

Hännällisen arkeoniviruksen infektiokyklin tutkiminen

Pro Gradu-tutkielma
Mirka Mäkelä

Yleisen mikrobiologian osasto
Biotieteiden laitos
Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta

Biotekniikan instituutti

Helsingin yliopisto

Marraskuu 2015

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution– Department Biotieteiden laitos	
Tekijä – Författare – Author Mirka Mäkelä			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Hännällisen haloarkeoniviruksen infektiokyklin tutkiminen			
Oppiaine – Läroämne – Subject Biotieteet			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma		Aika – Datum – Month and year Marraskuu 2015	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 63 (+ liitteet 7 sivua)
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Arkeonit tunnetaan erilaisiin ääriolosuhteisiin sopeutuneina yksisoluisina eliöinä. Halofiiliset arkeonit menestyvät hyvin korkean suolapitoisuuden ympäristöissä kuten suolajärvissä ja suolanrikastusaltaissa. Korkeasuolaisten ympäristöjen suolapitoisuus vaihtelee merivettä korkeammasta aina suolan saturoitumiseen. Tällaisissa ympäristöissä halofiiliset arkeonit ovat dominoivia mikro-organismejä, joiden solutiheys voi olla jopa 10^7 solua millilitrassa. Korkeissa suolapitoisuuksissa halofiilisten arkeonien ja bakteerien luontaiset viholliset puuttuvat, joten virusten oletetaan olevan niiden evoluutiota muokkaavista tekijöistä merkittävimpiä. Tähän mennessä noin 130 arkeonien virusta on kuvailtu, joista 90 infektoi halofiilisiä arkeoneja. Eristetyistä viruksista lukumääräisesti suurin osa on hännällisiä viruksia, jotka voidaan jakaa hännän ominaisuuksien mukaan kolmeen luokkaan: myo-, siphon- ja podovirukset.</p> <p>Arkeonivirusten infektiokyklejä, niiden käyttämiä isäntäsolun reseptoreja tai lysismekanismeja ei vielä juurikaan tunneta. Arkeoniviruksiin verrattuna bakteriofaageja ja eukaryoottien viruksia on tutkittu huomattavasti enemmän. Niille tunnetaan lukuisia reseptorimolekyylejä ja niiden tavat isäntäsolun lysaukseen tunnetaan. Tutkittujen arkeonivirusten adsorptio, soluun tunkeutuminen ja virionien vapauttaminen solusta muistuttavat pääpiirteiltään bakteriofaagien tai eukaryoottivirusten vastaavia mekanismeja. Arkeonin ollessa monessa suhteessa erilainen isäntäorganismi, myös arkeoniviruksille on täytynyt kehittyä erilaisia mekanismeja infektiokyklin läpi saattamiseen. Joidenkin filamenttisten arkeonivirusten on havaittu käyttävän reseptorinaan isäntäsolun pinnan pilus -rakenteita ja joidenkin lipidivaipallisten arkeonivirusten tiedetään adsorptoituvan suoraan isäntäsolun pinnalle pääpiirteittäin samoin kuin bakteerien tai eukaryoottien virukset. Isäntäsolujen lysaamiseen tutkitut arkeonivirukset eivät hyödynnä tunnettuja lysausmekanismeja. Virionien vapauttamisessa arkeoniviruksille on löydetty täysin uniikki mekanismi, viruksen indusoimat pyramidit. Vuonna 2009 SIRV2-arkkiviruksen infektion yhteydessä isäntäsolun pinnalle havaittiin muodostuvan pyramidin muotoisia ulokkeita. Infektiokyklin lopussa ulokkeet aukeavat ja vapauttavat viruspartikkelit solusta. Tämä on ensimmäinen lysismekanismi, joka arkkivirukselle on kuvailtu.</p> <p>Tässä työssä tutkittiin <i>Haloarcula vallismortis</i> -haloarkeonia infektoivan <i>Haloarcula</i> tailed virus 1 (HVTV-1) -viruksen elinkiertoa. HVTV-1 on hännällinen siphovirus, jonka genomi on kaksijuosteinen DNA. Aikaisemmin HVTV-1-viruksesta on julkaistu viruksen elinkierron kuvaus ja osoitettu, että se on infektiotyypiltään lyyttinen. HVTV-1-viruksen geenisekvenssi, kapsidin 3D-rakenne ja pääasiallinen kapsidiproteiini tunnetaan. HVTV-1 -viruksen infektion yhteydessä isäntäsolussa on havaittu viruksen tuottamia suurikokoisia, pyöreitä rakenteita, joilla on mahdollinen rooli viruksen elinkierrossa. Eläinsoluissa on infektion edetessä havaittu muodostuvan virustehtaita. Tällöin isäntäsolussa tapahtuu uudelleenjärjestäytymistä, joka johtaa replikaasi-proteiinien, virusgenomien ja replikaatioon tarvittavien isännältä peräisin olevien proteiinien konsentroituimiseen ja näin ollen replikaation tehostumiseen. HVTV-1-infektion tuottamat rakenteet arkeonisolussa saattavat toimia samoissa tehtävissä, kuin eläinsolujen virustehtaat. Näiden mollurarakenteiden merkitys infektiokyklissä saattaa olla myös virionien vapauttamisessa kuten aiemmin mainituilla arkeoniviruksen indusoimilla pyramidirakenteilla.</p> <p>Tämän työn tavoitteena oli tutkia viruksen adsorptiota yksityiskohtaisemmin ja selvittämään sen käyttämiä reseptoreita. Pyrittiin myös selvittämään, missä vaiheessa infektiokykliä viruksen indusoimat rakenteet ilmaantuvat soluihin, mistä ne koostuvat ja mikä niiden merkitys viruksen infektiokyklille voisi olla.</p> <p>Tämän työn perusteella voidaan sanoa, että HVTV-1-viruksen adsorptio on tehokasta ja jopa poikkeuksellisen nopeaa. Se adsorptoituu häntänsä välityksellä isäntäsolun pinnan arkellarakenteisiin. Yhteen arkellaan voi kiinnittyä useita viruksia, mutta reseptorit eivät saturoidu. HVTV-1:n infektiokyklin solun sisäinen vaihe on pitkä: adsorptiosta virustuotannon alkuun kuluu vielä kahdeksan tuntia ja solut lysaavat lopulta noin 12 tuntia infektion alusta. Noin kaksi tuntia ennen lysausta isäntäsolussa nähdään kaksi viruksen indusoimaa rakennetta, pyöreät mollurarakenteet ja laajat kalvoston näköiset rakenteet. Samaa aikaan kun virustuotanto käynnistyy, tuotetaan soluissa myös ainakin kahta viruksen indusoimaa tai koodaamaa proteiinia, joista toinen identifioitiin ribonukleotidireduktaasiksi. Mikäli tämä proteiini on osa mollura- tai kalvorakenteita, voidaan näiden rakenteiden olettaa osallistuvan esim. virusten maturaatioon tai ilmestymisaikansa perusteella virusten vapauttamiseen solusta. Infektion aikaansaamien erikoisten rakenteiden tutkimisessa riittäisi vielä jatkossakin työskätkä, erityisesti toisenkin viruksen indusoiman proteiinin identifioiminen ja mollurarakenteiden puhdistaminen ja tarkempi analysoiminen olisivat mielenkiintoisia haasteita.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Arkeoni; haloarkeoni; <i>Halobacteria</i> ; <i>Haloarcula</i> ; haloarkeonivirus; Haloarcula tailed virus 1; HVTV-1; hännällinen virus; adsorptio; mollura			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Maija Pietilä			
Säilytyspaikka – Förvaringsställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Biological and Environmental Sciences		Laitos – Institution– Department Department of Biosciences	
Tekijä – Författare – Author Mirka Mäkelä			
Työn nimi – Arbetets titel – Title The Infection cycle of a siphovirus infecting haloarchaea			
Oppiaine – Läroämne – Subject Biosciences			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu (master's thesis)		Aika – Datum – Month and year November 2015	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 63 (+ appendices 7 pages)
Tiivistelmä – Referat – Abstract Archaea are known to thrive in different kinds of extreme habitats. Halophilic archaea are found in environments where the salt concentration is high, like in salt lakes and solar salterns. The habitats of halophilic archaea have salt concentration varying from higher than sea water to the saturation of salt. In high salinity habitats, the biodiversity is typically low and archaea are dominant microorganisms. The cell density of haloarchaea can be up to 10 ⁷ cell/ml. When there are no predators for archaea and other halophilic microbes, viruses are thought to be the driving agents for their evolution. To this date, 130 archaeal viruses are described and 90 of them are known infect halophilic archaea. Most of the isolated haloarchaeal viruses are head-tailed. These head-tailed viruses can be divided into three different groups by the properties of the tail structure. Those three types of head-tailed viruses are myo-, siph- and podoviruses. The infection cycles, receptors or lysis mechanisms used by archaeal viruses are still poorly known. Few studied archaeal viruses use seemingly similar strategies to attach to the surface of the host cell, to penetrate the cell surface and to release new virions, as bacteriophages and viruses of eukaryotic cells do. Since archaeas differ so much from eukaryotic or bacterial cells, their viruses must have developed different strategies to carry out their infection cycle. Several filamentous viruses of archaea are known to attach to the pilus structures of their host cells and some of the enveloped archaeal viruses attach straight to the cell membrane of the host. These strategies are seemingly similar to those used by bacteriophages and viruses of eukaryotic cells. Strikingly different mechanism to release virions has been seen on SIRV-2, virus of a hyperthermophilic archaeon. The SIRV-2 infection induces pyramid shaped extrusions on the surface of the host cells. In the end of the infection cycle these pyramids open and release new virions from the cell. This is the first lysis mechanism described for an archaeal virus. In this work, the infection cycle of a head-tailed virus infecting extremely halophilic <i>Haloarcula vallismortis</i> was studied. The <i>Haloarcula vallismortis</i> tailed virus 1 (HVTV-1) is head-tailed siphovirus with a double stranded DNA genome. In previous studies the infection cycle of HVTV-1 is described to be lytic. The genome sequence, 3D-structure of the capsid and the major capsid protein of HVTV-1 is known. HVTV-1 infection has been seen to induce large, roundish structures on the surface of the infected cell. These structures may have a role in the course of the infection cycle. Several animal viruses are known to cause massive rearrangements in the host cell so that replication proteins, viral genome and the replication agents needed from the host are concentrated in specific locations. These rearrangements facilitates and enhances the viral replication. The roundish structures induced by HVTV-1 might play the same role as the virus factories of animal viruses do or these structures may be involved in the release of new virions in somewhat similar manner as those virus induced pyramid structures. In this study two main goals were set: 1.) To explore the adsorption of HVTV-1 in more details and see if the host cell receptor could be solved. 2.) To solve the possible role of the virus induced structure seen in the host cell and to find out, in which point of the infection cycle those structures appear. Based on this study, it can be said that the adsorption of HVTV-1 is efficient and very fast. The virus attaches to the archaeella structures of the host cell and the attachment is mediated by the tail of the virus. One archaeella may serve as a receptor for several viruses and they are not saturated. The intracellular phase of the infection cycle of HVTV-1 is long and the virus production starts 8 hours after infection. Virions are released when the host cells is lysed 12 hours after the infection. Two hours before the lysis, two virus induced structural changes of the cell are seen. The roundish structures at the surface of the cell and wide areas in the cytoplasm filled by a structure looking similar as lipid membranes. At the same time when the virus production begins, at least two virus induced or coded proteins are produced in the cell. The other one of these proteins was identified and it is predicted to be the virus encoded ribonucleotide reductase. Ribonucleotide reductase is an enzyme known to catalyse the synthesis of deoxyribonucleic acids from ribonucleic acids. If the ribonucleotide reductase is a part of seen structures, the timing of their appearance and the known function of the enzyme, could suggest those structures to play a role in the maturation or release of the virions. Many questions still remains and there would be lot more details to study in the HVTV-1 infection. Especially interesting would be the identification of the other virus induced protein, purifying those roundish structures and analysing them in more details.			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Archeon; haloarcheon; <i>Halobacteria</i> ; <i>Haloarcula</i> ; haloarcheal virus; HVTV-1; tailed virus; siphovirus; adsorption			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Maija Pietilä			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällys

Lyhenneluettelo.....	6
1. Johdanto.....	8
1.1. Arkeonit.....	8
1.1.2. Arkeoneille tyypillisiä pintarakenteita.....	8
1.2. Halofiiliset arkeonit.....	10
1.2.1. Yleiskatsaus halofiilisiin arkeoneihin.....	10
1.2.2. <i>Haloarcula</i> -suku.....	12
1.3. Virukset.....	12
1.3.1. Virusten historia ja luokittelu.....	12
1.3.2. Viruspartikkelien rakenne ja kokoaminen.....	13
1.3.2. Haloarkeonien virukset.....	15
1.4. Virusten infektiocyklit.....	16
1.4.1. Adsorptio.....	16
1.4.2. Soluun tunkeutuminen.....	17
1.4.3. Kapsidista kuoriutuminen ja replikaatio.....	17
1.4.4. Viruspartikkelien kokoamisesta solusta vapautumiseen.....	18
1.4.5. Arkeonivirusten adsorptio ja soluun tunkeutuminen.....	19
1.4.7. Arkeonivirusten infektiotyypit.....	19
2. Työn tausta ja tavoitteet.....	22
2.1. HVTV-1.....	22
2.2. Työn tavoitteet.....	22
3. Materiaalit ja menetelmät.....	24
3.1. Virus- ja isäntäkanta sekä kasvatusalustat ja -olosuhteet.....	24
3.2. Viruksen agarstokin valmistus.....	24
3.3. HVTV-1-viruspartikkelien puhdistus.....	24
3.3.1. HVTV-1-nestekasvatus.....	24
3.3.2. Virusten polyetyleeniglykolisaostus ja aggregaattien poistaminen virusnäytteestä.....	25
3.3.3. Viruspartikkelien puhdistus gradientteissa ja konsentroidi.....	25
3.4. Viruksen adsorption tutkiminen.....	25
3.4.1. Adsorptiotesti.....	25
3.4.2. Reseptorisaturaatiokoe.....	26
3.4.3. Superinfektio testi.....	26
3.4.4. Adsorptionäytteiden valmistaminen elektronimikroskopiaa varten.....	26
3.5. HVTV-1-infektoitujen <i>Har. vallismortis</i> -solujen tuottaminen.....	27
3.5.1. HVTV-1/ <i>Har. vallismortis</i> kasvukäyrän tarkistaminen.....	27

3.5.2. HVTV-1/ <i>Har. vallismortis</i> -näytteiden valmistaminen proteiinigeelielektroforeesia varten.....	27
3.5.3. HVTV-1/ <i>Har. vallismortis</i> –näytteiden valmistaminen ohutleikkeitä varten.....	27
3.5.4. HVTV-1/ <i>Har. vallismortis</i> -näytteiden valmistaminen lipidianalyysiä varten	28
3.5.5. Mollurarakenteiden puhdistus.....	28
3.6. Elektronimikroskopia.....	28
3.7. Proteiinianalyysit.....	29
3.7.1. Proteiinipitoisuuden määrittäminen	29
3.7.2. Proteiinien TCA-saostus.....	29
3.7.3. Geelielektroforeesit.....	29
3.8. Lipidianalyysit	30
3.8.1. Lipidien eristys.....	30
3.8.2. Ohutlevykromatografia.....	30
4. Tulokset	31
4.1. HVTV-1-viruksen adsorptio.....	31
4.1.1. Adsorption tutkiminen plakkitestillä - adsorptiotestit	31
4.1.2. Adsorption tutkiminen elektronimikroskopialla	33
4.2. Mollurarakenteen tutkiminen	34
4.2.1. HVTV-1-viruspartikkelien puhdistus ja puhdistettujen partikkelien analysointi.....	34
4.2.2. HVTV-1-viruksella infektoidujen <i>Har. vallismortis</i> –solujen kasvukäyrä	38
4.2.3. Infektoidujen solujen ohutleikkeiden elektronimikroskopia	39
4.2.4. Infektoidujen solujen proteiini- ja lipidianalyysit.....	40
5. Tulosten tarkastelu	46
5.1. Adsorptio	46
5.2. HVTV-1-viruspartikkelien puhdistus.....	47
5.3. HVTV-1-infektiosykli	48
5.4. Infektoiduissa soluissa elektronimikroskopialla näkyvät rakenteelliset muutokset ja niiden analysointi	48
5.5. Yhteenveto ja jatkossa tutkittavaa.....	50
6. Kiitokset.....	52
7. Lähteet	53
Liitteet.....	65
Liite 1, Kasvatusalustojen valmistusohjeet	65
Liite 2, Bradfordin reagenssin koostumus:.....	65
Liite 3, Proteiinigeelielektroforeesi.....	66
Liite 4, massa-analyysin tulokset	67

Lyhenneluettelo

16S rRNA	bakteerien ja arkkien ribosomin pienen alayksikön RNA
1x virus	puhdistettu liikkuvan vyöhykkeen sentrifugoinnilla
2x virus	puhdistettu ensin liikkuvan vyöhykkeen sentrifugoinnilla ja sitten tasapainosentrifugoinnilla
A	absorbanssi
BSA	naudan seerumin albumiini (bovine serum albumine)
cfu	pesäkkeen muodostava yksikkö (colony forming unit)
DNA	deoksiribonukleiinihappo (deoxyribonucleic acid)
EM	elektronimikroskopia
ESCRT	vesikkeleiden muodostamiseen perustuva lajittelumekanismi (endosomal sorting in the multi vesicular body)
<i>Har.</i>	<i>Haloarcula</i>
HCTV-1	<i>Haloarcula californiae</i> tailed virus 1
HCTV-5	<i>Haloarcula californiae</i> tailed virus 2
HVTV-1	<i>Haloarcula vallismortis</i> tailed virus 1
HVTV-2	<i>Haloarcula vallismortis</i> tailed virus 2
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IPB	pyramidi-rakenteen sisäinen inkluusiokappale (intrapyrimalidal body)
kDa	kilodalton
KPT	kaliumfosfowolframaatti (potassium phosphotungstate)
MES	4-morfoliini-etaanisulfonihappo
MGM	muokattu kasvualusta (modified growth medium)
MOI	infektiokerroin: infektiivisten virusten ja solujen lukumäärän suhde infektiossa (multiplicity of infection)
PAGE	polyakryyliamidigelelektroforeesi (polyacrylamide gel electrophoresis)
PEG	polyetyleeniglykoli
pfu	plakin muodostava yksikkö (plaque forming unit)
RNA	ribonukleiinihappo (ribonucleic acid)
rpm	kierrosta minuutissa (rounds per minute)
rRNA	ribosomaalinen RNA
RT	huoneenlämpö (room temperature)

SDS	natriumdodekyylisulfaatti (sodium dodecyl sulphate)
SIRV-2	<i>Sulfolobus islandicus</i> rod-shaped virus 2
st.	standardi
STIV1	<i>Sulfolobus</i> turreted icosahedral virus 1
TCA	trikloorietikkahappo
TEM	läpivalaisuelektronimikroskopia (transmission electron microscopy)
UA	uranyyliasettaatti
VAP	viruksen indusoimat pyramidirakenteet (Virus associated Pyramide)
V.C.	elävien solujen lukumäärä (viable count)

1. Johdanto

1.1. Arkeonit

Arkeonit ovat bakteerien ja eukaryoottien ohella elämän kolmas domeeni, joka erotettiin bakteerien domeenista virallisesti vuonna 1990 (Woese ym., 1990). Carl Woese teki havainnon prokaryoottien ribosomien pienen alayksikön ribonukleiinihapon (16S ribosomaalinen RNA, 16S rRNA) geenisekvenssien eroavaisuuksista jo vuonna 1977 (Woese & Fox, 1977). Hän huomasi tuolloin, että 16S rRNA jakaa prokaryootit kahteen selkeästi toisistaan eroavaan ryhmään. Tästä havainnosta elämän uuden domeenin tunnustamiseen kului kuitenkin yli kaksikymmentä vuotta, jolloin myös muita eroavaisuuksia arkeonien ja bakteerien väliltä löydettiin ja lopulta mikrobiologiayhteisö saatiin vakuuttumaan prokaryoottien domeenin sisältävän kaksi toisistaan eroavaa ryhmää. Näitä perustavanlaatuisia eroavaisuuksia löytyi 16S rRNA:n geenisekvenssin lisäksi mm. soluseinän rakenteesta, lipideistä, deoksiriboosinukleiinihapon (DNA) prosessoimisesta ja geenien rakenteesta. Arkeonit muistuttavat metaboliaaltaan bakteereja, mutta niiden DNA ja sen prosessoiminen puolestaan muistuttavat enemmän eukaryoottien vastaavia järjestelmiä (Cavicchioli, 2011). Lipideissä eroavaisuuksia löytyy mm. sidoksista. Bakteerien kuten eukaryoottienkin kalvojen fosfolipideissä on suoria rasvahappoketjuja esterisidoksilla glyseroliin kiinnittyneinä, kun taas arkeonien lipideissä on isoprenoidi-tyyppisiä hiilivetyketjuja esterisidoksilla kiinni glyserolissa. Arkeoneilla esterisidos kiinnittyy glyseroli-1-fosfaattiin, kun taas bakteereilla ja eukaryoteilla glyseroli-3-fosfaattiin (Jain ym., 2014).

