline stoppkoodon puudub ja on asendatud arginiini koodoniga, seetõttu P123 ei kodeerita üldse (Strauss and Strauss, 1994). Näiteks SFV avirulentse isolaadi rA774 puhul on opaalkoodon olemas, aga hiirtel surmavat entsefaliiti põhjustav tüvi SFV4 kodeerib vaid P1234 polüproteiini (Tuittila *et al.*, 2000).

nsP1, nagu teisedki alfaviiruste nsP-d, on multifunktsionaalne valk, mis omab guaniin-7-metüültransferaasset ja guanüülültransferaasset aktiivsust, vastutades viiruse genoomile 5'-*cap*-struktuuri lisamise eest ning on selle juures väga substraadispetsiifiline (Kuhn, 2013). Rakusiseselt lokaliseerub nsP1 membraanidel, ühtlasi on valk palmitoüleeritud. Olles ainus membraanseoseline alfaviiruse replikaasi valk, siis on ta ülesandeks polüproteiini sidumine tsütopaatilistele vesiikulitele (*cytopathic vesicles*, CPV) genoomi replikatsiooni käigus. Sellisel seostumisel modifitseeritud endosoomidele ja lüsoosoomidele ning just mitte plasmamembraanile, on roll ka nsP3 valgul (Salonen *et al.*, 2003).

nsP2 N-terminaalne pool täidab RNA helikaasi, nukleosiid-trifosfataasi ja RNA trifosfataasi rolli ning osaleb seega samuti 5' *cap*-struktuuri liitmisel genoomile (Strauss ja Strauss, 1994; Vasiljeva *et al.*, 2000). nsP2 reguleerib ka subgenoomse 26S mRNA transkriptsiooni initsiatsiooni (Strauss ja Strauss, 1994). C-terminaalne pool on tsüsteiin-proteaas, mis lõikab mittestruktuurset polüproteiini funktsionaalseteks vahevormideks ning ka lõplikeks mittestruktuurseteks valkudeks, olles seega oluline viiruse negatiivsete ja positiivsete RNA ahelate sünteesil. 50% ekspresseeritud nsP2-st lokaliseerub tsütoplasmaatilisel, teine pool tuumas ning tuuma lokalisatsiooni signaal (*nuclear localization signal*, NLS) on samuti valgu C-terminaalses osas (Merits *et al.*, 2001).

nsP3 täpne roll viiruse replikatsioonil on teadmata, küll on uuritud ja iseloomustatud selle mõningaid funktsioone ja interaktsioone. nsP3 on jaotatud kolmeks regiooniks: makro domeeniks, tsinki seondavaks domeeniks (*zinc binding domain*, ZBD) ja hüper-varieeruvaks regiooniks (*hypervariable domain*, HVD) (Shin *et al.*, 2012; Rupp *et al.*, 2015). N-terminaalne makro-domeen on konserveerunud nii paljude positiivse polaarusega RNA viiruste kui ka bakterite, arhede ja eukarüootsete organismide seas (Pehrson ja Fuji, 1998; Park ja Griffin, 2009). Näidatud on makro-domeeni poolt polü-ADP-riboosi sidumist, aga selle interaktsiooni tähtsus pole teada (Egloff *et al.*, 2006). Samuti on SINV makro-domeenide mutatsioonide abil näidatud, et domeen on oluline viiruse replikatsioonil ning neurovirulentsuse saavutamisel (Park ja Griffin, 2009). Keskmise domeeni ZBD on alfaviiruste seas konserveerunud ning nagu nimi ütleb, on nsP3 võimeline siduma ZBD kaudu tsink ioone. Selline omadus viitab eeldatavale funktsioonile siduda RNA-d, kuna paljud tsink ioone siduvad valgud on võimelised seostuma nukleiinhapetega ning osalema geeniregulatsioonis (Shin *et al.*, 2012). C-terminaalne domeen on varieeruv nii oma pikkuselt kui järjestuselt ning on üsna tolerantne deletsioonide suhtes (Strauss ja Strauss, 1994). Näiteks jäävad siia domeeni olulised erinevused virulentse SFV4 ja avirulentse rA774 SFV tüvede vahel, esinedes aminohappelist erinevustena, UGA

stoppkoodoni või arginiini koodoni vahetusena ning seitsme aminohappelise deletsioonina rA774 tüves (Tuittila *et al.*, 2000; Tuittila ja Hinkkanen, 2003). Paljusk C-terminaalselt on valk seriini ja treoniini jääkide kaudu fosforüleeritud, aga selle omaduse vajalikkus viiruse infektsioonitsüklis on teadmata (Kuhn, 2013), küll on iseloomustatud SINV nsP3 fosforüleerituse taseme seotust negatiivse polaarsusega RNA sünteesil (De *et al.*, 2003). SINV infektsiooni käigus lokaliseerub nsP3 tsütoplasmaatilisesse kompleksidesse, millel on omakorda kaks eri lokalisatsioonipiirkonda: ühed kompleksid kogunevad tuuma lähedusse, teised plasmamembraani ja endosoomide lähedusse (Gorchakov *et al.*, 2008). 30 aminohappejäägi deleteerimisel SFV nsP3 C-terminusest on täheldatud valgu filamentset lokalisatsiooni rakutuumas ümber (Varjak *et al.*, 2010).

nsP4 esindab alfaviiruste replikatsioonikompleksis RNA polümeraasi katalüütilist subühikut. nsP4 hulk rakus võrreldes teiste alfaviiruse mittestruktuursete valkudega on väiksem, mis on osaliselt põhjustatud UGA koodoni paiknemise tõttu enne nsP4 järjestust ning degradatsioonisignaali paiknemisega nsP4 C-terminaalses otsas, mille tõttu vaba nsP4 degradeeritakse (Strauss ja Strauss, 1994). Alfaviiruste seas on konserveerunud ca 100 esimest aminohapet, mis on unikaalsed just alfaviiruste RNA sõltuval RNA polümeraasil (*RNA dependend RNA polymerase*, RdRp). Ülejäänud ca 500 aminohappejääki omavad tüüpilisi motiive ja omadusi tuntud RdRp-dele (Rupp *et al.*, 2015). Konserveerunud N-terminaalne türosiini jääk on valku destabiliseeriv ning nsP4 proteolüüs rakus toimub N-otsa reegli alusel. Replikatsioonikompleksi koosseisus on valk stabiliseeritud (de Groot *et al.*, 1991). nsP4 adenülültransferaasne aktiivsus viib läbi polüA saba reparatsioone ning ühtlasi vastutab selle sünteesi eest alfaviiruse genoomile (Tomar *et al.*, 2006).

1.5. Alfaviiruste infektsioonitsükkel

Tulevasele peremeesrakule seob end alfaviirus oma membraanseoselise glükoproteiini E2 kaudu. Ühist retseptorit, millele kõik alfaviirused seonduksid pole tuvastatud, mis põhjendab ka alfaviiruste laia peremeesringi (Griffin, 2013). SINV üheks retseptoriks on näiteks laminiini retseptor, mis on konserveerunud paljudel imetajatel ning sääseliste rakkudes, kuid tegu pole ainsa retseptoriga või isegi tähtsaimaga, mida seob SINV E2 (Wang *et al.*, 1992). Näiteks on veel tõestatud SINV seondumist plasmamembraansetele kahevalentsete metalliioonide transportvalkudele NRAMP valkudele (*natural resistance-associated macrophage protein*), aga tegu pole taas universaalse retseptoriga, sest RRV E2 nendega ei interakteeru (Rose *et al.*, 2011).

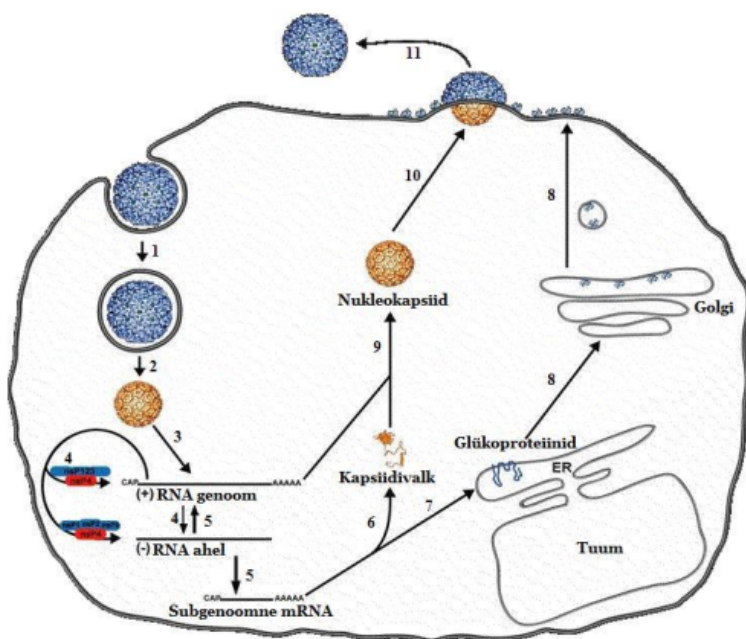
Järgneb viiruspartikli rakku sisenemine endotsütoosi teel, mis on paljudel juhtudel klatriin-sõltuv endotsütoos (Hoornweg *et al.*, 2016), kuid on näidatud ka klatriin-sõltumatut CHIKV sisenemist (Bernard *et al.*, 2010). Nukleokapsiidi vabastamiseks tsütosooli peavad liituma endosoomi ja virioni membraanid, mis on pH sõltuv sündmus (Glomb-Reinmund ja Kielian, 1998). Liitumispeptiid on E1 koosseisus, mis on neutraalsel pH-l kaitstud, kuid madalama pH juures E1 dissotseerub ja moodustab stabiilseid homotrimeere ning sellises konformatsioonis ulatub esile ka E1 liitumispeptiid ja membraanide fuseerumine saab toimuda (Li *et al.*, 2010; Griffin, 2013).

Nukleokapsiidi lahti pakkimine toimub ribosoomide abil ning sellega vabaneb tsütoplasmasse viiruse genoom (Wengler ja Wengler, 2002). Esimesena toimub rakus mittestruktuursete polüproteiinide süntees, mis olenevalt konkreetsest viirusest või tüvest transleeritakse P123 ja P1234 vormidena või ainult P1234 valguna (Strauss ja Strauss, 1994). Peale polüproteiini sünteesi lõikab nsP2 autoproteolüütiliselt polüproteiinist nsP4 valgu, mille tagajärjeks on kompleksi P123+nsP4 moodustumine ja see sünteesib genoomile komplementaarseid negatiivseid ahelaid (Merits *et al.*, 2001). Viirusliku proteaasi kogunedes liitvalgu koostises toimub ka edasine liitvalgu lõikamine. Teisena lõigatakse välja nsP1 valk, mille tulemusel moodustuvad väga lühikest aega eksisteerivad kompleksid nsP1+P23+nsP4 ning konformatsiooniline muutus toob kaasa eelistatava matriitsahela vahetuse negatiivse ahela kasuks. Kiire polüproteiini lõikamine individuaalseteks nsP-deks peädib hilise replikaasikompleksi nsP1+nsP2+nsP3+nsP4 moodustumisega ning viimaks lülitatakse P123 puudumise tõttu täielikult välja negatiivse ahela süntees. Negatiivselt matriitsahelalt sünteesitakse nii genoomset kui ka sgRNA-d struktuursete valkude tootmiseks, kusjuures ülekaalus on sgRNA-de sünteesitase (Lemm *et al.*, 1994; Shirako ja Strauss, 1994).

Alfaviiruste replikatsioon toimub viiruse poolt indutseeritud sopistuste, sfäärulite siseselt. Neid leidub nakatunud rakkude plasmamembraanidel ja modifitseeritud endosoomide ning lüsoosoomide ehk CPV membraanidel (Froshauer *et al.*, 1988; Frolova *et al.*, 2010). Sfääruli sisu on tsütoplasma väikese ava kaudu pidevalt ühenduses ja sopistus ei katkesta membraani (Spuul *et al.*, 2010). Huvitav on ka asjaolu, et sfääruli suurus sõltub sünteesitava RNA molekuli pikkusest (Kallio *et al.*, 2013). Esmene sfäärulite moodustumine toimub plasmamembraanil ning CHIKV puhul jäävadki replikatsioonikompleksid plasmamembraanile paiknema. SINV ja SFV infektsiooni käigus moodustuvad replikatsioonikompleksid plasmamembraanil lokaliseeruvates sfäärulites (Frolova *et al.*, 2010; Thaa *et al.*, 2015), kuid liiguvad endotsütoosile sarnase mehhanismi alusel CPV-de membraanidele ning paiknevad

raku keskosas. Sfääruli tähtsus alfaviiruse replikatsioonil võib olla kaitsta dsRNA (*double stranded*, kaheaahelaline) vaheprodukti peremehe patogeene tuvastavate retseptorite (*pathogen recognition receptor*, PRR) eest. Arvatakse ka funktsiooni replikatsioonikompleksi stabiliseerimisel ning replikatsioonifaktorite koondamisel (Rupp *et al.*, 2015).

Struktuursed valgud sünteesitakse 26S sgRNA-lt polüproteiinina järjekorras C-PE2(E3+E2)-6K-E1. Kapsiidivalk C on autoproteaas, mis lõikab end ülejäänud polüproteiinist lahti ja jääb tsütoplasmaatiliseks (Hahn ja Strauss, 1990). Sellega vabaneb PE2 N-terminus, milles paiknev signaaljärjestus lokaliseerib valgu ER membraani. Sarnased järjestused on ka E2 ja 6K C-terminuses, mis koordineerivad vastavalt 6K ja E1 ümberlokaliseerumist ER membraani. Rakulised proteaasid lõikavad nad edasi E1, 6K, TF ja PE2 valguks (Kuhn, 2013). E3 lõigatakse PE2 valgust Golgi kompleksis rakulise furiini poolt, et toota E2-E1 heterodimeer, mis seejärel lokaliseerub plasmamembraani (Zhang *et al.*, 2003). Alfaviiruste genoomides esineb pakkimissignaali, mis mõnel juhul on nsP1, mõnel juhul nsP2 kodeerivas regioonis (Frolova *et al.*, 1997). Need järjestused tunneb kapsiidivalk spetsiifiliselt ära, mis viib C-valgu oligomeriseerumiseni, moodustamaks 240 C-valgu koopiast ja 1 genoomsest RNA-st nukleokapsiidi (Jose *et al.*, 2009). Plasmamembraanil moodustunud E2-E1 heterodimeeridest trimeerid interakteeruvad E2 hüdrofoobse tsütoplasmaatilise domeeni kaudu nukleokapsiidi valkudega ning virion on valmis punguma peremeesraku plasmamembraanist (Jose *et al.*, 2012).



