

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

INGRID HÄÄL

SEMLIKI FOREST VIIRUSE MITTESTRUKTUURSEID VALKE
EKSPRESSEERIVATE RAKULIINIDE KONSTRUEERIMINE JA
ISELOOMUSTAMINE

MAGISTRITÖÖ
VIROLOOGIA ERIALAL

Juhendaja prof. ANDRES MERITS

TARTU 2004

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	5
I KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Alphaviirused ja alpha-sarnased viirused	7
1.2 Semliki Forest viirus (SFV).....	8
1.3 SFV virion	8
1.4 SFV genoom.....	9
1.5 SFV replikatsioonitsükkel	11
2.1 SFV MITTESTRUKTUURSETE VALKUDE FUNKTSIOONID	15
2.2 nsP1	15
2.2 nsP2	18
2.3 nsP3	21
2.4 nsP4	22
II EKSPERIMENTAALNE OSA	24
UURIMISTÖÖ EESMÄRGID	24
MATERJAL JA METOODIKA	25
TULEMUSED JA ARUTELU	39
1. Semliki Forest viiruse mittestruktuursete valkude ekspressioon indutseeritavates HEK 293 T-RExTM põhistes rakuliinides	39
1.1. Rakuliinide konstrueerimine.....	39
1.2. Kontrolleksperiment 1: EGFP ekspressiooni indutseerimine (Tet-OFF süsteemi kontroll)	40
1.3. Kontrolleksperiment 2: Rekombinantse valgu indutseerimise dünaamika.....	40
1.4. Rekombinantsete valkude ekspressioon indutseeritavates rakuliinides.....	41
1.5. SFV polüproteiine ekspresseerivad rakuliinid.....	46
1.6. SFV mittestruktuursete valkude lokaliseerimise uurimine rakus immuunofluorestsentsmeetodit kasutades	58
1.7. Ekspresseeritavate SFV mittestruktuursete valkude pooleluea määramine	63
2. Ekspresseeritavate SFV ns-valkude mõju rakule	68
2.1. SFV valkude põhjustatud tsütotoksilise efekti uurimine	69
2.2. SFV mittestruktuursete valkude ekspressiooni mõju raku metabolismile.....	73
3. Ekspresseeritavate valkude mõju SFV infektsioonile rakkudes	74
3.1. Rakkude vastuvõtlikuse analüüs.....	75
3.2. Mõju rekombinantse valgu ekspressioonile	75
KOKKUVÕTE	81
SUMMARY	83
KASUTATUD KIRJANDUS	85

KASUTATUD LÜHENDID

ah – aminohape
ATP – adensiin trifosfaat
ATPaas – adensiintrifosfataas
bp – aluspaar
BSA – veise seerumi albumiin
cDNA – komplementaarne DNA
CPV-I – tüüp I tsütoplasmaatilised vakuoolid
DNA – desoksüribonukleiinhape
DTT – ditiotreitool
EDTA – etüleendiamiintetraädikhape
GMP – guanosiin monofosfaat
GT – guanülültransferaas
GTP – guanosiin trifosfaat
IgG – immuunoglobulin G
kDa – kilodalton
moi – infektsiooni kordsus
MT – metültransferaas
NLS – tuuma lokalisatsiooni signaal
nsP – mittestruktuurne valk
nt – nukleotiid
NTP – nukleosiid trifosfaat
NTPaas – nukleosiid trifosfataas
PAGE – polüakrüülamiid geel-elektroforees
PBS – fosfaatpuhvriga sooladelahus
RdRp – RNA-st sõltuv RNA polümeraas
RNA – ribonukleiinhape
rpm – pööret minutis
SDS – naatrium dodetsüülsulfaat
SFV – Semliki Forest viirus
SIN – Sindbis viirus

TAE – Tris/Atsetaat/EDTA puhver

TE – Tris-EDTA puhver

Tris – trishüdrosümetüülaminmetaan

ts – temperatuuritundlik

VLP – viirus-laadne partikkel

wt – metsikut tüüpi

SISSEJUHATUS

Viirused on osa Maa ökosüsteemist. Kuigi üldiselt ei peeta neid elusorganismideks, võtavad nad aktiivselt osa energia- ja informatsiooni vahetusest ümbritsevas keskkonnas. Inimesele pakuvad nad huvi mitmes aspektis, sealhulgas nende paljunemine, elutsükkel ning patogeensus. Tänu oma suhteliselt lihtsale ehitusele on paljudest viirustest saanud mudelobjektid mitmete eluprotsesside uurimiseks.

Sugukond *Togaviridae* kuulub positiivse polaarsusega RNA genoomsete viiruste hulka, mis moodustavad kõigist kaasajal tuntud viiruste rühmadest kõige suurema ja heterogeensema grupi. Perekonda *Alphavirus* kuulub omakorda ligi kolmkümmend liiki inimese ja loomade patogeene. Alphaviirused omavad laia peremeeste ringi ning on võimelised replitseeruma erinevates rakutüüpides. Semliki Forest viirus (SFV) on üks selle perekonna enim uuritud esindajaid, kuna ta on inimesele suhteliselt ohutu ning laboritingimustes kergesti kasvatatav.

Käesoleva töö kirjanduse ülevaates kirjeldatakse SFV genoomi ülesehitust, antakse ülevaade viiruse replikatsioonitsüklist. Erilist tähelepanu on osutatud SFV poolt kodeeritud mittestruktuursete valkude kirjeldamisele. SFV mittestruktuursete valke on uuritud ca kaks aastakümnet, kasutades selleks nii biokeemilisi, rakubioloogilisi kui ka tehnogeneetilisi (rekombinantsete valkude) uurimise meetode. Sellele vaatamata on käesoleval ajal olemasolev informatsioon väga piiratud ja seda paljuski adekvaatsete eksperimentaalsete süsteemide puudumise tõttu. Seepärast oli antud töö eesmärgiks uue ja potentsiaalselt efektiivse *in vivo* süsteemi loomine, selle omaduste ja efektiivsuse hindamine.

Töö eksperimentaalne osa seisneb stabiilsete indutseeritavate SFV mittestruktuursete valke ekspresseerivate rakuliinide konstrueerimises ja iseloomustamises. Antud magistritöös toodud uurimus kujutab endast laiaulatusliku uurimistöö kokkuvõtet, kus on välja toodud seni saavutatud tulemused, samuti ka kirjeldatud ilmnunud probleemid ning kavandatud edasised uurimissuunad.

Käesolev töö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja rakubioloogia Instituudi mikrobioloogia ja viroloogia õppetooli juures. Täna professor Andres Meritsat juhendamise ning kasulike nõuannete eest. Samuti täna kõiki teisi mind abistanud inimesi.

I KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Alphaviirused ja alpha-sarnased viirused

Positiivsed RNA-genoomsed viirused moodustavad suurima tuntud viiruste rühma, mis jaguneb gruppidesse, mida nimetatakse supersugukondadeks. Kokku on tuntud kolm sellist supersugukonda, mida nimetatakse vastavalt picorna-sarnasteks, alpha-sarnasteks ja flavi-sarnasteks viirusteks. Alphaviiruse-sarnasesse supersugukonda kuuluvad loomaviirused perekondadest *Alphavirus* ja *Rubivirus*, kollatõve E viirus, putukaviirused sugukonnast *Tetraviridae* ning mitmed taimeviirused perekondadest *Tobamo-*, *Hordei-*, *Tymo-* ja *Potexvirus* (Koonin & Dolja, 1993).

Alphaviirused (perekond *Alphavirus* sugukond *Togaviridae*) on suhteliselt väikesed lipiidse ümbrise ja positiivse polaarsusega RNA-genoomsed viirused. Perekonda *Alphavirus* kuulub ligi kolmkümmend liiki inimese ja loomade patogeene. Nad omavad laia peremeeste ringi ning on võimelised replitseerima erinevates rakutüüpides. Alphaviiruste looduslikuks reservuaariks võib lugeda nii imetajaid, linde, kalu kui ka alphaviiruse putukvektoreid - moskiitoid.

Üle kümne alphaviiruse genoomi on täielikult või osaliselt sekveneeritud. Saadud andmed näitavad, et erinevate alphaviiruste genoomid on sarnase ülesehitusega. Struktuursete valkude aminohappejärjestustes on sarnasust 45 % ning mittestruktuursetes valkudes 60 % (Strauss & Strauss, 1994). Samuti on sekveneerimise tulemuste analüüs võimaldanud uurida alphaviiruste evolutsiooni. Saadud andmed näitavad, et RNA viirustele tüüpiliselt on alphaviiruste evolutsioon olnud kiire ja mõned arvutused annavad alust arvata, et tänapäeva alphaviiruste esivanem on tekkis alles 3 000 aastat tagasi (Weaver *et al.*, 1993).

Perekonna *Alphavirus* tüüpesindajateks on Sindbis viirus (SIN) ja Semliki Forest viirus (SFV). SIN ja SFV on olnud molekulaarviroloogide huviorbiidis juba üle aastakümnete. Neid viiruseid on muuhulgas kasutatud uurimustes, mis käsitlevad

glükoproteiinide transporti ja modifitseerimist raku, endotsütoosi ning membraanide fuseerumise mehhanisme (Ellgaard & Helenius, 2003; Helenius, 1995; Helenius & Aebi, 2001; Kielian, 1995). Viimase kümne aasta jooksul on alphaviiruste replikone kasutatud ekspressioonivektoritena erinevateks baasiringuteks, vaktsiinide ning rekombinantsete valkude tootmiseks ja geeniteraapia vektoritena (Frolov *et al.*, 1996).

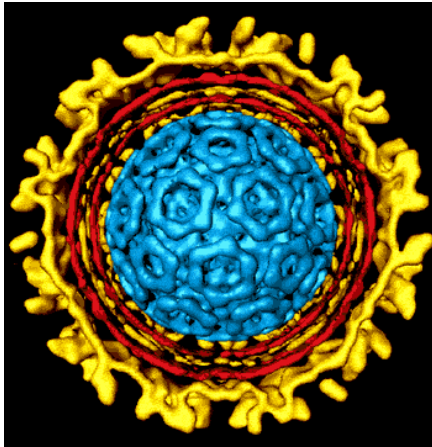
1.2 Semliki Forest viirus (SFV)

SFV isoleeriti Ugandas 1942. aastal moskiitodest ja on tänapäeval molekulaarsel tasandil üks kõige paremini iseloomustatud alphaviiruseid. SFV-d on võimalik kasvatada koekultuuri rakkudes kõrge tiitrini ja tema laboratoorsed tüved on inimesele avirulentsed (Strauss and Strauss, 1994), samal ajal kui SFV looduslikud tüved võivad põhjustada mõõdukaid ja harvem ka tõsiseid kesknärvisüsteemi infektsioone. SFV nakkus põhjustab imetaja koekultuurirakkudes mimeid tsütopaatilisi muutusi ja peremeesrakk sureb üldjuhul 20 tunni jooksul. Mitmed andmed näitavad, et üldjuhul indutseerivad alphaviirused rakkude programmeeritud surma (apoptoosi). Hiirtel põhjustab SFV nakkus letaalselt entsefaliiti ning seepärast kasutatakse SFV-d mudelviirusena viirusliku neuropatogeneesi uurimisel (Atkins *et al.*, 1999; Fazakerley, 2002). Putukarakkudele on SFV nakkus apatogeenne ja persistentne.

1.3 SFV virion

SFV virion on sfääriline, 65-70 nm diameetriga ning ümbrisega partikkel (joonis 1). Virioni sees paikneb 30 nm läbimõõduga nukleokapsiid, mis koosneb 240 kapsiidi valgu (C- valgu) koopiast (T=4 sümmeetria) ja sisaldab ainult ühte üheaheelalist genoomse RNA-d molekuli (nn. 42S RNA-d) (Mancini *et al.*, 2000). Kapsiidivalgud virionis on tihedalt kokku pakitud ja oma struktuurilt ning funktsioonilt kujutavad nad endast kümotrüpsiini-sarnast seriin-proteaasi (Choi *et al.*, 1991). SFV nukleokapsiidi ümbritseb peremehe plasmamembraanist pärit lipiidne kaksikkiht. Lipiidid moodustavad virioni kuivkaalust 30% ja on rikkad kolesterooli ja sfingolipiidide sisalduse poolest (Corver *et al.*, 1995; Kielian & Helenius, 1984).

Viiruse ümbris sisaldab heterodimeeride kujul transmembraanseid viiruse glükoproteiine E1 ja E2 (integraalsed membraani valgud) ning veel väikest perifeerset membraanivalku E3. Need struktuurid moodustavad omakorda 80 membraanset kompleksi, millest igaüks koosneb kolmest E1-E2 paarist ja mis ulatuvad lipiidsest kaksikkihist välja. Seega on SFV virionis kapsiidi ja ümbrisevalkude molaarne vahekord 1:1 (Cheng *et al.*, 1995).



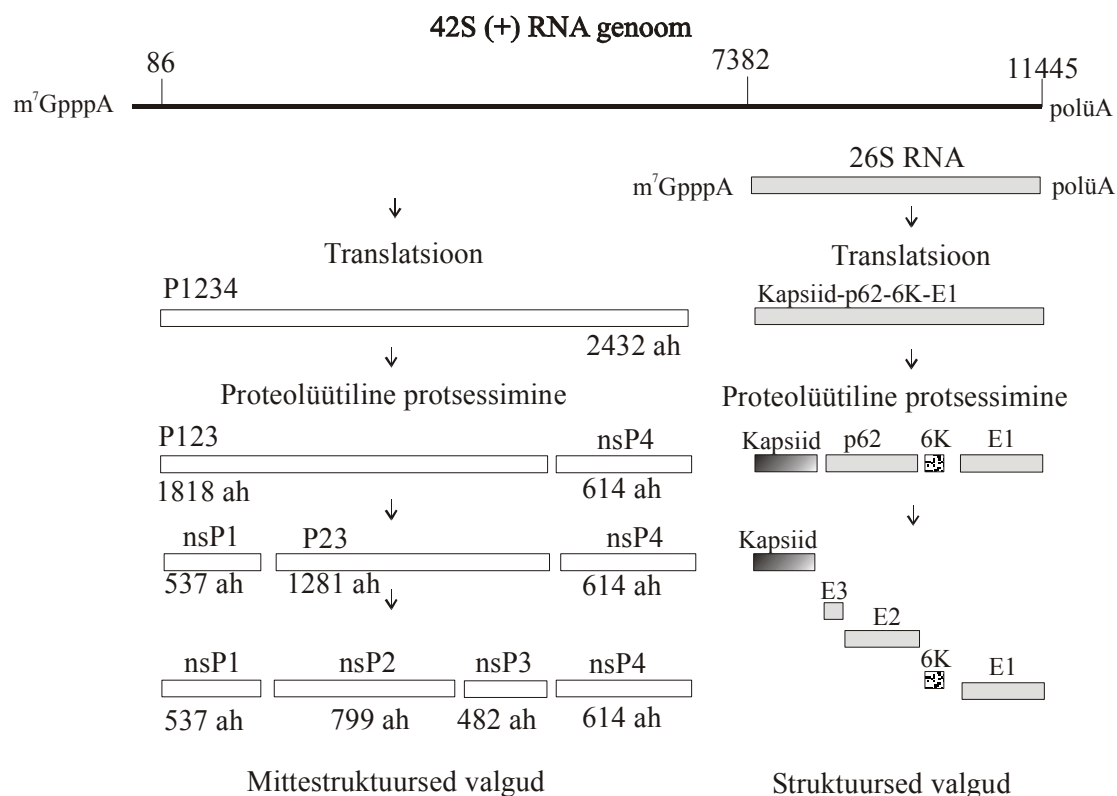
Joonis 1. SFV virioni ehituse skeem. Sinisega on tähistatud nukleokapsiid, kollasega glükoproteiinid (<http://biochem.ncsu.edu/faculty/brown/brown.htm>).

1.4 SFV genoom

SFV genoomiks on positiivse polaarsusega lineaarne ühe-ahelaline RNA pikkusega 11 445 nukleotiidijääki. Genoomse RNA 5'-otsas on 7-metüülguanosiinist cap struktuur (ehk kaabu) (m^7G , 7-metüülguanosiin) nagu rakulistel mRNA-delgi (Dubin *et al.*, 1977; Pettersson *et al.*, 1980; Wengler & Gross, 1979). Genoomse RNA 3'-otsas paikneb polü(A) saba.

Genoomse RNA 5'-poolne kaks kolmandikku kodeerib mittestruktuurseid valke (nsP), mis on vajalikud viiruse RNA replikatsiooniks. SFV genoomi 3' üks kolmandik kodeerib struktuurseid valke (joonis 2). Nakkuse ajal esineb rakkudes peale genoomse 42S RNA ka lühem, 26S subgenoomne mRNA, mis sünteesitakse viiruselise RNA polümeraasi (nimetused tulenevad nende sedimentatsioonikiirusest). Subgenoomne 26S RNA on järjestuselt identne genoomse RNA 3' terminaalsele 1/3-

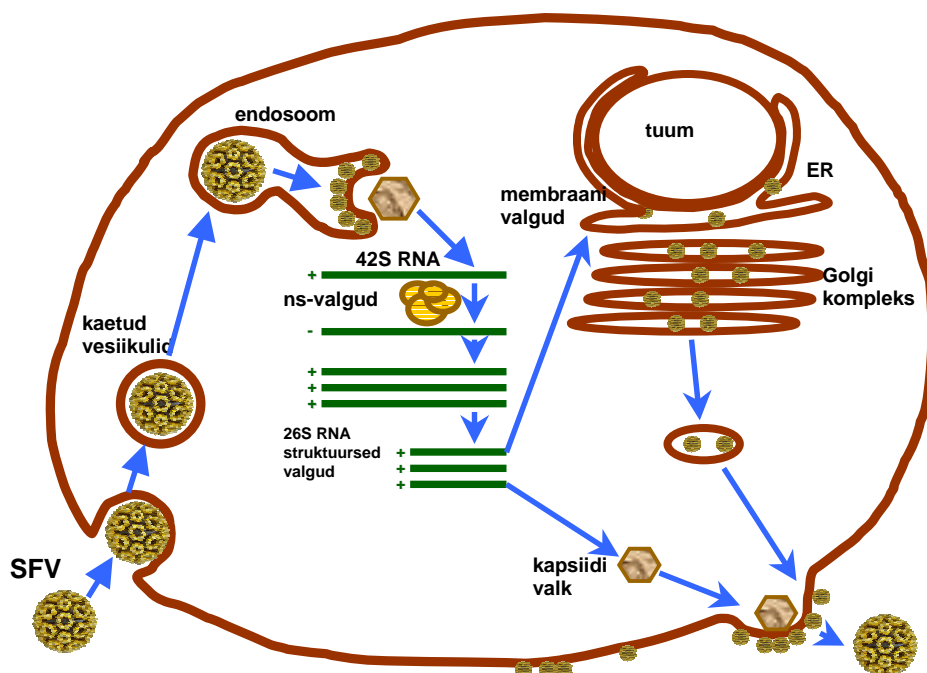
le. Ka see RNA omab cap-struktuuri, polü(A) järjestust ning funktsioneerib mRNA-na viiruse struktuursete valkude sünteesil (Strauss and Strauss, 1994). Subgenoomset RNA-d leidub hilises infektsioonis SFV-ga nakatatud rakus umbes kaks korda rohkem kui genoomset RNA-d.



Joonis 2. SFV genoomse organisatsiooni, translatsiooni ja polüproteiini protsessingu skeem. SFV 42S RNA ja 26S RNA translatsiooni produktideks on vastavalt mittestruktuursed ja struktuursed polüproteiinid. Numbrid genoomil osutavad nukleotiidijäakide numbritele SFV genoomis. Mõlemad translatsiooni produktid on polüproteiinid, mis hiljem protsessitakse viiruseliste või rakuliste proteaaside poolt. Genoomne ja subgenoomne RNA omavad 5' metüleeritud cap'i ja 3' polü(A) järjestust.

1.5 SFV replikatsioonitsükkel

SFV rakuline retseptor ei ole üheselt teada, virionis paiknevaks antireseptoriks on E2 valk. Seandumine rakule toimub retseptor-antireseptor interaktsioonide vahendusel, seandumisele järgneb rakku sisenemine. Alphaviirused sisenevad rakku retseptor-vahendatud klatriin-sõltuva endotsütootilise mehhanismi abil (DeTulleo & Kirchhausen, 1998; Helenius *et al.*, 1980) ja on võimelised nakatama erinevaid rakutüüpe. Happeline keskkond endosoomis (pH 6.2 ja vähem) põhjustab konformatsioonilisi muutusi viiruse ümbrises, mis annab tõuke viiruse ümbrise ja endosoomse membraani ühinemiseks (Marsh *et al.*, 1983). On näidatud, et madal pH on vajalik SFV glükoproteiinide fusogeenseks aktiveerimiseks: E1E2 heterodimeerid dissotsieeruvad ning vabanenud E1 subühikud trimeriseeruvad (Klimjack *et al.*, 1994; Wahlberg & Garoff, 1992). Moodustunud E1 trimeerid kujutavad endast SFV aktiivset liitumiskompleksi, mis interakteerub endosoomide membraaniga ja indutseerib virioni ja raku membraanide liitumise. Selle tulemusena vabaneb viiruse nukleokapsiid tsütoplasmasse, kus leiab aset RNA genoomi lahtipakkimine. Selles protsessis osalevad raku ribosoomid, mis vabastavad RNA teda ümbritsenud kapsiidivalgust (Singh & Helenius, 1992). Kapsiidivalgust vabanenud viiruseline RNA on valmis transleerimiseks (joonised 2 ja 3).



Joonis 3. Skemaatiline joonis SFV replikatsioonitsüklist (seletused tekstis).

SFV replikatsioon leiab aset nakatunud raku tsütoplasmas ja seda viib läbi viiruse kodeeritud RNA polümeraasne kompleks. Infektsiooni algul transleeritakse nukleokapsiidist vabanenud 42S RNA 5' kahelt kolmandikult mittestruktuurne polüproteiin (P1234, 2432 ah) (Kaariainen *et al.*, 1987). Viiruseline mittestruktuurne proteaas (nsP2) lõikab polüproteiini autokatalüütiliselt neljaks mittestruktuurseks valguks (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) (joonis 2). See on hästi koordineeritud protsess ja omab määravat tähtsust viiruse replikatsiooni regulatsioonis.

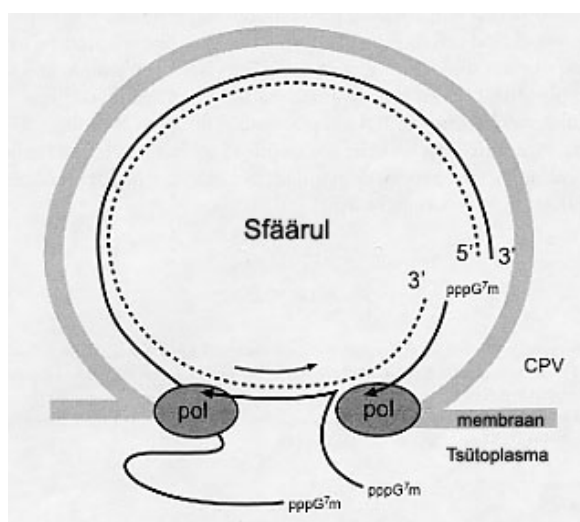
Esmalt lõigatakse eellasvalk P1234 mittestruktuurseteks P123 ja nsP4 valkudeks. Moodustub nn. varane RNA polümeraas (P123 + nsP4), mis vastutab täispika komplementaarse RNA (42S RNA negatiivne ahel) sünteesi eest. Varajase polümeraasi ebastabiilsus tingib selle, et negatiivset ahelat toodetakse ainult nakkuse varajases faasis (kestab umbes kolm tundi) (Sawicki & Sawicki, 1980). Seega on negatiivse RNA ahela süntees reguleeritud ja sõltub viirusvalkude juurdesünteesist.

Polüproteiini P123 edasisel lõikamisel moodustuvad nsP1, nsP2 ning nsP3 valgud, mis koos nsP4 valguga moodustavad hilise RNA polümeraasi. See ensüüm kasutab sünteesitud negatiivset ahelat matriitsina uute 42S RNA positiivsete ahelate ja subgenoomse 26S RNA sünteesiks (Kaariainen & Ahola, 2002; Kaariainen, *et al.*, 1987).

Subgenoomset 26S RNA-d transkribeeritakse sisemiselt promootorilt, mis asub RNA negatiivses ahelas ja kattub osaliselt nsP4 valku kodeeriva regiooniga. Juba 8h pärast SFV-ga nakatumist on ühes BHK21 rakkus keskmiselt sünteesitud ca. 20000 molekuli 42S ja 26S RNA-d (Tuomi *et al.*, 1975) ning 5000 negatiivset RNA ahelat (Wang *et al.*, 1991). 42S ja 26S positiivsete ahelate tootmine jätkub kuni raku surmani.

Viiruse positiivse polaarsusega RNA-de tootmine ehk hiline RNA süntees toimub tüüp I tsütoplasmaatilistes vakuoolides (*type I cytoplasmic vacuoles*, CPV-I). CPV-I-d on vesikulaarsed struktuurid (diameeter varieerub 0.6-2.0 µm vahel), mis kujutavad endast modifitseeritud lüsoosome ja endososome ning on tihti lähedalt seotud endoplasmaatilise retiikulumiga. See annab alust arvata, et viiruse RNA replikatsioon, translatsioon ja pakkimine on kontsentreeritud tsütoplasma kindlasse regiooni (Froshauer *et al.*, 1988). Lisaks on näidatud, et selles piirkonnas võib ka toimuda struktuursete valkude translatsioon ja sünteesitud genoomse RNA pakkumine

nukleokapsiidi (Froshauer, et al., 1988). CPV-de membraane iseloomustab spetsiifiliste 50 diameetriga sissesopistuste (sfäärulid), mis on ühenduses tsütoplasma, paiknemine CPV-I siseküljel. Olemasolevad andmed näitavad, et sfäärulites paikneb viiruse replikatsioonikompleks ja toimub RNA süntees (joonis 4). Samuti on leitud, et taolised sfäärulid on iseloomulikud kõikidele seni uuritud alpha-sarnastele viirustele. Sfäärulite moodustumise mehhanismi kohta on tänapäeval veel väga vähe teada. Muuhulgas on sfääruleid tuvastatud ka nakatunud raku pinnal ca. 3 tundi peale infektsiooni algust (Kujala *et al.*, 2001).



Joonis 4. SFV positiivsete 42S RNA ahelate sünteesi hüpoteetiline mudel. Negatiivse polaarsusega RNA matriits (tähistatud punktiirjoonega) moodustab tõenäoliselt dupleksi positiivse ahelaga (pidev joon). Hilised RNA polümeraasi molekulid (pol) koosnevad nsP1-nsP4 valkudest ning on kinnitunud membraanile. Kaheaahelaline RNA matriits keerleb läbi kahe erineva polümeraasi kompleksi noolega näidatud suunas. Uued positiivse polaarsusega RNA ahelad sünteesitakse poolkonservatiivse replikatsiooni käigus. Cap-struktuur lisatakse viiruse ensüümide poolt kotranskriptsiooniliselt (Kaariainen and Ahola, 2002).

Viiruse 26S RNA-lt transleeritakse struktuurne polüproteiin C-p62(E3E2)-6K-E1 (joonis 2). 26S RNA translatsiooni alustavad vabad ribosoomid, nende poolt transleeritakse kapsiidivalgu kodeeriv regioon. Järgnevalt lõikab kapsiidivalk end autokatalüütiliselt sünteesitud liitvalgust lahti. Protsessingu tulemusena vabaneb E3 valgu N-terminuses paiknev signaalpeptiid, mille funktsiooniks on juhtida 26S RNA-d transleerivad ribosoomid endoplasmaatilise retiikulumi membraanile, kus leiab aset edasine translatsioon.

Struktuurse polüproteiini edasine protsessimine toimub peremeesraku ensüümide abil. Rakulise päritoluga signaalpeptidaas lõikab p62 ja 6K ning 6K ja E1 vahelt. 6K omab signaaljärjestust, mis on oluline polüpeptiidi p62-6K-E1 ER-i translokatsioonil. E1 subühik ja p62 (E2 eelvalk) transporditakse karedapinnalisele endoplasmaatilisele retiikulumile, kus nad glükosüleeritakse ja moodustavad stabiilse heterodimeerse kompleksi. Dimeer transporditakse läbi Golgi kompleksi raku membraanile.

p62 eelvalgu protsessing E2 ja E3 valguks toimub hilises sekretoorses rajas (*trans*-Golgis), moodustunud E1, E2 ja E3 transporditakse seejärel plasmamembraanile (Lu & Kielian, 2000; Sariola *et al.*, 1995). Lisaks sellele, et valk 6K funktsioneerib signaaljärjestusena valgu E1 inserteerimiseks endoplasmaatilise retiikulumi membraani (Liljestrom & Garoff, 1991) suurendab ta ka membraanide läbilaskevõimet (Sanz *et al.*, 1994) ning viiruse pungumist eukarüootsest rakust (Loewy *et al.*, 1995).