Arkeonit tunnetaan usein ääriolosuhteisiin sopeutuneina ja niissä dominoivina organismeina, ekstremofiileina. Arkeoneja tavataankin mm. soodajärvistä (Sorokin ym., 2014), suolanrikastusaltaista (Antón ym., 2000) ja kuumista lähteistä (Huang ym., 2011). Vaikka ensimmäiset havainnot arkeonien ja bakteerien eroista tehtiin metanogeenillä ja halofiilillä arkeoneilla, eivät kaikki arkeonit suinkaan ole metaboliaaltaan erikoisia tai ekstremofiilejä, vaan niitä elää myös tavanomaisissa kasvuympäristöissä. Viimeisen vuosikymmenen aikana arkeoneja onkin löydetty lähes kaikista elinympäristöistä, joissa tavataan myös bakteereja (Cavicchioli, 2011). Edelleen arkeoneista tiedetään kuitenkin verrattain vähän. Tämä johtuu osin useiden arkeonien vaatimista erikoisista kasvuolosuhteista, joiden vuoksi niiden käsittely ja viljely laboratoriossa ei ole aina mahdollista sekä niiden vielä niin lyhyestä tutkimushistoriasta.

Alun perin arkeonien domeenissa oli vain kaksi pääjaksoa: *Euryarchaeota* (euryarkeonit) ja *Crenarchaeota* (krenarkeonit) (Winker ja Woese, 1991), jotka sisälsivät krenarkeonien termofiilit ja hypertermofiilit sekä euryarkeonien halofiilit ja metanogeeniset arkeonit. 16S rRNA-sekvenssivertailun lisäksi viime vuosina uudet, solujen viljelystä riippumattomat tekniikat ovat paljastaneet arkeonien domeenin olevan aiemmin uskottua monimuotoisempi. Nykyisin arkeonien domeenissa on viisi tunnustettua pääjaksoa eli krenarkeonien ja euryarkeonien rinnalle on hyväksytty seuraavat pääjaksot: *Thaumarchaeota* (Brochier-Armanet ym., 2008), *Korarchaeota* (Elkins ym. 2008) ja *Nanoarchaeota* (Huber ym., 2002). Osa uusista, vielä karakterisoimattomistakin arkeoneista eroaa edelleen tunnetuista pääjaksoista, ja arkeonien fylogeneettiseen puuhun onkin ehdotettu uusia haaroja: *Aigarchaeota* (Nunoura ym., 2011) ja *Geoarchaeota* (Kozubal ym., 2013).

1.1.2. Arkeoneille tyypillisiä pintarakenteita

Arkeonien ja bakteerien pintarakenteet eroavat toisistaan useilla tavoilla. Arkeonien soluseinässä ei ole bakteereille tyypillistä peptidoglykaania ja lähes kaikilla arkeoneilla soluseinän uloimman rakenteen muodostaa proteiineista rakentuva pintakerros, S-kerros (Surface layer (S-layer)) (Albers & Meyer, 2011). Tämä proteiinikerros on kaksikulotteinen kiteinen rakenne, joka koostuu yhdestä tai useammasta glykoproteiinista ja peittää koko solun (Fagan ym., 2014). S-kerros on kiinnittynyt solun ulkokalvoon

jalkamaisilla rakenteilla, jolloin kalvon ja soluseinän väliin muodostuu näennäinen periplasminen tila (Klingl, 2014). S-kerroksen proteiinit ovat yleensä vahvasti glykosyloituja. Glykosyloinnilla tarkoitetaan proteiinien translaationjälkeistä muokkausta, jossa tiettyihin aminohappoihin kiinnitetään sokerirakenteita (Schwarz & Aebi, 2011). Glykosyloinnin on esitetty mahdollistavan joidenkin arkeonien selviytymisen äärimmäisissä olosuhteissa. Sen arvellaan tietyillä arkeoneilla lisäävän proteiinien lämmönkestävyyttä ja stabiloivan niiden rakennetta, mutta koska kaikilla arkeoneilla proteiinien glykosylointia ei ole, se ei voi olla selviytymiselle välttämätöntä (Jarrell ym., 2014). Arkeonien soluseinien S-kerroksissa on huomattavaa vaihtelua domeenin sisällä. Kerros voi koostua pelkästään proteiinista tai siinä voi olla useita polymeereja kuten polysakkarideja ja bakteerien peptidoglykaania muistuttavaa pseudomureiinia. On myös muutamia arkeoneja, joilla ei ole lainkaan tätä pintakerrosta ja arkeoneja, joilla S-kerroksen ulkopuolella on lisäksi vielä ulkokalvo (Albers & Meyer, 2011, Rachel ym., 2002). S-kerros peptidoglykaaniseinän ohella löytyy hyvin laajasti myös bakteerien domeenista ja onkin pohdittu, voisiko tällainen proteiinkerros olla vanhinta alkuperää edustava soluseinä (Fagan 2014).

S-kerros solun uloimpana kerroksena ilman peptidoglykaaniseinää erottaa arkeoneja bakteereista, mutta arkeoneilla on havaittu myös muita, domeenille täysin uniikkeja pintarakenteita (Albers & Meyer, 2011). Tällaisia pintarakenteita ovat mm. hamit, bindosomit ja cannulae-rakenteet. Putkimaisia cannulae-rakenteita on löydetty hypertermofiilisiltä *Pyrodictium*-suvun arkeoneilta. Nämä arkeonit kasvavat solunulkoisten putkimaisten rakenteiden verkostossa, jotka muodostuvat, kun solunjakautumisen yhteydessä syntyvät uudet solut jäävät toistensa yhteyteen näiden putkien välityksellä (Rieger ym., 1995). Nämä rakenteet ulottuvat solujen periplasmiseen tilaan, mutta eivät sytoplasmaan asti. Cannulae-rakenteiden uskotaan olevan välttämättömiä solujen kasvuille, sillä yhtään *Pyrodictium*-suvun mutanttia ilman näitä rakenteita ei ole löydetty. Niiden uskotaan liittyvän joko ravinteiden kuljetukseen solujen välillä tai solujen kiinnittymiseen (Nickell ym., 2003). Hami-rakenteen nimi tulee latinan kielen sanasta *Hamus* eli koukku tai harppuuna, joka onkin varsin kuvaava nimi tälle pintarakenteelle. Hamit ovat piluksen kaltaisia 1-3 µm pituisia rakenteita, joiden päissä on kolme haaraa (Moissl ym., 2005). Hami-rakenteita on löydetty kylmässä, rikkipitoisessa suovedessä elävältä SM1-euryarkeonilta. SM1 elää erikoisessa yhteisössä tiettyjen filamenttimaisten bakteerien kanssa muodostaen helminauhamaisia biofilmejä. Bakteerit muodostavat "nauhan" helmien välillä ja SM1-arkeonit muodostavat helmimäiset rakenteet. Tällaiset helminauharakenteet kiinnittyvät toisesta päästään kiinteään kasvualustaan (Rudolph ym., 2001). Biofilmin rakennetta tutkittaessa on huomattu, että SM1-arkeonit sijoittuvat toisistaan noin 4 µm:n päähän eli juuri vierekkäisten solujen hamien muodostamalle etäisyydelle. Hamien on nähty muodostavan kasvualustaan laajoja ja tiheitä verkostoja ja niiden onkin esitetty olevan tärkeitä biofilmin muodostamisessa sekä solun kiinnittymisessä kasvualustansa (Henneberger ym., 2006, Moissl ym., 2002, Henneberger ym., 2006). Bindosomi-rakenteita on löydetty *Sulfolobales acidocaldarius* -arkeonin pinnalta. Ne ovat suuria proteiinikomplekseja, jotka ovat sekä rakenteellisia komponentteja arkeonin S-kerroksessa että tärkeässä roolissa sokerin sisäänotossa arkeonisoluun (Albers ym., 1999, Zolghard ym., 2014).

Cannulae-, hami- ja bindosomi -rakenteiden lisäksi arkeoneilta on löydetty piluksia ja arkeonien flagelloja. Arkeonien flagellojen uudeksi nimeksi on ehdotettu arkellaa (archaella) (Albers & Jarrell 2015). Tähän mennessä tutkittujen arkeonien pilukset ovat yhtä poikkeusta lukuun ottamatta edustaneet tyypin IV piluksia (Albers & Meyer, 2011). Bakteereilla tyypin IV pilukset toimivat useimmiten solun liikkumisessa kasvualustansa pintaa pitkin, mutta arkeoneilla pilusten funktiot ovat hyvin erilaisia ja niiden rakenteissa on eroja lajien välillä (Craig ym., 2004, Albers & Meyer, 2011). *Sulfolobales acidocaldarius* -arkeonin pinnalla on arkellojen lisäksi myös UV-valon indusoimia piluksia. UV-valon on huomattu aiheuttavan kyseisten arkeonien aggregoitumista ja pilusten tiedetään osallistuvan näiden aggregaattien muodostamiseen (Fröls ym., 2008). Iho670-kuidut ovat *Ignococcus hospitalis* -arkeonin hyvin hauraita, adhesiivisiä piluksia, jotka ovat jopa 20 µm pitkiä ja halkaisijaltaan 14 nm (Müller ym., 2009).

Pyörivällä liikkeellä solun uimisen mahdollistava arkella-rakenne on eniten tutkittu uloke arkeonien soluseinässä. Arkellat vastaavat toiminnaltaan bakteerien flagelloja, mutta rakenteellisesti ne muistuttavat enemmän bakteerien tyyppin IV piluksia (Albers & Jarrell, 2015). Tutkimustulosten pohjalta voidaankin olettaa sekä bakteerien että arkeonien uimisen kehittyneen itsenäisesti molemmissa domeeneissa (Lassak ym., 2012). Kuten tyyppin IV pilukset bakteereilla, myös arkellat rakentuvat signaalisekvenssin sisältävistä polypeptideistä, joita muokataan ennen liittämistä pilukseen. Tutkittujen arkeonien geenisekvensseistä löytyykin vahvistus bakteerien tyyppin IV pilusten ja arkellojen yhteiselle evolutiiviselle taustalle: arkeonien genomissa on homologi bakteerien geeneille, jotka koodaavat piluksen kokoamissysteemin tärkeitä proteiineja, sekä homologirakenne jalustassa toimivan membraaniproteiinin geenille (Bayley & Jarrel, 1998, Peabody ym., 2003). Erona flagelloihin arkellat saavat energiansa adenosiinitrifosfaatista, kun taas flagellat käyttävät protonigradienttia energialähteenään. Arkellat muodostuvat rakenneyksiköistä, joita lisätään rakenteen tyveen, kun taas flagellan rakenneyksiköt kulkevat rakenteen sisällä olevaa onttoa kanavaa pitkin flagellan kärkeen, jossa ne liitetään kasvavaan rakenteeseen (Streief ym., 2008, Jarrell ym., 1996).

1.2. Halofiiliset arkeonit

1.2.1. Yleiskatsaus halofiilisiin arkeoneihin

Kaikki organismit tarvitsevat jossain määrin suolaa elääkseen. Korkea suolapitoisuus on kuitenkin useimmille organismeille epäsuotuisa elinolosuhde, sillä osmoottinen paine saa veden virtaamaan ulos soluista ja korkean ionipitoisuuden vuoksi vapaan veden määrä on niin alhainen, etteivät entsyymit toimi normaalisti. Halofiiliset organismit ovat kuitenkin adaptoituneet korkeisiin suolapitoisuuksiin ja jopa vaativat molaarisia pitoisuuksia suolaa kasvuun ja normaaliin metaboliaan (Pieper ym., 1998, Eisenberg ym., 1992). Halofiilinen tarkoittaa 'suolaa rakastavaa' ja se on johdettu kreikan kielen sanasta *hals*, joka tarkoittaa suolaa tai merta sekä sanasta *philos* eli rakastava.

Kaikki halofiiliset arkeonit kuuluvat *Euryarchaeota*-pääjaksoon (Oren, 2014). Halofiiliset arkeonit ovat kuitenkin hyvin monimuotoinen ryhmä: suurin osa halofiilisista arkeoneista kuuluu lahkoon *Halobacteriales*, joka sisältää vain yhden heimon *Halobacteriaceae*. Myös osa metanogeenisistä arkeoneista on halofiilisiä, ja suurin osa niistä kuuluu lahkoon *Methanosarcinales* ja heimoon *Methanosarcinaceae*. Uuden pääjakson *Nanoarchaeota* edustajien uskotaan myös olevan halofiilisiä, sillä ympäristönäytteistä tehtyjen metagenomianalyyysien perusteella niitä tavataan korkeasuolaisissa ympäristöissä (Andrei ym., 2012). Korkean suolapitoisuuden ympäristöissä halofiiliset arkeonit ovat dominoivia organismeja. Ne menestyvät ympäristöissä, joissa suolapitoisuus voi vaihdella meriveden noin 0,6 molaarisesta aina noin 5 molaariseen natriumkloridi-pitoisuuteen eli suolan saturoitumiseen (DasSarma & DasSarma, 2012). Korkeissa suolapitoisuuksissa haloarkeonien solutiheys voi olla jopa yli 10^7 solua millilitrassa (Oren ym., 2002a, Burns ym., 2004). Suurin osa tällaisista ympäristöistä eristetyistä arkeoneista kuuluu *Halorubrum*-, *Haloarcula*- ja *Haloferax*-sukuihin. Mikrobeista arkeonien lisäksi tällaisissa ympäristöissä tavataan halofiilisiä bakteereja ja ainoana primaarituottajana yksisoluisia *Dunalliella*-leviä (Oren 2002b). Korkean suolapitoisuuden ympäristöille tyypillistä on myös diversiteetin matala kompleksisuus sekä korkeat virusmäärät (Boujelben ym., 2012, Garcia-Heredia ym., 2012). Halofiiliset arkeonit voidaan jakaa kasvuympäristönsä perusteella kolmeen ryhmään: äärimmäiset, kohtalaiset ja lievät halofiilit. Äärimmäisten halofiilien kasvulle optimaalinen natriumkloridi -pitoisuus on 3,4–5,1 M, kohtalaisten 0,85–3,4 M ja lievien halofiilien 0,2–0,85 M (Madigan ym., 2003).

Halofiilisiä arkeoneja yhdistää niiden tarve ympäristön korkealle suolapitoisuudelle, mutta niiden metabolioissa on suurta vaihtelua. Suurin osa halofiilisista arkeoneista on aerobisia tai fakultatiivisesti anaerobeja kemo-organoheterotrofeja. Iso osa näistä arkeoneista käyttää pääasiallisena hiilenlähteenään aminohappoja, mutta osa pystyy hyödyntämään myös erilaisia hiilihydraatteja. Osa halofiilisista arkeoneista

vaatii ympäristöltään hyvinkin monipuolisia ravinteita kasvaakseen, kun taas osa pystyy viljeltäessä kasvamaan yhdellä hiilenlähteellä ja käyttämään ammoniakkia typenlähteenä. Hapen ollessa kasvuympäristössä rajoittava tekijä halofiiliset arkeonit voivat hyödyntää vaihtoehtoisia elektroniluovuttajia, muuttaa energiametaboliansa fermentoivaksi tai fotoheterotrofiseksi. Fotoheterotrofiassa organismi tarvitsee edelleen hiilenlähteen ympäristöstä. Fotoautotrofista kasvua arkeoneilla ei ole tavattu. Halofiiliset metanogeenit taas ovat täysin anaerobisia ja tuottavat metaboliassaan metaania (Andrei ym., 2012). Tämä on arkeonien domeenille täysin uniikki piirre, sillä minkään muun tunnetun organismin ei tiedetä tuottavan energiametaboliassaan metaania (Babteste ym., 2005).

Jotta elämä korkeissa suolapitoisuuksissa on mahdollista, halofiilisten arkeonien on täytynyt mukautua vaativiin elinympäristöihin erilaisilla adaptaatioilla. Koska suurin osan halofiilisista arkeoneista on aerobisia tai fakultatiivisesti anaerobisia, niiden on pysyttävä hapellisissa kasvuympäristöissä. Happi kuitenkin liukenee huonosti suolaiseen veteen, joten tällaisissa ympäristöissä elävien arkeonien evoluutiossa on kehittynyt tapoja tämän ongelman ratkaisemiseksi. Useat halofiiliset arkeonit pystyvät liikkumaan ympäristössään uimalla arkella-rakenteiden (kappale 1.1.2) avulla ja näin saavuttamaan happi- ja ravinnepitoisuudeltaan sopivia ympäristöjä (Nikhil ym., 2001). Tällaisissa korkeiden suolapitoisuuksien vesiympäristöissä elävillä arkeoneilla on myös havaittu solujen sisällä erilaisia kaasuvesikkeleitä, joiden avulla ne välttävät vajoamisen ja pysyvät helpommin happipitoisessa vesikerroksessa (Hechler & Pfeifer, 2009, Oren 2013). Veden pintakerroksissa pysyminen saa aikaan seuraavan elinympäristön asettaman haasteen: jatkuva altistuminen auringon UV-säteilylle. Halofiiliset arkeonit tuottavatkin solukalvoonsa suuria määriä oranssin punertavia karotenoidia, joista suurin osa on C₅₀ bakterioruberiinejä (DasSarma & DasSarma, 2012). Nämä karotenoidit stimuloivat UV-vaurioista johtuvien tyminiidimeerien korjausta (Crowley ym., 2006).

Suurin haaste halofiilisten arkeonien elinympäristössä on kuitenkin korkea suolapitoisuus. Jotta arkeonisolun on mahdollista pysyä koossa tällaisessa ympäristössä, sillä on oltava solua stabiloivia rakenteita tai keinoja muilla tavoilla hallita osmoottista painetta. Sen täytyy myös pystyä pitämään yllä solun toimintoja, vaikka tällaisessa ympäristössä useiden keskeisten entsyymien toiminta normaalisti estyisi. Arkeonisolujen pinnalla solujen rakennetta tukee proteiinien ja siihen liittyvien polymeerien muodostama S-kerros (kappale 1.1.2). Halofiilisten arkeonien S-kerroksissa on havaittu eroja kohtalaisten- ja äärimmäisten halofiilien välillä. Äärimmäisen halofiilisella *Halobacterium salinarum* -arkeonilla S-kerroksen glykolysaatio on korkeampi ja glykoproteiineissa on sulfoituja glukuronihapotähteitä. Näistä muutoksista johtuen S-kerros on tiheimmin varautunut ja tämän uskotaan olevan adaptaatio elinympäristön suolapitoisuuteen (Mescher & Strominger, 1976, Eichler, 2003). Korkeissa suolapitoisuuksissa elävät arkeonit säätelevät myös solunsisäistä ionikonsentraatiotaan vähentääkseen osmoottista painetta. Monilla halofiilisilla arkeoneilla onkin solulimassaan molaarisia pitoisuuksia kalium- ja kloridi-ioneja. Toinen keino säätää solulimaa ympäristön kanssa isotonisemmaksi on syntetisoida solulimaan pieniä orgaanisia molekyylejä kuten glyserolia tai trehaloosia. Orgaanisten molekyyliden käyttö osmoottisen paineen tasaamiseen on käytössä laajasti kaikissa domeeneissa, kun taas kalium- ja kloridi-ionien molaariset pitoisuudet solulimassa ovat halofiilisille arkeoneille ominaisempaa (Oren, 2008).

Halofiilisilla arkeoneilla proteiinien pinnan on havaittu olevan negatiivisesti varautunut. Tämän varauksen saa aikaan happamien aminohappojen tai peptidien lisääminen proteiineihin. Negatiivisen varauksen uskotaan säilyttävän proteiimirakenteen joustavuuden negatiivisten varausten hylkiessä toisiaan. Halofiilisten arkeonien proteiineissa on myös vähemmän hydrofobisia aminohappoja. Tämän ominaisuuden uskotaan tasapainottavan proteiineja, sillä korkeasuolainen ympäristö voimistaa hydrofobisia voimia proteiinien sisällä, sillä vapaan veden määrä on vähäisempi. Sopeutena korkeisiin suolapitoisuuksiin osa

haloarkeonien proteiineista laskostuu oikein vain, kun ympäristön suolapitoisuus on tarpeeksi korkea (Reed ym., 2013).