Joonis 3. Alfaviiruste infektsioonitsükkel.

1. viiruse sisenemine, 2. nukleokapsiidi vabanemine, 3. genoomi vabanemine tsütoplasmasse, 4. mittestruktuursete valkude ja negatiivse RNA ahela süntees, 5. genoomse ja sgRNA süntees, 6. kapsiidivalk vabaneb struktuurset polüproteiinist, 7. viiruse membraanivalkude liikumine ER-i ja nende protsessimine, 8. membraanivalkude liikumine Golgi kompleksi protsessimiseks ning liikumine plasmamembraanile, 9. nukleokapsiidi moodustumine, 10. nukleokapsiid liigub plasmamembraanile, 11. viiruse pungumine. Joonis on võetud Sirle Sauli magistritööst (Sirle Saul, 2010)

1.6. Barmah Forest viirus

BFV on Austraalias tähtsusetult teine arbo- ja alfaviirus RRV järel (Naish *et al.*, 2013). Esmakordselt isoleeriti BFV laiema uuringu raames 1974. aastal Murray orust Barmah metsast kogutud *Culex annulirostris* moskiitodest, mille käigus klassifitseeriti see perekonda *Bunyavirus*. Isoleeritud tüvi BH2193, mis on praeguseks tuntud BFV prototüüptüvena, oli seroloogiliste testide põhjal sarnane Umbre viirusele, millest lähtuti ka esialgsel klassifitseerimisel (Marshall *et al.*, 1982). Hiljem kaheksakümnendatel iseloomustati erinevate molekulaarbioloogiliste ja biokeemiliste meetodite alusel BFV-d juba alfaviiruste hulka kuuluvaks. Selleks määrati BFV üldine morfoloogia, iseloomustati replikatsioonitsükli, kirjeldati selle alfaviirustele omast genoomset RNA-d ja võrreldi glükoproteiinide aminohappelist järjestust teiste alfaviirustega (Dalgarno *et al.*, 1984).

Tänaseks on Vana Maaailma alfaviiruste hulka kuuluv BFV genoom täispikkuses sekveneeritud (Lee *et al.*, 1997) ja fülogeneetiliste analüüside tulemusel paigutatud omanimelisse alfaviiruste seroloogilisse kompleksi, olles ka seni selle ainsaks esindajaks (Powers *et al.*, 2001). Järjestuspõhiselt on lähimad alfaviirused RRV ja SFV, kuigi seroloogilised testid nende viirustega ja teiste alfaviirustega rist-reaktiivsus ei näita. Huvitavaks erandiks on rist-reaktiivsus SINV-ga, kuigi fülogeneetiline kaugus nende viiruste vahel on oluliselt suurem, kui RRV ja SFV puhul (Dalgarno *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1997). BFV genoomi analüüsid on näidanud selle tüüpilist alfaviirustele omast ülesehitust ja suurust, kuid esineb teatud iseärasusi. BFV nsP3 on võrrelduna RRV nsP3-ga üsna lühike: vastavad suurused on 470 aminohappejääki ja 531 aminohappejääki, kus erinevus on mittekonserveerunud C-terminaalses HVD regioonis (Lee *et al.*, 1997). BFV E2 glükoproteiini molekulmass on samuti suhteliselt väike, kuna selle glükosüleerimise tase on madalam, kui teiste alfaviiruste E2 valgul ja antud omadus võib olla põhjuseks, miks BFV vastased antikehad neutraliseerivad kehvalt teisi alfaviiruseid (Lee *et al.*, 1997; Kostyuchenko *et al.*, 2011). Krüo-elektronmikroskoopia meetodiga on näidatud BFV tüüpilist alfaviirustele omast ehitust: genoomi kattev nukleokapsiid, mida omakorda katab lipiidne kaksikmembraan, millesse on ankurdatud viiruse glükoproteiinid (Kostyuchenko *et al.*, 2011).

1.6.1. BFV infektsiooni patogenees

BFV on endeemiline viirus Austraaliale ning seda on diagnoositud igas Austraalia osariigis, ka Tasmaanias. Perioodil 2007-2016 tuvastati Austraalias keskmiselt 1626 BFV haigusjuhtu ja aastate lõikes on juhtumeid kõige enam Queenslandi ning New South Walesi osariikides, ühtlasi leiab kirjandusest enim uuringuid BFV mõjust ja levikust just nende

osariikide statistika põhjal (Department of Health, Australia, 2017). Esimest korda kirjeldati BFV infektsiooni inimesel 1986. aastal (Vale *et al.*, 1986), kuid inimese patoloogiaga seostati viirust alles kaks aastat hiljem (Boughton *et al.*, 1988). Omaselt mitmetele Vana Maaailma alfaviirustele põhjustab BFV nakkus inimestel nahalöövet, lihasvalu, liigesvalu ja palavikku. Samad tunnused on ka RRV infektsioonil, mida peetakse raskemaks haiguseks, kuna lihas- ja liigesvalu on kauem kestvad just RRV infektsiooni puhul, kuigi pikemat haiguskulgu esineb harva ka BFV nakkuse korral. BFV-ga nakatumisel on lööbe esinemine tavalisem ning intensiivsem, RRV puhul esineb tihedamalt artriti (Jacups *et al.*, 2008). Sarnased või peaaegu identsed sümptomid raskendavad kahel infektsioonil vahet teha, mis viib tihtipeale valediagnoosini. Täpsemaks tuvastamiseks on abi molekulaarbioloogilistest meetoditest. Üheks variandiks on tuvastada verest spetsiifilisi BFV vastaseid IgG ja IgM antikehi (Cashman *et al.*, 2008), kuid see meetod võib olla kohati vähetundlik. Varajase nakkuse tuvastamiseks on täpsem reaal-aja pöördtranskriptsioon PCR meetod, mis tuvastab hõlpsalt vireemia ja on tundlikum koekultuuri meetoditest (Hueston *et al.*, 2013).

BFV infektsiooni patogeneesi iseloomustamiseks on välja töötatud hiirtel põhinev loomudel. Selleks kasutati prototüüpse BH2193, mis leiti olevat kõige virulentsem isolaat. Nakatatud hiirtel esineb üldist väsimust, selja küürutamist, karvastiku korrapäratust ning vähestel katseloomadel tagumiste jäsemete nõrkust. Viirus replitseerub liigestes, kuid erinevalt RRV-st, replitseerub BFV lihastes vaid vähesel määral. Ka koekultuuris kasvatatud inimese lihasrakkude nakatamisel näitas BFV oluliselt madalamat replikatsioonitaset võrreldes RRV-ga. BFV puhul esineb ka vähem põletikke ning lihastes ei kutsuta esile põletikuliste mediaatorite taseme tõusu. Üldiselt on BFV poolt põhjustatud haigus kergemalt läbi põetav kui RRV poolt põhjustatud nakkushaigus (Herrero *et al.*, 2014).

1.6.2. BFV levik

BFV lüljaljaseteks vektoriteks on moskiitod *Aedes* ja *Culex* perekondadest. Korduvalt on isoleeritud BFV-d näiteks *Aedes vigilax*, *Culex annulirostris* ja *Aedes notoscriptus* esindajatelt, kuid ühtki neist pole tähtsaima BFV vektorina esile toodud (Quinn *et al.*, 2005; Kay *et al.*, 2007). Tänapäevaks on veel tuvastamata BFV peamine selgroogne peremees, aga olulisteks kandjateks peetakse hobuseid ja rebaskuusut (*Trichosurus vulpecula*) (Kay *et al.*, 2007). Viimasega on aga eksperimentaalsed andmed näidanud BFV infektsiooni liialt madalat vireemiat nakatamaks suures hulgas moskiitosid, mistõttu eeldatakse rebaskuusudelt antud juhul vaid väikest rolli (Boyd *et al.*, 2001). BFV erinevaid isolaate iseloomustab läbivalt kõrge nukleotiidsete järjestuste homogeensus üle kogu levila, mistõttu arvatakse looduslikuks

reservuaariks olevat hoopis linde. Sarnane omadus iseloomustab ka teisi Austraalias lindude poolt edasi kantavaid viiruseid, nagu SINV-d ja Murray Valley entsefaliidi viirust (Poidinger *et al.*, 1997) ning hüpoteesi toetavad katsed, kus viirust kandvate imetajate verest on tuvastatud üsna väikesel hulgal BFV vastaseid antikehi (Boyd *et al.*, 2001; Kay *et al.*, 2007).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Antud uurimistöö põhieesmärgiks oli määrata koekultuuri tingimustes BFV individuaalsete mittestruktuursete valkude rakuline lokaliseerimine imetajarakkudes, kus suurem rõhk langes katsete tulemuste valguses just nsP3 lokaliseerimisele. BFV üksiku nsP3 valgu iseäraliku lokaliseerumismustri tuvastamisel pöördus tähelepanu sellele individuaalsele valgule ning tekkis soov teada, kas ühel või mõnel nsP3 domeenidest on sellisel lokaliseerimisel kaalukam roll.

Eesmärgid:

- Luua plasmiidseid DNA konstrukte, millelt ekspresseeritakse koos fluorestsentsmärgisega üksikud BFV mittestruktuursete valgud;
- Luua plasmiidseid DNA konstrukte, millelt ekspresseeritakse koos fluorestsentsmärgisega BFV nsP3 individuaalsed domeenid;
- Uurida konfokaalmikroskoobiga BFV individuaalsete mittestruktuursete valkude lokaliseerimist imetajarakkudes koekultuuri tingimustes, kus põhirõhk on nsP3 valgu ja selle üksikute domeenide lokaliseerimisel;
- Konstrueerida fluorestsentseerivat markervalgu ekspresseerivat infektsioonilist rekombinantset BFV;
- Uurida konfokaalmikroskoobiga BFV nsP3 lokaliseerimist rekombinantse markervalgu ekspresseeriva BFV abil.

2.2. Materjal ja meetodika

Bakteritüved ja söötmed. Rekombinantsete DNA konstrukte loomisel kasutati *E. coli* tüvesid NEB Turbo ning XL-10. pcDNA4_TO konstrukte kasutati NEB Turbo bakteritüve, mida kasvatati LB (*Lysogeny broth*) söötmes, kuhu lisati lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml ampitsilliini (Amp). pSP6-BFV ning pSP6-BFV-nsP3mC plasmiidide (infektsioonilise kloonide DNA-d, icDNA-d) paljundamiseks kasutati XL-10 tüve, mida kasvatati LB söötmes, kuhu lõppkontsentratsiooniga 25 µg/ml lisati kanamütsiini (Km).

Kasutatud rakuliinid ja söötmed. BHK-21 (*baby hamster kidney*, vastsündinud hamstri neerurakud) rakke kasvatati GMEM (*Glasgow's Modified Eagle's Medium*, Naxo) täissöötmes. U2OS (inimese osteosarkoom) rakuliini, mida kasvatati IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, Naxo) täissöötmes. Mõlemat rakuliini inkubeeriti kasvuks samades

tingimustes: temperatuuril 37 °C, 5% CO₂ kontsentratsioonil ja kõrge õhuniiskusega tingimustes.

Nimekiri kasutatud söötmetest:

- GMEM täissööde: GMEM, 10% FBS (*fetal bovine serum*, vasikaloote seerum), 2% TPB (*tryptose phosphate broth*), 200 mM Hepes (pH 7,2);
- GMEM nakatussööde: erinevalt täissöötmetest on nakatussööde seerumvaba, sisaldab 0,2% BSA (*bovine serum-albumin*);
- 2% GMEM sööde: erinevalt täissöötmetest on lisatud 2% FBS-i;
- GMEM-CMC (karboksümetüülselluloos, *carboxy methyl cellulose*) segu: 2:3 suhtes on segatud 2% GMEM sööde ja 2% CMC;
- IMDM täissööde: IMDM, millesse lisatud 10% FBS.

PCR ja selle abil restriksioonisaitide lisamine. Markervalku mCherry kloneerimiseks pSP6-BFV icDNA-sse teostati PCR praimeritega mCh_F ja mCh_R (Tabel 1). PCR abil viidi fragmendi otstesse *SmaI* restriksioonisaadid. Matriitsiks kasutati meie laboris varem tehtud mCherry markervalku ekspresseerivat infektsioonilist RRV kodeerivat plasmidi. PCR läbiviimiseks kasutati *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* kitti (*Thermo Scientific*) ja reaktsioonisegu lõppmahuks oli 50 µl, mille kokku segamisel lähtuti tootjapoolsest protokollist. Ahelreaktsioon viidi läbi *Biometra T Professional* termotsükleris ning programmi koostamisel kasutati taas polümeraasi kiti tooteprotokoll. Termotsükleri töö lõppedes tõsteti proov jääle. PCR produktisegu töödeldi 30 min *FastDigest DpnI* (*Thermo Scientific*) ensüümiga, et lagundada segust metüleeritud matriits-DNA. Väike hulk proovist kanti koos 6x DNA elektroforeesi värviga geelile, et teostada agarose-geelelektroforees veendumaks läbiviidud PCR-i toimimises.

