

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

**Alfaviiruse-põhise *trans*-replikatsiooni süsteemi kasutamine *swap*- ja
punktmutatsioonide uurimisel**

Bakalaureusetöö
Geenitehnoloogia
12 EAP

Siret Usar

Juhendajad PhD Andres Merits

MD, DSc Eva Žusinaite

TARTU 2016

Alfaviiruse-põhise *Trans*-replikaasi süsteemi kasutamine *swap*- ja punktmutatsioonideuurimisel

Siret Usar

Trans-replikaasi süsteem põhineb matriits-RNA replikatsioonil ja sellelt toimival subgenoomse RNA sünteesil (transkriptsioonil) imetajarakkudes, mida teostab samas rakus eraldi ekspresseeritud alfaviiruse replikaas. Replikatsiooni ja transkriptsiooni hinnatakse matriits-RNA-l kodeeritud markervalkude detekteerimisega. Käesoleva töö tulemused näitasid, et *trans*-replikaasi süsteem osutus väga informatiivseks alfaviiruste homologsete replikaasi domeenide vahetamise mõju uurimisel ning nsP2 proteaasi punktmutatsioonide efektide uurimisel. Uurimusest selgus, et domeenide vahetamine pärssis transkriptsiooni, osutades replikaasi valkude antud domeenide olulisusele transkriptsiooni jaoks. Valitud punktmutatsioonid nsP2 proteaasis blokeerisid täielikult replikatsiooni ja transkriptsiooni, millest järeldub, et proteaasne aktiivsus on oluline nii replikatsiooni kui transkriptsiooni jaoks.

Märksõnad: *Trans*-replikaasi süsteem, punktmutatsioonid, *swap*-mutatsioonid

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

Using alphaviral *trans*-replicase system for studying swap and point mutations

Siret Usar

The *trans*-replicase system is based on replication of template RNA and synthesis of subgenomic RNA (transcription) in animal cell by alphaviral replicase expressed simultaneously in the same cell. The replication and transcription is evaluated by the detection of marker proteins encoded by the template RNA. Results of this bachelor's thesis showed that *trans*-replicase system is very informative in studying effects of swapping homologous domains of alphaviral replicase and for investigating the effects of point mutations in nsP2 protease. The study revealed that domain swapping significantly inhibited transcription, thus indicating their importance for transcription. Point mutations in protease blocked completely replication and transcription, thus demonstrating the relevance of protease activity for alphaviral replication and transcription.

Keywords: *Trans*-replicase system, point mutations, swap mutations

CERCS code: B230 Biomedical sciences/ Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Alfaviirused	8
1.2. CHIKV.....	9
1.3. SFV	10
1.4. Alfaviiruste genoom	11
1.5. Alfaviiruste virion.....	12
1.6. Infektsioonitsükkel.....	13
1.6.1. Sisenemine rakku	13
1.6.2. Translatsioon	14
1.6.3. Replikatsioon ja trankriptsioon	15
1.6.4. Viiruse pakkimine ja väljumine rakust	17
1.7. <i>Trans</i> -replikatsiooni süsteem.....	18
2. ESKPERIMENTAALNE OSA	22
2.1. Töö eesmärgid.....	22
2.2. Materjalid ja meetodika	23
2.3. Tulemused ja arutelu.....	34
2.3.1 <i>Swap</i> -mutatsioonide uurimine.....	34
2.3.2 CHIKV nsP2 proteaasi punktmutatsioonide uurimine.....	39
2.3.3 SFV punktmutatsioonide uurimine	46
KOKKUVÕTE	49
SUMMARY	50
KASUTATUD KIRJANDUS	52
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	56
LIHTLITSENTS.....	57

KASUTATUD LÜHENDID

- cDNA** – komplementaarne DNA (*complementary DNA*)
- CHIKV** – Chikungunya viirus (*Chikungunya virus*)
- CMV** – tsütomegaloviirus (*Cytomegalovirus*)
- CPV-I** – I tüüpi tsütopaatile vakuool (*cythopathic vacuole type I*)
- E** – ümbrise ehk kattevalk (*envelope protein*)
- ECL** – võimendatud kemoluminestsents (*Enhanced chemiluminescence*)
- EEEV** – Ida hobuse entsefaliidi viirus (*Eastern Equine Encephalitis virus*)
- EMCV** – entsefalomüokardiidi viirus (*Encephalomyocarditis virus*)
- ER** – endoplasmaatiline retiikulum (*endoplasmic reticulum*)
- FCS** – veise loote seerum (*fetal calf serum*)
- Ffluc** – Jaanimardika lutsiferaas (*Firefly luciferase*)
- Gluc** – mere aerjalgse lutsiferaas (*Gaussia Luciferase*)
- GMEM** – Glasgow Modified Eagle's Medium
- HDV** – Hepatiit D viirus (*Hepatitis Delta Virus*)
- HSV** – Herpes Simplex Virus
- IRES** – Sisemine riobosoomi sisestus koht (*internal ribosomal entry site*)
- IMDM** – Iscove's Modified Dulbecco's Medium
- kb** – kiloalus (*kilobase*)
- kDa** – kilodaloton
- ns** - mittesrukturne (*non structural*)
- nsP** – mittestrukturne valk (*nonstructural protein*)
- NTR** – mittetransleeritav ala (*nontranslated region*)
- NTD** – N-terminaalne domeen
- ONNV** – O`nyong-nyong viirus (*O`nyong-nyong virus*)
- PBS** – fosfaatpuhvriga soolalahus (*phosphate buffered saline*)
- PolüA** – polü-adenosiin (*Poly adenosine*)
- RdRp** – RNA sõltuv RNA polümeraas (*RNA-dependent RNA polymerase*)
- RRV** – Ross River viirus (*Ross River virus*)
- SDS** – naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfate*)

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

SG – subgenoomne (*subgenomic*)

SINV – Sindbis viirus (*Sindbis virus*)

SV40 – (*Simian virus 40*)

UTR – mittetransleeritav region (*untranslated region*)

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

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

wt – metsiktüüp (*wild type*)

SISSEJUHATUS

Viirused on bioloogilised objektid, millel puudub rakuline ehitus ja iseseisev paljunemisvõime. Viirused sisaldavad geneetilist materjali DNA või RNA kujul ning paljunevad teistes elusorganismides replitseerumise kaudu. Seetõttu peetakse neid elusorganismide parasiitideks. Viirused nakatavad kõiki rakulise ehitusega olendeid ning mõned neis võivad põhjustada mitmesuguseid haigusnähte, isegi peremeesorganismi surma.

Alfaviirustel on positiivse polaarsusega RNA genoom ja nad kuuluvad *Togaviridae* sugukonda. Alfaviiruste perekonda kuulub ligi 30 liiki viiruseid, mille tüüpilisteks esindajateks on Chikungunya (CHIKV) ja Semliki Forest viirus (SFV). Alfaviirused on arboviirused, st., et nad kanduvad edasi lülijalgsete organismide, enamasti sääskede vahendusel. Nad on võimelised nakatama ka mitmeid selgroogseid peremehi ja imetajaid, nende hulgas ka inimesi. Alfaviiruseid kasutatakse palju molekulaarbioloogia uurimismudelitena ja nad on leidnud kasutust ka geeniteraapias.

Selleks, et mõista alfaviiruste elutsüklit, on vajalik teada viiruse poolt kodeeritud valkude funktsioone. Viirusvalkude funktsioonide uurimisel kasutatakse eelkõige punktmutatsioonide sisseviimist viirusvalkude kodeerivatesse järjestustesse ja homoloogsete domeenide vahetamist ehk *swappingut* ning nende efektide analüüsimist. Analüüsimisel kasutatakse suhteliselt töömahukaid ja keerulisi meetodeid, sellest hoolimata ei anna need alati küllaldaselt informatsiooni mutatsioonide omaduste kohta. Samuti ei sobi tavapärased meetodid letaalse mõjuga mutatsioonide uurimiseks. Letaalse mõjuga mutatsioonide uurimist võimaldab *trans*-replikaasi süsteem, mis on lihtne ja mitte niivõrd töömahukas. *Trans*-replikaasi süsteem põhineb replikaasi valkude poolt läbiviidaval matriits-järjestuse replitseerimisel ja transkribeerimisel ehk subgenoomse RNA sünteesil imetajarakkudes. Matriits-RNA replitseerimine ja subgenoomse RNA süntees viib matriits-järjestuses kodeeritud markervalkude eksperssioonini ja see võimaldab detekteerida replikatsiooni ja transkriptsiooni toimumist.

Käesoleva töö kirjanduse ülevaade kirjeldab alfaviiruseid, nende genoomi ja virioni ehitust ning infektsioonitsüklit keskendudes eelkõige CHIKV-le ja SFV-le. Lisaks antakse ülevaade ka *trans*-replikaasi süsteemi üldistest mehhanismidest ja ülesehitusest. Eksperimentaalne osa kirjeldab *swap*- ja punktmutatsioonide uurimist alfaviiruste replikaasi erinevates funktsionaalsetes domeenides kasutades selleks *trans*-replikaasi süsteemi. Käesoleva töö üldine eesmärk oli analüüsida selle uurimismeetodi efektiivsust viroloogia alastes uurimustes. Töö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis RNA-viiruste uurimisgrupis. Tänan Eva

Žusinaitet ja Andres Meritsat juhendamise eest. Samuti soovin tänada Liis-Karo Astoveri, Age Utti, Margit Mutsot ja Kai Rausalut abi ja kasulikke nõuannete eest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Alfaviirused

Alfaviirused kuuluvad *Togaviridae* sugukonda. Alfaviiruste hulka kuulub ligi 30 liiki viiruseid, millel on positiivse polaarsusega umbes 12 kb pikkune RNA genoom. (Strauss ja Strauss, 2008)

Alfaviirused on geograafiliselt väga laialt levinud ning tuvastatud kõigilt kontinentidelt. Eelkõige on levinud troopilistes piirkondades, kus sääskede levikuala on suurem. Geograafilise leviku alusel jaotatakse alfaviirused Vana Maailma ja Uue Maailma viirusteks. Vana Maailma viirused on levinud Austraalias, Euroopas, Aasias ja Aafrikas. Nende hulka kuuluvad Sindbis (SINV), Ross River (RRV), O`nyong-nyong (ONNV), Semliki forest (SFV) ja Chikungunya viirus (CHIKV). Uue Maailma viirused on leitud Lõuna- ja Põhja-Ameerikast. Nende hulka kuuluvad Western, Eastern ja Venezuelan Equine Encephalitis viirus (WEEV, EEV, VEEV). Alfaviirused on omavahel tihedas suguluses, aminohappeliste järjestuste sarnasus on 45% struktuursete valkude hulgas ja 60% mittestruktuursete valkude hulgas (Strauss ja Strauss, 1994).

Paljud alfaviirused kujutavad endast tõsist ohtu inimeste tervisele. EEV ja WEEV võivad põhjustada fataalset entsefaliiti. CHIKV ja sellega lähedases suguluses olev ONNV põhjustavad haigust, mida iseloomustab palavik, lööve ja liigesvalu. SFV ja SINV laboratoorseid tüvesid peetakse inimestele avirulentseteks, kuigi nende viiruste loomulikud tüved on põhjustanud tõsiseid haiguslikke nähte. Näiteks SINV võib põhjustada polüartriiti, palavikku ja löövet ning SFV palavikku, peavalu ja liigesvalu (Strauss ja Strauss, 1994).

Alfaviirused on arboviirused, see tähendab, et nad kanduvad edasi lüljalgsete vektorite, enamasti sääskede vahendusel. Sääskedes kulgeb alfaviiruse infektsioon asümptomaatiliselt ja eluaegselt. Infektsioon sääskedes algab sooletikus ja levib süljenäärmetesse, mille tulemusel sääsk on võimeline nakkust edasi kandma selgroogsele peremehele. Selgroogsetes on viiruse infektsioon tavaliselt piiratud immuunvastuse poolt (Strauss ja Strauss, 2008). Paljudel alfaviirustel on esimeseks selgroogseks peremeheks linnud. Selliste viiruste hulka kuuluvad SINV, WEEV ja EEEV. Arvatakse, et alfaviiruste laialdane levik on suuresti seotud rändlindude kaudu toimunud viiruse edasikandumisega. Samuti on ka inimesed võimelised alfaviiruseid levitama ning arvatakse, et inimeste suurenenud reisimisel on seos alfaviiruste ülemaailmse levikuga (Strauss ja Strauss, 1994).

1.2 CHIKV

Chikungunya viirus (CHIKV) esmakordselt isoleeriti Tansaaniast 1952. aastal. CHIKV puhangud esinesid sporaadiliselt Aasias ja Aafrikas aastail 1960-1990. Aastal 2005 CHIKV C/EA tüvi, mis tõenäoliselt pärines Kenya rannikult, levis India ookeani saartele ja Indiasse. Alates sellest ajast hakkas CHIKV levima ülemaailmselt põhjustamaks suuri haiguspuhanguid Kagu- ja Ida-Aasias. Selline globaalne epideemia oli põhjustatud paljude faktorite poolt. Nende hulka kuulusid suurenenud reisijate hulk, sääskede laienenud geograafiline jaotus ja epideemilise sääse tüve *Aedes albopictus* kohanemise suurenemine. CHIKV juhtumeid on arvukalt tuvastatud mitte endeemilistest riikidest, nagu Jaapanist, USA-st ja Euroopast. See näitab, et CHIKV pole enam troopiliste maade probleem. Epideemia Itaalias 2007. aastal oli esimene kohalik CHIKV puhang väljaspool troopilisi alasid. Viimane ülemaailmne CHIKV puhang esines 2013. aastal Kariibi mere saartel (Rougeron jt., 2015).

CHIKV on arboviirus, mis kantakse üle *Aedes* perekonna sääskede, enamasti *Aedes aegypti* vahendusel. La Reunioni saarel aastatel 2005-2006 esines CHIKV-i puhang, mille käigus haigestus 266 000 inimest (üle neljandikku saare elanikkonnast), kellest 260 surid. See epideemia oli ebatavaline võrreldes teiste epideemiatega, seetõttu, et ülekanne toimus *Aedes albopictus* vektori, mida nimetatakse ka “tiiger” sääseks vahendusel tavapärase *Aedes aegypti* vektori asemel. Vektori vahetus osutus võimalikuks punktmutatsiooni tõttu CHIKV E1 (virioni ümbrise valk) valgus, mis suurendas CHIKV infektsioonilisust *Aedes albopictus* vektori suhtes (Vazeille jt., 2007; Tsetsarkin jt., 2007). Ainult emased sääsed on nakkusohtlikud, kuid viimaste uuringute käigus on leidnud viiruse järjestusi ka isastelt sääskedelt (Rougeron jt., 2015). CHIKV puhangud esinevad sageli vihmaste perioodide ajal, kui suureneb sääskede tihedus. Sellest tulenevalt on ka CHIKV puhangud olnud peamiselt troopiliste maade probleem.

CHIKV ülekande tsükkel jagatakse kaheks, sülvaatiliseks ehk metsatüüpi ja linnatüüpi (*urban*) tsüklik. Sülvaatiline tsükkel esineb ainult Aafrikas, mille levikualaks on mets. See ülekande tsükkel toimub metsas elavate *Aedes furcifer*, *Aedes taylori*, *Aedes africanus* ja *Aedes luteocephalus* sääskede ja primaatide vahel. Viirus saab üle kanduda vaid lähedal elavatele inimestele, tekitades väikeseid puhanguid. Linnatüüpi (*urban*) tsükkel põhineb *A. aegypti* ja *A. albopictus* ning inimeste vahelisel ülekandel. Kuna seda tüüpi sääsed elavad inimeste vahetus läheduses, siis on epideemiad palju suuremad. Eelkõige esineb linnatüüpi ülekande tsükli Aasias (Weaver jt., 2012).

CHIKV infektsiooniga kaasnevad enamasti palavik, liigesvalu ja lööve. Sümptomid kujunevad välja 3-7 päeva jooksul. Haigus algab tavaliselt äkilise palaviku tõusuga, mis kestab mõned päevad kuni 2 nädalat. Peale palavikku tekivad enamikel nakatanutel liigesvalud, mis esinevad eelkõige randmetel, küünarnukkidel, põlvedel ja pahkludel. Lööve esinemine varieerub patsientidel, seetõttu ei saa seda pidada usaldusväärseks tunnuseks diagnoosimisel. Lööve esineb tüüpiliselt punaste laikudena või villidena. Lisaks esinevad sellised sümptomid nagu peavalu, väsimus, iiveldus ja oksendamine. Need on iseloomulikud akuutsele infektsioonile. Kõigil CHIKV nakatanud indiviididel ei esine sümptomeid. Umbes 3-25% patsientidest kulgeb nakkus asümptomaatiliselt (Staples jt., 2009). Sümptomid sarnanevad Dengue palavikule, seetõttu aetakse neid sageli ka segamini. See aga põhjustab sagedast CHIKV infektsiooni valesti diagnoosimist Dengue viiruse esinemisaladel. CHIKV sümptomid sarnanevad ka Ross River viiruse omadega. (Solignat jt., 2009).

1.3 SFV

SFV kuulub Vana Maailma alfaviiruste hulka. SFV on kõige lähedasemas suguluses Chikungunya, Getah ja Mayaro alfaviirustega. SFV isoleeriti esmakordselt 1942. aastal *Aedes abnormalis* sääskedelt Semliki metsast Ugandas. SFV on laialt levinud Aafrikas *Aedes africanus* ja *Aedes argenteopunctatus* vahendusel. Viiruse loomulik peremees on teadmata, kuid SFV infektsiooni on leitud hobustel, ahvidel ja inimestel. (Fazakerly, 2002; Knipe ja Howley, 2001)

SFV erinevaid tüvesid on kasutatud laborites üle maailma ja on näidatud eksperimentaalselt hiirte, jäneste ja merisigade nakatumist. Erinevaid tüved on jaotatud virulentseteks ja avirulentseteks vastavalt võimele tekitada haigust täiskasvanud hiires. Virulentsus hiirtes on vanusest sõltuv; kõik tüved on virulentsed vastsündinud hiirtes (Fazakerly, 2002). Kaks peamist SFV tüve on L10 ja A7. L10 on neurovirulentne hiiretele ja põhjustab neil surmavat entsefaliiti, kuid A7 on avirulentne tüvi. Enamus laboratoorsetes uuringutes kasutatud SFV tüvesid on tuletatud nendest kahest tüvest (Atkins jt., 1999). SFV-d peetakse inimestele enamasti mittepatogeenseks, kuigi on juhtumeid kus SFV on põhjustanud haigusnähte inimestel (Strauss ja Strauss, 1994).

Täiskasvanud hiirtel SFV replitseerub lihastes. Osa SFV tüvesid sisenevad ajju peaaju veresoonte endoteeli rakkude kaudu ja replitseeruvad seal, täpsemalt neuronites ja põhjustavad närvirakkude surma. Samuti on SFV võimeline nakatama oligodendrotsüüte, kuid mitte astrotsüüte (Fazakerly, 2002).

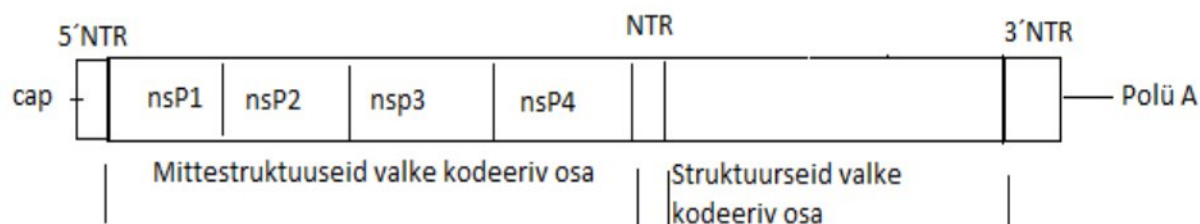
SFV on enim uuritud alfaviirus. Seda on kasutatud palju RNA viiruste molekulaarbioloogia uurimismudelina. Samuti on välja arendatud SFV-l põhinev vektorsüsteem, mis leiab laialt kasutust geeniteraapias, kuna see võimaldab kõrgetasemelist kloonitud transgeenide ekspressiooni transfekteeritud rakkudes. (Atkins jt., 1999) SFV-l põhinevad vektorsüsteemid on leidnud kasutust ka vaksineerimisel ja rekombinantsete valkude tootmisel. Kuna SFV-l põhinev vektorsüsteem on võimeline ekspresseerima võõrgeene neuronites, siis on võimalik seda kasutada kesknärvisüsteemi haiguste raviks, näiteks Parkinsoni tõve raviks. Geeniteraapias kasutatakse ka SFV paljunemisevõimetus VLP-sid (viirus laadsed partiklid) (Graham jt., 2005).