1.2.2. *Haloarcula* -suku

Suvun nimi, *Haloarcula*, on johdettu kreikan kielen sanasta *hals*, joka tarkoittaa suolaa tai merta sekä sanasta *arcula*, eli pieni laatikko. *Haloarcula* tarkoittaa siis sananmukaisesti suolaa vaativaa pientä laatikkoa. *Haloarcula* on yksi noin viidestäkymmenestä *Halobacteriaceae* -heimoon luettavista suvuista (Oren, 2014). *Haloarcula*-sukuun (Torreblanca ym., 1986) kuuluu 10 arkeonilajia, joiden solut ovat lyhyitä ja pleomorfisia sauvoja. Solujen morfologiassa on vaihtelua säännöllisen sauvamaisista kolmiomaisiin ja epäsäännöllisen muotoisiin sauvasoluihin (Oren ym., 2009). *Haloarcula*-kasvustot ovat punertavia niiden tuottamien bakterioruberiinien ansiosta. *Haloarcula*-lajeilla on genomissaan vähintään kaksi heterogeenistä 16S rRNA geeniä (Yang ym., 2007). Suurin osa *Haloarcula* -kannoista on liikkuvia (Oren ym., 2009). Kuten kappaleessa 1.2.1 todettiin, enemmistö halofiilistä arkeoneista on aerobisia tai fakultatiivisesti anaerobisia, eikä yksikään *Haloarcula*-kanta tee tähän poikkeusta. Kannat pystyvät kasvamaan anaerobisesti esimerkiksi silloin, kun kasvuympäristössä on saatavilla nitraattia. Kaikki *Haloarcula*-suvun kannat ovat äärimmäisiä halofiileja, joiden kasvuille optimaalinen NaCl-pitoisuus on 2,5-3,5 M. Korkea suolapitoisuus on soluille välttämättömyys, sillä ne hajoavat tislatussa vedessä. Näiden kantojen optimaalinen kasvu vaatii myös magnesiumia ja sen optimipitoisuus kasvuympäristössä on kannasta riippuen 0,005-0,1 M. Energiametabolialtaan *Haloarcula*-suvun arkeonit ovat kemoheterotrofeja, jotka pystyvät hyödyntämään hiilenlähteenään laajasti erilaisia substraatteja eivätkä välttämättä tarvitse aminohappoja kasvuunsa. Optimaalinen kasvulämpötila vaihtelee kannan mukaan välillä 22 - 55 °C ja kasvu on mahdollista pH-välillä 6,5-9 (Oren ym., 2009, Oren 2008). *Haloarcula vallismortis* on *Haloarcula* -suvun tyyppilaji ja se on eristetty suola-altaasta Kaliforniasta, Death Valleyn kansallispuistosta. Sen nimi, *vallismortis*, tarkoittaa kuollutta laaksoa viitaten sen löytöpaikkaan. *Har. vallismortis* on gram-negatiivinen, liikkuva arkeoni, jonka optimaalinen kasvulämpötila on 40 °C (Gonzalez ym., 1978).

1.3. Virukset

1.3.1. Virusten historia ja luokittelu

Virukset löydettiin vuonna 1898, kun Löffler ja Frosch onnistuivat ensimmäisinä eristämään ja kuvailemaan suodatettavan taudinaiheuttajan (Fenner, 2008). Jo kauan ennen sitä olivat Martinus Beijerinck ja Dmitrii Ivanovsky tutkineet toisistaan tietämättä tupakka-kasvin mosaiikkitauteja. Ensimmäisenä tätä kasvitautia oli tutkinut ja kuvaillut Adolf Mayer, jonka työ innoitti Ivanovskyn ja Beijerinckin tutkimuksia (Lustig & Levine, 1992). Tupakan mosaiikkitaudissa kasvin lehtiin muodostuu tummia ja vaaleita läikkiä mosaiikkimaiseen tyyliin, ja siitä se on myös saanut kuvaavan nimensä (Harrison & Wilson, 1999). Ivanovsky teki tutkimuksissaan huomion, että sairaasta kasvista otettu neste sairastuttaa injektoitaessa myös terveen kasvin. Hän myös totesi, että nesteen suodattaminen bakteerit poistavan suodattimen läpi ei muuta tilannetta. Nämä tulokset raportoitiin vuonna 1892 (Iwanowski, 1989). Beijerinck oli myös tahollaan kokeillut samanlaista suodatusta ja päätenyt Ivanovskyn kanssa samaan havaintoon vuonna 1898. Beijerinck teki kuitenkin myös toisen tärkeän havainnon siitä, että tautia aiheuttava tekijä lisääntyy elävässä kasvissa eikä ole ainoastaan kemiallinen tekijä (Beijerinck, 1898). Nimensä virukset ovat saaneet Louis Pasteurilta, joka kehitti rabies-rokotteen jo vuonna 1885, mutta ei kuitenkaan osannut erottaa viruksia muista taudinaiheuttajista. Hän päätti käyttää tästä rokotteesta vaikuttavasta tekijästä latinankielistä nimeä, *virus*, joka tarkoittaa myrkyä (Cann, 2005a). Nämä virustutkimuksen alkumetreit loivat pohjan virologialle, ja jo 1900-luvun alussa virukset olivat yleisesti tunnustettuja taudinaiheuttajia niin kasveissa kuin eläimissäkin (Lustig & Levine, 1992).

Nyt, kun virusten löytämisestä on kulunut jo yli vuosisata, pystytään virusmaailmaa tutkimaan hyvinkin yksityiskohtaisesti. Virusten tiedetään olevan obligaatteja solunsisäisiä parasiitteja, joilla ei ole elävälle organismeille tyypillistä aineenvaihduntaa eikä proteiinien tuottamiseen tarvittavia ribosomeja (Rybicki, 1990). Virukset eivät siten pysty lisääntymään ilman isäntäsolua. Isäntäsolun ulkopuolella virukset ovatkin yksinkertaisimmillaan vain nukleokapsideja, joissa proteiiniukuori sisältää kullekin virukselle tyypillisen genomien (Pennazio, 2011). Viruksia arvellaan olevan maapallolla noin 10^{31} ja niiden määrän arvioidaan ylittävän bakteerien ja arkeonien määrän noin 15-kertaisesti (Comeau ym., 2008, Suttle, 2007). Mielenkiintoisia tutkimuskohteita ja haasteita modernille virologialle ovatkin mm. virusten alkuperän ja evoluution selvittäminen, bakteriofagien eli bakteereja infektioivien virusten käyttö syöpähoidoissa sekä virusten aiheuttamien tautiepidemioiden estäminen.

Viruksia voidaan jaotella Baltimoren luokituksella, jossa virukset luokitellaan niiden genomien ja sen replikaatiomekanismin mukaan seitsemään luokkaan: I) virukset, joiden genomi on kaksijuosteinen DNA-molekyyli, II) virukset, joilla genomi on yksijuosteinen DNA-molekyyli, III) kaksijuosteiset RNA-virukset, IV) positiivissäikeiset, yksijuosteiset RNA-virukset ja V) negatiivissäikeiset, yksijuosteiset RNA-virukset. Luokkaan VI kuuluvat RNA-virukset, jotka replikoituvat DNA-välivaiheen kautta ja luokkaan VII kaksijuosteiset DNA-virukset, jotka replikoituvat RNA-välivaiheen kautta. Luokkien VI ja VII virukset käyttävät replikaatiossaan käänteistä transkriptiota (Baltimore 1971, Temin & Baltimore, 1972). Baltimoren luokitusjärjestelmässä ei kuitenkaan oteta replikaatiotavan ja genomien ohella huomioon muita viruksen ominaisuuksia, evoluutiota tai virusten mahdollista yhteistä alkuperää. Virusten virallisesta luokituksesta vastaa International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), jonka tavoitteena on muodostaa viruksista kansainvälisesti hyväksytty taksonominen järjestelmä (King ym., 2012). ICTV luokittelee virukset sen mukaan, mitä isäntäorganismia ne infektioivat. Tämän luokituksen jälkeen virukset jaetaan edelleen Baltimoren luokituksen ja tiettyjen muiden ominaisuuksien mukaan. Valitettavasti jatkuvasti lisääntyvä tietomäärä ja viruslajin määrittelemisen hankaluus on johtanut tilanteeseen, jossa suurta osaa viruksista ei ole pystytty sijoittamaan vielä mihinkään virusheimoon ICTV:n järjestelmässä. Virusten luokittelua on lähestytty myös rakenteen näkökulmasta jakamalla virukset linjoihin (Abrescia ym., 2012). Viruspartikkelit rakentuvat nukleiinihaposta, proteiinikapsidista sekä joissakin tapauksissa lipidikalvosta, joka sijaitsee kapsidin sisä- tai ulkopuolella (Voyles, 2002). Tällainen luokittelumalli perustuu siihen, että proteiini voi laskostua hyvin rajoitetuilla tavoilla muodostaakseen itsestään järjestäytyvän ja edelleen toiminnallisen virionin eli viruspartikkelin. Tällaisen kapsidin muodostumista voidaan pitää evolutiivisesti hyvin harvinaisena tapahtumana ja sitä kautta viruslinjoja yhdistävänä tekijänä. Kapsidin proteiinilaskokseen perustuvalla luokittelulla pystyttäisiin jakamaan viruksia ryhmiin välittämättä niiden infektioimista isännistä eli samassa virusryhmässä voisi olla jopa eri domeenien isäntiä infektioivia viruksia.

1.3.2. Viruspartikkelien rakenne ja kokoaminen

Suhteutettuna virusten nopeaan evoluutioon ja oletettuun määrään maapallolla virusten kapsidimorfologiassa on vain vähän vaihtelua. Kapsidimorfologian perusteella virukset voidaan jakaa neljään luokkaan: ikosahedraalisiin ja helikaalisiin viruksiin, viruksiin joilla on ikosahedraalinen pää ja helikaalinen häntä sekä osittain symmetrisiin ja epäsymmetrisiin viruksiin. Suurin osa tunnetuista viruksista on joko ikosahedraalisia tai helikaalisia. Monet eläinvirukset ja myös esimerkiksi bakteerien plasmavirukset ovat epätyypillisiä viruksia. Tällaisiin viruksiin kuuluu myös suuri joukko arkeoniviruksia, jotka ovat morfologialtaan virusmaailmalle uniikkeja, kuten pullon ja sitruunan muotoiset virukset (Abrescia ym., 2012, Pietilä ym., 2014). Viruspartikkelit ovat metastabiileja rakenteita. Tällä tarkoitetaan sitä, että ekstrasellulaarisessa tilassa genomia suojaava ja kuljettava kapsidi on stabiili, mutta infektion yhteydessä sen on pystyttävä muuttamaan konformaatiotaan ja vapauttamaan genominsa nopeasti isäntäsoluun. Infektiivinen virioni ei siis ole saavuttanut pienimmän mahdollisen vapaan energian konformaatiota, vaan saavuttaa sen vasta konformaatiomuutoksilla adsorption ja soluun tunkeutumisen yhteydessä. Metastabiili viruskapsidi muodostuu identtisistä rakenneproteiineista, jotka järjestäytyvät siten, että proteiinien välille

muodostuu maksimaalisen kontakti. Kapsidirakenteen pysyvyyteen ja kokoamiseen vaikuttavat mm. hydrofobiset ja elektrostaattiset vuorovaikutukset, joissa voidaan nähdä muutoksia jo vain yhtä aminohappoa koodaavan sekvenssin mutaatioissa. Kapsidirakennetta voivat stabiloida myös disulfidi- ja kovalenttiset sidokset. Erityisesti disulfididoksissa tapahtuvien muutosten uskotaan olevan merkittävä tekijä virionin konformaatiomuutoksessa, jota tarvitaan adsorption ja soluun tunkeutumisen yhteydessä (Mateu, 2013a).

Viruskapsidin kokoaminen on passiivinen tapahtuma, sillä ohjeet kokoamiseen on sisäänkoodattu kapsidiproteiinien sekvenssiin. Kapsidisymmetrian rakentumisen peruseriaatteen ovat hyvin yksinkertaiset: jokaisen alayksikön sitoutuminen viereisiin yksiköihin on identtistä. Tämä johtaa lopulta automaattisesti kapsidin rakenteen muodostumiseen. Tästä rakentumistavasta johtuen muodostuva kapsidi on luonnollisesti virheetön rakennelma. Ikosahedraalisen kapsidin lähes pyöreä rakenne saadaan aikaan, kun 20–60 kDa kokoisia pääasiallisia rakenneproteiineja on kapsidissa 60 tai sen moninkertoja. Pääasiallisten kapsidiproteiinien lisäksi kapsidissa on myös sen stabiilisuutta tukevia rakenneproteiineja. Tällainen järjestäytyminen mahdollistaa suljetun kuoren rakentumisen, jossa on yksinkertaisimmillaan 20 pintatasoa ja 12 napaa. Ikosahedrin rakentuminen noudattaa 2-3-5 -symmetriaa (Caspar & Klug, 1962, Mateu, 2013b, Voyles 2002). Helikaalisilla viruksilla proteiinikapsidi rakentuu suuresta määrästä identtisiä rakenneproteiineja. Rakenneproteiinit järjestäytyvät tiukasti vierekkäin koko genomien pituudelta muodostaen nukleokapsidin, joka on sylinterin muotoinen ja symmetrialtaan helikaalinen. Rakenneproteiinit ovat jatkuvassa vuorovaikutuksessa genomien kanssa, joten kapsidin koko riippuu suoraan genomien koosta. Helikaaliset virukset voivat olla rakenteeltaan joustavia tai hyvin jäykkiä ja saumaisia (Stubbs & Kendall, 2012). Useilla viruksilla on helikaalinen häntärakenne kiinnittyneenä ikosahedraaliseen kapsidiin. Se on ontto, putkimainen rakenne, jonka läpi virus ejektoi genominsa isäntäsolun kalvojen läpi. Häntä toimii myös sopivan isäntäsolun tunnistuksessa sekä solun pintaan kiinnittymisessä (Leiman & Shneider, 2012). Hännälliset virukset voidaan jaotella hännän pituuden ja supistumiskyvyn mukaan podo-, siphon- ja myovirusiin (Ackermann, 2003).

Osalla viruksista proteiinikapsidin pinnalla on vielä lipidivaippa, joka on useimmiten peräisin isäntäsolun kalvoista. Virus voikin saada lipidivaippansa vain kuroutumalla jostain isäntäsolun kalvosta kuten solukalvosta, tumakalvosta tai ulkokalvosta läpi (Brever, 1980). Se, mistä kalvosta virus lipidivaippansa saa, on virusspesifistä (Welsch ym., 2007). Vain muutamien suurten eukaryoottivirusten tiedetään syntetisoivan itse lipidejä (Claverie ym., 2009). Infektion aikana kalvolle, jonka läpi virus silmikoituu, on kuljetettu valmiiksi viruksen tarvitsemia integraalisia proteiineja (Suomalainen, 2002). Näiden proteiinien kalvon ulkoinen osa toimii usein viruksen adsorptiossa isäntäsolun pintaan ja kalvofuusiassa (Kielian & Jungerwirth, 1990). Ulkopinnan proteiinien oligomeerit muodostavat usein virusten pintaan piikkimäisiä rakenteita. Integraalisten kalvoproteiinien sisäosat osallistuvat usein myös virionien lopullisen rakenteen kokoamiseen. Viruksilla voi olla myös kapsidin sisäinen lipidivaippa, jonka virus muodostaa isäntänsä kalvoista (Lucas, 2001). Eräillä viruksilla lipidejä on ainoastaan rakenneproteiinin modifikaationa, ei niinkään yhtenäisenä lipidivaippana (Pietilä ym., 2013c). Lipidivaipan, proteiinikapsidin ja genomien lisäksi viruksista voi löytyä mm. eri entsyymejä kuten esimerkiksi proteaaseja ja polymeeraaseja (Poranen ym., 2002).

Virionien rakennetta voidaan tutkia useilla eri menetelmillä. Yleisimmin käytetään elektronimikroskopiaa ja röntgenkristallografiaa. Röntgenkristallografia perustuu röntgensäteiden hajontaan. Sitä käytetään kristallirakenteiden atomi- ja molekyyli-tasoinen tutkimiseen. Röntgensäteiden osuminen kristallirakenteeseen aiheuttaa sen hajoamisen eri suuntiin. Eri atomitasoista hajoavat säteet analysoidaan, jolloin saadaan tietoon atomien sidospituudet ja -kulmat, atomien paikat ja hilarakenne (Tang & Johnson, 2002). Korkean resoluution rakenteen määrittämiseksi voidaan käyttää myös kryo-elektronimikroskopiaa (kryo-EM), joka on läpivalaisuelektronimikroskopian menetelmä. Kryo-EM:lla pystytään tutkimaan värjäämätöntä ja fiksaamatonta näytettä, joka on jäädytetty nestemäisellä typellä tai etaanilla. Tässä menetelmässä näytettä

ei tarvitse kristallisoida, joten tutkiessa säästytään kristallisoinnissa toisinaan tapahtuvilta rakennemuutoksilta ja näytettä tarvitaan vain pieni määrä (Bai ym., 2015). Usein virionien rakennetutkimuksissa käytetään useita eri menetelmiä tarkimman tuloksen saavuttamiseksi (Castón & Carrascosa, 2013).

1.3.2. Haloarkeonien virukset

Kuten kaikki muutkin solulliset eliöt myös arkeonit ovat alttiita virusinfektioille. Jo ennen kuin arkeonit tunnistettiin omaksi domeenikseen, hännällisten virusten todettiin infektoivan erittäin halofiilisiä *Halobacterium*-suvun jäseniä (Prangishvili, 2013). Korkeissa suolapitoisuuksissa viruksen kaltaisia partikkeleita voi olla jopa 1×10^{10} kappaletta millilitrassa. Nykyisin arkeonien viruksia on kuvattu noin 130, kun taas bakteerien viruksia tunnetaan huomattavasti suurempi joukko (Atanasova ym., 2015a). Arkeonivirusten morfologioiden kirjo bakteerien viruksiin verrattuna on laaja: 29 luokiteltua arkeonivirusta jakautuu jopa 15 virusheimoon, kun taas bakteerivirukset kuuluvat vain kymmeneen virusheimoon (Snyder ym., 2015, Pietilä ym., 2014). Jo verrattain lyhyen tutkimushistoriansa aikana arkeoneille on tunnistettu 15 eri morfotyyppiä edustavaa virusta, kun vastaava luku bakteerien viruksille on 9. Arkeoneille tunnetaan pisanan-, pullon-, basillin-, sauvan, spiraalin-, ikosahedrin- ja sitruunanmuotoisia viruksia. Lisäksi tunnettuja morfotyyppiä ovat filamenttiset virukset sekä pyöreät virukset, joilla on helikaalinen ydin. Hännälliset ikosahedraaliset ja sitruunanmuotoiset virukset voidaan edelleen jakaa kolmeen eri tyyppiin hännän ominaisuuksien perusteella. Monille arkeonivirusten morfotyypeille kuten ikosahedraalisille, lineaarisille ja pleomorfisille viruksille löytyy vastaava morfotyyppi eukaryoottien tai bakteerien viruksista, mutta arkeoniviruksista on löydetty koko virusmaailmalle myös täysin uniikkeja morfotyyppiä kuten pullon-, sitruunan- ja pisananmuotoisia viruksia (Pietilä ym., 2014). Kaikki tähän mennessä tutkitut arkeonivirukset ovat DNA-viruksia, joiden genomi on yksi- tai kaksijuosteinen, lineaarinen tai sirkulaarinen. Arkeoneja infektoivia RNA-viruksia ei ainakaan toistaiseksi ole pystytty viljelemään, mutta viimeaikaisissa metagenomitutkimuksissa on löydetty selkeitä viitteitä arkeonien RNA-virusten olemassaolosta (Bolduc ym., 2012)

Tunnetuista noin 130 arkeoniviruksesta noin 90 infektoi halofiilisiä arkeoneja (Atanasova ym., 2015a). Korkean suolapitoisuuden vuoksi halofiilisten arkeonien elinympäristössä ei virusten lisäksi elä juurikaan muita arkeonien luontaisia vihollisia, jolloin virusinfektiot ovat merkittävä evoluutiota eteenpäin ajava tekijä (Oren, 2008, Rodriguez-Valera ym., 2009). Halofiiliset arkeonit ovatkin jatkuvassa vuorovaikutuksessa virusten kanssa, sillä viruksia voi korkeissa suolapitoisuuksissa olla jopa 10–100 kertaa isäntäsoluja enemmän (Porter ym., 2007). Halofiilisiä arkeoneja infektoivat tutkitut virukset ovat morfotyypeiltään hännällisiä viruksia, joilla on ikosahedraalinen kapsidi ja helikaalinen häntä, hännättömiä ikosahedraalisia, pleomorfisia ja sitruunan muotoisia viruksia. Myös lineaarisia viruksia on havaittu korkeiden suolapitoisuuksien ympäristöissä, mutta niiden ei ole vielä osoitettu infektoivan halofiilisiä arkeoneja (Atanasova ym., 2015a, Sime-Ngando ym., 2011).

