



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Miten rabiesvirus välttää isännän puolustuksen

Saana Nyberg

Biologian tutkinto-ohjelma (fysiologia)

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

1.6.2026

Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pääaine: Biologia

Tekijä: Saana Nyberg

Otsikko: Miten rabiesvirus välttää isännän puolustuksen

Ohjaaja: Tiina Henttinen

Sivumäärä: 31 sivua

Päivämäärä: 1.6.2026

Rabiesvirus on *lyssavirus* sukuun ja *Rhabdovirae* heimoon kuuluva neurotrooppinen virus, joka aiheuttaa maailmanlaajuisia haittaa kansanterveydelle. Koska rabiesviruksen kuolleisuusaste on oireiden alettua 100 %, se aiheuttaa vakavan uhan ihmisten terveydelle. Rabiesviruksen tiedetään käyttävän useaa eri reseptoria sen tunkeutuessa kohdesoluun, kuten NCAM, p75NTR, gangliosidit, karbohydraatit, nAChR ja mGluR2. Viruksen kiinnittymisestä soluun seuraa klatriinivälitteinen endosytoosi, joka on riippuvainen aktiinin polymerisaatiosta. Internalisaation jälkeen virus käyttää retrograadista kuljetusta mikrotubuluksia pitkin päästäkseen hermosolun soomaan. Viruksen kuljetuksesta on esitetty kaksi mallia, jossa toisessa kokonainen virus kuljetetaan vesikkelissä, kun taas toinen malli esittää, että pelkkä viruksen kapsidi kuljetettaisiin soomaan. Soomassa viruksen genomi transkriptoidaan ja replikoidaan inkluusiokappaleissa.

On tärkeää, että virus säätelee geeniensä ekspressiota, jotta immuunipuolustus ei tunnistaisi antigeenejä tai isäntäsolun normaali toiminta ei häiriintyisi. Rabiesvirus säätelee tarkkaan etenkin G-proteiinin eli piikkiproteiinin ilmentymistä, sillä isännän immuunipuolustus tunnistaa helposti juuri piikkiproteiinin. Päästyään keskushermostoon rabiesvirus vaikuttaa solusignaalointiin, joka estää T-soluja aiheuttamasta apoptoosia infektoiduissa neuroneissa. Sen sijaan rabiesvirus indusoi T-solujen apoptoosin. Apoptoosin lisäksi rabiesviruksella on myös muita patogeneesiin vaikuttavia tekijöitä. Se esimerkiksi aiheuttaa typpioksidin liikatuotantoa ja mitokondrionaalisia toimintahäiriöitä, jotka osaltaan selittävät taudin kliinisiä oireita.

Avainsanat: Rabiesvirus, lyssavirukset, viruksen elinkierto, immunosuppressio, neurotrooppisuus, G-proteiini, internalisaatio

Sisällys

1	JOHDANTO	1
2	RABIESVIRUKSEN ELINKIERTO	2
2.1	Viruksen kiinnittyminen, internalisaatio ja kuljetus isäntäsolussa	2
2.1.1	Glykoproteiini G ja isäntäsolun reseptorit	2
2.1.2	Internalisaatioreitit	5
2.1.3	Isäntäsolussa tapahtuva kuljetus	7
2.2	Replikaatio, viruspartikkelien kokoaminen ja solusta vapautuminen	11
3	RABIESVIRUSINFEKTION AIHEUTTAMA IMMUNOSUPPRESSIO	15
3.1	Apoptoosi	15
3.1.1	Neuronien apoptoosi isännän puolustusmekanismina	16
3.1.2	Apoptoosimekanismin hyödyntäminen infektiassa	17
3.2	Muita rabiesviruksen patogeeneesiin vaikuttavia tekijöitä	20
4	YHTEENVETO	22
5	LÄHTEET	23

1 JOHDANTO

Raivotautina tai vesikauhuna tunnettu rabies on maailmanlaajuisesti esiintyvä zoonoosi, joka on hyvin tappava oireiden alkamisen jälkeen. Oireet alkavat, kun virus on päässyt kulkeutumaan keskushermostoon. Ehkä noin puolet maailman väestöstä elää rabiesendeemisellä alueella ja eniten sitä esiintyy Aasiassa ja Afrikassa (WHO, 2025). Rabiukseen kuolee vuosittain arviolta 58 000, joista 40 % on lapsia. Kuitenkaan läheskään kaikkia rabiestapauksia ei raportoida. Suomi todettiin vapaaksi rabiesviruksesta 30 vuotta sitten, mutta sitä on kuitenkin viime vuosina löytenyt lepakoilta. Rabiesvirusta esiintyy Suomen lähiseuduilla, etenkin Venäjällä. Raivotautiseksi epäillyn eläimen puremasta tulee hakeutua lääkäriin, jossa infektiota voidaan hoitaa rokotteella ja vasta-ainehoidolla. (Anttila, 2024.)

Vesikauhu nimen tauti on saanut potilaiden pelonomaisesta suhtautumisesta veteen, sillä tartunnan saaneiden nielun lihasten toiminta on häiriintynyt, mikä on seurausta viruksen leviämisestä aivoihin. Aivoissa virus se aiheuttaa monia vakavia kliinisiä oireita ja lähes poikkeuksetta isännän kuoleman. Rabiesvirustartuntaa vastaan ainoa toimiva hoitokeino on rokote, joka on tehokas myös altistumisen jälkeen, kuitenkin ennen oireiden alkua. Ensimmäisen rabiesvirusrokotteen kehitti Louis Pasteur jo vuonna 1885. Rokotteen lisäksi eläimen pureman jälkeen henkilölle voidaan antaa rabiesviruksen vasta-ainetta.

Rabiesvirus tarttuu useimmiten rabiesvirusta kantavan eläimen puremasta, jolloin eläimen sylkeä pääsee ihmiseen, yleensä raajoihin, joissa se etenee perifeerisen hermoston soluihin. Virus on hyvin neurotrooppinen eli se hakeutuu kohti keskushermostoa ja sinne päästyään alkavat kliiniset oireet. Rabiesviruksen tarttumisesta, leviämisestä elimistössä, immuunipuolustuksen välttämisestä ja oireiden aiheuttamisesta tiedetään hyvin rajallisesti, mikä myös rajoittaa taudin hoitoa. Rabiesvirus käyttää pinnallaan olevaa G-proteiinia sitoutuessaan kohdesolun pintareseptoriin. Tässä kandidutkielmassa käsittelen tarkemmin nAChR ja mGluR2 reseptoreita. Tutkielman fokus on rabiesviruksen elinkierrossa ja immunosuppressiivisissa mekanismeissa, mitkä ovat vahvasti sidoksissa toisiinsa. Rabiesviruksen aiheuttamassa immunosupressiossa keskitytään apoptoosin säätelyyn.

2 RABIESVIRUKSEN ELINKIERTO

Rabiesvirus kuuluu *lyssavirusten* sukuun. Rabiesvirus on voimakkaasti hermohakuinen eli neurotrooppinen virus ja sen yleisiä isäntiä ovat monet pienet nisäkkäät, kuten koirat, lepakot, kissat, ketut ja supikoirat. Näiden eläinten puremasta rabiesvirus voi tarttua ihmiseen. Virus kulkeutuu raivotautisen eläimen syljen mukana ihmisen kudoksiin, joista se etenee hermoratoja pitkin keskushermostoon ja edelleen muualle elimistöön, esimerkiksi sylkirauhasiin, jossa virus lisääntyy voimakkaasti, mikä tehostaa tartuttavuutta muihin eläimiin. Viruksen itämisaika ihmisissä on yleensä 1–3 kuukautta, mutta se voi vaihdella 10 päivästä jopa vuosiin.

2.1 *Viruksen kiinnittyminen, internalisaatio ja kuljetus isäntäsolussa*

2.1.1 Glykoproteiini G ja isäntäsolun reseptorit

Rabiesvirus pääsee isäntänsä elimistöön yleensä sairaan eläimen pureman tai raapaisun kautta, minkä jälkeen se levittäytyy keskushermostoon. Virus tarttuu isäntäsolun pinnan reseptoreihin piikkimäisillä G-proteiineilla, jotka ovat tyypin I membraaniglykoproteiineja (Gaudin, 1997). Virus ei pysty infektoimaan soluja ilman G-proteiineja, mutta niiden välttämättömyys viruksen siirtymisessä transsynaptisesti solusta toiseen on edelleen kiistanalaista (Etesami ym., 2000; Mebatsion ym., 1996).

On vielä epäselvää, mitä reseptoria virus käyttää internalisaatiossa, mutta esimerkiksi neuronaaalinen soluadheesiomolekyyli (engl. neural cell adhesion molecule, NCAM), p75 neurotrooppinen reseptori (p75NTR), gangliosidit, karbohydraatit, nikotiiniasetyylikoliinireseptori (engl. nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) ja metabotrooppinen glutamaattireseptori subtyyppi 2 (engl. metabotropic glutamate receptor, mGluR2) ovat keskeisiä tekijöitä. Edellä mainitut reseptorit ovat erityisesti hermosolujen membraanilla sijaitsevia reseptoreja.

NCAM kuuluu immunoglobuliinien superperheeseen, ja se on tärkeä hermoston kehitykselle, synaptiselle plastisuudelle ja solujen väliselle kommunikaatiolle. Se osallistuu aivojen rakenteiden ja toiminnan muokkautumiseen ja voi vaikuttaa neurologisten ja neuropsykiatristen sairauksien kehittymiseen. NCAM on todennäköinen rabiesviruksen reseptori, sillä virus ei pystynyt infektoimaan soluja, jotka eivät ilmentäneet NCAM:ia (Thoulouze ym. 1998). On kuitenkin osoitettu, että rabiesvirus pystyy infektoimaan NCAM-puutteisia hiiriä, mikä viittaa

siihen, ettei NCAM ole välttämätön infektiolle, ja että rabiesvirus käyttää todennäköisesti myös muita kiinnittymisreseptoreja (Thoulouze ym., 1998).

p75NTR tunnistaa ja sitoutuu hermoston kasvutekijöihin eli neurotrofiineihin ja se on tärkeä signaalinvälittäjä, joka vaikuttaa hermosolujen kasvuun, selviytymiseen ja erilaistumiseen. p75NTR ilmentyy neuroneissa pääasiassa synapseissa ja sitoo neuronaaalisia kasvutekijöitä (engl. nerve growth factor, NGF) ja muita neurotrofiineja (engl. neurotrofin, NT). Neurotrofiinin indusoima signaalireitti voi johtaa solujen selviytymiseen tai apoptoosiin. Vasteen laatu riippuu solun ympäristöstä samaan aikaan saamista muista signaaleista. On osoitettu, että rabiesvirus tunkeutuu p75NTR reseptoria ilmentäviin soluihin ja että NGF:lla käsiteltyjen solujen infektioaste laskee. Rabiesvirus käyttää p75NTR reseptoria etenkin infektion alkuvaiheissa. p75NTR ei kuitenkaan ole välttämätön rabiesviruksen infektiolle *in vivo* tai *in vitro*. (Tuffereau ym., 1998.)

Gangliosidit ovat erityisesti hermosolujen solukalvolla ilmeneviä glykolipidejä, mutta niitä on myös muiden solujen solukalvolla. Gangliosidit vaikuttavat solukalvon rakenteeseen, solujen väliseen viestintään ja synaptiseen plastisuuteen. Tutkimuksessa, jossa rabiesviruksen kanssa samaan heimoon kuuluvaa vesikulaarista stromatiittivirusta (engl. Vesicular Stomatitis Virus, VSV) altistettiin gangliosideille, viruksen tartuttavuus kohdesoluihin laski. Liposomeihin lisätyillä gangliosideilla toistettuna infektion estyminen tehostui. (Sinibaldi ym., 1985.)