Struktuursete valkude ja genoomsete RNA-de kogunemine algatab uute virionide moodustumise. See protsess algab nukleokapsiidi moodustumisest, mille käigus kapsiidivalk assambleerub pakkimissignaali omava genoomse 42S RNA-ga, moodustades ikosaeedrilise struktuuri (Strauss and Strauss, 1994). Nukleokapsiidi assambleerimisest on veel vähe teada, aga on ilmne, et olulist rolli võivad mängida siin RNA-valk interaktsioonid (Soderlund *et al.*, 1975; Ulmanen, 1978). On näidatud, et positiivse polaarsusega genoomne RNA sisaldab signaali kapsiidi moodustumiseks ja et see signaal asub mittestruktuurseid valke kodeerivas regioonis (Frolova *et al.*, 1997). On teada, et ligikaudu 5-10% rakus sünteesitud täispikast 42S RNA-st pakitakse 8 tunni jooksul pärast infektsiooni algust kapsiididesse. Nende protsesside tulemusena moodustub kuni 20000 uut virioni nakatatud raku kohta (Tuomi, *et al.*, 1975).

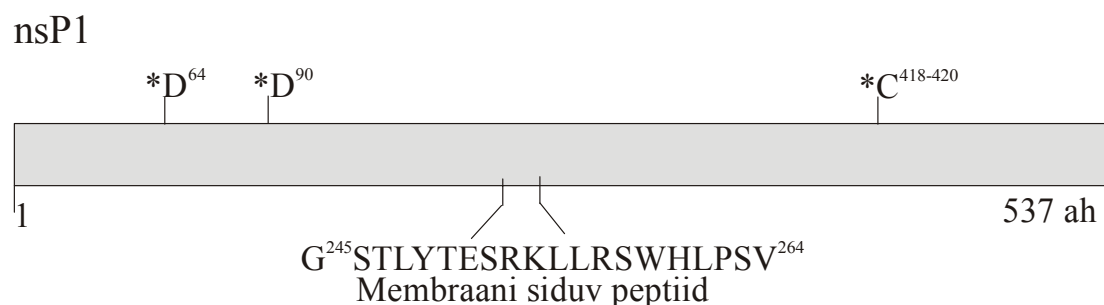
Viiruspartiklid vabanevad nakatunud rakust nukleokapsiidi pungumisel läbi plasmamembraani regioonide, mis on modifitseeritud viiruse glükoproteiinide poolt. Selleks protsessiks on vajalikud nii interaktsioonid nukleokapsiidi ja E2 valgu tsütoplasmaatiliste sabade vahel (Suomalainen *et al.*, 1992) kui ka lateraalsed vastasmõjud membraanivalkude vahel (Ekstrom *et al.*, 1994). Vabanenud virionid on võimelised nakatama uusi rakke.

2.1 SFV mittestruktuursete valkude funktsioonid

Ajalooliselt pärinevad esimesed andmed SFV mittestruktuursete valkude omaduste kohta temperatuuri-tundlike mutantidega teostatud geneetilistest katsetest. Tänapäeval on nsP-de funktsioone uuritud nii vastavaid rekombinantseid valke kui ka pöördgeneetilisi lähenemisi kasutades.

2.2 nsP1

nsP1 (537 ah jääki, 60 kDa) on multifunktsionaalne ensüüm ja SFV replikaasi kompleksi subühik. nsP1 järjestused on alphaviiruste seas suhteliselt konserveerunud, välja arvatud 80 C-terminaalset ah jääki. nsP1 N-terminuses asuv regioon (30-265 ah) omab homolooge kogu alphaviiruste supersugukonnas (Ahlquist *et al.*, 1985; Rozanov *et al.*, 1992).



Joonis 5. nsP1 skemaatiline kujutus. Joonisel on toodud amfipaatilise heeliksi (245-264 ah) järjestus. Aspartaadid D⁶⁴ ja D⁹⁰ on vajalikud S-adenosüül-L-metioniini (AdoMet) seondumiseks, tsüsteiinid positsioonides 418-420 nsP1 palmitüleerimiseks.

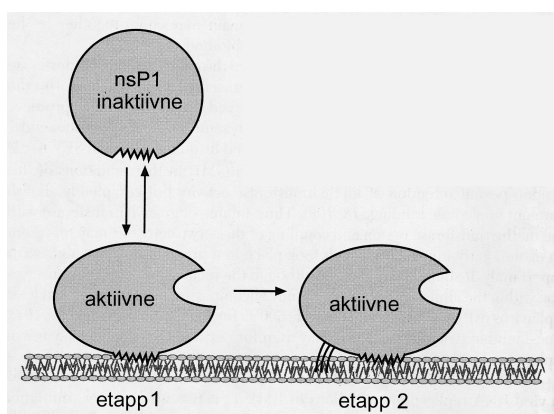
nsP1 seotus membraanidega

Nii alphaviirusega nakatunud rakkudes kui ka transientsel ekspressioonil on nsP1 seotud membraanidega (Ahola *et al.*, 2000; Peranen *et al.*, 1995). On näidatud, et see seostumine membraanidega toimub kahe erineva mehhanismi abil. Tugeva seostumise membraanidele tagab nsP1 tsüsteiinijääkide 418-420 (aminohappe positsioonides) posttranslatsiooniline palmitüleerimine (Laakkonen *et al.*, 1996)

(joonis 6). Need tsüsteiinid on konserveerunud ning asuvad samas regioonis kõikide alphaviiruste nsP1-des. Samas ei ole see mehhanism membraanile seondumise ainuke ega ka kõige olulisem. On näidatud, et kui nsP1 palmitüleerimiskohti muteerida, jääb valk siiski membraaniga seotuks (Laakkonen, et al., 1996) ja omab SFV replikatsioonikompleksis metsiktüüpi valgule sarnast lokalisatsiooni (Ahola, et al., 2000) ehkki side membraanidega on oluliselt nõrgem. Nakatunud rakus on nsP1 palmitüleerimise tulemuseks filapoodia sarnaste struktuuride moodustumine ja aktiini stress-fiibrile löhkumine (Laakkonen *et al.*, 1998). Nende nähtuste omavahelised seosed ja roll viiruse replikatsioonis on siiani teadmata.

Teine membraanidele kinnitumiseks oluline järjestus paikneb nsP1 keskosas ja kujutab endast amfipaatilist alfa-heeliksit. On näidatud, et nsP1-s olev trüptofaanijääk positsioonis 259 mängib olulist rolli membraanidele assotsieerumisel (Lampio *et al.*, 2000). Tuumamagnetresonants (NMR) analüüs on näidanud, et sünteetiline peptiid, mis on identne nsP1 ah jääkidele 245-265, konkureerib *in vitro* transleeritud nsP1-ga liposoomidele seostumise pärast (Lampio, et al., 2000). See sünteetiline peptiid moodustab samuti amfipaatilise alfa-heeliksi struktuuri, mis on võimeline seostuma happelisi fosfolipiide sisaldavatele liposoomidele. Erinevalt palmitüleerimisest on amfipaatilise heeliksi vahendusel toimuvad interaktsioonid membraanidega nsP1 ensümaatiliseks aktiivsuseks absoluutselt vajalikud (Ahola *et al.*, 1999).

Viiruse infektsioonis kujutab nsP1 seega “ankrut”, mis seob SFV RNA replikatsioonikompleksi tsütoplasmaatilisele membraanile (Ahola, et al., 2000).

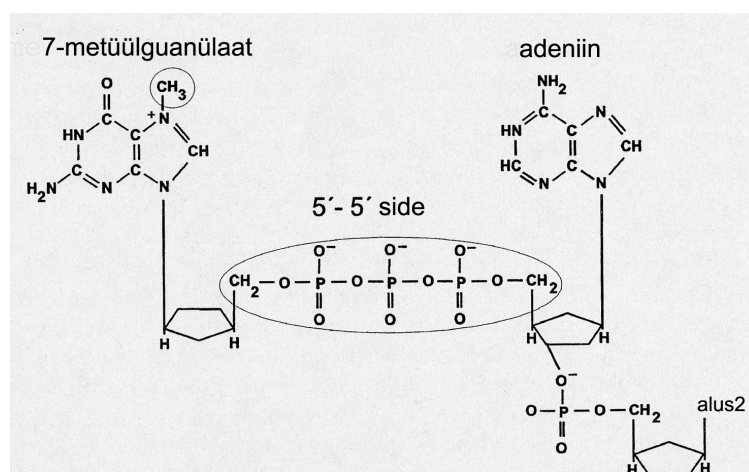


Joonis 6. Joonisel on näidatud nsP1 valgu seondumine membraanile. Valk seondub membraaniga nõrgalt polüpeptiidahela (amfipaatilise heeliksi) otsesel kontaktil anioonsete fosfolipiididega (etapp 1). Sama valgu palmitüleeritud vorm (tsüsteiinid positsioonides 418-420) seondub membraaniga tugevasti (etapp 2).

Metüültransferaasne (MT) ja guanüültransferaasne (GT) aktiivsus

nsP1 on vajalik viirus-spetsiifilise cap-struktuuri lisamisel viiruse genoomsele (42S) ja subgenoomsele (26S) mRNA-le (Vasiljeva *et al.*, 2000). Cap sisaldab 7-metüülguanülaati, mis on lingitud RNA otsaga 5'-5' trifosfaatsideme silla kaudu. Cap-struktuur on vajalik mRNA-de efektiivseks translatsiooniks enamuste eukarüootsete mRNA-de puhul (Marcotrigiano *et al.*, 1997) ja ta aitab stabiliseerida mRNA-sid tsütoplasmas (Furuichi *et al.*, 1977). Alphaviiruste cap-sünteesi mehhanism erineb tavalisest (raku tuumas toimuvast) cap-sünteesi mehhanismist ja on konserveerunud kogu alpha-sarnaste viiruste supersugukonnas.

nsP1 on guaniin-7-metüültransferaas ning teostab metüülrühma ülekannet S-adenosüül-metioniinilt (AdoMet) GTP-le. Guaniin metüleeritakse 7-ndas positsioonis (metüültransferaasne reaktsioon) ja lisatakse RNA 5' terminusele 5'-5' trifosfaatsideme abil (joonised 7 ja 8) (Laakkonen *et al.*, 1994). nsP1 teine ensümaatiline aktiivsus - guanüültransferaasne aktiivsus - katalüüsib kovalentse kompleksi moodustumist 7-metüül-GMP-ga (m^7GMP) (Ahola & Kaariainen, 1995), kus guanülaat on seotud fosfaatamiidsideme abil ensüümi lüsiinijäägile (Fresco & Buratowski, 1994; Shuman & Hurwitz, 1981). Milline ensüüm teostab viimast reaktsiooni alphaviirus-spetsiifilises cap-sünteesis (joonis 8), ei ole veel teada.



Joonis 7. Tüüpilise alphaviiruse mRNA cap-struktuur.

1. pppApRNA	nsP2 →	ppApRNA + P _i (<i>Vasiljeva & al., 2000</i>)
2. GTP + AdoMet	nsP1 →	m ⁷ GTP + AdoHcy (<i>Laakkonen & al., 1994</i>)
3. m ⁷ GTP + nsP1	→	m ⁷ GMP-nsP1 + PP _i (<i>Ahola & Kääriäinen 1995; Ahola & al., 1997</i>)
4. m ⁷ GMP-nsP1 + ppN ₁ N ₂ N ₃ ...	→	m ⁷ GpppN ₁ N ₂ N ₃ ... + nsP1

Joonis 8. Alphaviiruse RNA capeerimisreaktsioone katalüüsivad valk nsP2 (reaktsioon 1, RNA trifosfaataas eemaldab 5' γ fosfaadi sünteesitud RNA-lt) ja valk nsP1 (reaktsioonid 2 ja 3).

Alpha-sarnaste viiruste capeerimisreaktsiooni eripära seisneb selles, et metüültransferaases reaktsioonis eelistab nsP1 metüülrühma aktseptorina GTP-d, samal ajal kui rakulise päritoluga ensüümid metüleerivad eelistatult cap-analooge ja metüleerimata guanosiin-capiga RNA-sid (*Lampio et al., 1999*). Samuti moodustab nsP1 guanüültransferaases reaktsioonis kovalentse kompleksi m⁷GMP-ga, samal ajal kui rakulised ensüümid moodustavad GMP-ensüüm kompleksi. See on seotud sellega, et eukarüootse raku tuumas toimival RNA-le cap-struktuuri lisamisel kannab guaniin transferaas esmalt GMP üle RNA-le, moodustub kovalentne intermediaat ja alles viimaseks etapiks on 7-metüülrühma lisamine RNA molekulile liidetud G-jäägile.

nsP1 osalemisest otseselt replikatsiooni protsessis on veel väga vähe teada. Uurimustes SIN viiruse mutandiga on kindlaks tehtud, et nsP1 osaleb negatiivse RNA ahela sünteesil (*Sawicki et al., 1981*) ja seda nii initsiatsiooni kui ka elongatsiooni etapil (*Wang, et al., 1991*). SFV nsP1 kohta analoogsed andmed veel puuduvad.

2.2 nsP2

nsP2 (799 ah jääki, 86 kDa) on multifunktsionaalne valk, mis osaleb viiruse replikatsioonis ja mittestruktuurse eelvalgu protsessingus. Mitmed uurimused on näidanud, et arvatavasti osaleb nsP2 nakatatud rakkudes ka raku-spetsiifilise transkriptsiooni ja translatsiooni mahasurumises (*Suopanki et al., 1998*).

nsP2 koosneb kahest suhteliselt iseseisvast domeenist ja on näidatud, et kumbki neist omab spetsiifilisi ensümaatilisi aktiivsusi (joonis 9).



Joonis 9. Skemaatiline joonis nsP2-st. Näidatud on tähtsaimad aminohappejäägid helikaasi ja proteaasi domeenides (seletused tekstis).

nsP2 N-terminaalne osa moodustab helikaas/ NTP-ase/ trifosfataase domeeni. Rekombinantseid valke kasutades on näidatud, et nsP2 470 N-terminaalset aminohappejääki omavad nukleosiidtrifosfataasset (NTP-aset) aktiivsust. Punktmutatsioon GVPGSGK₁₉₂S → GVPGSGN₁₉₂S NTP-sidumissaidis inhibeerib nsP2 NTP-asse aktiivsuse (GNS mutant) (joonis 9) (Rikkonen *et al.*, 1994).

nsP2 osaleb viirus-spetsiifilises capeerimisreaktsioonis, kus nsP2 RNA trifosfataasne aktiivsus on vajalik (Vasiljeva, et al., 2000) eemaldamaks RNA 5' terminaalset otsast γ -fosfaat. Ensüüm kuulub metall-sõltuvate RNA trifosfataaside hulka, kuna tema täielikuks aktiivsuseks on vajalikud divalentsed katioonid (Vasiljeva, et al., 2000).

nsP2 (N-terminaalne domeen) on ka RNA helikaas (Gomez de Cedron *et al.*, 1999). nsP2 on võimeline *in vitro* NTP-de juuresolekul kaheaheelalist RNA-d lahti harutama. Eelpoolmainitud punktmutatsioon NTP-sidumissaidis inhibeerib nii kaheaheelalise RNA lahti harutamist kui ka trifosfataasset aktiivsust. Järelikult on NTP-ase aktiivsus RNA lahti harutamiseks vajalik, seda tõenäoliselt selle pärast, et helikaas kasutab energiaallikana ATP hüdrolüüsist pärinevat energiat (Bird *et al.*, 1998). RNA helikaasi täpset rolli positiivse polaarsusega RNA viiruste replikatsioonitsükli ei teata (osadel sellistel viirustel, nt. polioviirustel, helikaasne aktiivsus puudub). Oletatakse, et helikaas harutab lahti replikatsiooni käigus tekkinud kaheaheelalise RNA intermediaadi ja/või eemaldab sekundaarstruktuuriid matriits-RNA-lt.

Proteasne aktiivsus on seotud nsP2 C-terminaalse domeeniga, mis kujutab endast papaiini-sarnast tsüsteiin-proteaasi (Baker *et al.*, 1993; Gorbalyena *et al.*, 1991; Hardy & Strauss, 1989). Nii täispikk nsP2 kui ka tema C-terminaalne domeen – nn. Pro39 (459-799 ah) – on suutelised spetsiifiliselt protsessima P1234 polüproteiini ja tema väiksemaid intermediaate (Vasiljeva *et al.*, 2001). Deletsioonid nsP2 C-terminaalses domeenis muudavad nsP1234 polüproteiini protsessimist (Hardy and Strauss, 1989) ja mutatsioon tsüsteiinalaniini vastu positsioonis 478 muudab ensüümi proteolüütiliselt inaktiivseks (Merits *et al.*, 2001). Lisaks on teada, et nsP2 reguleerib negatiivsete ja positiivsete RNA ahelate taset/hulka ja subgenoomse mRNA sünteesi nakatatud rakus (Sawiki 1998).

Immuunfluorestsensanalüüs ja rakumaterjali fraktsioneerimine on näidanud, et nsP2 lokaliseerub rakus erinevates kompartmentides (Peranen *et al.*, 1990; Peranen *et al.*, 1988). Ainsana SFV mittestruktuursetest valkudest võib nsP2 paikneda nii raku tuumas kui tuumakeses (Peranen, et al., 1990). Kui ekspresseerida nsP2 üksinda, siis lokaliseerub viimane reeglina üksnes tuumas. Kuna suur osa nsP2-st lokaliseerub raku tuumas, siis oletati, et nsP2 valgus paikneb tuuma lokalisatsiooni signaal (NLS). Selle asukoha määramiseks kasutati deletsioonanalüüsi, mille tulemused näitasid, et nsP2 transpordi eest tuuma vastutab regioon PR648RRV. Sama tõendas ka läbi viidud mutatsioonanalüüs, mille tulemusena näidati, et mutatsioonide korral, kus osa arginiine on vahetatud aspartaadi vastu (RDR, DRR, DDR), lokaliseerub nsP2 eranditult tsütoplasmas (Rikkonen *et al.*, 1992). Peale selle leiti, et mutatsiooni R649D (RDR) korral on häiritud ka viiruse mittestruktuurse polüproteiini süntees ning sellega kaasneb viiruse replikatsiooni pidurdumine. Samuti vähendab see mutatsioon SFV tsütotoksilisust ning neuropatogeensust (Fazakerley *et al.*, 2002). Nakatunud rakkudes jääb 25% nsP2-st membraanifraktsiooni, 25 % lahusesse ning 50 % transporditakse tuuma. Lahuses olev nsP2 võib olla seotud ribosoomidega (Ranki *et al.*, 1979), tuumas olev nsP2 aga assotsieeruda tuumamaatriksiga (Peranen, et al., 1990). Lähtudes ülal toodud andmetest järeldub, et tuumas lokaliseeruvat nsP2-te ei vajata otseselt viiruse replikatsioonil, sams on oletatud, et see osa nsP2-st võib olla oluline inhibeerimaks peremeesraku DNA ja/või RNA sünteesi (Rikkonen, 1996).

nsP2 kontrollib ka subgenoomse 26S mRNA sünteesi (Hahn *et al.*, 1989) (Suopanki, et al., 1998) ning selle kaudu struktuursete valkude sünteesi. Selle regulatsiooni täpset mehhanismi veel ei teata.

2.3 nsP3

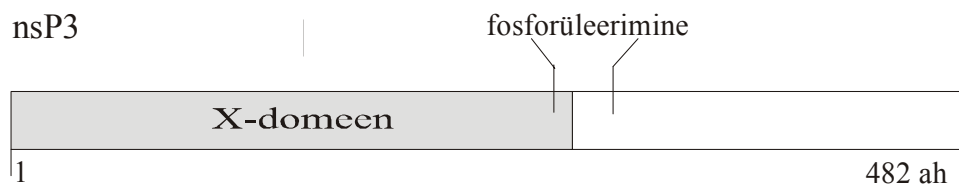
Ehkki molekulaarbioloogilised uurimused on näidanud, et nsP3 (482 ah jääki, 61 kDa) on alphaviiruse replikatsioonil oluline, on tema funktsioonide kohta vähe teada. On teada, et varases replikatsioonikompleksis osaleb nsP3 negatiivse RNA ahela sünteesil (Wang *et al.*, 1994) ja et nsP3 omab rolli ka subgenoomse 26S RNA sünteesil (mõlemad funktsioonid tõestatud mutantidega)(Hahn, *et al.*, 1989; Wang, *et al.*, 1994).

Arvatakse, et nsP3 on vajalik nsP3/4 saidi lõikamisel SIN polüproteiinis. Kuna see lõikamine on eeltingimuseks aktiivse polümeraasikompleksi moodustumisele, siis mängib nsP3 ka olulist rolli RNA sünteesil (Strauss and Strauss, 1994). Samas on SFV nsP3/4 saidi protsessingu uurimine näidanud, et vähemalt *in vitro* pole nsP3 valk (v.a. tema 5 viimast C-terminaalset ah jääki, mis kuuluvad lõikamise saiti) selleks protsessinguks oluline (Vasiljeva, *et al.*, 2001)(Lulla, avaldamata andmed). Samas on SFV nsP2/3 saidi protsessingu uurimine näidanud, et selleks protsessiks on vajalik nsP3 valgu N-terminaalse domeeni olemasolu, ehkki tema toimemehhanism ei ole veel selge (Lulla, 2003).

SFV-ga nakatud BHK rakkudes lokaliseerub nsP3 enamasti vakuoli-sarnastes struktuurides, mis kujutavad endast CPV-I-sid (Peranen & Kaariainen, 1991). On teada, et nsP3 osaleb CPV-I struktuuride moodustumises ja et selleks on vajalik nsP3 regiooni olemasolu mittestruktuurses polüproteiinis (Salonen *et al.*, 2003) (*in trans* ekspresseeritud nsP3 CPV-I moodustumisel ei osale). On oletatud, et nsP1 juuresolekul osaleb nsP3 replikatsioonikompleksi membraanile assotsieerumises (Vihinen & Saarinen, 2000). Biokeemiliselt on näidatud, et valk nsP3 üksi assotsieerub membraaniga nõrgalt (mõningatel andmetel üldse mitte).

nsP3-s on eristatavad kaks regiooni: konserveerunud N-terminus ehk X-domeen ja C-terminus ehk varieeruv regioon (joonis 10) (Koonin and Dolja, 1993).

X-domeeni homolooge on leitud teistes viirustes, bakterites, loomades ja taimedes (Pehrson & Fuji, 1998). nsP3 konserveerunud X-domeeni funktsioon on veel teadmata, kuid primaarstruktuuri kõrge konserveerumise tase vihjab valgu rollile katalüüsis või sidumises.



Joonis 10. Valgu nsP3 skemaatiline joonis. Näidatud on X-domeen ja fosforüleerimiskohad.

nsP3 C-terminus on ülivarieeruv nii pikkuselt kui ka järjestuselt isegi alphaviiruste hulgas. Deletsioonid ja duplikatsioonid nsP3 C-terminaalses osas ei oma erilisi efekte viiruse replikatsioonis (Lastarza *et al.*, 1994); nsP3 ts mutatsioonid ega ka *linker*-insertsioonid ei muuda polüproteiini protsessimist (LaStarza *et al.*, 1994).

SFV nsP3 on fosforüleeritud treoniini- ja seriinijääke pidi, mis paiknevad valgu C-terminaalses regioonis positsioonides Ser^{320, 327, 332, 335} ja Thr^{344, 345} (Li *et al.*, 1990; Peranen, et al., 1988; Vihinen and Saarinen, 2000). Kinaasid, mis vastutavad fosforüleerimise eest, on siiani tundmatud. Fosforüleerimise bioloogiline tähtsus ei ole veel selge, kuid on teada, et vastavate ah jääkide muteerimine või deleteerimine ei blokeeri viiruse replikatsiooni, kuid mõjutab SFV patogeensust hiirtel (Vihinen *et al.*, 2001).

2.4 nsP4

nsP4 (614 ah jääki, 68 kDa) on viiruse RNA polümeraasi katalüütiline subühik, mis sisaldab konserveerunud GDD-motiivi. Ka tema sekundaarstruktuur on sarnane teistele tuntud viiruselistele RNA polümeraasidele (joonis 11) (Kamer & Argos, 1984; Koonin and Dolja, 1993). SFV nsP4 väike N-terminaalne regioon ei oma homolooge teiste tuntud viiruste valkudega ja sellel regioonil puudub teadaolev ensümaatiline aktiivsus (Merits, et al., 2001).



Joonis 11. Valgu nsP4 skemaatiline joonis. Näidatud on konserveerunud GDD motiiv.

Arvatakse, et nsP4 interakteerub nii teiste SFV mittestruktuursete valkudega kui ka peremeesraku valkudega, mis osalevad viiruse RNA replikatsiooni. nsP4 on SFV mittestruktuursetest valkudest kõige ebastabiilsem ja degradeeritakse kiiresti ubikvitinüleerimise raja kaudu 26S proteasoomides. Ebastabiilseks muudab valgu tema enda N-terminaalne türosiinijääk, mille tunneb ära rakuline ubikvitinüleerimise mehhanism (de Groot *et al.*, 1991). Samas on türosiinijääk nsP4 N-terminuses oluline viiruse replikatsiooniks. On oletatud, et nakatatud rakus stabiliseeritakse osa sünteesitud nsP4 valgust (ca. 20 % koguhulgast) tänu interaktsioonidele teiste replikaaskompleksi valkude ja/või struktuuridega samal ajal kui ülejäänud osa nsP4-st lagundatakse. Individuaalselt ekspresseeritud natiivse nsP4 eluiga rakus ei ole teada.

II EKSPERIMENTAALNE OSA

UURIMISTÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva uurimistöö eesmärkideks oli:

1. Analüüsida HEK 293 T-RExTM (Tet-OFF) süsteemi kõlblikust SFV mittestruktuursete valkude omaduste ja funktsioonide analüüsi seisukohalt. Selleks oli kavas:
 - a. Konstrueerida SFV mittestruktuurseid valke ekspresseerivad rakuliinid
 - b. Kontrollida SFV mittestruktuursete valkude ekspressiooni ja lokalisatsiooni konstrueeritud rakuliinides
 - c. Määrata ekspresseeritavate SFV mittestruktuursete valkude pooleluiga
2. Uurida SFV mittestruktuursete valkude mõju raku elulemusele, raku makromolekulide sünteesile ja raku morfoloogiale
3. Uurida SFV mittestruktuursete valkude mõju viiruse SFV infektsioonile rakus ja selle kaudu ekspresseeritava markergeeni translatsioonile

Töö järgnev osa on jagatud kolmeks peatükiks, mis vastavad ülal toodud kolmele peamisele töösuunale. Seoses sellega, et tegemist on suhteliselt iseseisvate töösuundadega, on igas peatükis ühendatud sektsioonid “Tulemused” ja “Arutelu”, kuna nende eraldi välja toomine muudaks töö tulemuste esitamise liialt keeruliseks.

MATERJAL JA METOODIKA

Bakteritüved ja söötmed

Plasmiidide paljundamiseks kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α . Rakke kasvatati LB söötmes (*Luria Bertani*) (10 g/l bakto-trüptooni, 5 g/l pärmiekstrakti, 10 g/l NaCl), kuhu lisati ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 μ g/ml.

Rakuliinid ja söötmed

Stabiilselt SFV mittestruktuurseid valke ekspresseerivate rakuliinide konstrueerimiseks kasutati inimese embrüonaalset neerurakuliini HEK 293 T-REXTM ("Invitrogen"), milles ekspresseeritakse stabiilselt tetratsükliini (Tet) repressorit. Rakke kasvatati IMDM söötmes (*Iscove Modified Dulbecco's Medium*, "Sigma"), mis sisaldas 10 % veise loote seerumit ("Sebak") ning penitsilliini 100 IU/ml ja streptomütsiini 100 ng/ml. Tetratsükliini repressori selektsiooniks lisati söötmele blastocidini ("Invitrogen") lõppkontsentratsiooniga 5 μ g/ml. Meid huvitava geeni ekspresseerimiseks T-REXTM rakuliinis transfekteriti rakke vastavat inserti sisaldava pcDNA4/TO ekspressioonikonstruktiga. Rakuliinide selekteerimiseks lisati söötmele zeocini ("Invitrogen") lõppkontsentratsiooniga 10 μ g/ml. Võõrgeeni ekspressiooni indutseerimiseks lisati rakkudele tetratsükliini lõppkontsentratsiooniga 1 μ g/ml.

SFV viirus laadsete partiklite (VLP-de) tootmiseks kasutati hamstri neerurakuliini BHK-21. Rakke kasvatati GMEM söötmes (*Glasgow Modified Eagle's Medium*, "Gibco BRL"), millele lisati 200 mM HEPES, 0.3% *Bacto*TM *Tryptose Phosphate Broth*-i ("Difco"), 5% veise loote seerumit, 2 mM L-glutamiini ("Gibco BRL") ning penitsilliini 100 IU/ml ja streptomütsiini 100 ng/ml (lõppkontsentratsioon). Naktamiseks kasutati VLP-de lahjendust seerumvabas IMDM või GMEM söötmes.