Tabel 1. mCherry järjestuse amplifitseerimisel kasutatud praimerid

Praimer	Ahel	Järjestus
mCh_F	sense	5' TACCCGGGGGTGGCATGGTGAGCAAG 3'
mCh_R	antisense	5' GAACCCGGGCCCTCCCTTGAC 3'

BFV mittestruktuursete valkude, BFV nsP3-e erinevate domeenide ning CHIKV nsP3 ja SFV nsP3 järjestuste kloneerimiseks pcDNA4_TO_HA_EGFP ekspressioonivektoris kasutati fragmentide amplifitseerimiseks ülal mainitud *Phusion* polümeraasi lähtuvalt selle tooteprotokollist. BFV nsP-de matriitsiks PCR-l oli meie töörühmas varasemalt loodud pSP6-BFV icDNA-d sisaldav vektor ning CHIKV ja SFV nsP3 puhul vastavad infektsioonilised

kloonid. BFV nsP3 üksikute domeenide järjestuse amplifitseerimiseks kasutati matriitsiks pcDNA4_TO_HA_EGFP põhise BFV nsP3 ekspressioonikonstrukti, mis oli minu poolt loodud. Nendesse konstruktidest viidi PCR põhise mutageneesi abil *BamHI* ja *NotI* restriksioonisaaidid kasutades vastavaid primereid (Tabel 2), kus mainitud restriksioonisaaidid on fragmentide järjestustes vastavalt 5' ja 3' otstes. Samuti teostati PCR järgselt *DpnI* töötlus reaktsioonisegule ja kontrolliks agaros-geelelektroforees.

Tabel 2. pcDNA4_TO_HA_EGFP vektorisse kloneeritud insertide amplifitseerimisel kasutatud praimerid

Praimer	Ahel	Järjestus
SFV_P3_F	sense	5' ATGAGGATCCGCACCATCCTACAGAGTTAAGAGAGC 3'
SFV_P3_R	antisense	5' TACTGCGGCCGGTCACCCACCTGCCCTGTCTAGTC 3'
CHIKV_P3_F	sense	5' TATGGATCCGCACCGTCGTACCGGGTAAAAC 3'
CHIKV_P3_R	antisense	5' TACTGCGGCCGGTCACCCACCTGCCCTGTCTAGTC 3'
BFV_P3_F	sense	5'GATCTGGATCCGCACCGGCGTACAG 3'
BFV_P3_R	antisense	5' TTATGCGGCCGCTCACCCGCCGGCTCT 3'
MACRO_F	sense	5'GATCTGGATCCGCACCGGCGTACAG 3'
MACRO_R	antisense	5' TACTGCGGCCGCTCAAGTCCGGTGATCGATTG 3'
ZBD_F	sense	5' TCAGTGGATCCTCGGTTGAGATGGTGCAGGAT 3'
ZBD_R	antisense	5' CTATGCGGCCGCTCATTTGTAAGTTGGTGAACA 3'
HVD_F	sense	5' TCGTCCGATCCCGCCATGCATCAGACGG 3'
HVD_R	antisense	5' TTATGCGGCCGCTCACCCGCCGGCTCT 3'
BFV_P1_F	sense	5' CGTTGGATCCATGGCGAAACCAGTTG 3'
BFV_P1_R	antisense	5' CGTTGCGGCCGCTCATTCCCCTGCACGCTGGTCGA 3'
BFV_P2_F	sense	5' CGTTGGATCCGGGGTAGTGGAAC 3'
BFV_P2_R	antisense	5' CGTTGCGGCCGCTCAACTGCCCCGCCGGTAA 3'
BFV_P4_F	sense	5' CGTTGGATCCTACATTTTTTCGTCA 3'
BFV_P4_R	antisense	5' CGTTGCGGCCGCTCAATTTAGGACCACCGTAGAGATGTATT 3'

Kloneerimine. Amplifitseeritud ja töödeldud PCR produktid ligeeriti pJET1.2/blunt kloneerimisvektoris, kasutades selleks *CloneJET PCR Cloning* kitti (*Thermo Fisher*) ja järgides tootjapoolset protokoll. Loodud konstruktide loend on tabelis 3.

Ligatsioonisegudega transformeeriti kuumasoki meetodil *E. coli* NEB Turbo rakke. Selleks segati ligatsioonisegu ~200 µl kompetentsete *E. coli* rakkude suspensiooniga ning inkubeeriti 30 min jääl. Järgnev kuumašokk teostati termoplokis 42°C juures 2 min vältel, millele järgnes 3 min jääl hoidmine. Seejärel lisati segudele 800 µl LB vedelsöödet ning bakterirakke inkubeeriti loksutis 37 °C juures tund aega. Rakud tsentrifuugiti tuubi põhja (3220 g, 5 min) ja resuspendeeriti 100 µl söötmes. Rakud plaaditi LB agariga ning vastava selektiivse antibiootikumiga Petri tassidele ning inkubeeriti 14-16 h 37 °C juures.

pJet1.2 vahekonstruktide plasmiidse DNA eraldamiseks valiti transformeeritud bakteritassidelt erinev hulk bakterikolooniaid, millega inokuleeriti 3 ml LB söödet, millesse lisati kas Amp või Km. Bakterikultuuri kasvatati loksutis 37 °C juures loksutamiskiirusel 220

rpm 12-16 h. Plasmiidne DNA puhastati minipreparatsiooni teel kolonnpuhastamisega, kasutades kommertsiaalset kitti (*FavorPrepTM Plasmid Extraction Mini Kit, Favorgen Biotech Corp.*). Puhastatud DNA õigsust kontrolliti restriksioonanalüüsi ja agaros-geelelektroforeesiga ning Sangeri sekveneerimisega.

pJet1.2 vahekonstruktidest lõigati välja vastavalt mCherry fragment *SmaI* (*FastDigest, Thermo Scientific*) ning ülejäänud fragmendid *BamHI* ja *NotI* (*FastDigest, Thermo Scientific*) kasutades. Restriksioon viidi läbi 1 h jooksul temperatuuril 37 °C. Õige suurusega DNA fragmendid lõigati agarosgeelist välja ning puhastati kolonnpuhastamise abil (*NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel*). Samade ensüümidega samades tingimustes lõigati ka insertisoonisaidi loomiseks vastavaid vektoreid ning töödeldi aluselise fosfataasiga *FastAP* (*Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Scientific*) vältimaks vektorite iseligeerumist. pcDNA4_TO_HA_EGFP vektorisse ligeeriti inserdid EGFP valgu C-terminaalsesse otsa, pSP6-BFV icDNA vektorisse kloneeriti mCherry järjestus nsP3 järjestuse C-terminaalsesse ossa *SmaI* saiti. Ligeerimiseks kasutati T4 DNA ligaasi (*InvitrogenTM*), 5x T4 DNA ligaasi puhvrit ning reaktsioonid viidi läbi üleöö 4 °C juures või kahe tunniga toatemperatuuril. Ligatsioonisegudega transformeeriti kuumašoki meetodil *E. coli* bakterirakke, plasmiidne DNA eraldati minipreparatsiooniga, millele järgnes kontrollrestriksioon ning järjestuste õigsust kontrolliti Sangeri sekveneerimisega. Valmistatud plasmiidid on loendatud **tabelis 3**. Suuremas koguses plasmiidide paljundamiseks kasutati iga konstrukti jaoks 100 ml LB söödet, kuhu lisati kas Amp või Km ja inkubeeriti 220 rpm loksutis 37 °C juures 12-16 h. Plasmiidsete DNA konstruktide kolonnpuhastamiseks (midipreparatsiooniks) kasutati *NucleoBond® Xtra Midi EF* kitti. Puhastatud DNA kontsentratsioonid mõõdeti NanoDrop 2000c spektrofotomeetriga.

Tabel 3. Valmistatud plasmiidid

pSP6-BFVmC	Viiruse infektsiooniline plasmiid
pcDNA4_TO_HA_EGFP_BFVnsP1	ekspressioonikonstrukt
pcDNA4_TO_HA_EGFP_BFVnsP2	ekspressioonikonstrukt
pcDNA4_TO_HA_EGFP_BFVnsP3	ekspressioonikonstrukt
pcDNA4_TO_HA_EGFP_BFVnsP4	ekspressioonikonstrukt
pcDNA4_TO_HA_EGFP_CHIKVnsP3	ekspressioonikonstrukt
pcDNA4_TO_HA_EGFP_SFVnsP3	ekspressioonikonstrukt
pcDNA4_TO_HA_EGFP_BFVmacro	ekspressioonikonstrukt
pcDNA4_TO_HA_EGFP_BFVzbd	ekspressioonikonstrukt
pcDNA4_TO_HA_EGFP_BFVhvd	ekspressioonikonstrukt
pcDNA4_TO_HA_EGFP_BFVmacro-zbd	ekspressioonikonstrukt
pcDNA4_TO_HA_EGFP_BFVzbd-hvd	ekspressioonikonstrukt

In vitro transkriptsioon. pSP6-BFV-nsP3mC plasmid lineariseeriti *Xma*II (*FastDigest*, *Thermo Fisher*) restriktasiga (lõikas plasmidi vahetult peale polüA järjestust) 1 h jooksul 37 °C juures. Lineariseeritud plasmid puhastati järgnevalt *Zymo Research DNA Clean and ConcentratorTM* kitiga, elueeriti 10 µl vees. Lineariseerimisreaktsiooni toimimist hinnati agaros-geelelektroforeesiga 0,8% TAE agarosgeelis ning DNA kontsentratsioon mõõdeti NanoDrop 2000c spektrofotomeetriga.

In vitro transkriptsiooniks kasutati kommertsiaalset komplekti *mMESSAGE mACHINE® SP6 Transcription Kit* (*Thermo Fisher Scientific*). Lähtuvalt tooteprotokollist segati kokku reaktsioonisegu lõppmahuga 5 µl: 2,5 µl NTP/CAP-analoogi lahust, 0,5 µl 10x reaktsioonipuhvrit, 0,5 µl SP6 ja RNAasi inhibiitori ensüümisegu, 0,75 µl 20 mM GTP lahust ja 0,75 µl matriits-DNA (kogus lõpplahuses 195 ng). RNA süntees viidi läbi 1,5 h jooksul 37 °C juures ning RNA proovile lisati 10 µl steriilset vett. RNA sünteesi efektiivsuse, saagise ja kvaliteedi hindamiseks analüüsiti 1/10 RNA proovi agaros-geelelektroforeesil.

RNA elektroporatsioon. 90% konfluentsusega BHK-21 rakud koguti ~10 ml GMEM söötmes ning tsentrifuugiti 5 min jooksul 201 g põhja. Sööde aspireeriti ning rakud resuspendeeriti tihedusega $\sim 8 \times 10^6$ rakku 800 µl jääkülmas PBS-s (*phosphate buffered saline*, fosfaat-puhverdatud soolalahus).

800 µl rakususpensiooni tõsteti 4 mm elektrodide vahega jääkülma elektroporatsiooni küveti, millele lisati *in vitro* sünteesitud RNA. Elektroporaatoril (*BioRad GenePulser Xcell*) seadistati parameetriteks 850 V ja 25 µF. Küvetist lasti vool läbi kaks korda, kus voolupulsside vahel segati poratsioonisegu küveti seinale koputades. Elektroporatsiooni järgselt lisati koheselt rakususpensioonile 800 µl söödet, segu suspendeeriti ning kanti uuele koekultuuri tassile, mis sisaldas 7 ml 2% GMEM söödet. Transfekteeritud rakke inkubeeriti 24-48 h (tsütopaatilise efekti ilmnemiseni) temperatuuril 37 °C, 5% CO₂ keskkonnas, kõrge õhuniiskusega inkubaatoris.

Viirusvaru kogumine ja rakkude nakatamine rekombinantse viirusega analüüsiks konfokaalmikroskoobiga. Viiruse infektsioonilise RNA-ga elektroporeeritud rakkudelt koguti sööde 15 ml koekultuuri tuubi, mida tsentrifuugiti 3220 g 10 min 4 °C juures. Supernatant (sisaldas rekombinantseid virione) koguti 1 ml koguste kaupa viaalidesse edasiseks kasutamiseks ning hoiustamiseks.

Valmistamaks preparaati, millega jälgida markervalguga nsP3 lokalisatsiooni imetajarakus, pandi BHK-21 rakud kasvama 24-auguga koekultuuri plaadil, milles aukude

põhja oli asetatud preparaadi katteklaasid. Kui rakud olid saavutanud kasvutiheduseks umbes 90%, siis nakatati rakke rekombinantse viirusega 200 µl nakatussöötmes, arvestades ühe infektsioonilise virioni ühe raku kohta ehk MOI=1 (*multiplicity of infection*, infektsioonilisuse kordusarv). Inkubeeriti taas temperatuuril 37 °C ja 5% CO₂ kontsentratsioonil ning iga 10-15 min tagant loksutati rakuplaate. Ühe tunni möödudes lisati tassi aukudesse 2% GMEM sööde. 8 h möödudes jälgiti valgusmikroskoobiga viiruse tsütopaatilist efekti rakkudele ja fluorestsentsmikroskoobiga markervalgu ekspressiooni intensiivsust.

DNA elektroporatsioon. U2OS rakud koguti eelpool kirjeldatud viisil ning $\sim 6 \times 10^6$ rakku suspendeeriti 250 µl IMDM söötmes ning 250 µl rakususpensiooni tõsteti 4 mm elektroodide vahega küvettidesse. Rakususpensioonile lisati 5 µg vastavat DNA-d, 5 µl *carrier* DNA-d (lõhe spermi DNA) ja 1,25 µl Na-Bes ning teostati elektroporatsioon parameetritega 180 V ja 975 µF. Poreeritud rakususpensioonid kanti uutele 100 mm koekultuuri tassidele, millesse eelnevalt oli pandud 7 ml IMDM söödet. Samade tasside põhja oli pandud mikroskoopia tarvis katteklaasid, et ühelt rakutassilt koguda nii transfekteeeritud rakkude lüsaadid, kui ka rakkudega katteklaasid fluorestsentsmikroskoopia tarvis. Elektroporeeritud rakke inkubeeriti temperatuuril 37 °C, 5% CO₂ tingimustes ning kõrge õhuniiskusega inkubaatoris. Järgmisel päeval kontrolliti transfektsiooni efektiivsust fluorestsentsmikroskoobiga, koguti katteklaasid fluorestsentsmikroskoopia jaoks ja ülejäänud rakud lüüsi 1x Laemmli puhvris (50 mM Tris (pH 6,8; 2% SDS; 0,1% broomfenoolsinine; 10% glütserool; 0,1 M dithiothreitol) valgu detekteerimiseks western blotiga.