Karbohydraatit eli hiilihydraatit ovat elimistölle elintärkeä energianlähde. Karbohydraatit eivät ole rabiesviruksen reseptoreita, vaan ne assosioituvat viruksen käyttämään reseptoriin ja vaikuttavat sen toimintaan. Aikaisemmassa tutkimuksessa on osoitettu mannoosin, galaktoosin ja fukoosin poistamisen vähentävän viruksen tarttumista solukalvolle (Seganti ym., 1982), mutta toisaalta Conti ym. (1986) tutkimus indikoi siaalihapon, galaktoosin, mannoosin ja N-asetyyli-glukosamiinin, mutta ei fukoosin olevan välttämättömiä viruksen infektiivisyydelle.

nAChR:t ovat asetyylikoliinivälittäjäainetta sitovia reseptoreja, joita on sekä pre- että postsynaptisella solukalvolla. nAChR on lihaksen supistumiseen vaikuttava reseptori ja niitä on runsaasti lihassolujen hermolihaskliitoksissa postsynaptisella kalvolla. Rabiesvirusta paikantuu paljon hermolihaskliitoksiin, missä se tunkeutuu hermosoluun ja siten myös sen kohdereseptorit sijaitsevat näillä alueilla. Kun virus on kiinnittymisen jälkeen internalisoitunut kohdesoluun, virus paikantuu postsynaptisessa terminaalissa endosomaalisiin osastoihin (engl. endosomal compartments). (Lewis ym., 2000.) Tämänhetkisen tiedon perusteella virus pystyy tunkeutumaan suoraan hermopäätteisiin ilman, että viruksen täytyy replikoitua lihassoluissa,

mikä viittaa siihen, että rabiesvirus käyttää nAChR reseptorina etenkin infektion ensivaiheessa. Ensimmäinen infektiio lihassoluun saattaa olla monistusvaihe, jotta viruksia olisi tarpeeksi ääreishermostoon tunkeutumiseen (Murphy & Bauer, 1974). On myös esitetty, että virukset tunkeutuvat presynaptiseen hermosoluun synaptisten vesikkelien takaisinoton yhteydessä (Lewis ym., 2000). Koska nAChR sijaitsee postsynaptisella kalvolla hermo-lihasliitoksissa, virus hyödyntänee sitä reseptorinaan infektoidessaan lihassolun. Toisaalta, koska nAChR ei ilmenny hermopääätteissä, virus ei voi hyödyntää sitä viruksen levittäytyessä hermostoon. Castellanos ym. (1997) tutkimuksessa todettiin nAChR:iin kiinnittyvien vastavaikuttajien eli antagonistien kilpailevan rabiesviruksen kanssa reseptorin sitoutumispaikoista takajuurisolmukkeen soluissa. Vastavaikuttajat kuten mekamyylamiini ja d-tubokurariini, jotka sitoutuvat viruksen kanssa samaan asetyylikoliinireseptoriin, vähensivät viruksen infektiokykyä, mikä viittaa vahvasti siihen, että rabiesvirus käyttää asetyylikoliinireseptoreja tunkeutuessaan soluun. Tutkimuksessa ei kuitenkaan onnistuttu inhiboimaan muita solutyyppejä kuin hermosoluja, joten on todennäköistä, että virus infektoi soluja joidenkin muiden reseptorien välityksellä.

mGluR2 reseptorit ovat G-proteiinikytkettyjä reseptoreja (engl. G-protein coupled receptor, GPCR), joita on runsaasti keskushermoston neuroneissa. mGluR2 on tärkeä reseptori hermoston normaalin toiminnan kannalta ja se on yhdistetty moneen neurologiseen sairauteen kuten Alzheimerin tautiin, Parkinsonin tautiin, masennukseen, ahdistuneisuus häiriöön ja skitsofreniaan (Niswender & Conn, 2010). Rabiesviruksen G-proteiinin tiedetään sitoutuvan mGluR2:een viruksen tunkeutuessa soluun. RABV infektiosta laskee merkittävästi, kun mGluR2 ilmentymistä soluissa vähennetään siRNA-tekniikalla (engl. small interfering RNA). Sama muutos nähdään, kun mGluR2 reseptorin toiminta estetään siihen sitoutuvalla vasta-aineella *in vitro*. Lisäksi mGluR2-ektodomeenin liukoinen proteiini eli mGluR2 reseptorin extrasellulaarista osasta pilkottu proteiini neutralisoi viljeltyihin soluihin adaptoituneiden ja luonnossa esiintyvän kannan virusten infektion soluissa *in vitro* ja hiirissä *in vivo*. Rabiesvirus ja mGluR2 internalisoituvat soluihin, jossa ne kuljetetaan yhdessä aikaisiin ja myöhäisiin endosomeihin, mikä indikoi mGluR2 käyttävän samanlaista endosyyttistä ja endosomaalista kuljetusreittiä viruksen kanssa. Nämä löydökset viittaavat siihen, että mGluR2 on reseptori, joka mahdollistaa viruksen sisäänpääsyn soluun. Rabiesviruksen G-proteiini tunnistaa mGluR2 reseptorin, mutta VSV:n G-proteiini ei, eli rabiesvirus voi olla ainoa *Rhabdoviridae* heimon virus, joka käyttää kyseistä reseptoria ja internalisaatioreittiä. Tutkimuksessa on myös osoitettu sellaisten aivosolujen infektoituneen, joissa ei ollut mGluR2 reseptoreja tai niitä oli hyvin

vähän, mikä viittaa siihen, että rabiesvirus käyttää myös muita solun pintareseptoreja solujen infektoimiseen *in vivo*. On mahdollista, että rabiesviruksen G-proteiini pystyy jäljittelemään GPCR ligandeja ja vaikuttamaan mGluR2:n toimintaan. (Wang ym., 2018.)

On kuitenkin edelleen epäselvää, miten rabiesvirus internalisoituu soluun kiinnittymisen jälkeen. Myös mGluR2:n internalisaatio endosytoosilla on epäselvää, mutta teorian mukaan mGluR2 internalisoituu Tfr1-kytkentäisen klatriinivälitteisen endosytoosin (engl. clathrin-mediated endocytosis, CME) välityksellä. Tfr1:en endosytoosi mGluR2:ta sisältävissä klatriinipäällysteisissä solukalvopainanteissa (engl. clathrin-coated pits, CCP) saattaa kestää kauemmin, mikä selittää miksi rabiesviruksen endosytoosi kestää kauemmin kuin tavallinen CME. (Wang ym., 2023.)

Rabiesviruksen aiheuttaman sairauden loppuvaiheissa myös sellaiset solut, jotka eivät ilmennä yhtäkään edellä mainittua proteiinia voivat infektoitua (Piccinotti ym., 2013), mikä tarkoittaa sitä, että rabiesviruksen kiinnittymisessä solukalvolle on vielä tuntemattomia tekijöitä.

2.1.2 Internalisaatioreitit

Reseptoriin kiinnittymisestä seuraa rabiesviruksen internalisaatio kohdesoluun, jossa virus käyttää useita pinosytoottisia endosytoosin mekanismeja, kuten klatriinivälitteistä (CME) ja aktiinista riippuvaista endosytoosia eli makropinosytoosia. Toisin kuin reseptorivälitteisessä ja klatriinista riippuvaisessa endosytoosissa, jossa aineet sitoutuvat spesifisiin reseptorimolekyyleihin, makropinosytoosissa solut voivat ottaa sisäänsä suuria määriä nestettä ja liuenneita aineita ilman tarkkaa molekyylikohtaista tunnistusta, mikä tekee siitä hyvän internalisaatioreitin viruksille. CME:ssä viruksen kiinnittymistä tiettyyn reseptoriin seuraa klatriinin ryhmittäminen solun membraanille, mitä rekrytoi adaptoriproteiinit, kuten AP2, eps15 ja epsin1. AP2 aktivoituu, kun sen kohdereseptoreja ilmenee membraanilla. AP2 ja klatriini kiinnittyvät toisiinsa ja klatriinipäällysteinen solukalvopainanne muodostuu, mistä seuraa klatriinipäällysteisen vesikkelin (engl. clathrin-coated vesicle, CCV) muodostuminen. Dynamiiniproteiini kuroo vesikkelin irti solukalvosta vapauttaen sen sytoplasmaan. (Kaksonen & Roux, 2018.) Rabiesvirus käyttää todennäköisesti samoja klatriinista riippuvaisia internalisaatioreittejä kuin esimerkiksi p75NTR ja NCAM reseptoriproteiinit.

Makropinosytoosi on kasvutekijöiden aikaansaama ja siihen liittyy monivaiheinen signaalireitti. Makropinosytoosissa aktiini laajentaa solukalvoa muodostaen ulokkeita eli lamellipodeja ja filopodeja, jolloin plasmamembraani rypytyy ja taittuu muodostaen nesteen täyttämän ontelon, jonka dynamiinin välittämä membraanifuusio sulkee. Solun tukiranka

osallistuu internalisaatioon, sillä aktiinifilamentit tukevat muodostuvaa vesikkeliä vastustaen painetta, jolla solukalvopainanne katoaisi ja solukalvo palautuisi muotoonsa. (Mercer & Helenius, 2009.)

Sensoriset selkäydinhermosolmuneuronit ja motoneuronit ovat molemmat alttiita rabiesviruksen infektiolle. Neuronien morfologisten ja funktionaalisten erilaisuuksien takia on mahdollista, että rabiesvirus ei käytä näissä identtisiä internalisaatioreittejä. Endosytoosiprosessien farmakologinen häirintä osoittaa, että tehokas infektointi kummassakin neuronityypissä on dynamiiniriippuvaista ja että klatriinivälitteinen endosytoosi on ensisijainen internalisaatioreitti. (Piccinotti & Whelan, 2016.)

Superti ym. (1984) havaitsivat rabiesviruksen lokalisoituvan kanan alkiosolujen (engl. chicken embryo related, CER) plasmamembraanilla päällystettyihin solukalvopainanteisiin ja kuljetettavan vesikkeleissä, jotka fuusioituivat lysosomeihin. Sama ilmiö kuvattiin viljellyissä hippokampuksen neuroneissa, missä virukset otettiin soluun päällystetyissä vesikkeleissä, jotka fuusioituivat endosomeihin pian sisään ottamisen jälkeen (Lewis & Lentz, 1998). Rabiesvirus siis käyttää CME:a, mutta koska virukset ovat liian isoja, tarvitaan aktiinista riippuvaista CME:a tai makropinosytoosia. Ei kuitenkaan ole näyttöä siitä, että rabiesvirus käyttäisi makropinosytoosia internalisaatioreittinä (Piccinotti ym., 2013). Kun viruspartikkeleja sisältävä vesikkeli on solun sisällä, se voi fuusioitua lysosomeihin tai muihin soluelimiin, joissa aineet pilkotaan ja hyödynnetään solun toimintaan.

Rabiesvirus internalisoituu BS-C-1 fibroblasteihin ensisijaisesti klatriinivälitteisesti siten, että klatriinipäällysteiset solukalvopainanteet ovat vain osittain klatriinilla päällystettyjä, ja aktiinia tarvitaan endosomin internalisaatioon. Tämä internalisaatioreitti on sama kuin VSV:lla. Eläviä soluja kuvantamalla on havaittu, että rabiesviruksen ja VSV:n internalisaation kinetiikka on yhtenevä. VSV käyttää internalisaatiossa osittain klatriinilla päällystettyjä solukalvopainanteita ja se vaatii aktiinin polymerisaation. Viruksen internalisaatiossa aktiinin polymerisaation tarve riippuu kuitenkin viruksen koosta. Cureton ym. (2010) havaitsivat modifioidun ja normaalia pienemmän VSV-partikkelin internalisoituvan klatriinivälitteisesti ilman aktiinin polymerisaatiota

Sytä, miksi rabiesviruksen internalisaatioreitin oletetaan olevan samanlainen kuin VSV:llä, on useita. Esimerkiksi se, että VSV- ja rabiesviruspartikkelit ovat samankokoiset ja ne internalisoituvat samalla tavalla päällystetyillä solukalvopainanteilla. Tutkimuksessa osoitettiin, että rekombinantin VSV:n, jonka pintaproteiini oli korvattu rabiesviruksen G-

proteiinilla (rVSV RABV G) ja rabiesviruksen G-proteiinia ilmentävän rekombinantin rabiesviruksen (rRABV G) sisäänottoa ja infektiota inhiboivat kemikaalit, jotka blokkaavat aktiinin polymerisaatiota (Piccinotti ym. 2013). Samassa tutkimuksessa todettiin dynamiinin osallistuvan vesikkelin muodostumiseen. Toisessa tutkimuksessa selvisi, että virusta sisältävät vesikkelit sisältävät enemmän klatriinia ja klatriinin adaptorimolekyylejä kuin tavalliset vesikkelit (Cureton ym., 2009). Tämä muutos ei edesauttanut vesikkelin klatriinipäällistyneen viimeistelyä mikä tarkoitti, että aktiinin polymerisaatio oli tarpeellinen internalisaatioreitissä. Aktiinin polymerisaation kemiallinen inhibitio aiheutti viruspartikkeleja sisältävien vesikkelien jäämisen plasmamembraanille, mikä viittaa aktiinin osallistumisesta endosytoosiin. Rabiesviruksen ja VSV:n internalisaatioreitit ovat vastaavat, mutta ylipäätään virukset muokkaavat internalisaatioprosessia, sillä rabiesviruspartikkeleja soluun ottavien klatriinipäällisteisten solukalvopainanteiden morfologia on erilainen kuin niiden, joissa ei ole virusta.