Algplasmiidid

Kõikide algplasmiidide ning käesolevas töös konstrueeritud plasmiidide kaardid on toodud töö lõpus olevates lisades.

pcDNA4/TO (“Invitrogen”)

Vektor sisaldab *Cytomegalovirus* (CMV) varajast promootorit, pUC ja *Simian Virus* 40 (SV40) replikatsiooni alguspunkte ehk *origini*, tetratsükliini operaatorit ning ampitsilliini ja zeocini resistentsusgeene.

pTSF

SFV mittestruktuurseid valke kodeerivate geenide kloonimiseks **pcDNA4/TO** vektorisse kasutati olemasolevaid pTSF plasmide (**pTSF1**, **pTSF1^{6D}**, **pTSF2**, **pTSF2^{CA}**, **pTSF2^{RDR}**, **pTSF2^{CA+RDR}**, **pTSF2^{GNS}**, **pTSF3**), mis sisaldasid erinevaid variatsioone SFV mittestruktuurseid valke kodeerivatest järjestustest. Vektor sisaldab T7 promootorit ja ampitsilliini resistentsusgeeni. Vektor pTSF1^{6D} puhul on nsP1 kodeerivas regioonis tsüsteiinid positsioonides 418-420 vahetatudalaniinide vastu (Ahola, et al., 1999). Vektor pTSF2^{CA} sisaldab nsP2-te kodeerivas järjestuses positsioonis 478 aminohappe tsüsteiini muutustalaniini vastu, pTSF2^{RDR} puhul on nsP2-te kodeerivas järjestuses positsioonis 649 muudetud arginiin aspartaadiks (Fazakerley, et al., 2002). Vektor pTSF2^{CA+RDR} sisaldab nsP2-te kodeerivas järjestuses kombinatsiooni kahest eelpool mainitud aminohappe asendusest. Vektoris pTSF2^{GNS} nsP2-te kodeerivas järjestuses positsioonis 192 on lüsiin vahetatud asparagiiniks (Rikkonen, et al., 1994).

Ubi-Pons4

SFV mittestruktuurse valgu nsP4 kodeerivat järjestust sisaldav plasmiid, milles nsP4 valku kodeeriva järjestuse 5' otsa lisatud ubikvitiini kodeeriv järjestus. Vektor sisaldab T7 promootorit, faagi f1 ja pUC replikatsiooni alguspunkte ning ampitsilliini resistentsusgeeni.

pGL3

Lutsiferaasi reportervektor (“Promega”), mis sisaldab faagi fl replikatsiooni alguspunkti ja ampitsilliini resistentsusgeeni.

pSFV1

SFV mittestruktuursete valkude geene sisaldav replikon-vektor. Lisaks sisaldab veel SP6 promootorit, subgenoomset promootorit, polülinkerit, polüA järjestust ja ampitsilliini resistentsusgeeni.

pSFV1-EGFP

Plasmiid sisaldab SFV mittestruktuursete valkude geene ja *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) ekspressioonikassetti SFV subgenoomse promootori kontrolli all (kloneeritud Anna Iofiku poolt). pSFV1-EGFP lineariseerimiseks enne *in vitro* transkriptsiooni kasutati ensüümi *BcuI*.

pEGFP-C1

pEGFP-C1 kodeerib EGFP-d (“Clontech”). Sisaldab CMV promootorit, enhanseri, kanamütsiini resistentsusgeeni ning pUC replikatsiooni alguspunkti.

HelperI

Plasmiid sisaldab SFV struktuurseid geene, polüA järjestust ning ampitsilliini resistentsusgeeni. HelperI lineariseerimiseks enne *in vitro* transkriptsiooni kasutati ensüümi *BcuI*.

P1234, P1*234, P123 ja P12*3

Plasmiidid sisaldavad vastavalt SFV mittestruktuurseid nsP1234, nsP1*234, nsP123 ja nsP12*3 valke kodeerivaid järjestusi, T7 promootorit ning ampitsilliini resistentsusgeeni. Konstruktil P1*234 on nsP1 ja nsP2, konstruktil P12*3 on nsP2 ja nsP3 vaheline lõikesait blokeeritud punktmutatsioonide abil (glütsiin glutamaadi vastu) (Vasiljeva, et al., 2001).

Kloneerimine

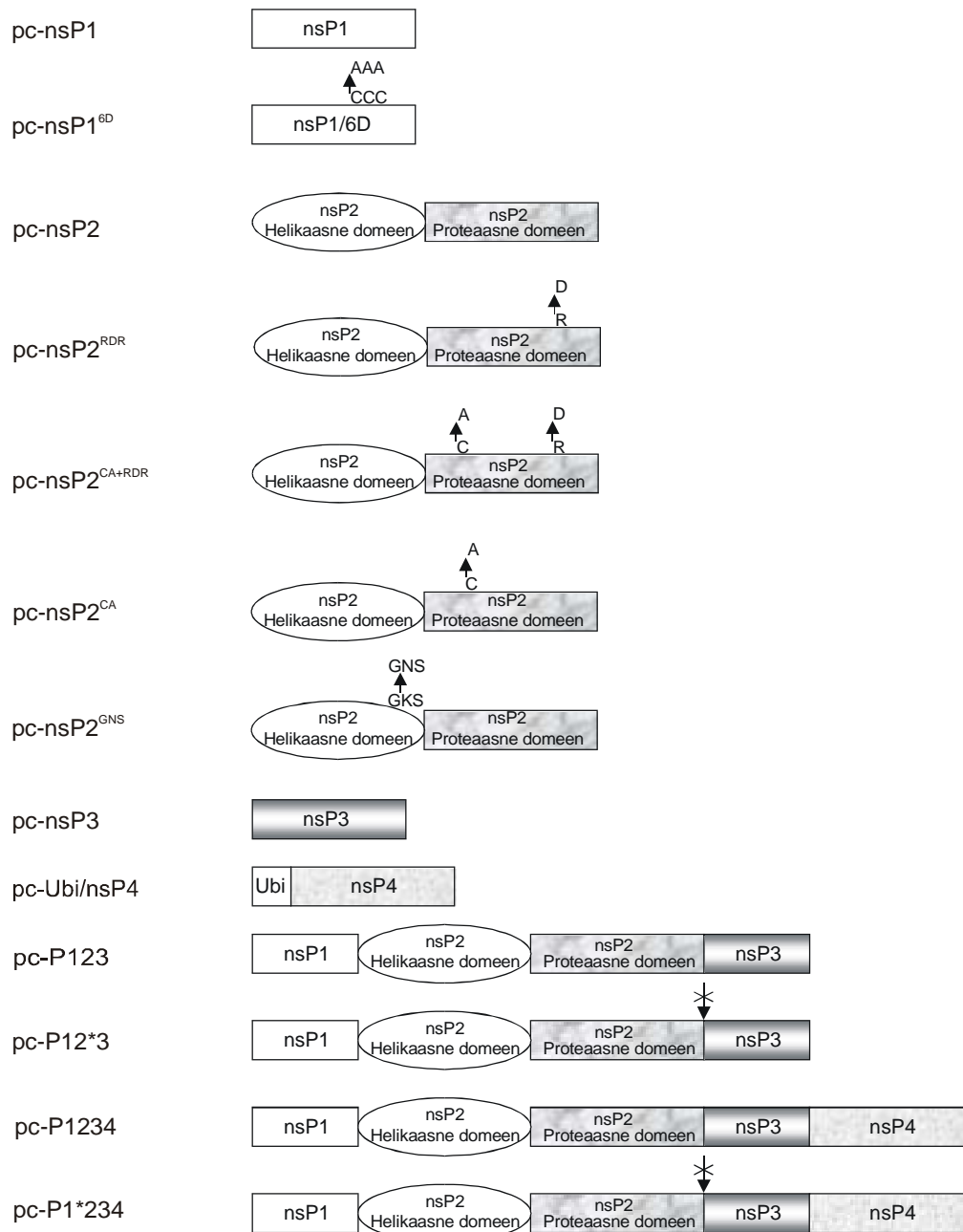
Restrikteerimiseks kasutati firma “Fermentas” ensüüme ja puhvreid vastavalt tootja poolt antud instruksioonidele. Restriktsioon toimus 37 °C-l 2 tunni jooksul, ensüümi kogus sõltus iga reaktsiooni puhul lõigatava DNA kogusest (erinevate plasmiidide restriktsiooni on põhjalikumalt kirjeldatud edaspidi). Kloneerimiseks sobivate vektorite saamiseks defosforüleeriti restrikteeritud DNA. Selleks lisati restriktsioonisegule aluselist fosfataasi – CIAP-i (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, “Roche”) 1 ühik 1µg DNA kohta. Kleepuvate otste täissünteesimiseks kasutati 2 ühikut *Klenow*-I fragmenti (“Fermentas”) 1µg DNA kohta. See reaktsioon viidi läbi restriktsioonipuhvril, kuhu oli lisatud dNTP-de segu lõppkontsentratsioonini 0.1 mM, 37 °C juures 30 minuti jooksul. Peale seda inaktiveeriti ensüüm 20 minutilise kuumutamisega 65 °C-l. Restriktsioonipuhvri vahetamise vajadusel kasutati *JetQuick Purification Spin Kit* 1 (“Genomed GmbH”). Restriktsioonil saadud DNA fragmendid lahutati agaros geel-elektroforeesil ja soovitud fragmendid lõigati agarosgeelist välja ning puhastati *Perfectprep^R Gel Cleanup Kit*-i kasutades (“Eppendorf”).

Ligeerimiseks kasutati 5 ühikut T4 DNA ligaasi ühe reaktsiooni kohta 1x T4 DNA ligaasi puhvril (4 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05 mM ATP) ning ekvimolaarsetes kogustes vektorit ja inserti. Reaktsioon toimus 15 °C juures üleöö ning järgnevalt ligaas inaktiveeriti 65 °C juures 10 minutit. Bakterite transformatsioon toimus kuumaehmatus (*heat shock*) meetodil.

Plasmiidne DNA eraldati esialgu aluselise lüüsiga (minipreparatsioon), suurema koguse materjali saamiseks kasutati midipreparatsiooni (*Eppendorf Perfectprep Plasmid Midi Kit*-i). Saadud plasmiidide õigsust kontrolliti restriktsioonanalüüsiga. Kloneeritud SFV mittestruktuursete geenide ja nende mutantide õigsuse kontrollimiseks sekveneeriti meid huvitavad regioonid.

Tabel 1. Konstrueeritud SFV mittestruktuurseid valke kodeerivaid järjestusi sisaldavad plasmiidid. Kloneerimisvektoriks oli kõikidel juhtudel pcDNA4/TO.

Number	Algplasmiidid	wt või mutant	Lõikamine ja töötlus							Saadud konstrukt
			Vektor			Insert				
			5'	3'	Klenow	5'	3'	Klenow	Pikkus	
1	pEGFP-C1		<i>Xba</i> I	<i>Bsp</i> 120I	—	<i>Nhe</i> I	<i>Bsp</i> 120I	—	792	pc-EGFP
2	pTSF1	wt	<i>Af</i> III	<i>Hind</i> III	+	<i>Nco</i> I	<i>Hind</i> III	+	1618	pc-nsP1
3	pTSF ^{6D}	mutant	<i>Af</i> III	<i>Hind</i> III	+	<i>Nco</i> I	<i>Hind</i> III	+	1618	pc-nsP1 ^{6D}
4	pTSF2	wt	<i>Af</i> III	<i>Bam</i> HI	+	<i>Nco</i> I	<i>Bgl</i> II	+	2402	pc-nsP2
5	pTSF2 ^{CA}	mutant	<i>Af</i> III	<i>Bam</i> HI	+	<i>Nco</i> I	<i>Bgl</i> II	+	2402	pc-nsP2 ^{CA}
6	pTSF2 ^{RDR}	mutant	<i>Af</i> III	<i>Bam</i> HI	+	<i>Nco</i> I	<i>Bgl</i> II	+	2402	pc-nsP2 ^{RDR}
7	pTSF ^{CA+RDR}	mutant	<i>Af</i> III	<i>Bam</i> HI	+	<i>Nco</i> I	<i>Bgl</i> II	+	2402	pc-nsP2 ^{CA+RDR}
8	pTSF2 ^{GNS}	mutant	<i>Af</i> III	<i>Bam</i> HI	+	<i>Nco</i> I	<i>Bgl</i> II	+	2402	pc-nsP2 ^{GNS}
9	pTSF3	wt	<i>Af</i> III	<i>Hind</i> III	+	<i>Nco</i> I	<i>Hind</i> III	+	1451	pc-nsP3
10	Ubi-Pons4	wt	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	—	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	—	2074	pc-Ubi/nsP4
11	P123	wt	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> 32I	—	<i>Bam</i> HI	<i>Pae</i> I	—	5457	pc-123
12	P1*23	mutant	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> 32I	—	<i>Bam</i> HI	<i>Pae</i> I	—	5457	pc-P1*23
13	P1234	wt	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> 32I	—	<i>Bam</i> HI	<i>Pae</i> I	—	7432	pc-P1234
14	P1*234	mutant	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> 32I	—	<i>Bam</i> HI	<i>Pae</i> I	—	7432	pc-P1*234



Joonis 12. Skeemaatiline joonis SFV mittestruktureid valke kodeerivatest järjestustest. Vektori pTSF1^{6D} puhul nsP1 kodeerivas regioonis tsüsteiinid positsioonides 418-420 on vahetatudalaniinide vastu. Vektor pTSF2^{CA} sisaldab nsP2-te kodeerivas järjestuses aminohappe tsüsteini muutustalaniini vastu positsioonis 478, pTSF2^{RDR} puhul on nsP2-te kodeerivas järjestuses muudetud arginiiniaspartaadiks positsioonis 649. Vektor pTSF2^{CA+RDR} sisaldab nsP2-te kodeerivas järjestuses kombinatsiooni kahest eelpool mainitud aminohappeasendusest. Vektoris pTSF2^{GNS} nsP2-te kodeerivas järjestuses on lüsiin vahetatud asparagiini vastu positsioonis 192. Konstruktil P1*234 on nsP1 ja nsP2, konstruktil P12*3 on nsP2 ja nsP3 vaheline lõikesait punktmutatsiooniga blokeeritud (glütsiin glutamaadi vastu).

Viirusvektori pSFV1-luc konstrueerimine

Konstrueerimaks plasmidi, mis sisaldaks lutsiferaasi ekspressioonikasseti, kasutati pSFV1 ning pGL3 plasmide. Vektorit pSFV1 lõigati ensüümidega *SmaI* (30 °C 1 tund) ja seejärel ensüümiga *BamHI* (37 °C 1 tund). Restriksioonisegule lisati pool tundi enne lõppu 1 ühik (U) aluselist fosfataasi.

Plasmidi pGL3, mis sisaldab lutsiferaasi ekspressioonikasseti, lõigati ensüümiga *XbaI*. Pärast kahetunnist lõikust 37 °C-l, lisati 5 U Klenow fragmenti vastavalt eelpoolkirjeldatud protokollile. Seejärel lõigati plasmidi ensüümiga *BglIII*. Saadud fragmentide (vektor 11027 ja insert 1710 aluspaari) ligatsioon ja transformatsioon toimus varasemates katsetes kasutatud meetodi järgi. Konstrueeritud plasmidi pSFV1-luc lineariseerimiseks kasutati ensüümi *BcuI*.

Transfektsioon

Ensüümi *PvuI* abil lineariseeritud DNA-d (konstruktid on loetletud tabelis 1) transfekteriti rakkudesse elektroporatsiooni meetodil. Selleks aspireeriti kõigepealt rakkudelt sööde, rakud suspendeeriti ning koguti 50 milliliitrisesse koekultuuri tuubi. Ühe transfektsiooni jaoks võeti 6 miljonit raku. Selleks, et määrata rakkude arv, tehti rakkudest kümnekordne lahjendus ja rakud loeti Bürkeri hemotsütomeetriga. Seejärel rakuksuspensioon tsentrifugeeriti (10 min., 1000 pööret minutis (rpm) “Jouan” CR 422), aspireeriti sööde ja resuspendeeriti söötmes, kuhu lisati 1M NaBES-puhvrit pH 7.5 lõppkontsentratsiooniga 5 mM. Elektroporatsiooni küvetis (0.4 cm, “BioRad”) segati 250 µl rakuksuspensiooni 50 µg kandja (lõhe või heeringa spermi DNA) ja lineaarse plasmidse DNA-ga (10 µg) ning elektroporeeriti (“BioRad” Gene Pulser II). Transfektsioonil kasutatud pinge ja mahutavus oli T-RExTM rakuliini puhul 180 V ning 950 µF. Seejärel pipeteeriti rakud küvetist 4 ml söötmesse ja tsentrifugeeriti (5 min., 1000 rpm “Jouan” CR 422). Sadenenud rakud resuspendeeriti 1 ml söötmes, jaotati tassidele (Ø 100 mm), kuhu oli lisatud 4 ml söödett ning inkubeeriti 37 °C / 5 % CO₂ tingimustel. SFV mittestruktuurseid valke ekspresseerivate rakkude selekteerimiseks lisati söötmele antibiootikumi zeocin lõppkontsentratsiooniga 10 µg/ml, võrdluseks kasutati vaid

carrieriga poreeritud rakkudega tasse. Zeocini lisamine indutseeris transfitseerimata rakkude massilise suuremise. Transfitseeritud rakkudest moodustunud üksikud kolooniad pikiti (igast liinist 10 kolooniat) ning zeocini selektsioon jätkus.

RNA (*in vitro* transkriptsiooni produkt) transfekteeriti BHK-21 rakkudesse elektroporatsiooni meetodil. Ühe transfektsiooni jaoks kasutati $\sim 4 \times 10^6$ rakku (50-70% konfluentne tass Ø 100 mm). Rakkudelt aspireeriti sööde, rakke pesti kaks korda steriilse PBS-iga (fosfaat puhvriga sooladelahus), trüpsiniseeriti, suspendeeriti ning koguti 50 milliliitrisesse koekultuuri tuubi, kuhu oli eelnevalt lisatud 8 ml GMEM söödet. Rakud sadestati tsentrifuugimisel (5 min., 10 000 rpm “Eppendorf Centrifuge 5810R”). Rakusademelt aspireeriti supernatant ja rakud resuspendeeriti vajalikus koguses PBS-is. Rakususpensioon (800 µl) ning RNA-d (50 µl; pSFV1-luc ja HelperI ning pSFV-EGFP ja HelperI) segati õrnalt omavahel. Elektroporatsiooniks kasutati eelnevalt jääl jahutatud küvetti ning tehti kaks pulssi 850 V ning 25 µF juures (“BioRad” Gene Pulser II). Küvetist kanti elektroporeeritud rakud üle tassidele (Ø 100mm), kuhu oli eelnevalt lisatud 10 ml GMEM söödet.

In vitro transkriptsioon

Plasmiide pSFV-EGFP, pSFV-luc ja HelperI (DNA kogus 3 µg reaktsiooni kohta) lineariseeriti ensüümiga *BcuI* (“Fermentas”). Lineariseeritud DNA puhastati *JetQuick PCR Purification Spin Kit*-iga (“Genomed GmbH”) ja elueeriti 30 µl vees. Jääl segati kokku *in vitro* transkriptsiooni segu: rNTP segu (1 mM ATP, CTP, UTP ning 0.5 mM GTP; “Amersham”), 5 mM DTT, 1 mM *Ribo m^{7G} Cap Analog* (“Promega”), 1x SP6 puhver (400 mM Hepes-KOH, pH 7.4, 60 mM MgOAc, 20 mM spermidiin-HCl) ning 0.1% dietüül pürokarbonaadiga (DEPC) töödeldud veega viidi ruumala 50 µl-ni. Enne lineariseeritud DNA (1.6 µg) lisamist lasti segul soojeneda toatemperatuurini, et vältida DNA sadenemist. Seejärel lisati 40 ühikut *Recombinant RNasin^R Ribonuclease Inhibitor*-it (“Promega”) ja 15 ühikut SP6 RNA polümeraasi (“Promega”). Süntees viidi läbi 37 °C juures 90 minuti jooksul. Saadud RNA saagist ja kvaliteeti hinnati agarosgeel-elektrofooresil.

Viirus-sarnaste partiklite (VLP-de) kogumine

SFV replikon RNA-dega transfekteeritud rakke inkubeeriti 48 tundi 33 °C juures. Peale inkubeerimise lõppu koguti transfekteeritud rakkudelt VLP-sid sisaldav sööde 30 ml tuubi ning tsentrifugeeriti 16 000 rpm 30 minutit +4 °C juures, kasutades Sorvall RC-5B tsentrifugeerija ja rootorit SS-34. Supernatant kanti ettevaatlikult üle ultratsentrifugeerituubi (Beckman 19 x 89 mm), kuhu oli eelnevalt lisatud 2 ml 20%-list sahharoosi ("sahharoospadi") TNE puhvris (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA). Seejärel tsentrifugeeriti proove 25 000 rpm 2 tundi +4 °C juures (rootor SW41TI, L8-M *Ultracentrifuge*, "Beckman"). Järgnevalt aspireeriti sööde ja sahharoos ning sademele lisati 100 µl TNE puhvrit ning segati *vortex*-il. Saadud VLP-sid sisaldavad preparaadid külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati –70 °C juures.

Rakkude nakatamine VLP-dega

Rakkudelt (90 % konfluentne 35 mm plaat) eemaldati sööde, pesti PBS-iga, mille järel lisati VLP-sid (kogus sõltus konkreetsest katsest) 500 µl seerumvabas GMEM või IMDM söötmes. Rakke nakatati 60 minutit 37 °C juures tassi vahepeal liigutades. Seejärel lisati 4 ml GMEM või IMDM söödett ning inkubeeriti 37 °C ja 5% CO₂ sisalduse juures.

Rekombinantsete valkude ekspressiooni detekteerimine *Western blot* meetodil

Rekombinantsete valkude ekspressiooni indutseerimiseks T-RExTM rakuliinides lisati rakuliinile tetratsükliini lõppkontsentratsiooniga 1 µg/ml. Rakke indutseeriti 1-24 tundi (2×10^6 rakku) ning lüüsi järgnevalt: rakke pesti kaks korda 1x PBS-iga, siis lisati 100µl-t 2xLaemmleri puhvrit (100 mM TrisHCl, pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.2% broomfenoolsinine, 20% glütserool) ning koguti kogu viskoosne materjal (ca. 90 µl) 1.5 ml tuubi. Rakulüüsi kuumutati 100 °C 10 minutit ning fuugiti siis 13 000 rpm 5 minutit (Biofuge; "Heraeus instruments"). Supernatandis olevad valgud lahutati geelelektroforeesil 8% SDS-polüakrüülamiidgeelil. Ülekanne toimus 20 minutit

ülekandepuhvris (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0.037% SDS, 20% etanool) firma “Amersham” nitrotselluloosfiltrile (Hybond™-ECL™) voolutugevusega 0.55 mA/cm², kasutades poolkuiva ülekande meetodit ja “Bio-Rad Instruments” aparati. Filter blokeeriti 1 tunni jooksul ruumitemperatuuril 5% lõssipulbri lahuses (sisaldades veel 1xPBS-s, 0.1% Tween20). Järgnevalt inkubeeriti filtrit vastavalt katsele küülikus toodetud nsP1 (10000x lahjendus), nsP2 (6000x lahjendus), nsP3 (10000x lahjendus) või nsP4 (4000x lahjendus) vastase polükloonaalse antikehaga 1 tund 2% lõssipulbri lahuses (sisaldades veel 1xPBS-s, 0.1% Tween20) ja pesti siis 3x10 minutit pesulahuses (50 mM TrisHCl pH7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20). Sekundaarse antikehaga, milleks oli peroksüdaasiga konjugeeritud küüliku IgG vastane kitse antikeha (lahjendusega 1:10000), inkubeeriti filtrit 1h 2% lõssipulbri lahuses (sisaldades veel 1xPBS-is, 0.1% Tween20) ja seejärel pesti 15 minutit ja 2x10 minutit pesulahusega. Signaal detekteeriti kasutades ECL™ Kit'i (“Amersham Pharmacia Biotech”) ja eksponeeriti röntgenfilmile.

Immuunfluorestsentsanalüüs

Rakke kasvatati kattedklaasidel 60% konfluentsuseni. Rekombinantse valgu ekspresseerimiseks indutseeriti rakuliini tetratsükliiniga 24 tunni jooksul. Peale seda eemaldati sööde ning preparaati pesti 3 korda 1xPBS-iga. Kattedklaasil kasvanud rakud fikseeriti 4% paraformaldehüüdi (PFA) lahusega toatemperatuuril 15 minutit. Seejärel eemaldati fikseerimislahus ja preparaati pesti 3 korda 1xPBS-iga ja töödeldi 50 mM NH₄Cl-ga 15 minutit. Seejärel preparaati pesti 1 kord 1xPBS-iga ning permeabiliseeriti membraanid 0.1% Triton-X lahuses 2 minuti jooksul. Peale seda pesti preparaate pesti 2 korda 1xPBS-iga ning blokeeriti 3% BSA/Dulbeccos (0.8 M CaCl₂ ja 0.5M MgCl₂ PBS-is) 20 minutit toatemperatuuril. Järgnevalt inkubeeriti preparaati vastavate primaarsete antikehadega (lahjendus vastavalt antikehale valmistati 3% BSA/Dulbeccos) 1 tunni jooksul. Seejärel pesti preparaati 3x10 minutit 0.2% BSA/Dulbeccos. Järgnevalt inkubeeriti preparaati FITC-ga konjugeeritud küüliku IgG vastase kitse antikehaga (100x lahjendus) või Texas Red-ga konjugeeritud küüliku IgG vastase kitse antikehaga (100x lahjendus) (1µg/µl 3%BSA /Dulbeccos lahuses) 1 tunni jooksul. Preparaati pesti 3x 10 minutit 0.2% BSA/Dulbeccos ning seejärel tehti järelfikseerimine 3% PFA lahuses 5

minutit. Jällegi pesti 3x 10 minutit 1xPBS ning lõpuks destilleeritud vees. Alusklaasi ja katteklaasi vahele lisati 5 µl sulundusvedelikku (Mowiol 4-88, 2.5 % DABCO). Katteklaasid asetati alusklaasidele nii, et rakud jääksid klaaside vahele. Preparaadid mikroskopeeriti OLYMPUS U-RFL-TX mikroskoobi abil ja tulemused pildistati, kasutades CD kaamerat (“Olympus”) ja vastavat tarkvara. Mõnede proovide mikroskopeerimiseks kasutati ka konfokaalmikroskoopi.

EGFP-d ekspresseeriva rakuliini FACS analüüs

Stabiilse indutseeritavat EGFP ekspressioonikasseti sisaldava rakuliini analüüsiks kasutati läbivoolu tsütomeetria meetodit, kasutades Becton-Dickinsoni FACSCalibur süsteemi. Rakke indutseeriti tetratsükliiniga 24 tunni jooksul, suspendeeriti söötmes ning koguti 15 milliliitrisesse koekultuuri tuubi ning asetati tagasi 37 °C ja 5 %-lise CO₂ sisalduse juurde kappi, kust iga proov võeti välja alles vahetult enne mõõtmist, et tagada võimalikult vähest surnud rakkude osakaalu. Kasutades indutseerimata rakke, pandi paika sobiv voolutuskiirus (500-1000 rakku sekundis). Katses mõõdeti kolme parameetrit, millega sai teha kindlaks osakeste (rakkude) suurus, pinnastruktuuri ja helendumist. Saadud andmed kajastusid graafikutena. Indutseerimata T-REx-EGFP rakuliini kasutati rakkude autofluorestsentsi mõõtmiseks. Et vältida tausta fluorestsentsi, arvestati umbes 1% autofluorestsentsist tausta fluorestsentsiks, mis siis hiljem indutseeritud rakuliini fluorestsentsist maha arvestati.

VLP-de tiitri määramine

Semliki Forest viiruse pSFV1-EGFP ja pSFV1-luc replikone sisaldavate VLP-dega nakatatud BHK-21 rakke analüüsiti, kasutades läbivoolu tsütomeetria meetodit (Becton-Dickinson FACSCalibur System) (kirjeldatud eespool). Tiiter määrati 12 tundi peale nakatamisest.

SFV-luc-ga nakatatud BHK-21 rakud koguti kokku ja fikseeriti 4 % PFA-ga 15 minutit toatemperatuuril. Lisati 5 ml 1 % BSA, 0,05 % Tween-20 lahust PBS-is (edaspidi BT-PBS) ja fuugiti 1000 rpm 20 °C 5 minutit (“Eppendorf Centrifuge 5810R”). Seejärel

eemaldati supernatant ja rakke permeabiliseeriti 100 µl 0,2 % TritonX-100 lahuses 10 minutit jääl. Seejärel lisati 3 ml BT-PBS-i ning tsentrifugeeriti 1000 rpm 20 °C 5 minutit. Eemaldati supernatant ja inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril kasutades polükloonaalset nsP3 vastast antikeha (polükloonaalne küüliku antikeha, 300x lahjendus) 200 µl 5 % lõssipulbrilahuses PBS-Tween-is. Seejärel lisati taas BT-PBS-i, fuugiti 1000 rpm 20 °C 5 minutit ja inkubeeriti 1 tund pimedas toatemperatuuril 50 µl kitses toodetud küüliku IgG-vastase sekundaarse Texas Red-konjugaadiga (100x lahjendus), lahjendatuna BT-PBS-is. Lisati taas BT-PBS-i, fuugiti 1000 rpm 20 °C 5 minutit, eemaldati supernatant ja rakud suspendeeriti BT-PBS-is ning analüüsiti. Kasutades nakatamata rakke, pandi paika sobiv voolutuskiirus (500-1000 rakku sekundis). Saadud andmed kajastusid graafikutena. Tiitri määramiseks kasutati ka immuunofluorestsentsanalüüsi.

Rakkude elulemuse määramine

Rakkude elulemuse määramiseks koguti rakud 24, 48 ja 72 tundi peale indutseerimist 15 ml tuubidesse ja fuugiti 200g juures 20 °C 5 minutit (“Eppendorf Centrifuge 5810R”). Eemaldati supernatant ja rakud suspendeeriti 1 µg/ml propiidiiumiodiidi lahuses PBS-is. Analüüsimiseks kasutati läbivoolu tsütomeetria meetodit (Becton-Dickinson FACSCalibur System).