Rakkude fikseerimine ning rakupreparaatide ettevalmistamine analüüsiks konfokaalmikroskoobiga. Nakatatud ning transfekteeeritud rakud fikseeriti sama protokollil alusel. Rakkudelt aspireeriti sööde ning pesti kaks korda DPBS-ga (*Dulbecco's* PBS). Rakkude fikseerimiseks inkubeeriti neid 15 min DPBS-s lahjendatud 4% paraformaldehüüdi lahuses. Seejärel pesti rakke kolm korda DPBS-ga ning kaks korda deioniseeritud veega. Katteklaasid, millele olid kinnitunud fikseeritud rakud tõsteti rakuplaadilt õhu kätte mõneks minutiks kuivama ja selle aja vältel pipeteeriti alusklaasidele sulundusvedelik: iga katteklaasi kohta 4 µl *SlowFade* reagendi ja DAPI lahust (Thermo Scientific).

Western blot analüüs. Analüüsiks kasutati pcDNA4_TO_HA_EGFP vektoril põhinevate konstruktidega transfekteeeritud U2OS rakkude lüsaate. Rakud lüüsi 24 h peale transfekteeerimist, valkude ekspressioon tehti kindlaks ka fluorestsentsmikroskoobiga. Lüüsimiseks kanti rakkudele 500 µl 2x Laemmli lüüsi puhvrit. Kogutud rakulüsaate kuumutati 100 °C juures 10 min ning tsentrifuugiti 17 000 g 5 min. Ligikaudu 150 000 rakule vastav kogus

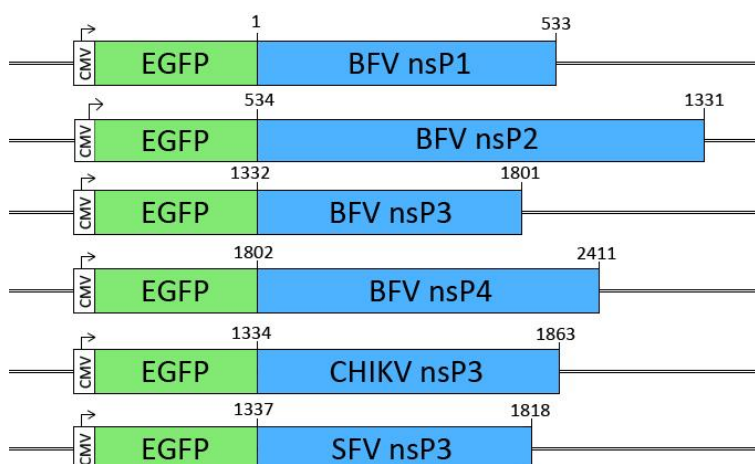
rakulüsaati kanti igasse 10% SDS-polüakrüülamidegeeli hambasse ja valgud lahutati elektroforeesil 1x SDS foreesipuhvris (0,125 M Tris; 0,9 M glütsiin; 0,5% SDS). Valgud kanti üle nitrotselluloosmembraanile (*Amersham™ Protran®*) *Semi-Dry* ülekandepuhvris (48mM Tris, 39mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% metanool) pingel 15 V 45 min jooksul, kasutades firma *BioRad Trans-Blot Semi-Dry* aparati. Nitrotselluloosmembraani blokeeriti ühe tunni jooksul loksutil toatemperatuuril 5% lõssilahuses, mis lahustati *western bloti* pesulahuses (50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,1% Tween20). Järgnevalt inkubeeriti membraani tund aega loksutil toatemperatuuril EGFP või BFV nsP2 vastase küülikus toodetud antikehaga, vastavalt lahjendustega 1:20 000 ja 1:1000 2% lõssilahuses. Sellele järgnes membraani pesu loksutil pesulahusega (3x 10 min). Sekundaarne küüliku IgG vastane määrõika peroksüdaasiga konjugeeritud kitse antikeha lahustati samuti 2% lõssilahuses, milles inkubeeriti membraani 45 min kuni 1 h. Järgnes membraani pesu loksutil pesulahusega (3x 10 min). Kemoluminestsentsi indutseerimiseks membraanil segati 1:1 suhtes *GE Healthcare Amersham ECL Western Blotting Detection* kiti reagentid ning antud segu kanti membraanile, mis kinnitati kahe tsellofaankile vahele. Signaali registreerimiseks eksponeeriti membraani röntgenfilmile ja röntgenfilm ilmutati pimikus.

2.3. Tulemused ja arutelu

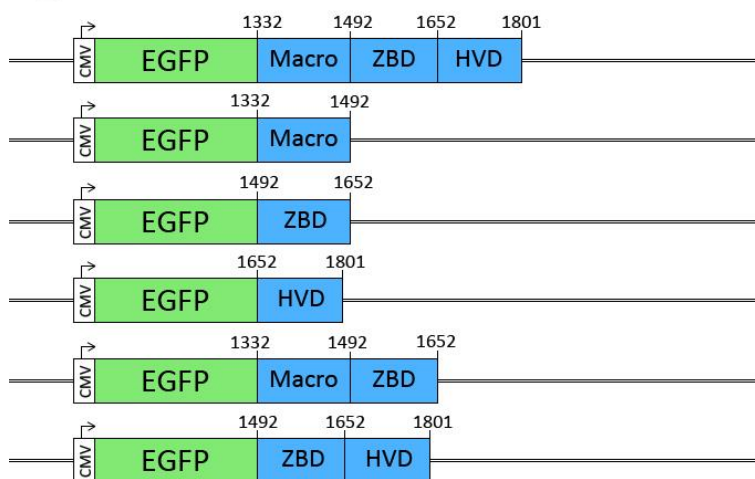
2.3.1. pcDNA4_TO_HA_EGFP vektorisse kloneerimise tulemused

pcDNA4_TO vektori baasil oli meie laboris varasemalt loodud HA märgist (gripiviiruse hemaglutiniini valgust pärit peptiid) ning EGFP markervalku ekspresseeriv vektor, millega uurida eukarüootses rakus huvipakkuvate valkude ekspressiooni fluorestsentsmärgise abil. Minu poolt loodi antud vektorit kasutades plasmidsed ekspressioonikonstruktid, kuhu kloneeriti BFV individuaalsed nsP-d, SFV ja CHIKV nsP3 järjestused ning eraldi BFV nsP3 üksikute domeenide või kõrvuti asetsevate domeenide ühised järjestused. Järjestused sisestati vektorisse EGFP C-terminaalse otsa järele, kus eukarüootses rakusüsteemis ekspresseeritakse CMV (*cytomegalovirus*) varajase promooteri kontrolli allt HA-EGFP liitvalk (Joonis 4). Selleks, et rakus ekspresseeritaks korrektse pikkusega valk, lisati PCR põhise mutageneesi abil uuritavate valkude C-terminustesse ka stoppkoodon.

A



B



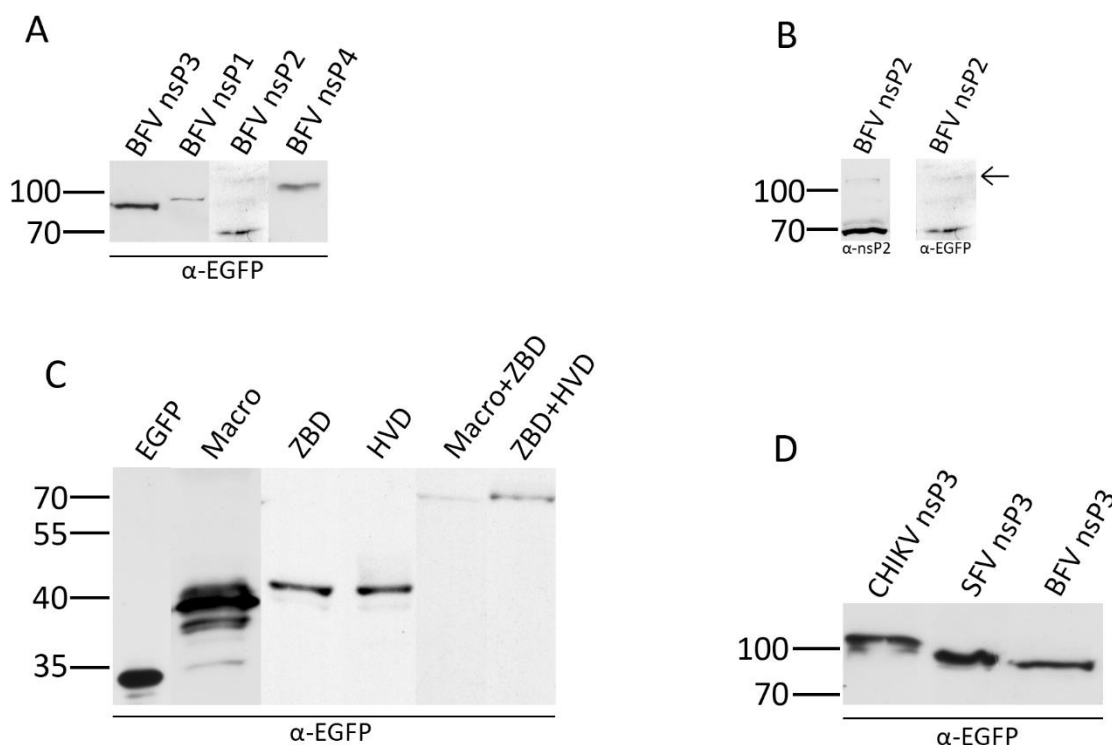
Joonis 4. DNA ekspressioonikonstruktid vektoris pcDNA4_TO_HA_EGFP. (A) Individuaalsed BFV nsP-d ning CHIKV ja SFV nsP3 plasmidsed konstruktid koos EGFP markervalguga. **(B)** Esimene konstruktijoonis näitab eraldi BFV nsP3 domeenide jaotust, teised on nii üksikute domeenidega konstruktid, kui valgus kõrvuti asetsevate domeenide ühised järjestused. Arvudega on välja toodud transleeritud valkude aminohappeline suurus vastavate mittestruktuursete polüproteiinide kontekstis, kus arvud esindavad aminohappejärjestustes valgu esimest ja viimast aminohappejääki.

Kloneerimise tulemuste õigsus määrati restriksioonanalüüsiga, kasutades *BamHI* ja *NotI* restriktase, mida kasutati ka insertide sisestamiseks vektorisse. Veendumaks, et sisestatud järjestused on täies ulatuses õiged, teostati Sangeri sekveneerimine ning Clone Manager tarkvara abil analüüsiti sekveneerimistulemused, millega kinnitati, et sisestatud järjestused olid täies pikkuses korrektsete nukleotiidsete järjestustega.

2.3.2. Western blot analüüsi tulemused

Western blot analüüsiga näidati pcDNA4_TO_HA_EGFP vektorisse loodud ekspressioonikonstruktidega transfecteeritud rakkudes, et ekspresseeritud on õige suurusega

rekombinantsed valgud. Valkude tuvastamisel pidi arvesse võtma kirjanduses esitatud üksikute valkude molekulmassidele lisaks asjaolu, et ekspresseeriti alati uuritud valgu ja HA-EGFP liitvalku, millest viimase molekulmass on ~30 kDa.



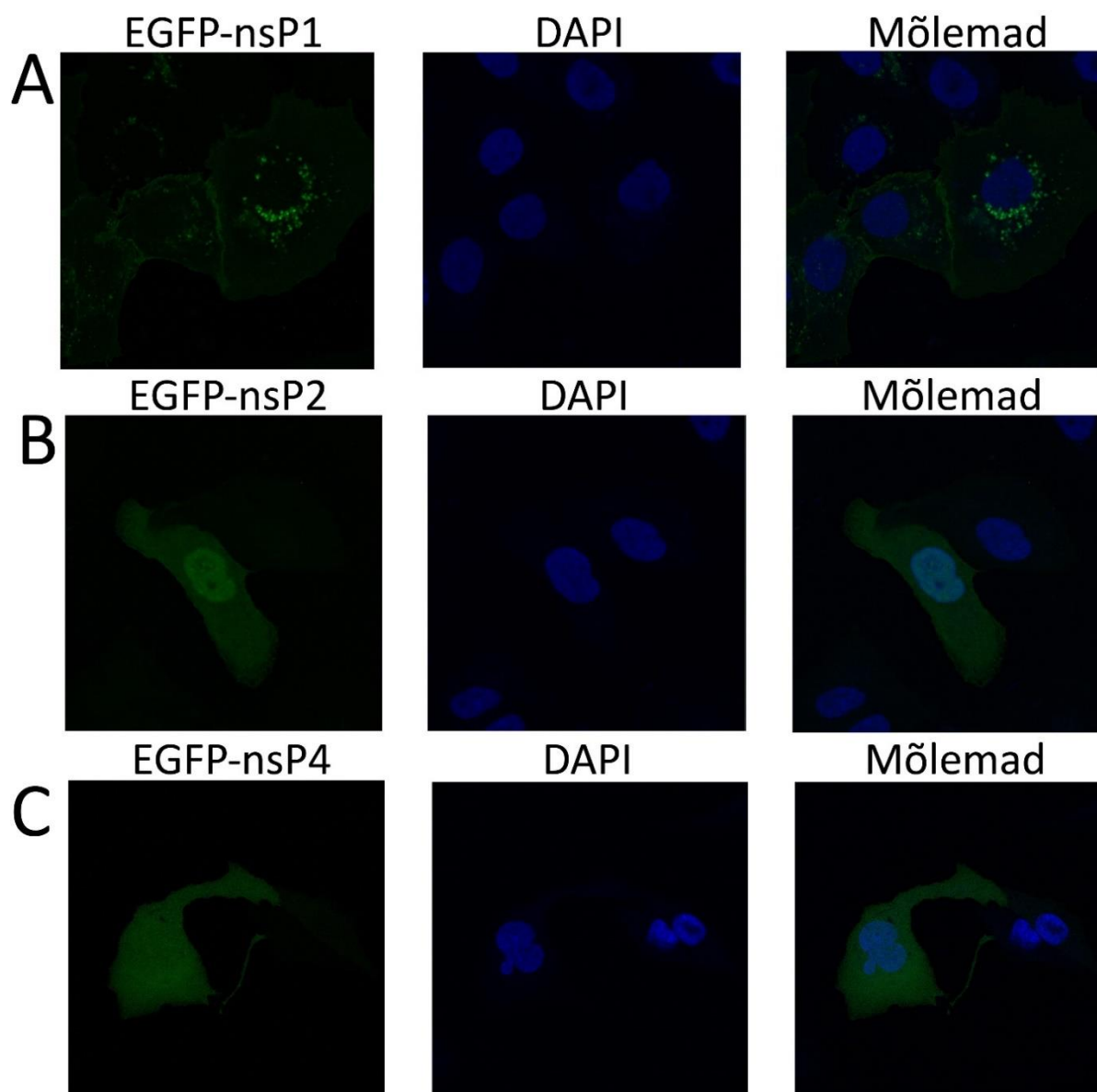
Joonis 5. Western blot analüüsi tulemused. (A) BFV HA-EGFP-nsP1–4 ekspressioonikonstruktidega transfecteeritud U2OS rakud, valkude ekspressioon on detekteeritud EGFP vastase antikehaga. (B) BFV HA-EGFP-nsP2 plasmiidiga transfecteeritud rakud, tuvastatud vastavalt α -nsP2 ja α -EGFP antikehaga; noolega on tähistatud nsP2 ligikaudne asukoht. (C) BFV nsP3 domeenide järjestustega ekspressioonikonstruktidega transfecteeritud U2OS rakud, märgistatud EGFP vastase antikehaga. (D) CHIKV, SFV ja BFV nsP3-HA-EGFP valgud, α -EGFP.