Rabiesvirus on vuorovaikutuksessa tiheään polarisoidun epiteelin mikrovilluksen ja ei-polarisoitujen solujen filopodien kanssa, mutta se, miten näiden rakenteiden vuorovaikutus vaikuttaa infektiioon, on epäselvää. Kun virus sitoutuu filopodiin, se aiheuttaa nopean ja tarkasti säädellyn lateraalisen liikkeen solukalvolla. Aktiinitukiranka säätelee tätä internalisaatiota edeltävää liikettä ja se on riippuvainen funktionaalisesta myosiini II:sta. Lateraalisen liikkeen häiritseminen tai estäminen vähentää infektiota merkittävästi. Tämä on yksi esimerkki siitä, miten rabies virus kaappaa isännän mekanismeja tehostaakseen infektiota käyttämällä filopodien ominaisuutta kuljettaa ainetta sisälle soluun. (Lehmann ym., 2005.)

2.1.3 Isäntäsolussa tapahtuva kuljetus

Internalisaation jälkeen rabiesviruksen pitää päästä hermosolun solukeskukseen eli soomaan replikaatiota varten. Rabiesvirus käyttää muiden neurotrooppisten virusten tapaan aksonaalista kuljetusjärjestelmää edetessään kohti neuronien soomaa ja keskushermostoa (kuva 1). Kun partikkeleja siirretään kohti solun keskiosaa, esimerkiksi aksonipääteestä kohti soomaa, kuljetetaan niitä mikrotubulusten pluspäästä kohti miinuspäätä. Tätä kutsutaan retrogradiseksi aksonaaliseksi kuljetukseksi. Kun partikkeleja siirretään pois päin soomasta eli miinuspäästä kohti pluspäättä, on kyseessä anterogradinen aksonaalinen kuljetus. Retrogradisessa kuljetuksessa käytetään sytosolista dyneiinimoottoriproteiinia, ja anterogradisessa kuljetuksessa käytetään kinesiiniä lastin kuljetukseen mikrotubuluksia pitkin. Sytoplasminen dyneiini on suuri proteiini- ja RNA-kompleksi, joka muodostuu raskas-, väli-, kevyt väli-, ja kevyt ketjuista. Kahden raskasketjun muodostamat globulaaripäät kävelevät mikrotubulusta

pitkin ja kevyetketjut kiinnittyvät lastiin dynaktiinilla. Rabiesvirus hyödyntää tätä solun kuljetuslaitteistoa viruksen kuljetuksessa. (Qiu ym., 2012.)

Rabiesviruksen internalisaatio ja endosomaalinen kuljetus ovat samanlaisia kuin muillakin rhabdoviruksilla, kuten VSV:llä. CCV:n muodostumisessa oleellinen AP-2 toimii myös CCV:n klatriinin poistamisessa eli niin sanotussa uncoating-vaiheessa ja vesikkelin fuusioitumisessa aikaiseen endosomiin Rab5 proteiinin välityksellä (Semerdjieva ym., 2008). Ahmad ym. (2017) havaitsivat rabiesviruksen lokalisoituvan Rab5/EEA1 kanssa, mutta myös Rab7/LAMP1 kanssa 24 ja 48 tuntia infektion jälkeen. Samaisessa tutkimuksessa havaittiin Rab5 ja Rab7 määrän vähentämisen siRNA tekniikalla vähentävän infektiota, mikä viittaa näiden endosomaalisten proteiinien olevan tärkeitä viruksen neuronaaaliselle kuljetukselle ja infektiolle.

Internalisaation jälkeen virusta sisältävät vesikkelit fuusioituvat aikaisiin endosomeihin, minkä jälkeen kypsät, myöhäiset ja kierrättävät endosomit sekä lysosomit ohjaavat viruksen kuljetusta. Rab GTPaasi on membraanikuljetuksen keskeinen säätelijä. Rab rekrytoi effektoriproteiineja, kuten lajitteluadaptoreita, kiinnitystekijöitä, kinaaseja, fosfataaseja ja moottoriproteiineja (Eathiraj ym., 2005). Endosomaalisten osastojen lievä happamuus aikaansaa G-proteiinin säätelemän viruksen ja endosomin membraanifuusion, mikä johtaa viruksen nukleokapsidin poistoon ja genomien vapautumiseen. Fuusioituminen katsotaan tapahtuvan, kun virus siirretään aikaisiin endosomeihin optimaalisen pH:n ja G-proteiinin säätelemän fuusion aiheuttamana. (Gaudin ym., 1993.) Viruksen G-proteiinin piikkirakenteen konformaatio voi muuttua alhaisessa pH:ssa ainakin kolmeen eri muotoon eli natiivitilaan (N), aktivoituun hydrofobiseen tilaan (A) tai fuusiota inaktivoivaan konformaatioon (I). Kun viruksen ympäristön pH on 7, G-proteiini on fuusiota edeltävässä N tilassa. Hapan ympäristö (pH 5,8–6) aiheuttaa G-proteiinin muuttumisen A tilaan, jolloin hydrofobiset domeenit proteiinin päissä paljastuvat, mikä mahdollistaa G-proteiinin vuorovaikutuksen kohdemembraanin kanssa fuusion ensimmäisessä vaiheessa. Fuusion eteneminen edellyttää kuitenkin pH:n laskua. On osoitettu, että G-proteiinin tietyt aminohapot ovat kriittisiä pH:sta riippuvien konformaatiomuutosten välittämisessä ja siten membraanifuusion loppuunsaattamisessa. Kun pH muuttuu emäksisemmäksi, G-proteiini muuttuu I tilaan, mikä estää fuusioitumisen kuljetuksen aikana happamissa vesikkeleissä. pH:n aiheuttamat konformaatiomuutokset ovat myös käänteisiä ja tasapainotila eri tilojen välillä mahdollistaa tehokkaan viruksen kuljetuksen. (Gaudin ym., 1993, Gaudin ym., 1995.)

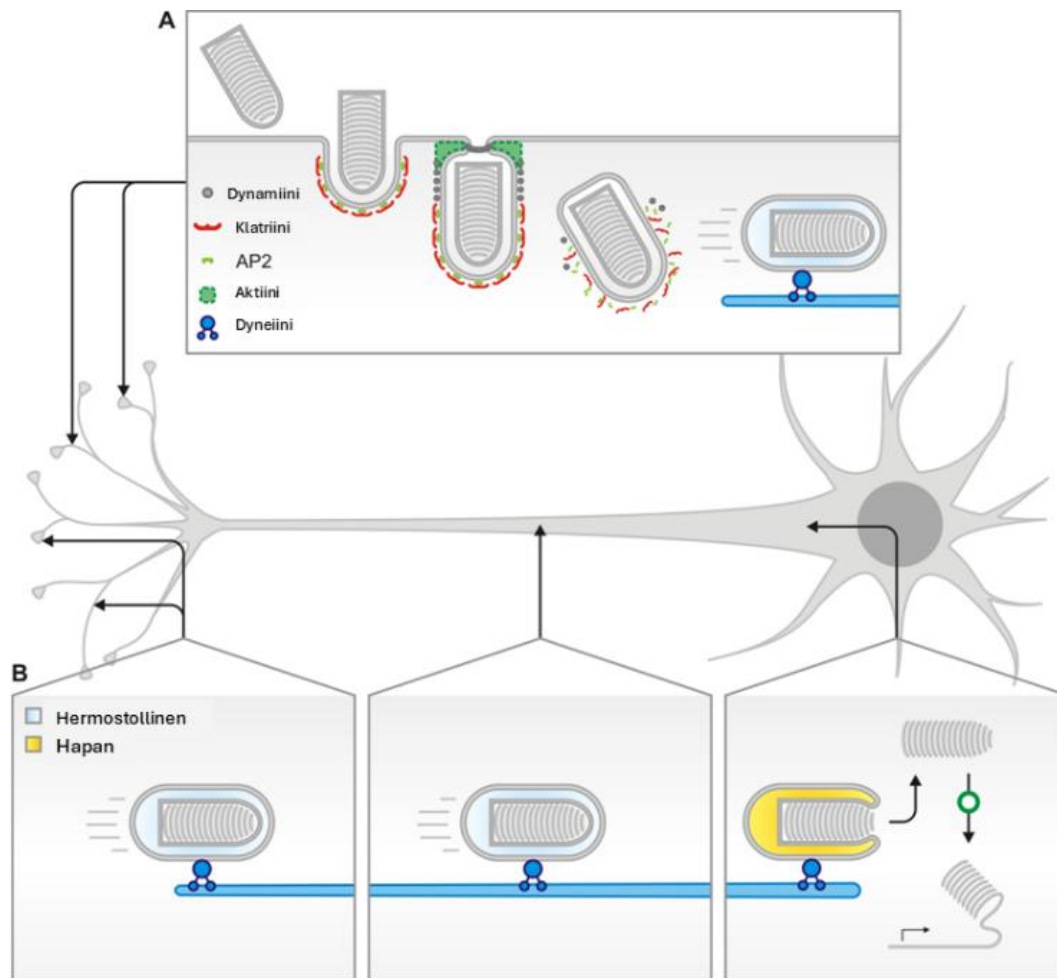
Rabiesviruksen fosfoproteiinin eli P-proteiinin ja dyneeniin kevytketju 8:n (engl. light chain 8, LC8) tiedetään olevan vuorovaikutuksessa toistensa kanssa, mutta on vielä epäselvää, onko tämä vuorovaikutus välttämätöntä rabiesviruksen solusisäiselle kuljetukselle ja siten sen patogeeniselle. Tan ym. (2007) tutkimuksessa generoitiin kahdenlaisia rekombinantteja rabiesviruksia, joissa toisissa oli LC8 sitoutumisalue (LC8-BD) ja toisten P-proteiinista se oli poistettu. LC8-BD:in poistaminen ei estänyt viruksen pääsemistä keskushermostoon, kun viruksilla infektoidiin aikuisia hiiriä, mutta se esti taudin puhkeamisen keskushermostossa. LC8-BD:n poisto vähensi merkittävästi viruksen transkriptiota ja replikaatiota keskushermostossa. Soluviljelmässä LC8-BD:in poisto ei vaikuttanut kokonaisten viruspartikkelien eli virionien tuotantoon. Vaikuttaa siis siltä, että LC8-BD:in poisto vaikuttaa primäärisen transkription eikä niinkään retrogradiseen kuljetukseen. Nämä tulokset osoittavat dyneeniin olevan osa rabiesviruksen aksonaalista kuljetusta mikrotubulusta pitkin kohti neuronien soomaa.

Rabiesviruksen kuljetus kohti soomaa alkaa, kun klatrinipäällysteinen vesikkeli fuusioituu aikaisen endosomin kanssa pian internalisaation jälkeen. Rabiesviruksen kuljetuksesta on esitetty kaksi eri mallia (kuva 1), joiden mukaan viruskapsidi kuljetetaan kiinnittyneenä moottoriproteiiniin sellaisenaan tai siten, että moottoriproteiini on kiinnittynyt viruksia sisältävään vesikkeliin. Myös rekombinantteja retroviruksia, joissa on rabiesviruksen G-proteiini, kuljetetaan retrogradisesti ja ne saavuttavat keskushermoston viruksen onnistuttua infektoimaan ääreishermoston soluja samalla tavalla kuin rabiesvirus (Mazarakis, 2001). Tämä tarkoittaa sitä, että rabiesviruksen G-proteiini on avaintekijä aksonaalissa kuljetuksessa ja että koko virus kuljetettaisiin vesikkelissä. Rabiesviruksen vesikkelikuljetusta puoltaa tutkimus, jossa rabiesviruksen kapsidi oli värjätty fluoresoivasti. Tutkimuksessa havaittiin, että virus kuljetettiin soomaan endosomaalisessa vesikkelissä (Klingen ym., 2008). Endosomaalisen kuljetuksen tarkka prosessi on kuitenkin vielä epäselvä. Koska kinesiini ja sytosolinen dyneiini käyttävät pääasiassa mikrotubuluksia liikkumiseen kuljettaessaan lastia sytoplasmassa, mikrotubulukset ovat todennäköisesti käytössä myös rabiesviruksen kuljetuksessa. Xun ym. (2015) tutkimus, jossa reaaliaikaisella kuvantamisella osoitettiin rabiesviruksen tunkeutuvan eläviin Vero-soluihin, tukee ajatusta siitä, että internalisoidun viruksen kuljetus on riippuvaista mikrotubuluksista.