Lutsiferaasi aktiivsuse määramine

Rakke kasvatati 24 tundi või kuni 70% konfluentsuse saavutamiseni. Pooltel tassidel indutseeriti rakke (6x 3.5 mm plaadilt) tetratsükliiniga (1 µg/µl) 8 tundi. Seejärel eemaldati sööde, pesti rake PBS-iga ning lisati SFV-luc VLP-sid üks virion raku kohta (moi 1) 150 µl seerumvabas IMDM söötmes. Rakke inkubeeriti 60 minutit 37 °C juures tassi vahepeal liigutades. Seejärel lisati 2 ml IMDM söödet ning inkubeeriti 37 °C tingimustel 6h. Rakkudelt eemaldati sööde, pesti 2 korda 1xPBS-iga ning lisati 200 µl lüüsi puhvrit (*Luciferase assay system Kit*, “Promega”) Ø 35 mm plaadi kohta. Rakulüsaat koguti kokku, rakujäänused eemaldati tsentrifugeerimise teel. Supernatant koguti uude

tuubi ning lüsaadist tehti 1/100 lahjendused lüüsi puhvris. Luminomeetri tuubid ("Turner Designes") täideti 50 µl LAR-iga (*Luciferase Assay Reagent*, "Promega"), enne mõõtmist lisati 20 µl lahjendatud rakulüsaati, segati korralikult, mõõdeti, kasutades luminomeetrit ("Turner Designes") ning tulemus kajastati graafikutena.

Metaboolne märgistamine (*pulse-chase*)

Rakke kasvatati 80 % konfluentsuseni, indutseeriti tetratsükliiniga 4 tunni jooksul (polüproteiini ekspresseerivate rakuliinide puhul 6h). Seejärel pesti rake kaks korda PBS-iga ja lisati 2 ml metioonini ja tsüsteiini vaba MEM söödet ("Sigma") ning inkubeeriti 37 °C juures. 30 minuti möödudes lisati rakkudele 50 µCi ³⁵S-metioniini ja ³⁵S-tsüsteiini segu ("Amersham", Reductive PRO-MIX) ja inkubeeriti 37 °C juures 45 minutit. Radioaktiivne sööde aspireeriti ja asendati IMDM söötmega, kuhu lisati täiendavalt metioniini ja tsüsteiini (lõppkontsentratsioonid vastavalt 10mM ja 5mM). Pulss (nullpunkt) lüüsi 5 minuti pärast 200 µl-s 1% SDS-is ja kuumutati 100 °C juures 2 minutit ning jahutati jääl (*chase* lüüsi vastavalt eksperimendi vajadustele; näiteks polüproteiini märgistamise puhul 90 minuti pärast).

Immuunosadestamine

Metaboolselt märgistatud ja 1% SDS lüüsitud proovidele lisati 2 ml NET puhvrit (1% NP40, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl) ning küüliku polüklooraalseid antikehi (lahjendused 1:5000 nsP3 ja nsP1, 1:2000 nsP2 ja nsP4). Proove loksutati 4 °C juures, 12 h pärast lisati 50 µl 50% Protein A Sepharose® CL-4B ("Amersham Biosciences") suspensiooni NET puhvris ja loksutati segajal 1 h. Proteiin A sefaroos oli eelnevalt tasakaalustatud 0.2% Dulbecco-PBS-is ja pestud neli korda NET-is. Proove pesti neli korda NET-is (1% NP40, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 400 mM NaCl). Peale viimase pesulahuse eemaldamist lisati Proteiin A sefaroosi graanulitele 30µl 1% Laemmli puhvrit ja seondunud valgud solubiliseeriti kuumutades 100 °C juures 2 minutit. Seejärel fuugiti Proteiin A sefaroos põhja ja supernatandis olevad märgistatud valgud lahutati 10% SDS-polüakrüülamiidgeelis. Geeli loksutati 1M Na-

salitsüaadilahuses 30 minutit, kuivatati ning eksponeeriti röntgenfilmile või detekteeriti signaal *PhosphoImager*'iga.

TULEMUSED JA ARUTELU

1. Semliki Forest viiruse mittestruktuursete valkude ekspressioon indutseeritavates HEK 293 T-RExTM põhistes rakuliinides

1.1. Rakuliinide konstrueerimine

HEK 293 T-RExTM on tetratsükliiniga reguleeritav rakuliin, mis ekspresseerib stabiilselt tetratsükliini repressorit (“Materjal ja Metoodika”). Sellele rakuliinil põhinevate uute rakuliinide konstrueerimisel kasutati algplasmiidina pcDNA4/TO, kuhu oli vastavalt inserteeritud EGFP-d või SFV mittestruktuurseid valke kodeerivad järjestused (“Materjal ja Metoodika”). Hübrüidsed lineariseeritud plasmiidid (ensüüm *PvuI*) transfekteeriti HEK 293 T-RExTM rakkudesse elektroporatsiooni meetodil. Töö selle osa tulemusena saadi järgnevad stabiilsed rakuliinid (Tabel 2), mida kasutati alljärgnevate uurimuste läbiviimiseks.

Tabel 2. Töö käigus konstrueeritud EGFP-d ja SFV mittestruktuurseid valke ekspresseerivad rakuliinid. Pluss märk tabelis näitab valku/valke, mida antud rakuliin ekspresseerib.

Rakuliin	EGFP	nsP1	nsP2	nsP3	nsP4	wt või mutant (teatud omadused)
T-REx-EGFP	+					wt
T-REx-nsP1		+				wt
T-REx-nsP1 ^{6D}		+				valku ei palmitüleerita
T-REx-nsP2			+			wt
T-REx-nsP2 ^{CA}			+			proteolüütiliselt inaktiivne
T-REx-nsP2 ^{RDR}			+			NLS muteeritud
T-REx-nsP2 ^{CA+RDR}			+			proteolüütiliselt inaktiivne ja NLS muteeritud
T-REx-nsP2 ^{GNS}			+			puudub NTP-aasne/helikaasne aktiivsus
T-REx-nsP3				+		wt
T-REx-Ubi/nsP4					+	wt
T-REx-P123		+	+	+		wt
T-REx-P12*3		+	koos			nsP2/nsP3 lõikesait blokeeritud
T-REx-P1234		+	+	+	+	wt
T-REx-P1*234		koos		+	+	nsP1 ja nsP2 lõikesait blokeeritud

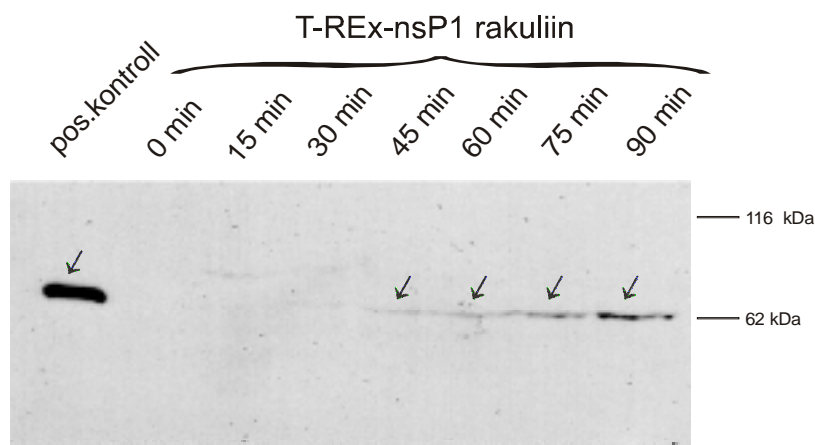
1.2. Kontrolleksperiment 1: EGFP ekspressiooni indutseerimine (Tet-OFF süsteemi kontroll)

Kontrollimaks tetratsükliiniga indutseeritavat promootorit Tet-OFF süsteemis, kasutati T-REx-EGFP rakuliini. Rakke indutseeriti tetratsükliiniga ning 24 tunni pärast analüüsiti läbivoolu tsütomeetriaga (Becton-Dickinson FACSCalibur System). Peale indutseerimist osutusid EGFP positiivseteks 96 % rakke, samas kui indutseerimata kontrollis ei olnud EGFP positiivseid rakke (andmed pole esitatud). Antud tulemused näitasid veenvalt, et kasutatud süsteem töötab efektiivselt ja on seega kavandatud uurimuse läbiviimiseks kasutatav. Sellest lähtuvalt loeti HEK 293 T-RExTM rakuliin kõlblikuks konstrueerimaks selle baasil uusi rakuliine, mis ekspresseeriksid SFV mittestruktuurseid valke.

1.3. Kontrolleksperiment 2: Rekombinantse valgu indutseerimise dünaamika

Indutseeritava süsteemi üheks kõige olulisemaks omaduseks on induktsiooni efektiivsuse kõrval (indutseeritava valgu maksimaalselt saavutatav kontsentratsioon) ka induktsiooni kiirus ja dünaamika. Kuna need parameetrid sõltuvad eelkõige süsteemist (repressor, promootor), mis olid kõikidel juhtudel samad, siis uuriti neid vaid ühe valgu näitel, milleks valiti SFV nsP1. Valgu nsP1 ekspressiooni indutseerimiseks lisati rakkudele tetratsükliini lõppkontsentratsiooniga 1 µg/ml ning valgu ekspressiooni T-REx-nsP1 rakuliinis kontrolliti immuunoblotiga, kasutades nsP1 vastase antikehana küülikus toodetud nsP1 vastast polükloonaalset antikeha. *Western blot* analüüsile tuginedes võib väita (joonis 13), et 45 minutit peale nsP1 rakkude indutseerimist T-REx-nsP1 rakuliinis on võimalik tuvastada nsP1 valgu ekspressioon.

Analoogselt ülal kirjeldatuga uuriti nsP1 valgu ekspressiooni dünaamikat ka hilisematel ajapunktidel. *Western blot* meetodit kasutades leiti, et maksimaalne rekombinantse valgu juurdesüntees leiab aset ajavahemikus 2-6 h peale induktsiooni algust (andmeid ei ole joonisena välja toodud).



Joonis 13. nsP1 valgu indutseerimise dünaamika kontroll rakuliinis T-REx-nsP1. Positiivse kontrollina on kasutatud SFV partiklitega nakatatud BHK21 rakkude totaallüsaati. nsP1 vastase antikehana kasutati küülikus toodetud nsP1 vastast polükloonaalset antikeha. Nooled näitavad nsP1 valgule vastavat vööti.

1.4. Rekombinantsete valkude ekspressioon indutseeritavates rakuliinides

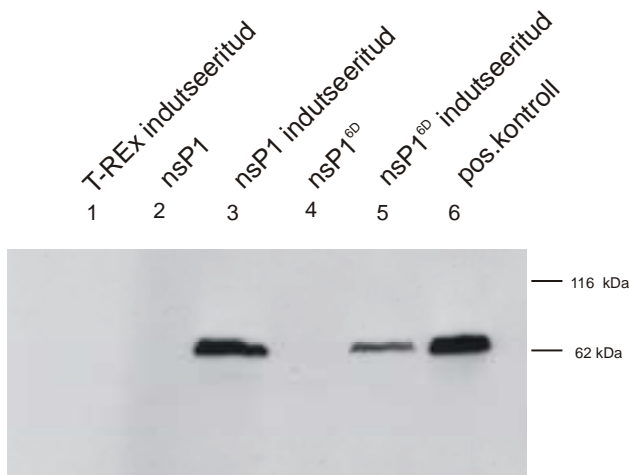
1.4.1. ns-valkude ning nende mutantsete vormide ekspressiooni kontroll *Western blot* meetodil

Valkude ekspressiooni konstrueeritud rakuliinides kontrolliti, kasutades *Western blot* meetodit. Võõrgeeni ekspressiooni indutseerimiseks lisati rakkudele tetratsükliini lõppkontsentratsiooniga 1 µg/ml. 24 tunni möödudes rakud lüüsi ja ligikaudu 100 000 rakust pärinevat lüsaati analüüsi elektroforeesil 10% SDS-polüakrüülamiidgeelis (vt. “Materjal ja Metoodika”). Positiivse kontrollina kasutati SFV partiklitega nakatatud BHK21 rakkude totaallüsaati (valmistatud 12 h peale infektsiooni, st. hilise infektsiooni staadiumis), negatiivse kontrollina lüsaate indutseerimata rakuliinidest. Nii positiivse kui ka negatiivse kontrollina kasutatud rakulüsaadi hulk vastas ligikaudu 100 000-le rakule.

Joonistel 14, 15, 16 ja 17 on ära toodud valik tulemustest, mis saadi SFV mittestruktuursete valkude ekspresseerivaid rakuliine analüüsides. Kokku analüüsi kümme sõltumatut rakuliini iga kasutatud konstrukti kohta. Nagu on joonistelt näha, ekspresseeruvad konstrueeritud rakuliinides kõik SFV mittestruktuursete valkude wt ja mutantsed vormid. Kõikidel juhtudel on näha, et ekspresseeritavad valgud on oodatud

suurusega. Rekombinantse valgu ekspressioon on absoluutselt sõltuv induktori olemasolust, sest indutseerimata kontrollides ei ole valgu ekspressioon detekteeritav.

Joonisel 14, radadel 3 ja 5 on näha, et nsP1 ja tema mutantne vorm ekspresseeruvad konstrueeritud rakuliinides. Indutseerimata kontrollides valgu ekspressioon puudub.



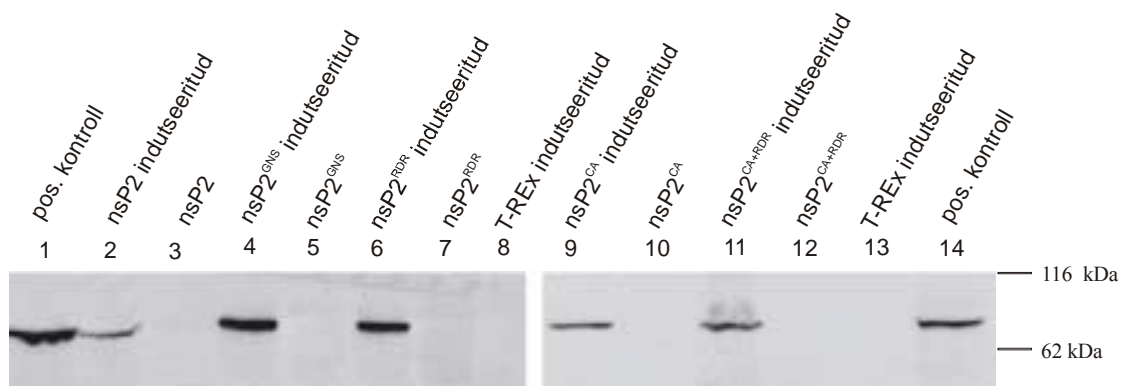
Joonis 14. nsP1 valgu ja mutandi nsP1^{6D} ekspressiooni kontroll T-REx-nsP1 ja T-REx-nsP1^{6D} rakuliinides (vastavalt rajad 3 ja 5). Negatiivse kontrollina on kasutatud indutseerimata T-REx-nsP1 (rada 2) ja T-REx-nsP1^{6D} (rada 4) rakuliine ning indutseeritud HEK 293 T-RExTM (rada 1) rakkude lüsaati. Positiivse kontrollina on kasutatud SFV partiklitega nakatatud BHK21 rakkude totaallüsaati (rada 6). nsP1 vastase antikehana kasutati küülikus toodetud nsP1 vastast polükloonaalset antikeha.

Ehkki töös kasutatud analüüsi meetod ei võimalda ekspresseeritud valgu hulga täpset kvantifitseerimist, võib sellel joonisel kujutatud tulemustest järeldada, et nsP1 (wt) valgu hulk indutseeritud rakkudes on ligikaudu võrdne sama valgu hulgaga SFV-ga nakatatud rakkudes (hiline infektsioon). Samal ajal kui nsP1^{6D} valgu kogus on selgelt väiksem. Sõltumatute rakuliinide analüüs näitas, et tõenäoliselt ei ole tegemist juhusliku, integratsiooni kohast sõltuva efektiga (tulemused ei ole joonisena ära toodud). Kuna mõlema valgu ekspressiooniks kasutatud süsteem on üks ja see sama, siis võib erinev valgu kontsentratsioon olla seotud:

- valkude erineva elueaga rakus (mutantne valk on nõrgemini mebraanidega seotud ja võib omada lühemat eluiga),
- valkude efektiga raku biosünteesidele, mis mõjutab negatiivse või positiivse tagasisideme kaudu ekspresseeritava valgu kontsentratsioone.

Mõlema hüpoteesi kontrollimiseks on alustatud vastavaid katseid, kuid nende tulemused pole hetkel veel selgunud.

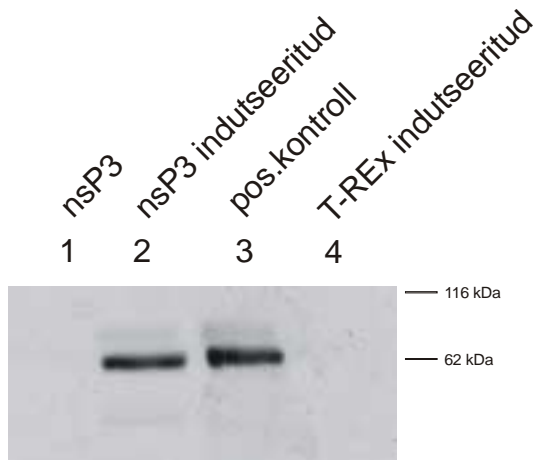
Joonisel 15 radadel 2, 4, 6, 9 ja 11 on näidatud rekombinantse nsP2 ja tema mutantsete vormide ekspressiooni. Ekspresseeritavate valkude hulk varieerub erinevate mutantide puhul, olles kõige väiksem wt nsP2 puhul ja suurim nsP2^{GNS} mutandil (viimasel juhul on valgu hulk ligikaudu võrdne nsP2 hulgaga nakatatud rakkudes). Analoogselt nsP1 valgu ekspresseerivate rakuliinidega ei ole ka nsP2 konstruktide puhul rekombinantset valgud indutseerimata rakuliinides detekteeritavad (rajad 3, 5, 7, 10, ja 12).



Joonis 15. nsP2 ja mutantsete nsP2^{GNS}, nsP2^{RDR}, nsP2^{CA}, nsP2^{CA+RDR} valkude ekspressiooni kontroll T-REx-nsP2, T-REx-nsP2^{GNS}, T-REx-nsP2^{RDR}, T-REx-nsP2^{CA} ja T-REx-nsP2^{CA+RDR} rakuliinides (rajad 2, 4, 6, 9, 11). Negatiivse kontrollina kasutati indutseerimata rakuliine T-REx-nsP2, T-REx-nsP2^{GNS}, T-REx-nsP2^{RDR}, T-REx-nsP2^{CA} ja T-REx-nsP2^{CA+RDR} (rajad 3, 5, 7, 10, 12) ning indutseeritud HEK 293 T-RExTM rakkude lüsaati (rajad 8 ja 13). Positiivse kontrollina kasutati SFV partiklitega nakatatud BHK21 rakkude totaallüsaati (rajad 1 ja 14). nsP2 vastase antikehana kasutati hiires toodetud nsP2 vastast monoklonaalset antikeha.

Sarnaselt ülal kirjeldatuga on märgatav, et ka nsP2 ekspressioonitase sõltub valgu kodeerivas järjestuses paiknevaist mutatsioonidest. Ka siinkohal on võimalikud ülal toodud mehhanismid. Selles plaanis on huvitav märkida, et nsP2 wt ekspresseerub olulist madalamal tasemel kui mitmed tema mutandid. Selline tulemus on näivas kooskõlas laialt levinud teoriga, et nsP2 osaleb raku spetsiifiliste biosünteeside mahasurumisel (st. vähenenud nsP2 kontsentratsioon on negatiivse tagasisideme tulemus). Selle hüpoteesi kontrollimiseks läbi viidud katseid kirjeldatakse allpool.

nsP3 ekspressioon on näha joonisel 16, rada 2. Sarnaselt nsP1 ja nsP2 ekspresseerivate rakuliinidega puudub nii indutseerimata kui ka mitte modifitseeritud T-REx rakuliinis vastava valgu ekspressioon. Indutseeritud rakuliinis on nsP3 tase ligikaudu võrdne nsP3 tasemega SFV-ga nakatatud rakkudes.

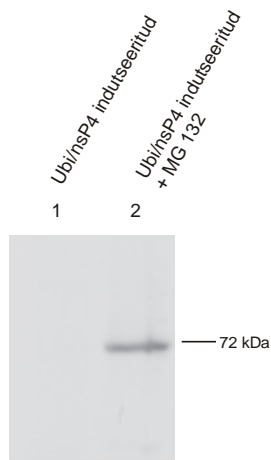


Joonis 16. nsP3 valgu ekspressiooni kontroll T-REx-nsP3 rakuliinis (rada 2). Negatiivse kontrollina kasutati indutseerimata rakuliini (rada 1) ja indutseeritud HEK 293 T-RExTM rakkude lüsaati (rada 4). Positiivse kontrollina kasutati SFV partiklitega nakatatud BHK21 rakkude totaallüsaati (rada 3). nsP3 vastase antikehana kasutati küülikus toodetud nsP3 vastast polükloonaalset antikeha.

1.4.2. nsP4 ekspressiooni uurimine pulse-chase meetodil

nsP4 ekspressioonisüsteemi kavandades tuli arvestada, et N-terminaalne metioniini jääk inaktiveerib nsP4-ja ja seetõttu ei oma seesugune rakuliin praktilist väärtust. Saavutamaks natiivse türosiin jäägi asetsemist nsP4 N-terminuses kasutati konstrukti Ubi/nsP4, mille *in vivo* protsessingu tulemusena moodustub raku natiivne (korrektse N-terminusega) nsP4. Samas oli ka teada, et natiivne nsP4 on suhteliselt ebastabiilne, kuna N-terminaalne türosiinjääk toob kaasa nsP4 kiire lagunemise (N-end rule). Selle ebastabiilsuse tulemusena (nsP4 degradeeritakse kiiresti ubikvitiini rajas) ei olnud võimalik detekteerida nsP4 ekspressiooni *Western blot* meetodil (andmed esitamata). Selleks, et tõestada nsP4 ekspressiooni vastavas rakuliinis, indutseeriti rakke tetratsükliiniga proteosoomi inhibiitori MG132 (lõppkontsentratsiooniga 5mM) juuresolekul 4 tundi. Järgnevalt märgistati sünteesitud valgud ³⁵S-metioniini ja ³⁵S-

tsüsteiini seguga 45 minuti jooksul ning rakud lüüsi denaturatiivsetes tingimustes. nsP4 immuunosadestati küülikus toodetud polükloonaalset antiseerumit kasutades. Saadud tulemused näitasid, et indutseeritud T-REx-Ubi/nsP4 rakuliinis ekspresseeritud nsP4 valku on võimalik detekteerida ainult proteosoomi inhibiitori juuresolekul (joonis 17, rada 2). Proteosoomi inhibiitorit lisamata lagunadatakse nsP4 liialt kiiresti (pooleluiga on ilmselt alla 5 minuti) selleks, et olla antud meetodil detekteeritav (joonis 17, rada 1).



Joonis 17. nsP4 valgu ekspressiooni kontroll rakuliinis T-REx-Ubi/nsP4, kasutades metaboolset märgistamist ^{35}S -metioniini ja ^{35}S -tsüsteiini seguga ning immuunosadestamist. Rada 1- indutseeritud T-REx-Ubi/nsP4 rakuliin ja rada 2- indutseeritud rakuliin T-REx-Ubi/nsP4 koos proteosoomi inhibiitoriga. nsP4 immuunosadestati kasutades küülikus toodetud nsP4 vastast polükloonaalset antikeha.

nsP4 ebastabiilsust SFV-ga nakatatud rakus on suhteliselt hästi uuritud nähtus. Samas on teada, et nakatatud rakus moodustab ca. 20% nsP4-st suhteliselt stabiilse fraktsiooni, samal ajal kui ülejäänud degradeeritakse. Selle nsP4 valgu stabilisatsiooni mehhanism ei ole selge, oletatud on interaktsioone teiste SFV valkude või raku komponentidega. Antud katse näitab selgesti, et T-REx-Ubi/nsP4 rakuliinis nsP4-ja stabiliseeriv süsteem puudub või on mittetäielik. Sellest tulemusest võib teha järelduse, et nakatatud rakus osaleb SFV nsP4 stabiliseerimisel vähemalt üks viiruse poolt kodeeritud valk või viiruse poolt indutseeritav struktuur.

Kokkuvõttes näitavad antud katsetes saadud tulemused (joonised 14, 15, 16, 17), et konstrueeritud rakuliinid ekspresseerivad vastvaid rekombinantseid valke ja on seega sobivad edaspidisteks katseteks.

1.5. SFV polüproteiine ekspresseerivad rakuliinid

SFV mittestruktuursed valgud ekspresseeritakse infektsiooni käigus polüproteiinide kujul. Polüproteiinid on vajalikud SFV RNA sünteesi läbiviimiseks (Kaariainen and Ahola, 2002). Samuti näitavad viimased andmed SFV replikatsioonikompleksi moodustamise kohta, et korrektsed replikatsioonikompleksi struktuurid moodustuvad ainult juhul kui nende koostisesse kuuluvad ns-valgud ekspresseeritakse ühise eelvalguna, st. individuaalselt ekspresseerituna ei ole SFV ns-valgud võimelised teineteise (ja raku komponentidega?) korrektselt interageeruma ja funktsionaalseid struktuure moodustama (Salonen, et al., 2003). Sellest lähtuvalt konstrueeriti antud töös ekspressioonikassetid, mis peaksid ekspresseerima SFV wt replikaasi (P1234), replikaasi mittepolümeraasset osa (P123) ja nende protsessinguvõimetuid mutante (P1*234 ja P12*3), mis ekspresseerivad teoreetiliselt SFV varajast replikaasi või selle osi. Kõiki nimetatud konstrukte kasutati stabiilsete rakuliinide saamiseks analoogselt SFV ns-valke ekspresseerivate konstruktidega. Saadud rakuliinides indutseeritavat rekombinantse valgu sünteesi analüüsiti *Western blot* ja *pulse-chase* meetodit kasutades.

1.5.1. Analüüs nsP1 vastast antikeha kasutades

nsP1 regiooni kodeerivad järjestused on olemas kõigis konstrueeritud polüproteiine ekspresseerivates rakuliinides, kuid nsP1 protsessimise poolest peaksid liinid teoreetiliselt teineteisest erinema:

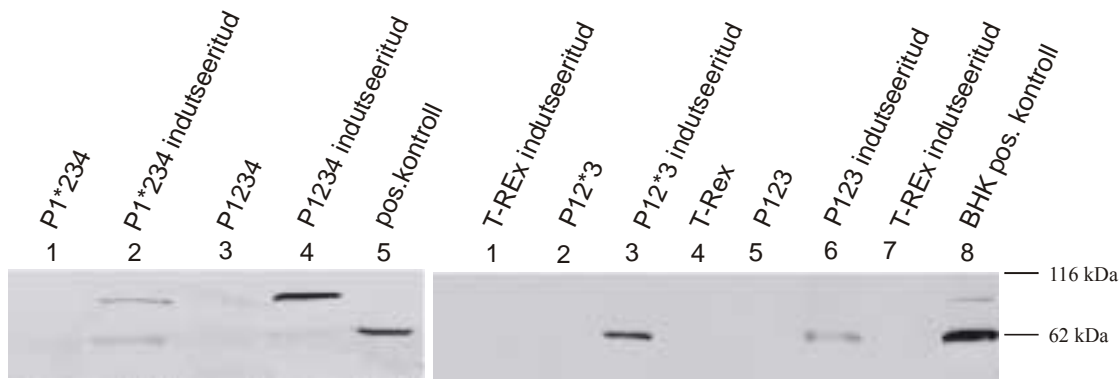
- rakuliinides T-REx-P1234, T-REx-P123 ja T-REx-P12*3 lõigatakse valk nsP1 polüproteiini küljest lahti,
- rakuliinis T-REx-P1*234 peaks jääma nsP1 seotuks nsP2-ga.

Western blot analüüsi tulemused, mis on toodud joonisel 18 (rajad 2 ja 4), on selle seisukohaga ilmses vastuolus. Nagu on jooniselt näha, lõigatakse nii wt T-REx-P1234 kui ka mutantse rakuliinis T-REx-P1*234 ekspresseeritud polüproteiinide küljest lahti

sarnane nsP1 epitoope sisaldav fragment. Seejuures see fragment on suurema molekulmassiga (joonis 18, rajad 2 ja 4) kui wt nsP1 (rada 5). Radadel 2 ja 4 võib näha ka näivalt õige molekulmassiga produkti, kuid seda ekspresseeritakse oluliselt madalamal tasemel kui suuremat valku ja selle valgu päritolu (ja olemus) ei ole selge. Samas on selge, et tegemist on spetsiifilise ekspressiooniga, kuna indutseerimata kontrollis vastavad valgud puuduvad. Ka ei ole tegemist juhusliku tulemuse ega deletsiooniga, sest samasugune ekspressioonipilt tekkis arvukates analüüsitud ja teineteisest sõltumatult valmistatud rakuliinides.