EGFP vastaste antikehadega tuvastatud BFV mittestruktuursed valgud liidetuna HA-EGFP märgistega vastasid oodatud molekulmassidele: nsP1 on ~90 kDa, nsP2 ~120 kDa, nsP3 ~85 kDa ja nsP4 ~110 kDa (Joonis 5 A). Kuna ilmutatud filmil oli nsP2 vastav triip väga nõrgalt näha, siis veendumaks nsP2 ekspressioonis detekteeriti seda ka BFV nsP2 vastaste antikehadega. Joonisel 5 paneelil B on toodud võrdlus nsP2 ja EGFP vastaste antikehadega detekteeritud valkude vahel. Mõlemal puhul on näha ca 120 kDa suurust triipu ning ka ca 70 kDa suurust ebaspetsiifilist märgistust, mis võib olla tingitud antikehade ebaspetsiifilisest seondumisest mõnele rakulisele valgule. Joonisel 5 paneelil C näidatud BFV nsP3 üksikute domeenide molekulmassid vastavad oodatud molekulmassidele ~45 kDa. Ühtlasi on kontrolliks tühi pcDNA4_TO_HA_EGFP vektoriga transfecteeritud rakkude lüsaat, mille puhul on näha HA-EGFP valgu oodatud ~30 kDa suurust triipu. Makro domeeni triibu hajusus võib olla tingitud antud valgu võimalikust rakusisesest proteolüüsist. Paneelil D on näidatud CHIKV, SFV ja BFV nsP3 triibud, mis vastavad oodatud suurustele vastavalt ~110 kDa, ~90 kDa ja ~85

kDa. Saadud tulemuste alusel võib järeldada, et transfecteeritud rakkudes, millega teostati edasised analüüsid konfokaalmikroskoobiga, ekspresseeriti õigete suurustega valgud.

2.3.3. BFV nsP1, nsP2 ja nsP4 lokaliseeruvad seni uuritud alfaviirustele sarnase mustriga

Koekultuuris transfecteeritud U2OS rakkudes sai fikseerimisjärgselt analüüsida konfokaalmikroskoobiga BFV individuaalsete mittestruktuursete valkude rakulist lokalisatsiooni imetajarakkudes. Fikseeritud rakupreparaatide vaatlemisel kasutati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi konfokaalmikroskoopi Zeiss LSM710. Kõik fotod võeti üles kasutades objektiivi suurendusega 63x, kasutades õli-immersioonsüsteemi ja jälgiti rohelist (EGFP) ja sinist (DAPI) signaali.

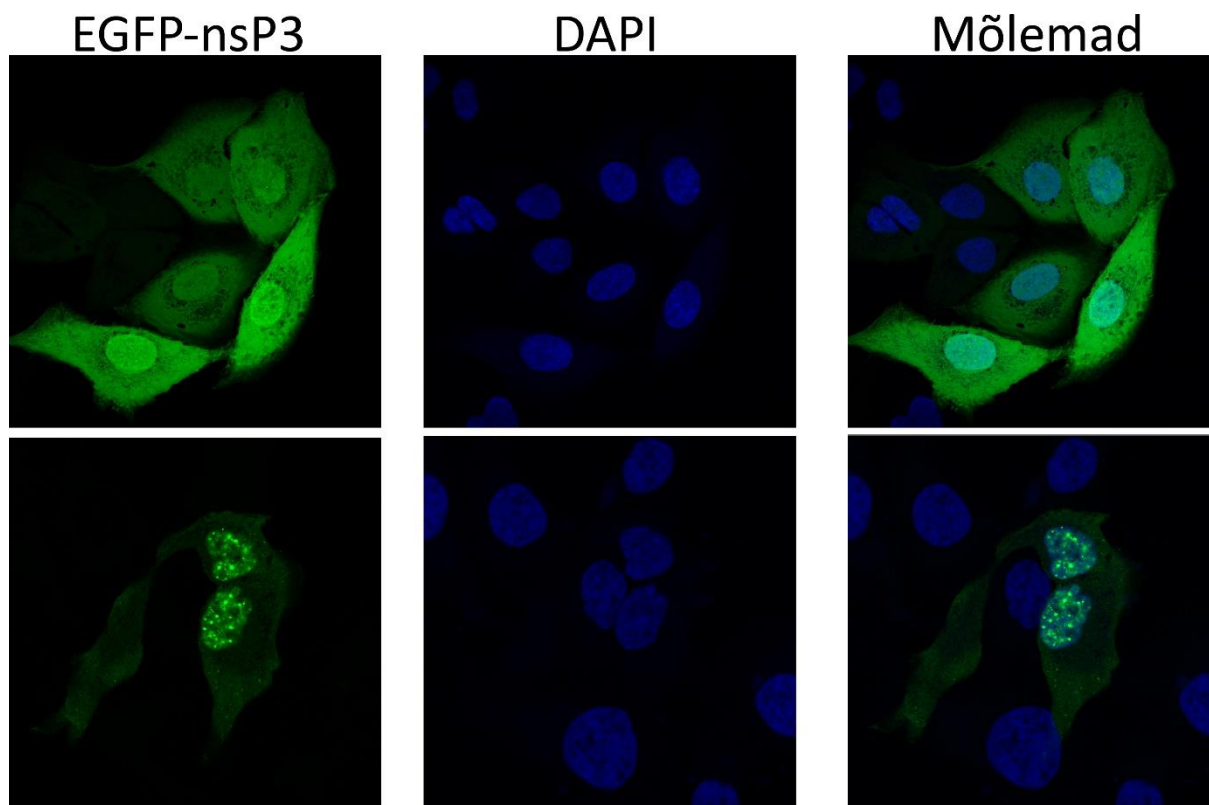


Joonis 6. BFV nsP1, nsP2 ja nsP4 rakuline lokalisatsioon. Rohelisega on värvunud mittestruktuursed valgud (EGFP) ja siniselt on värvunud tuumad (DAPI). 63x suurendus.

Joonisel 6 A esitatud transfektsiooni tulemus näitab BFV nsP1-EGFP liitvalgu lokaliseerumist plasmamembraanil. Selline lokalisatsioon on alfaviiruste nsP1 valgule omane ning on seda täheldatud ka varasemates publikatsioonides. nsP1 üheks rolliks replikatsioonikompleksis on selle sidumine või ankurdamine plasmamembraanidele (Spuul *et al.*, 2007) ning membraanile seostumise omadus on ka BFV nsP1 valgul. BFV nsP2 lokaliseerub imetajarakus difuusselt nii tsütoplasmas kui rakutuumas (Joonis 6B). Selline nsP2 lokaliseerumismuster on alfaviiruste seas tavaline. Alfaviiruste nsP2 valgul on tõenäoliselt olemas NLS, kuid kindlasti pole see alfaviirustel konserveerunud. On näidatud, et SFV nsP2 lokaliseerub umbes 50% ulatuses tsütoplasmaatilisel ja 50% ulatuses tuumas (Peränen *et al.*, 1990). CHIKV nsP2 lokaliseerub samuti ümber nii tuuma kui tsütoplasmasse, kuid ei jaotu neis alati sama suhte alusel nagu SFV nsP2 (Utt *et al.*, 2015). BFV nsP2 sarnane lokalisatsioon just SFV nsP2 suhtes võib olla tingitud nende lähemast evolutsioonilisest kaugusest, mõlemad viirused kuuluvad SFV klaadi (Powers *et al.*, 2001). Kindel nsP2 roll tuumas pole teada, kuid teatud määral võib see osaleda peremeesraku DNA sünteesi allasurumisel (Rikkonen, 1996). BFV nsP4 üksi lokaliseerub difuusselt üle tsütoplasma, spetsiifilist tuumalokalisatsiooni täheldada ei ole (Joonis 6C). See tulemus kattub samuti varasemate publikatsioonide andmetega, kus alfaviiruste infektsiooni korral koekultuuris lokaliseerub nsP4 koos replikatsioonikompleksidega kindlate fookustena, aga vaba nsP4 lokaliseerub mittespetsiifiliselt tsütoplasmaatilisel (Kujala *et al.*, 2001).

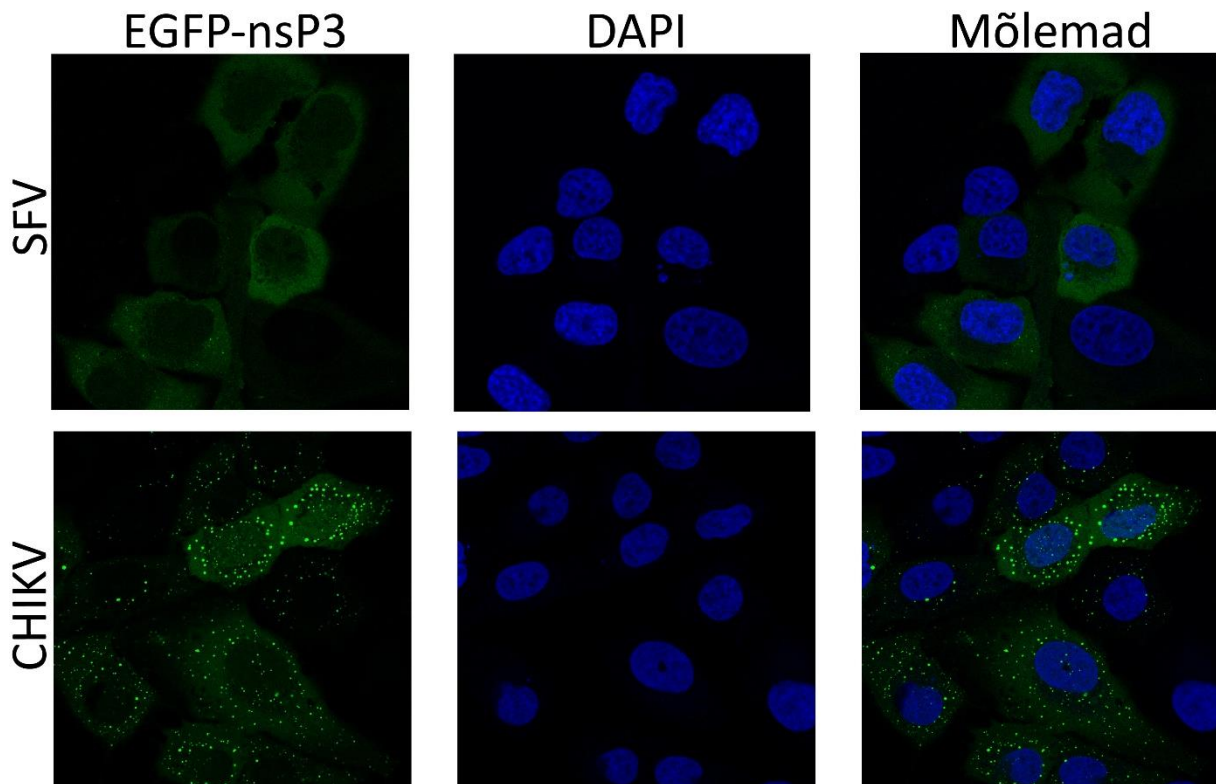
Tulemustest järeldub, et BFV mittestruktuursed valgud nsP1, nsP2 ja nsP4 on samasuguste lokalisatsioonimustritega, nagu teiste uuritud alfaviiruste vastavad mittestruktuursed valgud. Seega võib nendele valkudele eeldada samu funktsioone, mida vastavatele teistele uuritud alfaviiruste nsP-dele.

2.3.4. BFV nsP3 lokalisatsioon imetajarakus on alfaviiruste seas unikaalne



Joonis 7. BFV nsP3 rakuline lokalisatsioon. Kujutatud on sama plasmiidiga transfecteeritud U2OS rakkudes nähtud lokalisatsioonimustreid. Rohelisega on värvunud mittestruktuursed valgud (EGFP) ja siniselt tuumad (DAPI). 63x suurendus.