Eristetyistä halofiilisten arkeonien viruksista suurin osa on hännällisiä viruksia. Vaikka hännällisiä viruksia on eristetty lukumäärällisesti eniten (Pietilä ym., 2014), on ympäristönäytteitä tutkittaessa huomattu hännällisiä viruksia olevan morfotyypeistä vähiten. Tietyissä korkeasuolaisissa ympäristöissä hännällisten haloarkeonivirusten osuus kaikista nähdyistä viruksen kaltaisista partikkeleista oli alle 1 % (Sime-Ngando ym., 2011). Nämä ristiriitaiset havainnot johtuvat arkeonien ja sitä myöden niitä infektoivien virusten kasvatuksen haasteellisuudesta. Laboratorio-oloissa kasvamaan saadut arkeonit ja niiden virukset eivät siis vastaa alkuperäisessä elinympäristössä vallitsevia suhteita. Arkeonien hännälliset virukset infektoivat arkeoneja ainoastaan euryarkeonien pääjaksosta. Ne muistuttavat morfologialtaan bakteerien hännällisiä viruksia ja niiltä on todettu löytyvän useita homologeja vastaavien bakteerivirusten geneille (Luk ym., 2014). Näin ollen ne luokitellaan, kuten bakteriofagitkin, häntärakenteen ominaisuuksien perusteella podo-, myo- ja siphovirusiin (Pietilä ym., 2014).

Ikosahedraalisen morfotyypin haloarkeonivirukset ovat halkaisijaltaan 51–80 nm (Luk ym., 2014, Prangishvili ym., 2006). Niillä on ikosahedraalisen proteiinikapsidin lisäksi isäntäsolun lipideistä peräisin oleva lipidivaippa proteiinikapsidin sisäpuolella. Tällaisia viruksia tunnetaan tällä hetkellä viisi, ja ne infektoivat haloarkeoneja suvuista *Haloarcula*, *Halorubrum* ja *Natrinema* (Atanasova ym., 2015b). Pleomorfisilla pleolipovirusilla ei ole varsinaista proteiinikapsidia, vaan niiden membraanissa on kahta tai kolmea pääasiallista rakenneproteiinia. Osa näistä proteiineista muodostaa piikki-rakenteita, joiden oletetaan toimivan isäntäsolun infektoinnissa ja toiset näistä proteiineista ovat luultavasti vuorovaikutuksessa genomien kanssa virionin kokoamisen aikana (Pietilä ym., 2010 ja 2012). Pleolipovirukset ovatkin spiraalin muotoisen *Aeropyrum* coil-shaped virus (ACV)-viruksen lisäksi ainoita tunnettuja arkeoniviruksia, joiden genomi on yksijuosteinen DNA (Pina ym., 2011, Mochizuki ym., 2012). Halofiilisiä arkeoneja infektoivia, sitruunanmuotoisia viruksia on toistaiseksi onnistuttu eristämään vain yksi, vaikka niiden on todettu olevan morfotyypiltään kaikista yleisimpiä korkeissa suolapitoisuuksissa (Sime-Ngando ym., 2011, Bath ym., 1998). Sitruunanmuotoisen viruskapsidin on arveltu olevan joustava kapsidiproteiineihin tehtävän lipidimuokkauksen ansiosta (Pietilä ym., 2013a).

Haloarkeonivirusten isäntäkirjo vaihtelee virustyyppin mukaan kuten muillakin viruksilla. Isäntäkirjoa tutkittaessa joidenkin eristettyjen myovirusten on todettu infektoivan haloarkeoneja hyvinkin laajasti. Nämä virukset pystyivät infektoimaan arkeoneja jopa viidestä eri arkeonisuvusta. Muiden virustyyppien on huomattu olevan huomattavasti isäntäspesifisempiä. Haloarkeonivirusten on todettu infektoivan myös isäntäsoluja, jotka on eristetty erilaisista korkean suolapitoisuuden ympäristöistä, hyvinkin kaukaa toisistaan (Atanasova ym., 2015a, Atanasova ym., 2012).

1.4. Virusten infektiocyklit

Infektiocyklin solunsisäisessä vaiheessa virus ottaa käyttöönsä isäntäsolulta tarvitsemansa solun toiminnot ja alkaa tuottaa kopioita omasta genomistaan. Solu tuottaa viruksen komennossa myös rakenneproteiineja, joista uusia viruspartikkeleita kootaan ja joihin perintöainekset virusten kypsyessä pakataan. Uudet virionit vapautuvat solusta infektiocyklin päätteeksi ja ovat jälleen solun ulkopuolella elottomia partikkeleita (Cann, 2005b, Mateu 2013b)

1.4.1. Adsorptio

Viruksen infektiocykli voidaan jakaa kuteen osaan, joista ensimmäinen on adsorptio (Voyles, 2002). Adsorptiolla tarkoitetaan viruspartikkelin kiinnittymistä isäntäsolun pinnan adheesiomolekyyleihin ja niiden avustuksella varsinaiseen reseptoriin. Adheesiomolekyylit ovat pieniä, varautuneita molekyylejä, joiden avulla virukset pääsevät konsentroitumaan solun pinnalle ennen spesifistä sitoutumista varsinaiseen reseptoriin (Boulant ym., 2015). Adsorptiossa viruksen pinnan tietyt proteiinit tunnistavat tietyt isäntäsolun pinnan rakenteet, jotka toimivat reseptoreina kiinnittymiselle (Poranen ym., 2002). Virusten adsorptio on usein reseptorispesifistä, mikä tekee viruksista myös hyvin laji- ja soluspesifisiä. Adsorption tehokkuus vaihtelee virusten välillä. Toiset virukset adsorptoituvat hyvin nopeasti, kun taas toisilla adsorptiota voi viivyttaa esimerkiksi harvassa olevat tai vaikeammin saavutettavat reseptorit, ja osa viruksista tarvitsee useamman eri reseptorin (Casasnovas, 2013, Sieczkarski & Whittaker, 2005). Adsorption tehokkuuteen vaikuttaa myös mm. se, kuinka monta virusta yksi reseptori voi sitoa ja muodostuuko infektoituun soluun superinfektioekskluusio (Adams, 1959, Folimonova, 2012). Superinfektioekskluusion muodostuminen tapahtuu joissakin isäntäsoluissa, kun ensimmäinen virus on infektoinut solun. Tällöin tämä ensimmäinen virus indusoi superinfektioekskluusion muodostumisen eli sellaisia muutoksia solussa, ettei samaa lajia tai hyvin läheistä sukua edustavat virukset pysty enää infektoimaan samaa solua (Folimonova, 2012).

1.4.2. Soluun tunkeutuminen

Solun pintaan adsorptoituneen viruksen infektiocykli jatkuu solun sisään tunkeutumisella. Hännälliset virukset ejektioivat genominsa soluseinän ja -kalvon läpi häntärakenteensa avulla ja tyhjä kapsidi jää viruksen pinnalle (Leiman & Shneider, 2002). Osan hännällisistä viruksista tiedetään siirtävän genominsa täysin entsyymien avulla, mutta osa hännällisistä viruksista tarvitsee genominsa ejektioon lisäksi fysikaalista voimaa tai paineesta saatavaa apua (Molineux ja Panja, 2013). Genomin ejetiomekanismien yksityiskohtia ei vielä täysin tunneta, mutta siihen on esitetty kahta mallia: jatkuvuusmekaniikka ja hydrodynamiikka. Jatkuvuusmekaniikan mallissa genomin tiiviin pakkautumisen kapsidiin on mitattu aiheuttavan paineen, jonka voimalla genomi liikkuisi häntäkanavaan reseptoriin sitoutumisen laukaisemana (Purohit ym., 2005). Hydrodynamiikan mallissa oletetaan, että reseptoriin sitoutuneen viruksen kapsidin läpi diffuntoituu vettä osmoottisen gradientin vaikutuksesta ja hydrostaattinen paine saisi DNA:n ejektioitumaan häntäkanavaa pitkin (Lemay ym., 2013). Hydrodynamiikan malli on saanut enemmän tukea, mutta se ei yksin riitä koko genomin ejektioimiseen. Uskotaan, että genomin loppuosa autetaan solun sisälle entsyymien vetämänä (Molineux ja Panja, 2013).

Useat hännättömät virukset hyödyntävät isäntäsolun omaa, reseptorivälitteistä endosytoosia, jossa ligandin (tässä tapauksessa viruksen) sitoutuminen solun pinnan reseptoriin saa solun internalisoimaan tämän kohdan solukalvostaan endosytoosirakkulaan. Tämä endosytoosireitti on tunnetussa virusmaailmassa yleisin tapa soluun tunkeutumiseen (Boulant ym., 2015).

Lipidivaipalliset virukset voivat tunkeutua soluun endosytoosin ohella myös kalvofuusion avulla. Lipidivaipan ja solun ulkokalvon tai endosytoosirakkulan kalvon fuusio vapauttaa viruksen kapsidin sytoplasmaan. Kalvojen fuusioitumista välittävät viruksen ulkokalvon metastabiilit glykoproteiinit, fusogeenit. Fusogeenien metastabiiliin rakenteen muutoksista vapautuva energia mahdollistaa kalvofuusion (Más & Melero, 2013). Harvinaisempi tapa soluun tunkeutumiseen on koko viruspartikkelin translokaatio solukalvon läpi isäntäsolun kalvoproteiinien ja viruskapsidin toimesta (Cann, 2005b). Tätä kutsutaan endosytoosista riippumattomaksi, reseptorivälitteiseksi tunkeutumiseksi (Boulant ym., 2015). Kasvien viruksilla adheesio ja soluun tunkeutuminen tapahtuu täysin eri tavalla isäntäorganismien ominaisuuksien vuoksi. Kasvit eivät liiku, joten virusten leviävät vektorien kantamana kasvien välillä. Kasvisoluja myös ympäröi paksu soluseinä, mikä tekee soluun tunkeutumisesta suuremman haasteen kuin eläin-, bakteri- ja arkeonisoluilla. Kasveja infektoivien virusten infektiocykli alkaakin lähes aina vektorin avustamana, jolloin sekä kasvien välillä liikkuminen että soluseinän ylittäminen on ratkaistu. Kasviviruksen vektorina voi toimia esim. sieneni tai sukkulamato (Whitfield ym., 2015). Suurin osa kasvivirusten vektoreista on kasvia ravintonaan käyttäviä hyönteisiä, joiden vaurioittaessa kasvin solukkoa, virus pääsee siirtymään suoraan isäntäsoluun (Whitfield ym., 2015). Myös useiden eläinvirusten tiedetään leviävän vektorin välityksellä (Reynolds ym., 2006).

1.4.3. Kapsidista kuoriutuminen ja replikaatio

Soluun tunkeuduttuaan viruksen on paljastettava genominsa, jotta sen replikaatio voi alkaa. Jos viruksesta menee soluun genomin lisäksi kapsidi, infektiocyklin seuraava vaihe on kapsidista kuoriutuminen. Osa eläinviruksista tarvitsee vielä kapsidiaan, sillä sen rakenteet vuorovaikuttavat solutukirangan kanssa ja mahdollistavat viruksen liikkumisen siihen osaan solua, jossa sen replikaatio tapahtuu. Retrovirusten käänteinen transkriptio voi tapahtua vain kapsidin sisällä, joten ne voivat luopua kapsidista vasta transkription jälkeen (Cann, 2005b). Prokaryoottiviruksista mm. $\phi 6$ -bakteriofagi kuoriutuu kapsidistaan vasta solun sisällä (Olkkonen & Bamford, 1989). Kapsidista kuoriutumisen voivat saada aikaan mm. reseptoriin sitoutumisesta tai proteaaseista johtuvat kapsidin konformaatiomuutokset, kemialliset tekijät kuten pH:n lasku tai mekaaninen kapsidin hajotus solun moottoriproteiineja hyödyntämällä (Suomalainen & Greber, 2013).

Kun genomi on solussa, alkavat infektiocyklin seuraavat vaiheet: genomien replikaatio ja proteiinien tuotto. Tässä infektion vaiheessa virus ottaa haltuunsa solun toiminnat ja keskittyy ne replikoimaan genomiaan, tuottamaan siihen tarvittavia molekyylejä sekä kapsidin rakenneproteiineja (Goodwin ym., 2015). Kullakin seitsemällä virusluokalla (kappale 1.3.1) on oma replikaatiomekanisminsa. Kaksijuosteiset DNA-virukset voivat replikoida genominsa joko tumassa tai solulimassa. Tumassa genominsa replikoivat eukaryoottivirukset käyttävät isäntäsolun replikaatiokoneistoa, kun taas solulimassa replikoituvilla viruksilla on itsellään tarvitsemansa koneisto (Cann, 2005b). Eukaryoottien yksijuosteiset DNA-virukset replikoituvat aina tumassa, jossa DNA-juosteelle luodaan vastinpari. Bakteerien ja arkeonien yksijuosteiset DNA-virukset replikoituvat solulimassa (Voyles, 2002). Juosteelle tuotettua vastinparia käytetään uuden yksijuosteisen DNA:n templaattina (Weigel & Seitz, 2006). Kaksijuosteisten RNA-virusten genomi on usein segmentoitunut useaan pätkään. Jokainen RNA-segmentti replikoidaan RNA-riippuvaisen RNA-polymeraasin avulla, joka on pakattuna RNA-viruksen kapsidissa (Poranen, 2002). Yksijuosteisilla RNA-viruksilla genomi on joko positiivisessa(+) tai negatiivisessa(-) konfiguraatiossa. Vain +RNA-juostetta voidaan käyttää lähetti-RNA:na translaatiossa, joten -RNA:lle täytyy ensiksi valmistaa +RNA-vastinpari, jota sitten käytetään translaatioon ja replikaation templaattina. Retrovirukset muuttavat yksijuosteisen +RNA-genominsa käänteisellä transkriptaasilla DNA:ksi. DNA transkriptoidaan takaisin RNA:ksi vasta, kun uusia virioneja aletaan pakata. Luokan seitsemän virukset muuttavat isäntäsolussa DNA-genominsa ensiksi RNA:ksi, jota käytetään translaatioon ja replikaatioon. Replikoitu RNA-genomi muutetaan takaisin DNA:ksi käänteisellä transkriptiolla vasta kapsidien sisällä virusten kypsessä. Replikaatio voi tapahtua viruksesta ja isännästä riippuen joko tumassa tai solulimassa. Replikaation jälkeinen proteiinien tuotanto tapahtuu aina isäntäsolun solulimassa (Cann, 2005b).

1.4.4. Viruspartikkelien kokoamisesta solusta vapautumiseen

Kun genomia on replikoitu tarpeeksi ja rakenneproteiineja tuotettu, alkaa infektion seuraava vaihe: uusien viruspartikkelien kokoaminen. Viruspartikkelin kokoaminen on tapahtuma, jossa kaikki valmiin virionin kokoamiseen tarvittavat komponentit kerätään samaan paikkaan ja viruksen perusrakenne muodostuu (Cann, 2005b). Uskotaan, että virusten kokoaminen ja genomien pakkaus alkaa, kun viruksen proteiineja ja genomimolekyylejä on kertynyt soluun kriittinen pitoisuus, joka laukaisee tapahtuman (Cann, 2005b). Useissa virusinfektioissa solun sisään muodostuu selviä osastoja, joihin viruksen rakennekomponentit konsentroituvat. Tällaisia osastoja kutsutaan inkluusiokappaleiksi, jotka sijaitsevat eri viruslajeilla eri osissa solua (Netherton ym., 2007). Virusproteiinien aminohapposekvenssiin on sisäänkoodattu niiden kokoaminen partikkeleiksi, joten viruspartikkelin kokoaminen tuotetuista proteiineista on passiivinen tapahtuma. Suurella osalla viruksia virionin kokoaminen vaatii kuitenkin myös laskostumista avustavia proteiineja (Mateu, 2013). Perintöainestaan virukset usein muokkaavat ennen pakkaamista mm. liittämällä nukleinihapon päihin proteiineja (Bamford & Mindich, 1984).

Osa viruksista muuttuu infektiivisiksi vasta virusten pakkaamisen jälkeen tapahtuvan maturoitumisen yhteydessä. Maturoituminen voi tapahtua esimerkiksi kapsidin rakenteen muutoksina tai sisäisinä rakennemuutoksina kuten nukleoproteiinien ja genomien välisten vuorovaikutusten muutoksena (Mateu, 2013). Kaikilla viruksilla ei voida nähdä selvää eroa genomien pakkaamisen ja maturaation välillä ja osa viruksista maturoituu vasta solusta vapautumisen jälkeen (Bradley & Johnson, 2014, Cann, 2005b). Infektiocykli päättyy uusien virionien vapautumiseen solusta. Tähän infektion vaiheeseen viruksilla on useita toisistaan poikkeavia menetelmiä. Useat bakteriofagit hajottavat eli lyysaavat isäntäsolun infektiocyklinsä päätteeksi (Weinbauer, 2004). Suuri osa lipidivaipallisista viruksista vapautuu kuroutumalla solukalvosta, jolloin isäntäsolu ei aina kuole (Votteler & Sundquist, 2013). Virus voi ohjata solun myös ohjelmoituaan solukuolemaan eli apoptoosiin tai eksosytoimaan partikkeleita. Tunnetuin virus, joka indusoi isäntäsolun apoptoosin, on varmasti human immunodeficiency virus (HIV) (Sinoussi ym., 1983, Westendorp ym., 1995). Infektiocyklinsä partikkelien eksosytoosiin päättää mm. Vaccinia-virus, jota käytettiin rokotteena isorokon hävittämisessä (Smith & Law, 2004, Jacobs ym., 2009).

Virusinfektion kulussa on suuria eroja erilaista infektiotyypin tyyppiä hyödyntävien virusten välillä. Myös saman viruslajin infektioiden voi olla vaihtelua esimerkiksi isäntäsolun tilasta ja ympäristön stimulaatiosta johtuen. Lyyttisissä infektiotyypissä isäntäsolussa tuotetaan uusia virioneja ja sykli päättyy niiden vapautumiseen solusta ja solun kuolemaan. Kantajatilaisessa infektiossa vain osasta infektoituneesta isäntäsolupopulaatiota vapautuu vähitellen virioneja. Kroonisessa infektiossa kaikista infektoituneista soluista vapautuu virioneja vähitellen kuten latentissa infektiossa (Weinbauer, 2004). Kantajatilaisessa ja kroonisessa infektiossa isäntäsolu pystyy edelleen jakautumaan ja replikoitunut viruksen genomi löytyy myös tytär soluista, joissa infektiot jatkuu edelleen (Ackermann & DuBow, 1987). Infektiotyypit voivat olla tyypiltään myös latenti, jolloin viruksen genomi joko integroituu isäntäsolun genomiin tai pysyy solussa erillisenä episomina. Episomi on kromosomin ulkopuolinen DNA-rengas tai lineaarinen DNA-molekyyli. Latentissa infektiotyypissä virusgenomi replikoituu isäntäsolun genomin tahdissa eikä infektiosta ole muita merkkejä kuin soluissa latentiina pysyvä virusgenomi. Sekä kantajatilainen että latenti-infektio voi jatkua tällä tavalla pitkiäkin aikoja, mutta esimerkiksi solun muuttunut tila voi laukaista syklin muuttumisen lyyttiseksi, jolloin infektiotyypit päättyy virionien vapautumiseen (Cann, 2005b, Weinbauer, 2004).

1.4.5. Arkeonivirusten adsorptio ja soluun tunkeutuminen

Arkeonien virusinfektioiden kulku on pääpiirteittäin sama kuin muillakin viruksilla (kappaleet 1.4.1-1.4.4), mutta niiden molekulaarisia mekanismeja ei juurikaan vielä tunneta. Infektiotyypit uudessa solussa alkaa adsorptiolla, jolloin arkeonivirukset kohtaavat isäntäsolun pinnan S-kerroksen ja muita muista soluista eroavia pintarakenteita (kappale 1.1.2). Tiettyjen arkeonivirusten on havaittu adsorptoituvan isäntäsolun pinnan ulokkeisiin, kuten piluksiin ja arkelloihin, osan arkeoniviruksista tiedetään adsorptoituvan suoraan isäntäsolun pinnalle (Bettstetter ym., 2003, Prangishvili ym., 2013, Prangishvili & Krupovic 2012). Erityisesti filamenttisten arkeonivirusten on havaittu adsorptoituvan isäntäsolun pinnan ulokkeisiin, kun taas hypertermofiillisten arkeonien vaipalliset virukset ovat adsorptionsa aikana vuorovaikutuksessa suoraan isäntäsolun membraaneihin (Quemin ja Quax, 2015).