SFV-d on võimalik kasutada ka vähi vastases ravis. See põhineb SFV võimel replitseeruda pahaloomulistes kasvajarakkudes ja lõpuks hävitada need. Seda on uuritud hiirtel luuvähi vastases ravis (Ketola jt., 2008).

1.4 Alfaviiruste genoom

Alfaviiruste perekonna esindajate genoom on positiivse polaarsusega üheaheelaline RNA, mille pikkus CHIKV puhul on umbes 12 000 nukleotiidijääki ja SFV puhul 11 442 nukleotiidijääki. Genoomi 5' otsas on 7-metüülguanosiinist *cap* struktuur ja 3' otsas polü(A) saba (Khan jt., 2002; Strauss ja Strauss, 1994). Genoomne RNA on jaotunud kaheks peamiseks regiooniks: 5' otsa kaks kolmandikku, mis kodeerib mittestruktuurseid valke ja 3' otsa üks kolmandik, mis kodeerib struktuurseid valke (Joonis 1). Mittestruktuursed valgud transleeritakse genoomselt RNA-lt ühe polüproteiinina (P1234), millest moodustuvad proteolüütilise lõikamise tulemusel individuaalsed mittestruktuursed valgud (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4). Enamik alfaviiruseid sisaldab nsP3 valgu C-terminaalses regioonis stoppkoodonit, mille tõttu tekib kaks polüproteiini (P123 ja P1234). CHIKV-l ja SFV-l on aga selle asemel kodeeriv koodon, mistõttu transleeritakse üks polüproteiin (P1234). Struktuurseid valke kodeerivalt genoomi osalt sünteesitakse esmalt subgenoomne 26S mRNA, millel on samuti 5' otsas *cap* struktuur ja 3' otsas polü(A) saba. Seejärel transleeritakse subgenoomselt mRNA-lt polüproteiin, millest moodustuvad struktuursed valgud (kapsiidivalk C, glükoproteiinid E1 ja E2, polüpeptiidid E3 ja 6K). Genoomi 5' ja 3' otsas ning mittestruktuurseid valke ja struktuurseid valke kodeerivate lugemisraamide vahel asuvad mittetransleeritavad regioonid (NTR) (Joonis 1), mis sisaldavad olulisi signaale RNA replikatsiooni jaoks (Strauss ja Strauss, 1994). Alfaviiruste 5' NTR on umbes 60 nukleotiidijääki pikk ja 3' NTR on 300-550 nukleotiidijääki pikk. Alfaviiruste genoom

sisaldab nelja konserveerunud elementi, millel on oluline funktsioon alfaviiruste replikatsioonis. Need on 51 nukleotiidijääki pikk võimendav ehk enhaanser element nsP1 kodeerivas järjestuses, 24 nukleotiidijääki pikk subgenoomse mRNA transkriptsiooni promooter, 19 nukleotiidijääki pikk element RNA 3' otsas, mis funktsioneerib negatiivse ahela RNA sünteesi initsiatsiooni promooterina ja 5' otsas olev konserveerunud element (Rupp jt., 2015; Strauss ja Strauss, 1994).

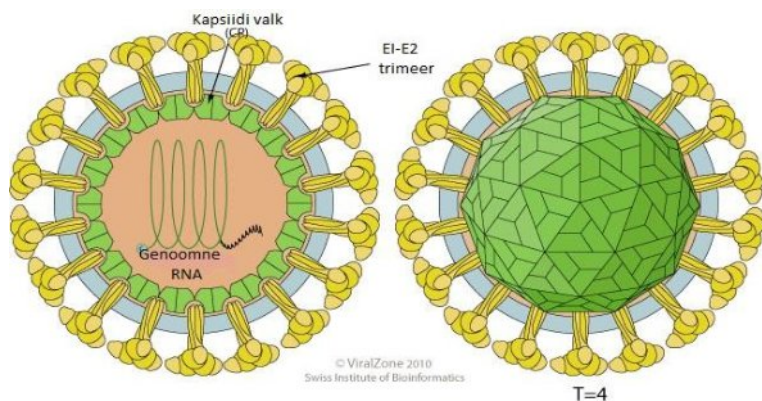


Joonis 1. SFV genoom. Joonisel on kujutatud positiivse polaarsusega üheaahelaline genoomne RNA, mille 5' otsas on *cap* struktuur ja 3' otsas polü(A) saba. 5' otsas on kaks kolmandikku mittestruktuurseid valke kodeeriv osa ja 3' otsas on üks kolmandik struktuurseid valke kodeeriv osa. 5' ja 3' otsas ning lugemisraamide vahel on mittetransleeritavad regioonid (NTR).

1.5 Alfaviiruste virion

Virion koosneb nukleokapsiidist ja seda ümbritsevast lipiidsest kaksikkihist. Alfaviiruste virionid on sfäärilised ja umbes 70 nm diameetriga. Alfaviiruste kapsiid ja glükoproteiinsed piigid moodustavad ikosaeedrilise struktuuri T=4 sümmeetriaga. Nukleokapsiid koosneb üheaahelalisest positiivse polaarsusega RNA genoomist, mis on kompleksis ~30 kDa suuruse kapsiidi valgu 240 koopiaga. Nukleokapsiid on ümbritsetud lipiidse kaksikkihiga, mis pärineb peremeesraku plasmamembraanist (Strauss ja Strauss, 1994). Ümbris sisaldab 240 koopiat viiruse poolt kodeeritud glükoproteiine (E1 ja E2), mis moodustavad kaksikihti läbiva heterodimeeri. E2 moodustub esialgselt eellas-molekulina PE2. E1 ja PE2 moodustavad heterodimeeri kohe pärast sünteesi ja läbivad lipiidset kaksikkihi nagu tüüp I integraalsed membraanvalgud. Virioni moodustumisel PE2 valgu C-terminaalne, tsütoplasmaatiline osa interakteerub nukleokapsiidi valguga. Glükoproteiini 240 koopiat interakteeruvad omavahel ja kapsiidivalgudega. Kapsiidivalgude ja glükoproteiinide sama arv (240) tagab nende vaheliste interaktsioonide üks ühele vastavuse. Glükoproteiini ja kapsiidivalgu interaktsioonide tulemusel moodustub partikli pinnale ikosaeedriline võre ja glükoproteiinid koordineeritakse.

Hiljem PE2 lõigatakse rakulise proteaasi poolt E2-ks ja E3-ks. Erinevalt CHIKV-st jääb SFV Puhul E3. E1 ja E2 jäävad seotuks heterodimeerina ning kinnituvad trimeeridena virioni pinnale moodustades piigi (Strauss ja Strauss, 2008; Staruss ja Strauss, 1994). Virion sisaldab 80 piiki, mis ulatuvad viiruslikust membraanist väljapoole (Joonis 2) (Cheng jt., 1995).



Joonis 2. Alfaviiruse virion. Joonisel on kujutatud nukleokapsiid, mis koosneb genoomsest RNA-st ja sellega seotud kapsiidivalgu koopiatest. Nukleokapsiidi ümbritseb liipidne kaksikkiht ehk ümbriis, mida läbistavad E1-E2 trimeerid, mis moodustavad oga taolisi struktuure (piike). (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/625.html, muudetud)

1.6 Infektsioonitsükkel

1.6.1 Sisenemine rakku

Infektsioon algab viiruse kinnitumisega peremeesraku retseptorile glükoproteiin E2 vahendusel. CHIKV retseptoriteks imetajarakkudes arvatakse olevat fosfatidülseriin ja glükoosaminoglükaan ning sääse rakkudes ATP süntaasi β subühik. Samuti ka hepariinsulfaat võib käituda alfaviiruste retseptorina. CHIKV infektsioon saab toimuda ka nende valkude puudumisel, kasutades alternatiivseid retseptoreid. SFV retseptoritest on teada vähe. Alfaviirused sisenevad rakku enamasti retseptor vahendatud klatriin sõltuva endotsütoosi teel. Moodustuvad viirust sisaldavad klatriiniga kaetud vesiikulid, mis transporditakse rakku. On näidatud, et klatriiniga kaetud vesiikulite moodustumiseks on vajalik dünaamiin valgu olemasolu. Seejärel klatriini molekulid dissotsieeruvad ja viirus toimetatakse endosoomidesse. Endosoomide pH langus vallandab konformatsioonilised muutused E1-E2 heterodimeeris, mis põhjustab viirusliku membraani liitumise e. fuseerumise peremeesraku endosomaalse membraaniga. Fuseerumisprotsessi võib jagada erinevateks etappideks: E2-E1 heterodimeeri destabilisatsiooniks, E1 trimerisatsiooniks, E1 integratsiooniks sihtmärk membraaniga ja fuseerumise toimumiseks. E2-E1 heterodimeeri destabilisatsiooni vallandab pH langus endosoomides, mille tulemusel E1-E2 heterodimeerid lagunevad. Olulist rolli

mängivad siin konserveerunud histidiini jäägid ümbrise glükoproteiinides, mis kontrollivad pH-st sõltuvaid konformatsioonilisi muutusi. E1-E2 heterodimeeri lagunemise tulemusel vabanenud E1 trimeriseerub. E1 trimeerid on aktiivsed liitumis valgud, mis põhjustavad viiruse ümbrise ja endosoomi membraani liitumise, seostudes sihtmärk membraaniga. Pärast membraanide liitumist nukleokapsiid vabaneb tsütosooli. Membraanide liitumiseks on vajalik ka kolesterool, millel võib olla oluline roll E1 hüdrofoobsel interaktsioonil sihtmärk membraaniga. Kolesterooli roll membraani liitumisel erineb alfaviiruste hulgas (Duijl-Richter jt., 2015; Leung jt., 2011). Kapsiidivalgul on afiinsus ribosoomide suhtes. Ribosoomid aitavad nukleokapsiidi lahti pakkida peale selle vabanemist tsütoplasmasse. Genoomse RNA vabanemisele järgneb selle translatsioon (Strauss ja Strauss, 2008).

1.6.2 Translatsioon

Vabanenud genoomselt RNA-lt, millel on 5' otsas *cap* struktuur ja 3' ots on polüadenüleeritud, transleeritakse mittestruktuurne polüproteiin (P1234) ehk mittestruktuursete valkude eellane. Viiruslik proteaas (nsP2) lõikab kotranslatsiooniliselt polüproteiini neljaks mittestruktuurseks valguks (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4). Need mittestruktuursed valgud koos mittestruktuurse polüproteiini lõikamise vaheproduktidega moodustavad replikatsioonikompleksi ja osalevad RNA replikatsioonil (Joonis 3). Mittestruktuursed valgud sisaldavad endas *cap* struktuuri sünteesimise aktiivsust (nsP1), helikaasi, proteaasi ja RNA trifosfataasi aktiivsust (nsP2) ning RNA polümeraasset aktiivsust (nsP4). *Cap* struktuuri sünteesimise aktiivsus on vajalik *cap* struktuuri lisamiseks viiruslikele RNA-dele. Trifosfataasne aktiivsus nsP2-s on vajalik terminaalse fosfaadi eemaldamiseks RNA 5' trifosfaadilt, et valmistada RNA-d ette *cap* struktuuri lisamiseks. Helikaasset aktiivsust on vaja RNA lahtiharutamiseks replikatsiooni käigus ning proteaasset aktiivsust on vaja prekursor polüproteiini protsessinguks. RNA polümeraasne aktiivsus on vajalik viirusliku RNA sünteesimiseks. NsP3 funktsioon RNA replikatsioonis on teadmata (Strauss ja Strauss, 2008; Kääriäinen ja Ahola, 2002). Alfaviirustel transleeritakse ka struktuurne polüproteiin, mis sünteesitakse subgenoomselt RNA-lt (Joonis 3) (Vasiljeva jt., 2001).

1.6.3 Replikatsioon ja transkriptsioon

Replikatsioon toimub nakatunud raku tsütoplasmas, membraaniga seotult. Viirus-spetsiifiline RNA-st sõltuv RNA polümeraasne (RdRp) aktiivsus vastutab kolme tüüpi RNA sünteesi eest.

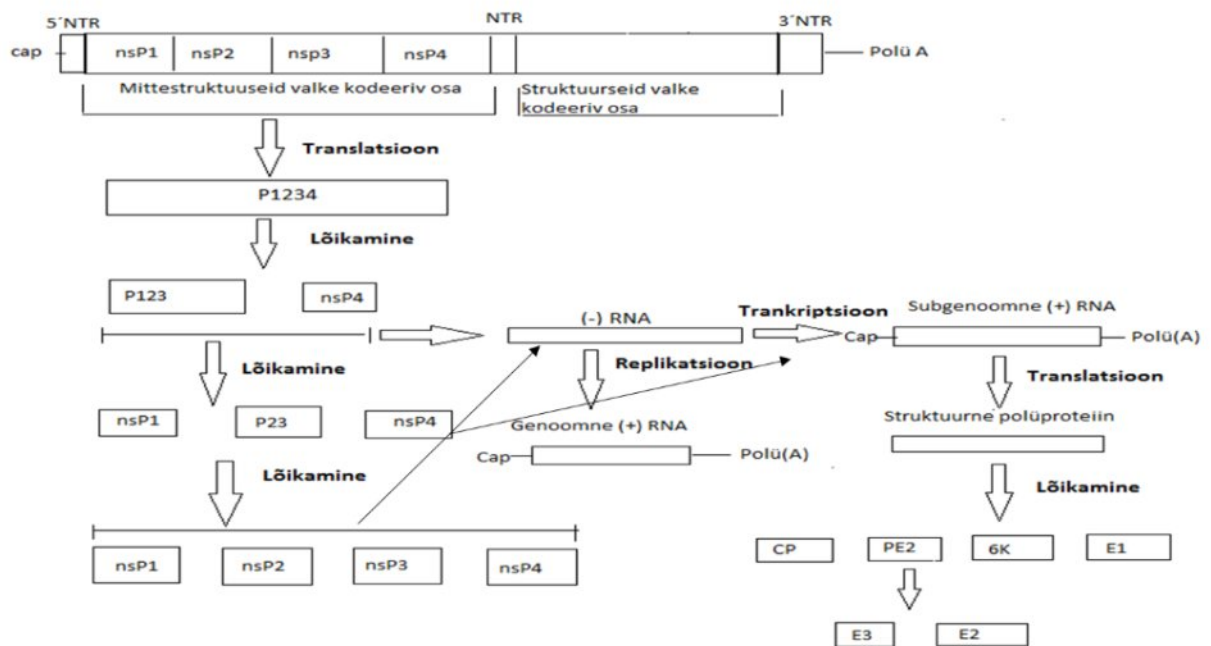
Need on positiivse polaarsusega 49S (CHIKV)/42S (SFV) genoomne RNA ja subgenoomne 26S mRNA ning negatiivse polaarsusega 49S (CHIKV)/42S (SFV) RNA, mis on matriitsiks mõlema nii genoomse RNA kui ka subgenoomse mRNA sünteesil. (Barton jt., 1990) Negatiivne RNA ahel eksisteerib dsRNA kujul dupleksis genoomse RNA-ga, mitte üheaahelalisena (Sawicki ja Sawicki, 1980).

Translatsiooniga samaaegselt või kohehelt peale translatsiooni toimub mittestruktuurse polüproteiini (P1234) esimene lõikamine, mille tulemusel tekivad P123 ja nsP4. NsP4 ja P123 koos rakuliste valkudega sünteesivad genoomselt RNA-lt komplementaarse negatiivse ahelaga RNA (varajane replikaas), kuid ei suuda sünteesida positiivse ahelaga RNA-d. Järgnevalt nsP2 valgu hulga suurenedes lõigatakse P123 *in trans* nsP1 ja nsP2 valgu vahelt. Selle tulemusel moodustub replikaas, mis saab sünteesida nii positiivse kui ka negatiivse ahelaga RNA-sid. NsP2 ja nsP3 vahelise lõikamise tulemusel on moodustunud kõik mittestruktuurset valgud ja valminud hiline replikaas on võimeline sünteesima vaid positiivse ahelaga RNA-d (Joonis 3). Järelikult varajases infektsiooni käigus sünteesitakse ainult negatiivse ahelaga matriits RNA-d ning hilises infektsioonis, kui proteaasi (nsP2) hulk suureneb, tekib *trans* lõikamine ja (-) RNA süntees surutakse alla. RNA negatiivse ahela sünteesi lõppemisel väheneb mittestruktuursete valkude translatsioon ja suureneb struktuursete valkude translatsioon. Seega (-) RNA süntees on translatsioonist sõltuv. Pärast negatiivse ahela sünteesi lõppemist jätkub (+) RNA süntees (-) RNA matriitsilt ja mittestruktuurset polüproteiini kodeerivat RNA-d juurde ei sünteesita enam. (+) RNA süntees (-) RNA matriitsil toimub infektsiooni lõpuni (Strauss ja Strauss, 2008; Sawicki ja Sawicki., 1980).

Negatiivse RNA matriitsilt sünteesitakse genoomne RNA ja subgenoomne mRNA, mis mõlemad on *cap* struktuuriga ja polüadenüleeritud (Joonis 3). Subgenoomse mRNA sünteesimiseks kasutatakse 24 nukleotiidset sisemist promooterit, mille aktiivsust suurendavad *enhancer* järjestused 100 nukleotiidijääki üleval pool promooterist. Subgenoomselt mRNA-lt transleeritakse polüproteiin, mis lõigatakse struktuurseteks valkudeks (kapsiidivalk C, glükoproteiinid E1 ja E2, polüpeptiidid E3 ja 6K) viiruslike ja rakuliste ensüümide poolt (Staruss ja Strauss, 2008). Seriinproteasest aktiivsust omav kapsiidivalk C lõikab end autokatalüütiliselt polüproteiini ahelast lahti vabastades selle tulemusel N-terminaalse signaaljärjestuse, mis osaleb polüproteiini ahela translokatsioonil endoplasmaatilise retiikulumi (ER) membraanile. Järgnevalt proteasessitakse polüproteiini rakuliste signaalpeptidaaside poolt, mille tulemusel vabanevad PE2, 6K ja E1. 6K valgu C-terminuses asuv hüdrofoobne peptiid vastutab E1 valgu translokatsiooni eest ER-membraanile

(Liljeström ja Garoff, 1991; Melancon ja Garoff, 1987). PE2 ja E1, mis on translokeeritud ER-le glükosüleeritakse seal ja moodustavad stabiilse heterodimeeri. See transporditakse Golgi kompleksi, kus PE2 lõigatakse E3-ks ja E2-ks (Lu ja Kielian, 2000). Glükoproteiinid (E1, E2 ja E3) transporditakse läbi Golgi kompleksi plasmamembraanile. Sünteesitud genoomne RNA koos kapsiidivalguga pakitakse virionidesse (Strauss ja Strauss, 2008; Gould jt., 2009).

Alfaviiruste replikatsioon leiab aset seotuna rakuliste modifitseeritud membraanidega. Tegemist on viiruslike valkude poolt indutseeritud sfääriliste membraani sissesopistustega. Neid nimetatakse sfääruliteks ja nad sisaldavad replikatsiooni intermediaate, mis koos mittestruktuursete (ns) valkudega moodustavad replikatsioonikompleksi. Lisaks ns valkudele arvatakse, et ka rakulised valgud on seotud sfäärulitega. Ns valkudest ainult nsP1 on võimeline seonduma membraanidega. Selle afiinsus membraani suhtes on määratud amfipaatilise alfa-heeliksi poolt. Sfäärulite diameeter on umbes 50 nm ja need on ühendatud tsütoplasma poori kaudu. Sfäärulite moodustumine algab plasmamembraanil ja hiljem nad sisenevad endotsütootilise protsessi teel raku tsütoplasmasse. Hilises infektsioonis on sfääruleid leitud tsütoplasmaatiliste vakuoolide membraanide, mida nimetatakse viiruse indutseeritud tüüp I tsütopaatilisteks vakuoolideks (CPV I), pinnal (Staruss ja Strauss, 2008; Spuul jt., 2010). Nendes vakuoolides arvatakse toimuvat RNA süntees, valkude süntees ja nukleokapsiidide pakkimine (Froshauer jt., 1988). CPV-d on viiruslike valkude poolt modifitseeritud lüsoosomid ja endosoomid. CPV-d ilmuvad varase infektsiooni jooksul ja teevad läbi ajast sõltuva küpsemisprotsessi alustades arvukatest väikestest perifeersetest endosoomidest (Kuljala jt., 2001; Peränen jt., 1995). CPV-de moodustumine toimub viiruse partiklitest sõltumatult infektsioonilise RNA-ga nakatunud rakkudes (Peränen ja Kääriäinen, 1991).