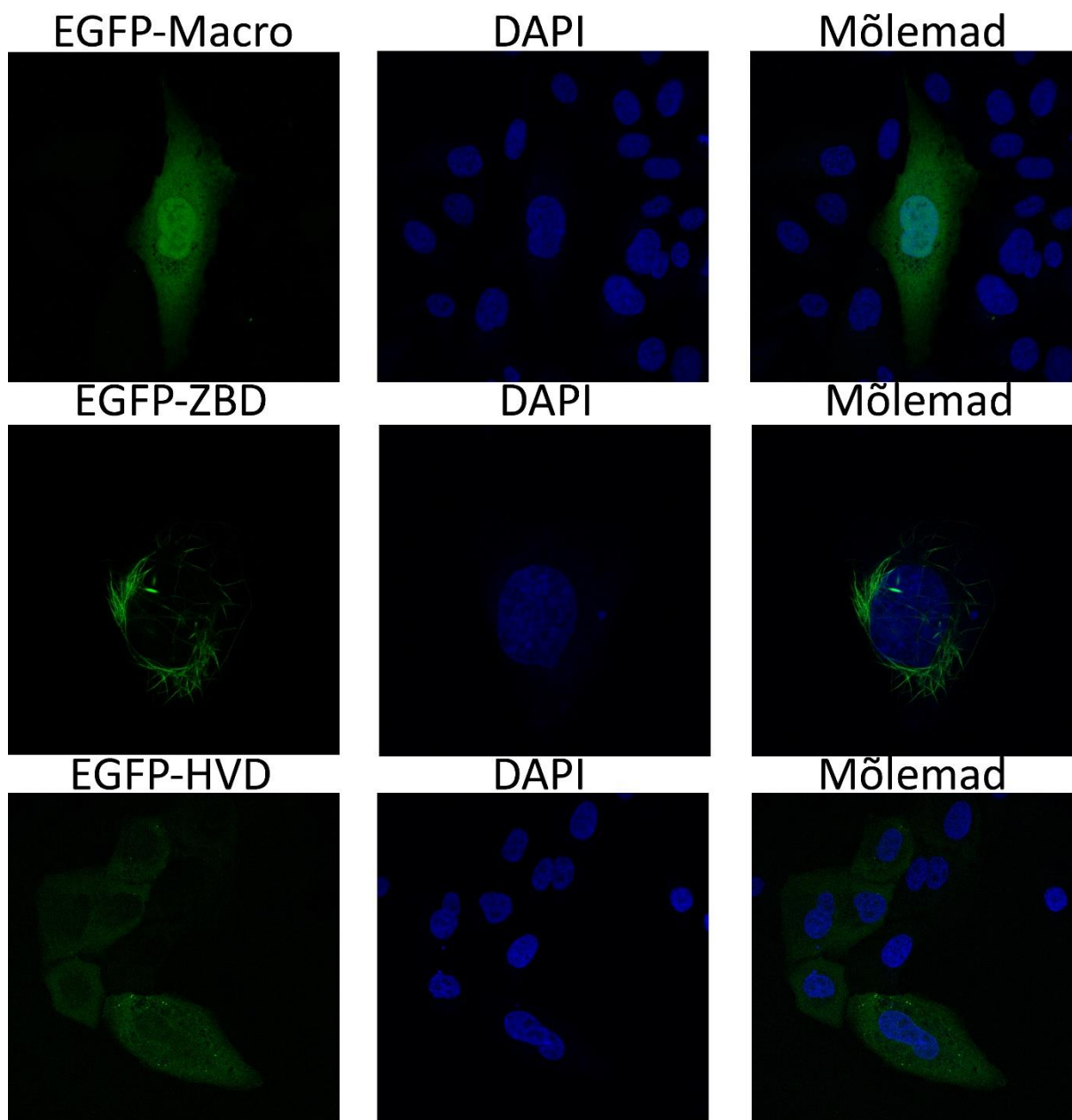
BFV individuaalne nsP3 lokaliseerub imetajarakkudes nii tsütoplasmas, kui tuumas ning viimase puhul mõnel juhul ka intensiivsemate fookustena (Joonis 7). Varasemalt on näidatud teiste alfaviiruste, näiteks SFV nsP3 lokaliseerumist tsütoplasmas, olles seotud vesiikulite laadsete struktuuridega (Kujala *et al.*, 2001). Võrdluseks loodi ka CHIKV ja SFV nsP3 analoogsed plasmidsed konstruktid EGFP-ga, et uurida sama protokollil alusel transfecteeritud vastavate valkude lokalisatsiooni samadel tingimustel (Joonis 8). CHIKV nsP3 lokaliseerub tsütoplasmas, nagu ka suurel enamusel puhkudest SFV nsP3, kuid viimase puhul leiti mõned rakud, mille tuumas oli samuti nsP3 nähtav, mis esinesid pigem erandina. SFV puhul on varem sarnast mustrit näidatud nsP3 mutantsete konstruktidega (Varjak *et al.*, 2010). See on aga oluliselt erinev tulemustest, mis saadi BFV nsP3-ga transfecteeritud rakkudega, kus pea kõikides rakkudes esines valgu lokaliseerumist tuumas. Veelgi huvitavam on tulemus, et nsP3-EGFP signaal näib konfokaalmikroskoobiga jälgituna veidi tugevam tuumas kui tsütoplasmas, nagu nsP2 puhul, milles esineb teadaolevalt NLS.



Joonis 8. SFV ja CHIKV nsP3 rakuline lokaliseatsioon. Rohelisega on värvunud EGFP-nsP3 liitvalk ja siniselt tuumad (DAPI). 63x suurendus.

2.3.5. BFV nsP3 tuumalokalisatsioon võib sõltuda makro domeenist

Alfaviiruste nsP3 on kirjanduses iseloomustatud koosnevat kolmest suuremast domeenist: makro domeenist, ZBD ja HVD. Eksperimentide põhjal on eraldi domeenidele ka iseloomulikke funktsioone leitud. Sellest ajendatuna loodi antud töö raames EGFP-ga DNA ekspressioonikonstruktid, mis sisaldasid BFV nsP3 üksikute domeenide järjestusi ning kõrvuti asetsevate domeenide järjestusi (Joonis 4B), et uurida mõne domeeni võimalikku kaalukamat rolli BFV nsP3 lokaliseerimisel tuuma.

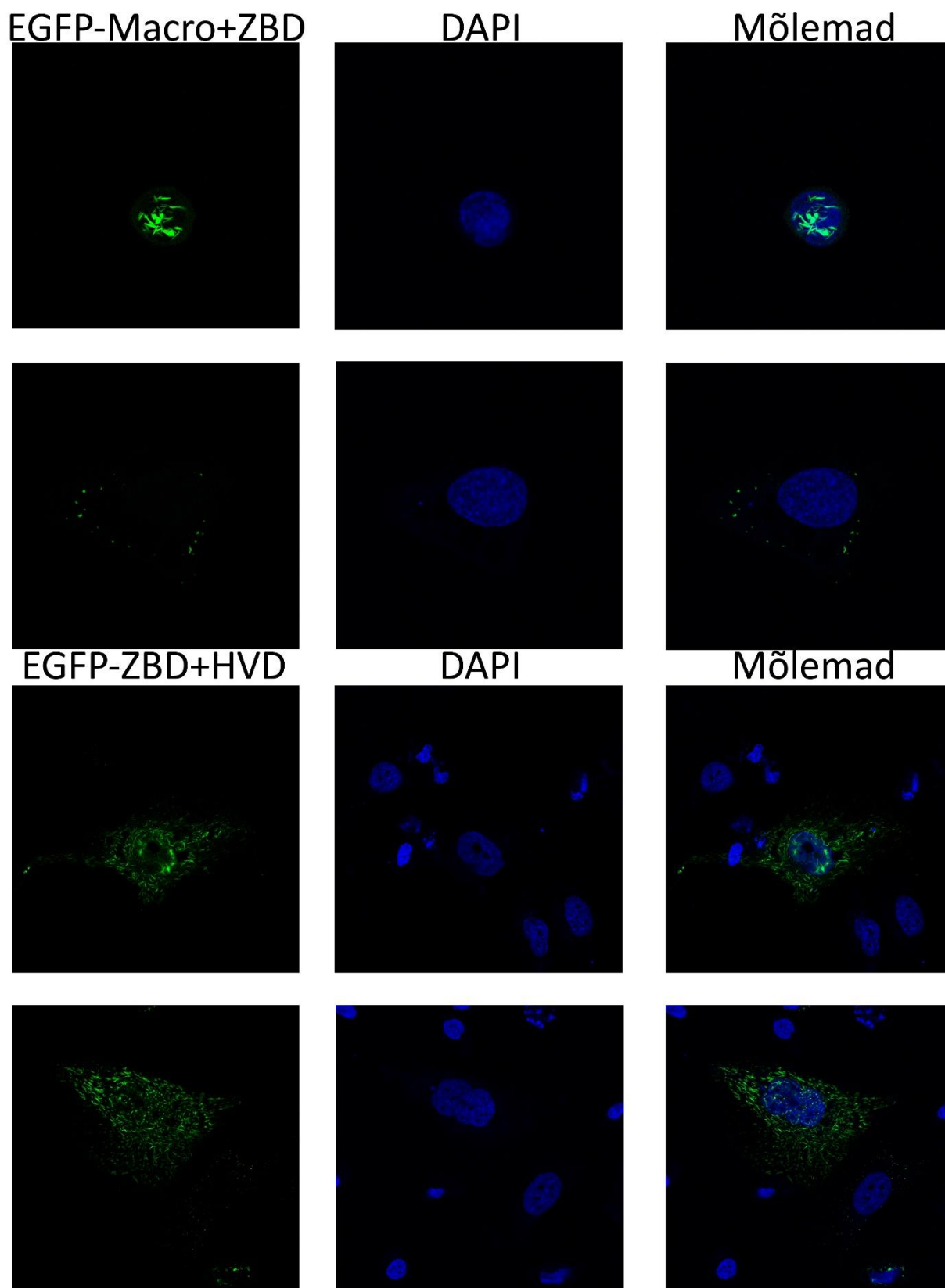


Joonis 9. BFV nsP3 individuaalsete domeenide lokaliseerimine imetajarakus. Rohelisega on värvunud nsP3 domeenid (EGFP) ja siniselt tuumad (DAPI). 63x suurendus.

Makro domeenile vastava valgulise produkti lokaliseerimine on väga sarnane kogu nsP3 lokaliseerimismustrile, paiknedes nii tsütoplasmas kui tuumas ning signaalide intensiivsus näib jaotunud ka üsna sarnaselt. Makro domeeni lokaliseerimise tuumas nähti konfokaalmikroskoobiga vaadeldes pidevalt. ZBD lokaliseerub tsütoplasmaatilisel, mõnedel juhtudel ka rohkem tuuma läheduses ning alati on näha filamentset lokaliseerumismustrit. ZBD filamentne lokaliseerumine võib viidata selle interakteerumisele raku aktiinfilamentidega. C-terminaalse HVD lokaliseerimine on enamjaolt tsütoplasmaatiline, väheste rakkude puhul nähti rohelist signaali ka tuumas, kuid intensiivsuste jaotus oli teistsugune, kui täispikkusega nsP3 ja makro domeeni puhul (Joonis 9).

Kuna makro domeeni jaotus imetajarakus on väga sarnane täispika BFV nsP3 lokaliseerimisele, siis võib eeldada makro domeeni teatud rolli kogu valgu lokaliseerimisel rakutuumas. Antud uurimuse põhjal ei saa seda kahjuks kindlalt järeldada ning see jääb edasiste katsete tõestada või ümber lükata.

Joonisel 10 on kujutatud nsP3 kahele kõrvuti asetsevatele domeenile vastavate valkude lokaliseerimist. Makro domeeni ja ZBD liitvalgu lokaliseerimist on näha samuti filamentsena, nagu seda oli täheldada ZBD puhul, mõnel juhul esines lokaliseerimist üksikute fookustena raku tsütoplasmas. Lokaliseerumist võib näha ka tuuma piirkonnas filamentsena, kuid intensiivsus üksiku ZBD-ga võrreldes tagasihoidlikum. ZBD ja HVD liitvalgu lokaliseerimine oli filamentne ja nähtav üle kogu raku, lokaliseerimist esines ka tuumapiirkonnas. Näib, et ZBD mõjutab nende kahe ekspresseeritud valgu filamentset lokaliseerimismustrit ning vahendab võimalikku interaktsiooni mikrofilamentidega, ka rakutuumase aktiiniga. Kuna aga ZBD üksi ei lokaliseerunud tuumas, siis võib teiste domeenide mõju avalduda valkude ümberpaiknemisel rakutuumas.



Joonis 10. BFV nsP3 kõrvuti asetsevate domeenide lokalisatsioon imetajarakus. Rohelisega on värvunud nsP3 domeenid (EGFP) ja siniselt tuumad (DAPI). 63x suurendus.