Genomin saattamista isäntäsolun sisään arkeoniviruksilla ei vielä juurikaan tunneta. Filamenttinen *Sulfolobus islandicus* rod-shaped virus 2 (SIRV-2) adsorptoituu piluksen kärkeen. Myöhemmin partikkelien on huomattu olevan sitoutuneena piluksen reunaan ja lopulta osittain hajonneita partikkeleita on nähty solun pinnalla (Quemin ym., 2013). Sitä, kuinka piluksiin ja arkelloihin adsorptoituvat virukset siirtyvät solun pinnalle ja vapauttavat genominsa soluun, ei vielä tiedetä. Lipidivaipalliset arkeonivirukset saattavat vapauttaa genominsa solun sisälle vaipallisten bakteeri- ja eukaryoottivirusten tapaan eli fuusioitumalla isäntäsolun solukalvoon. On myös esitetty, että pullon muotoisella *Acidianus* bottle-shaped virus (ABV) arkeoniviruksella (Häring ym., 2005) tietyt rakenteet voisivat toimia genomin injektoimisessa soluun bakteriofagien neulamaisen rakenteen tavoin (Quemin ja Quax, 2015).

1.4.7. Arkeonivirusten infektiotyypit

Suurin osa tunnetuista arkeonivirusten morfotyypeistä muodostaa infektiotyypin kroonisen, kantajatilaisen infektiotyyppin, jossa virioneja vapautuu ajan kuluessa, mutta isäntäsolu ei kuole (kappale 1.4.4). Useiden arkeonivirusten genomin tiedetään myös koodaavan integraasia, jonka avulla ne voivat liittää genominsa isäntäsolun genomiin ja muodostaa latentin infektiotyyppin (ks. kappale 1.4.4) (Pina ym., 2011). Hännällisten *Caudovirales* -heimon haloarkeonivirusten on kuitenkin todettu olevan infektiotyypiltään lyyttisiä (Pietilä ym., 2013b ja c, Nuttall & Dyal-Smith, 2002). Toistaiseksi ainoa spiraalinmuotoinen arkeonivirus *Aeropyrum* coil-shaped virus (ACV) on myös infektiotyypiltään lyyttinen (Mochizuki ym., 2012). Hännättömät ikosahedraaliset arkeonivirukset ovat pääasiassa lyyttisiä tai niiden infektiotyypit on indusoitavissa lyyttiseksi (Veesler ym., 2013, Jaakkola ym., 2012, Zhang ym., 2012, Bamford, 2005). Sitruunanmuotoiset arkeonivirukset eivät useimmiten ole lyyttisiä, mutta kasvattamalla isäntäsoluja epäsuotuisissa oloissa on näitä viruksia saatu indusoitua myös lyyttiseen infektiotyypin (Mochizuki ym., 2011, Xiang ym., 2005, Erdmann ym., 2014, Prangishvili ym., 2006, Pietilä, 2013a Geslin ym., 2007). Tutkitut

pleomorfiset, pullon- tai basillinmuotoiset arkeonivirukset eivät ole lyyttisiä (Pietilä ym., 2012, Häring ym., 2005 Mochizuki ym., 2010). Sauvan-, pisanan- ja filamentinmuotoisten virusten on todettu muodostavan kantajatilaisen infektion (Prangishvili ym., 1999, Mochizuki ym., 2011, Arnold ym., 2000, Bettstetter ym., 2003).

Koska arkeonien geenisäätelystä ja geenien ilmentymisestä tiedetään toistaiseksi hyvin vähän, on arkeonivirusten infektiokyklin solunsisäisestä vaiheesta vain vähän tietoa. Geneettisten mallisysteemien kehittäminen arkeonivirusten ja isäntien vuorovaikutusten tutkimiseksi mahdollistaisi arkeonivirusten replikaatiokyklin yksityiskohtaisemman tutkimisen. Geneettisiä virus-isäntämallisysteemejä on kehitetty tällä hetkellä kolme kappaletta ja ne kaikki ovat *Sulfolobus*-isännille (Snyder ym., 2015). Nämä systeemit ovat tarjonneet uutta tietoa mm. proteiinirakenteista sekä geenitoiminnasta ja sen säätelystä (Snyder ym., 2011, Wirth ym., 2011, Happonen ym., 2013). Mallisysteemit ovat mahdollistaneet myös virusvektorin kehittämisen *sulfolobus*-isännälle (Wirth ym., 2011, Stedman ym., 1999).

Useat bakteerien virukset lyysaavat solun holiini-endolysiini mekanismilla. Holiini on viruksen koodaama proteiini, joka muodostaa solukalvoon epäspesifisiä aukkoja. Näiden aukkojen läpi peptidoglykaaniselle pääsee kulkeutumaan endolysiinientsyymiä. Muralyyttinen endolysiini hajottaa soluseinää ja näin ollen solu hajoaa (Prangishvili ja Quax, 2011). On esitetty, että arkeonivirukset voisivat hyödyntää holiineja ja niiden avulla heikentää solukalvoa. Arkeonien genomeista on löytynyt homologeja holiinia koodaaville geeneille, mutta yhdenkään sekvensoidun arkeoniviruksen ei ole todettu kantavan näitä geenejä (Pina ym., 2011). Arkeoneilta ei ole löydetty S-kerrosta hajottavaa entsyymiä.

Kahdella krenarkeoniviruksella, *Sulfolobus* turreted icosahedral virus 1 (STIV-1) ja SIRV-2, on havaittu täysin uniikki mekanismi hajottaa isäntäsolu ja vapauttaa virionit ympäristöön (Bize ym., 2009, Quax, 2011, Prangishvili & Quax, 2011). Infektoidun solun pintaan muodostuu pyramidin kaltaisia ulokkeita (Virus-Associated Pyramide, VAP), jotka aukeavat ja vapauttavat virukset isäntäsolun ulkopuolelle. Näissä pyramidirakenteissa on seitsemän sivua ja niiden kärjet osoittavat ulospäin solusta. Pyramidilla ei ole pohjaa, ja niiden rakenne on ontto. Näitä rakenteita on arvioitu muodostuvan infektoidun solun pinnalle 10–20 kappaletta. Pyramidirakenteet muodostuvat ainoastaan virusten koodaamasta SIRV2-P98- tai STIV1-C92-proteiinista, ja nämä proteiinit järjestäytyvät itsestään seitsensivuisiksi pyramidirakenteeksi. Itsestään järjestäytyvien pyramidirakenteiden löytyminen onkin johtanut ehdotukseen uudesta "virodomi" nimityksestä viruksen koodaamille, autonomisille rakenteille, jotka eivät liity kapsidiin. Rekombinantti-P98 järjestäytyy samalla tavalla myös hypertermofiilisessä *Sulfolobus acidocaldarius* -arkeonissa ja jopa *Escherichia coli* -bakteerissa (Quax ym., 2011). Pyramidirakenteen aukeamista ei kuitenkaan ole havaittu kuin STIV1- ja SIRV2-virusten alkuperäisissä isäntäsoluissa, joten STIV1-92- ja SIRV2-P98-proteiinien lisäksi pyramidien aukeaminen ja virusten vapautuminen vaatii myös jonkin toisen tekijän (Prangishvili ja Quax, 2011). Pyramidirakenteet tunkeutuvat isäntäsolun S-kerroksen ja solukalvon läpi, mutta eivät ennen aukeamistaan aiheuta solun lyysaamista. Elektronimikroskopiolla on nähty, että auenneet pyramidirakenteet ovat yhä kiinni muilta osin ehjässä soluseinässä. Soluseinä on kuitenkin enää vain tyhjä kuori, sillä solun sisältö on vapautunut pyramidirakenteiden kautta ympäristöön (Quax ym., 2011). Pyramidirakenteita muodostuu isäntäsolun pintaan infektiokyklin loppuvaiheessa, mutta kuitenkin ennen viruskapsidien kokoamista (Chi-Yu Fu ym., 2010). Useiden pyramidien yhteydessä isäntäsolun sisäpuolella on havaittu olevan tiheä, pyöreän mallinen kappale (intrapyrimidial body, IPB), jonka merkitystä virusten vapauttamiselle tai pyramidin muodostumiselle ei vielä tunneta. IPB kappaleita on havaittu satunnaisesti sijoittuneina myös infektoimattomissa soluissa, mutta infektoiduissa soluissa ne ovat aina olleet pyramidirakenteen yhteydessä (Prangishvili ja Quax, 2011).

Kuten osa bakteeri- ja eukaryoottiviruksista, myös monet arkeoniviruksista vapauttavat virioneja solusta ilman solun lyysausta. Tämän infektiokyklin vaiheen yksityiskohtaisia mekanismeja arkeoneilla ei ole kuvattu vielä lainkaan. On kuitenkin esitetty, että lipidivaipalliset arkeonivirukset saattaisivat kuroutua

solukalvon läpi kuten useat eukaryoottien virukset (Quemin ja Quax, 2015). Esimerkiksi pleomorfisten arkeonivirusten uskotaan vapautuvan kuroutumalla, sillä niiden lipidivaipan koostumus on sama kuin isäntäsoluilla (Pietilä ym., 2010 ja 2012, Roine ym., 2010). Mekanismeja kuroutumisen takana tunnetaan erityisesti eukaryoottiviruksilta. Niiden tiedetään joko hyödyntävän isäntäsolun mekanismeja vesikkeleiden muodostamiseen tai käyttävän itsekkoodaamiaaan leikkausproteiineja solukalvoa läpäistessään (Quemin ja Quax, 2015). Muutaman eukaryoottiviruksen tiedetään hyödyntävän isäntäsolun omaa vesikkeleiden muodostamiseen perustuvaa lajittelumekanismia (endosomal sorting in the multi vesicular body, ESCRT). ESCRT-mekanismiin homologiproteiinit osallistuvat useissa arkeonisolussa solun jakautumiseen, mutta niiden mahdollista roolia myös virusten kuroutumisessa on pohdittu (Makarova ym., 2010, Quemin ja Quax, 2015).

2. Työn tausta ja tavoitteet

2.1. HVTV-1

Haloarcula vallismortis on äärimmäisen halofiilinen euryarkeoni, jota infektoiva virus, *Haloarcula vallismortis* tailed virus 1 (HVTV-1), on hännällinen siphovirus. Tälle isännälle tunnetaan toinenkin hännällinen virus, *Haloarcula* tailed virus 2 (HVTV-2), joka on myös siphovirus (Atanasova ym., 2012). Siphovirusten häntärakenne on pitkä ja supistumiskyvytön (Ackermann, 1999). Tässä työssä tutkitaan HVTV-1 -virusta, joka on yksi kolmesta hännällisestä arkeoniviruksesta, joiden kapsidien kolmiulotteinen rakenne on ratkaistu (Pietilä ym., 2013b, Pietilä ym. 2013c). HVTV-1-viruksen kapsidin on todettu sisältävän pääasiallisen kapsidiproteiinin lisäksi myös koriste proteiinin. Tämä koriste proteiini todennäköisesti muodostaa trimeerisiä rakenteita jokaisen pääasiallisen kapsidiproteiini-heksameerin keskelle ja stabiloi näin kapsidin rakennetta. Viruksen genomi on sekvensoitu ja siitä on tunnistettu pääasiallista kapsidiproteiinia koodaava geeni sekä hännän rakenteisiin, virionin kokoamiseen, nukleotidimetaboliaan ja DNA:n replikaatioon liittyviä geenejä. Viruksen genomi on kaksijuosteinen DNA-molekyyli, jonka on todettu olevan homologinen *Haloarcula californiae*-arkeonia infektoiville *Haloarcula californiae* tailed virus 1 (HCTV-1) ja *haloarcula californiae* tailed virus 5 (HCTV-5) viruksille (Pietilä ym., 2013b). Merkittävää samankaltaisuutta muiden virusten genomeihin ei ole havaittu (Senčilo & Roine, 2014). HVTV-1-viruksen infektiocykliä on tutkittu tarkastelemalla infektoitun *H. vallismortis*-kasvatuksen turbiditeettia ja virustiitteriä tietyissä aikapisteissä. Näissä samoissa aikapisteissä kasvatuksesta on otettu myös näytteet, joista valmistettiin ohutleikepreparaatteja elektronimikroskopiolla tarkasteltaviksi. Tämän aiemman tutkimuksen perusteella tiedetään, että HVTV-1-viruksen infektiocykli on lyyttinen, virusten adsorptio on nopeaa ja syklin solunsisäinen vaihe on pitkä, noin 10-12 tuntia (Pietilä ym., 2013b).

2.2. Työn tavoitteet

Arkeonit ovat bakteereihin ja eukaryooteihin nähden vähiten tutkittu elämän domeeni ja myös niiden viruksia on tutkittu vielä verrattain vähän. Arkeoniviruksia on eristetty noin 130 (Atanasova ym., 2015a), mutta niistä vain murto-osaa on tutkittu tarkemmin. Halofiiliset arkeonit elävät korkeissa suolapitoisuuksissa ja niiden kasvattaminen laboratorio-oloissa voi olla hankalaa. Jos arkeoneja ei pystytä viljelemään, niitä infektoivien virusten yksityiskohtainen tutkiminen on haastavaa, ellei mahdotonta. Haloarkeoneille on kuvattu tähän mennessä noin 90 virusta (Atanasova 2015a). Tästä virusjoukosta vain kouralliselle on tehty tarkempia tutkimuksia ja tietämys niiden elinkierroista on vielä hyvin vähäistä. Tietämys erityisesti arkeonien hännällisistä viruksista on vähäistä. Kaikki tunnetut hännälliset arkeonivirukset infektoivat euryarkeoneja ja useimmiten juuri halofiilisiä arkeoneja. Tutkimustieto näistä viruksista on pääosin genomitasoista ja vain kolmen viruksen, HVTV-1-, *Halorubrum sodomense* tailed virus 2 (HSTV-2) ja *Haloarcula sinaiensis* tailed virus 1 (HSTV-1) virionirakenteet on selvitetty (Pietilä ym., 2013a, Pietilä ym., 2013b). Samassa tutkimuksessa on saatu myös tietoa näiden virusten infektiocykleistä sekä genomeista.

HVTV-1-viruksen infektiocykliä on tutkittu aiemmin (Pietilä ym., 2013b), ja samalla on havaittu, että infektoitujen solujen pintaan muodostuu pallomaisia mollurarakenteita (Maija Pietilä, henkilökohtainen tiedonanto). Nämä erikoiset rakenteet havaittiin infektiocyklin loppuvaiheessa. Tämä mielenkiintoinen havainto antoi kipinän tälle työlle, jonka tärkeimpiä tavoitteita on HVTV-1-viruksen infektiocyklin yksityiskohtaisempi tutkiminen.

Tässä työssä on kaksi keskeistä osa-aluetta: 1) viruksen adsorption tarkempi tutkiminen sekä 2) mollurarakenteen analysoiminen. Adsorptiosta haluttiin selvittää, kuinka nopeaa ja tehokasta se on sekä muodostuuko infektoituun soluun superinfektioekskluusio. Viruksen adsorptiota tarkasteltiin myös läpivalaisuelektronimikroskopiolla ja selvitettiin, mihin kohtaan solua virukset kiinnittyvät.

Mollurarakenteesta pyrittiin selvittämään, milloin ne muodostuvat ja mistä ne koostuvat. Työn tavoitteena

oli ymmärtää mollurarakenteen merkitystä HVTV-1:n infektiocyklissä. Aiemmin STIV-1- ja SIRV-2- arkeonivirusinfektioiden yhteydessä solujen solukalvoon on nähty muodostuvan pyramidinmallisia rakenteita, jotka infektiocyklin lopuksi avautuvat ja vapauttavat virionit solun ulkopuolelle (Prangishvili ja Quax, 2011). Pyramidien sisäpuolella on nähty myös pallomaisia rakenteita. Näitä solun ulkopinnan pyramidirakenteita on puhdistettu ultrasentrifugoinnilla, joten pyrittiin myös puhdistamaan mollurarakenteita. Arkeonivirusten muita liysismekanismeja näiden pyramidirakenteiden lisäksi ei vielä tunneta yksityiskohtaisesti, joten tässä työssä yhtenä tavoitteena oli arvioida, voisivatko nämä mollurat liittyä HVTV-1-viruksen liysausmekanismiin.

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1. Virus- ja isäntäkanta sekä kasvatusalustat ja -olosuhteet

Työssä käytetty isäntäkanta oli *Haloarcula vallismortis* ATCC 29715 (Torreblanca ym., 1986) ja tutkittava virus HVTV-1 (Pietilä ym., 2013, Atanasova ym., 2012). *Har. vallismortis* -kanta kasvatettiin aerobisissa olosuhteissa 37 °C:n lämpötilassa.

Käytettiin muokattuja kasvatusalustoja (modified growth media, MGM). Näiden kasvatusalustojen pohjana oli 30 % (w/v) suolavesi, joka sisälsi 240 g NaCl, 30 g MgCl₂ · 6H₂O, 35 g MgSO₄ · 7H₂O, 7 g KCl, 5 ml 1 M CaCl₂ · 2H₂O ja 80 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.2) litrassa vettä (The halohandbook, 2009, <http://www.haloarchaea.com/resources/halohandbook>, sivut 11-15). Kasvatusalustojen valmistuksessa suolavettä käytettiin seuraavasti: MGM-liemessä oli 23 % (w/v), pehmytagarissa 18 % (w/v) ja maljoissa 20 % (w/v) suolavesi. Ohutleikenäytteitä (kappale 3.5.3) varten isäntäkanta kasvatettiin MGM-2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid (MES)-kasvatusliemessä. Tässä liemessä Tris-HCl oli korvattu 1 M MES-puskurilla, jonka pH oli 6,7. Kasvatusalustojen valmistusohjeet ovat liitteessä 1.

Titraukset tehtiin sekoittamalla putkessa 300 µl stationäärivaiheeseen kasvatettua isäntäkanta, 100 µl viruslaimennosta ja 3 ml MGM-pehmytagaria. Seos maljattiin MGM-maljoille ja kasvatettiin kolmen yön yli, jolloin plakit olivat selkeästi näkyvissä.

3.2. Viruksen agarstokin valmistus

Agarstokit valmistettiin kuten Pietilä ym., 2013b -julkaisussa. HVTV-1 maljattiin isäntänsä kanssa sopivana laimennoksena niin, että maljat olivat puoliksi syötyjä eli semikonfluentteja. Semikonfluentit maljat valmistettiin maljaamalla, kuten kappaleessa 3.1. on kerrottu. Sopiva laimennos määritettiin kokeilemalla eri laimennoksia, jotka oli tehty MGM-liemeen.

Semikonfluenttien maljojen pehmytagar-kerros kaavittiin erlenmayer-pulloon, johon lisättiin 2 ml MGM-lientä yhtä kaavittua maljaa kohden. Seosta inkuboitiin 1,5 tuntia ravistelussa 37 °C:n lämpötilassa. Inkuboinnin jälkeen pehmytagar sekä isäntäkannan solut ja soluriekaleet kerättiin pois sentrifugoimalla (Thermo Scientific F12 roottori, 10 000 rpm, 20 min, 4 °C). Supernatantti eli agarstokki titrattiin ja säilytettiin 4 °C:n lämpötilassa.

3.3. HVTV-1-viruspartikkelien puhdistus

Viruksen puhdistus tehtiin kuten aiemmin on julkaistu (Pietilä ym., 2013b). Virus kasvatettiin nestekasvatuksessa, josta soluriekaleet poistettiin lyysauksen jälkeen ja virukset saostettiin. Saostetut virukset puhdistettiin edelleen liikkuvan vyöhykkeen sentrifugoinnilla sakkaroosigradientissa sekä tasapainosentrifugoinnilla cesiumkloridigradientissa.

3.3.1. HVTV-1-nestekasvatus

Neljän yön yli kasvaneesta *Har. vallismortis* kasvatuksesta tehtiin nuorennokset tuoreeseen MGM-liemeen niin, että niiden absorbanssi aallonpituudella 550 nm oli 0,1. Nuorennoksia kasvatettiin ravistelussa logaritmisen kasvunvaiheen puoliväliin (3×10^8 solua/ml) eli kunnes absorbanssiksi mitattiin 0,7 (n. 24 h). Kasvatukset infektoitiin multiplicity of infection (MOI) -arvolla 10 eli jokaista isäntäsolua kohti lisättiin 10 infektiivistä virusta. Virusten annettiin adsorptoitua 30 min 37 °C:n lämpötilassa ilman ravistelua. Tämän jälkeen infektoidut kasvatukset siirrettiin yli yön ravisteluun samaan lämpötilaan. Seuraavaksi nestekasvatus käsiteltiin DNase I -entsyymillä (Sigma-Aldrich) lisäämällä sitä kasvatukseen 70 µg/ml ja inkuboimalla ravistelussa 30 min 37 °C:n lämpötilassa. Hajonneiden solujen riekaleet poistettiin kasvatuksista sentrifugoimalla (Thermo Scientific F12 roottori, 8000 rpm, 30 min, 15 °C). Supernatantista otettiin näyte, josta titrattiin sopivat laimennokset puhdistuksen kulun seuraamiseksi.