Gluska ym. (2014) huomasivat, että rabiesvirus ja NGF (nerve growth factor) internalisoituvat yhtä nopeasti, mikä viittaisi niiden käyttävän melko samanlaisia koneistoja. Samassa tutkimuksessa osoitettiin, että rabiesvirus voi internalisoitua p75NTR:n kanssa ja tällöin se

myös kuljetetaan retrogradisesti aksonia pitkin pääasiassa p75NTR:n kanssa. Mielenkiintoista on, että virus kulkeutuu nopeammin kuin NGF, mikä viittaisi siihen, että rabiesvirus ei vain kaappaa kuljetuskoneistoa, vaan se pystyy myös muokkaamaan sitä. Rabiesviruksen ja NGF yhteiskuljetuksesta on tunnistettavissa kaksi kuljetustyyppiä, hidas ja nopea, mikä kertoo siitä, että kuljetuksen nopeutta voidaan säädellä. Vaikuttaisikin siltä, että rabiesvirus tehostaa kuljetuksen nopeutta. Lisäksi tutkimuksessa todettiin, että p75NTR:sta riippuvainen kuljetus on nopeampaa ja ohjatumpaa kuin p75NTR:sta riippumaton kuljetus. Nopeammalle kuljetukselle on ominaista hetkelliset nopeuden kasvut ja vähentyneet lyhyiden pysähdysten määrä. Rabiesviruksen muiden reseptorien oletetaan käyttäytyvän samalla tavalla ja osallistuvan retrogradiseen aksonaaliseen kuljetukseen viruksen ollessa endosomin sisällä. Eli rabiesviruksen G-proteiini ei vain tunnista solukalvolla olevia proteiineja vaan myös hyödyntää niiden endosomaalisia kuljetusreittejä.

Koska G-proteiini on kuljetuksen ajan vesikkelin sisällä, on epäselvää, miten se reagoi moottorikompleksin kanssa. Koska G-proteiini ohjaa vesikkelin muodostumista, vesikkelin fysiologia määrittäne kuljetusmenetelmän. Tätä ei kuitenkaan ole pystytty todistamaan. Internalisaation jälkeen, kun virusta kuljetetaan kohti soomaa transkriptiota ja replikaatiota varten, rabiesvirus käyttää retrogradista aksonaalista kuljetusta. Anterogradista aksonaalista kuljetusta rabiesvirus käyttää replikaation jälkeen, kun viruspartikkeleja kuljetetaan kohti dendriittejä, joista virus vapautuu esimerkiksi synapsiin ja pääsee infektoimaan seuraavan solun.



Kuva 1. Malli rabiesviruksen G-proteiiniriippuvaisesta internalisaatioreitistä hermosoluun ääreishermostossa. Rabiesviruksen G-proteiinin kiinnittyminen hermosolun reseptoriin synapsissa tai neuriittikalvossa johtaa klatrinivälitteiseen endosytoosiin ja viruksen kuljetukseen mikrotubulusten välityksellä endosomaalisissa osastoissa. A. Rhabdovirukset internalisoidaan endosomeihin, jotka ovat vain osittain päällystetty klatriinilla, jolloin aktiinia tarvitaan endosomin viimeistelyyn ja irrottamiseen solukalvosta. B. Internalisaation jälkeen virusta sisältävät endosomit kulkevat aksonin poikki retrograadisesti mikrotubulusta pitkin. Endosomit happamoituvat saavuttaessaan sooman vapauttaen viruksen perintöaineen hermosolun sytoplasmaan, jossa se replikoituu. Muokattu (Piccinotti & Whelan, 2016.)

2.2 Replikaatio, viruspartikkelien kokoaminen ja solusta vapautuminen

Rabiesviruksen genomi on kierteinen ribonukleoproteiini (engl. helical ribonucleoprotein complex, RNP), jonka yksijuosteinen negatiivinen RNA-juoste on tiukasti kiinnittynyt viruksen nukleoproteiiniin. Rabiesviruksen ja VSV:n genomi koostuu viidestä proteiinista koodaavasta geenistä. Nämä proteiinit ovat nukleoproteiini (N), fosfoproteiini (P), matriisiproteiini (M), glykoproteiini (G), ja viraali RNA-polymeraasi (L). Geenit ovat RNA-

juosteessa järjestyksessä 3'-N-P-M-G-L-5'. Rabiesviruksen RNA tarvitsee käänteiskopioijan eli RNA-polymeraasin ja muita viruksen proteiineja replikoitumiseen. Aluksi negatiivisäikeinen yksijuosteinen RNA-genomi kopioidaan positiiviseksi RNA:ksi, joka toimii mallina uusien virusosien tuotannolle. Tämä positiivinen RNA voidaan sitten replikoida takaisin negatiiviseksi RNA:ksi uusien virionien kokoamiseksi. Proteiinit valmistetaan samalla, kun viruksen RNA replikoituu. Viruksen geenien koodaamat proteiinit syntetisoidaan isäntäsolun ribosomeilla. Replikaation ja proteiinisynteesin jälkeen RNA sekä viruksen rakenneproteiinit kerääntyvät soluliman eri osiin, yleensä solulimakalvostoon, muodostaen uusia virioneja.

Aksonaalisen kuljetuksen aikana viruksen G-proteiinissa tapahtuu konformaatiomuutoksia alhaisen pH:n vaikutuksesta, mikä mahdollistaa viruksen fuusion endosomin kalvon kanssa, jolloin viruksen genomi pääsee vapautumaan solulimaan. Kun nukleokapsidi on vapautettu sytoplasmaan, rabiesvirus kaappaa solun toimintoja indusoidakseen inkluusiokappaleiden muodostuksen (Lahaye ym., 2009). Inkluusiokappaleet ovat transkription ja replikaation tapahtumapaikka rabiesviruksen infektiossa. Näitä rakenteita esiintyy pian infektion jälkeen. Kun viruksen mRNA on transkriptoitu inkluusiokappaleessa, mRNA siirtyy hermosolun sytoplasman ribosomeille translaatiota varten. Samassa inkluusiokappaleessa transkription ohella tapahtuu viruksen genomien replikaatio, kun L-polymeraasi tekee komplementti-RNA:n ja kopioi siitä uusia virusgenomeja. (Heinrich ym., 2010.) Rabiesviruksen replikaatio näyttäisi siis tapahtuvan negrikappaleissa, jotka ovat sytoplasmisia inkluusiokappaleita, joita tyypillisesti löytyy rabiesviruksen infektoimista soluista (Lahaye ym., 2009). Niitä voidaan käyttää diagnostisina markkereina.

Rabiesviruksen geenien ilmentyminen ja genomien transkriptio on tarkasti säädeltyä ja se eroaa joiltain osin muista rhabdoviruksista, myös VSV:stä. VSV pyrkii tuottamaan mahdollisimman paljon uusia viruksia mahdollisimman pienessä ajassa. Rabiesvirus sen sijaan välttää isäntäsolun vahingoittamista säilyttääkseen solun toiminnot, joita virus käyttää hyväkseen. Suuri määrä virusproteiineja, etenkin glykoproteiineja, aiheuttavat yleensä voimakkaan immuunivasteen, joka johtaa solun apoptoosiin ja siten infektion häiriintymiseen. G-proteiinit ovat pääasiallisia antigeenejä, jotka aiheuttavat virusta neutralisoivien ja suojaavien vasta-aineiden tuotannon (Faber ym., 2002). Rabiesvirus on kehittänyt säätelymekanismeja tuottaakseen viruksen osia optimaalisia määriä, eli viruksien tuotto on tehokasta, mutta viraalipartikkelien määrä on riittävän alhainen, jolloin immuunipuolustus ei havaitse infektiota eikä isäntäsolun elintärkeät toiminnot häiriinny.

Isäntäsolun sytosoliin vapautettu tiivistynyt ja kiertynyt RNP:n muoto muutetaan synteettisesti aktiiviseen muotoon. Negatiivisen säikeen RNA ei toimi suoraan mallina proteiinien valmistukselle, vaan se kopioidaan ensin positiiviseksi säikeeksi eli mRNA:ksi, ennen kuin proteiinit voidaan syntetisoida. Nukleotidien määrä kunkin geenin välisessä alueessa (engl. intergenic region, IGR) säätelee geenien luentaa (Finke ym., 2000.) IGR:t rabiesviruksen genomissa ovat kooltaan 2,5,5, ja 24 nukleotidiä pitkiä (Conzelmann ym., 1990). IGR:en pituudet vaikuttavat alavirrassa olevien geenien ekspression määrään. IGR-jaksojen pituuksien vaihto viruksen genomissa muuttaa mRNA:n ja syntetisoidujen proteiinien määriä. Translaation uudelleenkäynnistys ei aina onnistu kunkin geeniliitoksen kohdalla, joten transkriptio on hiljennetty 3' päästä 5' päin suuntaan. Täten geenien järjestys osittain määrittää kunkin geenin mRNA:n määrän. (Finke ym., 2000.)

Leader RNA eli leRNA säätelee transkriptiota, sillä N-proteiini tarttuu siihen paljon voimakkaammin kuin muihin viruksen mRNA:hin, mikä viittaa siihen, että leRNA:ssa on signaali kapseloitumiselle (Yang ym., 1998). Liukoista N-proteiinia on alkuun rajallisesti, jolloin se fosforyloituu ja P-proteiini sitoutuu siihen muodostaen N-P-kompleksin, johon polymeraasi ja RNA kiinnittyvät lisäten transkriptiota. Lisääntyneen transkription ja translaation seurauksena N-proteiinin määrä kasvaa ja se defosforyloituu ja alkaa kapseloida leRNA:ta. Samalla P-proteiini sitoutuneena L-polymeraasiin alkaa replikoida kokonaista virusgenomia syntetisoiden positiivista RNA:ta, jota liukoinen N-proteiini kapseloi kotranskriptiivisesti muodosten antigenomin. Antigenomi käänteiskopioidaan negatiiviseksi jälkeläis-RNA:ksi, joka kapseloidaan yhtäläisesti samaan aikaan synteetin aikana. N-proteiinin dekapeloituminen siis lisää replikaatiota vähentäen transkriptiota. Genomin fosforyloimattoman nukleoproteiinin aikaansaama kapselointi häiritsee transkriptiota, joten kapselointi ennen transkriptiota tulee estää (Conzelmann & Schnell, 1994).

Muodostunut RNA-N-kompleksi sekä P-proteiini ja L-polymeraasi muodostavat aktiivisen sytoplasmisen RNP-kompleksin ja RNP-ytimen uusiin viruspartikkeleihin. RNP-kompleksi pystyy aloittamaan viraalin RNA-transkription ja replikaation. On mahdollista, että pelkkä N-proteiini vaikuttaa RNA-transkription vaihtumiseen replikaatioon kapseloimalla leRNA:ta. Kun N-proteiinia on tarpeeksi saatavilla, leRNA kapseloituu, mikä lisää replikaatiota ja vähentää transkriptiota. Kun N-proteiinia ilmenee yksin, se sitoutuu vahvemmin RNA-juosteeseen. Tämä ilmiö vähenee, kun N-proteiini ilmenee yhdessä P-proteiinin kanssa. Lisäksi P-proteiini estää N-proteiinin fosforylaatiota kaseinikinaasi II:n välityksellä (Wu ym., 2003). On todennäköistä, että N-P-proteiinikompleksi kiinnittyy tarkasti vain viruksen RNA:han, mikä

aiheuttaa N-proteiinin konformaatiomuutoksen, mikä mahdollistaa sen fosforylaation. Täten N-P-proteiinikompleksien määrä vaikuttaa viruksen replikaation lisääntymiseen ja transkription vähenemiseen. (Toriumi & Kawai, 2004). Kuitenkin fosforylaation esto N-proteiinissa estää replikaation ja transkription, mikä viittaisi näiden prosessien olevan yhteydessä (Wu ym., 2002).