Vastupidiselt P1234 ja P1*234 polüproteiine ekspresseerivatele liinidele annavad polüproteiine P123 ja P12*3 ekspresseerivad liinid *Western blot*´il nsP2 antikehaga signaali kohas, mis vastab nsP1 valgule (joonis 18, rajad 8 ja 11). Positiivse kontrollina on antud katsetes kasutatud SFV-ga nakatatud BHK21 rakke, negatiivse kontrollina indutseerimata ja T-RExTM rakuliine.

Saadud tulemus lubab oletada, et nsP1-te ekspresseeritakse T-REx-P123 ja T-REx-P12*3 rakuliinides, kuid T-REx-P1234 ja T-REx-P1*234 rakuliinides on ekspresseeritav nsP1 ebastandardse molekulmassiga, mis viitab võimalikule liitvalgule.



Joonis 18. nsP1 ekspressiooni kontroll rakuliinides T-REx-P1234, T-REx-P1*234, T-REx-P123 ja T-REx-P12*3 (rajad 2, 4, 8, 11). Negatiivse kontrollina on kasutatud indutseerimata rakuliine ja indutseeritud HEK 293 T-RExTM rakkude lüsaati (rajad 1 ja 12). Positiivse kontrollina on kasutatud SFV partiklitega nakatatud BHK21 rakkude totaallüsaati (rajad 5 ja 13). nsP1 vastase antikehana kasutati küülikus toodetud nsP1 vastast polüklooraalset antikeha.

1.5.2. nsP2 ekspressiooni kontroll SFV polüproteiine sisaldavates rakuliinides

Kuna polüproteiine ekspresseerivad rakuliinid protsessivad nsP1 valgu (või tema oletatava liitvalgu) ülejäänud polüproteiini küljest lahti, siis peab nendes olema ekspresseeritud aktiivne nsP2 proteaas. Selle kontrollimiseks analüüsiti polüproteiine ekspresseerivaid rakuliine ka nsP2 vastaseid antikehi kasutades. Teoreetiliselt peaks protsessing kulgema järgnevalt:

- rakuliinides T-REx-P1234 ja T-REx-P123 lõikab nsP2 autokatalüütiliselt end polüproteiini küljest lahti,
- rakuliinis T-REx-P1*234 jääb nsP2 seotuks nsP1-ga, kuna vastav lõikamissait on blokeeritud,
- rakuliinis T-REx-P12*3 jääb nsP2 seotuks nsP3-ga, kuna vastav lõikamissait on blokeeritud.

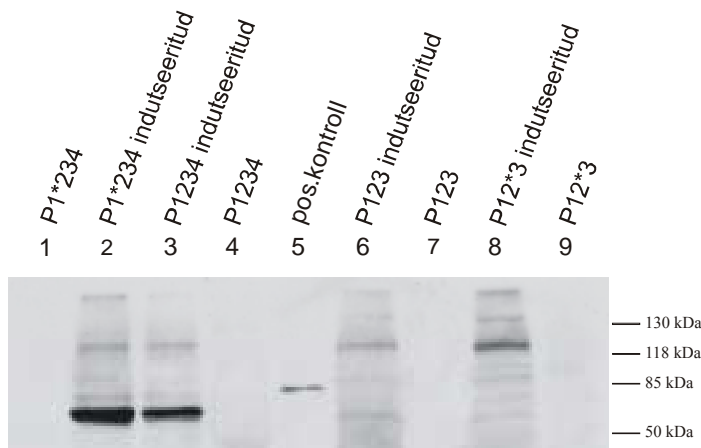
Nagu on näha joonisel 19, ei vasta ka sellel juhul saadud tulemused oodatule. nsP2 on detekteeritav nii T-REx-P1234 kui ka mutantses T-REx-P1*234 rakuliinis polüproteiini küljest lahti lõigatuna, kuid detekteeritava valgu molekulmass ei vasta nsP2 molekulmassile, vaid on sellest mõnevõrra väiksem (joonis 19, rajad 2 ja 3).

Rakuliinides T-REx-P123 ja T-REx-P12*3 on näha sarnane valgumuster kui ka T-REx-P1234, T-REx-P1*234 rakuliinides kuid signaali tugevus on siin tunduvalt nõrgem

(joonis 19, rajad 6 ja 8). Pildil on võimalik tuvastada ka suurema molekulmassiga valke, mis võivad olla veel protsessimata P1234 ja P123 polüproteiinid (rajad 2, 3, 6 ja 8). Positiivse kontrollina on antud katsetes kasutatud SFV-ga nakatatud BHK21 rakke, negatiivse kontrollina indutseerimata konstrueeritud rakuliinide lüsaate. nsP2 vastase antikehana kasutati hiire toodetud nsP2 vastast monoklonaalset antikeha.

Saadud tulemus näitab, et võrreldes positiivse kontrolliga ja molekulmassi markeriga ei ekspresseerita üheski konstrueeritud polüproteiine ekspresseerivas rakuliinis õige suurusega nsP2-te.

On tähelepanuväärne, et nii nsP1 kui ka nsP2 vastased antikehad tunnevad polüproteiine P1234 ja P1*234 ekspresseerivates liinides ära sarnaste molekulmassidega (tõestatud filtreid korduvalt nsP1 ja nsP2 antikehadega töödeldes) valgud. Ehkki puuduvad kindlad tõendid, et tegemist on ühe ja sama valguga, on loogiline oletada, et just nii see on. Sellisel juhul peab olema tegu nsP1/nsP2 liitvalguga (mis seletab tema äratundmist mõlema antikeha poolt), milles on deleteeritud kahe valgu vaheline protsessingusait (mis seletab seda, et P1234 ja P1*234 protsessingu produktid on identsed). Samas peab liitvalgus olema olemas aktiivne proteaas-domeen, mistõttu toimub vähemalt osaline lahtilõikamine nsP3 domääni küljest. Igal juhul on tegemist viiruse loomulikus infektsioonis mitte täheldatud produktidega. Nende produktide edasist analüüsi ja nende tekkimise kohta käivaid hüpoteese on käsitletud allpool.



Joonis 19. valgu nsP2 ekspressiooni kontroll rakuliinides T-REx-P1234, T-REx-P1*234, T-REx-P123 ja T-REx-P12*3 (rajad 2, 3, 6 ja 8). Negatiivse kontrollina on kasutatud induitsemata rakuliine (rajad 1, 4, 7 ja 9). Positiivse kontrollina on kasutatud SFV partiklitega nakatatud BHK21 rakkude totaallüsaati (rada 5). nsP2 vastase antikehana kasutati hiires toodetud nsP2 vastast monoklonaalset antikeha.

1.5.3. Valgu nsP3 ekspressiooni kontroll SFV polüproteiine sisaldavates rakuliinides

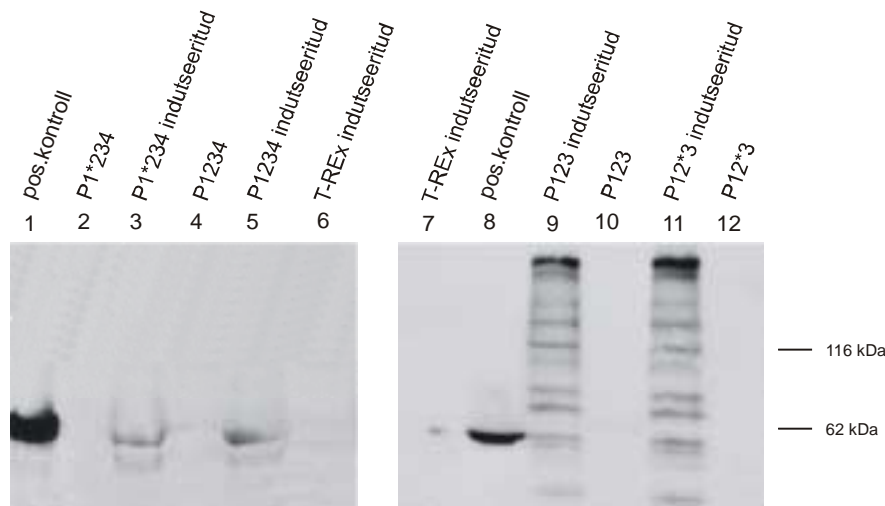
SFV polüproteiine ekspresseerivates rakuliinides T-REx-P1234, T-REx-P1*234, T-REx-P123 ja T-REx-P12*3 kontrolliti ka valgu nsP3 ekspressiooni. Ka see valk peaks ekspresseeruma erinevates vormides:

- rakuliinides T-REx-P1234, T-REx-P1*234 ning T-REx-P123 lõigatakse nsP3 polüproteiini küljest lahti,
- rakuliinis T-REx-P12*3 peaks jääma nsP3 seotuks nsP2-ga, kuna vastav lõikamissait on blokeeritud.

Saadud tulemused näitavad, et ootuspäraselt lõigatakse nsP3 T-REx-P1234 ja T-REx-P1*234 rakuliinides polüproteiini küljest lahti (joonis 20, rajad 3, 5). Moodustunud valgu molekulmass vastab nsP3 molekulmassile (61 kDa), kuid vastavat valku ekspresseeritakse madalal tasemel. Samas on nsP3 oodatavale molekulmassile vastavat valku rakuliinides T-REx-P123 ja T-REx-P12*3 väga vähe (joonis 20, rajad 9 ja 11) ning on võimalik, et seegi kujutab endast ebaspetsiifilise degradatsiooni, mitte spetsiifilise protsessingu produkti. Nende polüproteiinide ekspressiooni peamiseks produktiks on hoopis oluliselt suurema molekulmassiga valk (joonis 20, rajad 9 ja 11), mis kujutab endast ilmselt protsessimata polüproteiine P123 ja P12*3, kuna vastav signaal on

detekteeritav ka nsP1 (tulemused pole ära toodud) ja nsP2 antikehadega (joonis 19). Positiivse kontrollina on antud katsetes kasutatud SFV-ga nakatatud BHK21 rakkude lüsaati, negatiivse kontrollina indutseerimata ja HEK 293 T-RExTM rakuliine.

Saadud tulemus näitab, et polüproteiine ekspresseerivates rakuliinides ekspresseeritakse nsP3 domeeni, kuid selle protsessing toimub madalal tasemel. Samas on tegemist spetsiifilise signaaliga, kuna sarnased produktid ei ole indutseerimata kontrollides detekteeritavad.



Joonis 20. Valgu nsP3 ekspressiooni kontroll rakuliinides T-REx-P1234, T-REx-P1*234, T-REx-P123 ja T-REx-P12*3 (rajad 3, 5, 9, 11). Negatiivse kontrollina on kasutatud indutseerimata rakuliine (rajad 2, 4, 10, 12) ja indutseeritud HEK 293 T-RExTM rakkude lüsaati (rajad 6 ja 7). Positiivse kontrollina on kasutatud SFV partikkelitega nakatatud BHK21 rakkude totaallüsaati (rajad 1 ja 8). nsP3 vastase antikehana kasutati küülikus toodetud nsP3 vastast polükloonaalset antikeha.

Kokkuvõttena näitas polüproteiine ekspresseerivate rakuliinide analüüs *Western blot* meetodil, et ehkki nendes rakuliinides ekspresseeritakse vastavad SFV regioonid, leiavad aset mingid viiruse loomulikus infektsiooniprotsessis mitte aset leidvad protsessid. Nende protsesside olemuse väljaselgitamiseks kasutati tundlikumat *pulse-chase* ja immunosadestamise meetodeid (vt. allpool).

1.5.4 Polüproteiinide protsessingu uurimine pulse-chase ja immunosadestamise meetodil

Ülal kirjeldatud tulemused näitavad, et polüproteiinide protsessimine konstrueeritud rakuliinides ei vasta ootuspärasusele. Selle põhjuste selgitamiseks uuriti ajas kulgevat polüproteiinide protsessingut, kasutades tundlikku *pulse-chase* meetodit koos järgneva immunosadestamisega. Eksperimendi skeem oli järgnev:

- metaboolseks märgistamiseks kasutati ^{35}S -metioniini ja ^{35}S -tsüsteiini märgist (vt. “Materjal ja Metoodika”) ning märgistamine viidi läbi 45 minuti jooksul,
- *pulse* proovid koguti vahetult pärast 45 minutilist märgistamist ja seetõttu peaksid nad olema rikastatud vahetute translatsiooniproduktidega (mitteprotsessitud polüproteiinid),
- *chase* proovid lüüsi peale 90 minutit kestnud täiendavat inkubatsiooni mittemärgistatud Met ja Cys ülehulga juuresolekul. Seetõttu peaksid need samplid sisaldama *pulse*-faasi jooksul sünteesitud märgistatud valkude (polüproteiinide) protsessinguprodukte,
- metaboolselt märgistatud valgud immunosadestati nsP1, nsP2, nsP3 ja (P1234 ning P1*234 liinide puhul) nsP4 vastaste antikehadega

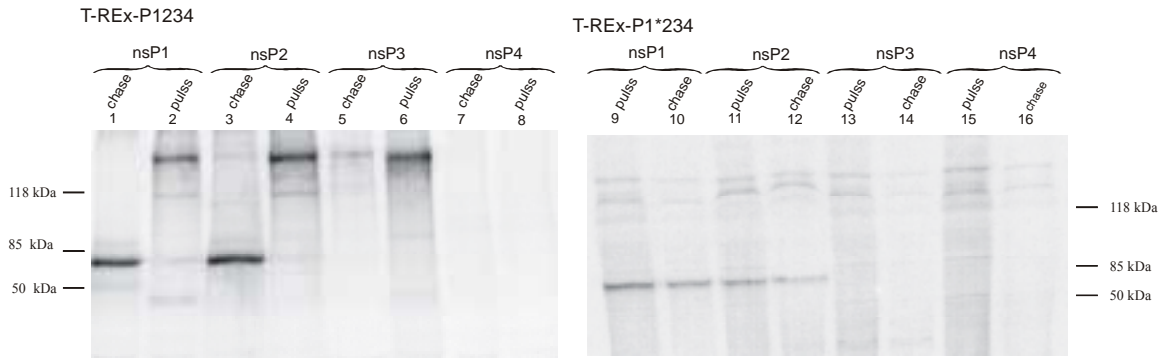
Rakuliinides T-REx-P1234 ja T-REx-P1*234 teostatud metaboolse märgistamise ja immunosadestamise tulemused on kajastatud joonisel 21. Nägu joonistelt näha erinevad T-REx-P1*234 ja T-REx-P1234 rakuliinide protsessingu analüüsi pildid oluliselt teineteisest. Selle põhjused ei ole teada ja on võimalik, et tegemist on individuaalse rakuliini omadustega (antud katses analüüsiti kummastki tüübist ainult ühte rakuliini) ja mitte fundamentaalse erinevusega P1234 ja P1*234 vahel. Erinevustele vaatamata kajastavad mõlemad pildid sarnaseid seaduspärasusi:

1. Rakuliinis T-REx-P1234 domineerib *pulse* proovis veel protsessimata polüproteiin (rajad 2, 4, 6), milles on olemas nsP1, nsP2 ja nsP3 regioonid, kuid puudub nsP4-le vastav regioon (rada 8). Viimase põhjus ei ole selge, kuid võib oletada nsP4 valgu väga kiiret eemaldamist polüproteiinilt koos tema järgneva degradeerimisega. Rakuliinis T-REx-P1*234 on nii *pulse*’is kui ka *chase*’is näha protsessimata polüproteiin kõikidel radadel (rajad 9-16). See võib kajastada asjaolu, et mingil

põhjusel on selles rakuliinis polüproteiini protsessimine aeglasem võrrelduna T-REx-P1234 rakuliiniga. See võib olla ka põhjuseks, miks selles rakuliinis on detekteeritav ka nsP4 osa polüproteiinist (rajad 15 ja 16). Samas võib aeglasem protsessing olla madalama ekspressioonitaseme (seda on näha jooniselt) otsene tulemus, kuna nsP2 hulga vähenemine rakus aeglustab *in trans* kulgev 3/4 ja 2/3 saitide protsessingut.

2. Nagu jooniselt näha, toimub mõlemas rakuliinis sarnane ja SFV-le ebatüüpiline nsP1 ja nsP2 liitvalgu ekspressioon (joonis 21, rajad 1, 3, 10, 12). See tulemus kinnitab, et *Western blot*-il nsP1 ja nsP2 antikehadega nähtud valk on tõesti üks ja seesama liitvalk.
3. nsP4 ei ole vabal kujul detekteeritav. See on ootuspärane, kuna nsP4 on proteasoomi inhibiitorite puudumisel ebastabiilne (vt. ülal). Samas on üllatav, et kummaski rakuliinis ei ole detekteeritav ka nsP3. See tulemus on kooskõlas *Western blot*-il detekteeritud väga väikese nsP3 hulgaga, kuid ei ole kooskõlas kirjanduslike andmetega. Selle nähtuse selgitamiseks on võimalik välja tuua kaks hüpoteesi:
 - nsP3 protsessing antud süsteemis ei ole spetsiifiline, mistõttu see kulgeb aeglaselt ja selle tulemusena moodustuv nsP3 on ebastabiilne ning degradeeritakse kiiresti.
 - mingil põhjusel on nsP3 pooleluiga antud süsteemis tavalisest oluliselt lühem.

Nende hüpoteeside kinnitamine/ümberlükkamine nõuab täiendavate eksperimentide läbiviimist.



Joonis 21. Polüproteiinide protsessimis-analüüs T-REx-P1234 js T-REx-P1*234 rakuliinides, kasutades ^{35}S -metioniini ja ^{35}S -tsüsteiiniga metaboolset märgistamist. *Chase* lüüsi 90 minutit pärast polüproteiini märgistamist. Metaboolselt märgistatud valgud immunosadestati nsP1, nsP2, nsP3 ja nsP4 vastaste antikehadega. Valgud lahutati 10% SDS-poliakrüülamiidgeelis, geel kuivatati ning signaal detekteeriti *PhosphoImager*’iga.

Ülal toodud tulemused näitavad veenvalt, et T-REx-P1234 ja T-REx-P1*234 rakuliinides toimuvat ebastandardsete valkude ekspressiooni ei saa seostada ainult protsessingu iseärasustega. Selle põhjuse selgitamiseks viidi läbi eksperimendid, mis andsid järgnevad tulemused:

1. PCR-l amplifitseeriti ja sekveeriti raku genoomi integreerunud P1234 ja P1*234 ekspressioonikassetid. Saadud tulemused kinnitasid, et integreerumise käigus ei ole toimunud ei geneetilisi ümberkorraldusi nagu promootori kadumaminek või kodeeriva järjestuse sisene deletsioon. Samuti kinnitas sekveneerimine spetsiifilise mutatsiooni paiknemist P1*234 ekspressioonikassetis. Seega ei tulene ebastandardne ekspressioonipilt mutatsioonidest ekspressioonikassetis.
2. SFV replikatsioon toimub normaalses infektsioonis eranditult tsütoplasmas, seega on võimalik krüptiliste intronite paiknemine viiruse genoomis. Lähtudes protsessingu pildist ja nsP1/nsP2 trankeeritud liitvalgu moodustumisest, võis mõlemal juhul oletada splaisingu toimumist nsP1/nsP2 ülemineku regioonis. Kuna nsP2 proteaasne funktsioon on säilinud, siis ei saa oletatav splaising puudutada nsP2 proteaasset regiooni. Selle hüpoteesi kontrollimiseks eraldati indutseeritud rakkudest mRNA-d ja analüüsiti neid RT-PCR abil. Amplifikatsioonil kasutatud praimerid valiti nii, et üks praimer paiknes nsP2 proteaasi regioonis (antisense praimer) ja teine nsP1 valku

kodeerivas regioonis (sense primer). Selle analüüsi tulemused näitasid veenvalt ca. 1.2 kb pikkust sisemist deletsiooni sisaldavate mRNA-de olemasolu rakus. Analüüs näitas ka wt RNA-de olemasolu, kuid oluliselt väiksemal määral (see RNA võis kujutada tuumas sünteesitud, kui veel protsessimata pre-mRNA-d). Nende PCR fragmentide sekveneerimine näitas et:

- ükski analüüsitud deletsioon ei toonud kaasa raaminihke mutatsiooni,
- kõikidel deletsioonidel oli ühine lõppunkt, mis vastas nukleotiidile 3068 SFV genoomis (proteaasse domääni algus),
- deletsioonide alguspunktid varieerusid ja asusid nsP1/nsP2 valkude vahelise lõikesaidi läheduses,
- ühelgi juhul ei olnud detekteeritavad splaisosoom-vahendatud splaisingule vajalikud konsensused.

Seega on selge, et T-REx-P1234 ja T-REx-P1*234 rakuliinides toimuva ebatüüpiliste valkude sünteesi tingib mingi suhteliselt spetsiifiline muutus neid valke kodeerivas RNA-s, sellest muutusest tingitud trankeeritud polüproteiini süntees ja järgnev ebakorrektnen protsessing. Samas jääb arusaamatuks, milline protsess on vastutav RNA-tasemel toimuva fragmendi deleteerimise eest. Selge on vaid see, et tegemist ei saa olla splaisosoom vahendatud splaisinguga. Seega on võimalik, et tegemist on mittekanoonilise RNA isesplaiseerumisega. See võimalus tõstatab üles huvitavad küsimused:

1. Kas taoline splaising leiab aset ka SFV infektsioonis ja milline on tema tähtsus? Siinkohal tuleb aga märkida, et senised kirjanduses avaldatud andmed ei osuta mingi taolise protsessi eksisteerimisele SFV infektsioonis.
2. Kui selline splaising on kasutatud süsteemi artefakt (kuid siiski mRNA struktuurist tingitud omadus), siis kuidas väldib SFV taolise protsessi toimumist *in vivo* infektsioonil?
3. Kas taoline RNA modifitseerimine leiab aset ka teiste ekspressioonisüsteemide kasutamisel? Kui jah, siis millistes süsteemides? Kui see protsess ei ole piiratud antud uurimuses kasutatud süsteemiga, võib see tähendada, et suvalistesse SFV polüproteiinide transientse ekspressiooni uurimise tulemustesse tuleb suhtuda

ettevaatlikult, juhul kui ei ole otseselt tõestatud, et taolised sündmused seal aset ei leia.

Peale teoreetiliste küsimuste tõstatab selline ootamatu fenomen üles ka praktilise küsimuse. Nimelt on selge, et P1234 polüproteiini ekspresseerivad rakuliinid ei ole käesoleval kujul SFV valkude funktsioonide uurimiseks sobivad. Kuidas saada üle soovimatust RNA modifitseerimisest? Teoreetiliselt võib ette kujutada vähemalt kahte võimalust, mis mõlemad on paraku töömahukad ja ei ole seetõttu esialgu kavandatavas tööplaanis:

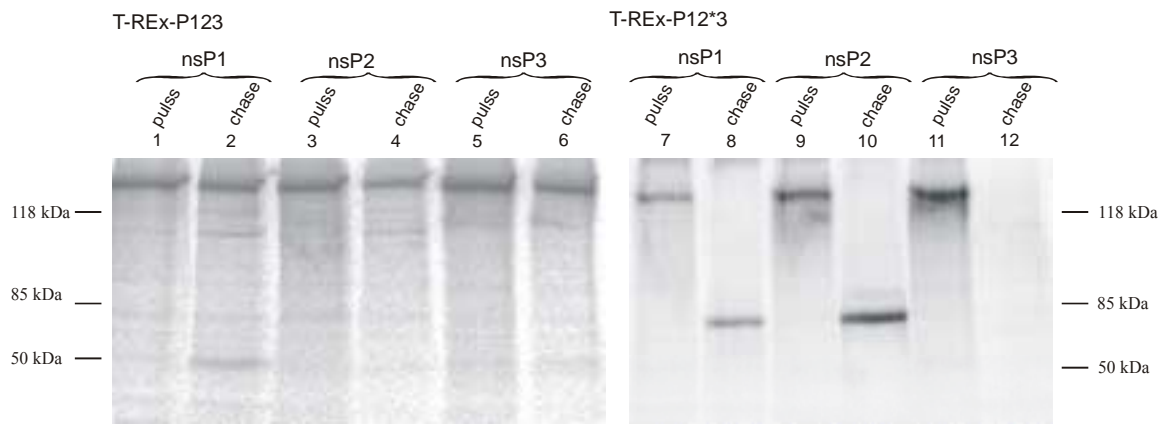
1. Sisestada P1234 koderivasse kasseti tugevaid splaisosoomide poolt protsessitavaid introne. Mitmetel juhtudel on näidatud, et loomuliku splaisingu läbiviimine stabiliseerib oluliselt rakutuumas sünteesitavat mRNA-d.
2. Muuta “splaisitava” regiooni ja selle ümbruse koodonkasutust ning selle kaudu mRNA sekundaarstruktuuri.

Kuna T-REx-P1234 ja T-REx-P1*234 rakuliinides toimuvate sündmuste analüüs näitas, et protsessis (milline selle mehhanism ka ei oleks) osalevad nsP1 ja nsP2 regioonile vastavad järjestused, võis eeldada, et taolised protsessid võivad aset leida ka P123 polüproteiine ekspresseerivates rakuliinides. Nagu näitas ka nende rakuliinidega läbi viidud *pulse-chase* analüüs (eksperimentaalne protokoll oli identne ülal kirjeldatuga) leiavad ka siin aset ebastandardised sündmused, ehkki need ei ole mitte täiesti identsed ülal kirjeldatutega.

Nii näidati, et T-REx-P12*3 rakuliins toimub sarnaselt ülal kirjeldatuga identsete liikuvustega ning nsP1 ja nsP2 immunoloogilisi determinante omavate valkude ekspressioon (joonis 22, rajad 8, 10). See võib tähendada, et ka selles rakuliinis ekspresseeruvad nsP1 ja nsP2 liitvalguna. Analoogselt ülal kirjeldatuga ei ole ka sellel juhul võimalik peale 90 minutilist *chase*'i detekterida vaba nsP3-e (rada 12) ning *pulse* proovis nähakse vaid protsessimata polüproteiine (rajad 7, 9, 11). Siinkohal tuleb märkida, et see tulemus ei lange kokku sama liini puhul *Western blot*-il saadud tulemusega, mis näitas oodatava molekulmassiga nsP1 domeeni ekspressiooni (joonis 18 rada 8), mistõttu tuleb tulemusse suhtuda kuni katsete kordamiseni ettevaatlikult. Samas on suure hulga ja suhteliselt stabiilsete polüproteiinide eksisteerimine hästi tõendatud,

kuna analoogsed valgud on näha *Western blot*-idel (jooni 19, rada 8 ja joonis 20, rada 11).

Rakuliinis T-REx-P123 on võimalik detekteerida eelkõige ainult protsessimata polüproteiini (joonis 24 rajad 1-6). See tulemus langeb kokku *Western blot* meetodil saadud tulemustega, kus on näha sarnased polüproteiinid (joonis 19, rada 6 ning joonis 20, rada 9). Samal ajal on need tulemused näivas vasturääkivuses wt mõõtmega nsP1 valgu detekteerimisega *Western blot* meetodil (joonis 18, rada 6). Polüproteiini aeglasema protsessingu põhjus (nagu jooniselt näha on see aeglasem kui T-REx-P12*3 rakuliinis) ei ole selge, kuid tegu võib olla individuaalse rakuliini omadustega (madalam ekspressiooni tase ja selle tõttu väiksem proteaasi kontsentratsioon) ja vajab edasist uurimist.



Joonis 22. Polüproteiinide protsessimis-analüüs T-REx-P123 ja T-REx-P12*3 rakuliinides, ^{35}S -metioniini ja ^{35}S -tsüsteiiniga metaboolset märgistamist kasutades. *Chase* lüüsi 90 minutit pärast polüproteiini märgistamist. Metaboolselt märgistatud valgud immunosadestati nsP1, nsP2, nsP3 vastaste antikehadega. Valgud lahutati 10% SDS-polüakrüülamiidgeelis, geel kuivatati ning signaal detekteeriti *PhosphorImager*’iga.

Võttes kokku polüproteiine ekspresseerivate rakuliinide uurimisel saadud tulemused tuleb konstateerida, et siin on saadud arvukalt ootamatuid tulemusi. Kuna on ilmne, et antud rakuliine praegusel kujul SFV molekulaarbioloogia uurimiseks kasutada ei saa, siis ei ole hetkel teostatud nende rakuliinide edasist analüüsi. Samas kujutavad ülal kirjeldatud protsessid huvitavat fenomeni ja põhimõtteliselt väärivad täiendavat uurimist.

Samuti on vaja märkida, et polüproteiinide uurimisel on erinevad meetodikad (*Western blot* versus *pulse-chase* + immuunosadestamine) andnud teineteisele vasturääkivaid tulemusi. Osalt on põhjus selles, et vastavaid katseid ei ole piisavalt korratud ja samuti on puudunud adekvaatsed kontrollid. Teine tõenäoline põhjus võib seisneda selles, et erinevate meetodikate puhul kasutati erinevaid indutseerimise ajapunkte (vastavalt 24 ja 4-6 tundi peale indutseerimist), mistõttu viiruse valkude kontsentratsioonid tõenäoliselt erinesid teineteisest uuritavates rakkudes ja samuti võisid esineda olulised erinevused rakkude füsioloogilises seisundis. Seetõttu on vaja kindlate tulemuste saamiseks katsetingimused mõlematel meetodite kasutamisel ühtlustada.

