

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Zika viiruse replikonide pakkimine viirus-replikon partiklitesse

Magistritöö

40 EAP

Siret Usar

Juhendajad PhD Andres Merits

MD, DSc Eva Žusinaite

TARTU 2018

Zika viiruse replikonide pakkimine viirus-replikon partiklitesse

Zika viiruse (ZIKV) replikoni pakkimiseks katsetati kolme erinevat pakkimissüsteemi. Nendeks olid SFV replikonidel, pakkimisrakuliinil ja viirus-replikon partiklitesse (VRP) pakitud SFV replikonil põhinev süsteem. Kõik kolm süsteemi põhinevad pakkimiseks vajalike ZIKV struktuursete valkude ekspressioonil *in trans* pakitava ZIKV replikoni suhtes. SFV replikonidel põhineva süsteemi puhul ekspresseeritakse ZIKV struktuursed valgud rekombinantselt SFV replikonilt ning pakkimisrakuliinil põhineva süsteemi korral stabiilselt rakuliini viidud vektorilt. SFV VRP-del põhinev süsteemi puhul saavutatakse ZIKV struktuursete valkude ekspressioon eelnevalt VRP-desse pakitud rekombinantselt SFV replikonilt. Kõigi kolme süsteemi ZIKV replikoni pakkimise efektiivsust hinnati ZIKV replikon-RNA-l kodeeritud markevalkude detekteerimisega. Käesoleva töö tulemustest selgus, et ainult VRP-desse pakitud SFV replikonil põhinev süsteem võimaldas efektiivselt pakkida ZIKV replikoni.

Märksõnad: Zika viirus, replikon, pakkimine

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

Packaging of Zika Virus Replicons into the Virus-replicon Particles

Three different packaging systems were tested to pack Zika virus (ZIKV) replicon. They included a system based on SFV replicons, a packaging cell line, and the SFV replicon packed into virus-replicon particles (VRP). All three systems are based on the expression of ZIKV structural proteins necessary for the packaging of ZIKV replicon *in trans*. In a system based on SFV replicon, ZIKV structural proteins are expressed from the recombinant SFV replicon and, in case of the packaging cell line, ZIKV structural proteins are expressed in a stable cell line. In the SFV VRP-based system, the expression of ZIKV-structural proteins is obtained from SFV replicon pre-packaged in VRPs. The efficiency of the packaging of ZIKV replicon for all three systems was evaluated by the detection of marker proteins encoded by ZIKV replicon. The results of this work revealed that only the system based on SFV replicon packed into VRPs enabled effective packaging of ZIKV replicon.

Keywords: Zika virus, replicon, packaging

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	9
1.1 Flaviviirused.....	9
1.2 ZIKV	10
1.3. ZIKV virion.....	11
1.4. ZIKV genoom	13
1.5. Infektsioonitsükkel	15
1.5.1. Sisenemine rakku	15
1.5.2. Translatsioon	16
1.5.4. Viiruslike valkude omadused	16
1.5.5. Replikatsioon.....	17
1.5.6. Virionide pakkimine ja küpsemine.....	19
1.6. Replikon	21
1.7. Replikonide pakkimissüsteemid.....	22
1.8. Töös kasutatud pakkimissüsteemid	23
1.8.1. SFV replikonidel põhinev pakkimissüsteem	23
1.8.2. Pakkimisrakuliinil põhinev pakkimissüsteem	25
1.8.3. Heteroloogilistel VPR-del põhinev pakkimissüsteem.....	27
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	29
2.1 Töö eesmärgid.....	29
2.2 Materjal ja meetodika.....	29
2.2.1 Bakteritüved	29
2.2.2 Rakuliinid ja söötmed.....	29
2.2.3 ZIKV replikonid	30
2.2.4. Pakkimiseks kasutatavad konstruktid ja rakuliin	31
2.2.5. Kompetentsete <i>E. coli</i> rakkude kasvatamine ja transformeerimine	33
2.2.6. ZIKV replikonide cDNAd sisaldavate plasmiidide puhastamine.....	33
2.2.7. <i>In vitro</i> transkriptsioon	34
2.2.8. BHK-21 rakkude ja BHK-CprME pakkimisrakuliini transfektsioon.....	34
2.2.9. C6/36 rakkude transfektsioon.....	35

2.2.10. BHK-21 rakkude re-transfektsioon	35
2.2.11. SFV-ZIKV-str VRP-de tiitri määramine	35
2.2.12. C6/36 rakkude nakatamine SFV-ZIKV-str VRP-dega.....	36
2.2.14 VERO ja C6/36 rakkude nakatamine ZIKV VRP-dega.....	37
2.2.15. Replikonide pakkimise efektiivsuse hindamine	37
2.2.16. <i>Western blot</i>	37
2.3. Tulemused.....	39
2.3.1. SFV replikonidel põhineva pakkimissüsteemi analüüs	39
2.3.2. BHK-CprME pakkimisrakuliinil põhineva pakkimissüsteemi analüüs	43
2.3.3. SFV-ZIKV-str VRP-del põhineva pakkimissüsteemi analüüs	45
2.4. Arutelu.....	49
KOKKUVÕTE.....	54
KIRJANDUSE LOETELU	57
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	67
LIHTLITSENTS	68

KASUTATUD LÜHENDID

BHK 21 – beebihamstri neeru rakuliin 21 (*baby hamster kidney cells*)

C – kapsiidivalk (*capsid protein*)

cDNA - komplementaarne DNA (*complementary DNA*)

CHIKV – Chikungunya viirus

DENV – Dengue viirus

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

dsRF – kaheahelaline relikatiivne vorm (*double-stranded replicative form*)

E valk – ümbrise valk (*envelope protein*)

ER – endolasmaatiline retiikulum (*endoplasmatic reticulum*)

FBS – veise loote seerum (*fetal bovine serum*)

FMDV – suu- ja sõrataudi viirus (*foot-and-mouth disease virus*)

GBS – Guillain-Barre sündroom

GMEM – *Glasgow Modified Eagle's Medium*

IU – infektsiooniline ühik (*infectious unit*)

JEV – Jaapani entsefaliidi viirus (*Japanese encephalitis virus*)

M valk – membraani valk (*membrane protein*)

MOI – infektsiooni kordus (*multiplicity of infection*)

NanoLuc – Nano lutsiferaas

NS – mittestruktuurne (*non structural*) (flaviviiruste puhul)

nsP – mittestruktuurne valk (*nonstructural protein*) (alfaviiruste puhul)

NTPaas – nukleosiidtrifosfataas (*nucleoside-triphosphatase*)

PBS – fosfaatpuhvriga soolalahus (*phosphate buffered saline*)

PFA – paraformaldehüüd (*paraformaldehyde*)

Polü(A) – polü-adenosiin (*poly adenosine*)

RC – replikatsioonikompleks (*replication complex*)

RLU – suhteline valgusühik (*relative light unit*)

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfat*)

sfRNA – subgenoomne flaviviiruse RNA (*subgenomic flavivirus RNA*)

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

SVP – subviraalsed partiklid (*subviral particles*)

ZIKV – Zika viirus (*Zika virus*)

TBEV – piikentsefaliidi viirus (*tick born encephalitis virus*)

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

UTR – mittetransleeritav region (*untranslated region*)

VRP – viirus replikon partiklid (*virus replicon particles*)

WHO – Maailma Terviseorganisatsioon (*World Health Organization*)

WNV – West Nile viirus (*West Nile virus*)

wt – metsiktüüp (*wild type*)

YFV – kollapalaviku viirus (*Yellow fever virus*)

SISSEJUHATUS

Viirused on bioloogilised objektid, millel puudub rakuline ehitus ja iseseisev paljunemisvõime. Sellest hoolimata viirused sisaldavad geneetilist materjali DNA või RNA kujul ning paljunevad elusorganismides replitseerumise kaudu. Viirused kasutavad paljunemiseks ja enda eluks vajalike protsesside läbiviimiseks rakulist masinavärki. Seetõttu peetakse neid elusorganismide parasiitideks. Viirused nakatavad kõiki organisme ning põhjustavad mitmesuguseid haigusnähte ning halvimal juhul ka peremeesorganismi surma.

Üsna suureks ohuks on kujunenud tõsiseid haiguslikke seisundeid tekitavad flaviviirused, millest viimasel ajal üks aktuaalsemaid on Zika viirus (ZIKV). ZIKV on kaua eksisteerinud Aafrikas, kuid viimastel aastatel on see levinud Vaikse Ookeani piirkondadesse, Lõuna-Ameerikasse ning Kariibi mere saartele. ZIKV nakkus kulgeb enamasti asümptomaatiliselt, kuid sümptomaatilise infektsiooni korral esinevad teiste flaviviirustega sarnased ilmingud nagu pea-, liiges- ja lihasvalu ning lööve. Viimasel ajal on ZIKV kujunenud suureks globaalseks ohuks, kuna võib põhjustada sünnidefekte ning neuroloogilisi häireid. Kättesaadav ravi ja vaktsiin ZIKV vastu puuduvad. Seega on praegusel hetkel tungiv vajadus välja töötada uusi süsteeme, millega saaks uurida ZIKV elutsükli erinevaid etappe ning liikuda lähemale vaktsiini väljaarendamisele.

Teiste flaviviiruste uurimisel on kasutust leidnud viirus-replikon partiklitesse (VRP) pakitud replikonid. Replikonide puhul on tegemist isereplitseeruvate RNA molekulidega, mis pole võimelised iseseisvalt moodustama infektsioonilisi viiruspartikleid. Flaviviiruste replikonide suureks eeliseks on nende mittetsütopaatilisus, mistõttu nad võimaldavad pikaajalist võõrgeenide ekspressiooni. Replikonide pakkimine VRP-desse võimaldab replikone efektiivselt viia nakatamisega erinevatesse rakutüüpidesse ning uurida flaviviiruste pakkimisega seotud mehhanisme. Flaviviiruste replikonide pakkimiseks on kasutatud erinevaid pakkimissüsteeme, mille eesmärk on toota replikonide pakkimiseks vajalikke flaviviiruste struktuurseid valke *in trans* ehk replikonist eraldiseisvalt konstruktilt. ZIKV replikoni pakkimist on senini kirjeldatud ainult meie labori poolt ning see vajaks põhjalikumat uurimist. Käesoleva magistritöö eesmärk oli uurida erinevaid võimalusi ZIKV replikoni pakkimiseks.

Magistritöö kirjanduse ülevaade kirjeldab flaviviiruseid, nende genoomi, virioni ehitust ning infektsioonitsükli, keskendudes eelkõige ZIKV-le. Lisaks antakse ülevaade replikonidest ja nende rakendustest ning erinevate pakkimissüsteemide ülesehitusest ja nende kasutusala-dest. Eksperimentaalne osa kirjeldab ZIKV replikoni pakkimist erinevate pakkimissüsteemidega.

Töö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis RNA-viiruste uurimisgrupis. Täna professor Andres Meritsat, Eva Žusinaidet juhendamise eest. Samuti soovin tänada Age Utti, Mona Tepporit ja Kai Rausalut abi ja kasulike nõuannete eest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Flaviviirused

Flaviviiruste perekond kuulub *Flaviviridae* sugukonda ja koosneb 53 erinevast viirusest (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2017). Flaviviirustel on üheaheelaline positiivse polaarsusega, ligikaudu 11 000 nukleotiidijäägi pikkune RNA genoom. Genoom sisaldab ühte avatud lugemisraami, millelt transleeritakse polüproteiin, mis lõigatakse struktuurseteks ja mittestruktuurseteks (NS, *nonstructural*) valkudeks. (Lindenbach jt., 2007) Flaviviirused nagu Jaapani entsefaliidi (JEV), Dengue (DENV), West Nile (WNV), kollapalaviku (YFV, *Yellow fever virus*), puukentsefaliidi viirus (TBEV, *tick born encephalitis virus*) ja ZIKV on tõsised inimese patogeenid, mis põhjustavad märkimisväärseid haiguslikke seisundeid ja globaalset suremust igal aastal (Brand jt., 2017).

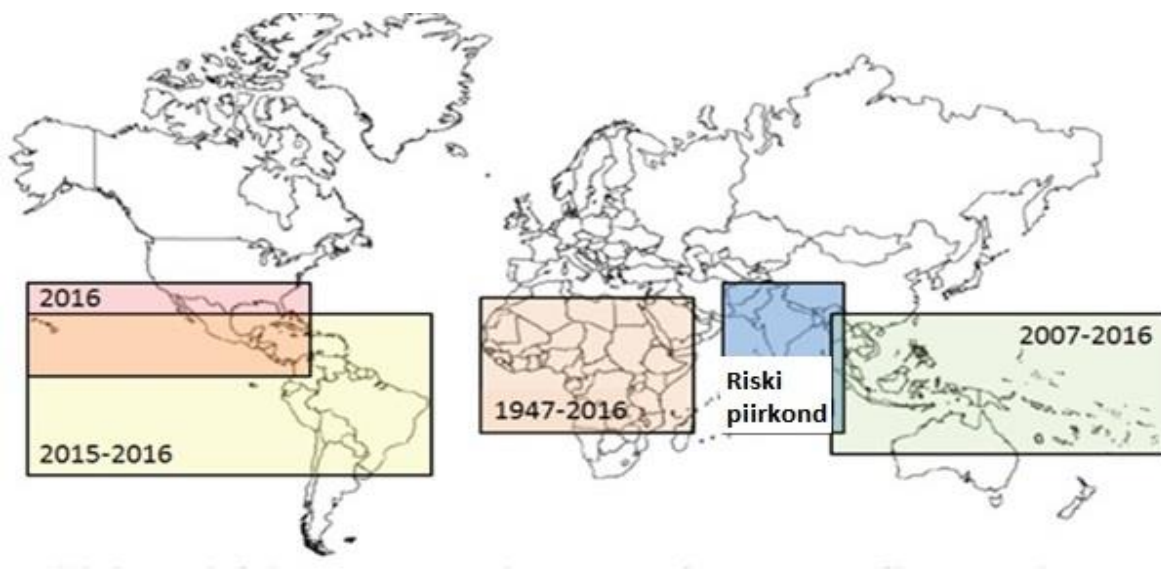
Enamik flaviviiruseid on arboviirused ehk lüljalgsetega ülekanduvad. Need jagatakse kolme gruppi vastavalt nende ülekande viisile: 1) sääskedega ülekanduvad, 2) puukidega ülekanduvad, 3) viirused, mis ei kasuta lüljalgset vektorit. (Strauss ja Strauss, 2008) DENV, YFV ja ZIKV on sääskedega ülekanduvad viirused, millel eristatakse kahte evolutsiooniliselt ja ökoloogilist erinevat ülekande tsüklit: sülvaatiline (metsloomade) ja linna ülekande tsüklil. Sülvaatilises tsüklis viirus tsirkuleerib *Aedes spp* puusääskede ja mitteinimestest primaatide vahel ning linna ülekande tsüklis viirus tsirkuleerib inimeste ja nende lähedal elavate *Aedes spp* sääskede vahel. (Vasilakis ja Weaver, 2017)

Tänapäeval rohkem kui pool maailma populatsioonist on kokku puutunud vähemalt ühe flaviviirusega (Brand jt., 2017). Enamikel juhtudel põhjustavad flaviviirused gripilaadseid sümptomeid nagu palavik, iiveldus, oksendamine, pea-, lihas- ja liigesvalu ning lööve. Väike hulk viirusinfektsioone põhjustavad tõsisemaid haigusnähte nagu kõrge palavik, entsefaliit, kollatõbi, kooma ja surm. (*World Health Organization, WHO, West Nile virus*, 2011; *Japanese encephalitis*, 2015; *Dengue virus*, 2017; *Yellow fever virus*, 2016; *Zika virus*, 2016) Sääskedega levivate flaviviiruste (DENV, WNV, YFV ja JEV) haigusjuhtumite arv on dramaatiliselt suurenenud viimaste aastakümnete jooksul. See kinnitab efektiivsete antiviraalsete ravimite ning vaktsiinide vajadust. (Brand jt., 2017) Vaatamata märkimisväärsele mõjule tervisele ja majandusele, puuduvad enamike flaviviiruste vastu efektiivsed vaktsiinid ning terapeutilised toimeained. Erandiks on siin YFV, JEV ja TBEV, mille vastu on kasutusel efektiivsed vaktsiinid.

(Goo jt., 2017) Selleks, et arendada uusi ravi- ja ennetamismeetodeid, tuleb mõista flaviviiruste elutsükli erinevaid aspekte.

1.2 ZIKV

ZIKV kuulub flaviviiruste perekonda, olles lähedases suguluses WNV, DENV ja YFV-ga (Duffy jt., 2009). ZIKV isoleeriti esmakordselt 1947. aastal Zika metsast (asub Ugandas) pärit reesusahvi verest (Dick jt., 1952). Esimesed inimeste nakatumise juhtumid tuvastati Ugandas ja Tanzaania Ühendatud Vabariigis 1952. aastal (Galán-Huerta jt., 2016). 2007. aastal toimus ZIKV puhang Yapi saarel, Mikroneesias. See oli esimene ZIKV levik Aafrikast ja Aasiast väljapoole. Hinnanguliselt 73% Yapi elanikest olid ZIKV-ga nakatunud. Selle ajani polnud tuvastatud ZIKV puhanguid ning vaid 14 ZIKV juhtumit oli üldse dokumenteeritud. (Duffy jt., 2009) See puhang näitas, et ZIKV nakkus on potentsiaalne esilekerkiv haigus, mida võidakse diagnoosimisel segamini ajada Dengue palavikuga (Faye jt., 2014). Aastatel 2013-2014 toimus ZIKV nakkuse puhang Vaikse ookeani saartel: Prantsuse Polüneesias, Cook'i saartel, Lihavõttesaartel ja Uus-Kaledoonias. Alates 2015. aastast leidis aset dramaatiline ZIKV levik, mis algas Brasiiliast ja levis Lõuna-Ameerikasse ja Kariibi mere saartele. Aastaks 2016 oli inimeste ZIKV infektsiooni juhtumeid tuvastatud 74 riigi territooriumil. (Kindhauser jt., 2016; Boigard jt., 2017) ZIKV ajaline ja geograafiline levik on esitatud Joonisel 1.



Joonis 1. ZIKV globaalne levik. ZIKV nakkuse juhtumite geograafilised tsoonid. Kindlatel ajavahemikel aset leidnud juhtumid on esitatud erinevate värvidega (Sikka jt., 2016, muudetud).

ZIKV kantakse inimestele üle viirusega nakatunud *Aedes* perekonna sääskede, peamiselt *Aedes aegypti* ja *Aedes albopictus* hammustuste kaudu. Need sääsed kannavad edasi ka DENV, YFV ja Chikungunya viirust (CHIKV). Lisaks peamisele ZIKV ülekandele sääskede vahendusel, on tuvastatud ka mitte-vektor ülekande juhtumeid. (Galán-Huerta jt., 2016) Prantsuse Polüneesia puhangu ajal demonstreeriti potentsiaalset ZIKV levikut vereülekande vahendusel (Musso jt., 2014). Lisaks saab ZIKV üle kanduda ka seksuaalselt. Ülekande on tuvastatud vaid nakatunud meestelt nende seksuaalpartneritele, seevastu ülekannet nakatunud naistelt seksuaalpartneritele pole tuvastatud. (Hilss jt., 2016) Leidub tõendeid ka platsentakaudse ja perinataalse ülekande kohta, kus on leitud ZIKV RNA-d lootevedelikust ning vastsündinu ja ema vereproovist (Calvet jt., 2016; Besnard jt., 2014). Rinnapiima, sülje, uriini ja hingamisteede piiskadega ZIKV ülekande kohta tõendid puuduvad (Galán-Huerta jt., 2016).

ZIKV nakkuse sümptomid sarnanevad teiste flaviviiruste (DENV, WNV, JEV ja YFV) infektsioonidega (Xie jt., 2016). Enamasti kulgeb ZIKV nakkus asümptomaatiliselt, kuid sümptomaatiline infektsioon sarnaneb Dengue palaviku ilmingutega nagu palavik, pea-, liiges- ja lihasvalu, lööve ning konjunktiviit (Boigard jt., 2017; Xie jt., 2016). Suurima ZIKV puhangu ajal Prantsuse Poüneesias suurenesid ka Guillain-Barre sündroomi (GBS) juhtumid, viidates viiruse võimalikule seosele GBS-ga (Cao-Lormeau jt., 2016). Tegemist on autoimmuunse häirega, mille korral immuunsussüsteem ründab perifeerset närvisüsteemi. Selle tulemusel tekib lihaste nõrkus, tundlikkuse kadu jalgades ja kätes ning paralüüs (*World Health Organization, WHO, Guillain-Barre syndrome*, 2016). Samuti on viimaste aastate jooksul toimunud puhangud näidanud raseduseaegse ZIKV infektsiooni seost vastsündinute mikrotsefaaliaga ja teiste neuroloogiliste häiretega (Schuler-Faccini jt., 2016). Sellest tulenevalt on ZIKV esile tõusnud globlaase probleemina (Boigard jt., 2017) ning 2016. aastal kuulutati Maailma Terviseorganisatsioon (*World Health Organization, WHO*) välja ülemaailmse ühiskonna tervisliku seisundi hädaolukorra seoses ZIKV-ga (WHO, 2016). Samuti hetkel puudub kättesaadav vaktsiin või ravim ZIKV vastu (Boigard jt., 2017). Seega on efektiivse ja turvalise vaktsiini loomine ning ZIKV uurimiseks vajalikke eksperimentaalsete süsteemide väljaarendamine praegusel hetkel ülimalt oluline (Boigard jt., 2017; Xie jt., 2016).

1.3. ZIKV virion

Sarnaselt teiste flaviviirustega on ZIKV virion väike, umbes 50 nm diameetriga sfääriline partikkel, mis sisaldab ~30 nm nukleokapsiidi südamikku (Lindenbach jt., 2007). ZIKV nagu ka

kõigi teiste flaviviiruste virionil on lipiidne ümbris, mis pärineb peremeesraku endoplasmaatilisest retiikulumist (ER) (Lindenbach jt., 2007; Zhang jt., 2003). Nukleokapsiid koosneb üheaahelalisest positiivse polaarsusega genoomsest RNA-st, mis on ümbritsetud kapsiidivalgust (*capsid protein*, C) koosnevast kihist (Zhang jt., 2003). Nukleokapsiidist väljaspool paikneb kiht, mis koosneb 180-st ümbrise (*envelope*, E) ja 180-st membraani (*membrane*, M) valgu koopiast, mis on ankurdatud lipiidse membraani (Zhang jt., 2003; Kostyuchenko jt., 2016). E ja M valgud asetsevad ikosaedriline sümmeetrias virioni välispinnal. Ikosaedriline sümmeetria moodustuvad 60 korduvat asümmeetrilist üksust, millest igaüks koosneb kolmest E valgust. E valgud asetsevad dimeeridena, millest kolm üksteisega paralleelselt asetsevat dimeeri moodustavad „parve“ struktuuri viiruse pinnale. Neid on kokku 30 tükki, mistõttu virioni pind moodustub 90-st E valgu dimeerist. (Kostyuchenko jt., 2016) E valgu 180 monomeeri asetus ei järgi T=3 sümmeetriat, nagu võiks oodata. Selline asetus on tingitud E valgu ebataavalisest sümmeetriast, mis teeb lipiidse kaksikkihi viiruse välispinnalt suurel määral kättesaamatuks. (Sirohi ja Kuhn 2017; Mukhopadhyay jt., 2005) Flaviviiruste virioni ehitus on kujutatud Joonisel 2.