3.3.2. Virusten polyetyleeniglykolisaostus ja aggregaattien poistaminen virusnäytteestä
Viruspartikkelit saostettiin sentrifugoidusta nestekasvatuksesta polyetyleeniglykoli 6000:lla (PEG6000). Kasvatukseen lisättiin 10 % (w/v) PEG6000, jonka annettiin liueta tunnin ajan 4 °C:ssa magneettisekoituksessa. Saostetut viruspartikkelit kerättiin sentrifugoimalla (Thermo Scientific F12 roottori, 8000 rpm, 40 min, 15 °C). Supernatantti poistettiin ja siitä otettu näyte titrattiin. Sentrifugointiputket huuhdeltiin 18 % suolavedellä seinämille mahdollisesti jääneen PEG:n poistamiseksi. Viruspelletti liuotettiin 18 % suolaveteen yön yli jäällä.

Liuotetut viruspartikkelit sentrifugoitiin aggregaattien poistamiseksi (Sorvall F28/50 -roottori, 9000 rpm, 10 min, 15 °C) ja supernatantti kerättiin talteen ja siitä otettu näyte titrattiin.

3.3.3. Viruspartikkelien puhdistus gradienteissa ja konsentroidi
PEG-saostetut virukset puhdistettiin ensin liikkuvan vyöhykkeen sentrifugoinnilla sakkaroosigradienteissa. Puhdistuksessa käytettiin 5 ja 20 % (w/v) sakkaroosiliuoksia, jotka oli valmistettu 18 % suolaveteen. Näistä liuoksista valmistettiin lineaarisia sakkaroosigradienteja Sorvallin AH629 –putkiin Biocomp Gradientmaster 105 sekoittajalla käyttäen seuraavia asetuksia: 76/18/2:30 (kulma/nopeus/aika).

PEG-saostetut virukset pipetoitiin sakkaroosigradienttiputkien pinnalle ja sentrifugoitiin (Sorvall AH629 roottori, 24 000 rpm, 1 h 5 min, 15 °C). Sentrifugoinnin jälkeen valoa siroavat, sinertävät virusvyöhykkeet (1 x puhdistettu virus) kerättiin gradienttiputkista pipetoimalla. Virusvyöhykkeestä otettiin näyte, joka titrattiin.

Sakkaroosissa puhdistetut viruspartikkelit puhdistettiin edelleen tasapainosentrifugoinnilla cesiumkloridissa. Tasapainosentrifugaatiossa käytettiin cesiumkloridiliuosta, jonka tiheys oli 1,4 g/ml ja joka oli valmistettu 18 % suolaveteen. AH629-putkiin laitettiin 26 ml cesiumkloridiliuosta. Liuoksen päälle pipetoitiin 10 ml liikkuvan vyöhykkeen sentrifugoinnista kerättyä virusnäytettä. Gradientteja sentrifugoitiin (Sorvall AH629 roottori, 20 000 rpm, 20 h, 15 °C) ja valoa siroava virusvyöhyke kerättiin. Kerätystä virusvyöhykkeestä otettiin näyte titrausta varten. Vyöhyke laimennettiin kaksinkertaiseen tilavuuteen 18 % suolavedellä, jossa ei ollut natriumkloridia ja puhdistetut viruspartikkelit konsentroitiin (Sorvall T647.5-roottori, 32 000 rpm, 3 h, 15 °C). Viruspelletin annettiin liueta yli yön jäällä 9 % suolaveteen. Liuotetusta viruspelletistä (2 x puhdistettu virus) otettiin näyte titrausta varten.

3.4. Viruksen adsorption tutkiminen

3.4.1. Adsorptiotesti

Adsorptiotesti tehtiin aiempaa HVTV-1-tutkimusta (Pietilä ym., 2013b) mukailten. Testissä käytettiin logaritmisen kasvun vaiheessa olevia *Har. vallismortis*-soluja, joiden absorbanssi aallonpituudella 550 nm oli 0,7. Kasvatusta otettiin 1 ml eli soluja noin 3×10^8 , jotka infektoitiin 1500 infektiivisellä HVTV-1-partikkelilla. Kontrollina käytettiin samaa tilavuutta MGM-lientä, johon lisättiin 1500 viruspartikkelia. Kontrollia ja infektoitua näytettä käsiteltiin tästä eteenpäin samalla tavalla. Infektion jälkeen näytteitä pidettiin 37 °C:n lämpötilassa ilman ravistelua. Näistä otettiin 120 µl:n näytteet 1, 5, 15, 30 ja 60 min infektion jälkeen. Näytteistä poistettiin solut sentrifugoimalla heti näytteenoton jälkeen (Eppendorf Centrifuge 5415 D, 13 000 rpm, 2 min, huoneenlämmössä (RT)). Sitoutumattomien partikkelien osuus selvitettiin titraamalla supernatantti. Titrausputkissa sekoitettiin 50 µl supernatanttia, 300 µl isäntäkasvatusta sekä 3 ml MGM-pehmytagaria. Jokaisesta aikapisteestä tehtiin rinnakkaiset titraukset. Seokset maljattiin MGM-maljoille. Adsorptioprosentit laskettiin muodostuneista plakeista seuraavasti: $100 - [(testimaljan plakit/kontrollimaljan plakit) \times 100]$. Adsorption nopeutta kuvaa sille laskettu adsorption rate-luku, joka laskettiin seuraavan kaavan avulla: $k = (2,3/Bt) \times \log(P_0/P)$, jossa B on solujen konsentraatio, P_0 on adsorptioitumattomien virusten osuus alussa, P on adsorptioitumattomien virusten osuus lopussa ja t on aikaväli (Adams, 1959).

3.4.2. Reseptorisaturaatiokoe

Tämä testi tehtiin Quemin ym., 2013 artikkelin esimerkin mukaan. Testissä käytettiin logaritmisen kasvun vaiheessa olevia *Har. vallismortis* -soluja ja ne infektoitiin kuudella eri MOI -arvolla, joista jokaista varten otettiin 1 ml isäntäkasvatusta. Testatut MOI-arvot olivat: 5×10^{-6} ; 5×10^{-3} ; 0,1; 1; 10 ja 50. Kasvatukseen lisättiin MGM-lientä niin, että kaikissa putkissa oli sama lopputilavuus kuin MOI-arvolla 50 infektoidussa putkessa. Jokaiselle MOI-arvolla laitettiin oma kontrolli, jossa 1 ml:an MGM-lientä lisättiin vastaava virusmäärä. Virusten annettiin adsorptiota 37 °C:n lämpötilassa ilman ravistelua 30 min. Kasvatuksista poistettiin solut sentrifugoimalla (Eppendorf Centrifuge 5415 D, 13 000 rpm, 2 min, RT). Sitoutumattomien virusten osuus selvitettiin titraamalla supernatanttia tai sen laimennosta taulukon 1 mukaan. Kaikkia näytteitä ei voinut titrata sellaisenaan, vaan niitä täytyi laimentaa, jotta eri MOI-arvoilla infektoitujen kasvatusten tulokset olisivat vertailukelpoisia. Titraukset tehtiin muuten samoin kuin tavallisessa adsorptiotestissä ja adsorptioprocentit laskettiin kuten edellä.

MOI	titrauksessa käytetty laimennos	käytetyn laimennoksen tilavuus
5×10^{-6}	-	50 µl
5×10^{-3}	10^{-3}	50 µl
0,1	10^{-5}	50 µl
1	10^{-6}	50 µl
10	10^{-7}	50 µl
50	10^{-7}	10 µl

Taulukko 1. Reseptorisaturaatiokokeen titrauksessa käytetyn supernatantin tai sen laimennosten tilavuudet.

3.4.3. Superinfektio testi

Superinfektio testi tehtiin Quemin ym., 2013 julkaisun esimerkin mukaan. Testissä käytettiin logaritmisen kasvun vaiheessa olevia *Har. vallismortis* -soluja. 15 ml:n kasvatusta eli noin $4,5 \times 10^9$ isäntäsolua infektoitiin MOI-arvolla 10. Virusten annettiin adsorptiota 30 min ajan 37 °C:n lämpötilassa ilman ravistelua. Kontrollina oli sama tilavuus isäntäkasvatusta, johon lisättiin virusinfektiota vastaava tilavuus MGM-lientä. Vapaat virukset poistettiin sentrifugoimalla (Sorvall F28/50 roottori, 10 000 rpm, 10 min, 20 °C). Supernatantti poistettiin ja solupelletti resuspensoitiin 15 ml:n tilavuuteen MGM-lientä. Superinfektiota varten 1 ml infektoitua isäntäsolukasvatusta ja kontrollikasvatusta infektoitiin uudelleen 1500 viruspartikkelilla. Toisena kontrollina oli 1 ml MGM-lientä, johon lisättiin tässä vaiheessa myös 1500 viruspartikkelia. Virusten annettiin adsorptiota kuten edellä. Infektoiduista kasvatuksista otettiin 120 µl:n näyte, josta poistettiin solut sentrifugoimalla (Eppendorf Centrifuge 5415 D, 13 000 rpm, 2 min, RT). Sitoutumattomien virusten osuus selvitettiin titraamalla supernatanteista 50 µl kuten adsorptiotestissä.

3.4.4. Adsorptionäytteiden valmistaminen elektronimikroskopiaa varten

Har. vallismortis -solujen negatiivivärjäyksen optimoimiseksi logaritmisen kasvun vaiheeseen kasvatetut solut kerättiin sentrifugoimalla (Eppendorf Centrifuge 5415 D, 5000 rpm, 5 min, 4 °C) ja resuspensoitiin alkuperäiseen tilavuuteen 23 % suolavettä. Pesu toistettiin kuten edellä. Työssä testattiin myös MGM-liemeen resuspensoituja soluja, jotka käsiteltiin kuten edellä, mutta 23 % suolaveden sijaan käytettiin MGM-lientä. Viruksen adsorptiota varten *Har. vallismortis* -soluja kasvatettiin logaritmisen kasvun vaiheeseen ja infektoitiin MOI-arvolla 50. Adsorptio pysäytettiin aikapisteissä 1, 15 ja 30 min siirtämällä 1

ml:n näytteet jälle 4 °C lämpötilaan. Kontrollina oli kasvatus, johon lisättiin virusstokkia vastaava tilavuus MGM-lientä. Jokaisesta aikapisteestä valmistettiin kaksi näytettä: pestyt ja pesemättömät solut. Pestyjen solujen näyte valmistettiin keräämällä solut 1 ml:n tilavuudesta sentrifugoimalla (Eppendorf Centrifuge 5415 D, 5000 rpm, 5 min, 4 °C) ja resuspensoimalla ne samaan tilavuuteen 23 % suolavettä. Pesu toistettiin kuten edellä, mutta solujen konsentroiduksi resuspensoitiin puoleen alkuperäisestä tilavuudesta.

3.5. HVTV-1-infektoitujen *Har. vallismortis* -solujen tuottaminen

3.5.1. HVTV-1/*Har. vallismortis* kasvukäyrän tarkistaminen

Neljän yön yli kasvaneesta *Har. vallismortis* -kasvatuksesta tehtiin nuorennokset tuoreeseen MGM-liemeen niin, että niiden absorbanssi aallonpituudella 550 nm oli 0,1. Nuorennoksia kasvatettiin ravistelussa logaritmisen kasvunvaiheen puoliväliin (3×10^8 solua/ml) eli kunnes kasvatuksen absorbanssi oli 0,7. Kasvatukset infektoitiin MOI-arvolla 10. Virusten annettiin adsorptiota 30 min 37 °C:n lämpötilassa ilman ravistelua, minkä jälkeen vapaat virukset poistettiin sentrifugoimalla (Sorvall 600 roottori, 10 000 rpm, 10 min, 20 °C). Solut resuspensoitiin samaan tilavuuteen MGM -lientä kuin ennen sentrifugointia ja sentrifugointiin uudelleen kuten edellä. Pestyt solut resuspensoitiin jälleen samaan tilavuuteen tuoretta MGM-lientä ja siirrettiin takaisin kasvamaan. Kasvatusten absorbanssia 550 nm:n aallonpituudella seurattiin koko kasvatuksen ajan Selecta Clormic -laitteella. Virustuoton seuraamiseksi kasvatuksista otettiin 1 ml:n näytteet seuraavissa aikapisteissä: heti infektion jälkeen, 5, 10, 12 ja 16 h infektion jälkeen ja näytteet titrattiin. Kontrollikasvatusta ei infektoitu, vaan siihen lisättiin virusstokkia vastaava tilavuus MGM-lientä.

3.5.2. HVTV-1/*Har. vallismortis*-näytteiden valmistaminen proteiinigeelielektroforeesia varten
HVTV1/*H.vallismortis*-kasvatus tehtiin samoin kuin kasvukäyrää määritettäessä (kappale 3.5.1) Näytteet, 2x1 ml, otettiin seuraavissa aikapisteissä: heti infektion jälkeen, eli 0 h, vapaiden virusten poistamisen jälkeen, 5, 8, 10, 12, 14 ja 16 h infektion jälkeen. Näytteenottohetkellä mitattiin myös kasvatuksen absorbanssi 550 nm:n aallonpituudella. Seuraavaa kaavaa käyttäen kaikkiin proteiininäytteisiin saatiin sama määrä soluja: $xx = (\text{näytteen } OD_{550}/0,9) \times 200 \mu\text{l}$, $yy = (xx/200) \times 40 \mu\text{l}$. Kaavassa xx tarkoittaa solupelletin liuottamiseen käytettyä Tris-HCl-puskurin (pH 7,2) tilavuutta ja yy 7x näytepuskurin tilavuutta. Aiemmin on todettu, että $A_{550}=0,9$, on sopiva vertailukohde.

Näytteet käsiteltiin seuraavalla tavalla:

1 a. Yhdestä 1 ml:n näytteestä poistettiin solut ja soluriekaleet sentrifugoimalla (Eppendorf Centrifuge 5415 D, 13 000 rpm, 5 min, RT). Supernatantista otettiin 200 μl , johon sekoitettiin 40 μl 7x näytepuskuria (koostumus liitteessä 3). Pelletti resuspensoitiin xx μl :an 20 mM Tris-HCl (pH 7,2)-puskuria ja näytteeseen lisättiin vielä yy μl :a 7x näytepuskuria. Pellettinäytteet vorteksoitiin kromosomaalisen DNA:n pilkkomiseksi.

1 b. Supernatanteista tehtiin myös TCA saostus (kappale 3.7.2). Sakat liuotettiin 1,5x näytepuskuriin, jonka tilavuus laskettiin seuraavasti: $[(xx/200) \times 40 \mu\text{l}]/5$. Liuotustilavuus oli siis viisi kertaa pienempi kuin pellettinäytteillä, koska myös lähtötilavuus oli samassa suhteessa pienempi.

2. Toisesta 1 ml:n näytteestä otettiin xx μl , johon sekoitettiin yy μl 7x näytepuskuria.

3.5.3. HVTV-1/*Har. vallismortis* -näytteiden valmistaminen ohutleikkeitä varten

Kasvatus tehtiin samoin kuin kasvukäyrämäärityksessä (kappale 3.5.1), mutta kasvatukseen käytettiin MES-MGM-lientä. Kasvatuksesta määritettiin myös absorbanssi ja virustuotto samoin kuin *Har. vallismortis* kasvukäyrää tarkistaessa, jotta voitiin varmistua siitä, että virustuotto on normaali. HVTV-1/*Har. vallismortis* MGM-MES kasvatuksesta otettiin 3 ml:n näytteet samoissa aikapisteissä kuin geelinäytteet oli otettu. Näytteisiin lisättiin 3 ml 3 % (v/v) glutaraldehydiä (Sigma-Aldrich) MGM-MES-liemessä ja inkuboitiin 20 min huoneenlämmössä. Glutaraldehydikäsittely tehtiin näytteiden fiksaamista varten. Solut kerättiin

sentrifugoimalla (Eppendorf Centrifuge 5810R, A-4-62-roottori, 4000 rpm, 10 min, 4 °C) ja muodostunut solupelletti resuspensoitiin MES-MGM-liemeen. Solut pestiin kaksi kertaa sentrifugoimalla (Eppendorf Centrifuge 5415 D, 5000 rpm, 5 min, 4 °C) ja resuspensoimalla MES-MGM-liemeen. Näytteet sentrifugoitiin vielä kerran kuten edellä solupelletin muodostamiseksi.

3.5.4. HVTV-1/*Har. vallismortis* -näytteiden valmistaminen lipidianalyysiä varten
Har. vallismortis soluja kasvatettiin logaritmissen kasvun vaiheeseen ja infektoitiin MOI-arvolla 10. Virusten annettiin adsorptiota 30 minuuttia 37 °C lämpötilassa, minkä jälkeen kasvatukset siirrettiin ravisteluun. Infektion annettiin jatkua 10 tunnin ajan. Kontrollina käytettiin infektoimattomia kasvatuksia. Kasvatuksista kerättiin solut sentrifugoimalla (Sorvall SA-600 roottori, 12 000 rpm, 15 min, 20 °C) Infektoiduista kasvatuksista solujen keräämiseen käytettiin koko tilavuus. Kontrollikasvatuksista otettiin näyte seuraavan kaavan mukaan: (infektoidun kasvatuksen absorbanssi 550 nm/kontrollikasvatuksen absorbanssi 550 nm:n aallonpituudella) x kasvatustilavuus. Solut resuspensoitiin 18 % suolaveteen.

3.5.5. Mollurarakenteiden puhdistus

Logaritmissen kasvuvaiheen *Har. vallismortis* -solut infektoitiin MOI-arvolla 10. Infektion annettiin jatkua 16 h ajan, minkä jälkeen soluriekaleet poistettiin sentrifugoimalla (Thermo Scientific F12 roottori, 8000 rpm, 30 min, 15 °C). Supernatantista otettiin näyte liikkuvan vyöhykkeen sentrifugointia varten ja loput supernatantista jaettiin kahteen yhtä suureen osaan. Toisen osan proteiinit saostettiin 5 ja toisen 10 % PEG6000:lla. Saostus, resuspensointi ja aggregaattien poisto tehtiin kuten aiemmin (kappale 3.3.2)

Aggregaattien poiston jälkeen 5 ja 10 % PEG-käsitellyt näytteet sekä ennen PEG-saostusta otettu näyte puhdistettiin liikkuvan vyöhykkeen sentrifugoinnilla (TH641, 21 000 rpm, 15 min, 15 °C) 5-20 % sakkaroosigradientissa, joka oli tehty 18 % suolaveteen. Gradienttien valmistuksessa käytettiin Gradient Masterin asetuksia 81,5/15/2:25 (kulma/nopeus/aika). 10 % PEG-käsitellyn ja käsittelemättömän näytteen gradientit fraktioitiin 1 ml:n fraktioihin ja pelletti resuspensoitiin 18 % suolaveteen. Fraktiot ja resuspensoitu pellettinäyte saostettiin trikloorietikkahapolla (TCA) (kappale 3.7.2).

3.6. Elektronimikroskopia

2x puhdistetut viruspartikkelit (kappale 3.3.3) ja *Har. vallismortis* -solut (kappale 3.4.4) negatiivivärjättiin 1 % (w/v) kaliumfosfowolframaatilla (KPT) (pH 6,5) tai 3 % (w/v) uranyyliasetaatilla (UA) (pH 4,5) taulukon 2 mukaisesti. Adsorptiokasvatuksesta (kappale 3.4.4.) kerätyt solunäytteet värjättiin 3 % (w/v) UA:lla (pH 4,5) käyttäen 10 sekunnin värjäysaikaa. Värjäykset suoritettiin pipetoimalla 2 µl näytettä hilalle. Näytteen annettiin adsorptiota kahden minuutin ajan, minkä jälkeen näytteet värjättiin pitämällä hilaa väripisaran pinnalla valitun värjäysajan mukaisesti. Lopuksi hila kuivattiin imupaperilla. *Har. vallismortis* -soluista (kappale 3.5.3) tehtiin ohutleikkeet elektronimikroskopian yksikössä (Helsingin yliopisto, Biotekniikan instituutti). Sekä negatiivivärjättyt näytteet että ohutleikenäytteet tutkittiin JEOL JEM-1400-elektronimikroskoopilla (kiihdytysjännite 80 kV).