Vapaan RNA:n sijasta RNP:t tarjoavat templaatin geeniekspressiolle ja replikaatiolle. L- ja P-proteiineista koostuva polymeerasikompleksi aloittaa transkription 3' päästä, jolloin mRNA:ta syntetoidaan. Uudet RNA-genomit kapseloidaan samanaikaisesti synteessin aikana, mikä tarkoittaa RNP:n replikaation olevan riippuvainen N-proteiinin saatavuudesta uuden RNA:n kapseloinnissa (Patton ym., 1984). Rabiesviruksen P-proteiini on L-polymeraasin välttämätön kofaktori ja lisäksi sitä vaaditaan myös RNA:n kapselointiin eli se on keskeinen osa sekä transkriptiossa että replikaatiossa (Horikami ym., 1992). Solusta vapautumisen yhteydessä RNP:t pakataan kuoreen, joka sisältää M-proteiinin sisemmän kerroksen ja transmembraaniset piikkiproteiinit (Mebatsion ym., 1999).

Muiden rhabdovirusten M-proteiinien tapaan rabiesviruksen M-proteiini säätelee transkriptiota ja replikaatiota. Rekombinantin rabiesviruksen M-proteiinin heterologinen ilmentyminen lisää viruksen transkriptiota, mutta ei replikaatiota. M-proteiinin ilmentymisen heikentäminen rekombinantissa rabiesviruksessa johtaa viruksen tuotantoon, jolla on korkea transkriptionopeus. (Finke ym., 2003.) Koska rabiesviruksesta peräisin olevat mRNA:t eivät eroa isäntäsolun mRNA:sta, rabiesviruksen M-proteiinin korkea pitoisuus vaikuttaa paitsi viruksen transkriptioon myös virusproteiinien translaatioon. Tämän seurauksena myös isäntäsolun proteiinisynteesi voi häiriintyä, mikä voi olla haitallista rabiesviruksen infektion säätelyssä, jossa se pyrkii säilyttämään isäntäsolun normaalin toiminnan ja täten välttämään immuunijärjestelmää havaitsemasta infektiota.

Rabiesviruksen elinkierron viimeiset vaiheet ovat viruksen kokoaminen ja vapautus solusta. On epäselvää, miten kapsidi kuljetetaan membraanille solusta vapautusta varten, mutta tiedetään, että rabiesviruksen M-proteiini ja G-proteiini ovat tässä avainasemassa. Virus pystyy vapautumaan solusta myös ilman G-proteiinia, mutta prosessi on 30 kertaisesti tehottomampi kuin viruksilla, joilla on G-proteiini (Mebatsion ym., 1996). Ilman M-proteiinia viruksen infektiokykyinen määrä eli virustiitteri on 500 000 kertaisesti suurempi, vaikka viruksen proteiinien ilmentymiseen se ei vaikuta juurikaan (Mebatsion ym., 1999). Rabiesviruksen M-proteiini on solusta vapautumisen lisäksi tärkeä myös RNP:n replikaation ja RNA:n synteessin

tasapainon säätelyssä (Finke ym., 2003). M-proteiini vaikuttaa siihen, ettei proteiineja syntetoida liikaa, ja että RNA:ta ja viruksen proteiineja on sopivasti saatavilla viruksen osien tuottoa varten. M-proteiinin monet tehtävät virionien tuotannossa demonstroii rabiesviruksen proteiinien osallistumista moniin viruksen toimintoihin ja sitä, kuinka tarkkaan virus säätelee prosessejaan mahdollistaakseen onnistuneen viruksen replikaatiosyklin.

3 RABIESVIRUSINFEKTION AIHEUTTAMA IMMUNOSUPPRESSIO

3.1 *Apoptoosi*

Rabiesvirus pyrkii välttämään isännän puolustuksen piiloutumalla viruksen infektoimiin soluihin. Rabiesvirukset kuten kaikki neurotrooppiset virukset, hyötyvät siitä, että edetessään keskushermostoon ne lisääntyvät ympäristössä, joka on immuunipuolustuksen kannalta edullinen virukselle. Virus ikään kuin piiloutuu hermosoluihin välttääkseen isännän puolustuksen.

Immuunipuolustus koostuu synnynnäisestä ja hankitusta immuniteetista. Ensisijainen puolustus virusinfektiota vastaan on synnynnäinen immuunivaste, joka aktivoituu hahmontunnistusreseptorien, kuten TLR:ien (engl. Toll-like receptors) sekä RNA-helikaasien käynnistämien viestiketjujen myötä, mikä johtaa tyypin I interferonien (engl. interferons, IFN) eli IFN α ja IFN β eritykseen. Monet virukset ovat kehittäneet mekanismeja välttääkseen tämän immuunivasteen. (Fensterl ja Sen 2009.) Synnynnäinen immuunivaste käynnistyy nopeasti ja siihen kuuluu sytokiinien, kuten IFN lisäksi tuumorinekroositekijän (TNF) ja erilaisten effektorisolujen, kuten makrofagien, luonnollisten tappajasolujen (engl. natural killer, NK) ja neutrofiilien toiminta. Apoptoosi eli ohjelmoitu solukuolema on immuunipuolustuksen keino estää viruksen replikaatiota ja sen leviämistä elimistössä eliminoimalla infektoidut solut. Jotkut virukset lisääntyvät nopeasti solussa ja leviävät eteenpäin ennen kuin immuunipuolustus tuhoaa solun apoptoosilla. Useat autoimmuunisairautta aiheuttavat virukset, kuten HIV, käynnistävät itse apoptoosin välttääkseen immuunipuolustuksen.

Rabiesviruksella on todennäköisesti sekä apoptoosia estäviä, että sitä lisääviä ominaisuuksia. Rabiesvirus pyrkii välttämään apoptoosin käynnistymistä infektion alkuvaiheessa, jotta se ehtii leviämään keskushermostoon asti. Kuten aikaisemmin mainittu, rabiesvirus säätelee solun replikaatio- ja transkriptiokoneiston toimintaa siten, että viruspartikkeleja, etenkin virusneutralisoivien vasta-aineiden tuotannon aiheuttavaa G-proteiinia tehdään vähän, jolloin

isännän immuunipuolustus ei tunnista infektoituneita soluja. Rabiesvirus pystyy myös säätelemään useita apoptoosireittejä edukseen. Rabiesviruksen G-proteiinin aminohapposekvenssi määrittää pitkälti apoptoosin käynnistämisen (Préhaud ym., 2003). On epäselvää, mihin tämä perustuu, mutta vaihtoehtoja ovat proteiinien stabiilisuuserot, taipumus väärälaiseen laskostumiseen ja solulimakalvoston stressi.

Apoptoosin merkitys on suhteellisen pieni ihmisen rabiesvirustartunnan eliminaatiossa (Baloul & Lafon, 2003). On huomattu, että heikennetyt rabiesviruskannat, kuten esimerkiksi rokotuskannat, aiheuttavat enemmän apoptoosia kuin patogeeniset rabiesviruskannat, jotka välttävät apoptoosia ja aiheuttavat neuronien toimintahäiriöitä. Dhingra ym. (2007) osoittivat, että heikennetty rabiesviruskanta lisäsi soluissa pro-apoptoottisten proteiinien määrää, kun taas patogeeninen rabiesviruskanta vaikutti ionitasapainoon ja synaptisten vesikkeliin kiinnittymiseen ja fuusioon. Eli patogeeninen rabiesvirus ei aiheuttanut apoptoosia ja apoptoosi itseasiassa vähensi viruksen patogeenisyyttä.

3.1.1 Neuronien apoptoosi isännän puolustusmekanismina

Apoptoosi on isännän immuunipuolustuksen mekanismi virusinfektiota vastaan, mutta virus voi myös hyväksikäyttää sitä välttääkseen muita immuunipuolustuksen vasteita. Ihmisillä tehdyissä tutkimuksissa ilmeni, ettei neuronien apoptoosi ole tärkeä tekijä rabiesviruksen infektiossa (Jackson ym., 2008) ja samoja tuloksia saatiin lepakoilla tehdyissä tutkimuksissa (Reid ja Jackson, 2001). Hiirissä tehdyssä kokeessa ilmeni neuronien apoptoosia, mutta on syytä huomioda, että kokeessa käytettiin imetysikäisiä hiiriä, joiden neuronit eivät ole vielä kehittyneet täydellisesti (Jackson & Park, 1998). Vastaavia tuloksia oli saatu muissakin tutkimuksissa, joissa oli käytetty joko imetysikäisiä tai immuuniheikennettyjä hiiriä. Li ym. (2005) osoittivat tutkimuksessaan, että patogeenisen juosteen infektoimat hermosolut eivät juurikaan apoptoidu, vaan niissä on toimintahäiriöitä toisin kuin vaimennetun juosteen aiheuttamassa infektiossa. Patogeeninen rabiesvirus aiheuttaa hermosolujen toimintahäiriöitä, mikä johtaa aksonien ja dendriittien pirstoutumiseen ja turpoamiseen, eli muutoksiin, jotka usein edeltävät aksonin tai dendriitin surkastumista. Nämä morfologiset muutokset selittävät taudin alkuvaiheen kliiniset oireet. (Scott ym., 2008.) Neuronaaliset toimintahäiriöt aiheutuvat rabiesviruksen P-proteiinin indusoimista mitokondrioiden toimintahäiriöistä (Kammouni ym., 2015). Ero patogeenisen ja vaimennetun rabiesviruksen välillä on apoptoosin aiheuttaminen isännän puolustusmekanismina tai neuronaalisten toimintahäiriöiden aiheuttaminen, mitkä selittävät kliinisten oireiden ilmentymistä. Rabiesviruksen käynnistämään apoptoosiin on yhdistetty ainakin G- ja M-proteiinit (Faber ym., 2002).

Yksi rabiesviruksen patogeenisyyttä lisäävä tekijä on sen kyky välttää apoptoosia. Heikommat rabiesviruskannat aiheuttavat enemmän apoptoosia (Morimoto ym., 1999). Faber ym. (2002) osoittivat, että paljon G-proteiinia ilmentäneen rabiesvirusrekombinantin patogeenisuus heikentyi hiiressä perifeerisen infektion jälkeen, mikä viittaa siihen, että G-proteiinin suuri määrä lisää apoptoosia. Lisäksi lisääntynyt apoptoosi imetysikäisten hiirien aivoissa johtunee rabiesviruksen korkeammasta neurovirulenssista nuoremmista hiirissä (Jackson & Park, 1998). Rabiesvirukselle on tärkeämpää välttää apoptoosia ääreishermostossa, sillä jos infektiota tuhoaisi primaariset infektoidut solut ja solujen välisen kuljetusmekanismin, solujen apoptoosi voisi estää viruksen pääsyn keskushermostoon.

3.1.2 Apoptoosimekanismin hyödyntäminen infektiossa

Rabiesviruksen kannalta on tärkeää, että elimistön solut säilyvät hengissä sen lisääntymissyklin ja elimistöön leviämisen alkuvaiheessa, joten apoptoosin välttäminen on tässä vaiheessa hyödyllistä. Rabiesvirus pyrkiikin säilyttämään neuronit tehokasta replikaatiota varten estämällä immuunimolekyylien toimintaa. Toisaalta apoptoosi voi olla virukselle hyödyllinen, ja rabiesviruksen tiedetäänkin indusoivan apoptoosia makrofageissa, oligodendrosyyteissä ja T-soluissa (Baloul & Lafon, 2003). Etenkin infektion alkuvaiheessa rabiesvirus estää adaptiivisen immuunivasteen käynnistymisen aktivoimalla immuunipuolustuksen solujen apoptoosin, jolloin elimistö ei tunnista virusta.

(Baloul & Lafon, 2003) osoittivat tutkimuksessaan neuroinvasiivisella RV-kannalla (CVS) ja heikennetyn patogeenisuuden omaavalla kannalla (PV) neuroinvasiivisuuden johtuvan tekijästä: neurotrooppinen RV välttää hermosolujen solukuoleman, infektoituneeseen hermoseen vaeltavat ”suojaavat” T-solut kuolevat apoptoottisesti, ja lopuksi infektoituneen hermoston tulehdus on rajoitettu. Heikennetty kanta saadaan poistettua T-soluilla keskushermostosta rabiesviruksen antigeenistä huolimatta, kun taas tappava kanta tuhoaa T-soluja ja pystyy siten replikoitumaan ja leviämään keskushermostossa. Baloulin ja Lafonin tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että hermosoluverkon säilyminen, tulehduksen rajoittaminen ja infektion seurauksena keskushermostoon tunkeutuvien T-solujen tuhoutuminen ovat ratkaisevia tapahtumia rabiesviruksen neuroinvasiolle ja myös siirtymiselle toiseen eläimeen.