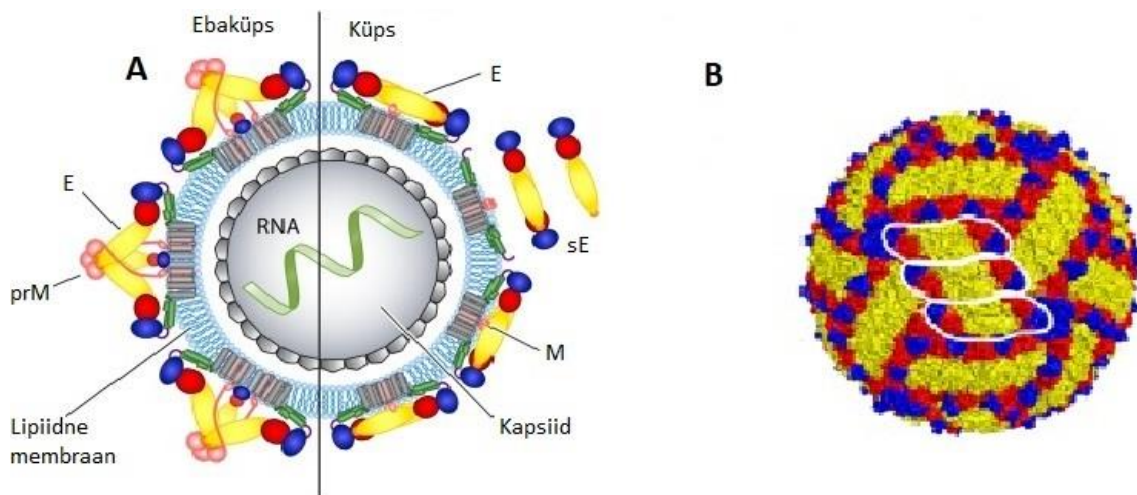
Krüo-elektronmikroskoopia andmetel põhinevad rekonstruktsioonid näitavad, et ZIKV partiklite ehitus sarnaneb üldiselt teiste flaviviirustega. Samuti on ZIKV pinnavalkudel tihedamad interaktsioonid, kui DENV pinnavalkudel, muutes ZIKV partiklid stabiilsemaks kui DENV partiklid. Selline ZIKV virionide struktuurne stabiilsus võib aidata viirusel ellu jääda karmides tingimustes nagu seemnevedelikus, süljes ja uriinis. (Barreto-Vieira jt., 2017)

Flaviviiruste virionid eksisteerivad kolmes erinevas olekus: ebaküpses, küpses ja fusogeenses (Sirohi jt., 2016). Viiruslike glükoproteiinide korraldus ebaküpssetes virionides on täiesti erinev küpssete virionide omast (Lindenbach jt., 2007). Ebaküpssete virionide pinnal paikneb 60 piiki, mis koosnevad kolmest E ja prM valgu heterodimeerist (Zhang jt., 2003). Küpssetes virionides 90 E valgu dimeeri ja M valgud asetsevad paralleelselt lipiidse kaksikkihiga ebataavalises siksakornament mustris, moodustades ikosaedriline kesta viiruse välispinnale (Lindenbach jt., 2007; Prasad jt., 2017).

Lisaks küpssetele ja ebaküpssetele virionidele eksisteerib ka osaliselt küpsed virione. Arvatakse, et ZIKV-l on tendents osaliselt ebaküpssete virionide suuremale osakaalule populatsioonis. Sellist osalist virionide küpsmist on täheldatud kõikide flaviviiruste puhul, kuid viiruspartiklite heterogeensus varieerub flaviviiruste vahel. Struktuurselt heterogeenne viiruse populatsioon on

eelis viiruslikule patogeenile, limiteerides neutraliseerivate epitoopite kättesaadavust virionil ja seeläbi raskendades peremehe immuunsüsteemil viiruse elimineerimist. (Prasad jt., 2017)

Mitmed flaviviiruste uuringud on näidanud, et lisaks infektsioonilistele virionidele, toodetakse ka partikleid, millel puudub viiruslik RNA genoom. Neid nimetatakse väikesteks mitteinfektsioonilisteks subviraalseteks partikliteks (SVP) või viirus-laadseteks partikliteks (VLP). VLP-d on mitteinfektsioonilised ja sarnanevad füüsikalis-keemiliste omaduste poolest metsiktüüpi viirusega. Nende mitteinfektsiooniliste partiklite kokkupanekut rekombinantsete meetodite abil on rakendatud valkude funktsiooni, morfogeneesi ja struktuuri uurimiseks ning flaviviiruste vastaste vaktsiinide loomisel. Samuti on ZIKV mitteinfektsioonilised partiklid leidnud kasutust vaktsiini väljatöötamisel. (Boigard jt., 2017)



Joonis 2. Flaviviiruste virion. A. Flaviviiruste ebaküps (vasakul) ja küps (paremal) virion. Joonisel on esitatud virion, mis koosneb nukleokapsiidist, seda ümbritsevast lipiidsest membraanist ning sellest väljapoole jäävast E ja M valkude kihist, mis asetsevad ikosaedrilise võre struktuuris virioni pinnal. Nukleokapsiid on moodustunud genoomsest RNA-st ja seda ümbritsevast kapsiidist. Ebaküpsedel virionidel paikneb 60 trimeerset piiki, mis koosnevad kolmest E ja prM valgu heterodimeerist ning küpsedel virionidel on 90 E valgu dimeeri, mis asetsevad paralleelselt lipiidse kaksikkihiga. Küpsedel virionidel esinevad ka lahustuvad E valgud (sE). B. E valgu dimeeride siksak-ornament organiseeritus küpse ZIKV virioni pinnal. 3 paralleelset E valgu dimeeri moodustavad ühe „parve“ kujulise moodustise siksak-ornament struktuuris. (Heinz ja Stiasny, 2017, muudetud)

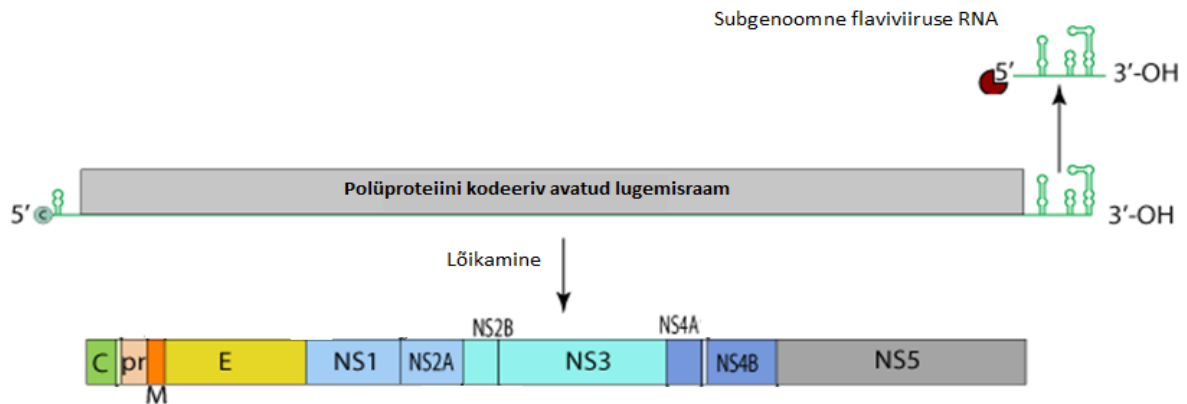
1.4. ZIKV genoom

ZIKV genoom pikkusega ~10 800 nukleotiidijääki (Kuno ja Chang, 2007) kodeerib ühte avatud lugemisraami, millelt transleeritakse polüproteiin. See lõigatakse ko- ja posttranslatsiooniliselt

kolmeks struktuurseks valguks (C, prM ja E) ja seitsmeks NS valguks (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Joonis 3) (Boigard jt., 2017).

ZIKV genoomi 5' otsas asub tüüp I *cap* struktuur ning 3' otsas puudub poliü(A) (polüadenüleeritud) saba struktuur. Selle asemel lõpeb genoomne RNA konserveerunud CU dinukleotiidijäädikuga. Sarnaselt teistele flaviviirustele asetseb ka ZIKV genoomi 3' ja 5'otsas mittetransleeritavad alad (*untranslated region*, UTR) (Joonis 3). Flaviviiruste genoomi 5' ja 3' UTR-de järjestused võivad konserveerunud RNA sekundaarstruktuurideks, mis on olulised genoomi tsükleerumisel replikatsiooni algusfaasis (Zhu jt., 2016) ning translatsiooni regulatsioonis (Holden ja Harris, 2004; Li ja Brinton, 2001; Wei jt., 2009). Flaviviiruste 3' UTR-l on funktsionaalne roll genoomi tsükleerumises, viiruse RNA replikatsioonis ja translatsioonis (Kuno ja Chang, 2007). Samuti 3' UTR-i RNA sekundaarstruktuurid seovad peremeesraku valke ning viirusliku replikatsioonikompleksi valke. 5' UTR sisaldab *cap* struktuuri ning konserveerunud *stem loop* regiooni (SLA), mis on promooteriks RNA sünteesil. (Zhu jt., 2016)

Lisaks genoomsele RNA-le toodetakse ZIKV infektsiooni puhul nakatunud rakkudes ka mittekodeerivaid subgenoomseid flaviviiruslikke RNA-sid (sfRNA) (Joonis 3). Subgenoomset RNA-d kodeerib 3' UTR ja see moodustub mittetäieliku viirusliku RNA lagundamise teel, mida viib läbi peremeesraku 5'-3' eksoribonukleas (Akiyama jt., 2016; Donald jt., 2016). Täielikku degradatsiooni takistavad 3' UTR-s moodustuvad pseudosõlmed, mis volditakse rakulise eksoribonukleasi suhtes resistentseteks RNA sruktuurideks (Akiyama jt., 2016; Chapman jt., 2014; Pijlman jt., 2008). SfrNA-d mängivad rolli kaasasündinud immuunsuse vältimisel ja viiruslikus patogeneesis (Akiyama jt., 2016; Donald jt., 2016).



Joonis 3. ZIKV genoom ja valgud. ZIKV genoom sisaldab ühte avatud lugemisraami, millelt transleeritakse polüproteiin, mis lõigatakse ko- ja posttranslatsiooniliselt kolmeks struktuurseks (C, prM, E) ja seitsmeks NS valguks (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). ZIKV Genoomi 5' otsas on *cap* struktuur ning 3' otsas olev sekundaarstruktuur viib subgenoomse flaviviiruse RNA moodustumisele läbi genoomse RNA lagundamise. (<http://viralzone.expasy.org/6756>, muudetud)

1.5. Infektsioonitsükkel

1.5.1. Sisenemine rakku

ZIKV nakatab erinevatest liikidest ja kudedest pärinevaid rakke (Saiz jt., 2016). ZIKV replitseerub *Aedes* perekonna sääskede soolestikus ja süljenäärmetes (Li jt., 2012; Wong jt., 2013) ning imetaja erinevates rakutüüpides (Bell jt., 1971). Eksperimentaalne infektsioon hiires on näidanud, et viirus replitseerub peamiselt ajurakkudes, sealhulgas neuronites ja astroglia rakkudes (Bell jt., 1971). Lisaks on hiljuti tuvastatud, et ZIKV suudab nakatada ka inimese naha fibroblaste, keratinotsüüte ja ebaküpseid dendriittrakte. ZIKV kasutab rakku sisenemiseks adhesiooni faktoreid ja fosfatidüülretseptorite perekonna erinevaid esindajaid (Hamel jt., 2015). Viirusepoolne antireseptor on E valk, mis vahendab viiruse seondumist rakule (Lindenbach, 2007).

Flaviviirused sisenevad peremeesrakku retseptor-vahendatud endotsütoosi teel (Lindenbach jt., 2007). Endosoomide happeline pH tekitab konformatsioonilise muutuse, mille käigus antiparalleelsed E homodimeerid eralduvad monomeerideks ning seejärel ühinevad taas paralleelseteks homotrimeerideks (Allison jt., 1995a; Stiasny jt., 1996; Stiasny jt., 2001). E monomeerid asetsevad taas kallutatud orientatsioonis viiruse pinna suhtes ning E valgus paiknevad liitumis-peptiidid suunatakse peremeesraku membraani suunas (Zhang jt., 2003; Strauss ja Strauss, 2008). Selle tulemusel muutuvad virionid liitumisvõimelisteks ning ühinevad

peremeesraku membraaniga (endosoomi membraaniga) (Harrison, 2008; Stiasny ja Heinz, 2006; Zhang jt., 2003). Seejärel nukleokapsiid pakitakse lahti ja genoomne RNA vabastatakse tsütoplasmasse. Genoomne RNA tsütoplasmas käitub mRNA-na viiruslike valkude translatsioonil, matriitsina RNA replikatsioonil ja geneetilise materjalina, mis pakitakse uutesse viiruspartiklitesse. (Lindenbach jt., 2007) Flaviviiruste sisenemise protsess on esitatud kogu flaviviiruste elutsükli kujutaval Joonisel 5.

1.5.2. Translatsioon

Tsütoplasmasse vabastatud flaviviiruste genoomselt RNA-lt sünteesitakse viiruslik polüproteiin, mis on ankurdatud ER-le (Uchil ja Satchidanandam, 2013; Hasan jt., 2018). Flaviviiruste translatsioon on *cap* sõltuv ning erinevalt paljudest teistest positiivse polaarsusega RNA viirustest, ei lülita flaviviirused välja rakulist valgusünteesi. Seega peab viiruslik RNA konkureerima rakulise mRNA-ga translatsiooni masinavärgi pärast. (Holden ja Harris, 2004) Flaviviirused kasutavad erinevaid mehhanisme, sealhulgas spetsiaalseid struktuure 3' ja 5' UTR-s, et hõlbustada translatsiooni (Lindenbach jt., 2007). Flaviviiruste 3' UTR moodustab juuksenõelastruktuuri, mis suurendab translatsiooni efektiivsust ning asendab puuduoleva poli(A) saba struktuuri (Strauss ja Strauss, 2008).

1.5.4. Viiruslike valkude omadused

1.5.4.1. Struktuursed valgud

Struktuursed valkude roll avaldub viiruse sisenemisel peremeesrakku, virionide kokkupanekul ning nende vabanemisel (Lindenbach jt., 2007). Flaviviiruste struktuursed valgud translokeeritakse ja ankurdatakse ER-le translatsiooni jooksul (Strauss ja Strauss, 2008; Mukhopadhyay jt., 2005). C valk moodustab dimeere ning on nukleokapsiidi ehituslik osa (Jones jt., 2003; Kiermayr jt., 2004). ER-i luumeni pool paiknevad prM ja E valk moodustavad kiiresti stabiilse heterodimeeri (Lorenz jt., 2002; Allison jt., 1995b). prM valgu interaktsioon E valguga on vajalik selleks, et aidata E valgul korrektselt voltuda ning takistada ebaküpsete virionide liitumist peremehe rakumembraaniga (Mossenta jt., 2017; Yu jt., 2008; Zhang jt., 2003).

1.5.4.2. Mittestruktuursed valgud

ZIKV NS valkudel arvatakse olevat samad funktsioonid, mis teiste flaviviiruste vastavatel valkudel (Martin-Acebes ja Saiz, 2012; Acosta jt., 2014). NS valkude ülesannete hulka kuuluvad replikatsiooniga seotud membraanide ümberkorralduste indutseerimine (NS4A),

immunomodulatsioon (NS1 ja NS2A), RNA replikatsiooni regulatsioon ja viiruse kokkupanek (NS2A) (Saiz jt., 2016).

NS2A ja NS2B on hüdrofoobsed polüpetiidid, mis on seotud membraanidega ja võivad toimida replikatsiooni masinavärgi ankruna. NS2A inhibeerib α/β interferoonide tootmist nakatunud rakkudes ning mängib rolli infektsiooniliste partiklite tootmises. NS2B on NS3 proteaasi aktiivsuse jaoks vajalik kofaktor. (Strauss ja Strauss, 2008)

NS3 valgul on lisaks proteaasi aktiivsusele ka helikaasi ja RNA trifosfataasi või nukleosiidtrifosfataasi (*nucleoside-triphosphatase*, NTPaas) aktiivsused. Helikaasi aktiivsus on tõenäoliselt vajalik replikatsioonil tekkiva kaheaahelalise replikatiivse vormi (*double-stranded replicative form*, dsRF) lahtiharutamiseks ning RNA trifosfataasi aktiivsus on vajalik *cap* struktuuri lisamiseks viiruslikule genoomile. (Uchil ja Satchidanandam, 2013)

NS1 on glükoproteiin, mille paljud ülesanded pole veel arusaadavad. NS1-te on leitud kolmes erinevas asukohas: rakusiseselt, ankurdatusena plasmamembraanile ja lahustuva valguna, sekreteerituna nakatunud rakkudest. Teatakse, et NS1 valgu rakusisest vormi vajatakse RNA replikatsiooniks. Selle funktsiooni läbiviimiseks NS1 interakteerub NS4A valguga. (Strauss ja Strauss, 2008)

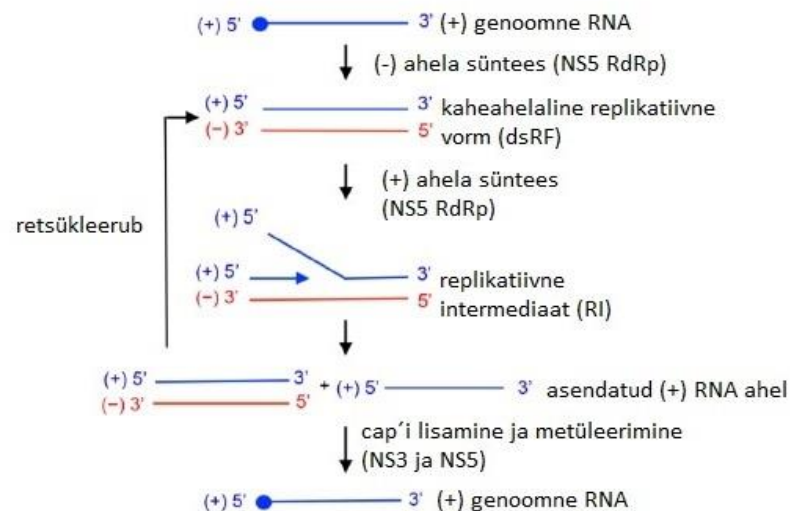
NS5 on viiruslik RNA polümeraas, millel on ka *cap* struktuuri lisamiseks vajalik metüültransferaasi aktiivsus (Strauss ja Strauss, 2008).

NS4A ja NS4B on membraanidega seotud hüdrofoobsed polüpetiidid. Need võivad osaleda viirusliku replikaasi kokkupanekus rakusisestel membraanidel (Strauss ja Strauss, 2008). NS4A on integraalne membraanivalk, mis arvatakse funktsioneerivat valgu sillana NS1 ja replikatsioonikompleksi (*replication complex*, RC) vahel (Uchil ja Satchidanandam, 2013). NS4B valgu roll jääb veel arusaamatuks, kuid teatakse, et ta lokaliseerub pigem raku tuumas kui replikatsiooni saitides (Uchil ja Satchidanandam, 2013).

1.5.5. Replikatsioon

ZIKV replikatsiooni kohta on teada vähe, kuid eeldatavasti sarnaneb see üldjoontes *Flaviviridae* sugukonna teiste esindajate replikatsioonitsükliga (Galán-Huerta jt., 2016). Replikatsioon algab negatiivse ahelaga RNA sünteesist. Kõigepealt seondub NS5 polümeraas genoomse RNA promooterile (SLA) genoomi 5' otsas. Negatiivse ahela sünteesi initsiatsioonile eelnevalt RNA

tsirkuleerub genoomi 3' ja 5' otsa vahelise interaktsiooni tulemusel. Selle RNA-RNA interaktsiooni vahendusel jõuab NS5 polümeraas initsiatsiooni saidini 3' UTR-s ning genoomi 3' ots tuuakse NS5-SLA kompleksi lähedale, et võimaldada RNA sünteesi initsiatsiooni. Genoomi tsükleerumise järgselt arvatakse, et 3' UTR-i juuksenõelastruktuuri alumine pool avaneb võimaldades negatiivse RNA ahela sünteesi initsiatsiooni. Saadud negatiivse polaarsusega RNA käitub matriitsina positiivse ahelaga RNA sünteesil (Lindenbach jt., 2007) ja jääb seotuks positiivse RNA-ga, moodustades dsRF-i (Roby jt., 2012). See käitub matriitsina paljude positiivsete RNA ahelate sünteesil asümmeetrilise semikonservatiivse mehhanismi kaudu s.t äsja sünteesitud positiivne RNA ahel asendab eelnevalt eksisteeriva positiivse RNA molekuli (Roby jt., 2012). Vabanenud positiivne RNA ahel funktsioneerib kas matriitsina negatiivsete ahelate sünteesil, mRNA-na viiruslike valkude translatsioonil või pakitakse see viiruspartiklitesse (Roby jt., 2012). Positiivse polaarsusega genoomi 5' otsa lisatakse metüleeritud *cap 1* struktuur NS3 ja NS5 valgu abil (Issur jt., 2009). Metüleeritud *cap* struktuur on oluline viirusliku RNA stabilisatsiooniks, translatsiooniks ning peremehe immuunvastuse vältimiseks (Daffis jt., 2011). Flaviviiruste replikatsiooni mehhanism on esitatud Joonisel 4.



Joonis 4. Flaviviiruste RNA replikatsiooni skeem. (+) genoomne RNA käitub matriitsina, millelt sünteesitakse (-) RNA ahel. Sünteesitud negatiivne RNA ahel jääb seotuks positiivse RNA-ga, moodustades kaheaahelalise replikatiivse vormi (dsRF), mis funktsioneerib matriitsina paljude positiivsete RNA ahelate sünteesil. Uus sünteesitud (+) ahel asendab eelnevalt eksisteeriva positiivse ahela. Saadud dsRNA produkt vabastatakse ning seda kasutatakse uute (+) ahelate sünteesiks. Asendatud (+) RNA ahelale sünteesitakse *cap* struktuur. Joonisel on sulgudes esitatud valgud, mis osalevad vastavas etapis. (Klema jt., 2015, muudetud)

Flaviviiruste infektsioon põhjustab ulatuslikku peremeesraku membraanide proliferatsiooni ja reorganisatsiooni (Uchil ja Satchidanandam, 2013). RNA replikatsioon leiab aset RC-des, mis asuvad viiruse indutseeritud membraansetes struktuurides – vesiikulite pakettides (Pijlman jt., 2006). Need membraansed struktuurid mässivad end ümber RC ning on tõenäoliselt vajalikud selle kokkupanekuks (Welsch jt., 2009). NS valkude (NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS5) ja dsRNA leidmine vesiikulite pakettides tõestab, et tegemist on RNA sünteesi toimumiskohaga (Westaway jt., 1997; Mackenzie jt., 2007; Mackenzie jt., 1996; Westaway jt., 1999). RC peamised komponendid on NS3 ja NS5 valk, mis omavad kõiki genoomi replikatsiooniks tarvilikke ensümaatilisi aktiivsusi. Ülejäänud mittestruktuursed valgud toetavad replikatsiooni ja osalevad RC moodustumises. (Lindenbach jt., 2013) Selline replikatsiooni ruumiline eraldatus võimaldab kontsentreerida metaboliite, mis on vajalikud replikatsiooniks ning samal ajal kaitsta viiruslikku RNA-d rakuliste nukleaaside ja kaasasündinud immuunsust vallandavate tsütosoolsete RNA sensorite eest. Vesiikulite paketid on seotud tsütoplasmaavause kaudu, mis võimaldab positiivse polaarsusega RNA genoomi väljumist tsütoplasmasse. (Cortese jt., 2017)