Joonis 3. Tranlatsioon, polüproteiini protsessing, replikatsioon ja trankriptsioon. Joonisel on kujutatud skemaatiliselt SFV ja CHIKV replikatsioonitsükkel. Peale viiruse sisenemist raku transleeritakse genoomselt RNA-lt mittestruktuurne polüproteiin (P1234), millest moodustuvad esimese lõikamise tulemusel P123 ja nsP4. Need moodustavad varajase replikaasi, mis sünteesib negatiivse ahelaga RNA-d. Järgnevate lõikamiste tulemusel moodustuvad kõik ülejäänud mittestruktuursed valgud (nsP1-nsP4), mis osalevad positiivse ahelaga RNA sünteesil negatiivse ahelaga RNA matriitsil. Negatiivselt ahelalt sünteesitakse genoomne RNA ja transkribeeritakse subgenoomne mRNA. Subgenoomselt mRNA-lt transleeritakse struktuurne polüproteiin, millelt moodustuvad struktuursed valgud (CP, E1, E2, E3, 6K).

1.6.4 Viiruse pakkimine ja väljumine rakust

Esmalt toimub kapsiidi moodustumine genoomse RNA ümber. Alfaviirustel pakitakse kapsiidi ainult genoomne RNA, sest pakkimissignaali on ainult genoomses RNA-s. Pakkimine initsieeritakse kapsiidivalgu seondumisega genoomses RNA-s oleva pakkimissignaali. Lisa kapsiidivalgud kaasatakse jätkamaks genoomse RNA pakkimist nukleokapsiidi. Olulised on elektrostaatiliselt interaktsioonid kapsiidivalgu positiivselt laetud N-terminaalse domeeni ja negatiivselt laetud viirusliku RNA vahel. Valmis nukleokapsiid transporditakse raku plasmaembraanile, kus see seotakse viiruslike glükoproteiinide kaudu raku plasmamembraaniga. Nukleokapsiid seondub spetsiifiliselt glükoproteiinide C-terminaalse domeeniga, nendest oluliseim on interaktsioon E2 glükoproteiiniga. See seondumine annab

vaba energia kapsiidi pungumiseks läbi plasmamembraani. Samuti ka glükoproteiinide lateraalsed interaktsioonid on olulised siinkohal (Strauss ja Strauss, 1994; Linger jt., 2004). Virionite küpsemine toimub enamasti nukleokapsiidide plasmamembraanist pungumise käigus, kus nad omandavad lipoproteiinse ümbrise (Strauss ja Strauss, 2008).

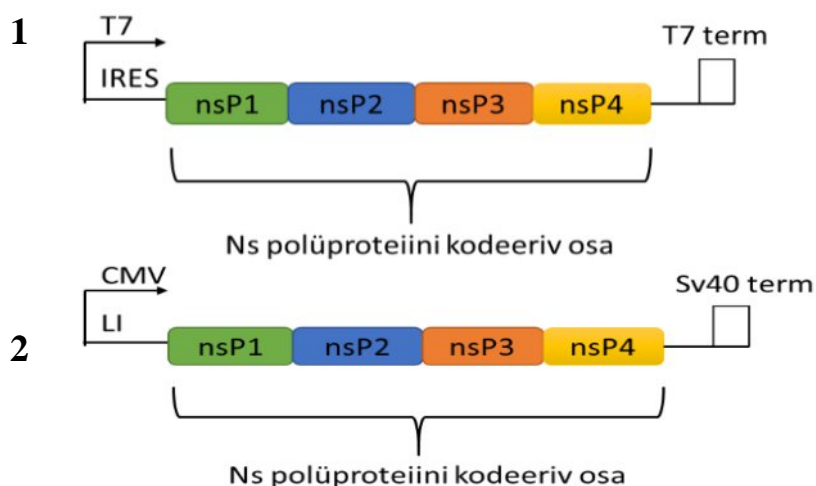
1.7 *Trans*-replikatsiooni süsteem

Trans-replikaasi süsteem on suhteliselt uudne ja väga efektiivne tööriist alfaviiruste RNA replikatsiooni erinevate aspektide uurimiseks. Süsteem on tundlik ja lihtne kasutada. *Trans*-replikaasi süsteemi saab kasutada näiteks tõsiselt kahjustavate mutatsioonide replikaasi aktiivsuse funktsionaalseks analüüsiks. Süsteemi abil saab eristada letaalseid mutatsioone nendest, millel on tugev negatiivne mõju replikaasi aktiivsusele, mida tavapäraste uurimustega ei ole võimalik. Sfäärulite biogeneesi uuringutes on kasutatud *trans*-replikaasi süsteemi, mille käigus on avastatud, et sfäärulite suurus on määratud replitseeruva RNA pikkusega. Lisaks on *trans*-replikaasi süsteem potentsiaalne kasutamiseks antiviraalsete strateegiade arendamises. *Trans*-replikaasi süsteem on ka sobilik kasutamiseks replikaasi mõjutavate inhibiitorite avastamises ja analüüsis (Utt jt., 2016).

Viiruse replikatsioonitsükli toimub mittestruktuursete (ns) valkude ekspressioon seotuna RNA replikatsiooniga. *Trans*-replikaasi süsteemis aga on ns valkude ekspressioon eraldatud RNA replikatsioonist. See süsteem põhineb matriits-järjestust ja mittestruktuurset (ns) polüproteiini kodeerivate plasmiidsete DNA-de transfektsioonil imetajarakkudes. Ns polüproteiini kodeerivalt plasmiidset DNA-lt ekspresseerub replikaasi polüproteiin, millest moodustuvad replikaasi valgud, mis on võimelised efektiivselt replitseerima matriits-RNA-d ja sünteesima subgenoomset RNA-d suurtes kogustes. See põhjustab matriits-RNA-lt ekspresseeruvate markervalkude kogunemise. Markeritena kasutatakse kergesti detekteeritavaid ja kvantifitseeritavaid valke – näiteks *Gaussia* ja *Firely* lutsiferaase. Lutsiferaas põhjustab substraadi olemasolul bioluminestsentsi, mida on võimalik detekteerida. Replikatsiooni ja transkriptsiooni efektiivsust mõõdetakse lutsiferaasi aktiivsuse kaudu.

Imetajarakkudesse transfekteeeritakse ns polüproteiini ja matriits-RNA-d kodeerivad plasmiidid. Esmalt toimub mittestruktuurse polüproteiini ekspressioon. Ns polüproteiini ekspresseerimiseks kasutatakse nii bakteriofaag T7 RNA polümeraasi kui ka rakulist RNA polümeraasi II. Bakteriofaag T7 polümeraasi ekspresseeritakse stabiilselt BSR rakkudes ning rakuline polümeraas II on olemas U2OS rakkudes. Seega on vajalik vastavate promooter-järjestuste olemasolu ns polüproteiini kodeerivas plasmiidises DNA-s. T7 RNA polümeraas

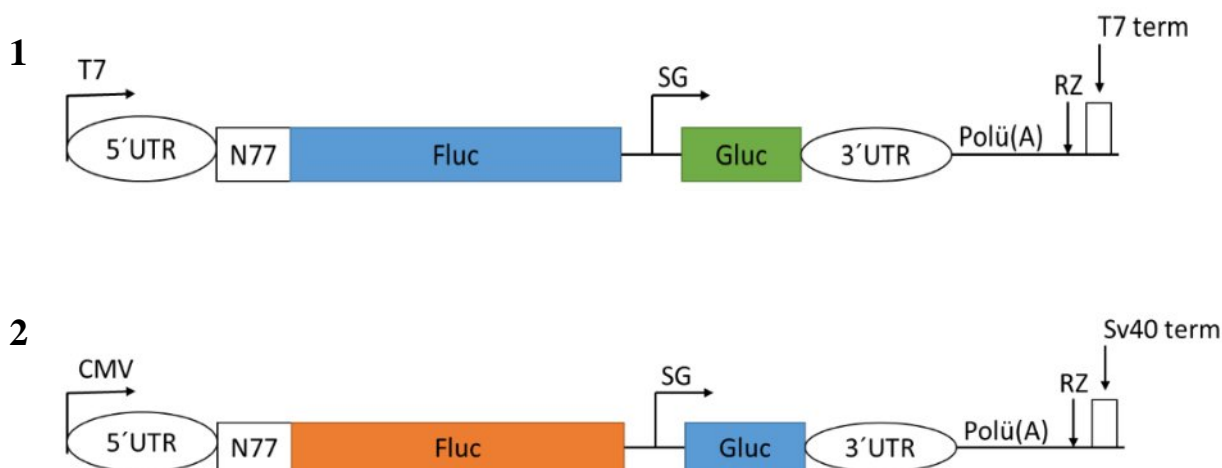
kasutab T7 promooterit ja RNA polümeraas II kasutab CMV (*cytomegalovirus*) vahetut varajast promooterit. Saavutamaks ns polüproteiini efektiivset ekspressiooni T7 promooteriga transkriptidelt, millel puudub *cap* struktuur asetatakse ns polüproteiini kodeeriv järjestus entsefalomüokardiidi viiruse (EMCV) IRES (*internal ribosomal entry site*) elemendi kontrolli alla. CMV promooteriga konstruktid on promooteri järgi asetatud HSV (*Herpes Simplex Virus*) tümidiinkinaasi liider-järjestus, mis stabiliseerib mRNA-d ning toimib translatsioonilise võimendajana ehk enhaanserina ns polüproteiini sünteesil ning sünteetiline intron (Joonis 4).



Joonis 4. Mittestruktuurset (ns) polüproteiini kodeerivad konstruktid. 1. T7 promooteriga ns polüproteiini kodeeriv konstrukti, mis vajab ekspresseerumiseks T7 polümeraasi. Ns polüproteiini kodeeriv järjestus on viidud entsefalomüokardiidi viiruse (EMCV) IRES elemendi kontrolli alla. Lisatud on ka terminaator järjestus T7 polümeraasi jaoks. **2.** CMV promooteriga ns polüproteiini kodeeriv konstrukti, mis kasutab ekspresseerumiseks rakulist polümeraasi II. LI - HSV (Herpes Simplex virus) tümidiinkinaasi liider järjestuse ja sünteetiline intron. SV40 term - SV40 (Simian virus 40) polüadenülatsiooni signaal.

Trans-replikaasi süsteemis kasutatakse matriits-RNA-d, mis ekspresseerub vastavalt konstrueeritud plasmiidilt, mis sisaldab kas T7 või CMV promooterit. Matriits-RNA-d kodeeriv plasmiid sisaldab kolme alfaviiruste genoomist pärinevat elementi, mis on vajalikud alfaviiruste replikatsiooniks. Need elemendid on täispikkuses 5' UTR, subgenoomse RNA promooter-järjestus ja 3' UTR'i 3' ots. Need elemendid on üksteisest eraldatud lühikeste polülinkeritega, kuhu on võimalik sisestada soovitud markereid kodeerivaid järjestusi. 5' UTR-le järgneb nsP1 77 N-terminaalset aminohapet kodeeriv regioon (N77), milles asub 51 nukleotiidijäägi pikkune alfaviiruste genoomi konserveerunud element. N77 elemendile järgneb *Fluc* (*Firefly luciferase*) ja *Gluc* (*Gaussia luciferase*) kodeerivad järjestused. 3' UTR-

le järgneb polü(A) saba, ribosüümi ja terminaator-järjestus. *Gluc* geeni järjestust kodeeritakse matriits-RNA teise lugemisraami poolt ja see on asetatud alfaviiruse subgenoomse promooteri kontrolli alla. Seega on *Gluc* ekspresiooniks vaja subgenoomse RNA sünteesi. *Fluc* järjestust kodeeritakse matriits-RNA esimese lugemisraami poolt, kus asub nsP1 N-terminaalset aminosahapeteid kodeeriv regioon (Joonis 5). Seega ekspresseeritakse seda ka aktiivse replikatsiooni puudumisel. *Fluc* ekspresseeritakse matriits-RNA-lt otse raku tsütoplasmas, kasutades T7 polümeraasi või tuumas CMV promooteri pealt, kasutades selleks rakulist RNA polümeraasi. Ns polüproteiinilt moodustuvad replikaasi valgud replitseerivad matriits-RNA, mille tulemusel ekspresseeritakse matriits-RNA-s sisalduvad *Gluc* ja *Fluc* geenid, mille produkte detekteeritakse. *Fluc* ja *Gluc* geenidelt toodetud lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine võimaldab hinnata replikatsiooni ja transkriptsiooni ehk subgenoomse RNA moodustumise taset. *Gluc* aktiivsus võimaldab hinnata RNA transkriptsiooni efektiivsust, kuna *Gluc* i ekspressioon toimub läbi subgenoomse RNA sünteesi. *Fluc* aktiivsus võimaldab hinnata matriits-RNA replitseerumise efektiivsust (Utt jt., 2016; Spuul jt., 2011).



Joonis 5. Matriits-RNA-sid ekspresseerivad konstruktid. 1. T7 promooteril põhinev matriits-järjestus, mis ekspresseerub BSR rakkudes, kasutades selleks bakteriofaag T7 polümeraasi. 2. CMV promooteril põhinev matriits-järjestus, mis ekspresseerub U2OS rakkudes, kasutades selleks rakulist RNA polümeraasi II. Matriits-RNA-d kodeerivad konstruktid sisaldavad alfaviiruste genoomist pärinevaid elemente, mis on olulised alfaviiruste replikatsioonitsükliks. Need on 5' UTR, nsP1 valgu 77 N-terminaalset aminosahapeteid kodeeriv regioon, subgenoomne (SG) promooter ja 3' UTR. Mõlemad konstruktid sisaldavad *Fluc* kodeerivat järjestust genoomse promooteri kontrolli all esimeses lugemisraamis ja *Gluc* kodeerivat järjestust subgenoomse promooteri kontrolli all teises lugemisraamis. Lisaks on olemas ka terminaator-järjestused (T7 term ja Sv40 term) ja 3' otsas polü(A) saba ning HDV (Hepatitis Delta virus) ribosüümi järjestus.

Trans-replikaasi katsetes kasutatakse alati negatiivse kontrollina polümeraasi aktiivsuse suhtes negatiivset polüproteiini (GAA) ekspresseerivat konstrukti, kus nsP4 valgu aktiivsaidis on kaks aspartaadijääki asendatudalaniinjääkidega. GAA replikaas pole võimeline replitseerima matriits-RNA-d, kuid GAA mutatsioonil puudub negatiivne efekt ns valkude ekspressioonile (Spuul, 2011; Utt jt., 2016). *Trans*-replikaasi katsed näitavad, et mutantset polümeraasi (GAA) ja matriits-RNA-d ekspresseerivate plasmiidide transfektsioonil imetajarakkudesse puudub *Gluc* aktiivsus. See näitab, et *Gluc* aktiivsus on sõltuv RNA replikatsioonist, mitte polüproteiini ekspressiooni teistest efektidest (Spuul jt., 2011).

Kuna *trans*-replikaasi süsteemides kasutatakse ns polüproteiini ja matriits-RNA ekspresseerimiseks nii T7 RNA polümeraasi ja sellele vastavat T7 promooterit kui ka rakulist RNA polümeraasi II ja CMV promooterit, siis võib jagada *trans*-replikaasi süsteemid CMV ja T7 promooteritel põhinevateks süsteemideks. *Trans*-replikaasi süsteemi katsed CHIKV puhul on näidanud, et *Fluc* aktiivsus on kõrgel tasemel nii CMV kui ka T7 promooteril põhinevas süsteemis ning *Gluc* aktiivsus korreleerub subgenoomse RNA tasemega. *Fluc* aktiivsus on suurem T7 promooteril põhinevas süsteemis. On näidatud ka, et ns valkude ekspressiooni tase on T7 promooteril põhinevas süsteemis kõrgem kui CMV promooteril põhinevas süsteemis. Replikaasi valkude tootmine oleneb ka rakutüübist, millesse toimub transfektsioon. On näidatud, et CMV promooteril põhinev süsteem on kõige efektiivsem U2OS rakkuliinis. Samas, BSR rakkudes on ns valkude ekspressiooni tase kõrgem kui U2OS rakkudes. Seega tuleks valkude ekspressiooni uurimisel, näiteks erinevate mutatsioonide efektide võrdlemisel, võtta neid üksikasju arvesse (Utt jt., 2016).

Trans-replikaasi süsteem on seni kirjeldatud väheste andmete alusel osutunud väga efektiivseks vahendiks ns valkude, replikaasi komplekside ja viiruse-peremehe interaktsioonide uurimises ning on kasulik inhibiitorite omaduste, mis mõjutavad replikatsiooni, analüüsimisel (Utt jt., 2016).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Alfaviiruste mittestruktuursete valkude, eelkõige nsP2 funktsioone on üsna palju uuritud punkt-mutageneesi abil. Selle abil tekitatud mutatsioonid analüüsitakse erinevate meetoditega, mis on suhteliselt töömahukad ja ei võimalda alati uurida kahjuliku mõjuga mutatsioone. Käesolevas töös uuritakse CHIKV ja SFV nsP2 proteaasi aktiivtsentris asuvate punktmutatsioonide mõju, kasutades selleks *trans*-replikaasi süsteemi. Lisaks on antud töös uuritud ka alfaviiruste replikaasi valkude funktsionaalsete domeenide vahetamise (*swappingu*) ja sellest tulenevate kompensatoorsete mutatsioonide mõju kasutades selleks samuti *trans*-replikaasi süsteemi.

Täpsemalt sooviti käesoleva töö raames uurida järgmist:

- 1) Alfaviiruste replikaasi valkude funktsionaalsete domeenide vahetamise (*swappingu*) mõju ja viiruste adapteerumise käigus tekkinud kompensatoorsete mutatsioonide mõju replikaasi efektiivsusele.
- 2) CHIKV nsP2 proteaasi aktiivtsentris asuvate punktmutatsioonide mõju mittestruktuursete valkude tootmisele, replikatsioonile ja transkriptsioonile.
- 3) SFV nsP2 proteaasi aktiivtsentris olevate punktmutatsioonide mõju replikatsioonile ja transkriptsioonile.
- 4) Hinnata *trans*-replikaasi süsteemi efektiivsust *swap*- ja punktmutatsioonide uurimisel.

Püstitatud eesmärkide saavutamiseks kasutati alfaviiruste *trans*-replikaasi süsteemi ning lähtuvalt töö tulemustest sooviti hinnata süsteemi efektiivsust viroloogia-alastes uurimustes.

2.2 Materjalid ja meetodika

Bakteritüved

Antud töös kasutati plasmiidide paljundamiseks *E. coli* tüve XL10 kompetentseid rakke. Bakterirakke kasvatati SOY (*Tryptic soy broth*) ja LB (*Lysogeny broth*) söötmes 37°C juures. Söötmetele lisati antibiootikumina kanamütsiini lõppkontsentratsioon 25 µg/ml.