Heikennetty rabiesvirus pystyy indusoimaan kaspasi-riippuvaista ja kaspasi-riippumatonta apoptoosia, joihin molempiin tarvitaan apoptoosia indusioivia tekijöitä (engl. apoptosis-inducing factor, AIF). Apoptoosin induktiotavasta riippumatta solutason morfologiset

muutokset ja niitä säätelevät proteiinit ovat samanlaiset. Kaspasi-riippuvainen ja kaspasi-riippumaton apoptoosi voidaan estää Bcl-2:n yli-ilmentymisellä. Bcl-2:n onkin osoitettu estävän hyvin monenlaisten ärsykkeiden aiheuttamaa apoptoosia, myös virusten indusoimaa apoptoosia (Thoulouze ym., 2003). On vielä epäselvää millä mekanismeilla patogeeninen rabiesvirus estää apoptoosin käynnistytksen, mutta on viitteitä siitä, että virus häiritsee pro-apoptoottisia tekijöitä ja säätelee myös omien geenien ekspressiota. Näin virus säilyttää hermoverkon eheyden, mikä on tärkeää viruksen lisääntymisen ja leviämisen kannalta.

Myös viruksen M- ja P-proteiinien on osoitettu vaikuttavan apoptoosiin. Kassiksen ym. (2004) tutkimuksessa, jossa neuroblastoomasolut infektoitiin lyssaviruksella, havaittiin TNF:n kaltaisen apoptoosia indusoivan ligandin (engl. TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) välittävän apoptoosisignaalia. Viruksen kapsidin hajoaminen ja genomin vapautuminen (niin sanottu uncoating-tapahtuma) sekä replikaatio ovat oleellisia apoptoosin käynnistämiseksi. Kun neuroblastoomasolut transfektoitiin M-proteiinia koodaavalla plasmidilla, ilmentyvä M-proteiini pystyi käynnistämään TRAILin kaltaisia signaalireittejä. Tämä viittaa siihen, että M-proteiini on aikaisessa vaiheessa osa TRAIL-säädellyn apoptoosin käynnistystä. P-proteiini tarttuu suoraan dyneiinin LC8:aan (engl. dynein light chain 8) (Jacob ym., 2000), joka todennäköisesti edesauttaa Bcl2:en apoptoosivastaista toimintaa. Tämä voitaisiin saavuttaa vaikuttamalla LC8:an toiseen funktioon eli Bcl-2-perheen pro-apoptoottisen jäsenen Bimin sitoutumiseen. Bim-LC8-kompleksit valvovat solujen normaalia toimintaa (Puthalakath ym., 1999). Solunsisäisen tukirangan uudelleenjärjestäytymisen myötä Bim-LC8-kompleksit vapautuvat, ja nämä kompleksit estävät Bcl2:n anti-apoptoottisen aktiivisuuden. Koska rabiesviruksen P-proteiinin ja Bim-proteiinien sitoutumistavat LC8:aan ovat identtiset, Bimin vuorovaikutus LC8:n kanssa voisi olla syrjäytetty infektoiduissa soluissa, mikä on mahdollinen mekanismi, jolla rabiesvirus voi vaikuttaa stressin aiheuttamaan apoptoosin käynnistymiseen. Kun otetaan huomioon apoptoosin käynnistämisen ratkaiseva merkitys viruspatogeneesissä (Morimoto ym., 1999), tämä voisi olla mekanismi, jolla vaikutetaan apoptoosin käynnistymiseen virusinfektion aiheuttaman soluntukirangan uudelleenjärjestäytymisen myötä. Vaikka P-proteiinin ja DLC1:n välisen interaktion vaikutuksesta apoptoosin säätelyyn ei toistaiseksi ole kokeellista näyttöä, tämä hypoteesi on mielenkiintoinen vaihtoehto P-proteiinin ja DLC1:n vuorovaikutuksen merkityksen ymmärtämiseksi viruspatogeneesissä. Ne voisivat myös selittää sellaisten rabiesviruskantojen heikentyneen patogeneisyyden, joilta puuttuu kyky sitoutua DLC1:een.

T-lymfosyytit tappavat kohdesolunsa aktivoimalla apoptoosin Fas:n ja sen ligandin, FasL:n välityksellä. FasL ilmentyy keskushermoston liikehermoissa ja kun Fas-reseptoria ilmentävät T-solut kiinnittyvät FasL:ään, T-solujen apoptoosi käynnistyy, jolloin haitallinen immuunivaste rajoittuu. (Flügel ym., 2000.) On osoitettu, että erittäin patogeenisissä rabiesvirustartunnoissa FasL ilmentyminen lisääntyy, jolloin virus leviää tehokkaammin keskushermostossa. Kuitenkin vähemmän patogeenisissä rabiesvirustartunnoissa FasL määrä kasvaa vasta, kun virus on saatu poistettua aivoista, mikä viittaa siihen, että FasL toimii normaalisti suojelemaan aivoja niiden palautuessa eikä ole osa viruksen immuunipuolustuksen välttämistä infektion aikana. Kun infektiota on saatu hallintaan, FasL toimii välttääkseen turhaa vauriota aivoissa. (Baloul ym., 2004.)

PD-1 eli programmed cell death-1-reitti on yksi mahdollinen mekanismi, jolla rabiesvirus estää T-soluja tappamasta infektoituja hermosoluja. PD-1 on T-solujen pinnalla oleva inhibitorinen molekyyli, joka kiinnittyessään B7-H1 ligandiin vaimentaa T-solujen aktiivisuutta. Rabiesvirusinfektio lisää B7-H1 ilmentymistä infektion alkuvaiheessa, mikä vaimentaa T-solujen vastetta (Lafon ym., 2008). Tämän osoitettiin pidentävän elinaikaa hiirillä, jotka eivät ilmennä B7-H1:tä. Lisäksi villityypin hiiriin verrattuna B7-H1 puutteisille hiirille ei myöskään kehittynyt aivokuumeita. (Lafon ym., 2008.)

Joissain tilanteissa rabiesvirukselle on hyödyllistä indusoida apoptoosia. Usea kaspaasi-riippuvainen apoptoosinsäätelijä on osa rabiesviruksen aiheuttamaa apoptoosia. Apoptoosin estäminen on vaikeaa, sillä se voidaan käynnistää monen eri reitin kautta. Yksi infektiolle tärkeä proteiini on Bax, joka on osa proteiiniiryhmää, jotka säätelevät apoptoosia. Bax edesauttaa apoptoosin käynnistymistä, kun taas Bcl-2 inhiboi sitä. Bax:in ja Bcl-2 välinen tasapaino on tärkeä määrittämään, käynnistyykö apoptoosi. Rabiesvirusinfektio nostaa Bax:in määrää samalla kun Bcl-2:en määrä säilyy samana, mikä johtaa apoptoosiin. Vaikka Bax onkin tärkeä rabiesviruksen aiheuttamalle apoptoosille, se ei ole välttämätön viitaten siihen, että on myös muita apoptoosia sääteleviä proteiineja, jotka ovat osana rabiesviruksen infektiota (Jackson, 1999). Kaspaasi-3, ja -8 määrä kasvaa rabiesviruksen infektiossa tarkoittaen rabiesviruksen indusoivan apoptoosia ainakin tämän reitin kautta (Sarmiento ym., 2006). Tutkimus osoittaa myös, että apoptoosin toiminnassa on eroja eri ikäisissä isännissä, sillä nuoremmat hiiret ovat herkempiä tietyille apoptoosireiteille, sillä niiden neuronit eivät ole vielä kehittyneet täydellisesti.

3.2 *Muita rabiesviruksen patogeneesiin vaikuttavia tekijöitä*

Rabiesvirusinfektion aikana monia immuunipuolustuksen geenejä ilmennetään eri tavalla keskushermostossa hiirimalleissa tehdyssä kokeessa, jossa verrattiin rabiesviruksella infektoiduja hiiriä kontrollihiiriin. Suurin osa näistä geeneistä liittyvät synnynnäiseen immunitettiin ja nämä moduloidut geenit voivat olla osa rabiesviruksen patogeneesiä keskushermostossa. Kyseisillä geeneillä saattaa olla suojaava vaikutus infektiota vastaan. (Zhao ym., 2011.)

Typpioksidin on normaalissa määrässä tärkeä molekyyli homeostaattisten toimintojen kannalta ja sillä on etenkin tärkeä tehtävä keskushermostossa hormonien erityksessä, uni-valve-syklissä, ruumiinlämmön sekä ruokahalun säätelyssä ja synaptisessa plastisuudessa. Typpioksidin on mukana myös immuunipuolustuksessa ja muissa tärkeissä toiminnoissa elimistössä (Calabrese ym., 2007). Typpioksidia tulee olla kudoksissa vain pieniä määriä ja oikeanlaisen toiminnan kannalta sopivissa määrissä sitä tuottaa konstitutiivinen typpioksidisyntaasi eli cNOS (Ubol, Sukwattanapan, ym., 2001). Indusoiva typpioksidisyntaasi eli iNOS voi tuottaa typpioksidia myös suurissa normaalin toiminnan kannalta haitallisissa määrissä. iNOS:in ilmentymistä aktivoi erilaiset stimulut, kuten endotoksiinit ja tulehdukselliset sytokiinit (Ubol, Sukwattanapan, ym., 2001). Typpioksidin on todettu osallistuvan rabiesviruksen vastaiseen immuunivasteeseen, mutta lisäksi myös sen patogeneesiin. Kokeessa säädelty, solujen normaalia toimintaa ylläpitävä, typpioksidin pitoisuus esti viruksen replikaatiota ja proteiinisynteesiä *in vitro* inhiboimalla transkriptiota (Ubol, Hiriote, ym., 2001). Rabiesvirus on sopeutunut stimuloimaan suuremman määrän typpioksidia infektoiduissa neuroneissa ja makrofageissa verrattuna homeostaattiseen määrään (Hooper ym., 1995). Korkean typpioksidin pitoisuuden sivuvaikutuksen on yhdistetty aivokuumeen kehittymiseen (Hooper ym., 1995) ja muiden kuin hermoston elinten, kuten sydämen ja keuhkojen, oireiluun rabiesvirustartunnasta (Liao ym., 2012), mikä selittää miten rabiesviruksen infektio johtaa isännän kuolemaan. Rabiesvirus käynnistää iNOS:in tuotannon neuroneissa ja makrofageissa, mikä nostaa typpioksidin määrää isännälle haitalliselle tasolle parantaen viruksen patogeenisyyttä ja aiheuttaen kliinisiä oireita (Ubol, Sukwattanapan, ym., 2001). Hiirissä tehdyssä kokeessa iNOS:in inhibointi pidensi rabiesviruksella infektoidujen hiirien elinaikaa ja vaikutus nähtiin viruksen replikaatiossa hidastaen sitä kuten myös infektoidujen solujen apoptoosin käynnistymisessä (Ubol, Sukwattanapan, ym., 2001). iNOS:in suuri ilmenemismäärä neuroneissa ja mikrogliaassa johtaa oksidatiivisen stressin kautta aksonien turpoamiseen ja

patologiaan, millä on korrelaatiota oireiden, kuten proteiinien heikentyneen aksonaalisen kuljetuksen ja aksonaalisen rappeutumisen alkamisen kanssa (Jackson ym., 2010).

Patogeeniset rabiesviruskannat pystyvät aiheuttamaan mitokondriaalisia toimintahäiriötä neuroneissa, mikä johtuu aksonien ja dendriittien turpoamisesta (Scott ym., 2008). Mitokondriaalisten respiratoristen ketjukompleksien I ja IV toiminta on lisääntynyttä CVS infektoiduissa neuroneissa. Kuitenkin vain kompleksin I lisääntynyt aktiivisuus korreloi eri hermosolutyypin infektioalttiuden kanssa. CVS infektio aiheuttaa lisääntynyttä mitokondrion kalvon potentiaalia, mikä lisää reaktiivisten happilajien (engl. reactive oxygen species, ROS) valmistusta. Tämä on todennäköisesti myös aiheuttaja ATP määrän romahdukselle infektoiduissa soluissa. (Alandijany ym., 2013.) Rabiesvirusinfektion aikana reaktiivisia happilajeja tuotetaan silloinkin, kun kompleksi I:tä inhiboidaan tarkoittaen, että ROS:a tuotetaan myös muissa osissa mitokondriota. Eri lyssavirukset käyttävät eri proteiineja aiheuttaakseen mitokondriaalisia toimintahäiriöitä. Rabiesvirus käyttää tähän pääasiassa P-proteiinia, kun taas MOKV M-proteiini teki samaa häirintää, mutta kohteena oli eri kompleksi (Kammouni ym., 2015). Nämä eri proteiinien aiheuttamat eriävät mekanismit mitokondriaalisen toimintahäiriön aiheuttamiseksi osoittaa tämän olevan tärkeä strategia lyssavirusten infektiossa edesauttaen neuronaaliseen vaurioon ja oireisiin, jotta virus pääsee leviämään isännästä toiseen.