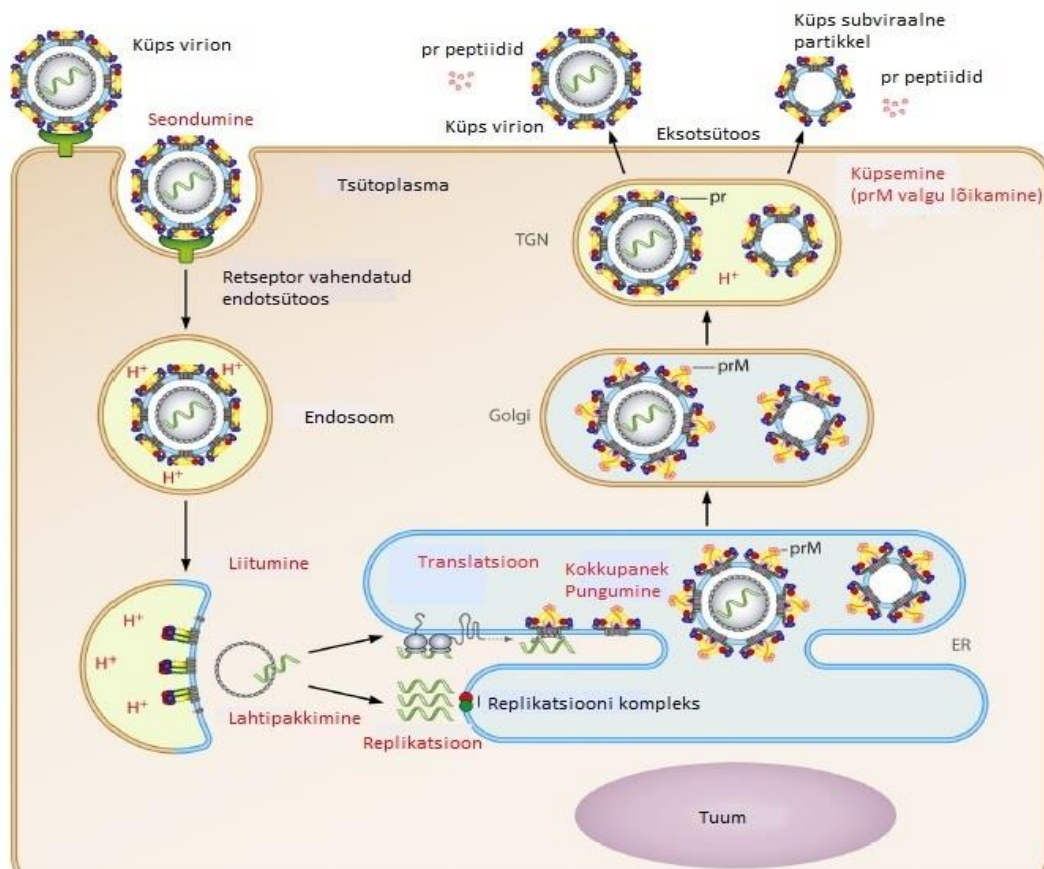
1.5.6. Virionide pakkimine ja küpsemine

Flaviviiruste partiklite kokkupanek hõlmab endas prM-E heterodimeeri moodustumist; nukleokapsiidi ja rakulise päritoluga lipiidse kaksikkihi moodustumist; ebaküpsete ja küpsete virionide moodustumist (Lindenbach ja Rice, 2003). Flaviviiruste virionide kokkupanekul on üks kõige varasemaid sündmuseid nukleokapsiidi moodustumine (Mukhopadhyay jt., 2005). Kapsiidi moodustumise ja selle viirusliku ümbrisega ühinemise mehhanism pole veel täpselt teada (Blazevic jt., 2016). Arvatakse, et C valk seostub sünteesitud genoomse RNA-ga ning sulandub kokku ER-i membraaniga, mille luumeni poolsem külge sisaldab prM-E heterodimeere. Tundmatute prM ja E valgu vaheliste interaktsioonide tulemusel viiruspartiklid punguvad läbi ER-i membraani ER-i luumenisse ning moodustuvad ebaküpsed viiruspartiklid. (Sirohi ja Kuhn, 2017)

Flaviviiruste ebaküpsetest virionidest moodustuvad küpsed virionid trans-Golgi ühenduses. Trans-Golgi ühenduse madal pH indutseerib ümberkorraldust, mille käigus 60 prM-E heterotrimeeri paigutuvad 90-ks küpsetele virionidele iseloomulikuks E valgu homodimeeriks. (Yu jt., 2008) See ümberkorraldus paljastab peremeesraku furiinile lõikamissaidi prM valgul ning selle tulemusel toimub prM valgu lõikamine (Stadler jt., 1997; Yu jt., 2009). Lõikamise tulemusel moodustub M valk ja vabaneb prM peptiid, mis jääb seotuks E valguga kuni partikkel

vabastatakse neutraalse pH-ga keskkonda (Yu jt., 2009). Kuna rakusisesed M valku sisaldavaid virione pole tuvastatud, siis arvatakse, et prM valgu lõikamine toimub vahetult enne küpsete virionide vabanemist (Lindenbach jt., 2007). Tekkinud küpsed viiruspartiklid transportitakse plasmamembraanile (Roby jt., 2012). Flaviviiruste pakkimise ja küpsemise ülevaatlik skeem on näidatud Joonisel 5.

RNA pakkimine on seotud selle replikatsiooniga ning seega arvatakse, et NS valkudel on oluline roll RNA pakkimises ja viiruse moodustumisel (Lindenbach jt., 2007; Roby jt., 2012). Näidatud on, et NS2A ja NS3 valgul on roll viiruse moodustumisel või sekretsioonil. Täpsed mehhanismid, kuidas need valgud osalevad RNA pakkimises, pole praeguseks veel teada. (Roby jt., 2012)



Joonis 5. Flaviviiruste infektsioonitsükkel. Viirus siseneb rakku retseptor-vahendatud endotsütoosi teel. Endosoomi happeline pH vallandab virioni ja rakumembraanide liitumise, millele järgneb viirusliku RNA vabanemine. Genoomne RNA funktsioneerib kui mRNA, millelt transleeritakse valmis valkudeks protsessitav polüproteiin. Viiruse RNA replikatsioon ja uute virionide kokkupanek leiab aset ER-i membraanil. Alguses moodustuvad ebaküpsed virionid, mis trans-Golgi kompleksides protsessitakse küpseteks virionideks ning vabanevad rakust eksotsütoosi teel. Virionide kokkupanekul moodustuvad ka subviraalsed partiklid, mis sisaldavad lipiidset membraani, prM-E komplekse, kuid millel puudub nukleokapsiid. (Heinz ja Stiasny, 2017, muudetud)

1.6. Replikon

Teadmised flaviviiruste replikatsiooni kohta on viimaste aastatega märkimisväärselt kasvanud tänu erinevate flaviviiruste täispikkade cDNA (komplementaarne DNA, *complementary DNA*) kloonide konstrueerimise ja kasutamisele. Pöördgeneetilisi rakendusi kasutatakse, et mõista flaviviiruste genoomi sisestatud geneetiliste muudatuste põhjustatud efekte. Hoolimata molekulaargeneetika eelistest, on paljude flaviviiruste rutiinsete laboratoorsete manipulatsioonide uurimine siiski keeruline, seda osalt nende viiruste patogeensete omaduste tõttu. Alternatiivne rakendus potentsiaalselt ohtlikke flaviviiruste uurimiseks on mitteinfektsioonilise replikoni kasutamine. (Jones jt., 2005)

Flaviviiruste replikoni puhul on tegemist isereplitseeruva RNA molekuliga: genoomiga, milles struktuurseid valke (C, prM, E) kodeeriv osa on asendatud markergeeniga (Khromykh ja Westaway, 1997). Markeeriks võib olla näiteks fluorestseeruv valk, mida saab detekteerida ja selle põhjal jälgida replikoni replitseerumist (Shan jt., 2013). NS valke kodeeriv osa on säilitatud, sest seda vajatakse RNA replikatsiooniks. Flaviviiruste puhul on näidatud, et struktuurseid valke kodeerivat osa, väljaarvatud RNA tsükleerumisdomeeni kapsiidi valku kodeerivas osas, pole viirusliku RNA replikatsiooniks tarvis. Seega suudab replikon efektiivselt replitseeruda, kuid ei ole võimeline tootma uusi virione. (Scholle jt., 2004)

Positiivse polaarsusega RNA viiruste replikonidel on mitmeid eeliseid viiruslike vektorsüsteemide ees. Üheks eeliseks on kõrgel tasemel heteroloogsete ehk võõrgeenide ekspressioon efektiivse replikoni paljunemise tõttu. Samuti ei teki DNA vahevorme ja replikatsioon toimub ainult tsütoplasmas. See hoiab ära probleemid, mis on seotud viiruse genoomi integratsiooniga raku genoomi. Lisaks ei teki kontrollimatut viiruse levikut, sest replikon-RNA ei saa väljuda rakkudest, millesse ta on viidud. (Harvey jt., 2004)

Kõrgel tasemel võõrgeenide ekspressioon on saavutatud alfaviiruste (Sindbis viiruse, Semliki Forest viiruse, polioviiruse) replikoni kasutamisele. Vastavate replikonide puuduseks on tsütopaatilisus, mis ei võimalda võõrgeenide pikaajalist ekspressiooni. (Khromykh ja Westaway, 1997) Erinevalt teistest RNA viiruste replikonidest on flaviviiruste replikonidel madal või puuduv tsütopaatiline efekt, mis võimaldab pikendada võõrgeenide ekspressiooni. Esimene konstrueeritud flaviviiruste replikon oli Kunjin viiruse replikon, mida on laialdaselt kasutatud võõrgeenide ekspressioonivektorina *in vitro* ja *in vivo*. (Harvey jt., 2004; Khromykh jt., 1998)

Samuti on konstrueeritud ka teiste flaviviiruste, näiteks DENV, WNV, YFV, ZIKV ja TBEV replikone (Harvey jt., 2004; Xie jt., 2016).

Replikonid on ka olulised eksperimentaalsed süsteemid, mida saab kasutada uurimaks flaviviiruste replikatsiooni ja patogeneesi molekulaarseid detaile. Võrreldes infektsioonilise cDNA klooniga võimaldavad replikoni süsteemid analüüsida viirusliku replikatsiooni sündmusi, näiteks translatsiooni ja RNA sünteesi ilma viiruse sisenemiseta ja virionide moodustumiseta. See replikoni omadus on kasulik just siis, kui kasutada replikone inhibiitorite antiviraalsete mehhanismide uurimiseks. (Xie jt., 2016) Samuti võimaldab see täpselt määratleda valgud, konkreetset valgujärjestused ja RNA järjestused, mis osalevad RNA replikatsioonis (Khromykh ja Westaway, 1997). Replikonid võimaldavad eristada viirusliku translatsiooni ja RNA replikatsiooni ning seeläbi uurida konserveerunud järjestuste deletsioonide ja mutatsioonide mõju viiruse translatsioonile ja replikatsioonile (Lo jt., 2003).

1.7. Replikonide pakkimissüsteemid

Sageli on replikonide kasutamine piiratud teatud rakutüüpide madala transfektsiooni efektiivsusega; replikonide pakkimine VRP-desse võimaldab nakatamise teel efektiivselt viia replikone erinevatesse rakutüüpidesse (Berger, 2009). Lisaks replikonidel põhinevad analüüsid võimaldavad uurida ainult sihtmärke, mis osalevad viiruslikus translatsioonis ja RNA sünteesis, kuid mitte viiruse sisenemiseks vajalikke sihtmärke. Neid saab uurida süsteemidega, mis põhinevad VRP-del. (Xie jt., 2016) Ka replikonide ekspressioonisüsteemidena kasutamise edu on suuresti saavutatud just tänu võimele toota suurtes kogustes partikleid, mis sisaldavad replikon-RNA-d (Khromykh jt., 1998). Replikonide pakkimine VRP-desse toimub *in trans* ehk mitte replikonilt ekspresseeritud struktuursete valkude vahendusel.

VRP-sid saab kasutada ravimiarenduses ja potentsiaalse vaktsiini väljatöötamisel. (Xie jt., 2016) VRP-d on füüsiliselt sarnased virionidele ja infektsioonilised, aga seni kui VRP-de struktuursed valgud pole kodeeritud replikon RNA-lt endalt, siis toimub ainult ühekordne infektsioonitsükkel ja viiruslike järglasi, mis leviksid edasi, ei saa moodustuda (Scholle jt., 2004). See on ka peamine põhjus, miks replikonide pakkimist VRP-desse kasutatakse vaktsiinide väljatöötamisel (Varnavski ja Khromykh, 1999). Pakitud alfaviiruste replikone on edukalt kasutatud vaktsineerimisel mikroobsete ja viiruslike patogeenide vastu (Varnavski ja Khromykh, 1999). Nagu juba eelnevalt mainitud, on flaviviiruste replikonidel oluline eelis alfaviiruste süsteemide ees – puudub tsütopaatiline efekt (Khromykh jt., 1998; Varnavski ja Khromykh, 1999). Seetõttu

on mitteinfektsioonilised flaviviiruste replikonid koos VRP-desse pakkimise võimega kasulikud tööriistad mittestütöpaatiliste ja mitteinfektsiooniliste vaktsiinide väljatöötamisel. Samuti võivad flaviviiruste replikonide pakkimissüsteemid osutada kasulikuks geeniteraapia rakendustes näiteks geenide viimisel mittejagunevatesse rakkudesse. (Varnavski ja Khromykh, 1999)

Pakkimissüsteemides saadavaid VRP-sid saab kasutada ka flaviviiruste bioloogiliste omaduste uurimiseks, sest VRP-de antigeensed omadused, seondumine ja sisenemine on sarnased viirusega. Seda hõlpsustab ka asjaolu, et eksperimente saab läbi viia madala ohutustasemega (BSL2) labori tingimustes. Flaviviiruste pakkimissüsteemid võimaldavad uurida näiteks struktuursete valkude protsessingu, infektsiooniliste partiklite küpsemise ja kokkupaneku mehhanisme. (Scholle jt., 2004) Näiteks on flaviviiruste pakkimissüsteeme kasutatud pakkimissignaali määratlemiseks flaviviiruse RNA-s (Khromykh jt., 1998). Pakkimissüsteemide üheks eeliseks on see, et pakkimine toimub eraldi RNA replikatsioonist ja see võimaldab uurida otse struktuursesse regiooni viidud mutatsioonide ja asenduste efekti RNA pakkimisele (Scholle jt., 2004). Pakkimissüsteeme on välja töötatud erinevate flaviviiruste näiteks, WNV (Scholle jt., 2004; Li jt., 2017), DENV (Sangiambut jt., 2013; Pang jt., 2014), Kunjin (Khromykh jt., 1998) ja TBEV replikonide jaoks (Gehrke jt., 2003; Yoshii jt., 2009).

1.8. Töös kasutatud pakkimissüsteemid

Lihtne ja efektiivne pakkimissüsteem on oluline eeldus replikonide praktiliseks kasutamiseks (Gehrke jt., 2003).

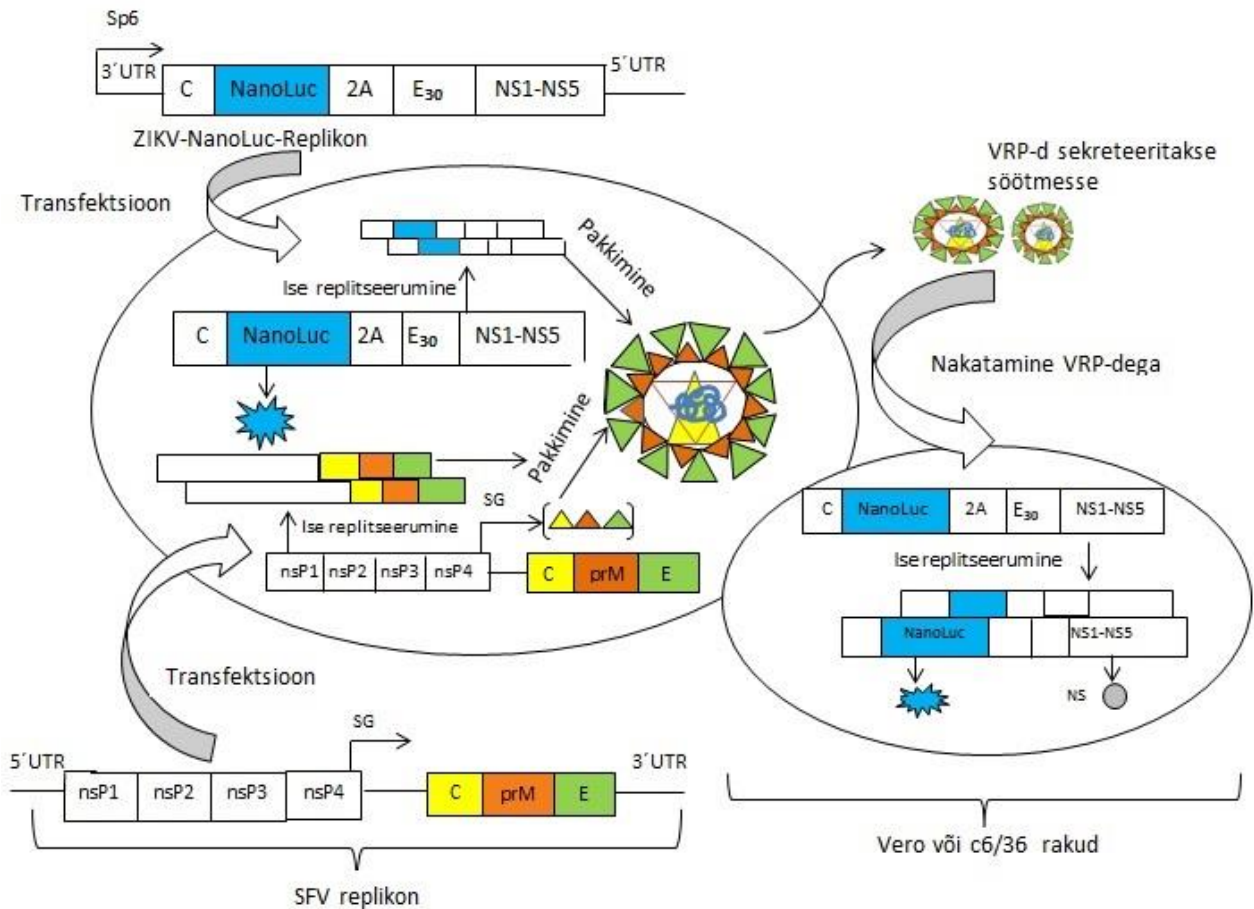
Erinevate tööde põhjal on näidatud, et flaviviiruste replikone saab edukalt pakkida VRP-desse struktuursete valkude abil, mille ekspressiooni *in trans* on võimalik saavutada erineval moel. Antud töös on ZIKV replikoni pakkimiseks kasutatud kolme erinevat pakkimissüsteemi: SFV (Semliki forest viirus) replikonidel, pakkimiserakuliinil ja SFV replikoni sisaldavatel VRP-del põhinevat süsteemi.

1.8.1. SFV replikonidel põhinev pakkimissüsteem

SFV replikonidel põhinevas süsteemis ekspresseeritakse replikoni pakkimiseks vajalikud ZIKV struktuursed valgud rekombinantselt SFV replikonilt. Samuti ekspresseeruvad SFV replikonilt SFV mittestruktuursed valgud (nsP), mis vastutavad SFV replikoni replitseerumise eest.

SFV replikoni kasutamise eelised ZIKV struktuursete valkude ekspressioonil on kõrge tasemel toimuv võõrgeeni ekspressioon ja vastavate vektorite kiire konstrueerimine. Antud süsteem

hõlmab kahte järjestikust transfektsiooni rakkudesse, millest esimesega viiakse rakkudesse pakitav ZIKV replikon ja teisega struktuurseid valke ekspresseeriv SFV replikon. Siinkohal on oluline, et SFV replikoni transfekteerimine leiaks aset siis, kui pakitava ZIKV replikon-RNA süntees on saavutanud maksimaalse taseme. Selle süsteemi ülesehitust visualiseerib Joonis 6. Kõige esimesena kasutati sama süsteemi Kunjin viiruse replikoni pakkimiseks (Varnavski ja Khromykh, 1999). Selle süsteemi rakendamise tulemusel saadi siiski palju vähem VRP-sid kui alfaviiruse enda replikoni pakkimisel. (Khromykh jt., 1998) Lisaks kaasnevad vastava süsteemiga ka teised piirangud nagu kaks järgnevat transfektsiooni, mis peavad olema edukad, ning SFV replikoni tsütopatogeensus (Gehrke jt., 2003). Samuti on SFV replikoni replitseerumine palju efektiivsem kui flaviviiruste replikoni oma. SFV tsütopaatilisuse ja ülereplitseerumise probleemi on antud töös üritatud lahendada tsütopaatilisust vähendavate mutatsioonide (RDD ja PG) viimisega SFV replikoni nsP2 valku kodeerivasse piirkonda (vt. Materjalid ja meetodid lk. 32). NsP2 on peamine SFV valk, mis vastutab peremeesraku transkriptsiooni ja translatsiooni mahasurumise eest (Tamm jt., 2008).



Joonis 6. SFV replikonidel põhineva pakkimissüsteemi skeem. Süsteem põhineb SFV replikonil, mis kodeerib SFV mittestruktuurseid valke (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) ja ZIKV struktuurseid valke (C, prM, E), mis pakivad ZIKV replikoni. Süsteem hõlmab ZIKV ning seejärel SFV replikoni transfektsiooni imetajarakkudesse. Mõlemad replikonid on võimelised ise replitseeruma transfekteeritud rakkudes, kasutades selleks replikonilt ekspresseeritud mittestruktuurseid valke. ZIKV replikoni replitseerumisega kaasneb markeri - Nano lutsifreaaS (NanoLuc) ekspressioon transfekteeritud rakkudes, mis on detekteeritav rakulüsaadist. Pakkimise tulemusel moodustunud VRP-d sekreteeritakse rakusöötmesse, millest need kogutakse ning kasutatakse uute rakkude nakatamiseks. Nakatunud rakkudes toimub ZIKV replikoni replitseerumine ja sellelt kodeeritud markeri (NanoLuc) ekspressioon.

1.8.2. Pakkimisrakuliinil põhinev pakkimissüsteem

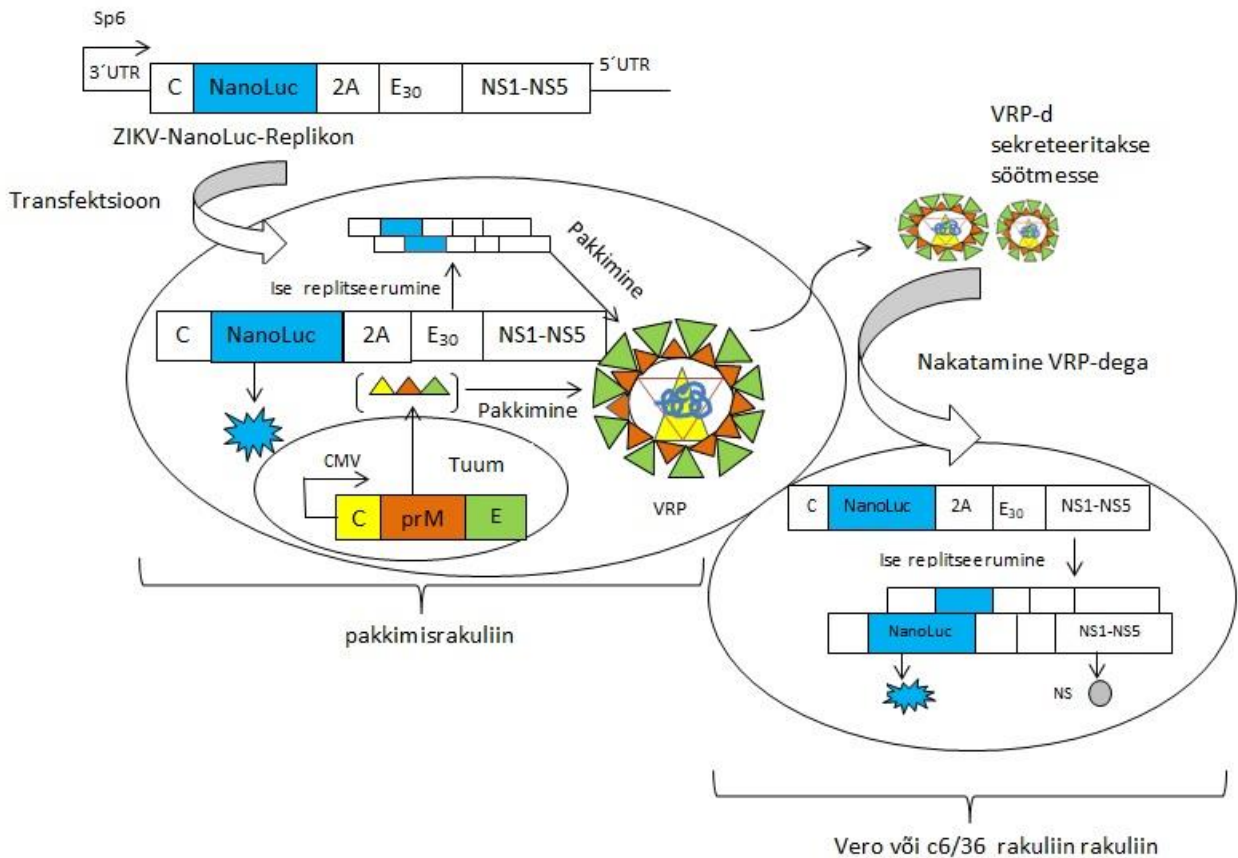
SFV replikonidel põhinev pakkimissüsteem on suhteliselt kohmakas, nõuab täpset transfektsiooni ajastamist ning saadud VRP-de tiiter on madal (Gehrke jt., 2003; Harvey jt., 2004). Seetõttu võeti kasutusele pakkimisrakuliin, mis oluliselt lihtsustab ja suurendab VRP-de tootmist (Gehrke jt., 2003). Ka antud töös on kasutatud ZIKV replikoni pakkimiseks pakkimisrakuliini, mis stabiilselt ekspresseerib ZIKV polüproteiini, mis lõigatakse raku struktuurseteks valkudeks (C, prM, E).