Rakuliinid ja söötmed

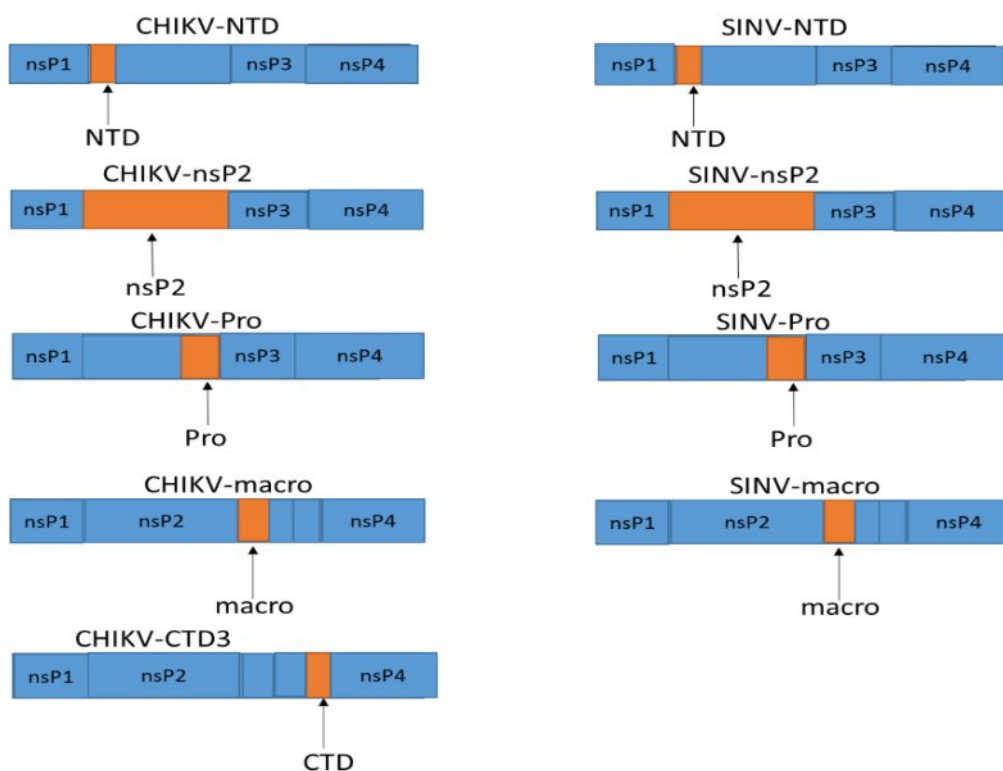
Plasmiidide transfektsiooniks kasutati U2OS ja BSR rakuliini. U2OS rakuliin on inimese luust pärinevad osteosarkoomi (pahaloomuline luukasvaja) rakud. U2OS rakke kasvatati IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco*) söötmes, kuhu lisati 10% FCS-i (*Fetal Calf Serum, PAA*) ning 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini (*Sigma*). BSR rakuliin on modifitseeritud BHK (*baby hamster kidney*) rakuliin, mis stabiilselt ekspresseerib bakteriofaag T7 RNA polümeraasi. BSR rakke kasvatati GMEM (*Glasgow Minimal Essential Medium, Gibco*) söötmes, millele lisati 2% TPB (*Tryptose Phosphate Broth*), 10 mM HEPES pH 7.4, 10% FCS ja G418 antibiootikumi (*Genetecin*) 1 mg/ml lõppkontsentratsioon. Rakke kasvatati 37°C ja 5% CO₂ tingimustes.

Töös kasutatud konstruktid

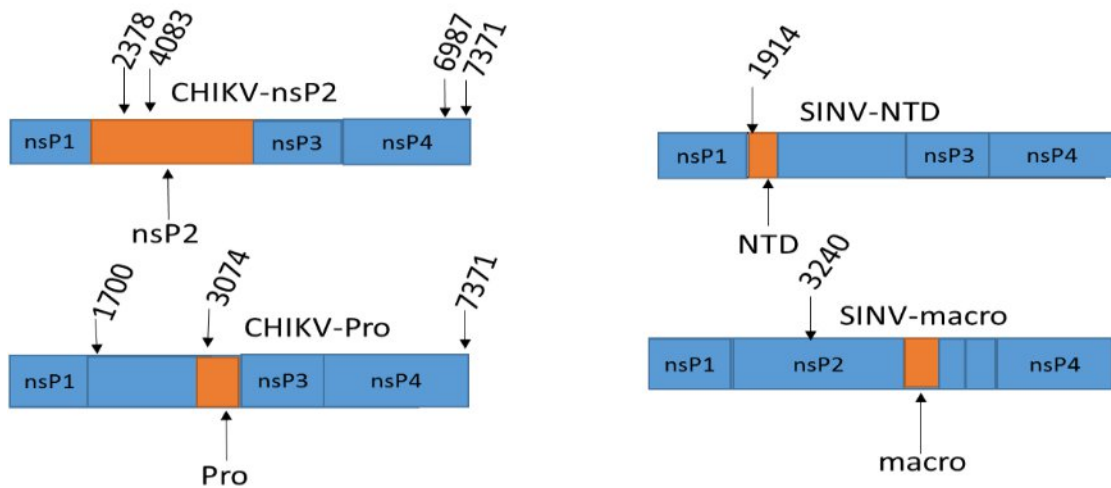
Swap-mutatsioonidega konstruktid, CHIKV ja SFV punktmutatsioonidega konstruktid

Töös on kasutatud *swap*-mutantsete viiruste genoomide põhjal valmistatud konstrukte, kus SFV genoomis on vahetatud replikaasi ehk mittestruktuursete valkude domeene kodeerivad järjestused kas CHIKV või SINV homoloogset domeeni kodeeriva järjestuse vastu. Edaspidi nimetatakse neid *swap*-mutatsioonidega konstruktideks. *Swap*-mutatsioonidega replikaaside ekspresseerimiseks kasutati pMC-GTU ekspressioonivektorit, mis sisaldab CMV (*cytomegalovirus*) vahetat varajast promooterit, kanamütsiini resistentsusgeeni ja SV40 (*Simian virus 40*) polüadenülatiooni signaali. *Swap*-mutatsioonidega replikaaside järjestused (mittestruktuurset polüproteiini P1234 kodeerivad järjestused) klooniti pMC-GTU vektorisse ja paljundati *E. coli* rakkudes. Tulemuseks saadi plasmiidid, mis kodeerivad vahetatud domeenidega mittestruktuursete (ns) polüproteiinide järjestusi. Kasutatud *swap*-

mutatsioonidega konstruktide kohta on toodud informatsioon tabelis 1 (SINV *swap*-domeenidega konstruktid) ja tabelis 2 (CHIKV *swap*-domeenidega konstruktid) ning joonisel 6 ja 7. Konstrukti nimetuses tähistab esimene osa doonorliigi nimetust, millest asendatud domeen pärines ning järgmine sõnaühend tähistab vahetatud domeeni lühendit. Numbrid nimetustes viitavad domeenide vahetuse käigus tekkinud kompensatoorsete mutatsioonide positsioonidele nukleotiidses järjestuses. *Swap*-mutatsioonidega konstruktid on vahetatud järgmised domeenid: kogu nsP2 valk, nsP2 valgu N-terminaalne domeen – NTD, nsP2 valgu proteaasi domeen – Pro, nsP3 valgu N-terminaalne makro domeen – macro ja nsP3 valgu C-terminaalne domeen – CTD3. Vahetatud (*swapped*) domeenidega polüproteiini järjestusi kodeerivad plasmidsed konstruktid on käesoleva töö autori valmistatud ning ülejäänud – professor Andres Meritsa valmistatud.



Joonis 6. *Swap*-mutatsioonidega (ns) polüproteiinide skeemid. Joonisel on kujutatud konstruktid, milles on SFV mittestruktuusrete valkude domeenid vahetatud SINV ja CHIKV homologsete domeenide vastu mittestruktuurses (ns) polüproteiinis. Vahetatud domeen on kujutatud oranži värviga ja noolega on viidatud vahetatud domeeni nimetus.



Joonis 7. *Swap*-mutatsioonidega (ns) polüproteiini konstruktid, mis sisaldavad adpteerumise käigus tekkinud kompensatoorseid mutatsioone. Joonisel on kujutatud *swap*-mutatsioonidega replikaasid, mis sisaldavad adpteerumise käigus tekkinud kompensatoorseid mutatsioone nukleotiidses järjestuses. Mutatsioonide positsioonid on joonisel viidatud nooltega.

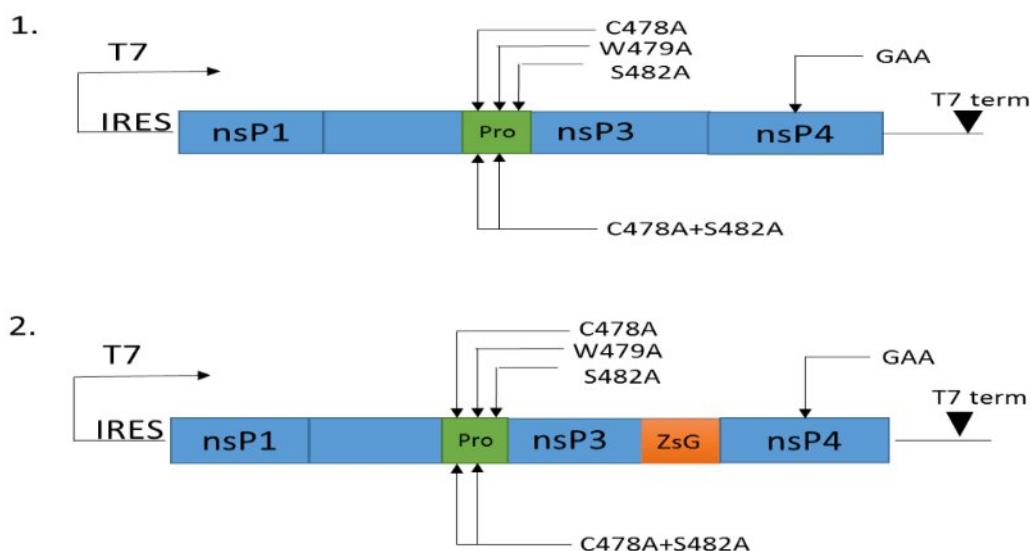
Tabel 1. SINV-st pärit *swap*-domeenidega konstruktid. Tabelis on näidatud konstrukti nimi, vahetatud domeen või valk ja kompensatoorse mutatsiooni positsioon nukleotiidses järjestuses ning selle asukoht mittestruktuurses valgus (nsP).

Konstrukti nimetus	Vahetatud domeen või valk	Mutatsiooni positsioon nukleotiidses järjestuses	Mutatsiooni asukoht nsP-s
SINV-nsP2	nsP2	-	-
SINV-NTD	NTD	-	-
SINV-NTD-1914	NTD	1914	NTD
SINV-NTD-5337	NTD	5337	nsP3
SINV-Pro	Pro	-	-
SINV-Macro	Macro	-	-
SINV-Macro-3240	Macro	3240	nsP2

Tabel 2. CHIKV-st pärit swap-domeenidega konstruktid. Tabelis on näidatud konstrukti nimi, domeeni doonorliik, millest vahetatud domeen pärines, vahetatud domeen või valk, kompensatoorse mutatsiooni positsioon nukleotiidses järjestuses ja asukoht mittestruktuursetes valkudes (nsP).

Konstrukti nimetus	Vahetatud domeen või valk	Mutatsiooni positsioon nukleotiidses järjestuses	Mutatsiooni asukoht nsP-s
CHIKV-nsP2	nsP2	-	-
CHIKV-nsP2 -2378	nsP2	2378	NTD
CHIKV-nsP2-4083	nsP2	4083	nsP2
CHIKV-nsP2-6987	nsP2	6987	nsP4
CHIKV-nsP2-7371	nsP2	7371	nsP4
CHIKV-NTD	NTD	-	-
CHIKV-Pro	Pro	-	-
CHIKV-Pro-1700	Pro	1700	nsP2
CHIKV-Pro-3074	Pro	3074	Pro
CHIKV-Pro-7371	Pro	7371	nsP4
CHIKV-Macro	Macro	-	-
CHIKV-CTD3	CTD	-	-

Lisaks on töös kasutatud CHIKV ja SFV mittestruktuurset polüproteiini kodeerivaid plasmiidseid konstrukte, mis sisaldavad punktmutatsioone nsP2 proteaasi domeeni kodeerivas piirkonnas (konstrueeritud prof. Andres Meritsa poolt). Antud punktmutatsioonid tähistavad aminohappejääkide asendusi nsP2 proteaasi aktiivtsentris. Punktmutatsioonidega CHIKV ja SFV konstruktid on toodud välja joonisel 8 ja tabelis 3 ja 4. Konstruktid sisaldavad T7 RNA polümeraasi promooterit ja entsefalomüokardiidi viiruse (EMCV) IRES elementi, mille kontrolli alla on viidud polüproteiini kodeeriv järjestus. T7 promooter ja IRES element on vajalikud polüproteiini ekspresseerumiseks BSR rakkudes, mis stabiilselt toodavad T7 RNA polümeraasi. Lisaks sisaldavad SFV proteaasi punktmutatsioonidega konstruktid roheliselt fluorestseeruvat markervalgu (*ZsGreen*) kodeerivat järjestust. Täpsemalt on see järjestus viidud nsP3 valku kodeerivasse järjestusse ning ekspresseeritakse kui nsP3-*ZsGreen* liitvalk. See võimaldab tuvastada rakkudesse viidud polüproteiini kodeerivalt plasmiidilt valkude ekspressiooni.



Joonis 8. CHIKV ja SFV punktmutatsioonidega konstruktid. Joonisel 8.1 on skemaatiliselt kujutatud CHIKV punktmutatsioonidega konstruktid ja joonisel 8.2 on SFV punktmutatsioonidega konstruktid. Polüproteiini kodeeriv järjestus on entsefalomüokardiidi viiruse (EMCV) IRES elemendi kontrolli all. Ekspressioon toimub T7 promooterilt. SFV punktmutatsioonidega konstruktid sisaldavad nsP3 valgu kodeerivas järjestuses roheliselt fluorestseeruva markervalgu (ZsG) geeni. Punktmutatsioonid nsP2 valgu proteaasis on joonisel nooltega viidatud nende aminohappelise positsiooni järgi.

Tabel 3. CHIKV punktmutatsioonidega konstruktid. Tabelis on toodud plasmiidseid konstruktid, mis kodeerivad CHIKV-i mittestruktuurset polüproteiini, milles on punktmutatsioonid nsP2 proteaasi domeenis. Tabelis on näidatud konstrukti nimetus, aminohappejäägi asendus ning selle positsioon aminohappelises järjestuses ja mittestruktuurse (ns) valgus. Lisaks on tabelis välja toodud kontrollidena kasutatud CHIKV metsiktüüpi (*wt*) polüproteiini kodeeriv konstrukti ja polümeraas-negatiivset polüproteiini kodeeriv konstrukti.

Konstrukti nimetus	Aminohappejäägi asendus	Positsioon aminohappelises järjestuses	Asukoht ns valkudes
CHIKV-P1234 (<i>wt</i>)	-	-	-
CHIKV-P1234-C478A	C>A	478	nsP2, Pro
CHIKV-P1234-S482A	S>A	482	nsP2, Pro
CHIKV-P1234-W479A	W>A	479	nsP2, Pro
CHIKV-P1234 C478A+S482A	C>A, S>A	478, 482	nsP2, Pro
CHIKV-P1234-GAA	DD>AA		nsP4

Tabel 4. SFV punktmutatsioonidega konstruktid. Tabelis on toodud SFV polüproteiini kodeerivad plasmiiidsed konstruktid, mis sisaldavad punktmutatsioone nsP2 valggu proteaasi domeeni aktiivsaisid ja SFV metsiktüüpi (*wt*) ns polüproteiini kodeeriv plasmiiid. Lisaks sisaldavad polüpreoteiini järjestused nsP3 kodeerivas osas roheliselt fluorestseeruvat markervalgu (*ZsGreen*) kodeerivat järjestust. See on tähistatud nimetuses Z tähega. Tabelis on välja toodud konstrukti nimetus, aminohappejäagi asendus ja selle positsioon aminohappelises järjestuses ning asukoht mittestruktuurses (ns) valgus.

Konstrukti nimi	Aminohappeli ne asendus	Positsioon aminohappelises järjestuses	Asukoht ns valkudes
SFV-P123Z4 (<i>wt</i>)	-	-	-
SFV-P123Z4-C4678A	C>A	478	nsP2
SFV-P123Z4-S482A	S>A	482	nsP2
SFV-P123Z4-W479A	W>A	479	nsP2
SFV-P123Z4-C478A+S482A	C>A, S>A	478, 482	nsP2

Trans-replikaaside matriits-järjestused

Käesolevas töös on kasutatud transfektsioonil matriits-järjestusi kodeerivaid plasmiiide, mis on konstrueerinud professor Andres Merits. Plasmiiidid sisaldavad vajalikke promooter-järjestusi, kas CMV või T7 promooterit. Replikaasi plasmiiidid, mis sisaldasid CMV promooterit transfekteriti U2OS rakkudesse ja replikaasi plasmiiidid, mis sisaldasid T7 promooterit transfekteriti BSR rakkudesse. *Swap*-mutatsioonidega plasmiiidsed konstruktid transfekteriti U2OS rakkudesse koos matriits-RNA-d kodeeriva plasmiiidiga, mis sisaldab *Fluc* (*Firefly luciferase*) ja *Gluc* (*Gaussia luciferase*) kodeerivaid järjestusi. CHIKV ja SFV proteaasi punktmutatsioonidega plasmiiidsed konstruktid transfekteriti BSR rakkudesse koos matriits-RNA-d kodeeriva plasmiiidiga, mis samuti sisaldab nii *Fluc* kui ka *Gluc* kodeerivaid järjestusi. *Gluc* kodeeriv järjestus on sisestatud vastavalt SFV või CHIKV subgenoomse (SG) promooteri kontrolli alla ja *Fluc* on sisestatud matriits-järjestuse esimesse lugemisraami, genoomse promooteri kontrolli alla. Rakkudes toimub matriits-RNA replitseerumine replikaasi valkude poolt, mis ekspreseeritakse mittestruktuurset polüproteiini järjestust sisaldavalt plasmiiidselt konstruktil.

Kloneerimine

Swap-mutatsioonidega replikaase ehk mittestruktuurseid valke kodeerivaid järjestused (antud juhul inserdid) kloneeriti pMC-GTU vektorisse. Järjestuste allikateks olid vastavat täispikka infektsioonilist *swap*-mutantseid viiruseid kodeerivad plasmiidid. Kloneerimisel kasutati „*Thermo Scientific*“ restriksiooniensüüme ja puhvreid vastavalt tootja juhenditele. pMC-GTU vektorit lõigati *Bsp119I* ja *NheI* ensüümidega. Insertide lõikamisel kasutati *Bsp119I* ja *BcuI* ensüüme. Restriksioonisegusse segati puhver, ensüümid, vesi ja DNA. Lisatava ensüümi hulk sõltus DNA kogusest. Reaktsioon toimus 37°C juures ja kestis 1 tund. Lõigatud vektorit töödeldi aluselise fosfataasiga (*FastAP, Thermosensitive Alkaline Phosphatase*) 1 U/μg 37°C juures 1 tund. Selle tulemusel eemaldati vektori 5' otsast fosfaatrühm, et vektor ei liigeks iseendaga kokku. Restriksioonil saadud DNA fragmendid lahutati agarosgeelelektroforeeesil ja hiljem puhastati agarosgeelist. Selleks kasutati „*NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*“ kit-i („*Macherey-Nagel*“) vastavalt tootja poolsele protokollile.

Insertide liitmiseks vektoriga viidi läbi liigimisreaktsioon. Ligatsioonil kasutati T4 DNA ligaasi („*Thermo Scientific*“), 10× ligatsioonipuhvrit, vektorit ja inserti ekvimolaarsetes kogustes. Ligatsioonisegudel lasti seista üleöö.

Ligatsioonisegudega transformeeriti kompetentseid *E. coli* XL10 tüve rakke. Transformatsiooni läbiviimiseks võeti 150 μl kompetentseid rakke ja lisati need ligatsioonisegule. Segu pandi jääle 30 minutiks. Selle möödudes tehti rakkudele kuumašokk 42°C juures, kestusega 2 minutit ja jahutati jääl 1-2 min. Seejärel lisati 800 μl SOY (*Tryptic soy broth*, „*Difco*“) söödet rakkudele ja rakke inkubeeriti loksutil 37°C juures 60 minutit. Järgnevalt koguti rakud tsentrifuugides (2500× g, 3 min) ja resuspendeeriti 150 μl söötmes ning külvati LB söötmega tassidele, kuhu oli lisatud kanamütsiini lõppkonsentratsiooniga 25 μg/ml. Rakkudega tasse inkubeeriti 37°C juures ~18 tundi. Tekkinud kolooniad külvati 3 ml LB söötmesse, kuhu lisati 25 μg/ml lõppkonsentratsiooniga kanamütsiini. Rakke kasvatati loksutil 37°C kraadi juures ~18 tundi.