1.6. SFV mittestruktuursete valkude lokalisatsiooni uurimine rakus immuofluorestsentsmeetodit kasutades

Rakuliine, mis ekspresseerivad (võttes aluseks *Western blot*'i abil saadud tulemused) korrektseid ns-valke, analüüsiti täiendavalt immunofluorestsentsmeetodit kasutades. Sellesse uurimisse ei kaasatud P1234, P1*234, P123 ja P12*3 polüproteiine ekspresseerivaid rakuliine, kuna need liinid ei tooda korrektseid ns-valke (vt. ülal). Samuti ei kaasatud sellesse uurimusse ka nsP4 ekspressioonikasseti sisaldavat rakuliini, kuna ekspresseeritav valk on äärmiselt ebastabiilne. Seepärast fokuseeriti uurimus eelkõige just nsP1, nsP2 ja nsP3 ja nende mutantseid vorme ekspresseerivatele rakuliinidele. Põhiliselt kasutati uurimiseks fluorestsentsmikroskoopi (vt. "Materjal ja Metoodika"), rakuliinide T-REx-nsP1 ja T-REx-nsP1^{6D} puhul kasutati lisaks tavalisele fluorestsentsmikroskoobile ka konfokaalmikroskoopi.

Kirjanduses avaldatud andmed näitavad, et SFV nsP1 ekspressioon rakus toob kaasa raku aktiin-tsütoskeleti lagundamise ja filopoodia-sarnaste struktuuride moodustumise (Laakkonen, et al., 1998), samal ajal kui mutantne nsP1^{6D} selliseid efekte esile ei kutsu (Ahola, et al., 2000). nsP1^{6D}-l on palmitüleerimissaidis (ah jäägid 418-420) tsüsteiinid vahetatudalaniinide vastu ning tänu sellele nõrgeneb nsP1 side rakumembraaniga. Mingil põhjusel toob see kaasa filopoodia-sarnaste struktuuride tekkimise blokeerimise.

Käesolevas töös saadud tulemused on hästi kooskõlas seni kirjanduses avaldatutega. wt nsP1 valk lokaliseerub plasmamembraanis ja moodustab intensiivselt filopoodia-sarnaseid struktuure (joonis 23). Ka nsP1^{6D} puhul on ilmne valgu lokalisatsioon

plasmamembraanis, samal ajal kui filopoodia-sarnaste struktuuride moodustumist ei toimu või see toimub wt nsP1-ga võrreldes väga vähesel määral. Need andmed lubavad oletada, et nsP1 valke ekspresseerivad indutseeritavad rakuliinid kujutavad endast adekvaatset mudelit nsP1 valgu ja tema poolt rakus esile kutsuvate muutuste uurimiseks.

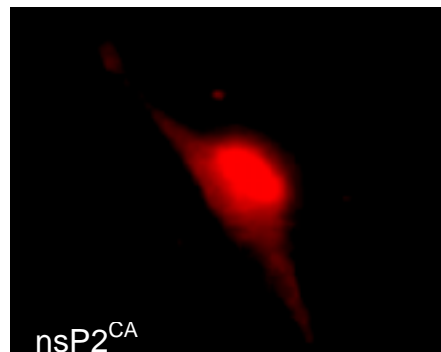
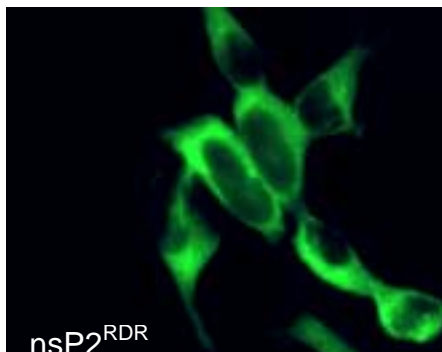
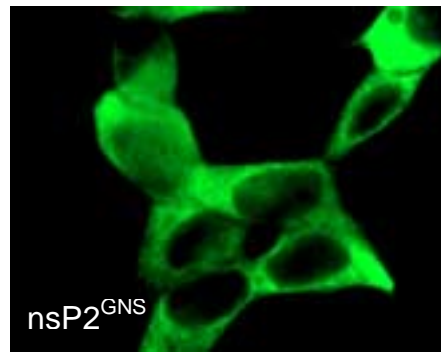
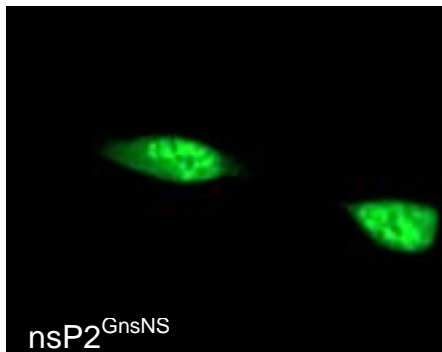
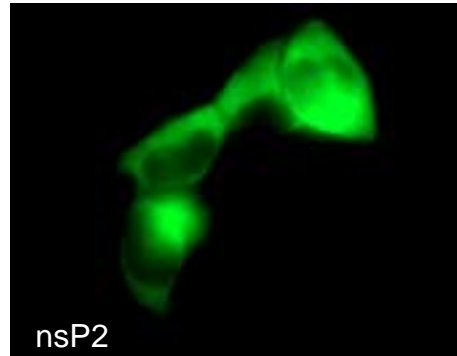
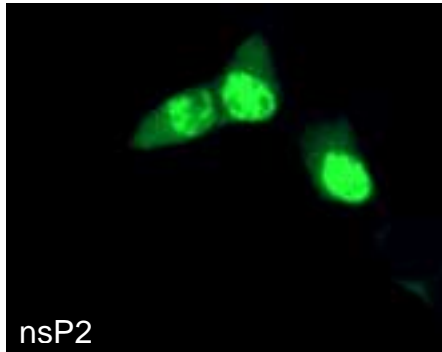
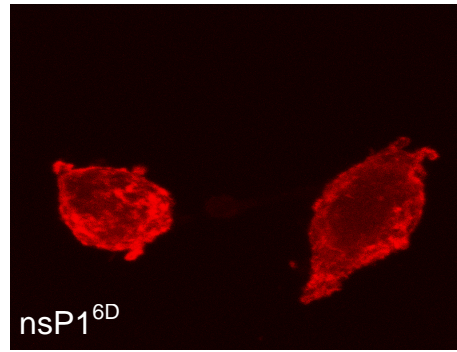
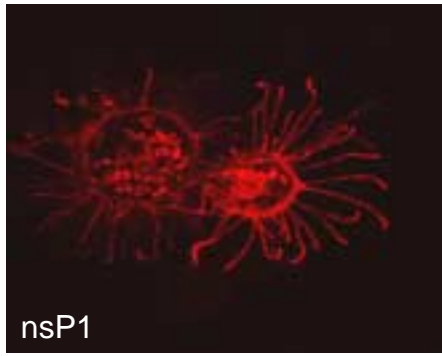
Kirjanduses avaldatud andmetel lokaliseerub nsP2 transientsel ekspressioonil peaaegu eranditult rakutuumas (Peranen, et al., 1990), samal ajal kui tuumse lokalisatsiooni signaalis mutatsioone sisaldav nsP2 lokaliseerub tsütoplasmas. Nendest andmetest lähtudes võis eeldada, et selles töös konstrueeritud rakuliinid peaksid jagunema kahte gruppi:

- nsP2 tuumse lokaliseerimisega liinid on T-REx-nsP2 (wt), T-REx-nsP2^{CA} ja T-REx-nsP2^{GNS},
- nsP2 tsütoplasmaatilise lokaliseerimisega liinid on T-REx-nsP2^{RDR} ja T-REx-nsP2^{CA+RDR}.

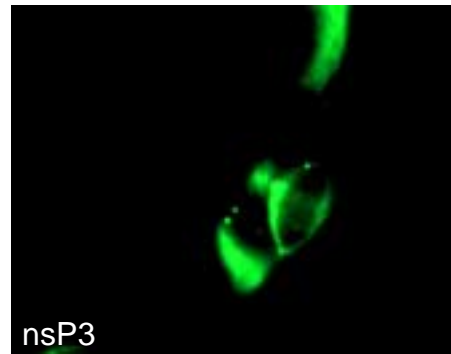
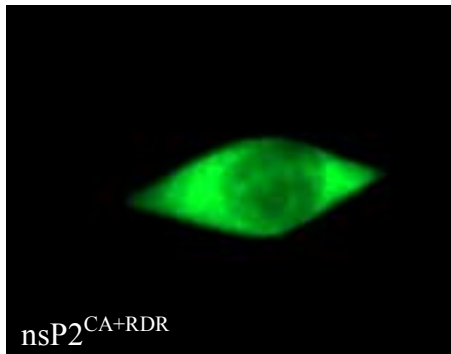
Saadud eksperimentaalsed andmed langevad antud oletusega kokku ainult osaliselt. nsP2^{RDR} ja nsP2^{CA+RDR} omavad tõesti ainult tsütoplasmaatilist lokaliseerimist, samal ajal kui nsP2 ja nsP2^{GNS} valgud lokaliseerusid erinevates ekspreimendites nii tuuma kui ka tsütoplasmasse (joonis 23 ja 24). nsP2^{CA} valg lokaliseerus kõigis läbiviidud katsetes ainult rakutuumas. Seega erineb indutseeritavas rakuliinis ekspresseeritavate nsP2 ja nsP2^{GNS} lokaliseerimine seni kirjanduses avaldatust. Samas tuleb märkida, et ka teised uurijad on erinevates katsetes aeg-ajalt täheldanud nsP2 valgu ebatüüpilist (tsütoplasmaatilist) lokaliseerimist (Salonen, suulised andmed). Selle nähtuse põhjused ei ole selged, kuid võib oletada, et erinevused võivad olla tingitud rakuliinide ja nende seisundi erinevusest, erinevate transfektsiooniskeemide kasutamisest jne. Siiski võib antud ekspreimendi tulemuste põhjal väita, et ka nsP2 valgu ja tema mutantide lokaliseerimine rakus langeb suuresti kokku oodatuga ja seega on vastavad rakuliinid kasutatavad nsP2 valgu funktsioonide uurimiseks.

nsP3 kohta oli teada, et ta moodustab transfitseeritud rakkude tsütoplasmas inklusioone, mis fluoreentsmikroskoobis sarnanevad CPV-I-dele, kuid elektronmikroskoobis vaadatuna kujutavad endast amorfseid nsP3 valgu kogumeid (Salonen, et al., 2003). Ka indutseeritavates rakuliinides ekspresseeritavale nsP3-le on iseloomulik tsütoplasmaatiline lokaliseerimine ja inklusioonkehade moodustumine (joonis

24), ehkki detekteeritud inklusioonkehade hulk oli tavaliselt üsna väike ja suur osa nsP3 valgust lokaliseerus rakus difuuselt. Ka need andmed lubavad oletada, et indutseeritavad rakuliinid sobivad nsP3 funktsioonide uurimiseks rakus.



Joonis 23. nsP1, nsP1^{6D}, nsP2, nsP2^{GNS}, nsP2^{RDR} ja nsP2^{CA} valkude rakulise lokalisatsiooni immuonofluorestsents-analüüs konstrueeritud T-REx-nsP1, T-REx-nsP1^{6D}, T-REx-nsP2^{GNS}, T-REx-nsP2^{RDR} ja T-REx-nsP2^{CA} rakuliinides. Primaarse antikehana on kasutatud küülikus toodetud nsP1 või nsP2 vastaseid polükloonaalseid antikehi. Sekundaarsete antikehadena kasutati nii FITC-iga kui ka Texas Red-iga konjugeeritud küüliku IgG vastaseid kitse antikehi (100x suurendus).



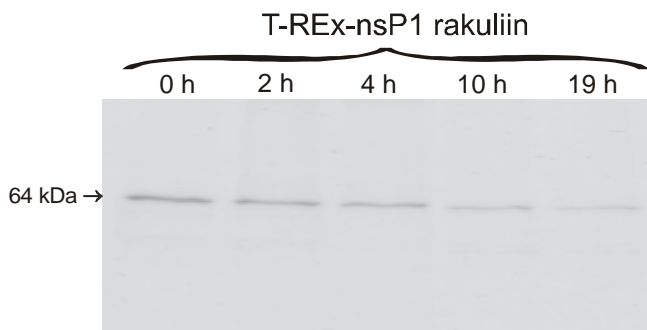
Joonis 24. nsP3 ja nsP2^{CA+RDR} valkude rakulise lokalisatsiooni immunofluorestsentsanalüüs konstrueeritud T-REx-nsP3 ja T-REx-nsP2^{CA+RDR} rakuliinides. Primaarse antikehana on kasutatud küülikus toodetud nsP2 või nsP3 vastaseid polükloonaalseid antikehi. Sekundaarse antikehana kasutati FITC-iga konjugeeritud küüliku IgG vastast kitse antikeha (100x suurendus).

1.7. Ekspresseritavate SFV mittestruktuursete valkude poolelua määramine

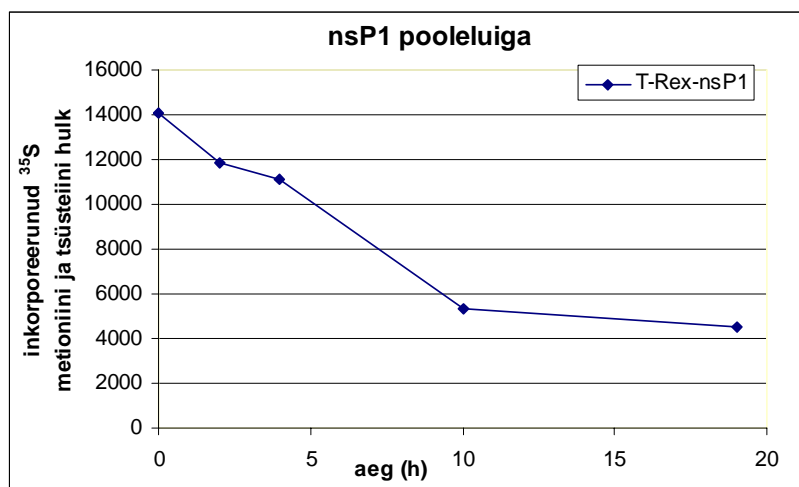
Viiruse poolt kodeeritud mittestruktuursete valkude elua kohta rakus puuduvad sageli adekvaatsed andmed, sest akuutselt nakatatud rakus ei ole tihti neid protsesse võimalik uurida: rakk sureb sageli liiga ruttu ja/või toimuvad infektsiooni käigus raku metabolismis järjestikused muutused. Samas on tegemist olulise informatsiooniga, kuna vähemalt infektsiooni algusfaasis toimub viiruse valkude süntees suhteliselt natiivses rakusiseses keskkonnas ja raku bioloogilised protsessid (k.a. valkude lagundamine) avaldavad otsest mõju viirusinfektsiooni edasisele kulgemisele. Kuna kirjanduses puudusid andmed SFV mittestruktuursete valkude, v.a. ebastabiilse nsP4-ja, elua kohta, otsustati selle määramiseks kasutada antud töö raames konstrueeritud mittestruktuurseid SFV valke ekspresseerivaid rakuliine T-REx-nsP1, T-REx-nsP2 ja T-REx-nsP3.

Valkude poolelua analüüsiks kasutati metaboolset märgistamist ja märgistatud valgu immuunosadestamist vastava valgu vastase antikeha ülehulgaga (seda selleks, et saavutada valgu kvantitatiivne sadestamine). Rakuliine indutseeriti 4 tundi, seejärel viidi 45 minuti jooksul läbi märgistamine ^{35}S -metioniini ja ^{35}S -tsüsteiini seguga. Järgnevalt lüüsi rakud erinevatel ajapunktidel ja valgud immuunosadestati denaturatiivsetes tingimustes.

Esmalt kontrolliti valgu nsP1 pooleluiga (joonis 25). Joonisel on näha, et nsP1 ekspressiooni tase langeb ajas. Kvantitatiivse analüüsi tulemusel määrati nsP1 elueaks T-REx-nsP1 rakuliinis 8 tundi (graafik 1).



Joonis 25. nsP1 valgu poolelua määramine T-REx-nsP1 rakuliinis, kasutades metaboolset märgistamist ja immuunosadestamist. nsP1 vastase antikehana kasutati küülikus toodetud nsP1 vastast polükloonaalset antikeha. Ajapunktid on lüüsitud 0, 2, 4, 10 ja 19 tundi pärast ^{35}S -metioniini ja ^{35}S -tsüsteiiniga märgistamist.

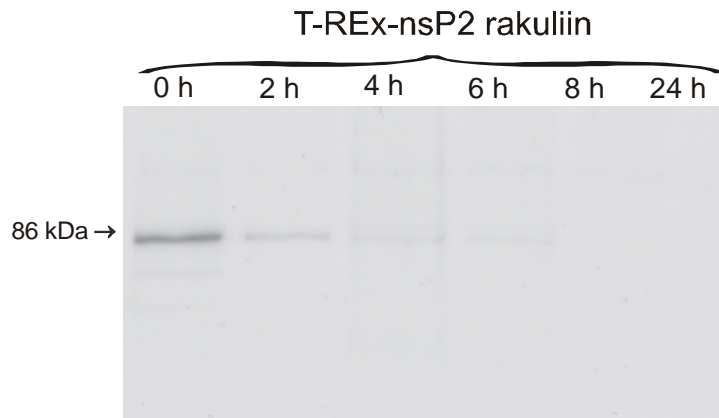


Graafik 1. nsP1 valgu poolelua määramine kvantiteerimisega T-Rex-nsP1 rakuliinis. Ajapunktid on võetud 0, 2, 4, 10 ja 19 tundi peale ^{35}S -metioniini ja ^{35}S -tsüsteiiniga märgistamist.

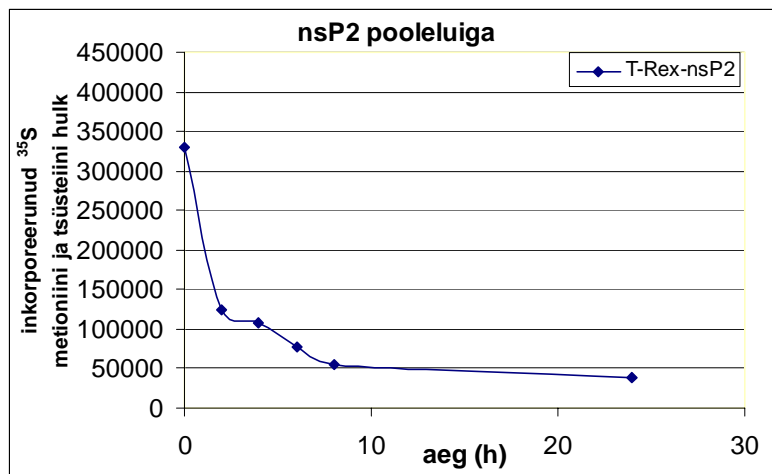
Seega on nsP1 näol tegemist pika pooleluuega valguga. On võimalik, et selline pikk pooleluiga tuleneb nsP1 seosest rakumembraanidega. Selles plaanis on huvitav uurida ka nsP1^{6D} mutantse valgu stabiilsust, sest see valk on membraanidega nõrgemini seotud ja näib indutseeritud rakkudes akumulereuma wt nsP1 valguga võrrelduna vähemal määral (joonis 14). Antud ekspreiment on võetud edasise töö plaani.

Järgnevalt määrati valgu nsP2 pooleluiga rakuliinis T-REx-nsP2, kasutades ülalkirjeldatud meetodikat. Selle eksperimendi tulemused on ära toodud joonisel 26.

Saadud tulemuste kvantiteerimise kaudu määrati nsP2 valgu poolelueaks ligikaudu üks tund (graafik 2). Saadud tulemustest lähtub, et mõõtmiseks vajalikud ajapunktid olid valitud ebaoptimaalselt, mistõttu tuleb katset korrata, jälgides nsP2 lagundamist juba varasematel ajahetkedel (nt. 15 min, 30 min, 45 min). Samuti tuleks vastav katse läbi viia ka nsP2 valgu mutantidega. See on oluline mõistmaks mutatsioonide bioloogilist efekti (juhul kui mutatsioon mõjutab valgu struktuuri, võib sellel olla mõju ka valgu elueale).

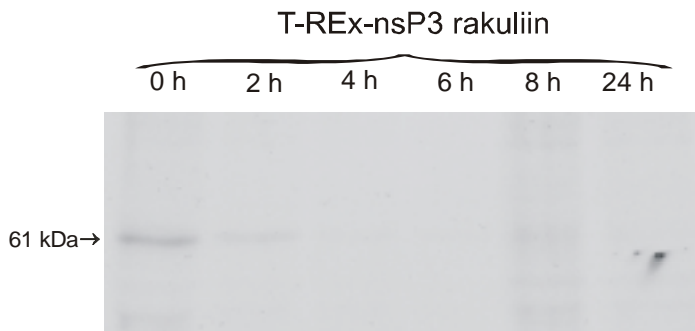


Joonis 26. nsP2 valgu pooleluea määramine kasutades metaboolset märgistamist ja immuunosadestamist. nsP2 vastase antikehana kasutati küülikus toodetud nsP2 vastast polükloonaalset antikeha.

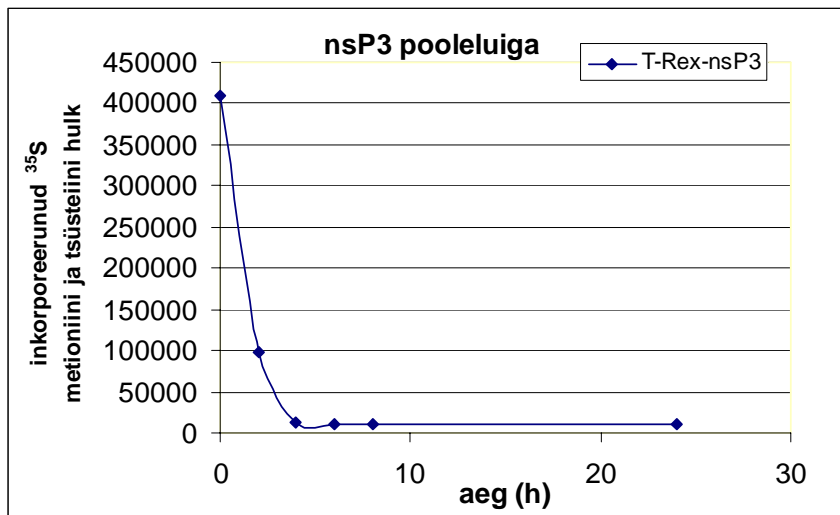


Graafik 2. nsP2 valgu pooleluea määramine kvantiteerimiga T-REx-nsP2 rakuliinis. Ajapunktid on võetud 0, 2, 4, 6, 8 ja 24 tundi peale ³⁵S-metioniini ja ³⁵S-tsüsteiiniga märgistamist.

Järgnevalt vaadeldi nsP3 valgu pooleluiga rakuliinis T-REx-nsP3, kasutades sama meetodikat (tulemused on toodud joonis 27). Saadud tulemuste kvantiteerimine näitas, et ka valgu nsP3 pooleluiga jääb ühe tunni piiridesse (graafik 3). Ka sellel juhul olid mõõtmiseks kasutatud ajapunktid valitud ebaoptimaalselt, mistõttu katsed tuleb korrata, jälgides nsP3 lagundamist juba varasematel ajahetkedel (nt. 15 min, 30 min, 45 min).



Joonis 27. nsP3 valgu pooleluea määramine, kasutades metaboolset märgistamist ja immuunosadestamist. nsP3 vastase antikehana kasutati küülikus toodetud nsP3 vastast polükloonaalset antikeha.



Graafik 3. nsP3 valgu pooleluea määramine kvantiteerimisega T-REx-nsP3 rakuliinis. Ajapunktid on võetud 0, 2, 4, 6, 8 ja 24 tundi peale ³⁵S-metioniini ja ³⁵S-tüsteiiniga märgistamist.

Võttes kokku saadud tulemused võib väita, et kolmest SFV mittestruktuursest valgust osutus kõige stabiilsemaks nsP1, talle järgnevad nsP2 ja nsP3. nsP4 valgu

signaali ei ole antud meetodiga võimalik detekteerida, kuna nsP4 lagundatakse väga kiiresti ubikvitileerimise rajas. Siiski ei saa nendest katsetest teha kaugeleulatavaid järeldusi, kuna:

1. Statistiliselt usaldusväärsete tulemuste saamiseks peaks katseid veel kordama ja valima igale valgule spetsiifiliselt sobivamad ajapunktid. Samuti tuleks katset korrata erinevaid induktsiooni aegu kasutades (4 tundi, 8 tundi, 16 tundi), kuna valkude stabiilsus võib sõltuda rakus juba olemas oleva viirusvalgu hulgast.
2. Katset tuleks teostada ka nsP1 ja nsP2 mutantidega.
3. Katset tuleks teostada ka polüproteiin kontekstis, sest tõenäoliselt mõjutavad SFV valgud vastastikku teineteise stabiilsust. Kuna polüproteiinide ekspressioon stabiilsetes liinides on hetkel ebaselge, võiks selleks kasutada transfitseeritud ja/või SFV-ga nakatatud rakke. Selline katse võimaldaks välja selgitada viiruse valkude omavaheliste interaktsioonide mõju nende stabiilsusele. Loogiline oleks oletada, et valkudest stabiilseim (nsP1) võib stabiliseerida ka teisi valke, kuna ta toimib membraanankruna kogu SFV replikaasi kompleksi tarvis.

2. Ekspresseeritavate SFV ns-valkude mõju rakule

SFV ja teiste alphaviiruste infektsiooniga imatejaterakkudes kaasnevad mitmed viiruse-indutseeritud tsütotoksilised efektid. Hästi on teada järgmised SFV poolt induitseeritud fenomenid:

1. Raku transkriptsiooni blokeerimine.
2. Raku translatsiooni blokeerimine.
3. Raku DNA sünteesi blokeerimine.
4. Rakkude apoptoosi induitseerimine.

Viiruse poolsed faktorid, mis vastutavad nende efektide esilekutsumise eest, samuti ka nende faktorite toimimise mehhanismid ei ole üldjuhul teada. Kirjanduslikud andmed, mis on enamasti saadud SIN induitseeritud tsütotoksilisuse uurimisel (Frolov & Schlesinger, 1994; Perri *et al.*, 2000) näitavad, et:

1. Nendes protsessides osalevad ainult viiruse mittestruktuused valgud, viiruse replikatsioon ei ole vajalik,
2. peamist rolli tsütotoksilisuses näib omama nsP2, sest just selles valgus lokaliseeruvad mutatsioonid, mis vähendavad SIN tsütotoksilisust.

SFV ns-valke ekspresseerivad induitseeritavad rakuliinid kujutavad endast väga sobivat süsteemi nende efektide uurimiseks, sest:

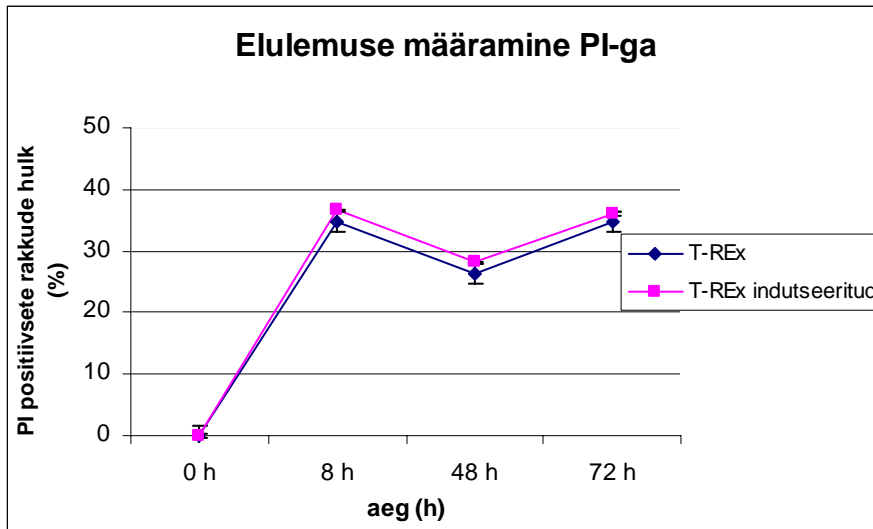
1. Induktsiooni on võimalik läbi viia üheaegselt ja kõigis rakkudes.
2. Induktsioon on „pehmeloomuline“ st. sellega ei kaasne raku füüsilist kahjustamist nagu elektroportatsioonil või keemilisel transfektsioonil.
3. Rekombinantse valguga indukteerimine on vaba paralleelselt kulgevatest protsessidest nagu seda on viiruse RNA replikatsioon või viirus-vektori genoomi replikatsioon.

Käesolev peatükk võtab kokku esimesed tulemused, mis on saadud nende fenomenide uurimisel, kasutades SFV ns-valke ekspresseerivaid rakuliine.