Struktuursed valgud pakivad replikoni VRP-desse ning replikoni kodeeritud NS valgud osalevad replikoni replitseerumisel. Antud süsteem on skemaatiliselt esitatud joonisel 7.

Pakkimisrakuliini konstrueerimiseks on viidud rakkudesse plasmid. See sisaldab ZIKV struktuurset polüproteiini kodeerivat geenikasseti, mille ekspresseerumisel rakuliinis moodustuvad struktuursed valgud (C, prM, E). Samuti on antud plasmidis antibiootikumi resistentsusgeen, mis võimaldab antibiootikumi lisamisel selekteerida rakke, mis sisaldavad antud plasmidi ja selle tulemusel ekspresseerivad struktuurseid valke. (Harvey jt., 2004)

Esimene pakkimissüsteem, mis kasutas pakkimiseks rakuliini oli TBEV replikoni pakkimine CHO-ME pakkimisrakuliiniga. See rakuliin ekspresseeris ainult kahte TBEV struktuurset valku: prM ja E. Antud uurimusest selgus, et CHO-ME pakkimisrakuliini saab väga edukalt kasutada TBEV replikoni pakkimiseks, kuid siiski jäi toodetud VRP-de kogus madalaks. (Gehrke jt., 2003) Järgmisena loodi Kunjin replikoni pakkimiseks tetratsükliiniga indutseeritav BHK-21 rakkudel põhinev pakkimisrakuliin, mis ekspresseeris kõiki kolme struktuurset valku ning võimaldas toota juba suuremas koguses VRP-sid. Kunjin replikoni pakkimise katsed näitasid, et pakkimisrakuliin on väga oluline edusamm flaviviiruse replikonil põhineval geeniekspressiooni süsteemi arendamises ja võib olla laialt kasutatav flaviviiruse RNA pakkimise ning virionide kokkupaneku uurimiseks. Pakkimisrakuliiniga toodetud VRP-sid on kasutatud ka immuniseerimiseks, mille tulemusel indutseeriti imuunvastused replikoni poolt ekspresseeritud immunogeenile. (Harvey jt., 2004)

Pakkimisrakuliinide puhul on näidatud, et hoolimata C ja E valgu järjestuste kattuvusest replikoni ja rakuliini viidud geenikasseti vahel, ei toimu rekombinantse infektsioonilise viiruse teket. Tänu suurele homoloogiale erinevate flaviviiruste vahel saab pakkimisrakuliine kasutada ka teiste flaviviiruste replikonide pakkimiseks (Harvey jt., 2004).

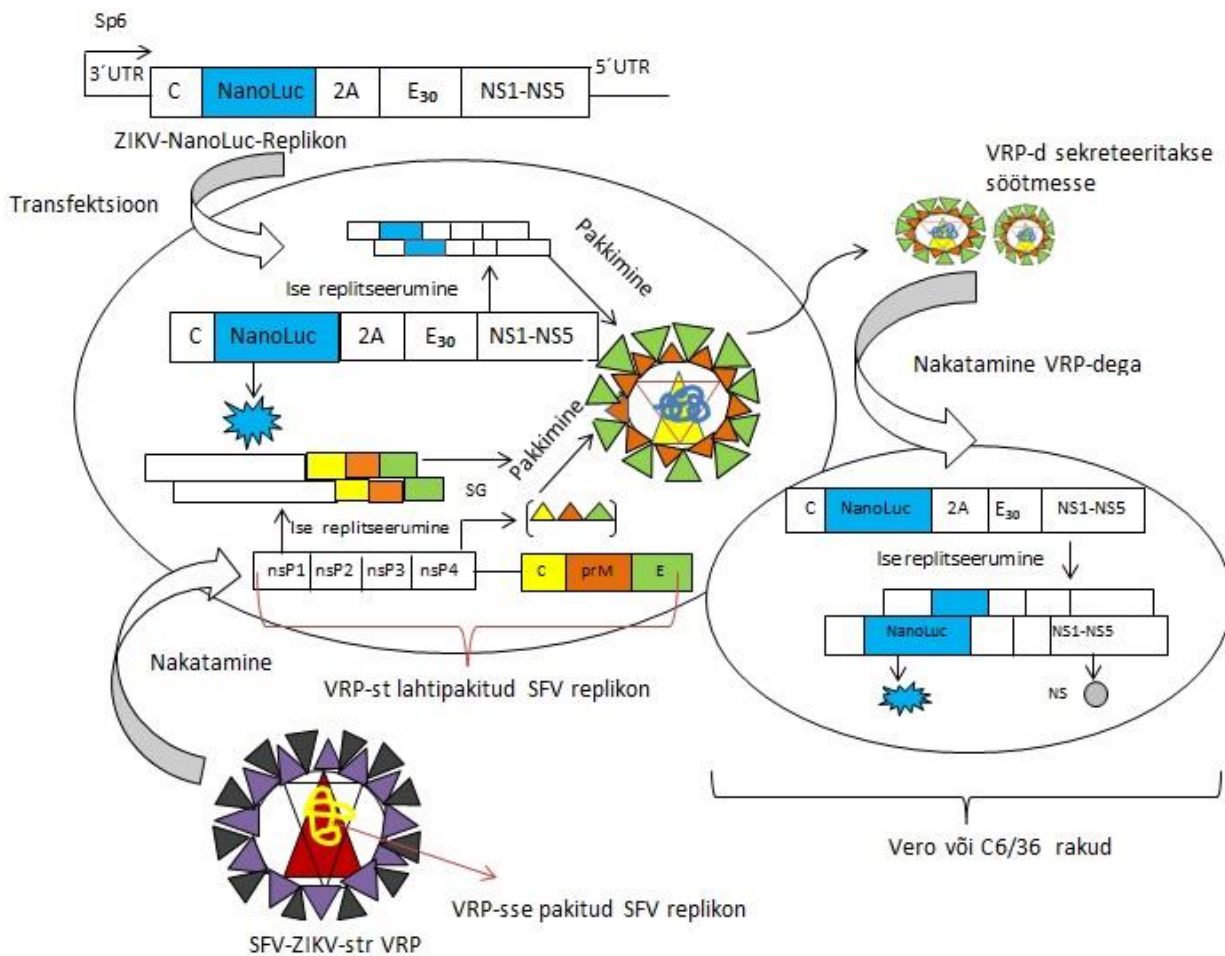


Joonis 7. Pakkimisrakuliinil põhineva pakkimissüsteemi skeem. Pakkimisrakuliini transfekeeritakse iseseisvalt replitseeruv ZIKV-NanoLuc replikon. Sellelt ekspresseeritakse mittestruktuursed (NS) valgud, mis on vajalikud replikoni replitseerumiseks ning NanoLuc marker. Pakkimisrakuliin ekspresseerib ZIKV struktuurseid valke, mis pakivad ZIKV-NanoLuc replikoni VRP-desse. Tekkinud VRP-d sekreteeritakse söötmesse. Edasised sündmused on samad kui Joonisel 6 kujutatud süsteemi puhul.

1.8.3. Heteroloogilistel VRP-del põhinev pakkimissüsteem

Lisaks kasutati antud töös ZIKV replikoni pakkimiseks ka heteroloogilisi VRP-sid ehk ZIKV struktuurseid valke kodeerivat SFV replikoni sisaldavaid VRP-sid (SFV-ZIKV-str VRP). See süsteem on suhteliselt sarnane SFV replikonidel põhineva süsteemiga, sest pakkimiseks kasutatakse samuti rekombinantset ZIKV struktuurseid valke ekspresseerivat SFV replikoni. Nende kahe süsteemi peamine erinevus seisneb just SFV replikonide viimisel rakkudesse. SFV replikonidel põhineva süsteemi raames transfekeeriti SFV replikonid otse rakkudesse. Siin aga pakitakse SFV replikonid eelnevalt VRP-desse ning seejärel viiakse need nakatamise teel rakkudesse. Selleks, et saavutada võimalikult kõrgel tasemel ZIKV replikoni pakkimine, nakatatakse ZIKV replikoniga transfekeeritud rakke SFV VRP-dega ajahetkel, mil ZIKV replikoni replikatsioon on saavutanud maksimaalse taseme. Transfekeeritud ja nakatatud

rakkudes ekspresseeritakse VRP-desse pakitud SFV replikonilt ZIKV struktureerd valgud, mis pakivad ZIKV replikoni VRP-desse. Vastava süsteemi skeem on esitatud Joonisel 8.



Joonis 8. SFV-ZIKV-str VRP-del põhineva pakkimissüsteemi skeem. Antud pakkimissüsteemis kasutatakse ZIKV replikoni pakkimiseks SFV-ZIKV-str VRP-sid. ZIKV replikoniga transfecteeritud rakke nakatatakse SFV-ZIKV-str VRP-dega. Edasised sündmused on samad kui Joonisel 6 kujutatud süsteemi puhul.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

VRP-desse pakitud flaviviiruste replikone saab kasutada flaviviiruste erinevate bioloogiliste omaduste uurimiseks ning võimalik, et ka vaktsiinide väljatöötamiseks. Flaviviiruste replikonide pakkimiseks on väljatöötatud mitmeid pakkimissüsteeme. Näiteks SFV replikonidel ja pakkimisrakuliinil põhinevate süsteemidega on edukalt pakitud Kunjin ning WNV replikone. ZIKV replikoni pakkimist on teadaolevalt kirjeldatud ainult meie labori poolt ning see vajaks põhjalikumat uurimist.

Käesoleva töö eesmärgiks oli optimeerida ZIKV replikoni pakkimist VRP-desse. Püstitatud eesmärgi saavutamiseks katsetati kolme erinevat pakkimissüsteemi: SFV replikonidel, pakkimisrakuliinil ning VRP-desse pakitud SFV replikonidel põhinevat süsteemi. Lähtuvalt töö tulemustest sooviti hinnata erinevate süsteemide efektiivsust ZIKV replikoni pakkimisel ning selgitada välja optimaalsed tingimused ZIKV replikoni pakkimiseks.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Bakteritüved

Antud töös kasutati ZIKV replikone kodeerivate plasmiidide paljundamiseks *E. coli* EPI300 tüve. Rakke kasvatati TB (*Terrific broth*, "Difco") söötmes 37°C juures. Söötmele lisati klooramfenikooli lõppkontsentratsioonis 12.5 µg/ml. Plasmidi amplifikatsiooni indutseeriti 0.1% L-arabinoosi lisamisega.

2.2.2 Rakuliinid ja söötmed

ZIKV replikonide transfektsiooniks kasutati BHK-21, C6/36 ja BHK-CprME pakkimisrakuliini. VRP-dega nakatamiseks kasutati C6/36 ja Vero E6 rakuliini. BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*) rakuliini puhul on tegemist hamstri neerudest pärinevate fibroblastidega. BHK-21 rakke kasvatati GMEM (*Glasgow Minimal Essential Medium*, „Gibco“) söötmes, mis sisaldas 2% TPB-d (*Tryptose Phosphate Broth*, trüptoos-fosfaat puljong, "Difco"), 10 mM HEPES pH=7.4, 7.5% inaktiveeritud FBS-i (*Fetal Bovine Serum*, veise loote seerum, "Sigma-Aldrich") ning 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini ("Naxo"). BHK-CprME rakuliin ekspresseerib stabiilselt ZIKV struktuurseid valke ja G418 antibiootikumi (*Geneticin*) resistentsusmarkerit. BHK-CprME rakuliini kasvatati GMEM söötmes, mis sisaldas 2% TPB-d, 10 mM HEPES

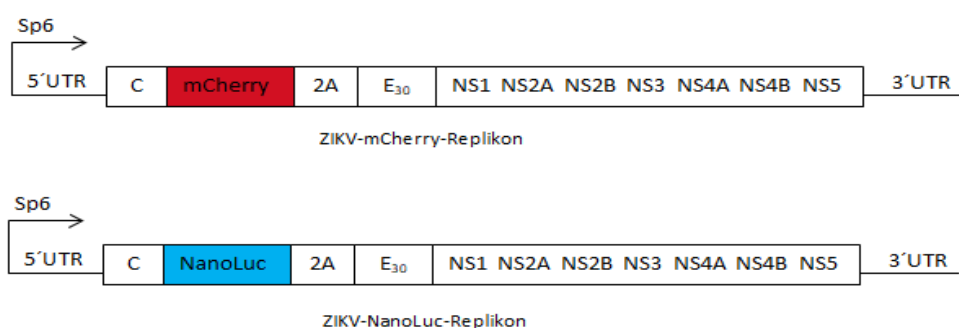
pH=7.4, 7.5% inaktiveeritud FBS-i, 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini ning millele lisati selektsiooni eesmärgil G418 antibiootikumi lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml. BHK-21 ja BHK-CprME rakuliine kasvatati 37°C ja 5% CO₂ juures. C6/36 rakuliini puhul on tegemist *Aedes albopictus* rakkudega. Neid rakke kasvatati 28°C ja 0% CO₂ juures, L15 (*Leibovitz's medium*, "PAN Biotech") söötmes, mis sisaldas 10% TPB-d, 10% inaktiveeritud FBS-i („*Life Technologies*") ning 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. Vero E6 rakud on Aafrika rohepärdiku neerudest isoleeritud epiteelirakud, mida kasvatati 37°C ja 5% CO₂ juures DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, „*Sigma-Aldrich*") söötmes, mis sisaldas 10% inaktiveeritud FBS-i ning 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini.

2.2.3 ZIKV replikonid

Antud töös on kasutatud kahte ZIKV replikoni (Joonis 9), mis on konstrueeritud kolleegide poolt. Konstrueeritud replikonid põhinevad ZIKV BeH819015 isolaadi (isoleeritud Brasiiliast 2015. aastal) järjestusel. ZIKV replikonide cDNA järjestused on SP6 RNA polümeraasi promooteri kontrolli all, mis võimaldab sünteesida replikoni RNA-d *in vitro*. Replikonide järjestused kodeerivad ZIKV 5' UTR-i, C valku, FMDV (*foot-and-mouth disease virus*, suu- ja sõrataudi viirus) 2A järjestust, ZIKV E valgu lõppu, NS valke (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) ja 3' UTR-i ning markerjärjestust. Replikoni konstruktidelt on ZIKV struktuurne regioon eemaldatud, väljaarvatud valmis C valku ja E valgu C-terminaalse regiooni 30 aminohappejääki kodeerivad alad (Joonis 9). E valgu C-terminaalset regiooni on vaja säilitada, sest see on vajalik NS1 valgu korrektseks translokatsiooniks ER-i membraanides. C valgu järjestust on vaja säilitada, sest see sisaldab RNA tsükleerumisjärjestust. Eemaldatud struktuurne osa on asendatud markerit - Nano lutsiferaasi (NanoLuc) või mCherry valku kodeeriva geeniga, mis ekspresseerub rakkudes replikoni replitseerumisel. mCherry puhul on tegemist punaselt fluorestseeruva valguga ning NanoLuc on kõrge stabiilsusega ensüüm, mis katalüüsib oma substraati valguse kvantide eraldumisega ning mille aktiivsust on võimalik mõõta rakulüsaadist, lisades sellele vastavat substraati. Markergeenile järgneb FMDV 2A autoproteinaas, mis lõikab ise ennast C-terminaalsest otsast ja vabastab sellega markervalgu ZIKV polüproteiinist.

Konstrukt kloneeriti pCCI vektorisse, mis sisaldab klooramfenikooli resistentsusgeeni. pCCI vektor on ühe koopia plasmiid, mis võimaldab toota madalates kogustes ZIKV replikoni cDNA-d bakterirakkudes. See on vajalik selleks, et vältida bakterirakkude suremist ZIKV replikonilt ekspresseeruvate viiruslike valkude toksilisuse tõttu (Schwarz jt., 2016; Aubry jt., 2015). Lisaks

sisaldab pCCI vektor indutseeritavat madala koopiaarvuga (kuni 20 plasmidi koopiat raku kohta) replikatsiooni alguspunkti (*origin*), millelt toimuv replikatsioon võimaldab toota lühikese aja jooksul suuremal hulgal plasmiidset DNA-d. Plasmiidse DNA replikatsiooni alustamiseks kõrgema koopiaarvuga alguspunktilt on vaja replikatsiooni initsatsiooni valgu (*trfA*) seondumist sellele. Spetsiaalne *E. coli* rakutüvi EPI300 sisaldab indutseeritava promooteri kontrolli all vastava valgu muteeritud geeni; selle sisselülitamine induktori (L-arabinoos) lisamisega aktiveerib kõrgema koopiaarvuga replikatsiooni alguspunktilt toimuva replikatsiooni (Epicentre, 2012 (1) ja (2)).



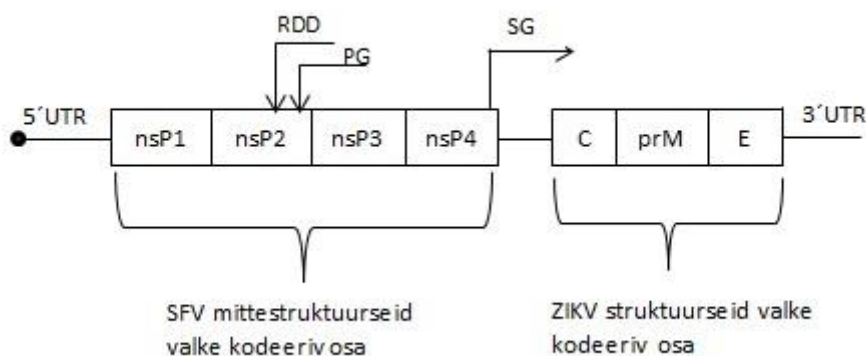
Joonis 9. ZIKV replikonid. Replikoni konstruktes on ZIKV struktuurne regioon, välja arvatud kapsiidi valk (C) ja ümbrise valgu C-terminaalse osa 30 aminohappejääki (E₃₀), asendatud markergeeniga, mis kodeerib vastavalt, kas mCherry või NanoLuc valku. Markergeeni ja ümbrise valgu lõpu (E₃₀) vahele jääb järjestus, mis kodeerib FMDV 2A autoproteinaasi. Replikonis on säilitatud ZIKV mittestruktuurseid valke (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) kodeeriv osa. Replikonile vastav cDNA asub SP6 RNA polümeraasi promooteri kontrolli all. 5' UTR ja 3' UTR tähistavad 5' ja 3' mittetransleeritavaid regioone.

2.2.4. Pakkimiseks kasutatavad konstruktid ja rakuliin

2.2.4.1. SFV-ZIKV-str replikonid

ZIKV replikonide pakkimiseks kasutati Tabelis 1 esitatud SFV-ZIKV-str replikone (SFV replikone). SFV replikonil on SFV struktuurne regioon asendatud ZIKV struktuurse regiooniga ja selle tulemusel ekspresseeruvad SFV replikonilt ZIKV struktuursed valgud, mis pakivad ZIKV replikoni RNA-d VPR-desse. Konstrueeritud SFV replikonide üldine skeem on näidatud joonisel 10. Antud töös on kasutatud kahte madala tsütoksilisusega SFV replikoni, mis sisaldavad mutatsioone (PG, RDD) nsP2 valgus ning kahte muteerimata tsütotoksilist SFV replikoni (wt,

OPT). PG mutatsiooni puhul on proliini jääk asendatud glütsiiniga nsP2 valgu positsioonis 718, muutes SFV replikoni rakkudele vähem tsütotoksiliseks. RDD mutatsiooni puhul on inaktiveeritud nsP2 valgu tuuma lokaliseerimise signaal (648RRR650), mistõttu ei saa see liikuda tuuma ning vastavalt põhjustada raku transkriptsiooni mahasurumist. (Tamm jt., 2008)



Joonis 10. SFV-ZIKV-str replikonide üldine skeem. ZIKV replikonide pakkimiseks kasutatud SFV replikonid kodeerivad SFV mittestruktuurseid valke (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) ja ZIKV struktuurseid valke (C, prM, E). ZIKV struktuurne regioon asub SFV subgenoomse (SG) promooteri kontrolli all. Madala tsütotoksilisusega SFV replikonid sisaldavad nsP2 valgus mutatsioone (PG ja RDD), mis vähendavad replikonide tsütotoksilisust ning replikatsiooni kiirust.

Tabel 1. ZIKV replikoni pakkimiseks konstrueeritud SFV replikonid

Konstrukti nimi	Mutatsioon/modifikatsioon	Mutatsiooni/modifikatsiooni asukoht	Mutatsiooni/modifikatsiooni efekt
SFV-ZIKV-str-wt	Puudub	Puudub	Puudub
SFV-ZIKV-str-OPT	OPT	ZIKV struktuurne regioon	Optimeeritud koodonkasutus ekspressiooni jaoks imetaja rakkudes
SFV-RDD-ZIKV-str	648RRR650 648RDD650	nsP2 valk,	nsP2 tuumalokaliseerimise signaali inaktiveerimine
SFV-PG-ZIKV-str	P718G	nsP2 valk,	nsP2 valgus tsütotoksilisuse vähenemine, täpne mehhanism teadmata

2.2.4.2. SFV-ZIKV-str VRP-de valmistamine

Pakimiseks kasutatud SFV-ZIKV-str VRP-de valmistamiseks ko-transfekteeriti SFV-ZIKV-str replikon-plasmiidilt ja SFV abiplasmiididelt (kahel *helper* plasmiidilt) sünteesitud RNA-dega rakke. Abiplasmiidid kodeerivad SFV subgenoomse promooteri vahendusel SFV struktuurseid valke, mis pakivad SFV-ZIKV-str replikon-RNA VRP-desse. Transfekteeritud rakke inkubeeriti 36 tundi 37°C ja 5% CO₂ juures ja seejärel koguti rakkudel SFV-ZIKV-str VRP-sid sisaldav sööde. VRP-sid kontsentreeriti ultratsentrifuugimisel Beckman Coulter SW28 rootoriga 28000 rpm (*revolutions per minute*) juures 3 tundi läbi sahharoospatja (20% sahharoos, 10 mM Tris pH 7.2, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA). VRP sadet suspendeeriti TNE (50 mM Tris pH 7.2, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA) puhvrts ja hoiti kasutamiseni -80°C juures.

2.2.4.3. Pakkimisrakuliin

Antud töös kasutati BHK-21 rakkudel põhinevat pakkimisrakuliini (BHK-CprME), mis ekspresseerib stabiilselt ZIKV struktuurseid valke (C, prM, E) CMV (inimese tsütomegaloviirus) promooteri kontrolli all (konstrueeritud vanemteadur Eva Žusinaite poolt).

2.2.5. Kompetentsete *E. coli* rakkude kasvatamine ja transformeerimine

ZIKV replikonide cDNAd sisaldavate plasmiidsete DNA-de paljundamiseks transformeeriti EPI300 *E. coli* rakke kuumašoki meetodil. Rakud külvati LB (*Lysogeny Broth*) söötme tassidele, kuhu oli lisatud klooramfenikool lõppkontsentratsiooniga 12.5 µg/ml. Rakkudega tase inkubeeriti 37°C juures üleöö. Tekkinud kolooniad külvati 2.5 ml TB (*Terrific broth*) söötmesse, millesse lisati klooramfenikooli lõppkontsentratsiooniga 12.5 µg/ml. Rakke kasvatati loksutil 37°C kraadi juures üleöö. Seejärel viidi rakkude söötme maht 10 ml-ni ning lisati L-arabinoosi lahust lõppkontsentratsioonini 0.1%. Peale induktori lisamist kasvatati rakke loksutil veel 5 h 37°C juures, mille järel koguti bakterirakud ning eraldati plasmiidne DNA. Selleks, et saada suuremat kogust DNA-d, külvati õiged kloonid 50 ml TB söötmesse, millesse lisati klooramfenikooli lõppkontsentratsiooniga 12.5 µg/ml. Rakke kasvatati loksutil 37°C kraadi juures üleöö ning seejärel viidi söötme maht 500 ml-ni ning indutseeriti L-arabinoosiga 5 tundi loksutil 37°C kraadi juures.