Plasmidse DNA eraldamiseks bakterirakkudest kasutati minipreparaatsiooni meetodit, mis põhineb aluselise lüüsi meetodil. Selleks kasutati *Plasmid DNA Extraction Mini Kit-i* („*Favorgen*“). Suurema koguse DNA saamiseks tehti midipreparaatsioon, kasutades *NucleoBond® Xtra Midi EF* („*Macherey-Nagel*“) kit-i. Nii minipreparaatsioon kui ka midipreparaatsioon viidi läbi vastavalt tootja poolsele protokollile. Sadestatud plasmidne DNA lahustati sobivas koguses vees. DNA midi- ja minipreparaatide kontsentratsioon mõõdeti

spektrofotomeetriga (*Nanodrop 2000*). Kloneerimise tulemusel saadud rekombinantsete DNA plasmiidide õigsust kontrolliti restriksioonanalüüsiga ja sekveneerimisega.

U2OS ja BSR rakkude transfektsioon

Swap-konstruktidne plasmiidne DNA koos matriits-järjestust sisaldava plasmiidiga transfekteeriti U2OS rakkudesse ning CHIKV ja SFV punktmutatsioonidega plasmiidid konstruktid koos matriits-plasmiidiga transfekteeriti BSR rakkudesse kasutades lipofektsiooni meetodit. See meetod põhineb geneetilise materjali viimisel rakkudesse liposoomide vahendusel. Selleks kasvatati rakud 100 mm läbimõõduga koekultuuri tassil 70-90% konfluentsuseni ja eelnevalt katsele külvati rakud kuue-auguliste plaatidele. Esmalt segati kokku replikaasi ja matriits-RNA-d ekspresseerivad plasmiidid DNA-d (1 µg igat plasmidi ühe augu kohta). Segati kokku 9 µl *LTX Plus Lipofectamine* reagent („*Invitrogen*“) ja 150 µl *OptiMEM* sööde kõigi konstruktid jaoks. Seejärel valmistati 150 µl *OptiMEM* söötme ja 2.5 µl *Plus Reagenti* segu kõigi konstruktid jaoks. Järgnevalt jaotati *OptiMEM* sööde ja *Plus* reagenti segu uutesse 1.5 ml tuubidesse ja segule lisati 10 µl plasmiidsete DNA-de segu. Viimasena lisati *Lipofectamine* reagenti ja *OptiMEM* söötme segu DNA+*OptiMEM*+*Plus* reagenti segule ja inkubeeriti toatemperatuuril 5 min. Samal ajal vahetati rakkudel söödet. Inkubatsiooniaja möödudes lisati rakkudele DNA segu koos *OptiMEM* söötmega, *Lipofectamine* ja *Plus* reagentiga ja inkubeeriti rakke 37°C juures 5% CO₂ keskkonnas 18 tundi.

Swap-mutatsioonidega konstruktidega teostati transfektsiooni U2OS rakkudesse kaks korda. CHIKV ja SFV proteaas-mutantseid konstrukte transfekteeriti BSR rakkudesse üks kord.

Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine

Gluc mõõtmine

U2OS rakkudelt, millesse oli transfekteeritud *swap*-mutatsioonidega plasmiidid, eemaldati sööde, pesti 1 kord PBS-ga ja lüüsi, kasutades 200 µl 1× *Renilla Luciferase Assay* („*Promega*“) lüüsipuhvit, inkubeerides 15 minutit toatemperatuuril. Lüüsitud rakud koguti 1.5 ml reaktsioonituubidesse ning tsentrifugeeriti lauatsentrifuugis (14000× g, 1 min). *Gluc* alktiivsuse mõõtmine teostati vastavalt „*Promega*“ *Renilla Luciferase Assay System* juhendile. Rakulüüsile (4 µl) lisati 20 µl *Renilla* lutsiferaasi substraati ning mõõdeti *Gluc*

aktiivsus. Mõõtmiseks kasutati *Glomax SIS* luminomeetrit („*Promega*“). Mõõdetud väärtusi analüüsiti tabelitöötlusprogrammiga *Excel*.

Fluc ja Gluc mõõtmine

BSR rakkudelt eemaldati sööde, pesti 1 kord PBS-ga, lisati 500 µl 1× *Passive Lysis Buffer* („*Promega*“) ja inkubeeriti 15 min toatemperatuuril. Seejärel mõõdeti nii *Fluc* (*Firefly luciferase*), kui ka *Gluc* (*Gaussia luciferase*) aktiivsus vastavalt *Dual-Luciferase Reporter Assay kit-i* („*Promega*“) poolsetele juhistele. Rakulüsaadile (4 µl) lisati 20 µl LAR II (*Luciferase Assay Reagent II*) ning mõõdeti *Fluc* aktiivsus. Seejärel lisati 20 µl *Stop & Glo* reagenti ja mõõdeti *Gluc* aktiivsus.. Hiljem analüüsiti saadud tulemusi tabelitöötlusprogrammiga *Excel*.

Western Blot

Transfekteeritud BSR rakkude lüsaate analüüsiti *Western Blot*-ga mittestruktuursete valkude tuvastamiseks. Transfekteeritud rakud pesti üks kord PBS-ga ja lisati 100 µl *Laemmli* lüüsi puhvrit (50 mM Tris pH 6.8, 100 mM dithiothreitol (DTT), 2% naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS), 10% glütserool, broomfenoolsinine). Lüsaat koguti tuubidesse ja kuumutati 100°C juures 5 min. Rakulüsaate säilitati -20°C juures. Lüsaadid kanti 8% SDS-polüakrüülamiid geelile ja lahutati SDS polüakrüülamiid geelelektroforeesil 1× SDS-jooksupuhvris (25 mM Tris, 0.25 M glütsiin, 0.1% SDS, pH 8.3). Kontsentreerivas osas rakendati 100 V pinget ja lahutavas osas 180 V pinget. Geelil lahutunud valgud kanti üle nitrotselluloos-membraanile („*Amersham*“) ühe tunni jooksul 15 V juures. Eelnevalt niisutati geeli ja nitrotselluloosfiltrit *Semi-Dry* puhvris (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0.037% SDS, 20% metanool). Ülekandeks kasutati *Trans-Blot Semi-Dry* masinat („*Bio-Rad*“). Ülekandunud valkudega membraan blokeeriti 5% lõssilahusega *western blot*’i pesulahuses (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20) 1 tunni jooksul toatemperatuuril. Seejärel lisati valkudega membraanile primaarne antikeha 2% lõssilahuses ja inkubeeriti üleöö 4°C juures. Kasutati CHIKV mittestruktuursete valkude (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) vastaseid antikehi, mis olid toodetud küülikus. Ns valkude vastaste antikehade seerumi lahjendused on näidatud tabelis 5. Järgnevalt pesti membraani *western blot*’i pesulahusega 3 korda 10 minutit ning seejärel inkubeeriti membraani 1 tund 2% lõssilahusega, kuhu oli lisatud sekundaarne antikeha, lahjendusega 1:10000. Ns valkude puhul kasutati kitses toodetud küüliku immunoglobuliinide vastast antikeha ja aktiini (*Santa Cruz*) puhul hiire immunoglobuliinide vastast antikeha. Mõlemad sekundaarsed antikehad olid konjugeeritud

määrarõika peroksüdaasiga. Peale sekundaarse antikehaga inkubatsiooni, pesti membraani jälle 3 korda 10 minutit *western blot*'i pesulahusega. Seejärel ilmutati kasutades ECL (*Enhanced chemiluminescence*) kit'i („*GE Healthcare*“), mis võimaldab detekteerida peroksüdaasi substraadi katalüüsisel eralduvat valgussignaali. Membraan eksponeeriti röntgenfilmile 1 min. Kui signaal oli nõrk, siis eksponeeriti pikema aja jooksul (kuni 1 tund).

***In vitro* translatsioon**

CHIKV replikaasi kodeerivate plasmiidsete konstruktidega, mis sisaldavad punktmutatsioone nsP2 proteaasi domeeni kodeerivas piirkonnas, teostati *in vitro* translatsioon, kasutades *TNT® coupled Reticulocyte Lysate System* kit-i („*Promega*“). *In vitro* translatsioon viidi läbi vastavalt tootja poolsetele juhistele lõppmahus 25 µl. *In vitro* translatsioonis on kasutatud T7 RNA polümeraasi ja sünteesivate valkude märgistamiseks radioaktiivset väävli isotoopi [³⁵S] sisaldavate metioniini ja tsüsteiini segu (*EasyTag™ EXPRESS³⁵S Protein Labeling Mix*, „*Perkin Elmer*“). Translatsiooni reaktsioon peatati *RNase A*, lõppkonsentratsioonis 10 ng/µl ja tsükloheksimiidi lõppkonsentratsioonis 1 mM lisamisega proovidele. Translatsioonil saadudprodukte järgnevalt kasutati immunosadestamiseks ns valkude vastaste antikehadega..

Immunosadestamine

Radioaktiivselt märgistatud translatsiooni produktidega teostati immunosadestamine, selleks et täpsemalt detekteerida, mis valgud moodustuvad CHIKV proteaas mutantsete polüproteiinide protsessingus. Esmalt denatureeriti translatsiooni produkte 1% SDS lahuses ja NET150 puhvris 70°C juures 10 min. Immunosadestamiseks kasutati NET150 puhvrit (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP40), NET400 puhvrit (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP40) ja proteiin A sefaroosi (*Protein A sepharose CL-4B*, „*GE Healthcare*“). Iga translatsiooni proov, millele oli lisatud 1% SDS ja NET150 puhvrit jagati neljaks osaks ja mahtu suurendati 1 ml-ni NET150 puhvriga. Seejärel teostati antikehadega seondumine, mille jaoks lisati CHIKV ns valkude vastaseid antikehi (immuniseeritud küülikute seerumid). Antikehade lahjendused on toodud välja tabelis 5. Antikehadega segusid hoiti üleöö 4°C juures. Moodustunud immuunkompleksite sadestamiseks lisati 80 µl ~50% proteiin A sefaroosi suspensiooni iga proovi kohta ja inkubeeriti 1 tund 4°C juures. Järgnevalt tehti pesu, et eemaldada mitte seondunud komponendid. Selleks tsentrifugeeriti (6000× g, 2 min, 4°C juures) proteiin A sefaroos põhja ja eemaldati supernatant. Proteiin A sefaroosi sademele lisati 1 ml NET400 (pesupuhvrit) ja

tsentrifuugiti 6000× g 4°C juures 2 min. Seda korrati veel 3 korda. Pesu järel denatureeriti valgud 100°C juures 10 min 30 µl kahekordses *Laemmli* puhvril. Sadestatud valgud kanti 8% SDS polüakrüülamiidgeelile ja lahutati SDS polüakrüülamiid-geelelektroforeesil 1× SDS jooksupuhvril. Geel kuivatati vaakumi toimetel ja valgud detekteeriti *Typhoon Phosphorimager*-ga („GE Healthcare).

Tabel 5. Antikehade lahjendused. *Western blot*'is ja immunosadestamisel kasutatud antikehad ja nende lahjenduse ning detekteeritavate valkude molekulmassid.

Antikeha	<i>Western blot</i>'i lahjendus	Immunosadestamise lahjendus	Molekulmass kDa
Anti-CHIKV nsP1	1: 3000	1:1000	64
Anti-CHIKV nsP2	1: 10 000	1:1000	96
Anti-CHIKV nsP3	1:10 000	1:2000	64
Anti-CHIKV nsP4	1:2000	1:100	73
Sekundaarne Anti-rabbit HRP	1: 10 000	-	-
Sekundaarne Anti-mouse HRP	1: 10 000	-	-

2.3. Tulemused ja arutelu

Käesolevas töös on kasutatud *swap*- mutatsioonide ning CHIKV ja SFV punktmutatsioonide uurimiseks *trans*-replikaasi süsteemi. See võimaldab hinnata nende mutatsioonide mõju viiruse replikatsioonile, transkriptsioonile ja mittestruktuursete valkude tootmisele.

2.3.1 *Swap*-mutatsioonide uurimine

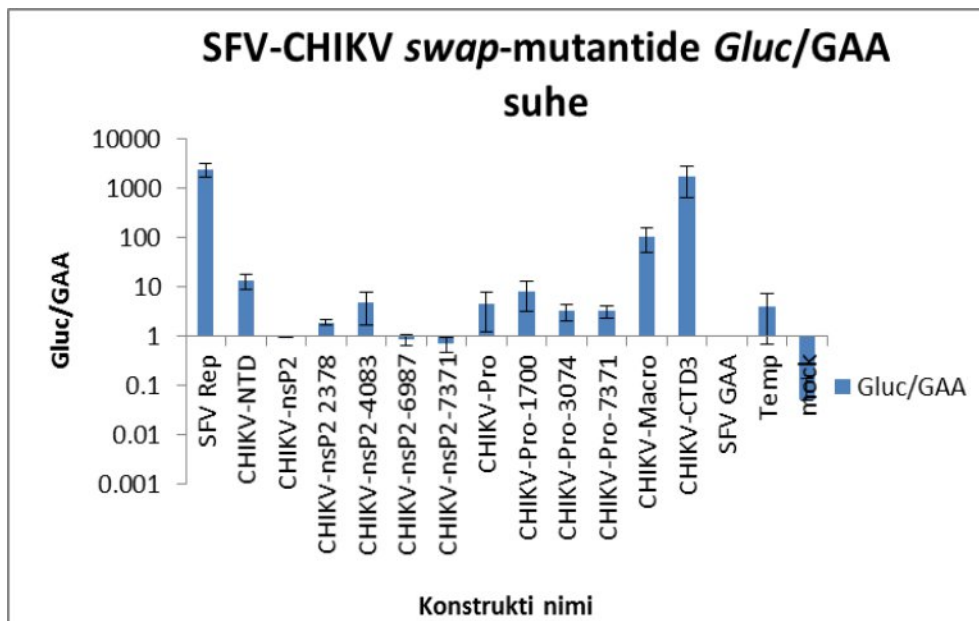
Transfektsioon ja Gluc aktiivsuse mõõtmine

Esmalt tõsteti SFV-SINV ja SFV-CHIKV *swap*-mutantseid replikaase kodeerivaid järjestused pMC-GTU plasmiidseesse vektorisse CMV promooteri kontrolli alla ja paljundati *E. coli* rakkudes. Konstruktide õigsust kinnitati restriksioonanalüüsiga ja sekveneerimisega. Need konstruktid transfekteeriti koos matriits-järjestust kodeeriva plasmiidiga U2OS rakkudesse. *Swap*-mutatsioonide uurimisel mõõdeti vaid *Gluc* aktiivsust, kuna see on informatiivsem iseloomustamiseks replikaaside transkriptsiooni ja replikatsiooni võimet. *Fluc* valk võib ekspresseeruda ka replikatsiooni toimumiseta, otse plasmiidilt transkribeeritud mRNA-lt. Seetõttu pole *Fluc* aktiivsus niivõrd usaldusväärne. Kuna *Gluc* järjestus on subgenoomse promooteri kontrolli all, siis ekspresseerub *Gluc* marker-valk vaid siis, kui sünteesitakse subgenoomselt promooterilt subgenoomset RNA-d. Seega näitab *Gluc* aktiivsus subgenoomse RNA sünteesi ehk transkriptsiooni taset. *Swap*-mutantsete replikaaside *Gluc* aktiivsuse mõõtmistulemused on toodud joonisel 9 ja 10. Näidatud on *Gluc* aktiivsuste suhe polümeraas negatiivse mutandi (GAA) suhtes, kuna see kirjeldab paremini domeenide vahetuse mõju transkriptsioonile.

Gluc aktiivsuse mõõtmistulemustest on näha, et enamus CHIKV-st pärit domeenidega (SFV-CHIKV) *swap*-mutantsete replikaaside *Gluc* aktiivsused on vähemalt kaks suurusjärku madalamad võrreldes metsiktüüpi replikaasiga (SFV-Rep) (Joonis 9). Seega replikaasi domeenide vahetamise (*swapping*) tulemusel on oluliselt vähenenud subgenoomse RNA süntees. Seetõttu võib oletada, et enamik vahetatud domeenidest on olulised subgenoomse RNA sünteesis (kuigi tõenäoliselt on tegemist kaudse efektiga) ja CHIKV-st pärit vastavad domeenidest pole võimelised täitma vajalikke funktsioone SFV-s. SFV-CHIKV *swap*-mutatsioonidega replikaaside hulgas on kõige suurem *Gluc* aktiivsus CHIKV-CTD3 vahetusega replikaasil, millel oli vahetatud nsP3 valgu C-terminaalne domeen (Joonis 9). Sellest tulenevalt saab järeldada, et CHIKV-CTD3 sünteesis kõige efektiivsemalt RNA matriitsil subgenoomset RNA-d metsiktüüpi SFV replikaasiga võrreldaval tasemel, hoolimata domeeni vahetusest. Suhteliselt kõrge *Gluc* aktiivsus oli ka CHIKV-macro vahetatud domeeniga replikaasil. Kõige väiksem *Gluc* aktiivsus SFV-CHIKV *swap*-mutatsioonide

hulgas esines kogu nsP2-ga (CHIKV-nsP2) vahetatud replikaasil. CHIKV-Pro *swap*-konstrukti *Gluc* aktiivsus on samas suurusjärgus CHIKV-nsP2 *swap*-konstruktiga ning CHIKV-NTD *swap*-replikaasi *Gluc* aktiivsus on ühe suurusjärgu võrra kõrgem CHIKV-nsP2 *swap*-replikaasi aktiivsusest, kuid siiski kaks suurusjärku madalam metsiktüübiga replikaasist (SFV-Rep) (Joonis 9).

CHIKV-CTD3 kõrgest *Gluc* aktiivsusest ja vastavalt kõrgest transkriptsiooni tasemest saab järeldada, et nsP3 C-terminaalne domeen (CTD3) ei oma olulist rolli viiruse transkriptsioonis. On näidatud, et nsP3 C-terminaalne domeen interakteerub G3BP valguga rakus, millega mõjutab stress-graanulite moodustumist nakatatud rakus (Panas jt., 2014). Seega on antud domeen oluline permeesrakuga interakteerumisel ja selle mõjutamisel. Kuid antud situatsioonis *trans*-replikaasi süsteemi kasutamine lubab järeldada, et CTD domeenil ei ole otsest seost transkriptsiooni/replikatsiooniga. Samuti ka macro domeeni vahetus pole eriliselt vähendanud subgenoomse RNA sünteesi. Eelnevalt on teada, et macro domeen on kõrgelt konserveerunud N-terminaalne regioon nsP3-s, mis on oluline viiruse replikatsiooniks, kuid selle täpsed funktsioonid on teadmata (Park ja Griffin, 2009). Kogu nsP2 vahetamise tulemusel on transkriptsiooni/replikatsiooni võime kadunud täielikult. Selle põhjustest räägitakse pikemalt CHIKV-st ja SINV-st pärit domeenide vahetamise võrdlemisel. Ka Pro domeeni vahetuse tagajärjel on subgenoomse RNA sünteesi efektiivsus oluliselt vähenenud, mis omakorda kinnitab Pro domeeni olulisust replikaasi funktsioneerimises. Pro domeen vastutab alfaviirustes mittestruktuurse polüproteiini proteolüütilise lõikamise eest eraldi valkudeks, mis on olulised replikatsioonitsükli jaoks. Arvatakse, et CHIKV proteaasi domeen erineb teiste alfaviiruste omadest. On näidatud, et CHIKV lõikamisaitide järjestused mittestruktuurses polüproteiinis erinevad oluliselt teiste alfaviiruste polüproteiini lõikamisaitidest (Saisawang jt., 2015). Seetõttu CHIKV proteaasi domeen ei tunne ära SFV ns polüproteiini lõikamisaiti ja ei suuda efektiivselt lõigata mittestruktuurset polüproteiini. NTD (nsP2 N-terminaalne domeen) vahetamise tulemusel oli transkriptsiooni tase vähenenud kaks suurusjärku võrreldes metsiktüüpi SFV replikaasiga. NsP2 N-terminaalne domeen sisaldab helikaaset, RNA trifosfataaset ja nukleosiidtrifosfataaset (NTP) aktiivsust (Vasiljeva jt., 2001). N-terminaalne domeen on osaleb proteaasi poolt läbiviidaval mittestruktuurse polüproteiini lõikamisel, kuid pole otseselt vajalik selleks. Täpsemalt aitab N-terminaalne domeen proteaasil ära tunda oma lõikesaiti (Lulla jt., 2012). Seega võib oletada, et NTD domeeni osalus on vajalik subgenoomse RNA sünteesi jaoks ning CHIKV-st pärinev NTD ei suuda täies mahus asendada SFV NTD funktsiooni.