2.1. SFV valkude põhjustatud tsütotoksilise efekti uurimine

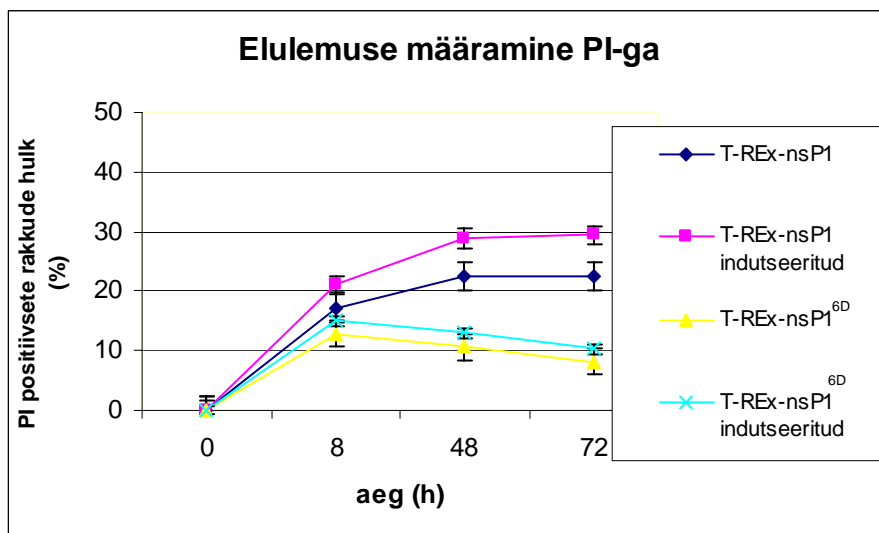
SFV infektsioon loomarakus on tsütotoksiline ja lõpeb peremeesraku surmaga. On näidatud, et üldjuhul kujutab raku surm endast viirus-indutseeritud apoptoosi. Kindlaid andmeid selle kohta, milline on selle apoptoosi täpsem mehhanism (mitokondriaalne, membraanidest alguse saav), ega ka selle kohta milline SFV valk (valgud) seda protsessi induitseerib(vad), siiani veel ei ole. Seepärast alustati selle protsessi uurimist, kasutades konstrueeritud induitseeritavaid rakuliine. Esimeses lähenemises kasutati tsütotoksilise efekti hindamiseks rakkude elulemuse määramist propiidiumiodiidi ning läbivoolutsütomeetriat (Becton-Dickinson FACSCalibur süsteemi) kasutades. Meetod põhineb sellel, et propiidiumiodiid inkorporeerub rakkudesse, mis ei ole eluvõimelised (membraan on destabiliseeritud), samal ajal kui eluvõimelised rakud propiidiumiodiidiga ei värvu. Esialgsed katsed teostati kolmes paralleelis ning igas paralleelis analüüsiti 50 000 rakku.

Kontrollkatses uuriti tetratsükliini lisamise mõju HEK T-RExTM rakuliini rakkude elulemusele, et välistada võimalus, et induktor ise mõjub rakkudele toksiliselt. Saadud tulemused näitasid, et tetratsükliin ei põhjustanud rakkude elulemuse vähenemist induitseeritud T-REx rakuliinis, võrreldes induitseerimata rakuliiniga (graafik 4). Propiidiumiodiid-positiivsete rakkude arv kasvas nii induitseeritud kui ka induitseerimata rakkude hulgas võrdselt (üks võimlus selle seletamiseks on rakukultuuri ülekasvamine ja vananemine). Seega osutus konstrueeritud süsteem edasiste uuringute tarvis sobilikuks, kuid saadud andmed näitasid, et väga oluline on teostada induktsioon enne, kui rakukultuur kujuneb konfluentseks.



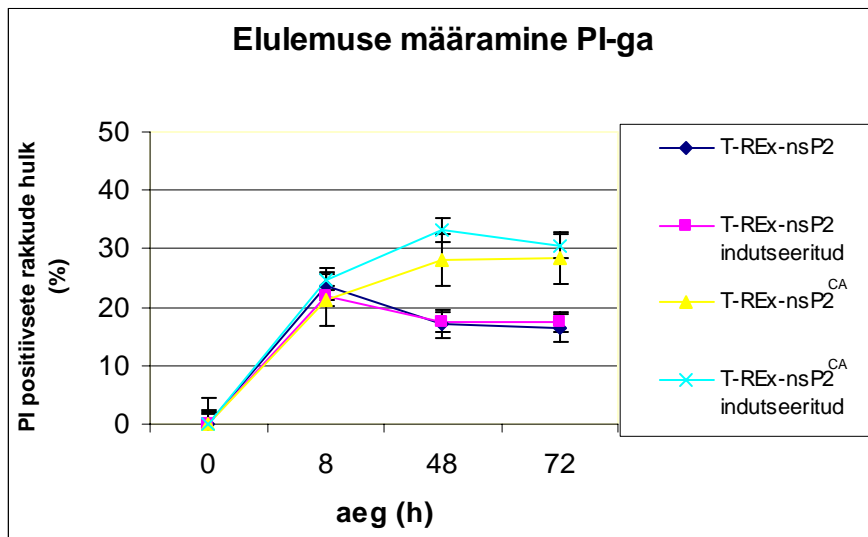
Graafik 4. Rakkude elulemuse määramine indutseeritud/indutseerimata T-REx rakuliinis. Ajapunktid on võetud 0, 8, 48 ja 72 tundi peale indutseerimist.

Järgnevat katseseriates kasutati tsütotoksilisust põhjustava teguri uurimiseks tetratsükliiniga indutseeritavaid erinevaid SFV ns-valke ekspresseerivaid rakuliine. Graafikult 5 on näha, et valk nsP1 põhjustab T-REx-nsP1 rakuliinis rakkude elulemuse vähenemist, samal ajal kui mutantsel nsP1^{6D} valgul taoline efekt puudub.

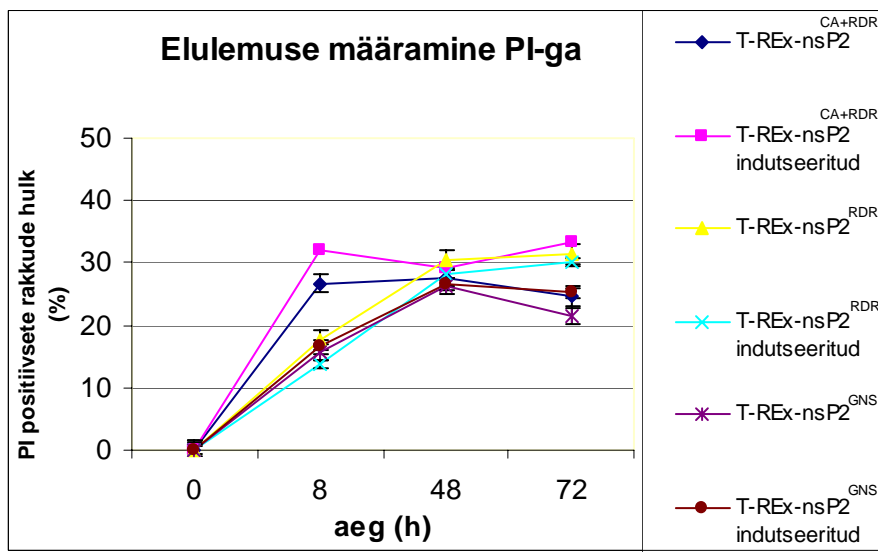


Graafik 5. Rakkude elulemuse määramine konstrueeritud T-REx-nsP1 ja T-REx-nsP1^{6D} rakuliinides. Ajapunktid on võetud 0, 8, 48 ja 72 tundi peale indutseerimist.

Graafikutel 6 ja 7 on kokku võetud nsP2 ja tema mutantide mõju rakkude elulemusele. Nagu graafikutelt näha ei mõju nsP2, nsP2^{RDR}, nsP2^{GNS} nsP2^{CA} ekspressioon rakkudele toksiliselt ega põhjusta võrreldes indutseerimata kontrolliga rakkude elulemuse vähenemist. Ainsa erandina põhjustab nsP2^{CA+RDR} ekspressioon T-REx-nsP2^{CA+RDR} rakuliinis rakkude elulemuse vähenemist (graafikul 7). Selle fenomeni põhjused on esialgu veel ebaselged.

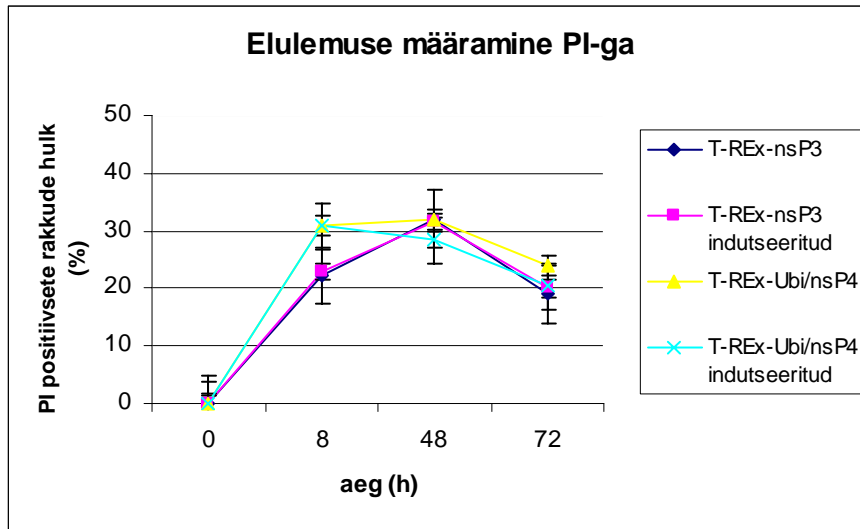


Graafik 6. Rakkude elulemuse määramine konstrueeritud T-REx-nsP2 ja T-REx-nsP2^{CA} rakuliinides. Ajapunktid on võetud 0, 8, 48 ja 72 tundi peale indutseerimist.



Graafik 7. Rakkude elulemuse määramine konstrueeritud T-REx-nsP2^{CA+RDR}, T-REx-nsP2^{RDR} T-REx-nsP2^{GNS} rakuliinides. Ajapunktid on võetud 0, 8, 48 ja 72 tundi peale indutseerimist.

Analoogilised katsed nsP3 ja nsP4 ekspresseerivate rakuliinidega näitasid, et sarnaselt nsP2 valguga ja enamuste tema mutantidega ei mõju nsP3 ega nsP4 rakkudele toksiliselt ega põhjusta võrreldes indutseerimata kontrolliga rakkude elulemuse vähenemist (graafik 8).



Graafik 8. Rakkude elulemuse määramine konstrueeritud T-REx-nsP3 ja T-REx-Ubi/nsP4 rakuliinides. Ajapunktid on võetud 0, 8, 48 ja 72 tundi peale indutseerimist.

Seega näitavad esialgsed tulemused, et enamus SFV mittestruktuuseid valke ei oma, vähemalt individuaalse ekspressiooni korral, olulist mõju rakkude elulemusele. Erandiks on nsP1 valk, mille ekspressioon toob kaasa elulemuse languse, samas võib see efekt olla seotud rakumembraanil aset leidvate struktuursete ümberkorraldustega (vt joonis 23). Millest võib olla tingitud mutantse nsP2^{CA+RDR} poolt esile kutsutud rakkude elulemuse vähenemine, jääb ebaselgeks.

Huvitav on märkida, et erinevalt SIN uurimisel saadud tulemustest, ei oma ükski SFV ns-valk tugevat efekti rakkude elulemusele. Seega seavad antud töös toodud tulemused kahtluse alla seni eksisteerinud teooria. Siiski on meie tulemused põhjanevate järelduste tegemiseks veel liiga esialgsed. Kindlasti on vaja katseid korrata, kasutades tundlikumaid uurimismeetodeid nagu seda on:

1. Apoptoosi määramine AnnexinV-ga.
2. Raku kaspasid indutseerimise analüüs.

Samuti on vajalik uurida erinevas kasvufaasis olavaid rakukultuure, et välistada kultuuri vananemisest tulenev rakkude suremus. Oluline oleks uurida ka SFV ns-valkude kooskõlastatud ekspressiooni (polüproteiini kujul) rakkude elulemusele, kuid probleemide tõttu polüproteiine ekspresseerivate rakuliinidega esialgu selliseid katseid läbi viia ei ole võimalik.

2.2. SFV mittestruktuursete valkude ekspressiooni mõju raku metabolismile

SFV mittestruktuursete valkude mõju uurimine raku makromolekulide sünteesile kujutab enadast antud uurimuse järgmist etappi. Käesolevaks ajaks on teostatud esialgsed uurimused hindamaks SFV valkude mõju raku toimuvale transkriptsioonile. Siinkohal tuleb märkida, et tegemist on keerulise probleemiga, kuna transkriptsiooni mõjutamine mõjutab omakorda negatiivse või positiivse tagasisideme kaudu ka indutseeritavate SFV valkude ekspressiooni ennast. Oma esialgsuse tõttu pole siinkohal hetkel olemasolevaid tulemusi ära toodud. Siiski on seni saadud tulemused võimaldanud määrata optimaalsed ajapunktid transkriptsiooni aktiivsuse uurimiseks. Edaspidi on kavas raku metabolismis toimuvaid muutusi uurida, kasutades selleks laia spektrit biokeemilisi meetode:

1. Sünteesitava DNA radioaktiivset märgistamist.
2. Sünteesitava RNA metaboolset märgistamist.
3. Sünteesitavate valkude metaboolset märgistamist.
4. Markergeenide ekspressiooni ja selle kvantifitseerimist.
5. Sünteesitavate mRNAde hulga hindamist, Real Time RT-PCR-i kasutades.

3. Ekspresseeritavate valkude mõju SFV infektsioonile rakkudes

Lisaks raku metabolismis toimuvatele muudatustele põhjustab viiruse replikatsioon rakus reeglina ka teatud muutusi, mis mõjutavad teiste, sama rakku nakatavate, viiruste infektsiooniprotsessi. Sarnaselt paljudele viirustele põhjustab SFV infektsioon nakatatud rakus:

1. Superinfektsiooni blokeerimist. Selle nähtuse olemus seisneb selles, et rakku sisenenud viirus takistab teise sarnase viiruse infektsiooni. Erinevad viirused kasutavad selleks erinevaid mehhanisme nagu:

- retseptori kõrvaldamine membraanilt (gripiviirus).
- endotsütoosi blokeerimine.
- superinfitseeriva viiruse lahtipakkimise blokeerimine.
- superinfitseeriva viiruse replikatsiooni takistamine jne.

Milline (või millised) nendest mehhanismidest realiseerub SFV infektsioonis ei ole teada.

2. Viiruste vahelisi interaktsioone. Juhul kui rakku nakatab korraga kaks sarnast viirust on tavaline viiruse poolt kodeeritud produktide vastastikune vahetamine. Sellel nähtusel rajaneb ka viiruste võime komplementeerida *in trans* funktsionaalselt defektseid viiruseid.

Küsimused, millele antud töös üritati vastust leida, olid järgmised:

1. Kas mingi SFV mittestruktuurse valgu ekspressioon takistab teise SFV virioni sisenemist rakku?
2. Kuidas mõjutab SFV mittestruktuursete valkude ekspressioon rakus SFV replikatsiooni erinevaid faase? Kas toimub mingi faasi aktiveerimine (*trans* aktivatsioon) ja/või mingi faasi mahasurumine (*trans* inhibeerimine)?

Sõltuvalt vastusest nendele küsimustele on edaspidi kavas uurida rakus ekspresseeritavate ns-valkude võimet komplementeerida letaalseid või ts-mutatsioone kandvate SFV replikonide replikatsiooni. See töösuund võib omakorda välja viia spetsiifiliste pakkimisliinide kujundamisele geeni- ja biotehnoloogias vajalike tinglikult letaalsete SFV mutantide tarvis.

3.1. Rakkude vastuvõtlikuse analüüs

Nagu ülal kirjeldatud on viirustel (sh. SFV-l) võime blokeerida superinfektsiooni ehk kord juba nakatunud raku uuesti nakatumist sama tüüpi viiruse poolt. Üheks superinfektsiooni blokeerimise võimaluseks on takistada uue viiruse sisenemist raku. Selle funktsiooni eest võib olla vastutav nii viiruse replikatsioon, viiruses sisenemisega seotud sündmused või mõni viiruse poolt kodeeritav valk. Siiani puudusid andmed, mis viitaksid sellele, et mõni SFV valk eraldi ekspresseerituna mõjutab rakkude vastuvõtlikkust viirusele.

Uurimaks seda võimalust SFV ns-valkude puhul, kasutati indutseeritud ja indutseerimata rakkude nakatamist SFV-EGFP viiruspartiklitega. Rakkude nakatamist hinnati EGFP positiivsete rakkude arvu järgi kolmes paralleelkatses. Positiivseks loeti kõik EGFP positiivsed rakud, sõltumata markervalgu ekspressiooni tasemest. Selle katse põhimõte seisnes selles, ei iga rakk, millesse SFV-l õnnestub siseneda ja seal oma replikatsioon käivitada läheb arvesse positiivse rakuna.

Ns-valkude ekspressiooni indutseeriti rakkudes 8 tundi enne nakatamist. Rakke nakatati madala moi tingimustes (ca. 1.0 pfu/rakk), selleks et vältida rakkude mitmekordset infektsiooni. EGFP positiivsete rakkude arvu analüüsiti 12 tunni peale nakatamist (SFV infektsiooni seisukohalt hiline ajapunkt) läbivoolutsütomeetriat kasutades. Saadud tulemused näitasid, et kõik rakuliinid nakatusid ning märgatavaid erinevusi EGFP-positiivsete rakkude arvus indutseerimata/indutseeritud rakkude puhul ei esinenud (andmed esitamata). Sellest võib järeldada, et ühegi SFV mittestruktuurse ala geeni ekspressioon eraldi võetuna ei takista superinfitseeriva viiruse sisenemist raku ja replikatsiooniprotsessi käivitumist.

3.2. Mõju rekombinantse valgu ekspressioonile

Eelmise eksperimendi loogilise jätkuna teostati uurimus, mis põhineb viiruse genoomi poolt ekspresseeritava markergeeni produkti täpsel kvantifitseerimisel. Erinevalt eelmisest katsest, kus kõik rakud, milles markergeen ekspresseerus, arvestati positiivseteks, mõõdeti selles katses markergeeni ekspressiooni taset rakkudes üldse.

Katset kujundades arvestati, et markergeeni (milleks valiti jaanimardika lutsiferaas) eksperssiooni efektiivsus sõltub järgmistest faktoritest:

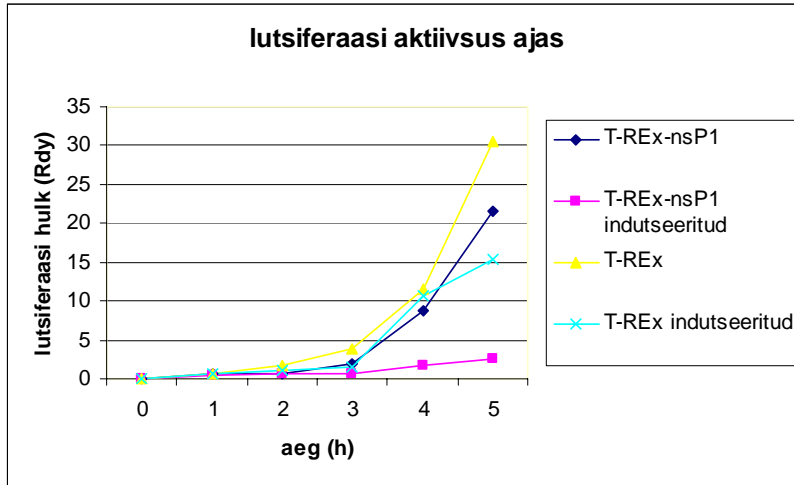
1. Viiruse sisenemise ja lahtipakkimise efektiivsusest; eelmise katse tulemuste põhjal ns-valgud nende protsesside efektiivsusele olulist mõju ei avalda.
2. Viiruse genoomse RNA translatsioonist.
3. Funktsionaalse replikatsioonikompleksi moodustamisest.
4. Negatiivse polaarsusega RNA sünteesi efektiivsusest.
5. Positiivsete genoomsete ahelate sünteesi efektiivsusest.
6. Subgenoomse RNA sünteesi efektiivsusest.
7. Subgenoomse RNA translatsiooni efektiivsusest.
8. Viiruse valkude ja *in trans* ekspresseeritava viiruse valgu mõjust raku metabolismile.

Kõikide nende faktorite koosmõju peaks väljenduma markergeeni ekspressioonitaseme muutuses. Töö esialgse etapina oli kavas võimalike efektide detekteerimine ja nendele tulemustele tuginedes konkreetse ns-valkude toimemehhanismi uurimiseks vajalike eksperimentide planeerimine.

Markergeeni raku sisseviimiseks kasutati SFV VLP-sid, millele oli pakitud lucgeeni sisaldav SFV replikon. Sarnaselt eelmisele katsele nakatati rakke madala moi tingimustes, kuid lutsiferaasi aktiivsuse analüüsiks valiti varajasem ajapunkt. Sellise valiku põhjus seisnes selles, et hilises infektsioonis toimub raku metabolismi mahasurumine viiruse poolt ja koos sellega kaob *in trans* ekspresseeritava ns-valgu mõju. Peale selle on loogiline oletada, et hilises infektsioonis ühtlustub viiruse replikatsioonitase kõikides rakkudes, st. *in-trans* ekspresseeritavate ns-valkude mõju SFV kaudu toimivale geeniekspressioonile on tõenäoliselt viiruse infektsiooni varajase faasiga seotud fenomen.

Katse tingimuste optimeerimiseks kasutati T-REx ja T-REx-nsP1 rakuliine. Rakke indutseeriti 8 tundi, samaaegselt nakatati nii indutseeritud kui indutseerimata rakke SFV-luc viiruspartiklitega. Lutsiferaasi ekspressiooni erinevus indutseeritud/indutseerimata rakuliinidel on detekteeritav 4-ndast tunnist peale SFV-luc viiruspartiklitega nakatamist (graafik 10). Edaspidi uuriti subgenoomse RNA sünteesi 5 tundi pärast viirusega nakatamist. Kõik katsed teostati kolmes paralleelis. Kontrollkatsena viidi paralleelselt alati läbi ka indutseeritud ja indutseerimata algrakuliini

nakatamine ja lutsiferaasi aktiivsuse vaherkord indutseeritud ja indutseerimata kontrollrakkudes loeti võrdseks 100%-ga (kõik ülejäänud andmed normaliseeriti sellele vastavalt).



Graafik 10. Lutsiferaasi ekspressiooni efekti uurimine T-REx ja T-REx-nsP1 rakuliinides. Ajapunktid on võetud 0, 1, 2, 3, 4 ja 5 tundi peale SFV-luc viiruspartiklitega nakatamist.

Teostatud analüüsi tulemused on kokkuvõtvalt esitatud tabelis 3. Sellest on näha, et rakuliinid jagunevad lutsiferaasi ekspressioon mõjutamise osas kahte ossa.

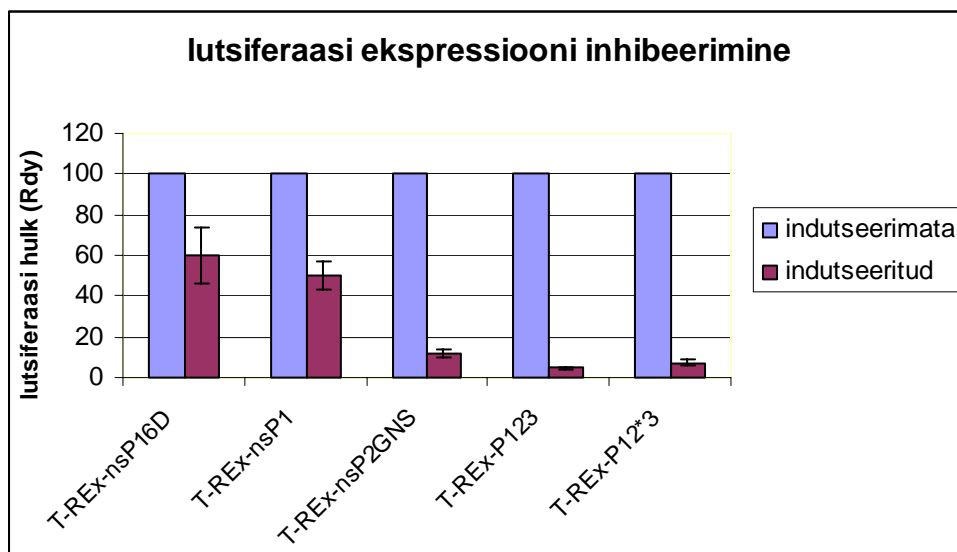
1. Rakuliinid, milles indutseeritakse valgud nsP2, nsP2^{CA}, nsP2^{RDR}, nsP2^{CA+RDR}, nsP3 ja nsP4, sarnanevad T-Rex algrakkudega, st. nendes ei toimu vastusena induksioonile lutsiferaasi ekspressiooni taseme spetsiifilist muutust. See võib kajastada nii toimimiseefekti puudumist kui ka teineteist tasakaalustavate erisuunaliste efektide summat.

2. Rakuliinid, milles indutseeritakse valgud nsP1, nsP1^{6D}, nsP2^{GNS}, P123 ja P12*3 erinevad T-Rex algrakkudest ja nendes toimub vastusena SFV ns-geeni ekspressiooni indutseerimisele markergeeni ekspressiooni inhibeerimine. Diagramm, mis on kujutatud graafikul 11, näitab markergeeni ekspressiooni mahasurumise ulatust.

Oluline on märkida, et mitte ühegi rakuliini puhul ei täheldatud vastuseks geeniekspressiooni indutseerimisele markergeeni ekspressioonitaseme tõusu.

Tabel 3. Tabelis on toodud ns-alkude transientse ekspressiooni mõju SFV replikoni vahendusel toimuvale lutsiferaasi ekspressioonile.

Rakuliin	mõju lutsiferaasi ekspressioonile
T-REx-nsP1	Jah
T-REx-nsP1 ^{6D}	Jah
T-REx-nsP2	Ei
T-REx-nsP2 ^{CA}	Ei
T-REx-nsP2 ^{RDR}	Ei
T-REx-nsP2 ^{CARDR}	Ei
T-REx-nsP2 ^{GNS}	Jah
T-REx-nsP3	Ei
T-REx-Ubi/nsP4	Ei
T-REx-P123	Jah
T-REx-P123	Jah



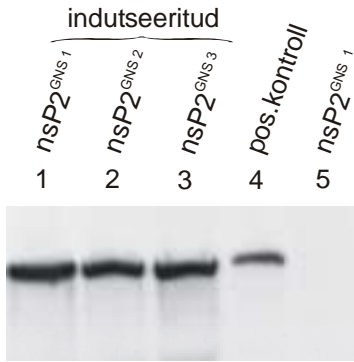
Graafik 11. Graafikuna on toodud lutsiferaasi ekspressiooni inhibeerivate rakuliinide T-REx-nsP1, T-REx-nsP1^{6D}, T-REx-nsP2^{GNS}, T-REx-P123 ja T-REx-P12*3 andmed. Tulemused on normaliseeritud võttes arvesse algrakuliini nakatamisel saadud tulemust.

Graafikul 11 toodud andmed näitavad, et nsP1 ekspressioon omab subgenoomse promotori alt toimuvale lutsiferaasi ekspressioonile mahasuruvat efekti ja seda nii wt nsP1-te kui ka, ehkki vähemal määral, mutantset nsP1^{6D}-d ekspresseerivates liinides. Selle inhibeerimise mehhanismi ei ole selge ja selle uurimiseks kavandatakse täiendavaid eksperimente.

Ka polüproteiine P123 ja P12*3 ekspresseerivates rakuliinides on inhibeerimise efekt selgesti jälgitav ja on isegi suurem kui ainult nsP1 valku ekspresseerivas rakuliinis T-REx-nsP1 (graafik 11). Ka siin pole inhibeerimise mehhanism veel arusaadav, veelgi enam, pole teada, kas see efekt on tingitud nsP1 ekspressioonist (*Western blot* analüüsi tulemused näitavad nendes rakkudes nsP1 ekspressiooni) ja/või RNA-s aset leidvate deletsioonide tulemusel tekkinud nsP1/nsP2 liitvalgu vormide toimest (taolised ebakorrektsed valgud võivad teoreetiliselt inhibeerida normaalsete SFV valkude poolt läbiviidavaid protsesse).

Tähelepanuväärseks saab lugeda avastust, et nsP2 ja enamused tema mutante markergeeni ekspressiooni ei mõjuta. Tulemus on oluline seepärast, et nsP2 proteaasid aktiivsust peetakse sageli vastutavaks superinfektsiooni blokeerimise eest. Vähemalt antud töös kasutatud süsteemis ei pea see oletus paika, ehkki ei saa täielikult välistada, et rekombinantse nsP2 ekspressioon toimub inhibeeriva efekti ilmnemiseks liialt madalal tasemel.

Teatava ootamatusena selgus, et kõigist nsP2 mutantidest omab ainult nsP2^{GNS} lutsiferaasi ekspressiooni inhibeerivat efekt. Kinnitamaks, et tegemist pole ühe konkreetse rakuliini omadusega, korrati seda katset kolmes sõltumatus T-REx-nsP2^{GNS} rakuliinis. Allpool on toodud *Western blot* pilt kolmest sõltumatust T-REx-nsP2^{GNS} rakuliinist, näitamaks, et mutantid valgud ekspresseeruvad T-REx-nsP2^{GNS} rakuliinides (joonis 28) ja et igas sõltumatus rakuliinis toodetakse nsP2^{GNS} valku ligikaudu võrdselt. Nende katsete tulemused kinnitasid, et nsP2^{GNS} inhibeerib markergeeni ekspressiooni kõikides testitud rakuliinides.