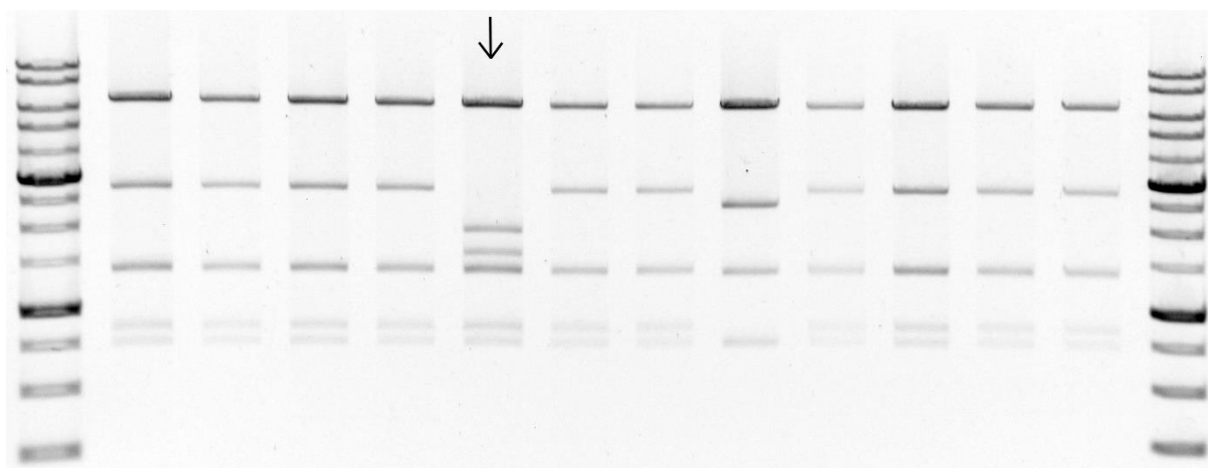
2.3.6. pSP6_BFVmC kloneerimise ja *in vitro* transkriptsiooni tulemused

Varem konstrueeriti meie töörühmas BFV icDNA-d sisaldav pSP6-BFV vektor, mille alusel saaks *in vitro* transkriptsiooniga luua BFV infektsioonilist genoomset RNA-d ning mille transfekterimisel rakkudesse toodetakse infektsiooniline viirus. Minu poolt on kloneeritud antud konstruktis BFV nsP3 järjestuse C-terminaalsesse poolde markervalku mCherry kodeeriv järjestus, et luua töövahend, millega uurida rekombinantse viiruse abil fluorestsentsmikroskoobiga infektsiooni kulgu ning analüüsida konfokaalmikroskoobiga BFV nsP3 valguga lokaliseerimist viiruse kontekstis (Joonis 11).



Joonis 11. mCherry järjestuse ligikaudne paiknemine BFV genoomis. Joonis kujutab markervalku kodeeriva järjestuse paiknemist rekombinantse viiruse genoomi kontekstis. Siniselt on kujutatud nsP3 järjestust ja punasega sisestatud mCherry järjestust, mis sisestati *SmaI* lõikesaiti.

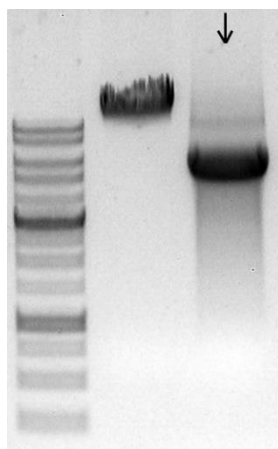
Kuna inserdi sisestamiseks ja sisestamissaidi loomiseks kasutati *SmaI* endonukleaasi, mis lõigates jätab fragmendi otsad tõmbiks, siis teostati restriksioonanalüüs ensüümidega *EcoRI* ja *Eam1105I* (Thermo Scientific), kus õige orientatsiooniga sisestatud fragmendi puhul oodati DNA fragmente suurustega 756 bp, 877 bp, 1389 bp, 1416 bp, 1628 bp, 1997 bp ja 6732 bp. Kaheteistkümnest puhastatud DNA-st sisaldas üks ka õiget järjestust (Joonis 12), millega teostati ka järgnev *in vitro* RNA süntees.



Joonis 12. Restriksioonanalüüs pSP6-BFVmC kloonidega. Noolega on tähistatud korrektselt sisestatud mCherry järjestusega pSP6-BFVmC kloon.

Joonisel 13 on toodud etiidiumbromiidiga värvitud ja UV-ga visualiseeritud lineariseeritud matriits-DNA ja *in vitro* sünteesitud RNA proovi pilt 0,8% TAE agarosgeelis, millega veenduti, et transkriptsioon on toimunud ning RNA saagikus on piisav

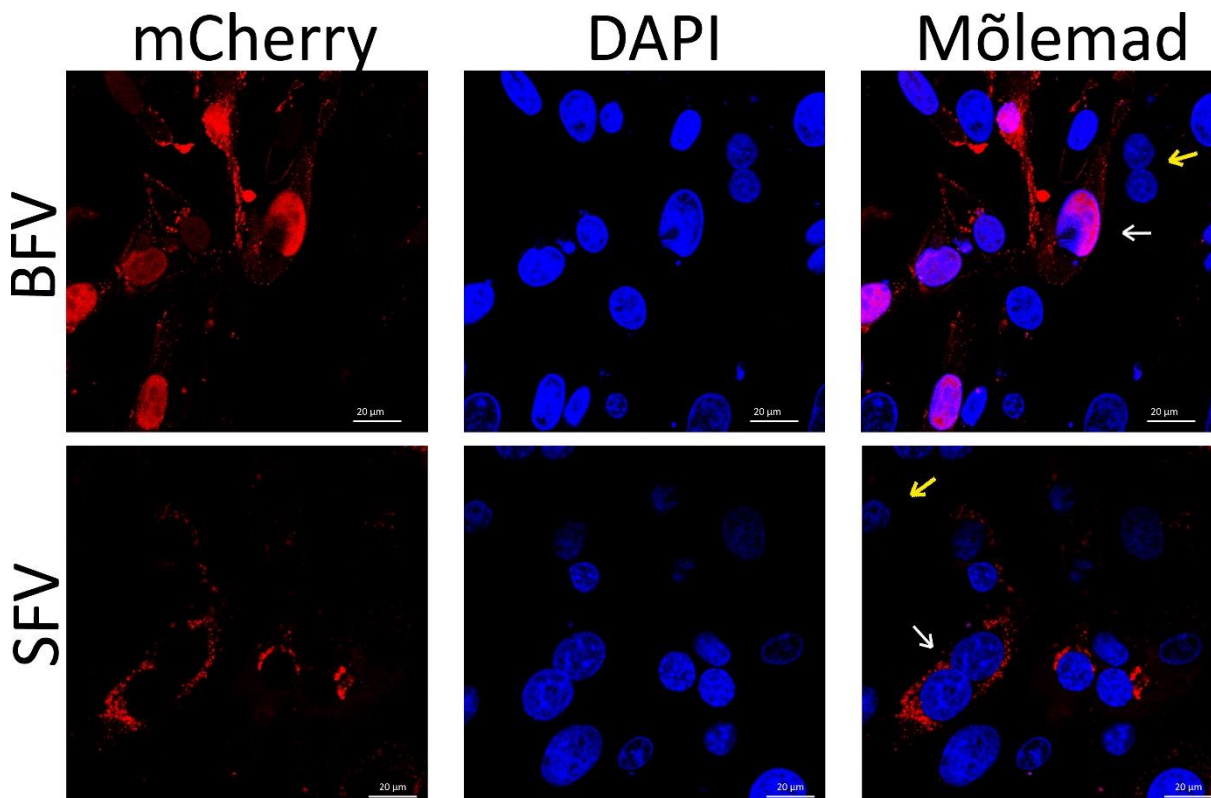
transfektsiooniks, viirusvaru loomiseks ja kogumiseks. 24 h peale transfektsiooni koguti viirusvaru edasisteks katseteks.



Joonis 13. Geel-elektroforees RNA proovile. Noolega on tähistatud rada, kus jooksis RNA proov, teises rajas jooksutati RNA sünteesil kasutatud lineariseeritud matriits-DNA proovi.

2.3.7. BFV nsP3 lokaliseerub tuumas ka viirusega nakatades

Sarnaselt valguekspressiooni lokalisatsiooni analüüsiga uuriti ka rekombinantse viirusega nakatatud BHK-21 rakkudes nsP3 lokalisatsiooni konfokaalmikroskoobiga. Analüüsil jälgiti punast (mCherry) ja sinist (DAPI) signaali. Kasutati 63x suurendusega objektiivi õli-immersioonsüsteemis.



Joonis 14. nsP3 lokalisatsioon rekombinantse BFV ja SFV-ga nakatatud rakkudes. Valge nool tähistab nakatunud rakku ja kollane nool nakatumata rakku. Punaselt on värvunud nsP3-mCherry liitvalk ja siniselt tuumad (DAPI). 63x suurendus.

Võrdluseks teise enamuuritud alfaviirusega, viidi katse paralleelselt läbi rekombinantse SFV-ga nakatatud rakkudes. Nakatamiseks kasutatud rekombinantne SFV on meie uurimisrühmas varasemalt loodud ning sarnaselt minu poolt loodud BFVmC viirusele on SFV nsP3 valku sisestatud markervalk mCherry. Selle tulemusel ekspresseeritakse mõlema rekombinantse viirusega nakatades vastav nsP3-mCherry liitvalk. Kooskõlas varasemate uurimustega, lokaliseerub SFV nsP3 ainult tsütoplasmaatilisel selgete fookustena (Joonis 14), lokaliseerudes enamasti koos replikatsioonikompleksidega. Joonisel 14 on näha, et BFV nsP3 iseäralik lokalisatsioonimuster esineb ka viirusega nakatatud rakkudes. BFV nsP3 lokaliseerub tsütoplasmas fookustena, olles ilmselt replikatsioonikomplekside koosseisus ning osa nsP3-st on ümberpaiknenud ka tuuma. Tulemused näitavad selget erinevust BFV ja SFV vahel ja tõenäoliselt osalisi erinevaid funktsioone nsP3 valgule ning viirus-peremeesorganismi vahelistele interaktsioonidele.

BFV on esimene alfaviirus, mille puhul on kirjeldatud nsP3 ümberpaiknemist peremehe rakutuumas. Antud töö raames jääb vastamata küsimus sellele, millist funktsiooni võiks täita ühe alfaviiruse nsP3 rakutuumas, jääb üle vaid spekuloida. Alfaviiruste mittestruktuursetest valkudest on kõige vähem konkreetset teada just nsP3 kohta, mis teeb antud valgu uurimise põnevaks. On tõestatud, et varase alfaviiruste infektsiooni käigus lokaliseerub osa nsP-dest replikatsioonikompleksidest sõltumatult, mis viitab nende võimalikele rollidele interakteeruda ja mõjutada peremeesraku valke ning osaleda rakusiseste protsesside reguleerimisel, millega mõjutatakse ka viiruse infektsioonitsükli kulgu. Kuna NLS esineb alfaviirustel teadaolevalt vaid nsP2-s ning selle mõju näiteks SFV infektsiooni puhul on teatud määral peremeesraku DNA sünteesi pärssiv (Rikonen, 1996), siis võiks mõni sarnane funktsioon olla ka replikatsioonikompleksist välja jääval BFV nsP3 valgul.

KOKKUVÕTE

Austraalias leviv Barmah Forest viirus (BFV) on väheuuritud inimesele patoloogiline alfaviirus, mis nakkuse korral võib põhjustada liigesvalu, lihasvalu, palavikku ja ulatuslikku löövet ning sümptomid võivad esineda püsivalt mitu kuud. Käesolevas bakalaureusetöös loodi töövahend BFV edasiseks uurimiseks ning analüüsi BFV individuaalsete mittestruktuursete valkude lokaliseerimiseks imetajarakus.

Individuaalsete BFV mittestruktuursete valkude ekspressiooniks imetajarakus loodi plasmidsed DNA konstruktid, millelt kodeeriti rakus CMV promooteri alt HA-EGFP markerjärjestusega fluorestseeruvad liitvalgud. Iga loodud plasmiidiga viidi läbi rakkude transfektsioon ning ekspresseeritud liitvalkude lokaliseerimiseks tehti konfokaalmikroskoobiga pilte fikseeritud rakkudest. Tulemustest järeldus, et valgud nsP1, nsP2 ja nsP4 lokaliseeruvad sama mustri alusel, mida on alfaviiruste puhul varemgi kirjeldatud. nsP3 lokaliseerimise on varem täheldatud vaid tsütoplasmaatiliseks, kui BFV puhul nägime selle ümberpaiknemist ka tuuma. *Western blot* analüüsiga kontrolliti, kas ekspresseeriti ka õige suurusega liitvalgud.

BFV nsP3 iseäralik lokaliseerimismuster tekitas küsimuse, et millises nsP3 domeenis võiks paikneda tuumalokaliseerimise signaal. Seetõttu loodi ekspressioonikonstruktid, millelt kodeeritakse nsP3 üksikud domeenid ja kaks kõrvuti asetsevat domeeni HA-EGFP liitvalguna. Täispikale nsP3-le väga sarnaselt lokaliseerub makro domeen ning tuumas nähti ka makro+ZBD ja ZBD+HVD liitvalke, küll aga teistsuguse lokaliseerimismustriga.

Kolmandaks loodi rekombinantne BFV, mille nsP3 järjestusse lisati mCherry markervalku kodeeriv järjestus, millega nakatamisel nähti taas antud valgu lokaliseerimise rakutuumas. Käesoleva uurimistöö käigus kirjeldati esmakordselt ühe alfaviiruse, BFV, nsP3 ümberlokaliseerumist rakutuumas. Kuigi antud töö põhjal ei saa järeldusi teha nsP3 võimalike funktsioonide kohta rakutuumas või isegi selle kohta, millega võiks valk rakutuumas seonduda, on see aluseks edasisteks uurimistöödeks.

Localization of Barmah Forest virus non-structural proteins in the mammalian cell

Ailar Omler

SUMMARY

Barmah Forest virus (BFV) is a mosquito borne alphavirus that is widely spread only in Australia. Humans act as hosts for BFV and might suffer from the symptoms for up to a few months, or the infection can be asymptomatic altogether. It is the cause of nearly a 1000 reported cases of human BFV infection each year that is characterized by arthralgia, myalgia, rash and fever.

Alphaviruses encode 4 different non-structural proteins (nsP) and each of them is directly necessary in the replication complex, but all those individual proteins also localize in different cellular compartments independently from the replication complexes and exhibit some functions that would not be associated directly with virus replication. The aim of this study was to analyse the cellular localization of individual BFV non-structural proteins and to construct a recombinant virus for further research downstream.