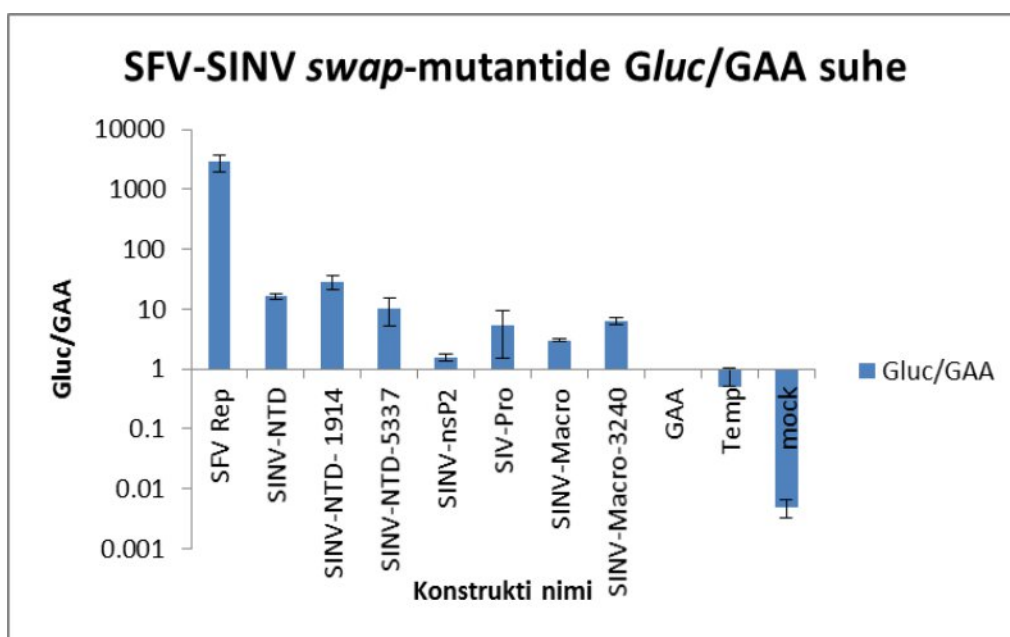


Joonis 9. SFV-CHIKV *Swap*-mutatsioonidega SFV replikaaside *Gluc/GAA* suhe. Joonisel on kujutatud CHIKV-st pärit vahetatud domeenidega SFV replikaaside (SFV-CHIKV) *Gluc* aktiivsus polümeraas negatiivse (GAA) replikaasi suhtes. Veapiirid mõlema joonise tulpadel tähistavad kahe katse mõõtmisvahemikku. *Temp* väärtus kujutab ainult matriits-RNA transfekteeerimisel saadud *Gluc* aktiivsust. *Mock* väärtus kujutab DNA-ga mitte transfekteeeritud rakkude saadud *Gluc* aktiivsuse mõõtmistulemuste suhet.

Meie laboris varem tehtud vahetatud domeenidega viiruste adapteerimise käigus on tekkinud kompensatoorsed mutatsioonid (Teppor, 2014). Neid on tuvastatud nii nendes samades domeenides, mida on vahetatud, kui ka teistes mittestruktuursetes valkudes. Kompensatoorsete mutatsioonidega SFV-CHIKV *swap*-mutatsioonidega replikaaside *Gluc* aktiivsus *trans*-replikaasi süsteemis on jäänud samasse suurusjärku, mis algsetel adapteerumata *swap*-replikaasidel (Joonis 9). Täheldatavad on ainult väikesed erinevused kompensatoorsete mutatsioonidega ja algsete adapteerumata *swap*-replikaaside *Gluc* aktiivsuste vahel. Seega nii täispikkuses nsP2 kui Pro domeeni vahetuse tulemusel toimunud adapteerimise käigus tekkinud kompensatoorsed mutatsioonid (2378, 4083 ja 1700, 3074, 7371) ei suurendanud ega ka vähendanud olulisel määral transkriptsiooni efektiivsust, millest tulenevalt võib järeldada, et kompensatoorsetel mutatsioonidel puudub oluline mõju transkriptsioonile. Kuid sellegi poolest on osa nendest mutatsioonidest suurendanud viiruse elujõulisust (Teppor, avaldamata andmed). Seega võib arvata *trans*-replikaasi süsteemiga saadud tulemused viitavad, et antud mutatsioonid tõstavad viiruse elujõulisust teiste mehhanismide kaudu, kuid mitte subgenoomse RNA sünteesi suurenemise kaudu.

SINV-st pärit domeenidega *swap*-mutatsioonidega replikaaside (SFV-SINV) puhul oli samuti märgatav kaks kuni kolm suurusjärku madalam *Gluc* aktiivsus võrreldes metsiktüübiga (SFV-Rep) (Joonis 10). Sellest järeldub, et kõikide domeenide (NTD, nsP2, Pro ja macro)

vahetamise tulemusel vähenes oluliselt subgenoomse RNA süntees, mistõttu antud domeenid on olulised transkriptsiooni toimumisel (ka siin on tõenäoliselt tegemist kaudse efektiga) ja SINV-st pärit domeenid ei suutnud piisaval tasemel funktsioneerida SFV kontekstis. Kõige kõrgem *Gluc* aktiivsus oli SINV-NTD *swap*-mutantsel replikaasil ja kõige väiksem *Gluc* aktiivsus oli SINV-nsP2 *swap*-mutantsel replikaasil (GAA-replikaasiga samas suurusjärgus) (Joonis 10). Seega pärssis kõige enam subgenoomse RNA sünteesi kogu nsP2 vahetamine ja kõige vähem NTD (N-terminaalne domeen) vahetus. Pro ja macro domeenide vahetus (SINV-Pro ja SINV-macro) mõjutas ka oluliselt mõjutas aktiivsust (Joonis 10) ning vastavalt transkriptsiooni efektiivsust.



Joonis 10. SFV-SINV *Swap*-mutatsioonidega SFV replikaaside *Gluc*/*GAA* suhe Joonisel on kujutatud SINV-st pärit vahetatud domeenidega SFV replikaaside (SFV-SINV) *Gluc* aktiivsus polümeraasi negatiivse (*GAA*) replikaasi suhtes. Veepiirid mõlema joonise tulpadel tähistavad standardhälvet. *Temp* väärtus kujutab ainult maatriks-RNA-ga transfekteeritud rakkude *Gluc* aktiivsuse mõõtmistulemust ja *mock* väärtus on DNA-ga transfekteerimata rakkude *Gluc* mõõtmistulemust.

SINV-st pärit domeenide vahetamise tagajärjel tekkinud kompensatoorsete mutatsioonide puhul ei ole märgatav eriliselt suurenenud või vähenenud *Gluc* aktiivsus võrreldes algsete adapteerimata *swap*-replikaasidega. Sellest järeldub, et NTD ja macro domeeni vahetuse järgselt tekkinud kompensatoorsed mutatsioonid ei mõjutanud oluliselt subgenoomse RNA sünteesi. Seega oli neil mutatsioonidel neutraalne efekt transkriptsioonile. Varasemast uurimusest selgus, et Pro ja nsP2 vahetamise tulemusel kadus viiruste elujõulisus täielikult,

mistõttu SFV-SINV-nsP2 ja SFV-SINV-Pro viiruseid ei olnud võimalik adapteerida. (Teppor, 2014).

Võrreldes CHIKV-st ja SINV-st pärit domeenidega vahetamise mõju subgenoomse RNA sünteesile võib järeldada, et nsP2, NTD ja Pro domeeni vahetamise mõju nii CHIKV-st kui ka SINV-st pärit domeenide puhul on suhteliselt sama. Ainuke erinevus on macro domeeni vahetamise korral. CHIKV-st pärineva macro domeeni vahetus pole eriliselt kahjustanud subgenoomse RNA sünteesi võimet. Macro domeeni vahetuse kahjuliku mõju puudumist tõestab ka varasem uurimus, kus on näidatud, et macro domeeni vahetuse järgselt pole vähenenud viiruse elujõulisus. Seetõttu, ei kaasatud ka CHIKV-macro *swap*-mutanset viirust adapteerimisse, mille tõttu puuduvad antud juhul kompensatoorsed mutatsioonid (Teppor, 2014). SINV-st pärineva macro domeeni vahetuse tulemusel on subgenoomse RNA süntees oluliselt vähenenud võrreldes metsiktüüpi SFV replikaasiga. Selle põhjuseks võib olla see, et CHIKV ja SFV macro domeeni järjestused on sarnasemad kui SINV ja SFV omad. Varasemalt on teada, et CHIKV ja SFV on fülogenteetiliselt lähedasemad kui SINV ja SFV (Strauss ja Strauss, 1994), millega võiks ka seletada saadud domeeni vahetuse efekti. Väärib tähelepanu, et nii CHIKV-st kui ka SINV-st pärineva täispika nsP2 vahetamise tulemusel oli replikaasi transkriptsiooni/replikatsiooni võime kadunud täielikult. Selle põhjuseks võib olla see, et kogu nsP2 vahetusega on häiritud vajalikke interaktsioonide moodustumine teiste replikaasi domeenidega, mis omakorda takistab nsP2 täielikku funktsioneerimist. Samuti tõestavad antud tulemused, et nsP2 on oluline transkriptsiooni jaoks kas siis kaudselt või otseselt. Kaudne mõju seisneb nsP2 C-terminuses asuva Pro domeeni proteolüütilise aktiivsuse häirumisel, mille tulemusel on häiritud ka kogu replikatsioonitsükkel. Otsene mõju transkriptsioonile võib olla seotud nsP2 teiste aktiivsustega. Pro domeeni vahetuse puhul on näha suhteliselt madalat transkriptsiooni taset nii SINV-st kui ka CHIKV-st pärinevate domeenide puhul. Sellest tulenevalt võib järeldada, et Pro domeeni vahetuse järgselt on häiritud proteolüütiline aktiivsus. Selle tulemusel on takistatud replikaasi ehk mittestruktuursete valkude formeerumine, mis on vajalikud nii replikatsiooniks kui ka transkriptsiooniks. Replikaasi valkude puudumisel ei toimu ei replitseerumist ega ka subgenoomse RNA sünteesi.

Kompensatoorsete mutatsioonide mõju mõlemast viirusest pärinevate domeenide puhul on samuti sarnane. Adapteerimise käigus tekkinud kompensatoorsed mutatsioonid ei ole märgatavalt suurendanud ega ka vähendanud transkriptsiooni efektiivsust (Joonia 9 ja 10). Tähelepanu tuleks juhtida sellele, et adapteerimise käigus tekkinud kompensatoorsed mutatsioonid teistes mittestruktuursetes valkudes võivad viidata sellele, et vahetatud domeeni

ja selle mutatsiooniga mittestruktuurse valgu või teise domeeni vahel toimuvad olulised interaktsioonid. Näiteks CHIKV-st pärineva Pro domeeni vahetus kutsus esile kompensatoorse mutatsiooni tekke nsP4 valgus. Seega võib aravata, et Pro domeeni ja nsP4 vahel toimuvad interaktsioonid.

Tulemustest võib järeldada, et *trans*-replikaasi süsteemi kasutamine *swap*-mutatsioonide uurimisel osutus väga efektiivseks ja andis piisavalt informatsiooni *swap*-mutatsioonide mõju kohta. Saadud tulemusi saaks kasutada edasistes uurimustes. Vastupidi, domeenide vahetamise tagajärel toimunud mutantsete viiruste adapteerimise käigus tekkinud kompensatoorsed mutatsioonid *trans*-replikaasi süsteemis ei ole näidanud erilist suurendavat ega vähendavat efekti subgenoomse RNA sünteesile. Seega, *trans*-replikaasi süsteemi kasutamisega pole õnnestunud näidata nende mutatsioonide positiivset mõju replikaaside transkriptsioonivõimele. See võiks viidata sellele, et need mutatsioonid võivad pigem olla olulised viirusinfektsiooni kontekstis (nt. võivad mõjutada interaktsiooni peremeesrakkudega) ning seetõttu vajavad uurimist kasutades teisi viroloogilisi meetodeid.

2.3.2 CHIKV nsP2 proteaasi punktmutatsioonide uurimine

CHIKV nsP2 proteaasi punktmutatsioonide mõju replikatsioonile ja transkriptsioonile

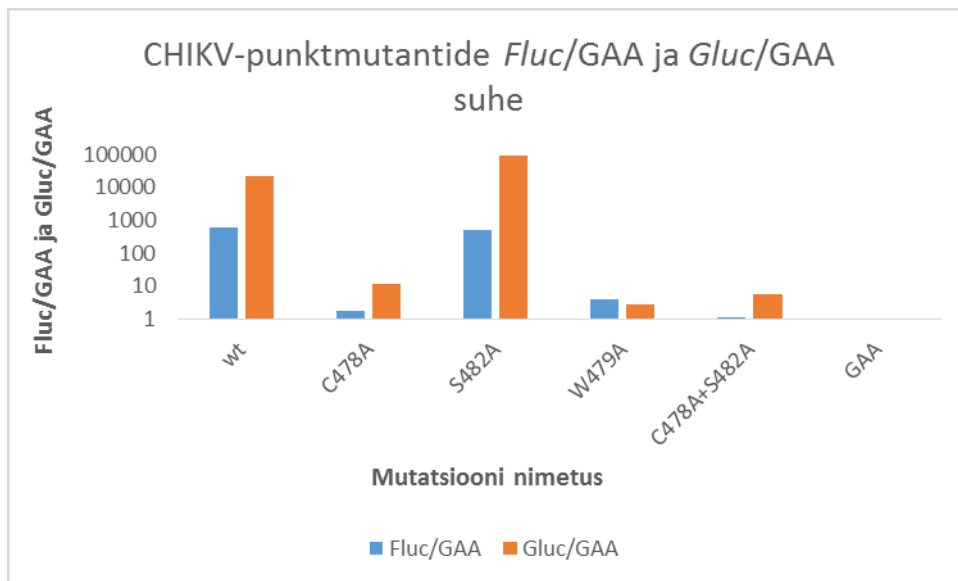
CHIKV nsP2 proteaasi punktmutatsioonide uurimisel kasutati samuti *trans*-replikaasi süsteemi, mille käigus analüüsiti nende mutatsioonide mõju replikatsioonile ja transkriptsioonile *Fluc* ja *Gluc* aktiivsuste kaudu. Punktmutatsioonidega CHIKV replikaasi kodeerivad plasmiidid transfekteeriti BSR rakkudesse ja 18 tunni möödudes mõõdeti *Fluc* ja *Gluc* aktiivsust (Joonis 12). Seda tehti kolmes korduses. Kaks kordust sai tehtud meie labori liikme Age Utt'i poolt. Antud töö raames tehti üks kordus, mis kinnitas eelneva kahe katse tulemusi.

Punktmutatsioonid asuvad CHIKV nsP2 proteaasi aktiivtsentris (Joonis 8.1). NsP2 on vastutav viiruse replikatsiooni ja paljunemise eest, kasutades selleks nii proteolüütilist kui ka teisi aktiivsusi. Täpsemalt vastutab nsP2 oma proteolüütilise aktiivsusega mittestruktuurse polüproteiini lõikamise eest, mille tulemusena tekivad viiruse transkriptsiooni ja replikatsiooni jaoks vajalikud polüproteiini vaheproduktid ja mittestruktuursed valgud. Replikatsioon ja transkriptsioon kontrollitud mittestruktuurse polüproteiini ekspressiooni ja protsessimisega (Merits jt., 2001). Antud punktmutatsioonid kujutavad endast proteaasi aktiivtsentris asuvate aminohappejääkide asendusi. Varasemalt on teada, et teatud

punktmutatsioonid nsP2 proteaasi aktiivsaidis blokeerivad viiruse replikatsiooni imetajarakkudes. Antud töös uuriti nende mutatsioonide mõju replikatsioonile ja transkriptsioonile *trans*-replikaasi süsteemis. Selleks, et analüüsida punktmutatsioonide mõju proteaasile aktiivsusele ja sellest tulenevalt mittestruktuursete valkude moodustumisele analüüsiti *trans*-replikaasi katsest saadud rakkude lüsaadid *Western Blot* meetodil. Lisaks sellele analüüsiti proteaasi aktiivsaidis asuvaid punktmutatsioonide mõju ka *in vitro* kasutades selleks *in vitro* translatsioonile ja immunosadestamise meetodit.

Fluc ja *Gluc* mõõtmistulemused on näidatud joonisel 11, kus on näidatud on *Gluc* aktiivsuse suhe polümeraas negatiivse replikaasi (GAA) suhtes. See suhe näitab mitu korda efektiivsemalt proteaasi mutandid replitseerivad matriits-RNA-d ja sünteesivad subgenoomset RNA-d. Tulemustest on üldiselt näha, et mutantsete replikaaside (va. S478A) *Fluc* aktiivsuse suhe on kaks kuni kolm suurusjärku madalam metsiktüüpi CHIKV replikaasi omast. *Gluc* aktiivsuse suhe on nende mutatsioonidega replikaaside puhul kolm kuni neli suurusjärku madalamal tasemel võrreldes metsiktüübi replikaasiga (Joonis 11). Sellest järeldub, et kõik punktmutatsioonid, va. S482A, proteaasi aktiivsaidis vähendavad oluliselt võimet replitseerida matriits-RNA-d ja sünteesida subgenoomset RNA-d. S482A mutatsiooniga replikaasi *Fluc* aktiivsuse suhe on kõige kõrgem, metsiktüüpi replikaasiga samas suurusjärgus. Kõige madalam *Fluc* aktiivsuse suhe on C478A+S482A topelt-mutatsiooniga replikaasil, polümeraas negatiivse replikaasiga (GAA) samal tasemel. Kõige kõrgem *Gluc* aktiivsuse suhe on S482A mutatsiooniga replikaasil, suurem isegi metsiktüübiga replikaasi omast, ning kõige madalam aktiivsus on W479A replikaasil (Joonis 11). Tulemustest järeldub, et seriini jäägi asendus ei takista replitseerimast matriits-RNA-d ega ka subgenoomse RNA sünteesi RNA matriitsil ehk transkriptsiooni. Seega ei ole seriini jäägil olulist rolli proteaasi aktiivsuses ja sellest tulenevalt ei kahjusta ka selle asendus replikatsiooni ja transkriptsiooni toimumist. *Gluc* aktiivsuse mõõtmistulemustest lähtuvalt on kõige madalam replikatsiooni/transkriptsiooni toimumise efektiivsus topelt C478A+S482A mutandil, kus on asendatud nii tsüsteiini- kui ka seriini jääk. Samuti ka ainult tsüsteiini jäägi asendus (C478A) blokeerib peaaegu täielikult replikatsiooni ja transkriptsiooni. Järelikult tsüsteiinil positsioonis 478 on väga oluline roll proteolüütilises aktiivsuses ja sellest tulenevalt ka replikatsioonis ja subgenoomse RNA sünteesis. Kõige madalam subgenoomse RNA sünteesi tase esineb trüptofaanijäägi asendamise (W479A) tagajärjel. Seega võib oletada, et trüptofaan samuti mängib olulist rolli proteaases aktiivsuses ja sellest tulenevalt subgenoomse RNA sünteesis. Lisaks näitavad tulemused, et *Fluc* aktiivsuse tasemed on kõrgemad *Gluc* aktiivsuse omadest C478A, W479A, C478A+S482A ja GAA mutatsioonide puhul (Joonis 11). See on ka

loogiline, kuna *trans*-replikaasi süsteemis *Fluc* ekspreereerub ka ilma matriits-RNA replitseerumiseta.