2.2.6. ZIKV replikonide cDNAd sisaldavate plasmiidide puhastamine

ZIKV replikonide cDNA-d sisaldavate plasmiidide puhastamine tavapärasel meetodil (kasutades kommertsiaalset kitti) ei võimaldanud saada piisavas koguses ja hea kvaliteediga DNA-d. Seega pöörduti plasmiidide puhastamisel teiste meetodite poole. Algselt kasutati plasmiidide

puhastamiseks tseesiumkloriidi gradiendil põhinevat meetodit, aga kuna see ei andnud soovivat tulemust, siis võeti kasutusele kahekordne puhastusmeetod. Esialgu eraldati plasmiidne DNA minipreparatsiooni meetodil, kasutades kommertsiaalset kitti (*FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kit*, „Favorgen Biotech Corp.“) vastavalt tootja poolsele protokollile. Puhastatud plasmiidide õigsust kontrolliti geelil restriksioonanalüüsiga (selleks kulus kõik minipreparatsioonil saadud DNA saagis) ning valiti välja õiged kloonid. Suuremate DNA koguste saamiseks kasutati kahekordsel sadestamisel põhinevat meetodit. Selleks tsentrifugeeriti („Sorwall RC 5B Plus“, 9000× g, 10 min) 500 ml bakterikultuuri rakud põhja, eemaldati sööde ja rakke suspendeeriti 50 ml SOL I lahuses (50 mM glükoos, 25 mM Tris-Cl pH=8.0, 10 mM EDTA pH=8.0). Järgnevalt lisati segule 50 ml lüüsilahust SOL II (0.2 M NaOH, 1% SDS), segati õrnalt ja inkubeeriti toatemperatuuril 5 min. Seejärel lisati segule neutraliseerimiseks 50 ml SOL III lahust (3 M Kaaliumatsetaat pH 4.5) ja segati kallutades ning seejärel tsentrifugeeriti 9000× g 10 min. Seejärel supernatant eraldati sademest filtratsiooniga läbi filterpaberi. Supernatandile lisati 0.8 mahtu isopropanooli ja tsentrifugeeriti 15 000× g 4°C juures 30 minutit. Saadud sade lahustati 8 ml RES puhvris (*NucleoBond® Xtra Midi Kit*, „Macherey Nagel“) ning seejärel jätkati puhastamist *NucleoBond® Xtra Midi* kitiga („Macherey-Nagel“) vastavalt tootja poolsele protokollile. Puhastatud DNA kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriga (*Nanodrop 2000*).

2.2.7. In vitro transkriptsioon

ZIKV replikonide cDNA-d sisaldavad plasmiidid lineariseeriti ensüümiga *AgeI* (*FastDigest*, „Thermo Fisher Scientific“). Plasmiidset DNA-d lisati restriksioonisegusse 4 µg. Lineariseeritud DNA puhastati restriksioonisegust *DNA clean and concentration* kitiga („Zymo Research“) vastavalt tootja poolsetele juhistele ja elueeriti 10 µl vees. *In vitro* transkriptsioon viidi läbi, kasutades *mMESSAGE mMACHINE™ SP6 Transcription* kitti („Invitrogen“), juhindudes tootja poolsest protokollist. Reaktsioonisegu (20 µl) sisaldas 1× NTP/CAP segu (5 mM ATP, 5 mM CTP, 5 mM UTP, 1 mM GTP, 4 mM CAP analoog), 1× reaktsiooni puhvrit, 3 mM GTP-d, 0.5 µg lineariseeritud DNA-d, ensüümi segu (SP6 RNA polümeraas, RNAasi inhibiitor). Reaktsioonisegu inkubeeriti 37°C juures 1 h ja 45 minutit. RNA saagist hinnati agarose geelelektroforeesil.

2.2.8. BHK-21 rakkude ja BHK-CprME pakkimisrakuliini transfektsioon

In vitro sünteetiliselt NanoLuc markerit ekspresseeriv ZIKV replikon-RNA transfekteeeriti BHK-21 ja BHK-CprME pakkimisrakuliini lipofektsiooni meetodil, kasutades *Lipofectamine 2000*

reagenti („Invitrogen“). Selleks kasvatati rakud 100 mm läbimõõduga koekultuuri tassil 70-90% konfluentsuseni ning katsele eelneval päeval külvati rakud 6-augulistele plaatidele. Lipofektsiooni läbiviimiseks segati ühes tuubis 9 µl *Lipofectamine 2000* reagenti 150 µl Opti-MEM söötmega („Life Technologies“) ning teises tuubis segati 18 µl replikon-RNA-d (*in vitro* transkriptsiooni segu) 150 µl Opti-MEM söötmega. Seejärel segati kaks segu omavahel kokku ja inkubeeriti toatemperatuuril 5 min. Selle aja jooksul vahetati rakkudel sööde 1 ml värsket söötme vastu. Seejärel lisati tekkinud RNA-lipiid kompleksid raku söötmele ning rakke inkubeeriti 37°C juures 5% CO₂ keskkonnas 48 tundi (BHK-21 rakkude puhul). BHK-CprME pakkimisrakuliini inkubeeriti 72 h pärast transfektsiooni, mil replikoni replikatsioon ja VRP-de moodustumine oli saavutanud kõrgeima taseme (tulemused pole esitatud) ning seejärel koguti VRP-sid sisaldav sööde. Transfektsiooni õnnestumist kontrolliti, mõõtes NanoLuc aktiivsust rakulüsaadist.

2.2.9. C6/36 rakkude transfektsioon

NanoLuc ja mCherry markervalgu ekspresseerivad ZIKV replikon-RNA-d (*in vitro* transkriptsiooni segud) transfekteeriti C6/36 rakkudesse lipofektsiooni meetodil sarnaselt BHK-21 rakkude transfektsiooniga. Peale RNA-lipiid komplekside lisamist inkubeeriti rakke 28°C ja 0% CO₂ juures 4 tundi. Nelja tunni möödudes vahetati rakkudel sööde ja seejärel asetati need uuesti 28°C ja 0% CO₂ juurde. mCherry replikon-RNA transfektsiooni õnnestumine tehti kindlaks fluorestsentsmikroskoobi (*Nikon Eclipse 200 TEU*) abil. NanoLuc replikoni-RNA transfektsiooni õnnestumine tehti kindlaks samamoodi nagu BHK-21 ja BHK-CprME pakkimisrakuliini transfektsiooni puhul.

2.2.10. BHK-21 rakkude re-transfektsioon

BHK-21 rakkudesse, millesse oli transfekteeritud ZIKV-NanoLuc replikon-RNA, transfekteeriti järgnevalt SFV replikonide (SFV-RDD-ZIKV-str, SFV-PG-ZIKV-str, SFV-ZIKV-str-OPT ja SFV-ZIKV-str-wt) *in vitro* sünteesitud RNA. Re-transfektsioon viidi läbi 48 tundi pärast ZIKV replikon-RNA transfektsiooni, kasutades taas *Lipofectamine 2000* reagenti ja ülal kirjeldatud protokollit. Rakke inkubeeriti re-transfektsiooni järel 37°C ja 5% CO₂ juures 48 tundi ning seejärel koguti ZIKV VRP-sid sisaldav sööde.

2.2.11. SFV-ZIKV-str VRP-de tiitri määramine

SFV-ZIKV-str VRP-de tiitri määramiseks tehti VRP-dest seerumvabas GMEM söötmes kümnekordsed lahjendused (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷). Seejärel eemaldati 90-100% konfluentsusega 12-augulisel plaadil kattedklaasidel kasvanud BHK-21 rakkudelt sööde; rakke pesti PBS-ga

(*phosphate buffered saline*, fosfaat-puhverdatud soolalahus) ning neile lisati 150 µl VRP-de lahjendusi. Rakke inkubeeriti 37°C ja 5% CO₂ juures üks tund tassi iga 10 min tagant loksutades. Peale inkubeerimist lisati rakkudele GMEM täissöödet ja inkubeeriti rakke 18 tundi 37°C ja 5% CO₂ juures. Seejärel eemaldati nakatatud rakkudelt sööde, rakke pesti kaks korda Dulbecco PBS-ga ning fikseeriti 4% paraformaldehüüdi (PFA) lahusega toatemperatuuril 20 min jooksul. Seejärel lisati klaasidele -20°C metanooli ja hoiti -20°C külmkapis 10 minutit. Klaase pesti kolm korda Dulbecco PBS-ga, tõsteti 24-augulisele plaadile ning klaasil olevad rakud blokeeriti 5% blokkilahusega (FBS lahjendus Dulbecco PBS-s) toatemperatuuril 30 minuti jooksul. Seejärel lisati klaasidele SFV nsP3 ja ZIKV E valgu („*GeneTex*“) vastaste antikehade lahjendused 5% blokkilahuses ning inkubeeriti toatemperatuuril üks tund. Järgnevalt pesti klaase kolm korda Dulbecco PBS-ga ning inkubeeriti üks tund pimedas sekundaarsete antikehade lahjendusega 5% blokkilahuses. Sekundaarsete antikehadena kasutati küüliku vastaseid Alexa488 ja Alexa568 fluorestseerivate värvidega konjugeeritud antikehasid („*Invitrogen*“). Seejärel pesti klaase neli korda Dulbecco PBS-ga ja kaks korda destilleeritud veega ning kuivatati. Preparaadi valmistamiseks lisati alus- ja katteklaasi vahele *SlowFade* sulundusvedelikku („*Invitrogen*“) ja katteklaasid asetati alusklaasidele nii, et rakud jääksid klaaside vahele.

Saadud preparaate vaadeldi fluorestsentsmikroskoobiga (*Nikon Eclipse 200 TEU*) ning loeti kokku helenduvad rakud 20 vaateväljas. Selle järgi arvutati keskmine positiivsete rakkude arv ning infektsiooniliste ühikute (*infectious unit*, IU) arv VRP preparaadi ühe milliliitri kohta (IU/ml).

2.2.12. C6/36 rakkude nakatamine SFV-ZIKV-str VRP-dega

ZIKV NanoLuc ja mCherry replikonidega transfekteeritud C6/36 rakke nakatati SFV-ZIKV-str VRP-dega. Ajapunktiks nakatamisel valiti 48 h pärast transfektsiooni, mil replikatsiooni tase oli kõrgeim (tulemused pole esitatud). Enne nakatamist koguti paralleel-plaadil kasvanud C6/36 rakke, värviti 0.4% trüptaansinisega ja loendati rakud „*Countess*“ rakuloendiga („*Invitrogen*“). Seejärel arvutati C6/36 rakkude nakatamiseks võetavate VRP-de kogus nii, et kasutatud MOI (*multiplicity of infection*, infektsiooni kordsus) oleks 10 infektsioonilist ühikut raku kohta.

Nakatamiseks eemaldati rakkudelt sööde ja pesti rakke üks kord 1 ml seerumvaba söötmega. Seejärel lisati rakkudele SFV-ZIKV-str VRP-sid 400 µl seerumvabas L15 söötmes ja inkubeeriti tase 28°C ja 0% CO₂ juures üks tund iga 10 min tagant tase kallutades. Seejärel lisati C6/36 rakkudele seerumiga L15 söödet ja inkubeeriti 28°C ja 0% CO₂ juures. 48 tundi peale rakkude

nakatamist koguti VRP-sid sisaldav sööde. VRP-sid sisaldav sööde tsentrifugeeriti 10 min, 1500× g, et eemaldada söötmes olevad rakud, ning VRP-de supernatanti säilitati 4°C juures. Samamoodi toimiti ka muudest pakkimissüsteemidest pärineva söötmega. Järgnevalt kasutati VRP-sid sisaldavaid supernatante uute Vero E6 ja C6/36 rakkude nakatamiseks.

2.2.14 VERO ja C6/36 rakkude nakatamine ZIKV VRP-dega

Selleks, et kindlaks teha, kas ZIKV replikonide pakkimine VRP-desse oli toimunud, nakatati kogutud VRP-de supernatantidega 6-augulisel plaadil kasvanud Vero E6 ja C6/36 rakke. Vero E6 ja C6/36 rakkudelt (70-90% konfluentsed) aspireeriti sööde, rakke pesti seerumvaba söötmega ning seejärel lisati 150 µl VRP-sid sisaldavat supernatanti 150 µl seerumvabas söötmes (2× VRP-de lahjendus). Rakkudega tase inkubeeriti, neid iga 10 min tagant loksutades ühe tunni jooksul, 37°C ja 5% CO₂ juures Vero E6 rakkude puhul või 28°C ja 0% CO₂ juures C6/36 rakkude puhul. Seejärel lisati rakkudele seerumiga söödet ja inkubeeriti rakke kuni 5 päeva.

2.2.15. Replikonide pakkimise efektiivsuse hindamine

Replikonide pakkimise efektiivsust hinnati VRP-de supernatantidega nakatatud Vero E6 ja C6/36 rakkudes markervalkude ekspressiooni põhjal. Peale rakkude nakatamist VRP-dega, millesse oli pakitud mCherry replikon, jälgiti nakatatud rakke igapäevaselt kuni 5 päeva jooksul, määrates mCherry positiivseid (punaselt fluorestseeruvaid) rakke fluorestsentsmikroskoobi abil. NanoLuc aktiivsust mõõdeti vastavat markerit sisaldavate VRP-dega nakatatud rakkude lüsaadist 24, 48 ja 72 h pärast nakatamist. Selleks eemaldati rakkudelt sööde, pesti üks kord PBS-ga ja lüüsitati, kasutades 100 µl 1× *Renilla Luciferase Assay* („Promega“) lüüsipuhvit ning inkubeeriti toatemperatuuril 10 min. Lüüsitud rakud koguti 1.5 ml reaktsioonituubidesse ning tsentrifugeeriti lauatsentrifugeerimis (14000× g, 1 min). NanoLuc aktiivsuse mõõtmiseks kasutati *coelenterazine native* substraati („TBD-Biodiscovery“), mis segati puhvriga (50 mM Tris pH=7.5, 0.5 mM EDTA pH=8.0, 25 mM NaCl) vastavalt tootja poolsele juhisele. 20 µl rakulüsaadile lisati 20 µl *coelenterazine native* reagenti (substraat + puhver) ning mõõdeti NanoLuc aktiivsus. Mõõtmiseks kasutati *Glomax SIS* luminomeetrit („Promega“).

2.2.16. Western blot

SFV-ZIKV-str replikonidega re-transfekteeritud BHK-21 rakkude lüsaate analüüsiti *western blot* ga selleks, et tuvastada SFV mittestruktuursete valkude ja ZIKV struktuursete valkude ekspressiooni. 48 h pärast re-transfektsiooni pesti rakke üks kord PBS-ga, seejärel lisati 100 µl 1×

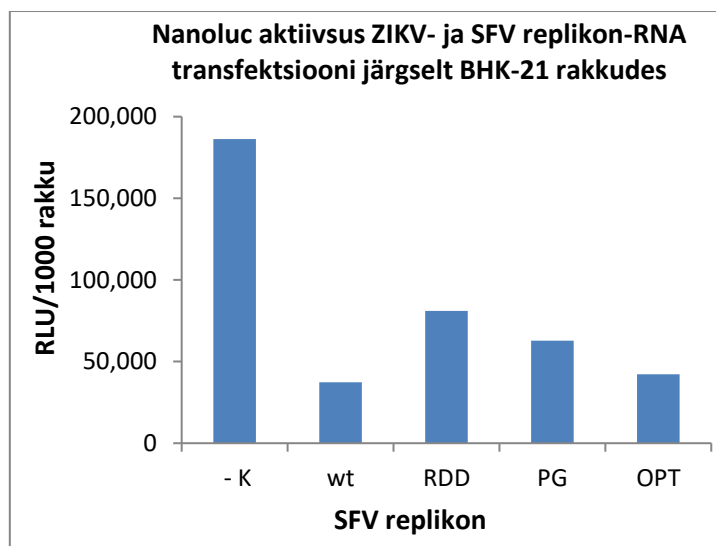
Laemmlli lüüsi puhvrit (50 mM Tris pH 6.8, 100 mM ditiotreitol, 2% naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS), 10% glütserool, broomfenoolsinine). Saadud lüsaat koguti ja kuumutati 5 min 100°C juures. Lüsaadid kanti 10% SDS polüakrüülamiidgeelile ja lahutati SDS polüakrüülamiidgeel-elektroforeesil 1× SDS jooksupuhvris (25 mM Tris, 0.25 M glütsiin, 0.1% SDS, pH 8.3). Geelil lahutunud valgud kanti üle nitrotselluloosmembraanidele („*GE Healthcare*“) ühe tunni jooksul 20 V juures *Semi-Dry* puhvrit (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0.037% SDS, 20% metanool) ja *Trans-Blot Semi-Dry* masinat („*Bio-Rad*“) kasutades. Ülekandunud valkudega membraan blokeeriti 5% lõssilahusega *western blot* pesupuhvris (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20). Seejärel lisati membraanidele primaarse antikehana, kas ZIKV E valgu vastast antikeha („*GeneTex*“), lahjendusega 1:5000 või SFV nsP2 valgu vastast antikeha, lahjendusega 1:6000 2% lõssilahuses *western blot*’i pesupuhvris ja inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Järgnevalt pesti membraane *western blot*’i pesupuhvris 3 korda 10 minutit ning seejärel inkubeeriti membraane 1 tund 2% lõssilahusega, kuhu oli lisatud mädarõika peroksüdaasiga konjugeeritud küüliku immunoglobuliinide vastane antikeha, lahjendusega 1:10000. Seejärel pesti membraani 3 korda 10 minutit *western blot*’i pesulahusega. Signaal detekteeriti, kasutades ECL (*Enhanced chemiluminescence*) kitti („*GE Healthcare*“) ja röntgenfilmi abil.

2.3. Tulemused

2.3.1. SFV replikonidel põhineva pakkimissüsteemi analüüs

SFV replikonidel põhinev pakkimissüsteem koosneb kahest transfektsioonist BHK-21 rakkudesse. Esimesena transfekteeeritakse pakitav ZIKV replikon-RNA ning 48 h hiljem pakkimiseks kasutatav SFV replikon-RNA (Joonis 6). Antud süsteemi raames katsetati kahte muteeritud madala tsütotoksilisusega (RDD, PG) ja kahte muteerimata tsütotoksilist SFV replikoni (wt, OPT) (Tabel 1).

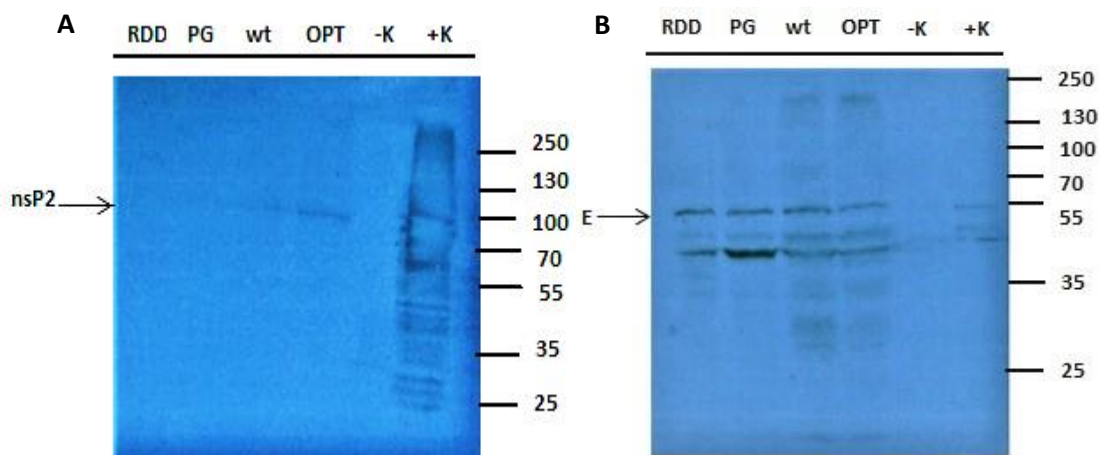
Esialgu hinnati ZIKV-NanoLuc replikoni transfektsiooni efektiivsust ja replikatsiooni taset NanoLuc aktiivsuse põhjal topelt transfekteeeritud BHK-21 rakkudes (Joonis 11). ZIKV-NanoLuc replikon kodeerib NanoLuc markervalku, mille aktiivsus on proportsionaalne replikon-RNA koopiaarvuga ning selle kaudu ka replikoni replikatsiooni tasemega. NanoLuc aktiivsust mõõdeti 96 h pärast ZIKV replikon-RNA transfektsiooni ning 48 h pärast SFV replikon-RNA transfektsiooni (vahetult enne ZIKV VRP-de kogumist). Negatiivseks kontrolliks olid ZIKV replikoniga transfekteeeritud BHK-21 rakud, mida ei re-transfekteeeritud SFV replikon-RNA-ga ehk *mock* re-transfekteeeritud BHK-21 rakud. Saadud tulemustest (Joonis 11) nähtub, et negatiivsetes kontrollrakkudes on NanoLuc aktiivsus üsna kõrge. Seega ZIKV replikoni transfektsioon on olnud edukas ja replikon replitseerub efektiivselt. NanoLuc aktiivsused erinevate SFV replikonidega (wt, PG, RDD, OPT) re-transfekteeeritud BHK-21 rakkudes on suurusjärgu võrra madalamad kui negatiivsetes kontrollrakkudes. Sellest järeldub, et ZIKV replikoni replikatsiooni efektiivsus langeb oluliselt peale rakkude re-transfektsiooni. Nimetatud efekt on suurim tsütotoksiliste SFV replikonide (wt ja OPT) ja mõnevõrra väiksem madala tsütotoksilisusega SFV replikonide (RDD, PG) transfekteeerimisel. Samas on erinevus tsütotoksiliste ja madala tsütotoksilisusega replikonide vahel väike - umbes poolteist kuni kaks korda (Joonis 11). Sellest järeldub, et siin kasutatud madala tsütotoksilisusega SFV replikonid (RDD, PG) ei ole ZIKV replikoniga koos kasutamiseks piisavalt nõrgestatud.



Joonis 11. NanoLuc aktiivsus BHK-21 rakkudes ZIKV- ja SFV replikon-RNA transfekteeerimise järgselt.

Joonisel on kujutatud NanoLuc aktiivsus, mis mõõdeti BHK-21 rakkudest, millesse oli transfekteeeritud pakitav ZIKV-NanoLuc replikon-RNA ja pakkimiseks kasutatav SFV replikon-RNA (toodud joonise x-teljel). Kontrolliks (-K) olid mock re-transfekteeeritud rakud, st. rakud, mida ei re-transfekteeeritud ZIKV replikon-RNA järgselt SFV replikon-RNA-ga. NanoLuc aktiivsus on esitatud RLU-des (*relative light unit*, suhteline valgusühik) ning normaliseeritud rakkude arvu (1000 rakku) suhtes. Mõõdetud NanoLuc aktiivsuste põhjal hinnati ZIKV replikoni transfektsiooni efektiivsust ja replikatsiooni taset.

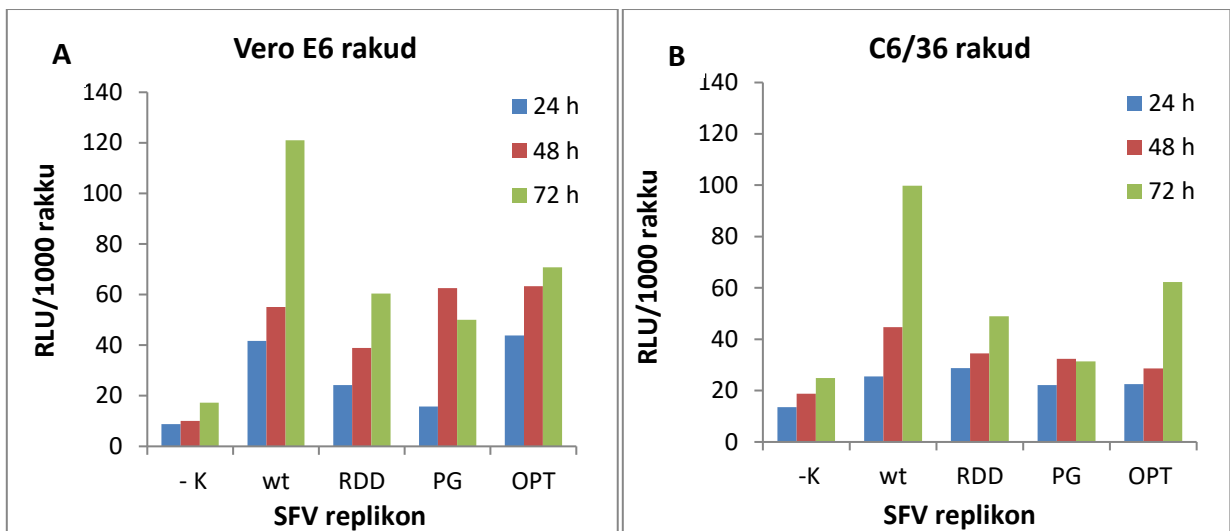
Lisaks NanoLuc markeri ekspressioonile analüüsiti ka SFV mittestruktuursete (ns) ja ZIKV struktuursete valkude ekspressiooni *western blot*'i abil. Analüüsi tulemustest nähtub, et ZIKV E valk ekspresseerub kõigilt SFV replikonidelt (RDD, PG, wt, OPT). Samal ajal SFV nsP2 valk on tuvastatav nõrga signaalina ainult muteerimata ehk nõrgestamata SFV replikonide (SFV-OPT ja SFV-wt) korral (Joonis 12A ja B). See võib olla tingitud asjaolust, et PG või RDD mutatsioone sisaldavate replikonide replitseerumisvõime on vähenenud ja seega nsP2 valgu tootmine.