For the expression of individual BFV nsP-s their respective coding sequences were cloned into a plasmid containing the sequences for EGFP and HA tag, which would be used for DNA transfection and subsequent localization analysis of the expressed joined proteins via confocal microscopy. It was observed that BFV nsP1, nsP2 and nsP4 exhibit subcellular localization similar to nsP-s of other alphaviruses. nsP3 localized in the cytoplasmic and nuclear compartments and it is the first time we have seen this phenomenon described for an alphavirus nsP3.

In order to find out if any of the three domains of nsP3 play a discrete role in the nuclear localization of BFV nsP3, similar DNA constructs were made with individual nsP3 domains (macro domain, ZBD, HVD) and the adjacent domains in fusion with the HA-EGFP tags. The macro domain showed a very similar localization pattern to the whole nsP3, ZBD and HVD localized in the cytoplasm. Macro+ZBD and ZBD+HVD proteins localized in a filamentous pattern and showed some nuclear localization, which was different from the localization of whole nsP3.

To analyse BFV nsP3 localization in the context of a viral infection, a recombinant BFV was created with an mCherry coding sequence inserted into the C-terminal part of nsP3. Nuclear localization of nsP3 was observed in this experiment as well. With this data, we have described

a unique phenomenon for an alphavirus nsP3. Further analysis of BFV nsP3 is necessary to pinpoint the exact amino acid motif responsible for nuclear localization, to find out about possible interactions of BFV nsP3 and host nuclear factors, and to characterize its role in virus replication and pathogenesis more broadly.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Bernard, E., Solignat, M., Gay, B., Chazal, N., Higgs, S., Devaux, C., and Briant, L. (2010). Endocytosis of Chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments. *PloS One* 5, e11479.
- Boughton, C. R., Hawkes, R. A., and Naim, H. M. (1988). Illness caused by a Barmah Forest-like virus in New South Wales. *Med. J. Aust.* 148, 146–147.
- Boyd, A. M., Hall, R. A., Gemmell, R. T., and Kay, B. H. (2001). Experimental infection of Australian brushtail possums, *Trichosurus vulpecula* (Phalangeridae: Marsupialia), with Ross River and Barmah Forest viruses by use of a natural mosquito vector system. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 777–782.
- Cashman, P., Hueston, L., Durrheim, D., Massey, P., Doggett, S., and Russell, R. C. (2008). Barmah Forest virus serology; implications for diagnosis and public health action. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* 32, 263–266.
- Dalgarno, L., Short, N. J., Hardy, C. M., Bell, J. R., Strauss, J. H., and Marshall, I. D. (1984). Characterization of Barmah forest virus: an alphavirus with some unusual properties. *Virology* 133, 416–426.
- De, I., Fata-Hartley, C., Sawicki, S. G., and Sawicki, D. L. (2003). Functional Analysis of nsP3 Phosphoprotein Mutants of Sindbis Virus. *J. Virol.* 77, 13106–13116.
- Egloff, M.-P. *et al.* (2006). Structural and Functional Basis for ADP-Ribose and Poly(ADP-Ribose) Binding by Viral Macro Domains. *J. Virol.* 80, 8493–8502.
- Forrester, N. L., Palacios, G., Tesh, R. B., Savji, N., Guzman, H., Sherman, M., Weaver, S. C., and Lipkin, W. I. (2012). Genome-Scale Phylogeny of the Alphavirus Genus Suggests a Marine Origin. *J. Virol.* 86, 2729–2738.
- Frolova, E., Frolov, I., and Schlesinger, S. (1997). Packaging signals in alphaviruses. *J. Virol.* 71, 248–258.
- 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.
- 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.
- Glomb-Reinmund, S., and Kielian, M. (1998). The Role of Low pH and Disulfide Shuffling in the Entry and Fusion of Semliki Forest Virus and Sindbis Virus. *Virology* 248, 372–381.
- 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.
- Griffin, D. E. 2013. Alphaviruses, p. 651–686. *In* D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, R. A. Lamb, M. A. Martin, V. R. Racaniello, B. Roizman, *Fields Virology*, 6th ed., vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

- 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.* 88, 8967–8971.
- Hahn, C. S., and Strauss, J. H. (1990). Site-directed mutagenesis of the proposed catalytic amino acids of the Sindbis virus capsid protein autoprotease. *J. Virol.* 64, 3069–3073.
- Herrero, L. J., Lidbury, B. A., Bettadapura, J., Jian, P., Herring, B. L., Hey-Cunningham, W. J., Sheng, K.-C., Zakhary, A., and Mahalingam, S. (2014). Characterization of Barmah Forest virus pathogenesis in a mouse model. *J. Gen. Virol.* 95, 2146–2154.
- Hoornweg, T. E., van Duijl-Richter, M. K. S., Ayala Nuñez, N. V., Albulescu, I. C., van Hemert, M. J., and Smit, J. M. (2016). Dynamics of Chikungunya Virus Cell Entry Unraveled by Single-Virus Tracking in Living Cells. *J. Virol.* 90, 4745–4756.
- Hueston, L., Toi, C. S., Jeoffreys, N., Sorrell, T., and Gilbert, G. (2013). Diagnosis of Barmah Forest Virus Infection by a Nested Real-Time SYBR Green RT-PCR Assay. *PLoS ONE* 8, e65197.
- Jacups, S. P., Whelan, P. I., and Currie, B. J. (2008). Ross River virus and Barmah Forest virus infections: a review of history, ecology, and predictive models, with implications for tropical northern Australia. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt.* N 8, 283–297.
- Jose, J., Przybyla, L., Edwards, T. J., Perera, R., Burgner, J. W., and Kuhn, R. J. (2012). Interactions of the Cytoplasmic Domain of Sindbis Virus E2 with Nucleocapsid Cores Promote Alphavirus Budding. *J. Virol.* 86, 2585–2599.
- Jose, J., Snyder, J. E., and Kuhn, R. J. (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* 4, 837–856.
- Kallio, K., Hellström, K., Balistreri, G., Spuul, P., Jokitalo, E., and Ahola, T. (2013). Template RNA Length Determines the Size of Replication Complex Spherules for Semliki Forest Virus. *J. Virol.* 87, 9125–9134.
- Kay, B. H., Boyd, A. M., Ryan, P. A., and Hall, R. A. (2007). Mosquito feeding patterns and natural infection of vertebrates with Ross River and Barmah Forest viruses in Brisbane, Australia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 417–423.
- Kostyuchenko, V. A., Jakana, J., Liu, X., Haddow, A. D., Aung, M., Weaver, S. C., Chiu, W., and Lok, S.-M. (2011). The Structure of Barmah Forest Virus as Revealed by Cryo-Electron Microscopy at a 6-Angstrom Resolution Has Detailed Transmembrane Protein Architecture and Interactions. *J. Virol.* 85, 9327–9333.
- Kuhn, R. J. 2013. *Togaviridae*, p. 629–650. In D. M. Knipe, P. M. Howley, J. I. Cohen, R. A. Lamb, Diane E. Griffin, M. A. Martin, V. R. Racaniello, B. Roizman, *Fields Virology*, 6th ed., vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 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.
- Lee, E., Stocks, C., Lobigs, P., Hislop, A., Straub, J., Marshall, I., Weir, R., and Dalgarno, L. (1997). Nucleotide sequence of the Barmah Forest virus genome. *Virology* 227, 509–514.

- Lemm, J. A., Rümenapf, T., Strauss, E. G., Strauss, J. H., and Rice, C. M. (1994). Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *EMBO J.* 13, 2925–2934.
- Li, L., Jose, J., Xiang, Y., Kuhn, R. J., and Rossmann, M. G. (2010). Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature* 468, 705–708.
- Luers, A. J., Adams, S. D., Smalley, J. V., and Campanella, J. J. (2005). A Phylogenomic Study of the Genus Alphavirus Employing Whole Genome Comparison. *Comp. Funct. Genomics* 6, 217–227.
- Marshall, I. D., Woodroffe, G. M., and Hirsch, S. (1982). Viruses recovered from mosquitoes and wildlife serum collected in the Murray Valley of South-Eastern Australia, February 1974, during an epidemic of encephalitis. *Aust J Exp Biol Med Sci* 60, 457–470.
- Merits, A., Vasiljeva, L., Ahola, T., Kääriäinen, L., and Auvinen, P. (2001). Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein by nsP2 protease. *J. Gen. Virol.* 82, 765–773.
- Naish, S., Mengersen, K., Hu, W., and Tong, S. (2013). Forecasting the Future Risk of Barmah Forest Virus Disease under Climate Change Scenarios in Queensland, Australia. *PLoS ONE* 8, e62843.
- Nasar, F. *et al.* (2012). Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 14622–14627.
- Park, E., and Griffin, D. E. (2009). The nsP3 macro domain is important for Sindbis virus replication in neurons and neurovirulence in mice. *Virology* 388, 305–314.
- Pehrson, J. R., and Fuji, R. N. (1998). Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res.* 26, 2837–2842.
- Peränen, J., Rikonen, M., Liljeström, P., and Kääriäinen, L. (1990). Nuclear localization of Semliki Forest virus-specific nonstructural protein nsP2. *J. Virol.* 64, 1888–1896.
- Poidinger, M., Roy, S., Hall, R. A., Turley, P. J., Scherret, J. H., Lindsay, M. D., Broom, A. K., and Mackenzie, J. S. (1997). Genetic stability among temporally and geographically diverse isolates of Barmah Forest virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 230–234.
- Powers, A. M., Brault, A. C., Shirako, Y., Strauss, E. G., Kang, W., Strauss, J. H., and Weaver, S. C. (2001). Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. *J. Virol.* 75, 10118–10131.
- Quinn, H. E., Gatton, M. L., Hall, G., Young, M., and Ryan, P. A. (2005). Analysis of Barmah Forest virus disease activity in Queensland, Australia, 1993–2003: identification of a large, isolated outbreak of disease. *J. Med. Entomol.* 42, 882–890.
- Rikonen, M. (1996). Functional significance of the nuclear-targeting and NTP-binding motifs of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Virology* 218, 352–361.
- Rose, P. P., Hanna, S. L., Spiridigliozzi, A., Wannissorn, N., Beiting, D. P., Ross, S. R., Hardy, R. W., Bambina, S. A., Heise, M. T., and Cherry, S. (2011). Natural Resistance-Associated

Macrophage Protein Is a Cellular Receptor for Sindbis Virus in Both Insect and Mammalian Hosts. *Cell Host Microbe* 10, 97–104.

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

Salonen, A., Vasiljeva, L., Merits, A., Magden, J., Jokitalo, E., and Kaariainen, L. (2003). Properly Folded Nonstructural Polyprotein Directs the Semliki Forest Virus Replication Complex to the Endosomal Compartment. *J. Virol.* 77, 1691–1702.

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.* 109, 16534–16539.

Shirako, Y., and Strauss, J. H. (1994). Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 68, 1874–1885.

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 membrane association and virus replication. *J. Virol.* 81, 872–883.

Strauss, J. H., and Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58, 491–562.

Thaa, B. *et al.* (2015). Differential Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt-mTOR Activation by Semliki Forest and Chikungunya Viruses Is Dependent on nsP3 and Connected to Replication Complex Internalization. *J. Virol.* 89, 11420–11437.

Tomar, S., Hardy, R. W., Smith, J. L., and Kuhn, R. J. (2006). Catalytic Core of Alphavirus Nonstructural Protein nsP4 Possesses Terminal Adenylyltransferase Activity. *J. Virol.* 80, 9962–9969.

Tuittila, M., and Hinkkanen, A. E. (2003). Amino acid mutations in the replicase protein nsP3 of Semliki Forest virus cumulatively affect neurovirulence. *J. Gen. Virol.* 84, 1525–1533.

Tuittila, M. T., Santagati, M. G., Røytta, M., Määttä, J. A., and Hinkkanen, A. E. (2000). Replicase complex genes of Semliki Forest virus confer lethal neurovirulence. *J. Virol.* 74, 4579–4589.

Utt, A., Das, P. K., Varjak, M., Lulla, V., Lulla, A., and Merits, A. (2015). Mutations Conferring a Noncytotoxic Phenotype on Chikungunya Virus Replicons Compromise Enzymatic Properties of Nonstructural Protein 2. *J. Virol.* 89, 3145–3162.

Vale, T. G., Carter, I. W., McPhie, K. A., James, G., and Cloonan, M. J. (1986). Human Atbovirus Infections Along the South Coast of New South Wales. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 64.

Vaney, M.-C., Duquerroy, S., and Rey, F. A. (2013). Alphavirus structure: activation for entry at the target cell surface. *Curr. Opin. Virol.* 3, 151–158.

Varjak, M., Zusinaite, E., and Merits, A. (2010). Novel Functions of the Alphavirus Nonstructural Protein nsP3 C-Terminal Region. *J. Virol.* 84, 2352–2364.

Vasiljeva, L., Merits, A., Auvinen, P., and Kaariainen, L. (2000). Identification of a Novel Function of the Alphavirus Capping Apparatus: RNA 5'-triphosphatase Activity Of nsP2. *J. Biol. Chem.* 275, 17281–17287.

Wang, K.-S., Kuhn, R. J., Strauss, J. H., Strauss, E. G., and Ou, S. (1992). High-Affinity Laminin Receptor Is a Receptor for Sindbis Virus in Mammalian Cells. *J. Virol.* 66, 4992–5001.

Wengler, G., and Wengler, G. (2002). In vitro analysis of factors involved in the disassembly of Sindbis virus cores by 60S ribosomal subunits identifies a possible role of low pH. *J. Gen. Virol.* 83, 2417–2426.

Zhang, X., Fugère, M., Day, R., and Kielian, M. (2003). Furin Processing and Proteolytic Activation of Semliki Forest Virus. *J. Virol.* 77, 2981–2989.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://www9.health.gov.au/cda/source/cda-index.cfm>

LISAD

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Ailar Omler

(sünnikuupäev: 15.05.1995)

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

Barmah Forest viiruse mittestruktuursete valkude lokalisatsioon imetajarakus,

mille juhendajateks on Margit Mutso ja Eva Žusinaite,

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

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 29.05.2020 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, 29.05.2017