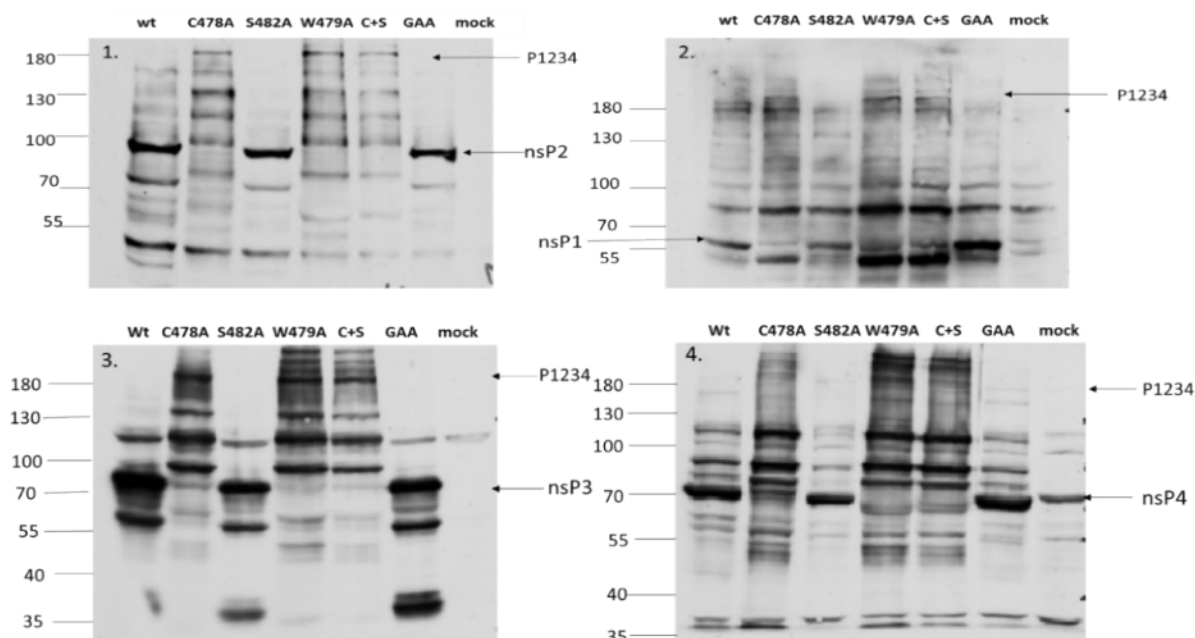
Joonis 11. CHIKV proteaasi punktmutatsioonidega replikaaside *Fluc*/*GAA* ja *Gluc*/*GAA* suhe. Joonisel on kujutatud *Fluc* ja *Gluc* aktiivsus polümeraas negatiivse mutandi (*GAA*) suhtes.

Eelnevalt on kirjanduses teda, et alfaviiruste nsP2 C-terminuses asuv proteaas sisaldab aktiivsaidis tsüsteini- ja histidiinjääki. Arvatakse, et tsüsteiin koos histidiiniga katalüüsib peptiid-sideme lõikamist. CHIKV proteaas erineb teiste alfaviiruste proteaasidest mitmete omaduste poolest. Arvatakse, et CHIKV proteaasi aktiivstsentris asuvat tsüsteiinijääki on võimeline katalüütiliselt asendada seriinjääk. Seega kasutatakse katalüüsis nii tsüsteiini- kui ka seriinjääki. Saadud tulemuste põhjal ei ole võimalik väita, et tsüsteiinijäägi asenduse tagajärjel suudab seriin asendada katalüütilist aktiivsust, kuna tsüsteiini muteerimisel (C478A) blokeeritakse proteaasne aktiivsus täielikult. Samuti asub proteaasi katalüütilises tsentris trüptofaanijääk, mis on ümbritsetud hüdfoobsete jääkide ja Van der Waals kontaktidega. Trüptofaan osaleb loop struktuuri, mis sisaldab katalüütilist histidiinjääki, stabiliseerimisel, kuid mitte katalüüsis. Trüptofaanijäägi asendused põhjustavad konformatsioonilisi muutusi ja seeläbi mõjutavad kaudselt proteaasi katalüütilisi omadusi ja seostumist substraatidega. (Saisawang jt., 2015) Saadud tulemused kinnitavad selles positsioonis trüptofaanijäägi olulisust CHIKV nsP2 proteaasile aktiivsusele.

Mittestruktuursete valkude e CHIKV nsP2 proteaasi punktmutatsioonide mõju mittestruktuursete valkude ekspressioonile

Mittestruktuursete valkude ekspressiooni transfekteeritud rakkudes kontrolliti *Western Blot* analüüsiga. Selleks transfekteeriti punktmutatsioonidega CHIKV replikaase kodeerivaid plasmiidid BSR rakkudesse ja rakud lüüsi ning seejärel teostati *Western Blot* analüüs. See võimaldab tuvastada mittestruktuurse polüproteiini ekspressiooni ning mittestruktuursete valkude ja ns polüproteiini vaheproduktide moodustumist proteolüütilise lõikamise tulemusel. Selleks kasutati CHIKV mittestruktuursete valkude vastaseid antikehi. Negatiivse kontrollina kasutati *mock* proovi ehk DNA-ga mitte transfekteeritud rakke ja positiivse kontrollina CHIKV metsiktüüpi polüproteiini kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud rakkude lüsaati (*wt*). Tulemustest on näha, et mittestruktuurne polüproteiin (P1234) on ekspresseerunud C478A, W479A ja C478A+S482A mutatsioonide korral. Samuti ka *wt*, S482A ja GAA mutatsiooni korral on toimunud ns polüproteiini ekspresseerumine, kuid see on formeerunud juba mittestruktuurseteks valkudeks, mistõttu pole *Western Blot* piltidelt võimalik näha ns polüproteiini. Negatiivse kontrolli (*mock*) puhul pole tuvastatav mitte ühegi valgu moodustumine. Ainult S482A ja GAA mutatsioone kandvate ja metsiktüüpi replikaaside korral on detekteeritavad kõik üksikud mittestruktuurset valgud (nsP1, nsP2, nsP3 ja nsP4), mille suurused vastavad eeldatule (vt. Materjal ja meetodika) (Joonis 12). Seega seriini jäägi asendus (S482A) proteaasi aktiivsaisdis ja polümeraasi aktiivsaisdi mutatsioon (GAA) ei mõjuta negatiivselt proteolüütilist aktiivsust. Mittestruktuurse polüproteiini (P1234) lõikamine mittestruktuurseteks valkudeks (nsP1-nsP4) toimub samamoodi nagu metsiktüübi puhul (Joonis 12). Nagu ka eelnevatest tulemustest oli näha, et S482A mutatsioon ei mõjuta negatiivselt replikatsiooni ega ka transkriptsiooni, siis on loogiline, et seriini jäägi asendus ei kahjusta proteaasi aktiivsust. Selle tulemusel toimub mittestruktuursete valkude moodustumine korrektselt, mis võimaldab replikatsiooni ja transkriptsiooni toimumist. Polümeraas negatiivne mutant (GAA) ei takista mittestruktuurse polüproteiini proteolüütilist lõikamist, sest polümeraasne aktiivsus ei ole vajalik proteolüüsi jaoks. Replikatsiooni ja transkriptsiooni toimumiseks on oluline polümeraasest aktiivsust kandev nsP4 valk, seetõttu puudub GAA mutandil replikatsiooni ja transkriptsiooni võime, kuid proteaasne aktiivsus on säilinud. Ülejäänud mutantsete replikaaside (C478A, W479A, C478A+S482A) puhul pole tuvastatav mitte ühegi mittestruktuurse valgu ega ns polüproteiini vaheprodukti moodustumine. Nende puhul on detekteeritav lõikamata mittestruktuurne polüproteiin (P1234) (Joonis 12). Seega, C478A, W479A ja C478A+S482A mutatsioonid blokeerivad täielikult proteolüütilist aktiivsust, mille tulemusel ei moodustu mitte ühtegi mittestruktuurset

valku. Seega võib järelda, et asendatud aminohappejääkidel on oluline roll proteaasi aktiivsuses.



Joonis 12. Mittestruktuursete valkude moodustumine CHIKV proteaasi punktmutatsioonide korral.

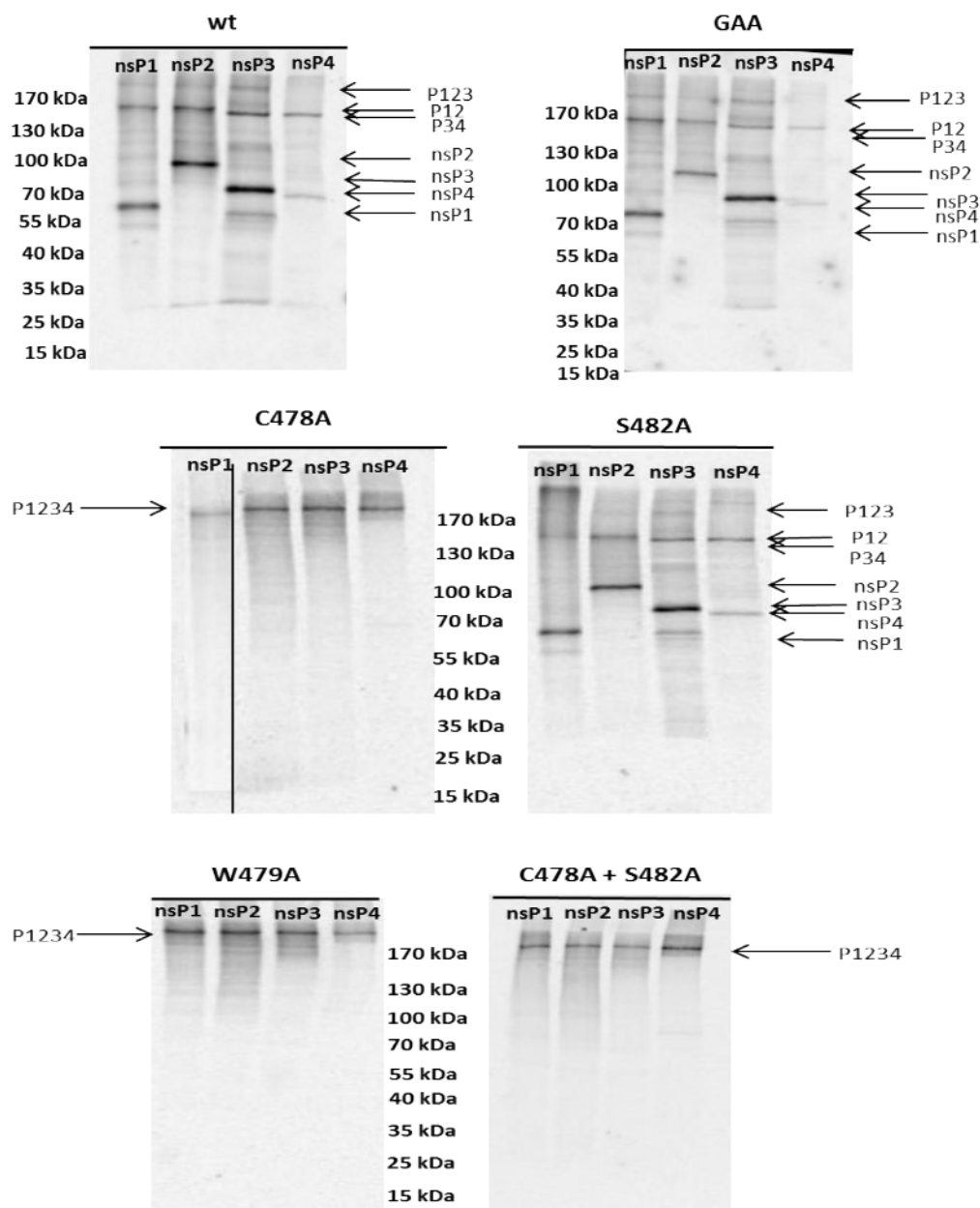
Proteaasi domeenis punktmutatsioone kandvate CHIKV replikaaside konstruktidega transfekeeritud BSR rakkude lüsaate lahutati 8% SDS-PAGE foreesil. CHIKV ns valke detekteeriti vastavate spetsiifiliste antikehadega *western blot* analüüsil. Paneelid: **1.** Anti-nsP1; **2.** Anti-nsP2; **3.** Anti-nsP3; **4.** Anti-nsP4. Iga paneeli kohal on viidatud mutatsioonide nimetused. Vasakul pool on viidatud valgumarkeri (*PageRuler Prestained Protein Ladder*) molekulmassid (kDa) ning nooltega on viidatud moodustunud mittestruktuurset valgud ja P1234 polüproteiin. *Mock* on negatiivne kontroll ehk DNA-ga mitte transfekeeritud rakulüsaat. *Wt* on positiivne kontroll ehk metsiktüüpi polüproteiini kodeeriva konstruktiga transfekeeritud rakulüsaat.

In vitro translatsioon CHIKV nsP2 proteaasi punktmutatsioonide mõju polüproteiini protsessingule *in vitro* translatsioonil

Eelnevalt kirjeldatud tulemused on saadud kasutades *trans*-replikaasi süsteemi imetajarakkudes. Selleks, et uurida proteaasi aktiivsaisid asuvate punktmutatsioonide otsest efekti polüproteiini protsessingule kasutati valkude metaboolset märgistamist *in vitro* translatsioonil. *In vitro* translatsiooni ja lõikamise käigus moodustunud valgulisi produkte detekteeriti immunosadestamisega. Tulemused on esitatud joonisel 13. S482A ja GAA

mutatsioone sisaldavate konstruktide korral lõigatakse ns polüproteiin efektiivselt mittestruktuurseteks valkudeks nagu ka metsiktüübi puhul – immunosadestamise järgselt on geelelektroforeesil selgelt detekteeritavad nii üksikud mittestruktuursed valgud, kui ka proteolüüsi vaheproduktid. Ülejäänud mutantsed proteaasid pole võimelised lõikama ns polüproteiini, mis on geelil detekteeritav kõrgmolekulaarse üksikproduktina. Seega immunosadestamise tulemused toetavad *western blot*-iga saadud tulemusikinnitades *trans*-replikaasi süsteemi kasutamise saadud tulemusi.

Üldiselt, kasutades *trans*-replikaasi süsteemi õnnestus näidata, et enamik antud töös uuritud mutatsioone proteaasi aktiivtsentris blokeerivad proteolüütilist aktiivsust ja seeläbi võimet replitseerida matriits-RNA-d ja sünteesida subgenoomset RNA-d.

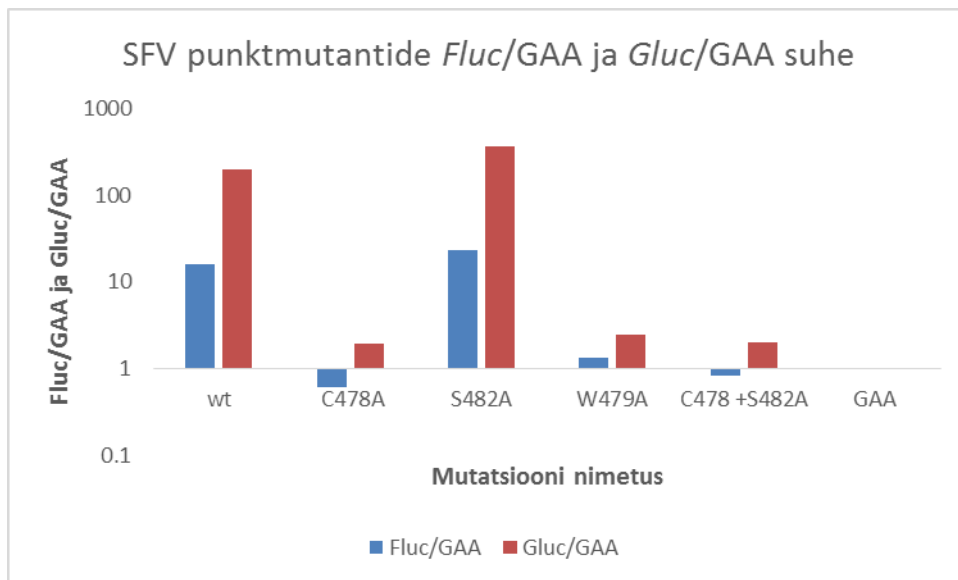


Joonis 13. Mittestruktuurse polüproteiini proteolüütilise lõikamise produktide detekteerimine immunosadestamisega. CHIKV proteaasi aktiivsaiidi punktmutatsioonidega polüproteiini kodeerivatele plasmiididega teostati *in vitro* translatsioon valkude märgistamisega radioaktiivse [³⁵S] väävli isotoopi sisaldava metioniiniga. Selleks, et detekteerida replikaasi valkude moodustumist proteolüütilise lõikamise tulemusel, kasutati immunosadestamist. Geelide radadel on näidatud sadestamiseks kasutatud vastavate mittestruktuursete valkude-vastaste antikehade nimetused (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4). Immunosadestamise tulemused on visualiseeritud *Typhoon Phosphoimager* i abil.

2.3.3 SFV nsP2 proteaasi punktmutatsioonide uurimine

Transfektsioon ja Fluc ning Gluc aktiivsuse mõõtmine SFV nsP2 proteaasi punktmutatsioonide mõju replikatsioonile ja transkriptsioonile

SFV punktmutatsioonide uurimiseks kasutati samuti *trans*-replikaasi süsteemi. Uuriti samu aminohappelisi asendusi proteaasi aktiivtsentris, mis ka CHIKV puhul (Tabel 4). SFV punktmutatsioone sisaldavaid replikaase kodeerivad plasmiidseid konstrukte koos matriits-RNA-d ekspresseerivate plasmiididega transfekteeriti BSR rakkudesse ja lüüsi 18 tunni möödudes, seejärel mõõdeti *Fuc* ja *Gluc* aktiivsus. Transfektsiooni ja sellele järgnevat mõõtmist teostati üks kord. Tulemustes on näidatud SFV punktmutatsioonidega replikaaside *Fluc* ja *Gluc* aktiivsus polümeraas negatiivse replikaasi (GAA) suhtes (Joonis 14). Kasutatud on CHIKV GAA mutatsiooniga replikaasi, mis on suhteliselt sarnane SFV-le. Saadud tulemused langevad kokku CHIKV proteaasi punktmutatsioonide *trans*-replikaasi katse tulemustega (Joonis 11). Kõige suurem *Fluc* ja *Gluc* aktiivsuse suhe on S482A mutatsiooni puhul ja kõige väiksem C478A ja C478A+S482A mutatsioonide puhul. W479A mutatsiooni sisaldava replikaasi *Fluc* ja *Gluc* aktiivsuse suhe on C478A+S482A replikaasiga suhteliselt samal tasemel (Joonis 14). Varasemalt on teada, et SFV nsP2 proteaasi katalüütilises tsentris on kesksel kohal Cys481 ja His558 aminohapped, mille asendamised viivad proteolüütilise aktiivsuse ja RNA sünteesi kadumisele. Samuti on näidatud, et Cys478 aminohappejääk on oluline proteolüütilise aktiivsuse jaoks ja sellest tulenevalt RNA replikatsiooni jaoks (Golbutsov jt., 2006). Seda tõestab ka käesoleva töö tulemus, mis näitab, et aminohappelises järjestuses positsioonis 478 oleva tsütseiini jäägi asendaminealaniiniga blokeerib täielikult võime replitseerida matriits-RNA-d. Tulemustest järeldub, et kõik aminohappelised asendused nsP2 proteaasis va. seriini jäägi asendus, takistavad replitseerimast matriits-RNA-d ja subgenoomse RNA sünteesi. Kuna aminohappelised asendused olid tehtud proteaasi domeeni aktiivtsentris, selle tulemusel on kadunud proteaasne aktiivsus ja seega RNA süntees oli takistatud. Seega kinnitavad tulemused asjaolu, et RNA süntees on sõltuv polüproteiini ekspressioonist ja lõikamisest mittestruktuurseteks valkudeks.