Taulukko 2. Läpivalaisuelektronimikroskoopilla tutkittuihin näytteisiin kokeillut negatiivivärit ja värjäysajat.

Näyte	Käytetty negatiiviväri	Värjäysaika (sekuntia)
<i>Har. vallismortis</i> -solut	UA	10 ja 30
HVTV-1-partikkelit	UA ja KPT	30

3.7. Proteiinianalyysit

3.7.1. Proteiinipitoisuuden määrittäminen

Proteiinipitoisuuden määrittämiseen käytettiin Bradfordin menetelmää (Bradford, 1976). Ensiksi määritettiin standardisuora naudnan seerumin albumiinista (bovine serum albumine, BSA) tehdyllä proteiiniliuoksella. BSA-liuoksen pitoisuus oli 2 mg/ml, josta 96-kuoppalevyn kuoppiin laimennettiin standardikäyrään käytetyt määrät: 1, 2, 3 ja 4 µg. BSA laimennettiin deionisoituun veteen. Laimennoksia pipetoitiin 100 µl kuoppalevyn kuoppiin ja lisättiin sama tilavuus Bradfordin reagenssia (koostumus liitteessä 2). Standardiliuosten absorbanssit mitattiin Eppendorf BioPhotometer -laitteella 595 nm:n aallonpituudella, ja näistä tuloksista piirrettiin standardisuora. 2x puhdistetuista HVTV-1-partikkeleista tehtiin deionisoituun veteen 1:10-, 1:50-, 1:100- ja 1:500 -laimennokset, joiden absorbanssit mitattiin kuten edellä. HVTV-1-näytteen proteiinipitoisuus määritettiin vertaamalla absorbanssia standardikäyrään.

3.7.2. Proteiinien TCA-saostus

2x puhdistettujen HVTV-1-viruspartikkelien (ks. kappale 3.3.), *Har. vallismortis* -solunäytteiden (ks. kappale 3.5.2.) ja mollurarakenteen puhdistuksen fraktioiden (ks. kappale 3.5.5.) proteiinit TCA-saostettiin. Näytteisiin lisättiin 100 % (v/v) TCA:ta niin, että loppupitoisuus oli 10 %. Näytteitä inkuboitiin jäällä 30 min ja saostuneet proteiinit kerättiin sentrifugoimalla (Eppendorf Centrifuge 5415 D roottori, 13000 rpm, 30 min, 4 °C). Supernatantti poistettiin vesi-imulla ja pelletit liuotettiin 50 µl:an 1,5 kertaista näytepuskuria (koostumus liitteessä 3).

Saostus tehtiin 2x puhdistetun virusnäytteen 8, 10 ja 12 µg proteiinipitoisuuksille. Eppendorf-putkiin laitettiin valittu pitoisuus virusnäytettä ja ennen TCA-saostusta näytilavuus nostettiin 450 µl:an 9 % suolavedellä.

3.7.3. Geelielektroforeesit

Kaikkia geelinäytteitä keitettiin 5 min ajan ennen geeliin lataamista. Standardina geeleissä käytettiin PageRuler™ Unstained Protein Ladder –proteiinistandardia (Thermo Scientific). Elektroforeesin jälkeen geelejä värjättiin noin tunnin ajan Coomassie Blue –värissä, minkä jälkeen sitoutumaton väri poistettiin 10% (v/v) etikkahapossa yön yli. Geelien valmistusohjeet ovat liitteessä 2.

2x puhdistetut, TCA-saostetut HVTV-1-partikkelit analysoitiin trisiini-natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (trisiini-SDS-PAGE), jonka ylägeelin akryyliamidipitoisuus oli 5 % (w/v) ja erotusgeelin 14 % (w/v). Geelielektroforeesissa asetukset olivat 80 V, 60 mA, yli yön.

HVTV-1-infektoitujen solujen (kappale 3.5.2) proteiinikoostumuksen muutoksia eri aikapisteissä analysoitiin trisiini-SDS-PAGE-geelissä, joissa ylägeelin akryyliamidipitoisuus oli 5 % (w/v) ja erotusgeelin 8 % (w/v) tai 14 % (w/v). Sekä supernatanteista että pelleteistä valmistetut näytteet analysoitiin. Geelielektroforeesien annettiin jatkua yli yön: 8 % geelit asetuksilla 60 V, 50 mA ja 14 % geelit 70 V, 60 mA. Infektoitujen solujen proteiinikoostumuksia analysoitaessa virusstandardina käytettiin 12 µg 2x puhdistettua, TCA-saostettua HVTV-1-virusta.

Infektoidusta kasvatuksesta valmistettujen pelletinäytteiden (kappale 3.5.2) sekä mollurapuhdistuksen gradienttifraktioista valmistettujen näytteiden (kappale 3.5.5) proteiinikoostumusta analysoitiin SDS-PAGE-geelillä, jonka ylägeelin akryyliamidipitoisuus oli 5 % (w/v) ja erotusgeelin 8 % (w/v). Geelielektroforeesi tehtiin asetuksilla 60 V, 30 mA, yli yön.

Massaspektrometria-analyysia varten solupellettinäyte, joka oli tehty infektoidusta *Har. vallismortis* -kasvatuksesta 16 tuntia infektion jälkeen (kappale 3.5.2), ladattiin 8 % SDS-PAGE-geeliin, jossa käytettiin standardina myös PageRuler™ Prestained Protein ladder -proteiinistandardia (Thermo Fischer). Tästä geelistä leikattiin palat, joissa tutkittavien proteiinien vyöhykkeet olivat. Palat analysoitiin proteomiikan

yksikössä (Helsingin yliopisto, Biotekniikan instituutti), jossa niistä tunnistettiin peptidisekvenssejä. Proteomiikan yksikössä näitä sekvenssejä verrattiin HVTV-1-viruksen ja *Har. vallismortis* -kannan genomien peptidikirjastoihin.

3.8. Lipidianalyysit

3.8.1. Lipidien eristys

Kaikki lipidieristyksessä käytetyt lasiputket huuhdeltiin ensiksi deionisoidulla vedellä, sitten etanolilla, metanolilla ja lopuksi kloroformilla. Näytteisiin, joiden tilavuus oli 450 µl, lisättiin 3 ml metanolia ja seos vorteksoitiin. Seuraavaksi lisättiin 6 ml kloroformia ja sekoitettiin vorteksoimalla. Seoksia inkuboitiin pimeässä huoneenlämmössä 30 min ajan, minkä jälkeen näytteet sentrifugoitiin (Eppendorf S810R roottorilla, 2500 rpm, 10 min, 22 °C). Supernatantit siirrettiin uusiin putkiin, joihin lisättiin 1,8 ml:a 18 % suolavettä. Seos sentrifugoitiin kuten edellä. Muodostuneet ylä- ja alafaasit eroteltiin eri putkiin.

Putkiin, joihin yläfaasi pipetoitiin, lisättiin 86:14:1 -suhteessa sekoitettua kloroformi:metanoli:18 % suolavesi-liuosta, seos sekoitettiin vorteksoimalla ja sentrifugoitiin kuten edellä. Muodostuneet alafaasit yhdistettiin aiemmin eroteltuihin alafaaseihin. Näyteputkista haihdutettiin neste typpikaasulla lämpimässä vesihauteessa. Jäljelle jääneet pelletit resuspensoitiin 9:1 -suhteessa sekoitettuun kloroformi:metanoli-liuokseen, noin 200 µl:n tilavuuteen per pelletti.

3.8.2. Ohutlevykromatografia

Ohutlevykromatografiassa käytetty lasikammio huuhdeltiin ensiksi deionisoidulla vedellä, sitten etanolilla, metanolilla ja lopuksi kloroformilla. Kromatografialiuoksena käytettiin 104 ml kloroformi:metanoli:90 % etikkahappo -liuosta, joka oli sekoitettu suhteessa 65:4:35. Kammioon asetettiin imupaperi helpottamaan tasapainottumista. Kammion annettiin tasapainottua 1,5 tunnin ajan.

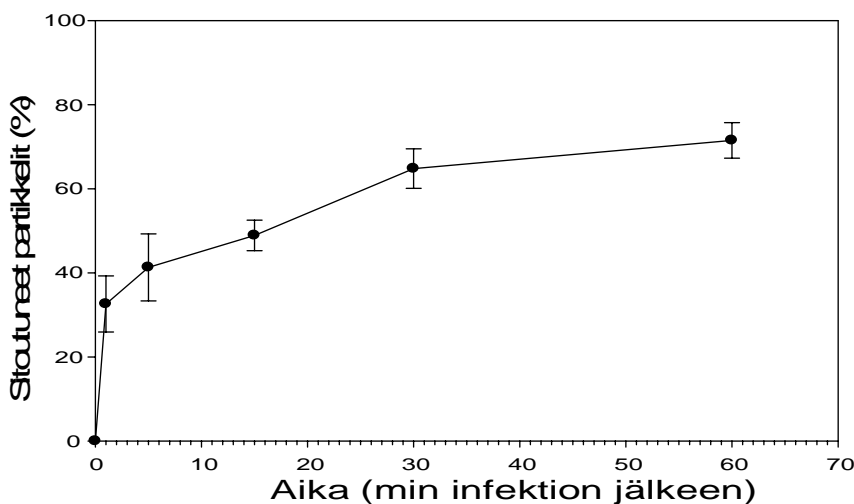
Silikonilevy aktivoitiin 120 °C:n lämpötilassa tunnin ajan ja jäädytettiin eksikaattorissa n. 15 min ajan. Näytteet pipetoitiin levyille ja niiden annettiin kuivua. Kuivunut levy asetettiin kammioon ja kromatografialiuoksen annettiin nousta 2 senttimetrin päähän levyn yläreunasta. Näytteiden ajautumisen jälkeen levy kuivattiin. Tämän jälkeen se värjättiin lasikammiossa, jossa oli joditekiteiden muodostamaa höyryä.

4. Tulokset

4.1. HVTV-1-viruksen adsorptio

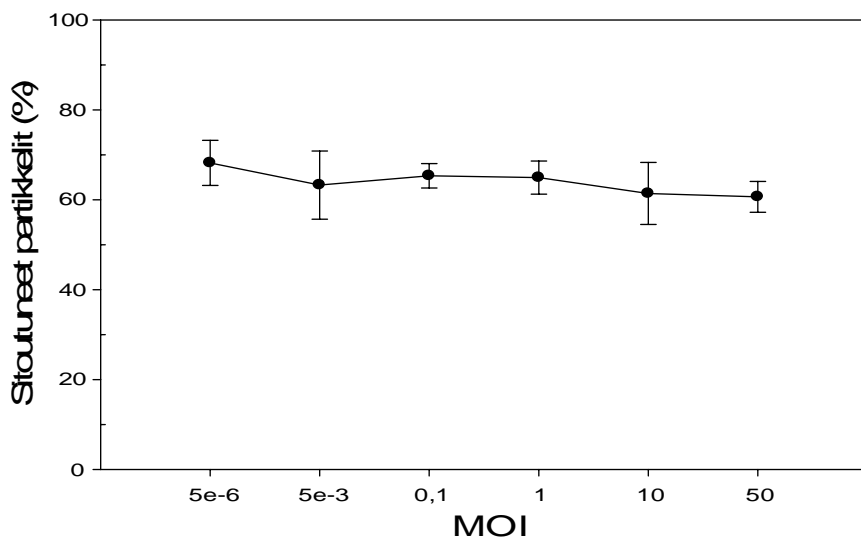
4.1.1. Adsorption tutkiminen plakkitestillä - adsorptiotestit

Viruspartikkelien sitoutuminen isäntäsolun pintaan on virusinfektion ensimmäinen vaihe. Aiemmin on selvitetty, että HVTV-1-viruksen adsorptio *Har. vallismortis*-soluihin on tehokasta (Pietilä ym., 2013). Tässä työssä haluttiin selvittää tarkemmin, kuinka nopeasti virus saavuttaa maksimaalisen adsorption. Tavallisessa adsorptiotestissä solut infektoitiin HVTV-1-viruksella ja sitoutumattomien virusten määrää seurattiin tunnin ajan. Sitoutumattomien virusten määrää selvitettiin poistamalla näytteestä solut ja titraamalla supernatantti, johon vapaat virukset olivat jääneet. Adsorptoituneiden virusten osuus nousi sitä korkeammaksi, mitä pidempi aika infektiosta kului (kuva 1). Alussa adsorptoituneiden virusten osuus nousi nopeasti, mutta 30 ja 60 min. aikapisteiden välillä adsorptiota ei kuitenkaan enää merkittävästi tapahtunut. Tunti infektion jälkeen 71 % viruksista oli adsorptoitunut. Adsorption nopeutta kuvaava, adsorption nopeusvakio, oli aikapisteiden 0-1 min. välillä 7×10^{-9} ml/min ja 1-5 min. välillä $5,5 \times 10^{-11}$ ml/min.



Kuva 1. HVTV-1-viruksen adsorptio *Har. vallismortis*-solujen pinnalle on tehokasta ja nopeaa. Sitoutuneiden partikkelien määrä selvitettiin eri aikapisteissä infektion jälkeen. Kuvaajan pisteiden virhemarginaalit muodostuvat kolmen toiston vaihteluvälistä.

Tässä työssä haluttiin selvittää myös, saturoituvatko *Har. vallismortis*-solun pinnalla olevat HVTV-1-viruksen reseptorit. Reseptorisaturaatiota testattaessa virusten määrä infektoitavaa solua kohden nostettiin 107-kertaiseksi. Kuvasta 2 nähdään, että kaikilla testatuilla MOI-arvoilla tulos oli samankaltainen: hieman yli 60 % viruksista adsorboitui soluihin 30 min aikana.



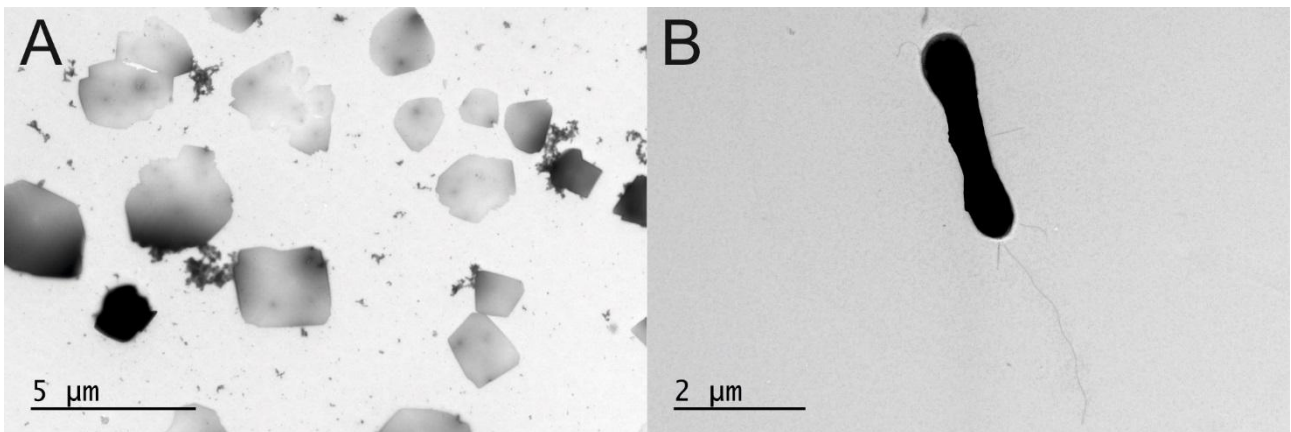
Kuva 2. Reseptorisaturaatiotesti. *Har. vallismortis* -solut infektoitiin eri MOI-arvoilla ja sitoutuneiden virusten määrä selvitettiin. Kuvaajan pisteiden virhemarginaalit muodostuvat kolmen toiston vaihteluvälistä.

Tässä työssä haluttiin selvittää myös, saturoituvatko *Har. vallismortis* -solun pinnalla olevat HVTV-1-viruksen käyttämät reseptorit. Reseptorisaturaatiota testattaessa virusten määrä infektoitavaa solua kohden nostettiin 10^7 -kertaiseksi. Kuvasta 2 nähdään, että kaikilla testatuilla MOI-arvoilla tulos oli samankaltainen: hieman yli 60 % viruksista adsorboitui soluihin 30 min aikana.

Superinfektioestillä haluttiin selvittää, muodostuuko isäntäsoluun ns. superinfektioekskluusio eli, onko kertaalleen infektoitu solu mahdollista infektoida vielä uudelleen. Superinfektioekskluusio on ilmiö, jossa solun aiemmin infektoinut virus estää saman tai hyvin läheistä sukua olevan viruksen uuden infektion samaan soluun (Labrie ym., 2010). Superinfektioestissä *Har. vallismortis* -solut infektoitiin MOI-arvolla 10 ja 30 min päästä sitoutumattomat virukset poistettiin, minkä jälkeen solut infektoitiin uudelleen. Kontrollikasvatuksena oli infektoitua kasvatusta vastaava *Har. vallismortis* -kasvatus, johon lisättiin virusstokkia vastaava tilavuus MGM-lientä ensimmäisessä infektiossa, mutta joka muuten käsiteltiin samalla tavalla. Seuraavaksi selvitettiin toisella infektiokerralla sitoutumattomien virusten määrä kuten tavallisessa adsorptiotestissä. Tätä määrää verrattiin soluja sisältämättömään MGM-näytteeseen, johon oli lisätty 1500 viruspartikkelia, samoin kuin varsinaisten kasvatusten toisessa infektiossa. Mikäli yksikään viruspartikkeli, joka lisättiin toisessa infektiovaiheessa, ei sitoudu, maljoilla olisi pitänyt olla noin 200 plakkia. Superinfektioestissä infektoidun kasvatuksen maljojen isäntäsolumatto oli kaikissa toistoissa täysin syöty. Mikäli superinfektioekskluusio olisi muodostunut, eikä yksikään virus toisessa infektoinnissa olisi sitoutunut, olisi plakkeja testimaljalla tällöin ollut noin 200 eli ne olisivat olleet erillisinä, laskettavina plakkeina. Kontrollikasvatuksesta, jota ei ensimmäisessä vaiheessa infektoitu, plakkeja muodostui noin 200, mikä viittaisi siihen, että pestyihin soluihin ei sitoudu enää viruksia. MGM-liemikontrollista plakkeja muodostui noin 200 eli virukset säilyivät infektiivisinä.