Joonis 12. SFV nsP2 ja ZIKV E valgu ekspressiooni kontroll. BHK-21 rakke re-transfekteeriti SFV replikon-RNA-dega (RDD, PG, wt, OPT) 48 h pärast ZIKV replikon-RNA tranfekteerimist. 48 h pärast re-transfektiooni rakud lüüsiiti ja saadud lüsaadid lahutati 10% SDS-PAGE abil. SFV nsP2 valgu ekspressiooni detekteeriti SFV nsP2 valgu vastase antikehaga (A) ja ZIKV E valgu ekspressiooni tuvastati ZIKV E valgu vastase antikehaga (B). Joonise üleval on esitatud SFV replikonide nimetused. Paremal küljel on viidatud valgumarker – *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (kDa). Vasakul küljel on noolega viidatud SFV nsP2 (A) ja ZIKV E valgu signaal (B). Negatiivne kontroll (-K): transfekteerimata BHK-21 rakud; positiivne kontroll (K+): vastavalt SFV- (A) või ZIKV-ga (B) nakatatud rakkude lüsaadid.

Topelt transfekteeritud BHK-21 rakkudel kogutud ja eeldatavasti VRP-desse pakitud ZIKV-NanoLuc replikoni sisaldavat supernatanti kasutati järgnevalt nii imetaja- (Vero E6) kui ka putukarakkude (C6/36) nakatamiseks. ZIKV replikoni sisaldavate VRP-de (ZIKV VRP-d) moodustumise ja nakatamise efektiivsust hinnati nakatatud rakkude NanoLuc aktiivsuse põhjal. See põhineb sellel, et kui ZIKV-NanoLuc replikoni pakkimine VRP-desse pole efektiivne (või ei toimu üldse), siis ZIKV replikon ei saa Vero E6 ja C6/36 rakkudesse siseneda. Sellest tulenevalt NanoLuc markeri ekspressioon nakatatud rakkudes on madal või puudub hoopis. Seega NanoLuc aktiivsus ZIKV VRP-dega nakatatud rakkudes on otseses sõltuvuses ZIKV-NanoLuc replikoni pakkimise efektiivsusest. Pakkimise efektiivsuse analüüsimisele võeti ka negatiivne kontroll, et hinnata kas detekteeritav NanoLuc signaal tuleb uuesti nakatatud rakkudest või on tegemist NanoLuc aktiivsuse ülekandega (st signaal tuleb markervalku sisaldavast nakatamis-söötimest). Negatiivse kontrollina kasutati supernatanti, mis koguti *mock* re-transfekteeritud BHK-21 rakkudel. NanoLuc aktiivsust mõõdeti ZIKV VRP-de supernatandiga nakatatud Vero E6 ja C6/36 rakkudest 24, 48 ja 72 h pärast nakatamist. See võimaldas hinnata NanoLuc aktiivsuse muutumist ajas: märgatav NanoLuc aktiivsuse kasv tähendab siin replikoni replitseerumist.

Saadud tulemused demonstreerivad, et NanoLuc aktiivsus ZIKV VRP-dega nakatatud Vero E6 (Joonis 13A) ja C6/36 rakkudes (Joonis 13B) oli kaks suurusjärku madalam kui topelt transfekteeritud BHK-21 rakkudes (Joonis 11). Sellest võib järeldada, et ZIKV replikoni pakkimine VRP-desse topelt transfekteeritud BKH-21 rakkudes oli väga ebaefektiivne. Siiski olid NanoLuc aktiivsused nakatatud Vero E6 ja C6/36 rakkudes SFV replikonidega retransfekteerimise korral mõnevõrra (kuni üks suurusjärk) kõrgemad negatiivsest kontrollist ja näitasid (eriti wt replikoni puhul) selget tõusu ajas (Joonis 13A ja B). Seega mingil tasemel ZIKV VRP-de moodustamine ja järgnevate rakkude nakatamine siiski aset leidis. Suurim oli see muteerimata, tsütotoksiliste SFV replikonide (wt ja OPT) kasutamisel; madala tsütotoksilisusega SFV replikonide (RDD, PG) kasutamise korral olid erinevused negatiivsest kontrollist väga väikesed (Joonis 13A ja B). Seega võib arvata, et antud mutatsioonid nsP2 valgus küll võimaldavad ZIKV replikoni efektiivsemat replikatsiooni (Joonis 11), kuid ei soodusta ZIKV replikoni pakkimist VRP-desse. Kokkuvõtvalt näitasid siin saadud tulemused, et kasutatud katsetingimustel ei suuda SFV replikonidelt toodetud struktuursed valgud efektiivselt ZIKV replikoni pakkida.



Joonis 13. NanoLuc aktiivsus SFV replikonide vahendusel pakitud ZIKV VRP-dega nakatatud Vero E6 ja C6/36 rakkudes. Vero E6 (A) ja C6/36 rakke (B) rakke nakatati ZIKV VRP-de supernatandiga, mis koguti pakitava ZIKV-NanoLuc ja pakkimiseks kasutatava SFV replikon-RNA-dega (viidatud joonise x-teljel) transfekteeritud BHK-21 rakkudelt. Negatiivseks kontrolliks (-K) võeti Vero E6 ja C6/36 rakud, mida nakatati ZIKV replikon-RNA-ga transfekteeritud, kuid SFV replikon-RNA-ga mitte transfekteeritud rakkudelt (*mock* re-transfekteeritud) rakkudelt kogutud supernatandiga. NanoLuc aktiivsust mõõdeti rakkudest 24, 48 ja 72 h pärast nakatamist. NanoLuc aktiivsus on esitatud RLU-des (*relative light unit*, suhteline valgusühik) ning normaliseeritud rakkude arvu (1000 raku) suhtes. Nakatatud rakkude NanoLuc aktiivsuste põhjal hinnati SFV replikonide vahendusel toimuva ZIKV replikoni pakkimise efektiivsust.

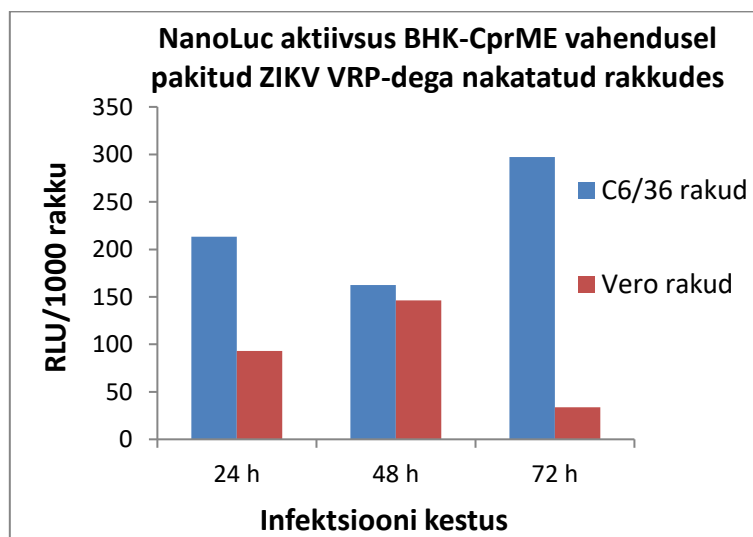
2.3.2. BHK-CprME pakkimiskakuliinil põhineva pakkimissüsteemi analüüs

Kuna BHK-CprME pakkimiskakuliinil põhinev süsteem kasutab ZIKV-NanoLuc replikoni pakkimiseks rakuliinis ekspresseeruvaid ZIKV struktuurseid valke, siis koosneb see süsteem ainult ZIKV replikoni transfektsioonist BHK-CprME rakuliini.

Esmalt hinnati 72 h pärast transfektsiooni ZIKV-NanoLuc replikoni transfektsiooni efektiivsust ja replikatsiooni taset NanoLuc aktiivsuse põhjal BHK-CprME rakkudes. See analüüs näitas, et NanoLuc aktiivsus BHK-CprME rakkudes on üsna kõrge (38 522 RLU/1000 raku), ehkki selgelt madalam kui sama replikoniga transfekteeritud BHK-21 rakkudes (Joonis 11). Siiski näitavad need andmed selgelt, et ZIKV-NanoLuc replikoni transfektsioon BHK-CprME rakkudesse oli efektiivne ning replikoni replikatsiooni tase 72 h pärast transfektsiooni üsna kõrge.

Järgnevalt nakatati BHK-CprME rakkudelt kogutud eeldatavasti ZIKV-NanoLuc VRP-sid sisaldava supernatandiga Vero E6 ja C6/36 rakke. ZIKV VRP-de sisaldust hinnati NanoLuc aktiivsuse mõõtmisega Vero E6 ja C6/36 rakkudest 24, 48 ja 72 h pärast nakatamist. Tulemustest

on näha, et NanoLuc aktiivsus ZIKV VRP-dega nakatatud Vero E6 ja C6/36 rakkudes on madal (Joonis 14). Erinevalt SFV replikonidel põhineva süsteemi raames nakatatud rakkudest (Joonis 13A ja B) langes NanoLuc aktiivsus siin 72-ks tunniks oluliselt (Vero E6) või püsis suhteliselt stabiilsena kogu katse jooksul (C6/36) (Joonis 14). See põhjal võib arvata, et tegemist oli NanoLuc markeri passiivse ülekandega st. mõõdetud aktiivsus pärines BHK-CprME rakkudelt kogutud supernatandist ja nakatamist ning ZIKV replikatsiooni ei toimunud. Seega võime järeldada, et BHK-CprME rakkudes ei toimunud ZIKV replikonide pakkimist või siis oli see äärmiselt ebaefektiivne, jäädes allapoole katse tundlikkuse piirist. Seega ei sobi BHK-CprME rakuliin ZIKV replikoni pakkimiseks. Selleks, et kindlalt väita ZIKV-replikoni pakkimise puudumist, tuleks analüüsimisele võtta ka negatiivne kontroll-supernatant sarnaselt SFV replikonidel põhineva süsteemiga. Kuna aga pakkimiskonstrukti ise ekspresseerib ZIKV struktuurseid valke, siis ei ole võimalik võtta analüüsimisele negatiivset kontroll-supernatanti, mis pärineks rakkudelt, millesse on transfekteeritud ZIKV replikon, kuid puudub ZIKV struktuurseid valke ekspresseeriv konstrukti.



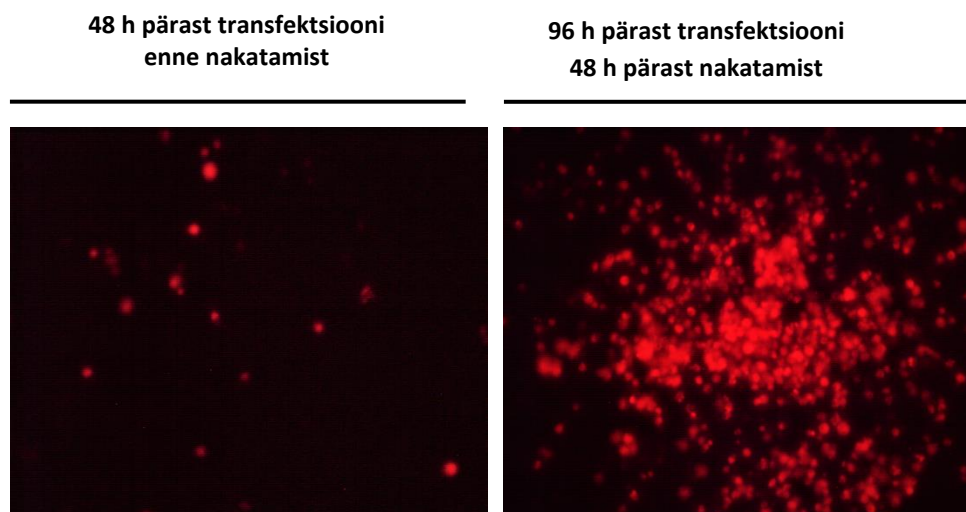
Joonis 14. NanoLuc aktiivsus BHK-CprME pakkimiskonstrukti vahendusel pakitud ZIKV VRP-dega nakatatud Vero E6 ja C6/36 rakkudes. Vero E6 ja C6/36 rakke nakatati ZIKV VRP-de supernatandiga, mis koguti ZIKV-NanoLuc replikoni pakkimiseks kasutatud BHK-CprME pakkimiskonstruktiilt. NanoLuc aktiivsus mõõdeti rakkudest 24, 48 ja 72 h pärast nakatamist. NanoLuc aktiivsus on esitatud RLU-des (*relative light unit*, suhteline vaguesühik normaliseerituna rakkude arvu (1000) suhtes). Mõõdetud NanoLuc aktiivsust kasutati pakkimiskonstrukti vahendusel toimuva ZIKV replikoni pakkimise efektiivsuse hindamiseks.

2.3.3. SFV-ZIKV-str VRP-del põhineva pakkimissüsteemi analüüs

Ülal kirjeldatud katsed näitasid, et BHK-CprME rakkudes ZIKV VRP-de moodustumist ei toimu. SFV replikonidega ZIKV VRP-de moodustamine küll saavutati, kuid see oli väga ebaefektiivne (Joonis 13A ja B). Kuna SFV replikonide tsütotoksilisuse vähendamine andis negatiivse tulemuse, kasutati järgnevalt pakkimist tsütotoksilise SFV replikoniga putukarakkkudes, milles SFV infektsioon tsütotoksiline ei ole (Kielian, 1993). Tsütotoksiline SFV replikon oli pakitud VRP-desse ja viidi nakatamise teel C6/36 rakkudesse. Antud süsteemi kasutati nii ZIKV-NanoLuc kui ka ZIKV-mCherry replikoni pakkimiseks. Selleks kõigepealt transfekteeriti pakitav ZIKV replikon C6/36 rakkudesse. Kuna putukarakkude transfekteerimine on suhteliselt ebaefektiivne, võeti ZIKV replikon-RNA-d kaks korda rohkem kui eelnevalt BHK-21 rakkude transfektsioonil. Kui ZIKV replikoni transfektsioonist oli möödunud 48 h, siis nakatati C6/36 rakke SFV-ZIKV-str VRP-dega. 48 h pärast C6/36 rakkude nakatamist koguti eeldatavasti ZIKV VRP-sid sisaldav supernatant ja rakud lüüsi ning mõõdeti NanoLuc aktiivsus. Mõõdetud NanoLuc aktiivsus (5932 RLU/1000 rakku) oli võrreldav eelnevatest pakkimissüsteemidest mõõdetud NanoLuc aktiivsustega (Joonis 11 ja 38 522 RLU/1000 rakku) näidates, et putukarakkude transfekteerimiseks võetud suurem kogus ZIKV replikoni RNA-d võimaldas tõsta transfektsiooni efektiivsust ligikaudu samale tasemele imetajarakkudega.

Rakkude transfekteerimise efektiivsuse täpsemaks hindamiseks osutus kasulikuks ZIKV-mCherry replikon, mis kodeerib punaselt fluorestseeruvat markervalku. Selle ekspressiooni saab visuaalselt hinnata fluorestsentsmikroskoobi abil. Vahetult enne ja 48 h pärast SFV-ZIKV-str VRP-dega nakatamist ehk 48 h ja 96 h pärast ZIKV-mCherry replikon-RNA transfektsiooni hinnati fluorestsentsignaali C6/36 rakkudest. Saadud piltidelt on näha punaselt fluorestseeruvaid rakke nii enne kui ka pärast nakatamist (Joonis 15). See viitab sellele, et ZIKV-mCherry replikon replitseerub edukalt C6/36 rakkudes ning näitab nagu eeldati, et putukarakkudes ei häiri SFV-ZIKV-str VRP-dega nakatamine ZIKV replikonide replitseerumist. Siiski 48 h pärast ZIKV-mCherry replikoni transfekteerimist, vahetult enne nakatamist on punaselt helenduvate rakkude arv tõenäoliselt mitte rohkem kui 5% rakkude koguarvust. Seega võib selle põhjal järeldada, et ZIKV-mCherry replikoni transfektsioon C6/36 rakkudesse pole olnud kuigi efektiivne. Samuti on näha, et peale SFV-ZIKV-str VRP-dega nakatamist suureneb punaselt fluorestseeruvate C6/36 rakkude arv järsult. Kõige tõenäolisemalt põhjustavad seda moodustunud ZIKV-mCherry VRP-d, mis väljuvad rakkudest ja nakatavad ZIKV-mCherry replikon-RNA-ga transfekteerimata C6/36

rakke (st. ZIKV replikon levib rakkude vahel). Seega näitas see katse kaudselt, et ZIKV replikoni pakkimine VRP-desse on selles pakkimissüsteemis küllaltki efektiivne.

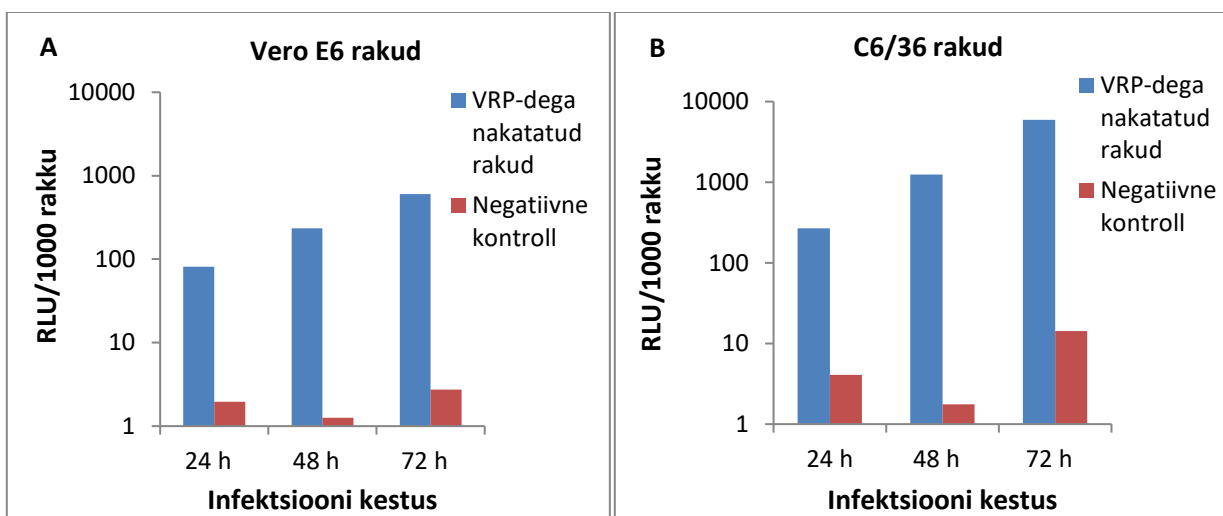


Joonis 15. mCherry markeri ekspressioon C6/36 rakkudes ZIKV-mCherry replikoni transfektsiooni ja SFV-ZIKV-str VRP-dega nakatamise järgselt. ZIKV-mCherry replikon-RNA transfekeeriti C6/36 rakkudesse. 48 h tundi pärast transfektsiooni nakatati samu rakke struktureid valke ekspresseerivat SFV replikon-RNA-d sisaldavate VRP-dega (SFV ZIKV-str VRP-d). Fluorestsentsmikroskoobi abil detekteeriti fluorestsentssignaali C6/36 rakkudest vahetult enne nakatamist ehk 48 h pärast transfektsiooni ning 48 h pärast nakatamist ehk 96 h pärast transfektsiooni.

Selleks, et täpsemalt analüüsida kui efektiivne on SFV-ZIKV-str VRP-de vahendatud ZIKV NanoLuc ja mCherry replikonide pakkimine, nakatati kogutud ZIKV-NanoLuc ja -mCherry VRP-de supernatantidega Vero E6 ja C6/36 rakke. Sarnaselt SFV replikonidel põhineva süsteemiga võeti ka siin ZIKV-NanoLuc ja -mCherry replikoni pakkimise analüüsimiseks negatiivne kontroll. Siin oli selleks supernatant, mis koguti vaid ZIKV replikon-RNA-ga transfekeeritud ning SFV-ZIKV-str VRP-dega nakatamata (*mock*-nakatatud) rakkudelt. ZIKV VRP-de moodustumise ja nakatamise efektiivsust hinnati NanoLuc replikoni puhul analoogselt eelnevate pakkimissüsteemidega ning mCherry replikoni puhul nakatatud rakkude helenduse põhjal.