Joonis 28. nsP2^{GNS} valgu ekspressiooni kontroll kolmes sõltumatus T-REx-nsP2^{GNS} rakuliinis (rajad 1, 2, 3). Negatiivse kontrollina on kasutatud indutseerimata rakuliini lüsaati (rada 5). Positiivse kontrollina on kasutatud SFV partiklitega nakatatud BHK21 rakkude totaallüsaati (rada 4). nsP2 vastase antikehana kasutati hiire toodetud nsP2 vastast monoklonaalset antikeha.

Milles seisneb nsP2^{GNS} poolt põhjustatava inhibeerimise mehhanism on veel vara öelda, ehkki, lähtudes olemasolevast informatsioonist, võib protsessi mehhanismi kohta teha mitu võimaliku oletust:

1. nsP2^{GNS} ekspresseerub rakkudes mõnevõrra paremini (kõrgemal tasemel) kui teised nsP2 vormid (joonis 15, joonis 28) ja tema poolt avaldatav inhibeeriv efekt on seotud lihtsalt kõrgema valgu kontsentratsiooniga.
2. nsP2^{GNS} kujutab endast inaktiivset helikaasi. Kuna helikaasid on enamasti oligomeersed molekulid, siis võib nsP2^{GNS} mõjuda SFV replikatsioonil kui dominantselt negatiivne mutant.

Mõlema siintoodud hüpoteesi kontrollimiseks, samuti ka nsP2^{GNS} poolt mõjutatava(te) viiruse replikatsioonil olulis(te) protsessi(de) uurimiseks on vajalik kavandada ja läbi viia täiendavaid katseid.

KOKKUVÕTE

Perekond *Alphavirus*, kuhu kuulub ka SFV, on grupp suhteliselt väikeseid lipiidse ümbrise ja positiivse polaarsusega RNA genoomseid viiruseid, mis tänu oma suhteliselt lihtsale ehitusele pakuvad suurt huvi mudelviirustena viiruse elutsükli uuringutes. Erilist tähelepanu osutatakse SFV mittestruktuursete valkude funktsioonidele, kuna viimased omavad olulist rolli viiruse genoomi replikatsioonil, transkriptsioonil ja translatsioonil.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uudse SFV mittestruktuursete valke ekspresseeriva süsteemi loomine, selle omaduste ja efektiivsuse hindamine. Töö käigus konstrueeriti tetratsükliiniga indutseeritavad SFV mittestruktuursete valke ekspresseerivad T-REx rakuliinid. Mitmete meetoditega analüüsitud liinid, mis ekspresseerisid SFV ns-valke ja nende mutante, osutusid sobivaks kavandatud uurimistöö edasiseks läbiviimiseks. Töö käigus konstrueeriti ka neli SFV polüproteiine ekspresseerivat rakuliini. Vastupidiselt individuaalseid valke ekspresseerivatele liinidele tõi polüproteiine ekspresseerivate liinide analüüs välja ebakorrektsete valkude sünteesi, mistõttu nende liinide kasutamine edasises uuringus oli limiteeritud.

Kasutades konstrueeritud süsteeme iseloomustati SFV mittestruktuursete valkude lokaliseerimise rakus ja võrreldi saadud tulemusi kirjanduses avaldatud andmetega. Nii näidati, et nsP1 ekspressioon stabiilses rakuliinis toob kaasa rekombinantse valgu lokaliseerimise plasmamembraani ja filopodia-sarnaste struktuuride moodustumise, mutantset nsP1^{6D} valku ekspresseerivates rakkudes taolisi struktuure ei täheldatud. Võrreldes kirjanduslike andmetega näitasid meie katsed ka nsP2 ja nsP2^{GNS} valkude oodatust erinevat lokaliseerimist, kuna nad lokaliseerusid nii tsütoplasmas kui ka tuumas. nsP3 ja mutantsete nsP2^{CA}, nsP2^{RDR} ja nsP2^{CA+RDR} lokaliseerimise uurimisel saadud tulemused vastasid täpselt kirjanduses avaldatule.

Kasutades loodud rakuliine alustati katseid SFV ns-valkude pooleluea määramiseks. Esialgsed tulemused näitavad, et nsP1 omab oluliselt pikemat pooleluea (pooleluea ca. 8 h) kui nsP2 ja nsP3 (pooleluea ca. 1 h). Võimalik, et nsP1 pikk pooleluea tuleneb nsP1 seotusest raku membraaniga.

Peale selle näitas läbi viidud katseseeria, et ainsa SFV ns-valguna omab nsP1 olulist mõju raku elulemusele (vähendades seda). Ka siin võib otsida paralleele rakumembraanil toimuvate struktuursete ümberkorraldustega.

Vastupidiselt kirjanduses avaldatud andmetele näitasid meie poolt läbi viidud katsed, et superinfektsiooni blokeerimise eest ei vastuta eraldivõetuna ükski SFV mittestruktuurse ala geen. Samas tuleb märkida, et antud töös ei olnud võimalik viiruse sisenemist raku ja viiruse replikatsiooniprotsessi käivitamist takistava protsessi uurimiseks kasutada konstrueeritud polüproteiine ekspresseerivaid rakuliine, mis põhimõtteliselt kujutaksid endast viiruse infektsiooni imiteerimise seisukohalt kõige adekvaatsemat mudelit.

Peale viiruse raku sisenemise mõjutamise uurimise analüüsi veel ka *in trans* ekspresseeritavate ns-valkude mõju SFV-vektori vahendatud markergeeni ekspressioonile. Nende katsete tulemused näitasid, et markervalgu ekspressiooni inhibeerisid kasutatud katsesüsteemis nsP1, nsP1^{6D}, nsP2^{GNS}, P123 ja P12*3 valgud. Hetkel on nendest tulemustest veel vara teha kaugeleulatuvaid järeldusi, kuna tulemuste adekvaatseks hindamiseks tuleks katseid korrata, vajadusel valida sobivam katsesüsteem, ajagraafik jne. Edasise töö plaani kuulub ka meie poolt kirjeldatud inhibeerimise mehhanismi väljaselgitamine.

SUMMARY

Semliki Forest virus (SFV) belongs to the group of the positive-strand RNA viruses. SFV provides, due to its relative simplicity, a great interest as a model virus for the studies of the virus life cycle in general. It has been established that SFV encoded nonstructural (ns) proteins play essential role in viral genome replication, transcription and translation, therefore special attention was paid to their functional studies.

The aim of the present work was to develop of the novel system for the expression of the SFV ns-proteins and subsequent characterisation of this system. For this purpose tetracyclin-inducible T-REx stable cell lines, expressing SFV ns-proteins, were constructed and subsequently analyzed. Four stable cell lines expressing different SFV ns-polyproteins were also made. In contrast to cell lines, expressing individual proteins, the analysis of polyprotein expressing cell lines revealed aberrant protein expression and therefore the use of these cell lines in the following research was limited.

The subcellular localization of SFV ns-proteins was determined by use of the immunofluorescence technique and the obtained results were compared with previously published data. It was shown that expression of nsP1 in stable cell line results in the membrane localization of recombinant protein and formation of the filopodia-like structures on the cell surface. In contrast, such structures were not detected in cell line expressing nsP1^{6D} mutant. These results were in line with previously published data. Compared to the published data our results revealed inconsistency of the localization of the nsP2 and nsP2^{GNS} proteins: these proteins were found to localize in the cytoplasm as well as in cell nucleus. At the same time the localization of nsP3 and mutant proteins such as nsP2^{CA}, nsP2^{RDR} and nsP2^{CA+RDR} was consistent with previously published data.

Constructed stable cell lines were used to initiate the experiments aiming determination of the half-life of SFV ns-proteins. Preliminary results demonstrate that nsP1 (half-life ca. 8 h) is by far the most long-living ns-protein of the SFV, since the half-lives of the nsP2 and nsP3 were significantly shorter (ca. 1 h). It can be speculated that such a long half-life of nsP1 may be due to its membrane association.

Additionally it was demonstrated that nsP1 is the only SFV ns-protein which expression affected the cell viability. Again, it is possible to speculate that this effect is connected to the cell membrane rearrangements caused by expression of this protein.

In contrast to the published data, our experiments indicated that none of the SFV individual ns-proteins is solely responsible for the phenomenon called “block of superinfection”. However, it must be noted that it was not possible to use the complete polyprotein expressing cell lines in this experiment.

As a next step the effects of SFV ns-protein expression at the SFV vector-mediated marker gene expression were investigated. Obtained preliminary data revealed that the expression of marker protein was inhibited by expression of the nsP1, nsP1^{6D}, nsP2^{GNS}, P123 or P12*3 proteins in stable cell lines. However, the final conclusions can't be made based on this preliminary experimental data. For the adequate evaluation of the results this experiment should be repeated and, if necessary, different experimental system setup, timepoints etc. used. Future research plans also involve detailed studies of the mechanisms of action of ns-proteins possessing this inhibitory effect.

KASUTATUD KIRJANDUS

Ahlquist, P., Strauss, E. G., Rice, C. M., Strauss, J. H., Haseloff, J. & Zimmern, D. (1985). Sindbis virus proteins nsP1 and nsP2 contain homology to nonstructural proteins from several RNA plant viruses. *J Virol* **53**, 536-42.

Ahola, T. & Kaariainen, L. (1995). Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 507-11.

Ahola, T., Kujala, P., Tuittila, M., Blom, T., Laakkonen, P., Hinkkanen, A. & Auvinen, P. (2000). Effects of palmitoylation of replicase protein nsP1 on alphavirus infection. *J Virol* **74**, 6725-33.

Ahola, T., Lampio, A., Auvinen, P. & Kaariainen, L. (1999). Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *Embo J* **18**, 3164-72.

Atkins, G. J., Sheahan, B. J. & Liljestrom, P. (1999). The molecular pathogenesis of Semliki Forest virus: a model virus made useful? *J Gen Virol* **80**, 2287-97.

Baker, S. C., Yokomori, K., Dong, S., Carlisle, R., Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V. & Lai, M. M. (1993). Identification of the catalytic sites of a papain-like cysteine proteinase of murine coronavirus. *J Virol* **67**, 6056-63.

Bird, L. E., Subramanya, H. S. & Wigley, D. B. (1998). Helicases: a unifying structural theme? *Curr Opin Struct Biol* **8**, 14-8.

Cheng, R. H., Kuhn, R. J., Olson, N. H., Rossmann, M. G., Choi, H. K., Smith, T. J. & Baker, T. S. (1995). Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. *Cell* **80**, 621-30.

Choi, H. K., Tong, L., Minor, W., Dumas, P., Boege, U., Rossmann, M. G. & Wengler, G. (1991). Structure of Sindbis virus core protein reveals a chymotrypsin-like serine proteinase and the organization of the virion. *Nature* **354**, 37-43.

Corver, J., Moesby, L., Erukulla, R. K., Reddy, K. C., Bittman, R. & Wilschut, J. (1995). Sphingolipid-dependent fusion of Semliki Forest virus with cholesterol-containing liposomes requires both the 3-hydroxyl group and the double bond of the sphingolipid backbone. *J Virol* **69**, 3220-3.

de Groot, R. J., Rumenapf, T., Kuhn, R. J., Strauss, E. G. & Strauss, J. H. (1991). Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8967-71.

DeTulleo, L. & Kirchhausen, T. (1998). The clathrin endocytic pathway in viral infection. *Embo J* **17**, 4585-93.

Dubin, D. T., Stollar, V., Hsueh, C. C., Timko, K. & Guild, G. M. (1977). Sindbis virus messenger RNA: the 5'-termini and methylated residues of 26 and 42 S RNA. *Virology* **77**, 457-70.

Ekstrom, M., Liljestrom, P. & Garoff, H. (1994). Membrane protein lateral interactions control Semliki Forest virus budding. *Embo J* **13**, 1058-64.

Ellgaard, L. & Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181-91.

Fazakerley, J. K. (2002). Pathogenesis of Semliki Forest virus encephalitis. *J Neurovirol* **8 Suppl 2**, 66-74.

Fazakerley, J. K., Boyd, A., Mikkola, M. L. & Kaariainen, L. (2002). A single amino acid change in the nuclear localization sequence of the nsP2 protein affects the neurovirulence of Semliki Forest virus. *J Virol* **76**, 392-6.

Fresco, L. D. & Buratowski, S. (1994). Active site of the mRNA-capping enzyme guanylyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*: similarity to the nucleotidyl attachment motif of DNA and RNA ligases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6624-8.

Frolov, I., Hoffman, T. A., Pragai, B. M., Dryga, S. A., Huang, H. V., Schlesinger, S. & Rice, C. M. (1996). Alphavirus-based expression vectors: strategies and applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11371-7.

Frolov, I. & Schlesinger, S. (1994). Comparison of the effects of Sindbis virus and Sindbis virus replicons on host cell protein synthesis and cytopathogenicity in BHK cells. *J Virol* **68**, 1721-7.

Frolova, E., Frolov, I. & Schlesinger, S. (1997). Packaging signals in alphaviruses. *J Virol* **71**, 248-58.

Froshauer, S., Kartenbeck, J. & Helenius, A. (1988). Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes. *J Cell Biol* **107**, 2075-86.

Furuichi, Y., LaFiandra, A. & Shatkin, A. J. (1977). 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature* **266**, 235-9.

Gomez de Cedron, M., Ehsani, N., Mikkola, M. L., Garcia, J. A. & Kaariainen, L. (1999). RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. *FEBS Lett* **448**, 19-22.

Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V. & Lai, M. M. (1991). Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Lett* **288**, 201-5.

Hahn, Y. S., Strauss, E. G. & Strauss, J. H. (1989). Mapping of RNA- temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: assignment of complementation groups A, B, and G to nonstructural proteins. *J Virol* **63**, 3142-50.

Hardy, W. R. & Strauss, J. H. (1989). Processing the nonstructural polyproteins of sindbis virus: nonstructural proteinase is in the C-terminal half of nsP2 and functions both in cis and in trans. *J Virol* **63**, 4653-64.

Helenius, A. (1995). Alphavirus and flavivirus glycoproteins: structures and functions. *Cell* **81**, 651-3.

Helenius, A. & Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-9.

Helenius, A., Kartenbeck, J., Simons, K. & Fries, E. (1980). On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *J Cell Biol* **84**, 404-20.

Kaariainen, L. & Ahola, T. (2002). Functions of alphavirus nonstructural proteins in RNA replication. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **71**, 187-222.

Kaariainen, L., Takkinen, K., Keranen, S. & Soderlund, H. (1987). Replication of the genome of alphaviruses. *J Cell Sci Suppl* **7**, 231-50.

Kamer, G. & Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res* **12**, 7269-82.

Kielian, M. (1995). Membrane fusion and the alphavirus life cycle. *Adv Virus Res* **45**, 113-51.

Kielian, M. C. & Helenius, A. (1984). Role of cholesterol in fusion of Semliki Forest virus with membranes. *J Virol* **52**, 281-3.

Klimjack, M. R., Jeffrey, S. & Kielian, M. (1994). Membrane and protein interactions of a soluble form of the Semliki Forest virus fusion protein. *J Virol* **68**, 6940-6.

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

Kujala, P., Ikaheimonen, A., Ehsani, N., Vihinen, H., Auvinen, P. & Kaariainen, L. (2001). Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. *J Virol* **75**, 3873-84.

Laakkonen, P., Ahola, T. & Kaariainen, L. (1996). The effects of palmitoylation on membrane association of Semliki forest virus RNA capping enzyme. *J Biol Chem* **271**, 28567-71.

Laakkonen, P., Auvinen, P., Kujala, P. & Kaariainen, L. (1998). Alphavirus replicase protein NSP1 induces filopodia and rearrangement of actin filaments. *J Virol* **72**, 10265-9.

Laakkonen, P., Hyvonen, M., Peranen, J. & Kaariainen, L. (1994). Expression of Semliki Forest virus nsP1-specific methyltransferase in insect cells and in *Escherichia coli*. *J Virol* **68**, 7418-25.

Lampio, A., Ahola, T., Darzynkiewicz, E., Stepinski, J., Jankowska-Anyszka, M. & Kaariainen, L. (1999). Guanosine nucleotide analogs as inhibitors of alphavirus mRNA capping enzyme. *Antiviral Res* **42**, 35-46.

Lampio, A., Kilpelainen, I., Pesonen, S., Karhi, K., Auvinen, P., Somerharju, P. & Kaariainen, L. (2000). Membrane binding mechanism of an RNA virus-capping enzyme. *J Biol Chem* **275**, 37853-9.

Lastarza, M. W., Grakoui, A. & Rice, C. M. (1994). Deletion and duplication mutations in the C-terminal nonconserved region of Sindbis virus nsP3: effects on phosphorylation and on virus replication in vertebrate and invertebrate cells. *Virology* **202**, 224-32.

LaStarza, M. W., Lemm, J. A. & Rice, C. M. (1994). Genetic analysis of the nsP3 region of Sindbis virus: evidence for roles in minus-strand and subgenomic RNA synthesis. *J Virol* **68**, 5781-91.

Li, G. P., La Starza, M. W., Hardy, W. R., Strauss, J. H. & Rice, C. M. (1990). Phosphorylation of Sindbis virus nsP3 in vivo and in vitro. *Virology* **179**, 416-27.

Liljestrom, P. & 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.

Loewy, A., Smyth, J., von Bonsdorff, C. H., Liljestrom, P. & Schlesinger, M. J. (1995). The 6-kilodalton membrane protein of Semliki Forest virus is involved in the budding process. *J Virol* **69**, 469-75.

Lu, Y. E. & Kielian, M. (2000). Semliki forest virus budding: assay, mechanisms, and cholesterol requirement. *J Virol* **74**, 7708-19.

Lulla, A (2003). Functional characterization and substrate specificity of Semliki Forest Virus non-structural protease, magistritöö.

Mancini, E. J., Clarke, M., Gowen, B. E., Rutten, T. & Fuller, S. D. (2000). Cryo-electron microscopy reveals the functional organization of an enveloped virus, Semliki Forest virus. *Mol Cell* **5**, 255-66.

Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N. & Burley, S. K. (1997). Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* **89**, 951-61.

Marsh, M., Bolzau, E. & Helenius, A. (1983). Penetration of Semliki Forest virus from acidic prelysosomal vacuoles. *Cell* **32**, 931-40.

Merits, A., Vasiljeva, L., Ahola, T., Kaariainen, L. & Auvinen, P. (2001). Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein by nsP2 protease. *J Gen Virol* **82**, 765-73.

Pehrson, J. R. & Fuji, R. N. (1998). Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res* **26**, 2837-42.

Peranen, J. & Kaariainen, L. (1991). Biogenesis of type I cytopathic vacuoles in Semliki Forest virus-infected BHK cells. *J Virol* **65**, 1623-7.

Peranen, J., Laakkonen, P., Hyvonen, M. & Kaariainen, L. (1995). The alphavirus replicase protein nsP1 is membrane-associated and has affinity to endocytic organelles. *Virology* **208**, 610-20.

Peranen, J., Rikkonen, M., Liljestrom, P. & Kaariainen, L. (1990). Nuclear localization of Semliki Forest virus-specific nonstructural protein nsP2. *J Virol* **64**, 1888-96.

Peranen, J., Takkinen, K., Kalkkinen, N. & Kaariainen, L. (1988). Semliki Forest virus-specific non-structural protein nsP3 is a phosphoprotein. *J Gen Virol* **69**, 2165-78.

Perri, S., Driver, D. A., Gardner, J. P., Sherrill, S., Belli, B. A., Dubensky, T. W., Jr. & Polo, J. M. (2000). Replicon vectors derived from Sindbis virus and Semliki forest virus that establish persistent replication in host cells. *J Virol* **74**, 9802-7.

Pettersson, R. F., Soderlund, H. & Kaariainen, L. (1980). The nucleotide sequences of the 5'-terminal T1 oligonucleotides of Semliki-Forest-virus 42-S and 26-S RNAs are different. *Eur J Biochem* **105**, 435-43.

Ranki, M., Ulmanen, I. & Kaariainen, L. (1979). Semliki Forest virus-specific nonstructural protein is associated with ribosomes. *FEBS Lett* **108**, 299-302.

Rikkonen, M. (1996). Functional significance of the nuclear-targeting and NTP-binding motifs of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Virology* **218**, 352-61.

Rikkonen, M., Peranen, J. & Kaariainen, L. (1992). Nuclear and nucleolar targeting signals of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Virology* **189**, 462-73.

Rikkonen, M., Peranen, J. & Kaariainen, L. (1994). Nuclear targeting of Semliki Forest virus nsP2. *Arch Virol Suppl* **9**, 369-77.

Rozanov, M. N., Koonin, E. V. & Gorbalenya, A. E. (1992). Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol* **73**, 2129-34.

Salonen, A., Vasiljeva, L., Merits, A., Magden, J., Jokitalo, E. & Kaariainen, L. (2003). Properly folded nonstructural polyprotein directs the semliki forest virus replication complex to the endosomal compartment. *J Virol* **77**, 1691-702.

Sanz, M. A., Perez, L. & Carrasco, L. (1994). Semliki Forest virus 6K protein modifies membrane permeability after inducible expression in Escherichia coli cells. *J Biol Chem* **269**, 12106-10.

Sariola, M., Saraste, J. & Kuismanen, E. (1995). Communication of post-Golgi elements with early endocytic pathway: regulation of endoproteolytic cleavage of Semliki Forest virus p62 precursor. *J Cell Sci* **108**, 2465-75.

Sawicki, D. L. & Sawicki, S. G. (1980). Short-lived minus-strand polymerase for Semliki Forest virus. *J Virol* **34**, 108-18.

Sawicki, D. L., Sawicki, S. G., Keranen, S. & Kaariainen, L. (1981). Specific Sindbis virus-coded function for minus-strand RNA synthesis. *J Virol* **39**, 348-58.

Shuman, S. & Hurwitz, J. (1981). Mechanism of mRNA capping by vaccinia virus guanylyltransferase: characterization of an enzyme--guanylate intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 187-91.

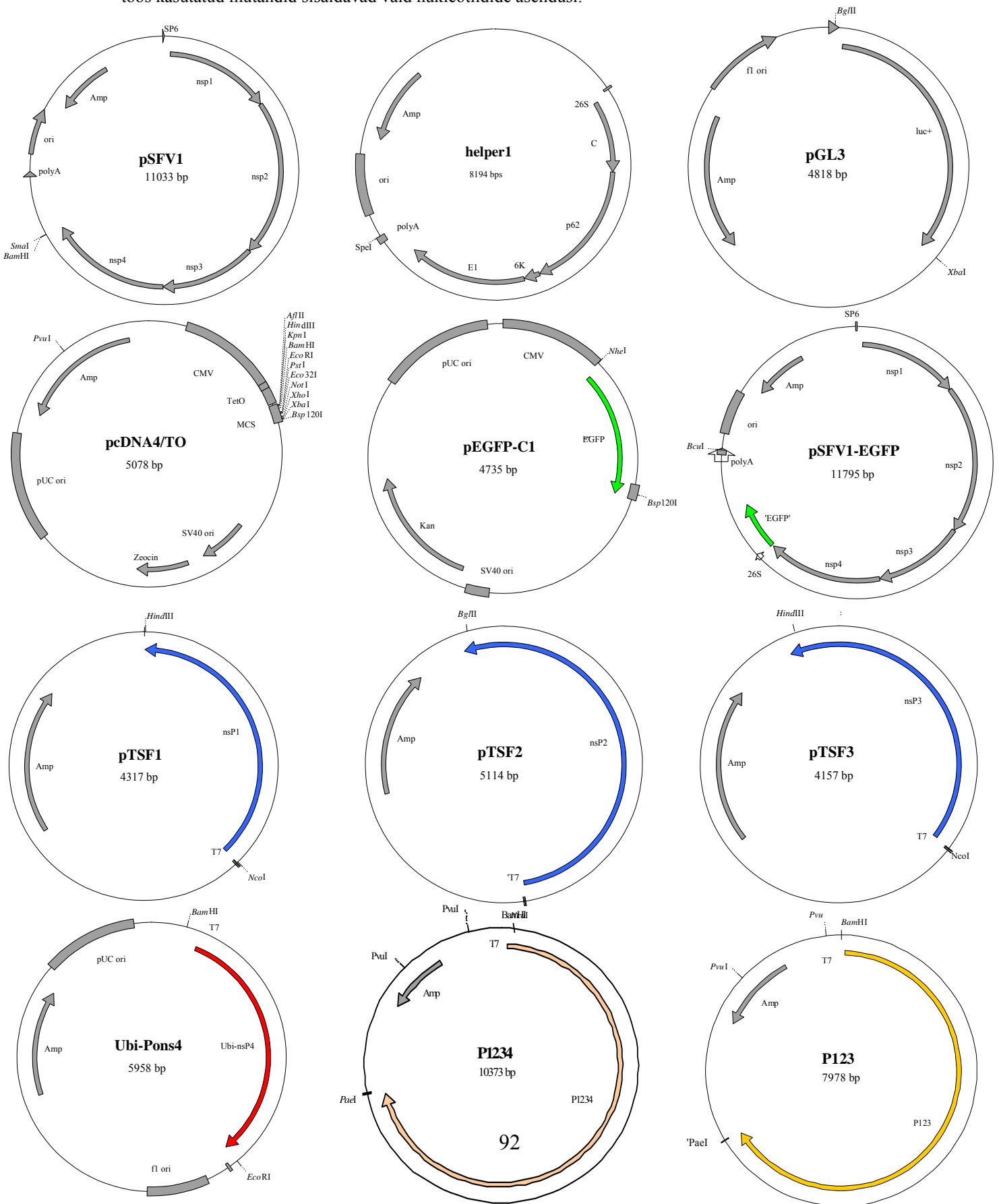
Singh, I. & Helenius, A. (1992). Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *J Virol* **66**, 7049-58.

Soderlund, H., Kaariainen, L. & von Bonsdorff, C. H. (1975). Properties of Semliki Forest virus nucleocapsid. *Med Biol* **53**, 412-7.

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

- Suomalainen, M., Liljestrom, P. & Garoff, H. (1992).** Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of alphaviruses. *J Virol* **66**, 4737-47.
- Suopanki, J., Sawicki, D. L., Sawicki, S. G. & Kaariainen, L. (1998).** Regulation of alphavirus 26S mRNA transcription by replicase component nsP2. *J Gen Virol* **79**, 309-19.
- Tuomi, K., Kadaridainen, L. & Soderlund, H. (1975).** Quantitation of Semlike Forest virus RNAs in infected cells using ³²-P equilibrium labelling. *Nucleic Acids Res* **2**, 555-65.
- Ulmanen, I. (1978).** Assembly of Semliki Forest virus nucleocapsid: detection of a precursor in infected cells. *J Gen Virol* **41**, 353-65.
- Vasiljeva, L., Merits, A., Auvinen, P. & Kaariainen, L. (2000).** Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *J Biol Chem* **275**, 17281-7.
- Vasiljeva, L., Valmu, L., Kaariainen, L. & Merits, A. (2001).** Site-specific protease activity of the carboxyl-terminal domain of Semliki Forest virus replicase protein nsP2. *J Biol Chem* **276**, 30786-93. Epub 2001 Jun 15.
- Vihinen, H., Ahola, T., Tuittila, M., Merits, A. & Kaariainen, L. (2001).** Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3. *J Biol Chem* **276**, 5745-52. Epub 2000 Dec 4.
- Vihinen, H. & Saarinen, J. (2000).** Phosphorylation site analysis of Semliki forest virus nonstructural protein 3. *J Biol Chem* **275**, 27775-83.
- Wahlberg, J. M. & Garoff, H. (1992).** Membrane fusion process of Semliki Forest virus. I: Low pH-induced rearrangement in spike protein quaternary structure precedes virus penetration into cells. *J Cell Biol* **116**, 339-48.
- Wang, Y. F., Sawicki, S. G. & Sawicki, D. L. (1991).** Sindbis virus nsP1 functions in negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **65**, 985-8.
- Wang, Y. F., Sawicki, S. G. & Sawicki, D. L. (1994).** Alphavirus nsP3 functions to form replication complexes transcribing negative-strand RNA. *J Virol* **68**, 6466-75.
- Weaver, S. C., Hagenbaugh, A., Bellew, L. A., Netesov, S. V., Volchkov, V. E., Chang, G. J., Clarke, D. K., Gousset, L., Scott, T. W., Trent, D. W. & et al. (1993).** A comparison of the nucleotide sequences of eastern and western equine encephalomyelitis viruses with those of other alphaviruses and related RNA viruses. *Virology* **197**, 375-90.
- Wengler, G. & Gross, H. S. (1979).** Replicative form of Semliki Forest virus RNA contains an unpaired guanosine. *Nature* **282**, 754-6.

Lisa 1. Alglasmiidid. Joonisel on toodud vektorite pSFV1, HelperI, pGL3, pc-DNA4/TO, pEGFP-C1, pSFV-EGFP ja Ubi-Pons4 kaardid. Kaardid on toodud wt vektoritest pTSF1, pTSF2, P1234 ja P123, kuna töös kasutatud mutandid sisaldavad vaid nukleotiidide asendusi.



Lisa 2. Konstrueeritud plasmiidid. Joonisel on toodud konstrueeritud vektorite pSFV-luc, pc-EGFP, pc-nsP1, pc-nsP2, pc-nsP3, pc-ubi/nsP4, pc-P1234 ja pc-P123 kaardid. Toomata on pc-nsP1^{6D}, pc-nsP2^{CA}, pc-nsP2^{RDR}, pc-nsP2^{CARDR}, pc-nsP2^{GNS}, pc-P*1234 ning pc-P12*3 kaardid (teatud regioonid sisaldavad nukleotiidi asendusi).