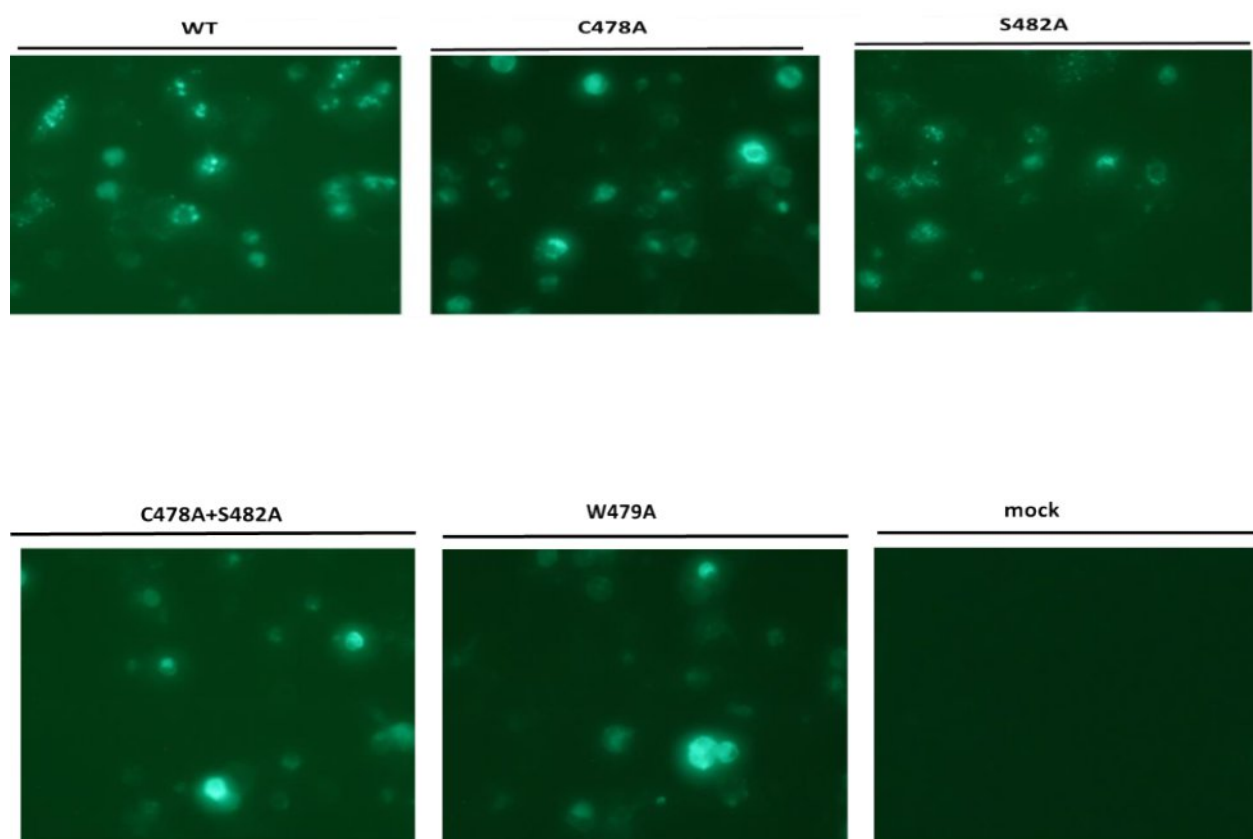
Joonis 14. SFV proteaasi punktmutatsioone sisaldavate replikaaside *Fluc/GAA* ja *Gluc/GAA* suhe. Joonisel on näidatud *Fluc* ja *Gluc* aktiivsus polümeraas negatiivse replikaasi (GAA) aktiivsuse suhtes.

ZsGreen signaali detekteerimine

Antud töös kasutatavates konstruktid SFV polüproteiini kodeeriv järjestus sisaldab nsP3 kodeerivas osas markervalgu (*ZsGreen*) järjestust. Tegemist on roheliselt fluorestseeruva valguga, mis võimaldab tuvastada polüproteiini (P123Z4) ekspressiooni rakkudes. Fluorestsentsmikroskoobi piltidelt (Joonis 15) on näha *ZsGreen*-i roheliselt fluoretseeruvat signaali kõikide mutatsioone sisaldavate ja metsiktüüpi replikaaside puhul. Seega rakkude transfektsiooni järgselt on toimunud kõigi mutatsioonide korral polüproteiini ekspressioon. Piltidel on täheldatavad ekspressioonimustri erinevused. S482A mutandi muster on sama metsiktüüpi polüproteiiniga (*wt*). Nende puhul on märgatav, et roheline signaal rakkudes pole jaotunud ühtlaselt, vaid on nähtav tsütoplasmas täpilise muustrina (Joonis 15). Selline muster on iseloomulik eraldi ekspresseeritud SFV nsP3-le (Peränen, 1991) ning selline pilt võib kaudselt olla tõestuseks, et polüproteiini protsessing on edukalt toimunud ning nsP3-*ZsGreen* liitvalk lokaliseerub vastavalt nsP3 muustrile. Ülejäänud mutantsete valkude muster erineb metsiktüüpi polüproteiini (*wt*) omast. Neid iseloomustab ühtalne roheline signaali jaotus rakkudes (Joonis 15). *ZsGreen* signaali detekteerimistulemustest järeldub, et SFV

polüproteiini kodeerivatelt plasmiididelt ekspreseedub edukalt mittestruktuurne polüproteiin BSR rakkudes.

Tulemustest lähtuvalt saab järeldada, et *trans*-replikaasi süsteem on efektiivne SFV punktmutatsioonide uurimiseks. See võimaldab teha olulisi järeldusi SFV nsP2 proteaases domeenis asuvate punktmutatsioonide mõju kohta nii replikatsioonile kui ka subgenoomse RNA sünteesile.



Joonis 15. SFV proteaasi mutatsioone sisaldavate replikaaside ekspressioon BSR rakkudes. SFV polüproteiini järjestused sisaldasid nsP3 kodeerivas osa roheliselt fluorestseeruva markervalgu *ZsGreen*'i järjestust. SFV polüproteiini kodeerivad plasmiidid transfekteeriti BSR rakkudesse ja nendes tuvastati polüproteiini ekspreseedumist fluorestsents-mikroskoobiga *ZsGreen* signaali detekterimisega. Proteaasi aktiivsentrü mutatsioonid on viidatud paneelide kohal; *WT* – metsiktüüpi replikaasi; *mock* – transfekteerimata rakud.

KOKKUVÕTE

Trans-replikaasi süsteem on efektiivne ja lihne tööriist, mida saab kasutada punktmutatsioonide funktsionaalses analüüsis ja teistes viroloogia alastes uurimustes. *Trans*-replikaasi süsteem on ülesehitatud matriits-RNA replitseerumisel ja sellelt sünteesitava subgenoomse RNA moodustumisel replikaasi valkude vahendusel. Selleks transfekteeritakse replikaasi valke kodeeriv plasmiidne konstrukt koos matriits-RNA-d kodeeriva plasmiidse konstruktiga imetajarakkudesse. Seal toimub juba matriits-RNA replitseerumine ja subgenoomse RNA süntees matriits-järjestuses sisalduvalt subgenoomselt promooterilt. Subgenoomse RNA sünteesi ja matriits-RNA replitseerumist hinnatakse matriits-RNA pealt ekspresseerivate markervalkude detekteerimise abil.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida *swap*- ja CHIKV ja SFV nsP2 proteaasi punktmutatsioone, kasutades selleks *trans*-replikaasi süsteemi. *Swap*-mutatsioonide uurimisel saadud tulemused näitavad, et domeenide vahetamise tulemusel oli transkriptsiooni tase oluliselt vähenenud. Sellest järeldub, et vahetatud replikaasi domeenid on olulised transkriptsiooni toimumisel. Kõige enam vähendas transkriptsiooni taset nsP2 ja Pro domeeni vahetamine. Sellest lähtuvalt järeldub, et nsP2 ja Pro domeenil on teistest olulisem roll subgenoomse RNA sünteesil. Tähelepanu väärib ka see, et nsP3 C-terminaalse domeeni vahetuse järgselt toimus subgenoomse RNA süntees metsiktüüpi replikaasiga samal tasemel. Seega pole see domeen vajalik transkriptsiooniks. Adapteerumise käigus tekkinud kompensatoorsete mutatsioonidega *swap*-mutandid ei olnud eriliselt edukamad subgenoomse RNA sünteesimisel. Kompensatoorsed mutatsioonid ei suurendanud ega ka vähendanud eriliselt *swap*-mutantsete replikaaside transkriptsiooni taset. Seega võib öelda, et enamik kompensatoorseid mutatsioone olid neutraalse mõjuga.

CHIKV ja SFV punktmutatsioonide uurimuse tulemused näitavad, et nsP2 proteaasi aktiivsaidis asuvad punktmutatsioonid kahjustavad oluliselt proteaasset aktiivsust ja selle tulemusel võimet replitseerida matriits-RNA-d ja sünteesida subgenoomset RNA-d. Saadud tulemused kinnitavad, et proteaasne aktiivsus on oluline replikatsiooni ja transkriptsiooni jaoks. Ainult seriini jäägi asendus proteaasi aktiivsaidis ei kahjustanud proteaasset aktiivsust ega võimet replitseerida matriits-RNA-d ja sünteesida subgenoomset RNA-d.

Trans-replikaasi süsteemi kasutamisega antud mutatsioonide uurimisel saadi palju informatsiooni nende mutatsioonide mõju kohta ja sellest tulenevalt mittestruktuursete valkude olulisuse kohta replikatsioonil ja transkriptsioonil. Kuna käesoleva töö raames osutus *trans*-replikaasi süsteemi kasutamine väga informatiivseks, siis väärib see kasutust ka teistes viroloogia alastes uurimustes.

Using alphaviral trans-replicase system for studying swap and point mutations

Siret Usar

SUMMARY

The *trans*-replication system is an effective and simple tool for studying point mutations in functional analysis and other research related to virology. The *trans*-replication system is built on uncoupling the alphaviral replicase expression and replication of the template RNA. To do this, the plasmid construct encoding for the non-structural polyprotein is transfected into mammalian cells with the plasmid construct encoding for the template RNA. There, the template RNA is replicated and the subgenomic RNA is synthesized from the subgenomic promoter with the help of replicase provided *in-trans*. The efficiency of synthesis of subgenomic RNA and replication of template RNA is evaluated by the detection of generated marker proteins encoded by the template plasmid.

The objective of this thesis was to examine the swap- and CHIKV and SFV point mutations of nsP2 protease using the *trans*-replication system. The results of studying swap-mutations showed that swapping of some domains significantly reduced transcription. Swapping of the whole nsP2 and Pro domain has caused the strongest decline in the synthesis of the subgenomic RNA, therefore these domains are essential for the effective subgenomic RNA synthesis. Swapping of other domains did not impact the subgenomic RNA synthesis as much. It is worth attention, that swapping of C-terminal domain of nsP3 had no negative effect to transcription. This indicates that this domain is not significant for transcription. The swap mutants with compensatory mutations generated during the adaptation were not significantly more successful in the synthesis of subgenomic RNA. Compensatory mutations did not significantly increase or decrease the transcription level of the swap mutants. Thus, the effect of compensatory mutations should be studied using other approaches.

An examination of the CHIKV and SFV point mutations demonstrated that the point mutations in the active site of the nsP2 protease significantly damage protease activity and, as a result, the ability to replicate the template RNA and synthesise subgenomic RNA. The results confirm that protease activity is essential for replication and transcription. Only the replacement of serine residue in the active site did not damage the replication and transcription of the template RNA indicating that this residue is not critical for nsP2 protease activity.

The analysis of these mutations using the *trans*-replication system provided a lot of information about the significance of different replicase domains and protease activity of

nsP2. Since the *trans*-replicase system used in this bachelor's thesis was very informative, it is worth using in the field of virology.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Atkins, G. J., Sheahanand, B. J. and Liljeström, P.** (1999). The molecular pathogenesis of Semliki Forest virus: a model virus made useful ? *J. Gen. Virol.* 80: 2287–2297.
- Barton, D. J., Sawicki, S. G. and Sawicki, D. L.** (1991). Solubilization and Immunoprecipitation of Alphavirus Replication Complexes. *J. Virol.* 65: 1496-1506.
- Cheng, R. H., Kuhn, R. J., Olson, N. H., Rossmann, M. G., Choi, H.K., Bakter, T.S.** (1995). Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. *Cell.* 80: 621-630
- cysteine protease of Chikungunya virus. *Vir. Res.;* 131: 293–298.
- Duijl-Richter, M. K. S., Hoornweg, T.E., Rodenhuis-Zybert, I.A. and Smit, J. M.** (2015). Early Events in Chikungunya Virus Infection - From Virus Cell Binding to MembraneFusion. *Viruses.* 7: 3647-3674.
- Fazakerley, J. K.** (2002). Pathogenesis of Semliki Forest virus encephalitis. *J. NeuroVirol.* 8(suppl. 2): 66–74, 2002.
- Froshauer, S., Kartenbeck, J. and Helenius, A.** (1988). Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes. *J. Cell. Biol.* 107: 2075–2086.
- Golubtsov, A., Kääriäinen, L. And Galdentey, J.** (2006). Characterization of the cysteine protease domain of Semliki Forest virus replicase protein nsP2 by in vitro mutagenesis. *FEBS Letters.* 7: 1502–1508.
- Gould, E. A., Coutard, B., Malet, H., Morin. B., Jamal, S., Weaver, S., Gorbalenya, A., Moureau, G., Baronti, C., Delogu, I., Forrester, N., Khasnationov, M., Gritsun, T., Lamballerie, X.de. and Canard, B.** (2010). Understanding the aplhaviruses: Recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. *Antivir. Res.* 87: 111-124.
- Graham, A., Walker, R., Baird, P., Hahn, C.N and Fazakerley, J.K.** (2005). CNS Gene Therapy Applications of the Semliki Forest Virus 1 Vector Are Limited by Neurotoxicity.
- Ketola, A., Hinkkanen, A., Yongabi F., Furu, P., Ma“ä”tta “, A., Liimatainen, T., Pirinen, R., Bjo“rn, M., Hakkarainen, T., Ma“kinen, K., Wahlfors, J. and Pellinen, R.** (2008). Oncolytic Semliki Forest Virus Vector as a Novel Candidate against Unresectable Osteosarcoma. *Cancer. Res.* 68: (20) 8342-8350.
- Khan, A. H., Morita, K., Parquet, M .C., Hasebe, F., Mathenge, E. G. M. and Igarashi, A.** (2002). Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J. Gen. Virol.* 83: 3075-3084.

- Knipe, D. M. and Howley, P. M.** 2001. Other Alphaviruses p. 1052-1054. In: Fields' Virology. 5th ed. USA.
- Kujala, P., Ikäheimonen, A., Ehsani, N., Vihinen, H., Auvinen, P. and Kääriäinen, L.** (2001). Biogenesis of the Semliki Forest Virus RNA Replication Complex. *J. Virol.* 75: 3873–84.
- Kääriäinen, L. and Ahola, T.** (2002). Functions of alphavirus nonstructural proteins in RNA replication. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 71: 187-222.
- Leung, J. Y., Ng, M. M. and Chu, J. J. H.** (2011). Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. *Advances in Virology.* 9: 2-9.
- Liljeström, P. and Garoff, H.** (1991). Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *J Virol.* 65: 147–54.
- Linger, B. R., Kunovska, L., Kuhn, R. J. and Golden, B. L.** (2004). Sindbis virus nucleocapsid assembly: RNA folding promotes capsid protein dimerization. *RNA.* 10: 128–138.
- Lu, Y. and Kielian, M.** (2000). Semliki Forest Virus Budding: Assay, Mechanisms, and Cholesterol Requirement. *J. Virol.* 74 : 7708–19.
- Lulla, A., Lulla, V. And Merits, A.** (2012). Macromolecular assembly-driven processing of the 2/3 cleavage site in the alphavirus replicase polyprotein. *J Virol.* 86: 553–65.
- Melancon, P. and Garoff, H.** (1987). Processing of the Semliki Forest virus structural polyprotein: role of the capsid protease. *J Virol.* 61: 51301–9.
- Merits, M., Vasiljeva, L., Ahola, T., Kääriäinen, L. and Auvinen, P.** (2001). Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein by nsP2 protease. *J.Gen.Virol.* 82: 765–773.
- Panas, M. D., Ahola, T. and McInerney, G. M.** (2014). The C-terminal repeat domains of nsP3 from the Old World alphaviruses bind directly to G3BP. *J.Virol.* 88(10):5888-93.
- Park, E. and Griffin, D.** (2009). The nsP3 macro domain is important for Sindbis virus replication in neurons and neurovirulence in mice. *Virol.* 10: 305–314
- Peränen, J.** (1991). Localization and phosphorylation of Semliki Forest virus non-structural protein nsP3 expressed in COS cells from a cloned cDNA. *J.Gen.Virol.* 9:72-195.
- Peränen, J. and Kääriäinen, L.** (1991). Biogenesis of type I cytopathic vacuoles in Semliki Forest virus-infected BHK cells. *J. Virol.* 65: 1623–7.
- Peränen, J., Laakkonen, P., Hyvonen, M. And Kääriäinen, L.** (1995). The Alphavirus Replicase Protein nsP1 Is Membrane-Associated and Has Affinity to Endocytic Organelles. *Virol.* 208: 610-620.

- Rougeron, V., Sam. I-C., Caron, M., Nkoghe, D., Leroy, E. and Roques, P.** (2015). Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *J. Clin. Virol.* 64: 144-152.
- Rupp, J. C., Sokoloski, K. J., Gebhart, N. N. and Hardy, R. W.** (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J. Gen. Virol.* 96: 2483–2500.
- Saisawang, C., Saitornuang, S., Sillapee, P., Ubol, S., Smith, D. R. and Kettreman, A.** (2015). Chikungunya nsP2 protease is not a papain-like cysteine protease and the catalytic dyad cysteine is interchangeable with a proximal serine. *Scientific Reports.* 5: 1–10.
- Sawicki, D. L. and Sawicki, S. G.** (1980). Short-lived minus-strand polymerase for Semliki Forest virus. *J. Virol.* 34: 1108–18.
- Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L., Devaux, C.** (2009). Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virol.* 393: 183-197.
- Spuul, P., Balisteri, G., Hellström, K., Golubtsov, A., Jokitalo, E. and Ahola, T.** (2011). Assembly of Alphavirus Replication Complexes from RNA and Protein Components in a Novel trans-Replication System in Mammalian Cells. *J. Virol.* 85: 4739–4751.
- Spuul, P., Balistreri, G., Kääriäinen, L. and Ahola, T.** (2010). Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. *J. Virol.* 84: 7543–7557.
- Staples, J .E., Breiman, R. F., Powers, A. M.** (2009). Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clin. Infect. Dis.* 49: 942–948.
- Strauss, J. H., Strauss, E. G.** 2008. Alphaviruses, p 89-105. In: *Viruses and Human Diseases*, 2nd ed. Elsevier Academic Press, Canada.
- Strauss, J. H. and Strauss, E. G.** (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58: 491–562.
- Teppor, M.** (2014). Alfaviiruste replikaasi kompleksi struktuuri uurimine valkude homologsete domeenide vahetamisega. Tartu Ülikool. Loodus- ja Tehnoloogiateaduskond, Molekulaar-ja Rakubioloogia Instituut, Molekulaar ja Viroloogia õppetool. Bakalaureusetöö.
- Tsetsarkin, K.A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E., Higgs, S.** (2007). A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 3(12) : e201.
- Utt, A., Quirin, T., Saul, S., Helleström, K., Ahola, T. and Merits, A.** (2016). Versatile Trans-Replication Systems for Chikungunya Virus Allow Functional Analysis and Tagging of Every Replicase Protein. *PLoS ONE.* 27: 1-27.

Vasiljeva, L., Valmu, L., Kääriäinen, L. and Merits, M. (2001). Site-specific Protease Activity of the Carboxyl-terminal Domain of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP2. *J. Biol. Chem.* 276(33): 30786-93.

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

Weaver, S. C., Osorio, J. E., Livengood, J. A., Chen, R. and Stinchcomb, D. T. (2012). Chikungunya virus and prospects for a vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 11(9): 1087–1101.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

http://viralzone.expasy.org/all_by_species/625.html

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Siret Usar

(sünnikuupäev: 19.09.94)

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

„Alfaviiruse-põhise trans-replikatsiooni süsteemi kasutamine swap- ja punktmutatsioonide uurimisel“

mille juhendaja 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, vähemalt kaks aastat hiljem.

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

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

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

Tartus 24. mai 2016