NanoLuc aktiivsuse mõõtmistulemustest on näha, et ZIKV-NanoLuc VRP-sid sisaldava supernatandiga nakatatud Vero E6 (Joonis 16A) ja C6/36 rakkudes (Joonis 16B) toimub NanoLuc ekspressioon kõrgel tasemel. Selle aktiivsus suureneb ajas: 24 ja 72 ajapunkti erinevus oli Vero E6 rakkudes ligikaudu 10-kordne (Joonis 16A) ja C6/36 rakkudes isegi kuni 100 kordne (Joonis 16B). 72 tundi peale infektsiooni ületas NanoLuc aktiivsus nakatatud Vero E6 rakkudes

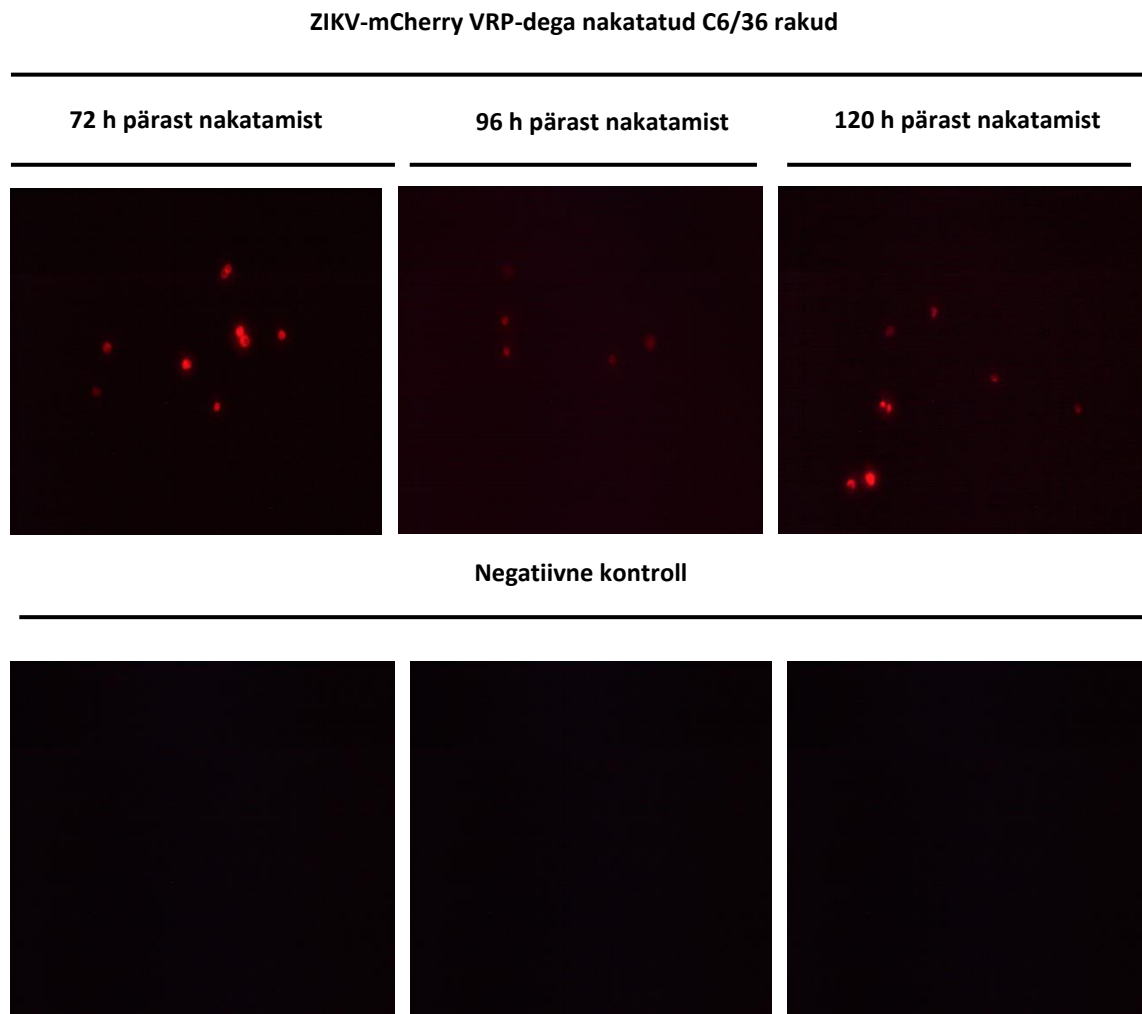
kontrollrakkude oma 219 korda; C6/36 rakkudes 418 korda. NanoLuc aktiivsus ZIKV-NanoLuc VRP-dega nakatatud C6/36 rakkudes saavutas enam-vähem sama taseme (Joonis 16B), mis ZIKV-NanoLuc replikoniga transfekteeritud rakkudes (5932 RLU /1000 rakku). Samal ajal Vero E6 rakkudes jäi see umbes suurusjärgu võrra madalamaks (Joonis 16A). Need tulemused viitavad sellele, et antud süsteemis toodetud ZIKV VRP-d suudavad paremini nakatada putuka- kui imetajarakke või toimub ZIKV replikonide replikatsioon ZIKV VRP-dega nakatatud putukarakkudes efektiivsemalt, kui imetajarakkudes. See on kooskõlas varem avaldatud andmetega, mis näitavad, et siin kasutatud ZIKV tüvi tõesti replitseerub C6/36 rakkudes kõrgemal tasemel kui Vero E6 rakkudes (Mutso jt., 2017). Eriti oluliseks tulemuseks on aga see, et saadud andmete põhjal võib järeldada, et SFV-ZIKV-str VRP-del põhineva süsteemiga toimus efektiivne ZIKV replikonide VRP-desse pakkimine. Hinnanguliselt oli see umbes kahe suurusjärgu võrra efektiivsem kui SFV replikonidel põhineva süsteemi puhul (võrdle Joonis 13 A , B ning 16 A, B).



Joonis 16. Nanoluc aktiivsus SFV-ZIKV-str VRP-de vahendusel pakitud ZIKV VRP-dega nakatatud Vero E6 ja C6/36 rakkudes. ZIKV-NanoLuc replikon-RNA-ga transfekteeritud rakke nakatati pakkimiseks kasutatud SFV-ZIKV-str VRP-dega. 48 h pärast nakatamist koguti ZIKV-NanoLuc VRP-de supernant, millega nakatati Vero E6 ja C6/36 rakke (sinised tulbad). Negatiivseks kontrolliks olid Vero E6 ja C6/36 rakud, mida nakatati supernatandiga, mis koguti ZIKV-NanoLuc replikon-RNA-ga transfekteeritud, kuid SFV-ZIKV-str VRP-dega nakatamata (*mock*-nakatatud) rakkudelt (punased tulbad). NanoLuc aktiivsust mõõdeti nakatatud rakkudest 24, 48 ja 72 tundi pärast nakatamist. NanoLuc aktiivsus on esitatud RLU-des (*relative light unit*, suhteline valgusühik) ning normaliseeritud rakkude arvu (1000 rakku) suhtes. Nakatatud rakkude NanoLuc aktiivsuse põhjal hinnati SFV-ZIKV-str VRP-de vahendusel toimuva ZIKV replikoni pakkimise efektiivsust

mCherry ekspressiooni visualiseerivatelt fluorestsentsmikroskoobi piltidelt on näha üksikuid punaselt fluorestseeruvaid C6/36 rakke (Joonis 17 ülemine paneel), seevastu helenduvaid Vero

E6 rakke ei õnnestunud üldse tuvastada. Kindlasti näitavad need andmed, et ka selle süsteemi kasutamisel jääb ZIKV VRP-de tiiter madalaks: kasutades nakatamiseks 150 µl ZIKV-mCherry VRP-sid sisaldavat supernatanti suudeti nakatada kuni üks protsent C6/36 rakkudest. Arvestades rakkude arvu (umbes 1 miljon raku 6-augulise plaadi augu kohta) tähendab see mitte rohkem kui 10 000 nakatunud raku ehk siis ZIKV-mCherry VRP-de tiitrit vahemikus 10^4 - 10^5 IU/ml.



Joonis 17. mCherry ekspressioon SFV-ZIKV-str VRP-de vahendusel pakitud ZIKV VRP-dega nakatatud C6/36 rakkudes. ZIKV-mCherry replikon-RNA-ga transfekteeritud rakke nakatati pakkimiseks kasutatud SFV-ZIKV-str VRP-dega. 48 h pärast nakatamist koguti ZIKV-mCherry VRP-de supernant, millega nakatati C6/36 rakke (ülemine paneel). Negatiivseks kontrolliks olid C6/36 rakud, mida nakatati supernatandiga, mis koguti ZIKV-mCherry replikon-RNA-ga transfekteeritud kuid SFV-ZIKV-str VRP-dega nakatamata (*mock*-nakatatud) rakkudelt (alumine paneel). Paneelide kohal on näidatud aeg pärast nakatamist, millal vastav fluorestsentssignaal detekteeriti. Fluorestsentssignaali põhjal hinnati SFV-ZIKV-str VRP-de vahendusel toimuva ZIKV-mCherry replikoni pakkimise efektiivsust.

2.4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli optimeerida ZIKV replikonide pakkimist, kasutades selleks SFV replikonidel, pakkimisrakuliinil ja SFV replikoni sisaldavatel VRP-del ehk SFV-ZIKV-str VRP-del põhinevaid pakkimissüsteeme. Töös analüüsiti, kas ja kui efektiivselt sellised pakkimissüsteemid võimaldavad pakkida ZIKV replikoni.

Antud tööst selgus, et ZIKV replikone õnnestus arvestatava efektiivsusega pakkida ainult SFV-ZIKV-str VRP-del põhineva süsteemiga putukarakkudes. Sarnast lähenemist on kirjeldatud ka Mutso jt 2017. aasta artiklis. Käesoleva töö peamiseks erinevuseks varem avaldatud tulemustest on antud juhul teisi markereid kodeerivate ZIKV replikonide (ZIKV-NanoLuc, ZIKV-mCherry) kasutamine ning katsetingimuste optimeerimise tulemusel saavutatud ZIKV replikoni efektiivsem pakkimine.

Samuti demonstreerisid käesoleva töö tulemused, et SFV-ZIKV-str VRP-dega nakatamine käivitab mCherry markerit ekspresseeriva replikoni levimise ZIKV VRP-de tootmiseks kasutatud rakukultuuris. See on kahtlemata tingitud sellest, et moodustuvad ZIKV VRP-d, mis nakatavad uusi ZIKV-mCherry replikoniga transfekteerimata naaberrakke. Selline „tagasiseondumine“ vähendas ZIKV VRP-de hulka rakusöötmes (supernatant), mida kasutati Vero E6 ja C6/36 rakkude nakatamisel. Seda demonstreerib ääretult madalal tasemel toimuv või puudulik mCherry ekspressioon selle supernatandiga nakatatud C6/36 (Joonis 17) ja Vero E6 rakkudes. mCherry helenduse puudumine Vero E6 rakkudes võis olla tingitud lisaks veel sellest, et imetajarakud (Vero E6) on ZIKV infektsioonile vähem vastuvõtlikumad kui putukarakud (C6/36). Samuti ei saa välistada võimalust, et C6/36 rakkudelt kogutud sööde sisaldas lisaks ZIKV-mCherry VRP-dele ka suurel hulgal SFV-ZIKV-str VRP-sid. Kuna SFV-ZIKV-str VRP-d on imetajarakkudele väga toksilised takistavad need ZIKV replikonide paljunemist rakkudes ja võisid suruda maha ZIKV replikoni vahendatud mCherry ekspressiooni Vero E6 rakkudes. Seevastu SFV-ZIKV-str VRP-de vahendusel toodetud analoogsete ZIKV-NanoLuc VRP-dega nakatatud Vero E6 rakkudes tuvastati kõrgel tasemel NanoLuc markeri ekspressioon replikon-RNA-lt. Seega mCherry helenduse puudumine ZIKV-mCherry VRP-dega nakatatud Vero E6 rakkudes on pigem tingitud sellest, et mCherry fluorestseerumine jäi alla määramispiiri.

ZIKV-mCherry replikoni pakkimine SFV-ZIKV-str VRP-dega näitas, et VRP-de saagis jäi vahemikku 10^4 - 10^5 infektsioonilist ühikut milliliitri kohta. See on üsna madal võrreldes alfaviiruste replikonide saagisega (SFV VRP-de tiitrid on suurusjärgus 10^9 infektsioonilist ühikut

milliliitri kohta). Sellest aga piisab mitmete bioloogiliste uurimuste läbiviimiseks, kuid näiteks potentsiaalsete vaktsiinikandidaatide väljaarendamise seisukohalt jääb seda väheks. Osalt on madalam tiiter flaviviirustele ka iseloomulik. Samuti põhines kasutatud replikon ka koekultuurile adapteerimata ZIKV kliinilise isolaadi järjestusel. Sellest tulenevalt replitseerub see rakukultuuris madalamal tasemel kui viiruse laboratoorsed tüved (Mutso jt 2017). Need on viiruse omadused ja neid ei saa (või ei ole soovitatav) muuta. Siiski on võimalik muutmata neid omadusi, tõsta SFV-ZIKV-str VRP-del põhineva süsteemiga saadavat ZIKV VRP-de saagist ehk pakkimise efektiivsust.

SFV-ZIKV-str VRP-del põhineva süsteemi peamiseks kitsaskohaks on putukrakkude suhteliselt madal transfektsiooni efektiivsus. Täpsemalt tuleneb see sellest, et transfektsiooni reagentid, sealhulgas siin kasutatud *Lipofectamine 2000*, ei ole eriti efektiivsed putukarakkude transfekteerimisel. Seda demonstreerivad selgelt Joonisel 15 (vasak paneel) toodud tulemused – ZIKV-mCherry replikoniga transfekteerimise järel on punaselt helenduvate rakkude arv väike. Sellest tulenevalt võis ka ZIKV-mCherry VRP-de saagis olla madal, sest C6/36 rakkudes polnud piisavalt ZIKV replikoni, mida pakkida. Tõenäoliselt saaks ZIKV VRP-de saagist tõsta vähemalt suurusjärgu võrra, kui oleks võimalik suurendada replikoniga transfekteeritud rakkude arvu. Selleks võiks otsida efektiivsemaid transfektsioonireagente või kasutada replikatsiooni käivitamiseks DNA plasmide, sest DNA transfektsioon putukarakkudesse on RNA transfektsioonist oluliselt efektiivsem.

Samuti on SFV-ZIKV-str VRP-del põhinevat süsteemi suhteliselt keeruline kasutada, kuna see nõuab SFV-ZIKV-str VRP-de valmistamist ning nagu juba mainitud siis putukarakkude transfektsiooni efektiivsus on madal. Seega otsisime sellele lihtsamat alternatiivi pakkimisrakuliini ja SFV replikonidega re-transfekteerimise näol. Paraku selgus, et konstrueeritud BHK-CprME rakuliinis ZIKV replikoni pakkimist ei toimu ning ZIKV ja SFV replikon-RNA-de järjestikusel transfekteerimisel ZIKV replikonide pakkimise efektiivsus on väga madal. Kuna ZIKV replikon replitseerub edukalt mõlema pakkimissüsteemi kasutamisel, siis pakkimise puudumise ja ebaefektiivse pakkimise põhjused saavad tuleneda ainult SFV replikonidega ja BHK-CprME rakuliiniga seotud probleemidest.

Üheks probleemiks SFV replikonidel põhineva süsteemi puhul võib olla see, et SFV replikonide RNA-sid ei suudetud piisavalt efektiivselt viia rakkudesse, millesse oli juba viidud ZIKV replikon. Oletust toetab SFV nsP2 ja ZIKV E valkude madal ekspressiooni tase (Joonis 12). Kuna

üldreeglina on SFV replikon-RNA-de transfektsioon BHK-21 rakkudesse väga efektiivne, siis probleemiks võib olla teistkordne transfektsioon lühikese aja jooksul. Samuti võib ZIKV replikoni olemasolu rakkudes takistada kuidagi SFV replikoni sisenemist või replikatsiooni käivitamist. Seda, et SFV replikonid ise töötavad, näitas veenvalt SFV-ZIKV-str VRP-del põhinev süsteem, mis erineb SFV replikonidel põhinevast süsteemist SFV replikoni rakkudesse viimise ja kasutatud rakutüübi poolest. Varasemalt on väidetud, et replikoni viimine rakkudesse VRP-desse pakitunult on palju efektiivsem kui replikon-RNA otsene transfekteerimine rakkudesse. Selle põhjuseks võib olla asjaolu, et VRP-d funktsioneerivad omapäraste tsaperonidena ning viivad pakitud replikon-RNA täpsesse translatsiooni toimumiskohta. (Puig-Basagoiti jt., 2005) Seega, SFV-ZIKV-str VRP-del põhineva süsteemi efektiivne ja SFV replikonidel põhineva süsteemi vahendatud ebaefektiivne ZIKV replikonide pakkimine võis olla tingitud just SFV replikonide rakkudesse viimise meetodist. Samuti on võimalik, et erinevalt topelt transfektsioonist, infektsiooniga ei tekitatud täiendavaid rakkude kahjustusi. Alfaviiruse replikonid on rakkude kahjustuse suhtes väga vastupidavad (ilmselt põhjusel, et nad ise põhjustavad rakkude kahjustusi) samal ajal, kui flaviviiruste replikonid (mis ise tsütotoksilised ei ole) on rakkude kahjustuste suhtes tundlikud. Seega võis topelt transfektsioon iseenesest mõistetavalt mõjutada negatiivselt ZIKV replikon-RNA-de replitseerumist, mistõttu polnud piisavalt RNA-sid, mida oleks saanud SFV replikonilt toodetud ZIKV struktuursete valkudega pakkida. Seeõttu ei saa ka ZIKV replikoni pakkimine olla ka kuigi efektiivne.

Samuti võib eeldada, et SFV replikonidel põhineva süsteemi vahendatud ebaefektiivne ZIKV replikonide pakkimine võis olla tingitud ka SFV replikonide kõrgeast tsütotoksilisest efektist imetajarakkudele. Hüpooteesi toetab asjaolu, et SFV-ZIKV-str VRP-del põhinev süsteem, mille puhul kasutati putukarakke, oli oluliselt efektiivsem. See on tingitud asjaolust, et imetajarakud on tundlikumad SFV replikonide tsütotoksilisuse suhtes kui putukarakud (Kielian, 1993). On võimalik, et suur osa SFV replikonidega transfekteeritud BHK-21 rakkudest suri enne, kui ZIKV VRP-d moodustusid, samal ajal kui SFV infektsiooni negatiivne mõju C6/36 rakkudele oli oluliselt väiksem või puudus hoopis. Hüpooteesi vastu räägib aga asjaolu, et SFV replikonide põhineva süsteemi puhul kasutati ka madala tsütotoksilisusega SFV replikone (RDD, PG). Sellest hoolimata polnud ka nende SFV replikonidega pakkimine efektiivne ja pigem oli saadud tulemus oodatule vastupidine (Joonis 13A, B). Seega, SFV replikonide vahendatud ebaefektiivne ZIKV replikonide pakkimine on tingitud millestki muust, kui tsütotoksilisusest imetajarakkudele. Näiteks samade mutatsioonidega SFV replikonidel on varasemalt näidatud vähenenud paljunemise

võimet (Tamm, 2007), mistõttu SFV replikon-RNA ja sellelt ekspresseeritud valkude tasemed on madalad (Joonis 12). Samas ei mõjuta see negatiivselt võõrvalkude tootmist (Tamm jt., 2008), mida kinnitasid ka käesolevas töös saadud andmed (Joonis 12). Seega, mittetsütotoksiliselt SFV replikonilt toodetud pakkimiseks vajalike ZIKV struktuursete valkude tase ei ole madalam kui wt replikonide puhul ega saa olla põhjuseks, miks ZIKV replikoni pakkimine oli väga ebaefektiivne.

Lisaks võis SFV replikonidel ja SFV-ZIKV-str VRP-del põhineva süsteemi erinev pakkimise efektiivsus tuleneda kasutatud rakutüübist. SFV replikonidel põhineva süsteemi puhul kasutati pakkimiseks imetajarakke (BHK-21), aga SFV-ZIKV-str VRP-del põhineva süsteemi puhul putukarakke (C6/36). Nimelt imetaja- ja putukarakkudes pakitud VRP-del erineb viirusliku ümbrise lipiidne koostis ning viiruslike glükoproteiinide glükosüleeritus (Boylan jt., 2017). Näiteks WNV puhul on näidatud, et viiruse päritolu mõjutab viiruse ning sihtmärkraku vahelist interaktsiooni ja infektsioonilisust (Lim jt., 2010). Seega, SFV-ZIKV-str VRP-del põhineva süsteemi raames putukarakkudes pakitud ZIKV VRP-d võisid uusi rakke paremini nakatada kui SFV replikonidel põhineva süsteemiga imetajarakkudes toodetud ZIKV VRP-d. Kuid vaktsiinide tootmise seisukohalt eelistatakse hoopis kindlaid imetajarakkude liine (CHO, Vero) ja putukarakke ei kasutata (v.a. inimese papilloomiviiruse vaktsiin). Põhjuseks on see, et imetajarakkude glükosüleerimise profiil sarnaneb rohkem inimese organismile kui putukarakkudes toimuv glükosüleerimine (Krammer ja Grabherr, 2010; Thompson, 2013). See omakorda mõjutab toodetud vaktsiinikandidaadi antigeenseid omadusi, mis kutsuvad esile erinevaid immuunvastuseid. Lisaks esineb putukarakkudes ka vaktsiinide saastuse oht erinevate viirustega, mida putukarakud kannavad ning millest paljud on tundmatud (Merten jt., 2007; WHO, 2013). Seetõttu on SFV-ZIKV-str VRP-del põhineva süsteemi kasutamine vaktsiinide väljatöötamisel on piiratud.

Ka SFV replikonidel põhineva süsteemiga oleks võimalik saavutada efektiivsem ZIKV replikoni pakkimine. Selleks oleks kõige loogilisem loobuda topelt transfektsioonist. Aga kuna madala tsütotoksilisusega SFV replikone pole võimalik efektiivselt VRP-desse pakkida, siis ei saa transfektsiooni infektsiooniga asendada. Küll aga on võimalik ZIKV replikoni ko-transfektsioon rakke mittekahjustavate alfaviiruste replikonidega nagu CHIKV-NCT (Pohjala jt 2011, Utt jt 2015) või siis ZIKV replikonide sisseviimine alfaviiruste replikonide abil tehtud stabiilsetesse rakuliinidesse. Kas sellised lähenemised töötavad ning milline on nende efektiivsus, on vaja veel analüüsida. Võimalik, et rakuliinide kasutamine ei anna loodetud efekti, sest siin uurimistöös

kasutatud kolmas pakkimissüsteem – BHK-CprME rakuliin – kas ei tootnud üldse ZIKV VRP-sid või siis jäi nende saagis katsete tundlikkuse piirist allapoole. Kuna varasemalt tehti kindlaks, et BHK-CprME rakkudes toimub ZIKV struktuursete valkude ekspressioon, siis ei saa VRP-de puudumise põhjuseks olla sobivate struktuursete valkude puudumine.

Eelnevates töödes on kirjeldatud flaviviiruste struktuursetid valke tootvas pakkimisrakuliinis SVP-de moodustumist. SVP-d koosnevad ainult E ja M valgust ning neisse ei ole pakitud replikoni. (Yoshii jt., 2008; Gehrke jt., 2003) Samuti võis ka antud juhul rakuliinis toodetavad ZIKV struktuursed valgud ZIKV replikoni pakkimise asemel osaleda hoopis SVP-de moodustumises. Toota struktuursetid valke sellistes kogustes, et neist jätkuks nii SVP-de kui ka VRP-de moodustamiseks pole ilmselt lihtne, sest flaviviiruste struktuursed valgud on rakkudele toksilised (Fayzulin jt., 2006). Parimaks võimaluseks seda vältida, on kasutada struktuursete valkude ekspresseerimisel indutseeritavat promotootrit (Harvey jt., 2004). Samuti saab kasutada rakuliine, mis on vähem tundlikud toksilisusele (Gehrke jt., 2003). Efektive pakkimisrakuliini loomine on üsna keeruline ülesanne, sest lisaks viiruse struktuursete valkude tootmisele on vajalik nende tootmine õigel ajal ja õiges kohas. Reaalses infektsioonis on flaviviiruse genoomide süntees ning struktuursete valkude tootmine seotud ehk toimub ühes ja samas raku kompartmentis. Neid tingimusi on lihtsam jäljendada kasutades struktuursete valkude tootmiseks teise RNA viiruse (antud töös SFV replikonde) abi.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et putukarakkudes SFV-ZIKV-str VRP-del põhineva pakkimissüsteemiga suutsime saavutada arvestatava ZIKV VRP-de tootmise. SFV replikonidel ja BHK-CprME pakkimisrakuliinil põhineva süsteemidega ei suudetud seda saavutada mitmete asjaolude tõttu. Samuti ka SFV-ZIKV-str VRP-del põhineval süsteemil on omad puudused, mistõttu vajaks see veel optimeerimist, et saavutada suurem ZIKV-VRP-de saagis. Tõenäoliselt on see võimalik üsna lihtsate võtetega, kuid nõuab siiski analüüsimist.

KOKKUVÕTE

VRP-desse pakitud flaviviiruste replikonid on oluliseks tööriistaks flaviviiruste uurimisel ning võivad kasutust leida ka vaktsiinide väljatöötamisel. Flaviviiruste replikonidele iseloomulik kõrge replikatsioonivõime ja mittetsütopaatiline infektsioon tagavad kõrgel tasemel toimuva pikaajalise võõrgeenide ekspressiooni. Replikonide pakkimine VRP-desse loob võimaluse nende loomulikul viisil (infektsiooni teel) rakkudesse viimiseks ja vastavate protsesside uurimiseks. Varasemalt on loodud flaviviiruste replikonide pakkimiseks mitmeid pakkimissüsteeme, mis kõik põhinevad flaviviiruste RNA pakkimiseks vajalikke struktuursete valkude tootmisel *in trans* pakitava replikoni suhtes.

Käesoleva töö eesmärk oli uurida võimalusi ZIKV replikonide pakkimiseks. Selleks kasutati kolme erinevat pakkimissüsteemi: SFV replikonidel põhinevat kahekordset transfektsioonisüsteemi, pakkimisrakuliini ja VRP-desse pakitud SFV replikonil põhinevat süsteemi. Tulemustest selgus, et ZIKV replikoni õnnestus VRP-desse pakkida ainult viimasena nimetatud süsteemiga, topelt transfektsiooni süsteem andis väga madalad saagised ja VRP-de moodustamist konstrueeritud pakkimisliinis tuvastada ei õnnestunudki. Ka efektiivseimal juhul jäi VRP-de saagis madalaks. Siiski võimaldavad saadud andmed järeldada, millised on optimaalsed tingimused ZIKV replikoni pakkimiseks ja sellega ka VRP-de tootmise täiendavat optimeerimist.

Töös püstitatud eesmärk uurida erinevaid võimalusi ZIKV replikoni pakkimiseks, sai täidetud ning see võimaldab ZIKV replikone edasises uurimistöös kasutada.