Lämpösokkiproteiinit ovat osa useita solun normaalin toiminnan kannalta tapahtuvia prosesseja. Lämpösokkiproteiini 70 (engl. heat shock protein 70, HSP70) on mukana translaatiassa, laskostumisessa, solunsisäisessä liikenteessä ja proteiinien hajottamisessa. HSP70 on osallisena myös eri virusten replikaatiossa ja todistettusti myös rabiesviruksen replikaatiossa, jossa sen huomattiin sitoutuvan etenkin rabiesviruksen N-proteiiniin. (Lahaye ym., 2012). HSP70:n ekspression määrä korreloi viruksen mRNA:n, virusproteiinien ja -partikkelien määrään ja HSP70:n inhibointi vähensi replikaatiota (Lahaye ym., 2012).

Glukokortikoidit ovat homeostaasille ja immuunisäätelylle tärkeitä steroideja, joilla on tarkka rooli tulehdusreaktioiden heikentämisessä liiallisen reaktion aiheuttaman vaurion välttämiseksi. Rabiesviruksella infektoiduissa hiirissä kortikosteroni-tasot olivat jopa 12 kertaisia verrattuna kontrollihiiriin. Kortikoidien inhiboiminen vähensi kuolleisuutta ja klinisiä oireita, sillä kortikoidit vähentävät tulehdusreaktioita, mikä auttaa elimistöä puolustautumaan virusinfektiota vastaan (Schutsky ym., 2014). Glukokortikoidit vaikuttavat immuunireaktioon estäen virusta-neutraloivien vasta-aineiden valmistusta (engl. virus-neutralizing antibodies,

VNA) tarkoittaen, ettei rokotteella hoidetulle potilaalle kehity immunitettia rabiesvirusta vastaan (Burns ym., 1960). Rabiesvirusinfektio stimuloi HPA-akselia, joka tuottaa glukokortikoideja. Näin rabiesvirus pystyy inhiboimaan tulehdusreaktiota ja antigeenin esittelyä vähentämällä myös VNA:n tuotantoa.

4 YHTEENVETO

Rabiesvirus on yksi vanhimmista tuntemistamme ihmisille patogeenisistä viruksista ja mikä tekee siitä niin vaarallisen, on sen immunosuppressiiviset mekanismit. Rabiesviruksella on useita keinoja välttää isännän puolustus säätelämällä proteiinisynteesiä ja vaikuttamalla immuunipuolustuksen vasteeseen. Rabiesvirus käyttää montaa eri reseptoria tunkeutuessaan soluun, mikä tekee infektion estämisestä vaikeaa. Rabiesviruksen pitkä evolutiivinen historia ihmisen kanssa on mahdollistanut kehittymisen monille mekanismeille, joissa virus käyttää hyväkseen isäntäsolun oman toiminnan kannalta välttämättömiä rakenteita ja reittejä. Rabiesviruksen neurotrooppisuus on merkittävä osa immunosuppressiivisuutta, sillä keskushermoston neuronit omaavat kyvyn estää immuunivasteen välttääkseen liiallista infektion aiheuttamaa vahinkoa. Rabiesviruksen kyky piiloutua infektoimiinsa soluihin on avain sen välttäessä isännän immuunipuolustusta. Vaikka rabiesvirus onkin ollut tunnettu jo hyvin kauan, siitä tiedetään vielä rajallisesti ja uutta tutkimusta toteutetaan jatkuvasti. Toki myös joiltain osin rajallinen tieto omin solujemme toiminnasta vaikuttaa tiedon puutteisiin viruksen infektion etenemisessä ja säätelyssä.

5 LÄHTEET

- Ahmad, W., Li, Y., Guo, Y., Wang, X., Duan, M., Guan, Z., Liu, Z., & Zhang, M. (2017). Rabies virus co-localizes with early (Rab5) and late (Rab7) endosomal proteins in neuronal and SH-SY5Y cells. *Virologica Sinica*, 32(3), 207–215.
<https://doi.org/10.1007/s12250-017-3968-9>
- Alandijany, T., Kammouni, W., Roy Chowdhury, S. K., Fernyhough, P., & Jackson, A. C. (2013). Mitochondrial dysfunction in rabies virus infection of neurons. *Journal of NeuroVirology*, 19(6), 537–549. <https://doi.org/10.1007/s13365-013-0214-6>
- Anttila, VJ. (2024) Rabies (vesikauhu ja eläinten raivotauti). Lääkärikirja Duodecim.
<<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00598>> [Luettu 29.6.2025]
- Baloul, L., Camelo, S., & Lafon, M. (2004). Up-regulation of Fas ligand (FasL) in the central nervous system: A mechanism of immune evasion by rabies virus. *Journal of Neurovirology*, 10(6), 372–382. <https://doi.org/10.1080/13550280490521122>
- Baloul, L., & Lafon, M. (2003). Apoptosis and rabies virus neuroinvasion. *Biochimie*, 85(8), 777–788. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(03\)00137-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(03)00137-8)
- Burns, K. F., Shelton, D. F., Lukeman, J. M., & Grogan, E. W. (1960). Cortisone and ACTH Impairment of Response to Rabies Vaccine. *Public Health Reports (1896-1970)*, 75(5), 441. <https://doi.org/10.2307/4590822>
- Burrage, T. G., Tignor, G. H., & Smith, A. L. (1985). Rabies virus binding at neuromuscular junctions. *Virus Research*, 2(3), 273–289. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(85\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0168-1702(85)90014-0)
- Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D. A., & Giuffrida Stella, A. M. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(10), 766–775.
<https://doi.org/10.1038/nrn2214>
- Castellanos, J. E., Castañeda, D. R., Velandia, A. E., & Hurtado, H. (1997). Partial inhibition of the in vitro infection of adult mouse dorsal root ganglion neurons by rabies virus using nicotinic antagonists. *Neuroscience Letters*, 229(3), 198–200.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)00440-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)00440-0)
- Conti, C., Superti, F., & Tsiang, H. (1986). Membrane Carbohydrate Requirement for Rabies Virus Binding to Chicken Embryo Related Cells. *Intervirology*, 26(3), 164–168.
<https://doi.org/10.1159/000149696>

- Conzelmann, K. K., & Schnell, M. (1994). Rescue of synthetic genomic RNA analogs of rabies virus by plasmid-encoded proteins. *Journal of Virology*, 68(2), 713–719. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.2.713-719.1994>
- Conzelmann, K.-K., Cox, J. H., Schneider, L. G., & Thiel, H.-J. (1990). *Molecular Cloning and Complete Nucleotide Sequence of the Attenuated Rabies Virus SAD B19*.
- Cureton, D. K., Massol, R. H., Saffarian, S., Kirchhausen, T. L., & Whelan, S. P. J. (2009). Vesicular Stomatitis Virus Enters Cells through Vesicles Incompletely Coated with Clathrin That Depend upon Actin for Internalization. *PLoS Pathogens*, 5(4), e1000394. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000394>
- Cureton, D. K., Massol, R. H., Whelan, S. P. J., & Kirchhausen, T. (2010). The Length of Vesicular Stomatitis Virus Particles Dictates a Need for Actin Assembly during Clathrin-Dependent Endocytosis. *PLoS Pathogens*, 6(9), e1001127. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001127>
- Dhingra, V., Li, X., Liu, Y., & Fu, Z. F. (2007). Proteomic profiling reveals that rabies virus infection results in differential expression of host proteins involved in ion homeostasis and synaptic physiology in the central nervous system. *Journal of Neurovirology*, 13(2), 107–117. <https://doi.org/10.1080/13550280601178226>
- Eathiraj, S., Pan, X., Ritacco, C., & Lambright, D. G. (2005). Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5. *Nature*, 436(7049), 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature03798>
- Etessami, R., Conzelmann, K.-K., Fadai-Ghotbi, B., Natelson, B., Tsiang, H., & Ceccaldi, P.-E. (2000). Spread and pathogenic characteristics of a G-deficient rabies virus recombinant: An in vitro and in vivo study. *Journal of General Virology*, 81(9), 2147–2153. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-9-2147>
- Faber, M., Pulmanusahakul, R., Hodawadekar, S. S., Spitsin, S., McGettigan, J. P., Schnell, M. J., & Dietzschold, B. (2002). Overexpression of the Rabies Virus Glycoprotein Results in Enhancement of Apoptosis and Antiviral Immune Response. *Journal of Virology*, 76(7), 3374–3381. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.7.3374-3381.2002>
- Faber, M., Pulmanusahakul, R., Nagao, K., Prosniak, M., Rice, A. B., Koprowski, H., Schnell, M. J., & Dietzschold, B. (2004). Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(46), 16328–16332. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407289101>
- Finke, S., Cox, J. H., & Conzelmann, K.-K. (2000). Differential Transcription Attenuation of Rabies Virus Genes by Intergenic Regions: Generation of Recombinant Viruses

- Overexpressing the Polymerase Gene. *Journal of Virology*, 74(16), 7261–7269.
<https://doi.org/10.1128/JVI.74.16.7261-7269.2000>
- Finke, S., Mueller-Waldeck, R., & Conzelmann, K.-K. (2003). Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. *Journal of General Virology*, 84(6), 1613–1621. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19128-0>
- Flügel, A., Schwaiger, F. W., Neumann, H., Medana, I., Willem, M., Wekerle, H., Kreutzberg, G. W., & Graeber, M. B. (2000). Neuronal FasL Induces Cell Death of Encephalitogenic T Lymphocytes. *Brain Pathology*, 10(3), 353–364.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2000.tb00267.x>
- Gaudin, Y. (1997). Folding of rabies virus glycoprotein: Epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. *Journal of Virology*, 71(5), 3742–3750.
<https://doi.org/10.1128/jvi.71.5.3742-3750.1997>
- Gaudin, Y., Ruigrok, R. W., Knossow, M., & Flamand, A. (1993). Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *Journal of Virology*, 67(3), 1365–1372. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.3.1365-1372.1993>
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Durrer, P., Flamand, A., & Ruigrok, R. W. (1995). Biological function of the low-pH, fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein (G): G is transported in a fusion-inactive state-like conformation. *Journal of Virology*, 69(9), 5528–5534. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.9.5528-5534.1995>
- Gluska, S., Zahavi, E. E., Chein, M., Gradus, T., Bauer, A., Finke, S., & Perlson, E. (2014). Rabies Virus Hijacks and Accelerates the p75NTR Retrograde Axonal Transport Machinery. *PLoS Pathogens*, 10(8), e1004348.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004348>
- Heinrich, B. S., Cureton, D. K., Rahmeh, A. A., & Whelan, S. P. J. (2010). Protein Expression Redirects Vesicular Stomatitis Virus RNA Synthesis to Cytoplasmic Inclusions. *PLoS Pathogens*, 6(6), e1000958.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000958>
- Hooper, D. C., Ohnishi, S. T., Kean, R., Numagami, Y., Dietzschold, B., & Koprowski, H. (1995). Local nitric oxide production in viral and autoimmune diseases of the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12), 5312–5316. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5312>
- Horikami, S. M., Curran, J., Kolakofsky, D., & Moyer, S. A. (1992). Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome

- replication in vitro. *Journal of Virology*, 66(8), 4901–4908.
<https://doi.org/10.1128/jvi.66.8.4901-4908.1992>
- Jackson, A. C. (1999). Apoptosis in experimental rabies in bax -deficient mice. *Acta Neuropathologica*, 98(3), 288–294. <https://doi.org/10.1007/s004010051082>
- Jackson, A. C., Kammouni, W., Zhrebetskaya, E., & Fernyhough, P. (2010). Role of Oxidative Stress in Rabies Virus Infection of Adult Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons. *Journal of Virology*, 84(9), 4697–4705. <https://doi.org/10.1128/JVI.02654-09>
- Jackson, A. C., & Park, H. (1998). Apoptotic cell death in experimental rabies in suckling mice. *Acta Neuropathologica*, 95(2), 159–164. <https://doi.org/10.1007/s004010050781>
- Jackson, A. C., Randle, E., Lawrance, G., & Rossiter, J. P. (2008). Neuronal apoptosis does not play an important role in human rabies encephalitis. *Journal of Neurovirology*, 14(5), 368–375. <https://doi.org/10.1080/13550280802216502>
- Jacob, Y., Badrane, H., Ceccaldi, P.-E., & Tordo, N. (2000). Cytoplasmic Dynein LC8 Interacts with Lyssavirus Phosphoprotein. *Journal of Virology*, 74(21), 10217–10222. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.21.10217-10222.2000>
- Kaksonen, M., & Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(5), 313–326.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>
- Kammouni, W., Wood, H., Saleh, A., Appolinario, C. M., Fernyhough, P., & Jackson, A. C. (2015). Rabies virus phosphoprotein interacts with mitochondrial Complex I and induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Journal of NeuroVirology*, 21(4), 370–382. <https://doi.org/10.1007/s13365-015-0320-8>
- Kassis, R., Larrous, F., Estaquier, J., & Bourhy, H. (2004). Lyssavirus Matrix Protein Induces Apoptosis by a TRAIL-Dependent Mechanism Involving Caspase-8 Activation. *Journal of Virology*, 78(12), 6543–6555. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6543-6555.2004>
- Klingen, Y., Conzelmann, K.-K., & Finke, S. (2008). Double-Labeled Rabies Virus: Live Tracking of Enveloped Virus Transport. *Journal of Virology*, 82(1), 237–245.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01342-07>
- Lafon, M., Mégret, F., Meuth, S. G., Simon, O., Velandia Romero, M. L., Lafage, M., Chen, L., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., Prehaud, C., & Wiendl, H. (2008). Detrimental Contribution of the Immuno-Inhibitor B7-H1 to Rabies Virus Encephalitis. *The*

- Journal of Immunology*, 180(11), 7506–7515.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7506>
- Lahaye, X., Vidy, A., Fouquet, B., & Blondel, D. (2012). Hsp70 Protein Positively Regulates Rabies Virus Infection. *Journal of Virology*, 86(9), 4743–4751.
<https://doi.org/10.1128/JVI.06501-11>
- Lahaye, X., Vidy, A., Pomier, C., Obiang, L., Harper, F., Gaudin, Y., & Blondel, D. (2009). Functional Characterization of Negri Bodies (NBs) in Rabies Virus-Infected Cells: Evidence that NBs Are Sites of Viral Transcription and Replication. *Journal of Virology*, 83(16), 7948–7958. <https://doi.org/10.1128/JVI.00554-09>
- Lehmann, M. J., Sherer, N. M., Marks, C. B., Pypaert, M., & Mothes, W. (2005). Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *The Journal of Cell Biology*, 170(2), 317–325. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503059>
- Lewis, P., Fu, Y., & Lentz, T. L. (2000). Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures. *Muscle & Nerve*, 23(5), 720–730.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4598\(200005\)23:5%253C720::AID-MUS9%253E3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(200005)23:5%253C720::AID-MUS9%253E3.0.CO;2-5)
- Lewis, P., & Lentz, T. L. (1998). Rabies virus entry into cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Neurocytology*, 27(8), 559–573. <https://doi.org/10.1023/A:1006912610044>
- Liao, P., Hsu, Y., Yang, H., Wang, M., & Chen, L. (2012). Involvement of extraneural tissues and upregulation of inducible nitric oxide synthase after experimental infection with rabies virus in BALB/c mice and LEW/SsN rats. *Pathology International*, 62(9), 619–627. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2012.02846.x>
- Mazarakis, N. D. (2001). Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery. *Human Molecular Genetics*, 10(19), 2109–2121.
<https://doi.org/10.1093/hmg/10.19.2109>
- Mebatsion, T., König, M., & Conzelmann, K.-K. (1996). Budding of Rabies Virus Particles in the Absence of the Spike Glycoprotein. *Cell*, 84(6), 941–951.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81072-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81072-7)
- Mebatsion, T., Weiland, F., & Conzelmann, K.-K. (1999). Matrix Protein of Rabies Virus Is Responsible for the Assembly and Budding of Bullet-Shaped Particles and Interacts with the Transmembrane Spike Glycoprotein G. *Journal of Virology*, 73(1), 242–250.
<https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.242-250.1999>

- Mercer, J., & Helenius, A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. *Nature Cell Biology*, 11(5), 510–520. <https://doi.org/10.1038/ncb0509-510>
- Morimoto, K., Hooper, D. C., Spitsin, S., Koprowski, H., & Dietzschold, B. (1999). Pathogenicity of Different Rabies Virus Variants Inversely Correlates with Apoptosis and Rabies Virus Glycoprotein Expression in Infected Primary Neuron Cultures. *Journal of Virology*, 73(1), 510–518. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.510-518.1999>
- Murphy, F. A., & Bauer, S. P. (1974). Early Street Rabies Virus Infection in Striated Muscle and Later Progression to the Central Nervous System. *Intervirology*, 3(4), 256–268. <https://doi.org/10.1159/000149762>
- Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50(1), 295–322. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533>
- Patton, J. T., Davis, N. L., & Wertz, G. W. (1984). N protein alone satisfies the requirement for protein synthesis during RNA replication of vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology*, 49(2), 303–309. <https://doi.org/10.1128/jvi.49.2.303-309.1984>
- Piccinotti, S., Kirchhausen, T., & Whelan, S. P. J. (2013). Uptake of Rabies Virus into Epithelial Cells by Clathrin-Mediated Endocytosis Depends upon Actin. *Journal of Virology*, 87(21), 11637–11647. <https://doi.org/10.1128/JVI.01648-13>
- Piccinotti, S., & Whelan, S. P. J. (2016). Rabies Internalizes into Primary Peripheral Neurons via Clathrin Coated Pits and Requires Fusion at the Cell Body. *PLOS Pathogens*, 12(7), e1005753. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005753>
- Préhaud, C., Lay, S., Dietzschold, B., & Lafon, M. (2003). Glycoprotein of Nonpathogenic Rabies Viruses Is a Key Determinant of Human Cell Apoptosis. *Journal of Virology*, 77(19), 10537–10547. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.19.10537-10547.2003>
- Puthalakath, H., Huang, D. C. S., O'Reilly, L. A., King, S. M., & Strasser, A. (1999). The Proapoptotic Activity of the Bcl-2 Family Member Bim Is Regulated by Interaction with the Dynein Motor Complex. *Molecular Cell*, 3(3), 287–296. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80456-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80456-6)
- Qiu, W., Derr, N. D., Goodman, B. S., Villa, E., Wu, D., Shih, W., & Reck-Peterson, S. L. (2012). Dynein achieves processive motion using both stochastic and coordinated stepping. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(2), 193–200. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2205>

- Reid, Jackson, J. (2001). Experimental rabies virus infection in *Artibeus jamaicensis* bats with CVS-24 variants. *Journal of Neurovirology*, 7(6), 511–517.
<https://doi.org/10.1080/135502801753248097>
- Sarmiento, L., Tseggai, T., Dhingra, V., & Fu, Z. F. (2006). Rabies virus-induced apoptosis involves caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Virus Research*, 121(2), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.05.002>
- Schutsky, K., Portocarrero, C., Hooper, D. C., Dietzschold, B., & Faber, M. (2014). Limited Brain Metabolism Changes Differentiate between the Progression and Clearance of Rabies Virus. *PLoS ONE*, 9(4), e87180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087180>
- Scott, C. A., Rossiter, J. P., Andrew, R. D., & Jackson, A. C. (2008). Structural Abnormalities in Neurons Are Sufficient To Explain the Clinical Disease and Fatal Outcome of Experimental Rabies in Yellow Fluorescent Protein-Expressing Transgenic Mice. *Journal of Virology*, 82(1), 513–521. <https://doi.org/10.1128/JVI.01677-07>
- Seganti, L., Superti, F., Mastromarino, P., Sinibaldi, L., & Orsi, N. (1982). Role of carbohydrates in cell membrane receptors for vesicular stomatitis virus. *Bollettino Dell'Istituto Sieroterapico Milanese*, 61(4), 294–299.
- Semerdjieva, S., Shortt, B., Maxwell, E., Singh, S., Fonarev, P., Hansen, J., Schiavo, G., Grant, B. D., & Smythe, E. (2008). Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *The Journal of Cell Biology*, 183(3), 499–511. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806016>
- Sinibaldi, L., Goldoni, P., Seganti, L., Superti, F., Tsiang, H., & Orsi, N. (1985). Gangliosides in early interactions between vesicular stomatitis virus and CER cells. *Microbiologica*, 8(4), 355–365.
- Superti, F., Derer, M., & Tsiang, H. (1984). Mechanism of Rabies Virus Entry into CER Cells. *Journal of General Virology*, 65(4), 781–789. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-65-4-781>
- Tan, G. S., Preuss, M. A. R., Williams, J. C., & Schnell, M. J. (2007). The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17), 7229–7234.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0701397104>
- Thoulouze, M.-I., Lafage, M., Schachner, M., Hartmann, U., Cremer, H., & Lafon, M. (1998). The Neural Cell Adhesion Molecule Is a Receptor for Rabies Virus. *Journal of Virology*, 72(9), 7181–7190. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.9.7181-7190.1998>

- Thoulouze, M.-I., Lafage, M., Yuste, V. J., Baloul, L., Edelman, L., Kroemer, G., Israel, N., Susin, S. A., & Lafon, M. (2003). High level of Bcl-2 counteracts apoptosis mediated by a live rabies virus vaccine strain and induces long-term infection. *Virology*, *314*(2), 549–561. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00491-4](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00491-4)
- Toriumi, H., & Kawai, A. (2004). Association of Rabies Virus Nominal Phosphoprotein (P) with Viral Nucleocapsid (NC) Is Enhanced by Phosphorylation of the Viral Nucleoprotein (N). *Microbiology and Immunology*, *48*(5), 399–409. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03529.x>
- Tuffreau, C., Bénéjean, J., Blondel, D., Kieffer, B., & Flamand, A. (1998). Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *The EMBO Journal*, *17*(24), 7250–7259. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7250>
- Ubol, S., Hiriotte, W., Anuntagool, N., & Utaisinchaoen, P. (2001). A radical form of nitric oxide suppresses RNA synthesis of rabies virus. *Virus Research*, *81*(1–2), 125–132. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00378-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00378-1)
- Ubol, S., Sukwattanapan, C., & Maneerat, Y. (2001). Inducible nitric oxide synthase inhibition delays death of rabies virus-infected mice. *Journal of Medical Microbiology*, *50*(3), 238–242. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-3-238>
- Wang, J., Wang, Z., Liu, R., Shuai, L., Wang, X., Luo, J., Wang, C., Chen, W., Wang, X., Ge, J., He, X., Wen, Z., & Bu, Z. (2018). Metabotropic glutamate receptor subtype 2 is a cellular receptor for rabies virus. *PLOS Pathogens*, *14*(7), e1007189. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007189>
- Wang, X., Wen, Z., Cao, H., Luo, J., Shuai, L., Wang, C., Ge, J., Wang, X., Bu, Z., & Wang, J. (2023). Transferrin Receptor Protein 1 Is an Entry Factor for Rabies Virus. *Journal of Virology*, *97*(2), e01612-22. <https://doi.org/10.1128/jvi.01612-22>
- WHO (2024) Rabies. <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>> [Luettu 29.6.2025]
- Wu, X., Gong, X., Foley, H. D., Schnell, M. J., & Fu, Z. F. (2002). Both Viral Transcription and Replication Are Reduced when the Rabies Virus Nucleoprotein Is Not Phosphorylated. *Journal of Virology*, *76*(9), 4153–4161. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.9.4153-4161.2002>
- Wu, X., Lei, X., & Fu, Z. F. (2003). Rabies virus nucleoprotein is phosphorylated by cellular casein kinase II. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *304*(2), 333–338. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00594-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00594-1)

- Xu, H., Hao, X., Wang, S., Wang, Z., Cai, M., Jiang, J., Qin, Q., Zhang, M., & Wang, H. (2015). Real-time Imaging of Rabies Virus Entry into Living Vero cells. *Scientific Reports*, 5(1), 11753. <https://doi.org/10.1038/srep11753>
- Yang, J., Hooper, D. C., Wunner, W. H., Koprowski, H., Dietzschold, B., & Fu, Z. F. (1998). The Specificity of Rabies Virus RNA Encapsidation by Nucleoprotein. *Virology*, 242(1), 107–117. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.9022>
- Zhao, P., Zhao, L., Zhang, T., Qi, Y., Wang, T., Liu, K., Wang, H., Feng, H., Jin, H., Qin, C., Yang, S., & Xia, X. (2011). Innate immune response gene expression profiles in central nervous system of mice infected with rabies virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(6), 503–512. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.09.003>