Packaging of Zika Virus Replicons into the Virus-Replicon Particles

Siret Usar

SUMMARY

The Zika virus (ZIKV) is a positive-sense single-stranded RNA virus that belongs to the flavivirus family. The ZIKV virus was already discovered in Uganda in 1947, but public has only started to show interest in the virus in recent years. The reason is the massive spread of Zika virus outside Africa and Asia, and the potency to transfer from mother to fetus, causing microcephalia in newborns. Therefore, it is now crucial to create different systems for studying the ZIKV and developing a vaccine.

Replicons packaged in VRPs have proven to be useful in the study of flaviviruses and in the development of vaccines. Flavivirus replicons are the self-replicating RNA molecules that have a removed region encoding for structural proteins, which is replaced by some foreign genes. The great benefit of flavivirus replicons is their non-cytopathic nature and high replication potency by ensuring high-level long-term expression of foreign genes. Packing the replicons into VRPs creates an opportunity to investigate the packaging and release of the virus and to use them as potential vaccine candidates.

For the packaging of flavivirus replicon in VRPs, several packaging systems have been developed; all of them were based on the production of structural proteins for RNA packaging of flaviviruses *in trans* to packaged replicon. The packaging of ZIKV replicons has not yet been thoroughly investigated.

The objective of this thesis was to explore the opportunities for packaging ZIKV replicons. For this purpose, three different packaging systems were used: a double transfection system based on SFV replicons, a packaging cell line expressing the ZIKV structural proteins, and an expression system for structural proteins mediated by SFV replicon packaged in VRPs. The results of the research revealed that the packaging of ZIKV replicon was only successful when packed into VRPs in insect cells, using for packaging the SFV replicon-based system. The double-transfection system produced very low yields and no formation of VRPs in the constructed packaging line was identified. In the most efficient case, the yield of VRPs remained low.

Nevertheless, the data obtained allow to conclude which optimal conditions for the packaging of the ZIKV replicon are and, thus, decide on further optimization of the production of VRPs.

The goal set in the research – to explore various options for the ZIKV replicon to be packed – has been met and it permits ZIKV replicons to be used in further research.

KIRJANDUSE LOETELU

1. Acosta, E. G., Kumar, A., and Bartenschlager, R. (2014). Revisiting Dengue virus-host cell interaction: new insights into molecular and cellular virology. *Advances in Virus Research*. 88: 1-109
2. Akiyama, B. M., Laurence, H. M., Massey, A. R., Costantino, D. A., Xie, X., Yang, Y., Shi, P., Nix, J. C., Beckham, J. D. and Kieft, J. S. (2016). Zika virus produces non-coding RNAs using a multi-pseudoknot structure that confounds a cellular exonuclease. *Science*. 354: 1148–1152.
3. Allison, S. L. Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W., Kunz, C. and Heinz, F. X. (1995a). Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *Journal of Virology*. 69: 695–700.
4. Allison, S. L., Stadler, K., Mandl, C. W., Kunz, C. and Heinz, F. X. (1995b). Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. *Journal of Virology*. 69: 5816–5820.
5. Aubry, F., Nougairède, A., Gould, E. A. and Lamballerie, X. (2015). Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: A historical perspective. *Antiviral Research*. 114: 67-85.
6. Barreto-Vieira, D. F., Jacome, F. C., da Silva, M. A. N., ... Monika Barth, O. M. (2017). Structural investigation of C6/36 and Vero cell cultures infected with a Brazilian Zika virus. *PLoS ONE*. 18: 1-18.
7. Bell, T. M., Field, E. J. and Narang, H. K. (1971). Zika virus infection of the central nervous system of mice. *Archives of Virology*. 35: 183-193.
8. Berger, A., (2009). Establishing a trans-packaging system for TBEV replicons to study events of complementation and recombination in the genus *Flavivirus*. *Viini Ülikool*. 89:1-89.
9. Besnard, M., Lastère, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V. M. and Musso, D. (2014). Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance*. 4: 1-4.
10. Blazevic, J., Rouha, H., Bradt, V., Heinz, F. X. and Stiasny, K. (2016). Membrane anchors of the structural flavivirus proteins and their role in virus assembly. *Journal of Virology*. 80: 6365-6378.

11. Boigard, H., Alimova, A., Martin, G. R., Katz, A., Gottlieb, P. and Galarza, J. M. (2017). Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 20: 1-20.
12. Boylan, B. T., Moreira, F. R., Carlson, T. W. and Bernard, K. A. (2017). Mosquito cell-derived West Nile virus replicon particles mimic arbovirus inoculum and have reduced spread in mice. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 11(2): e0005394.
13. Brand, C., Bisailon, M. and Geiss, B. J. (2017). Organization of the Flavivirus RNA replicase complex. *WIREs RNA*. 14:1-14.
14. Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., de Filippis, I., Fabri, A. Araujo, E. S. M. and de Sequeira, P. C. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infectious Diseases*. 16: 653–660.
15. Cao-Lormeau, V., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., ... Fontanet, A. (2016). Guillain-Barré syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet*. 387: 1531- 1539.
16. Chapman, E. G., Moon, S. L., Wilusz, J. and Kieft, J. S. (2014). RNA structures that resist degradation by Xrn1 produce a pathogenic Dengue virus RNA. *Elife*. 3: e01892.
17. Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E. G., ... Bartenschlager, R. (2017). Ultrastructural characterization of Zika virus replication factories. *Cell Reports* 18: 2113–2123.
18. Daffis, S., Szretter, K. J., Schriewer, J., ... Diamond, M. S. (2010). 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*. 468: 452-456.
19. Dick G. W., Kitchen S. F. and Haddow A. J. (1952). Zika virus I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 46: 509- 520.
20. Donald, C. L., Brennan, B., Cumberworth, S. L., ... Kohl, A. (2016). Full genome sequence and sfRNA interferon antagonist activity of Zika virus from Recife, Brazil. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 10: e0005048.
21. Duffy, M. R., Chen, T. H., Powers, A. M., ... Hayes, E. B. (2009). Zika virus outbreak on Yap island, Federated States of Micronesia. *The new England journal of medicine*. 360:2536-43.

22. Faye, O., Freire, C. C. M., Iamarino, A., Faye, O., de Oliveira, J. V. C., Diallo, M., Zanoth, P. M. A. and Sall, A. A. (2014). Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 8: e2636.
23. Fayzulin, R., Scholle, F., Petrakova, O., Frolov, I. and Mason, P. W. (2006). Evaluation of replicative capacity and genetic stability of West Nile virus replicons using highly efficient packaging cell lines. *Virology*. 351: 196-209.
24. Galán-Huerta, K. A., Rivas-Estilla, A. M., Martínez-Landeros, E. A., Arellanos-Soto, D. and Ramos-Jiménez, J. (2016). The Zika virus disease: An overview. *Medicina Universitaria*. 18: 115- 124.
25. Gehrke, R., Ecker, M., Aberle, S. W., Allison, S. L., Heinz, F. X. and Mandl, C. W. (2003). Incorporation of tick-borne encephalitis virus replicons into virus-like particles by a packaging cell line. *Journal of Virology*. 77: 8924–8933.
26. Goo, L., VanBlargan, Kimberly A. Dowd, K. A., Diamond, M. A. and Pierson, T. C. (2017). A single mutation in the envelope protein modulates flavivirus antigenicity, stability, and pathogenesis. *PLOS Pathogens*. 13: e1006178.
27. Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., ... Misséa, D. (2015). Biology of Zika virus infection in human skin cells. *Journal of Virology*. 89: 8880–8896.
28. Harrison, S. C. (2008). Viral membrane fusion. *Nature Structural and Molecular Biology*. 15: 690–698.
29. Harvey, T. J., Liu, W. J., Wang, X. J., Linedale, R., Jacobs, M., Davidson, A., Le, T. T. T., Anraku, I., Suhrbier, A., Shi, P-Y. and Khromykh, A. A. (2004). Tetracycline-inducible packaging cell line for production of flavivirus replicon particles. *Journal of Virology*. 78: 531–538.
30. Hasan, S. S., Sevvana, M., Kuhn, R. J. and Rossmann, M. G. (2018). Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nature Structural & Molecular Biology*. 25: 13-20.
31. Heinz, F. X. and Stiasny, K. (2017). The antigenic structure of Zika virus and its relation to other flaviviruses: implications for infection and immunoprophylaxis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 81: 1-81.
32. Hilss, S. L., Russell, K., Hennessey, M., Williams, C., Oster, A. M., Fischer, M. and Mead, P. (2016). Transmission of Zika virus through sexual contact with travelers to areas of ongoing transmission – continental United States. (2016). *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 65: 215-216.

33. Holden, K. L. and Harris, E. (2004). Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain. *Virology*. 15: 119-133.
34. Issur, M., Geiss, B. J., Bougie, I., Picard-Joune, F., Despins, S., Mayette, J., Hobdey, S. E. and Bisailon M. (2009). The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA*. 15: 2340–2350.
35. Jones, C. T., Ma, L., Burgner, J. W., Groesch, T. D., Post, C. B. and Kuhn, R. J. (2003). Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *Journal of Virology*. 77: 7143–7149.
36. Jones, C. T., Patkar, C. G. and Kuhn, R. J. (2005). Construction and applications of yellow fever virus replicons. *Virology*. 331: 247– 259.
37. Khromykh A. A., Varnavski, A. N. and Westaway, E. G. (1998). Encapsidation of the flavivirus Kunjin replicon RNA by using a complementation system providing Kunjin virus structural proteins in trans. *Journal of Virology*. 72: 5967–5977.
38. Khromykh, A. A. and Westaway, E. G. (1997). Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *Journal of Virology*. 71: 1497–1505.
39. Kielian, M. 1993. Membrane fusion activity of alphaviruses, p. 385-411 *In: Viral Fusion Mechanisms*, Bentz, J. CRC Press, United States of America.
40. Kiermayr, S., Kofler, R. M., Mandl, C. W., Messner, P. and Heinz, F. X. (2004). Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis (TBE) flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. *Journal of Virology*. 78: 8078–8084.
41. Kindhauser, M. K., Allen, T., Frank, V., Santhana, R. S. and Dye, C. (2016). *Bull World Health Organ*. 94: 675–686.
42. Klema, V. J., Padmanabhan, R. and Choi, K. H. (2015). Flaviviral replication complex: coordination between RNA synthesis and 5'-RNA capping. *Viruses*. 7: 4640-4656.
43. Kostyuchenko, V. A., Lim, E. X. Y., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T., Ooi, J. S. G., Shi, J. and Shee-Mei Lok, S-M. (2016). Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*. 533: 425-428.
44. Krammer F., Grabherr R. (2010). Alternative influenza vaccines made by insect cells. *Cell Press*. 16: 313-320.
45. Kuno, G. and Chang, G. J. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of Virology*. 152: 687- 696.

46. Li, M. I., Wong, P. S., Ng, L. C. and Tan, C. H. (2012). Oral susceptibility of Singapore *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 6: e1792.
47. Li, W. and Brinton, M. A. (2001). The 3' stem loop of the West Nile virus genomic RNA can suppress translation of chimeric mRNAs. *Virology*. 287: 49–61.
48. Li, W., Ma, L., Guo, L-P., Wang, X-L., Zhang, J-W., Bu, Z-G. and Hua, R-H. (2017). West Nile virus infectious replicon particles generated using a packaging-restricted cell line is a safe reporter system. *Scientific Reports*. 7: 3286.
49. Lim, P-Y., Louie, K. L., Styer, L. M., Shi, P-Y. and Bernard, K. A. (2010). Viral pathogenesis in mice is similar for West Nile virus derived from mosquito and mammalian cells. *Virology*. 400: 93-103.
50. Lindenbach, B. D. and Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Advances in virus research*. 59: 23–61.
51. Lindenbach, B. D., Murray, C. L., Theil, H-J. and Rice, C. M. 2013. *Flaviviridae*, p. 712-746. *In*: Knipe, D., Howey, P., editors, *Field's Virology* 6th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
52. Lindenbach, B. D., Thiel, H-J. and Rice, C. M. 2007. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*, p. 1101-1133. *In*: Knipe, D. M. and Howely, P. M. and editors, *Fields Virology*, 5th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
53. Lo, M. K., Tilgner, M., Bernard, K. A. and Shi, P-Y. (2003). Functional analysis of mosquito-borne flavivirus conserved sequence elements within 3' untranslated region of West Nile virus by use of a reporting replicon that differentiates between viral translation and RNA replication. *Journal of Virology*. 77: 10004–10014.
54. Lorenz, I. C., Allison, S. L., Heinz, F. X. and Helenius, A. (2002). Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*. 76: 5480–5491.
55. Mackenzie J. M., Jones, M. K. and Young, P. R. (1996). Immunolocalization of the Dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology*. 220: 232-240.
56. Mackenzie, J. M., Kenney, M. T. and Westaway, E. G. (2007). West Nile virus strain Kunjin NS5 polymerase is a phosphoprotein localized at the cytoplasmic site of viral RNA synthesis. *Journal of General Virology*. 88: 1163–1168.

57. Martin-Acebes, M .A. and Saiz, J. C. (2012). West Nile virus: a re-emerging pathogen revisited. *World Journal of Virology*. 1: 51–70.
58. Merten, O. W. (2007). Attention with virus contaminated cell lines. *Cytotechnology*. 55: 1–2.
59. Mossenta, M., Marchese, S., Poggianella, M., Campos, J. L. S. and Burrone, O. R. (2017). Role of N-glycosylation on Zika virus E protein secretion, viral assembly and infectivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 492: 579- 586.
60. Mukhopadhyay, S., Richard J. Kuhn, R. J. and Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 13-22.
61. Musso, D., Nhan, T., Robin, E., Roche, C., Bierlaire, D., Zisou, K., Shan Y. A., Cao-Lormeau, V. M., Broult, J. (2014). Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia. *Eurosurveillance*. 3:1-3.
62. Mutso, M., Saul, S., Rausalu, K., Susova, O., Žusinaite1, E., Mahalingam, S. and Merits, A. (2017). Reverse genetic system, genetically stable reporter viruses and packaged subgenomic replicon based on a Brazilian Zika virus isolate. *Journal of General Virology*. 98: 2712-2724.
63. Pang, X., Guo, Y., Zhou, Y., Fu, W. and Gu, X. (2014). Highly efficient production of a Dengue pseudoinfectious virus. *Vaccine*. 32: 3854–3860.
64. Pijlman, G. P., Funk, A., Kondratieva, N., ... Khromykh, A. A., (2008). A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe*. 13: 579–591.
65. Pijlman, G. P., Kondratieva, N. and Khromykh, A. A. (2006). Translation of the flavivirus Kunjin NS3 gene in cis but not its RNA sequence or secondary structure is essential for efficient RNA packaging. *Journal of Virology*. 80: 1255–11264.
66. Pohjala, L., Utt, A., Varjak, M., Lulla, A., Merits, A., Ahola, T. and Päivi Tammela, P. (2011). Inhibitors of Alphavirus Entry and Replication Identified with a Stable Chikungunya Replicon Cell Line and Virus-Based Assays. *PLoS One*. 6: e28923.
67. Prasad, V. M., Miller, A. S., Klose, T., Sirohi, D., Buda, G., Jiang, W., Kuhn, R. J. and Rossmann, M. G. (2017). Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2: 184-186.
68. Puig-Basagoiti, F., Deas, T. S., Ren, P., Tilgner, M., Ferguson, D. M. and Pei-Yong Shi, P-Y. (2005). High-Throughput Assays Using a Luciferase-Expressing Replicon, Virus Like

- Particles, and Full-Length Virus for West Nile Virus Drug Discovery. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 49: 4980-4988.
69. Roby, J. A., Funk, A. and Khromykh A. 2012. Flavivirus replication and assembly, p. 21-39. *In: Shi, P., Molecular Virology and Control of Flaviviruses*, Caister Academic Press, Great Britain.
 70. Saiz, J., Vázquez-Calvo, A., Blázquez, A. B., Merino-Ramos, T., Escribano-Romero, E. and Martín-Acebes, M. A. (2016). Zika virus: the latest newcomer. *Frontiers in Microbiology*. 7: 1-19.
 71. Sangiambut, S., Suphatrakul, A., Sriburi, R., Keelapang, P., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Malasit, P. and Sittisombut, N. (2013). Sustained replication of Dengue pseudoinfectious virus lacking the capsid gene by trans-complementation in capsid-producing mosquito cells. *Virus Research*. 174: 37–46.
 72. Scholle, F., Girard, Y. A., Zhao, Q., Higgs, S. and Mason, P. W. (2004). Trans-packaged West Nile virus-like particles: infectious properties in vitro and in infected mosquito vectors. *Journal of Virology*. 78: 11605–11614.
 73. Schuler-Faccini, L., Ribeiro, E. M., Feitosa, I. M. L., ... Sanseverino, M. T. V. (2016). Possible association between Zika virus infection and microcephaly – Brazil, 2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 65: 59–62.
 74. Schwarz, M. C., Sourisseau, M., Espino, M. M. and Gray, E. S., Chambers, M. T., Tortorella, D. and Evans, M. J. (2016). Rescue of the 1947 Zika Virus Prototype Strain with a Cytomegalovirus Promoter-Driven cDNA Clone. *mSphere*. 12: e00246-16.
 75. Shan, C., Li, X., Deng, C., Shang, B., Xu, L., Ye, H., Yuan, Z. and Zhang, B. (2013). Development and Characterization of West Nile Virus Replicon Expressing Secreted Gaussia Luciferase. *Virologica Sinica*. 28: 161-166.
 76. Sikka, V., Chattu, V. K., Popli, R. K., Galwankar, A. C., Kelkar, D., Sawicki, S. G., Stawicki, A. P. and Papadimos, T. J. (2016). The emergence of zika virus as a global health security threat: A review and a consensus statement of the INDUSEM Joint working Group (JWG). *Journal of Global Infectious Diseases*. 8: 3-15.
 77. Sirohi, D. and Kuhn, R. J. (2017). Zika virus structure, maturation, and receptors. *The Journal of Infectious Diseases*. 16: 935–944.
 78. Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T. C., Rossmann, M. G., and Kuhn, R. J. (2016). The 3.8Å resolution cryo-EM structure of Zika Virus. *Science*. 352: 467–470.

79. Stadler, K., Allison, S. L., Schalich, J. and Heinz, F. X. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of Virology*: 71: 8475–8481.
80. Stiasny, K. and Heinz, F. X. (2006). Flavivirus membrane fusion. *Journal of General Virology*. 87: 2755–2766.
81. Stiasny, K., Allison, S. L., Mandl, C. W. & Heinz, F. X. (2001). Role of metastability and acidic pH in membrane fusion by tick-borne encephalitis virus. *J. Virol.* 75: 7392–7398.
82. Stiasny, K., Allison, S. L., Marchler-Bauer, A., Kunz, C. and Heinz, F. X. (1996). Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus. *Journal of Virology*. 70: 8142–8147.
83. Strauss, J. H. and Strauss, E. G. 2008. Genus *Flavivirus*, p. 107-112. *In: Viruses and Human Diseases*, 2nd edition, Elsevier Academic Press, Canada.
84. Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P. R., Zhang, W., Pletnev, S. V., Sedlak, D., Baker, T. S., Strauss, J. H., Kuhn, R. J. and Rossmann, M. G. (2003). Structures of immature flavivirus particles. *The EMBO journal*. 22: 2604- 2613.
85. Zhu, Z., Chan, J. F., Tee, K., Choi, G. K., Lau, S. K., Woo, P. C., Tse, H. and Yuen, K. (2016). Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. *Emerging Microbes & Infection*. 5: e22.
86. Tamm, K. (2007). Semliki forest viiruse mittestruktuurse valgu nsP2 tuumalokalisatsiooni mutantide fenotüübi kirjeldamine. *Tartu Ülikool*. 75:1-75.
87. Tamm, K., Merits, A. and Sarand, I. (2008). Mutations in the nuclear localization signal of nsP2 influencing RNA synthesis, protein expression and cytotoxicity of Semliki Forest virus. *Journal of General Virology*. 89: 676- 686.
88. Thompson, C. M. (2013). Development of Production Process for a Virus Like Particle Based Vaccine in Cell Culture. *Universite de Montreal*. 123: 1-123.
89. Uchil, P. D. and Satchidanandam, V. (2003). Architecture of the flaviviral replication complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 24388–24398.
90. 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. *Journal of Virology*. 89: 3145–3162.

91. Varnavski, A. N. and Khromykh, A. A. (1999). Noncytopathic flavivirus replicon RNA-based system for expression and delivery of heterologous genes. *Virology*. 255: 366-375.
92. Vasilakis, N. and Weaver, S. C. (2017). Flavivirus transmission focusing on Zika. *Virology*. 22: 20-35.
93. Wei, Y., Qin, C., Jiang, T., Li, X., Zhao, H., Liu, Z., Deng, Y., Liu, R., Chen, S., Yu, M. (2009). Translational regulation by the 3' untranslated region of the dengue type 2 virus genome. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 81: 817–824.
94. Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J. and Bartenschlager, R. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the Dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host and Microbe*. 5: 365–375.
95. Westaway, E. G., Mackenzie, J. M., Kenney, M. T., Jones, M. K. and Khromykh, A. A. (1997). Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *Journal of Virology*. 71: 6650–6661.
96. Westaway, E.G., Khromykh, A., A. and Mackenzie, J. M. (1999). Nascent flavivirus RNA colocalized in situ with double-stranded RNA in stable replication complexes. *Virology*. 258: 108–117.
97. WHO. (2013). Annex 3: Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. WHO Technical Report Series. 110: 79-187.
98. Wong, P. S., Li, M. Z., Chong, C. S., Ng, L. C., and Tan, C.H . (2013). *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 7: e2348.
99. Xie, X., Zou, J., Shan, C., Yang, Y., Kum, D. B., Dallmeier, K., Neyts, J. and Shi, P. (2016). Zika virus replicons for drug discovery. *EbioMedicine*. 4:156-160.
100. Yoshii, K., Goto, A., Kawakami, K., Kariwa, H., and Takashima, I. (2008). Construction and application of chimeric virus-like particles of tick-borne encephalitis virus and mosquito-borne Japanese encephalitis virus. *Journal of Virology*. 89: 200-211.
101. Yoshii, K., Ikawa, A., Chiba, Y., Omori, Y., Maeda, J., Murata, R., Kariwa, H. and Takashima, I. (2009). Establishment of a neutralization test involving reporter gene-

expressing virus-like particles of tick-borne encephalitis virus. *Journal of Virology Methods*. 161: 173–176.

102. Yu, I. M., Holdaway, H. A., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G. and Chen, J. (2009). Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *Journal of Virology*. 83: 12101–12107.
103. Yu, I., Zhang, W., Holdaway, H. A., Li, L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G. and Chen, J. (2008). Structure of the immature Dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*. 319: 1834- 1837.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

1. [Epicentre an Illumina Company. \(2012\). CopyControl™ pCC1BAC™ \(BamH I,Hind III, EcoR I Cloning-Ready\) Vector.](#) Kasutatud 06.05.18.
2. [Epicentre an Illumina Company. \(2012\). TransforMax™ EPI300™ Electrocompetent E. coli TransforMax™ EPI300™ Chemically Competent E. coli.](#) Kasutatud 06.05.18.
3. [International Committee on Taxonomy of Viruses.](#) (2017). Kasutatud 03.04.18.
4. [World Health Organization \(WHO\) Zika virus.](#) (2016). Kasutatud 05.05.18
5. [World Health Organization \(WHO\). Dengue virus.](#) (2016). Kasutatud 05.04.18
6. [World Health Organization \(WHO\). Director-General summarizes the outcome of the Emergency Committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome.](#) (2016). Kasutatud 03.04.18.
7. [World Health Organization \(WHO\). Guillain-Barre syndrome.](#) (2016). Kasutatud 04.04.17
8. [World Health Organization \(WHO\). Japanese encephalitis.](#) (2015). Kasutatud 05.04
9. [World Health Organization \(WHO\): West Nile Virus.](#) (2011). Kasutatud 03.04.18
10. [World Heath Organization \(WHO\) Yellow Fever virus.](#) (2018). Kasutatud 05.04.18

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Siret Usar,

(sünnikuupäev: 19.09.1994)

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

Zika viiruse replikonide pakkimine viirus-replikon partiklitesse,

mille juhendajad on Andres Merits 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 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, 27.05.2018