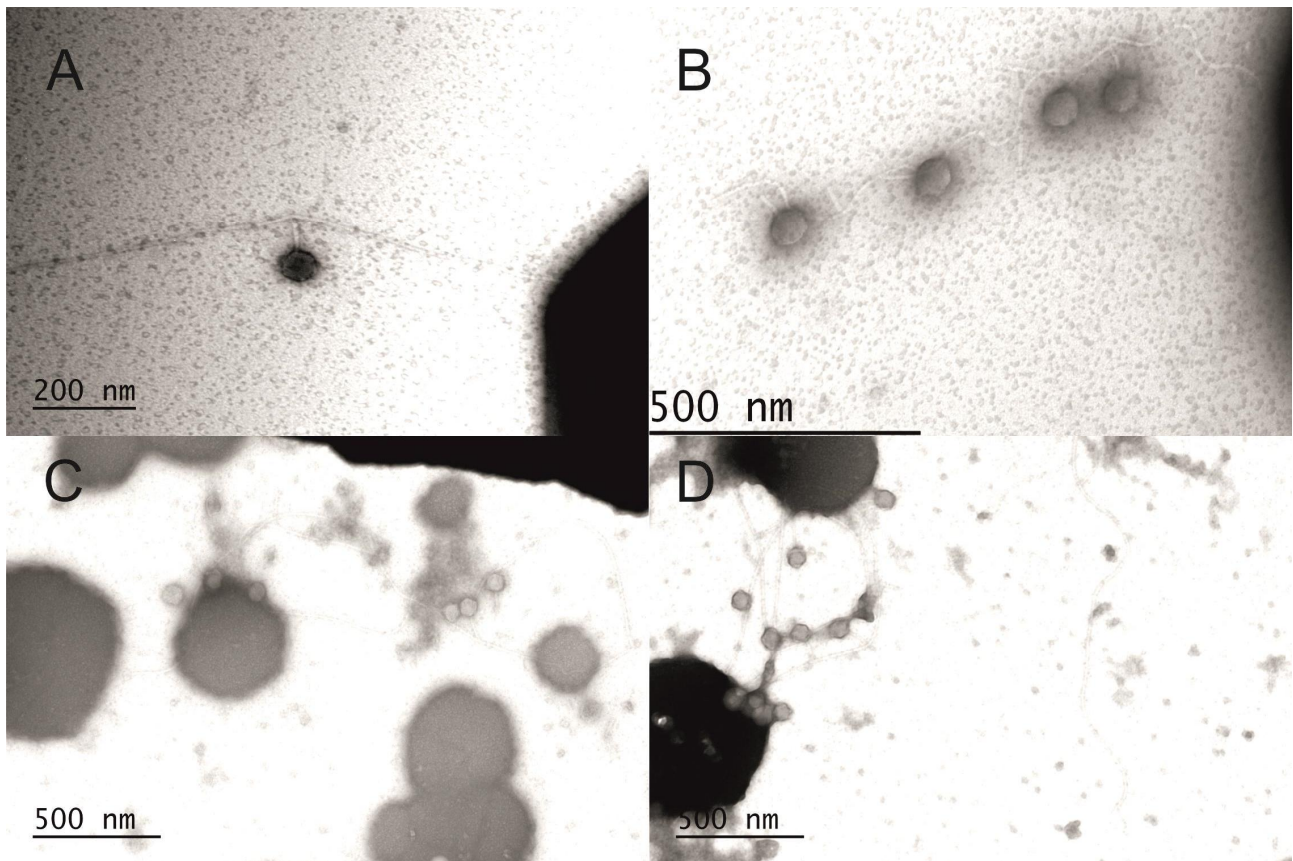
4.1.2. Adsorption tutkiminen elektronimikroskopiolla

Tässä työssä yhtenä tavoitteena oli HVTV-1-viruksen adsorptiokohdan selvittäminen. Jotta tätä pystyttiin läpivalaisuelektronimikroskopiolla tutkimaan, oli löydettävä mikroskopianäytteiden valmistus- ja värjäysmenetelmä, joka sopisi mahdollisimman hyvin isäntäsoluille. Läpivalaisuelektronimikroskoopilla nähtiin, että uranyyliasetattivärjäys 10 sekunnin värjäysajalla (kuva 3B) sopii *Har. vallismortis*-soluille pidempää värjäysaikaa paremmin (kuva 3). 23 % suolavedellä pestyt ja siihen resuspensoidut sekä 10 sekuntia uranyyliasetatilla värjäytyt *Har. vallismortis*-solut olivat muodoltaan sauvamaisia ja niissä oli pitkiä arkelloja (kuva 3B), kun taas 30 sekunnin värjäysajalla solut olivat kulmikkaita (kuva ei esitetä). 23 % MGM-liemeen resuspensoidut, 30 sekuntia samalla värillä värjäytyt solut näkyivät myös kulmikkaina (kuva 3A), kun taas lyhyellä 10 sekunnin värjäysajalla solut olivat sauvamaisia ja niissä näkyi myös arkelloja. 23 % MGM-liemeen resuspensoitujen solujen taustalla oli paljon epäpuhtauksia.



Kuva 3. *Har. vallismortis*-soluja negatiivivärjättiin uranyyliasetatilla läpivalaisuelektronimikroskopiaa varten. A: *Har. vallismortis*-solu MGM:ssä värjättyinä 30 sekuntia UA:lla B: *Har. vallismortis*-solu suolavedessä värjättyinä 10 sekuntia UA:lla.

HVTV-1-partikkelien reseptoreita *Har. vallismortis*-solujen pinnalla ei aiemmin ole tutkittu. Tässä työssä tarkoituksena oli selvittää, mihin solun pinnan rakenteisiin virukset kiinnittyvät. Viruspartikkelien lisäämisen jälkeen tutkittiin pestyjä ja pesemättömiä solunäytteitä aikapisteistä 1, 15 ja 30 min infektion jälkeen. Pesemättömät näytteet otettiin suoraan infektoidusta kasvatuksesta, joten ne olivat MGM-liemessä. Osa näytteistä pestiin solujen konsentroimiseksi. Pestyissä näytteissä infektoidun kasvatuksen solut oli kerätty sentrifugoimalla ja resuspensoitu 23 % suolaveteen. Läpivalaisuelektronimikroskopiassa sekä pestyissä että pesemättömissä näytteissä nähtiin viruksia kiinnittyneinä hännillään solujen arkelloihin (kuva 4). Pestyissä näytteissä (kuva 4 A ja B) arkelloja ja viruksia oli selvästi vähemmän kuin pesemättömissä näytteissä (kuva 4 C ja D), joissa arkellat olivat pitkiä ja niihin oli kiinnittyneinä lukuisia viruksia. Viruksia ei nähty kiinnittyneinä solun ulkopinnalle. Pesemättömissä näytteissä oli taustalla enemmän epäpuhtauksia verrattuna pestyihin soluihin. Aikapisteissä 1 ja 15 minuuttia infektion jälkeen sitoutuneita viruksia havaittiin enemmän kuin 30 min infektion jälkeen otetussa näytteessä.



Kuva 4. HVTV-1-viruksen adsorptiota tutkittiin läpivalaisuelektronimikroskopiolla. Pestyistä näytteistä 1 min (A) ja 15 min (B) infektion jälkeen otetuissa kuvissa viruksia nähdään kiinnittyneinä arkelloihin. Pesemättömissä näytteissä (C ja D) arkellat olivat pidempiä ja viruksia nähtiin enemmän. Pesemättömistä näytteistä otetut kuvat ovat aikapisteestä 1 min infektion jälkeen. Elektronimikroskopiaa varten näytteet oli värjätty uranyyliasetaatilla, 10 sekunnin värjäysaikaa käyttäen.

4.2. Mollurarakenteen tutkiminen

4.2.1. HVTV-1-viruspartikkelien puhdistus ja puhdistettujen partikkelien analysointi

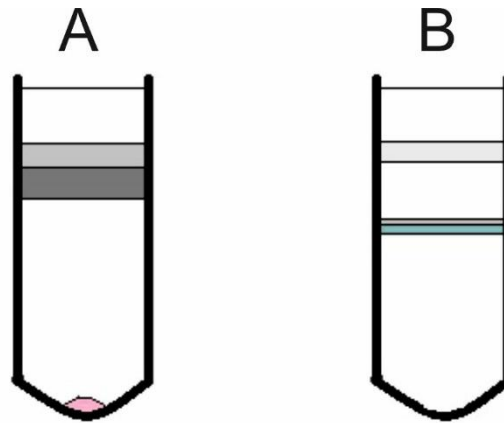
Työssä pyrittiin tuottamaan puhtaita HVTV-1-viruspartikkeleita, jotta niitä voitaisiin käyttää kontrollina mollurarakenteen proteiini-analyseissa (kappale 3.2.5). Viruspartikkelien puhdistus suoritettiin kuten aiemmin on julkaistu (Pietilä ym., 2013b). Puhdistuksen aluksi yön yli kasvatettu, infektoitu nesteviljelmä käsiteltiin DNase I:llä, minkä jälkeen soluriekaleet poistettiin sentrifugoinnilla. Tämän vaiheen jälkeen infektiivisten virusten määrä oli tiittereiden perusteella korkea (taulukko 3).

Virukset saostettiin nestekasvatuksesta 10 % polyetyleeniglykolilla. PEG-saostuksen jälkeen viruspartikkelit kerättiin sentrifugoimalla ja supernatantti ja pelletti otettiin talteen. Supernatantissa virussaanto edelliseen puhdistusvaiheeseen verrattuna oli 0 % (taulukko 3). Liuotetusta pelletistä poistettiin aggregaatit ja aggregaattien poiston jälkeen otetun näytteen perusteella virussaanto oli 0,8 % (taulukko 3) eli käytännössä infektiivisiä viruksia ei saatu enää kerättyä. Aggregaatteja ei titrattu.

Polyetyleeniglykolilla saostetut HVTV-1-viruspartikkelit puhdistettiin 5-20 % sakkaroosigradientissa liikkuvan vyöhykkeen sentrifugoinnilla. Sentrifugoinnin jälkeen gradientissa erottui kaksi valoa siroavaa sinertävää vyöhykettä putken yläosassa (kuva 5). Alempi vyöhyke oli voimakkaan sinertävä ja sen pinnalla oli vaaleamman sinertävä vyöhyke. Putken pohjalla oli myös pieni haalean punainen pelletti. Alempi

vyöhyke kerättiin ja siitä otettu näyte titrattiin. Tiitterin perusteella laskettu virussaanto oli 0,002 % (taulukko 3).

Sakkaroosigradientista kerätty alempi vyöhyke puhdistettiin edelleen tasapainosentrifugoinnilla cesiumkloridigradientissa. Gradientissa erottui kolme vyöhykettä: putken yläosassa hyvin vaalea vyöhyke, voimakas ohut vyöhyke aivan putken keskikohdassa ja aivan sen pinnalla näkynyt ohut vyöhyke. Putken keskiosan voimakas vyöhyke kerättiin, mutta infektiivisten virusten saanto oli 0 % (taulukko 3).



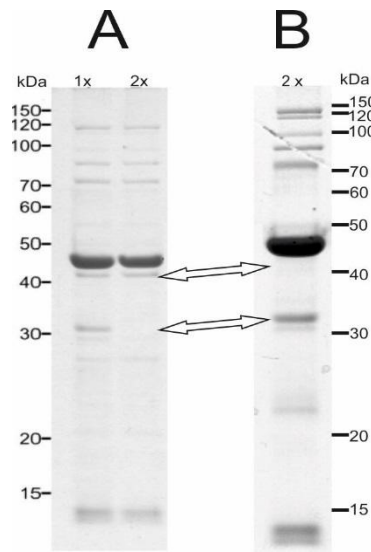
Kuva 5. HVTV-1-partikkeleita puhdistettiin sakkaroosigradientissa ja edelleen cesiumkloridigradientissa. Sakkaroosigradientissa (A) nähtiin kaksi vyöhykettä ja pieni haalean punertava pelletti. Cesiumkloridigradientissa (B) yksi vyöhyke oli putken yläosassa ja kaksi vyöhykettä aivan putken keskitasossa.

Viruspartikkelit konsentroidiin sentrifugoimalla. Konsentroidun, 2x puhdistetun HVTV-1-näytteen infektiivisten virusten saanto oli 0 % (taulukko 3).

Taulukko 3. Viruspuhdistuksen eri vaiheissa kerättyjen näytteiden titrausten tulokset ja niistä lasketut infektiivisten virusten saannot.

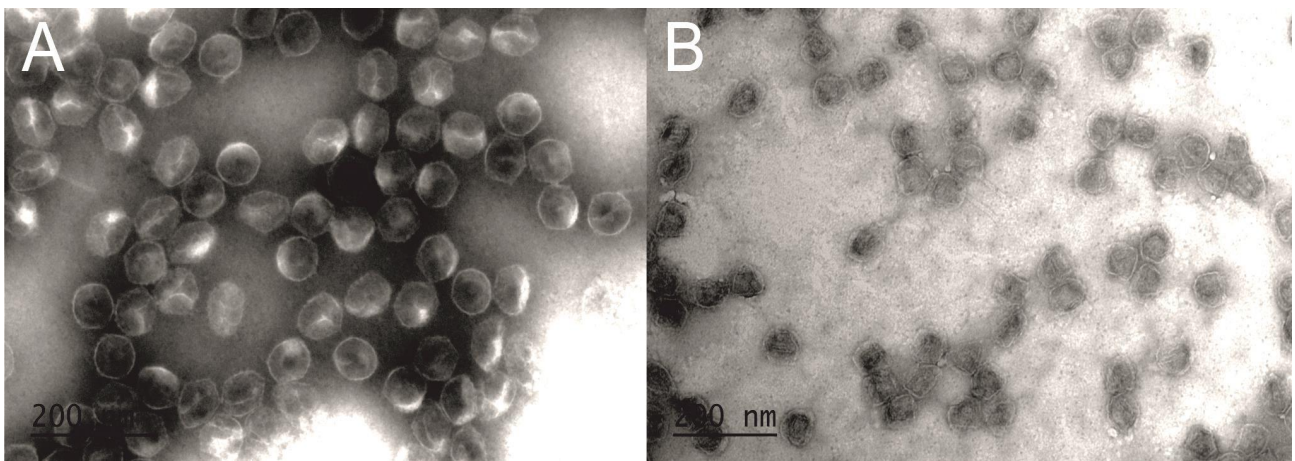
Puhdistusvaihe	Tilavuus (ml)	Tiitteri pfu/ml (pfu = plakin muodostava yksikkö, plaque forming unit)	Yhteensä pfu:ja	Saanto (%)
DNase käsittelyn jälkeinen supernatantti	975	$2,4 \times 10^{10}$	$2,34 \times 10^{13}$	
PEG-saostuksen jälkeinen supernatantti	975	0	0	0
PEG-saostetut virukset aggregaattien poiston jälkeen	4,5	4×10^{10}	$1,8 \times 10^{11}$	0,8
1x vyöhyke sakkaroosigradientissa (kuva 5A)	23	$17,5 \times 10^6$	$4,0 \times 10^8$	0,002
2x vyöhyke cesiumkloridigradientissa (kuva 5B)	5	0	0	0
Konsentroituu 2 x virus	0,15	6×10^5	9×10^4	0

2x puhdistetun HVTV-1-viruksen proteiinipitoisuudeksi määritettiin noin 12 mg/ml. Puhdistetun viruksen proteiinikoostumus analysoitiin proteiinigeelielektroforeesilla. 12 µg:a puhdistettuja HVTV-1-viruspartikkeleita ajettiin 8 % SDS-PAGE-geelissä (kuva 6). Proteiinikoostumuksessa näkyy kaksi eroavaisuutta verrattuna aiemmin nähtyihin tuloksiin (Pietilä ym., 2013b). Noin 45 kiloDaltonin (kDa) kokoisen pääasiallisen kapsidiproteiinin alapuolelta puuttui yksi proteiinivyöhyke. Lisäksi näytteessä oli 30 kDa:n kokoinen proteiini, joka aiemmin on jäänyt 1x puhdistukseen eli vain sakkaroosissa puhdistettuihin näytteisiin.



Kuva 6. 2x puhdistettu HVTV-1-virus analysoitiin 8 % SDS-PAGE-geelissä. A: Aiemmassa tutkimuksessa (Pietilä ym., 2013b) 1 x ja 2x puhdistuksesta nähdyt proteiini koostumukset. B: Tässä työssä tehdystä 2 x puhdistuksesta nähty proteiini koostumus. Erot proteiinivyöhykkeissä merkitty nuolilla.

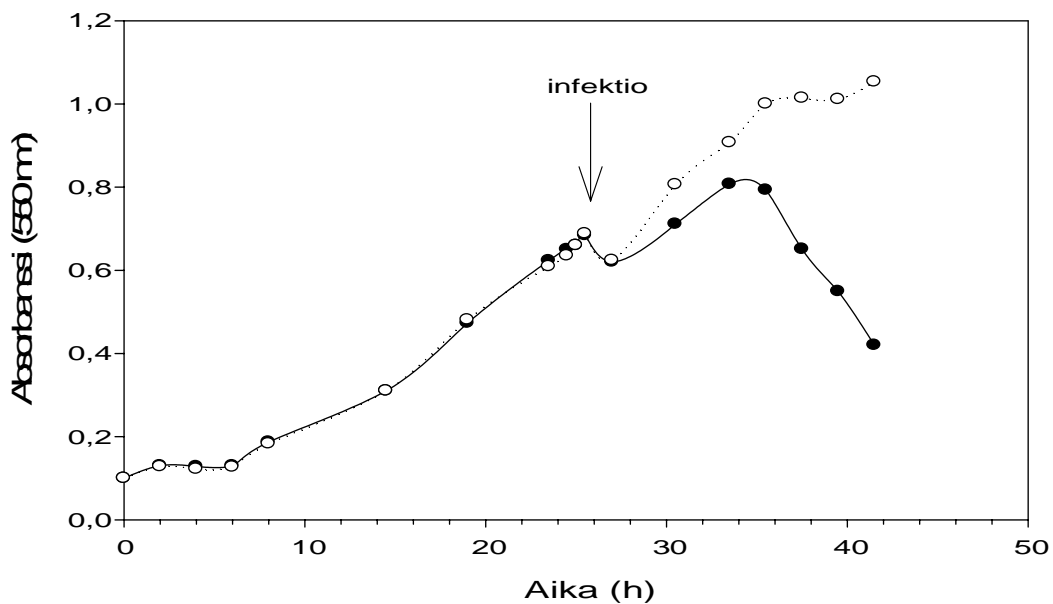
Elektronimikroskopiolla tarkasteltuina puhdistetut HVTV-1-viruspartikkelit värjäytyivät kaliumfosfowolframaatilla ja 30 sekunnin värjäysajalla hyvin. Kuvasta 7A voi nähdä viruksen pinnan "decoration"-proteiineja (Pietilä ym., 2013b). Myös muutamalla viruksella oleva häntä näkyy selvästi. Uranyyliasetaatilla värjätyt viruspartikkelit näkyivät epäselvästi ja värjäytyivät huonommin eikä pieniä pinnan rakenteita pystynyt erottamaan (kuva 7B). Molemmissa värjäyksissä suurimmassa osassa partikkeleita ei nähty häntää, mutta ei myöskään irrallisia häntiä. Kuvasta 7A nähdään myös kapsidin pintakerroksen näkyvän selvästi vaaleana tumman sisäosan ympärillä. Tämä viittaisi siihen, että väri on päässyt kapsidin sisään ja genomi on purkautunut ulos kapsideista.



Kuva 7. HVTV-1-virusia värjättiin negatiiviväreillä läpivalaisuelektronimikroskopiaa varten. A: HVTV-1-partikkeleita värjättyä kaliumfosfowolframaatilla. B: HVTV-1-partikkeleita värjättyä uranyyliasetaatilla.

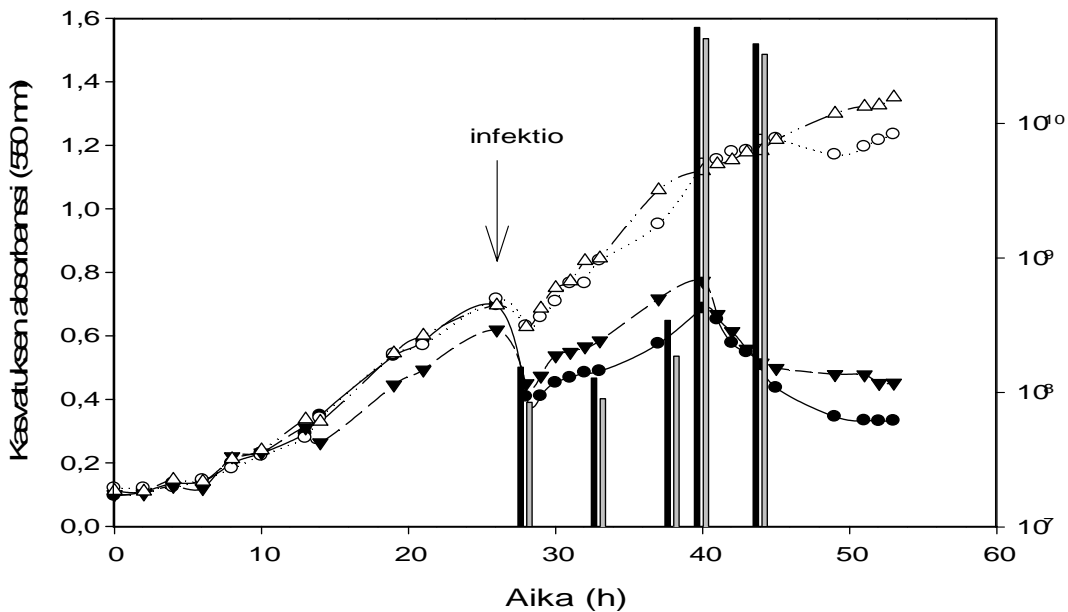
4.2.2. HVTV-1-viruksella infektoidujen *Har. vallismortis*-solujen kasvukäyrä

HVTV-1/*Har.vallismortis*-kasvukäyrä on määritetty jo aiemmin (Pietilä ym., 2013b). Tässä työssä tarkistettiin ensin, että *Har. vallismortis* kasvoi normaalisti ja HVTV-1 -infektiosykli toimi kuten aiemmin. Kasvukäyrästä (kuva 8) nähdään, että isäntäkannan solut ovat logaritmisin kasvunvaiheen puolivälissä 20-30 tunnin kuluttua kasvatuksen alusta. Infektiosta absorbanssin laskuun eli solujen lyysaamiseen kuluu noin 12 tuntia.



Kuva 8. HVTV-1/*Har.vallismortis*-kasvukäyrä. Kuvassa nähdään infektoidussa- ja kontrollikasvatuksessa tapahtuvat turbiditeetin muutokset. Infektioitu kasvatus merkitty mustilla ympyröillä ja infektioimaton kasvatus valkoisilla.

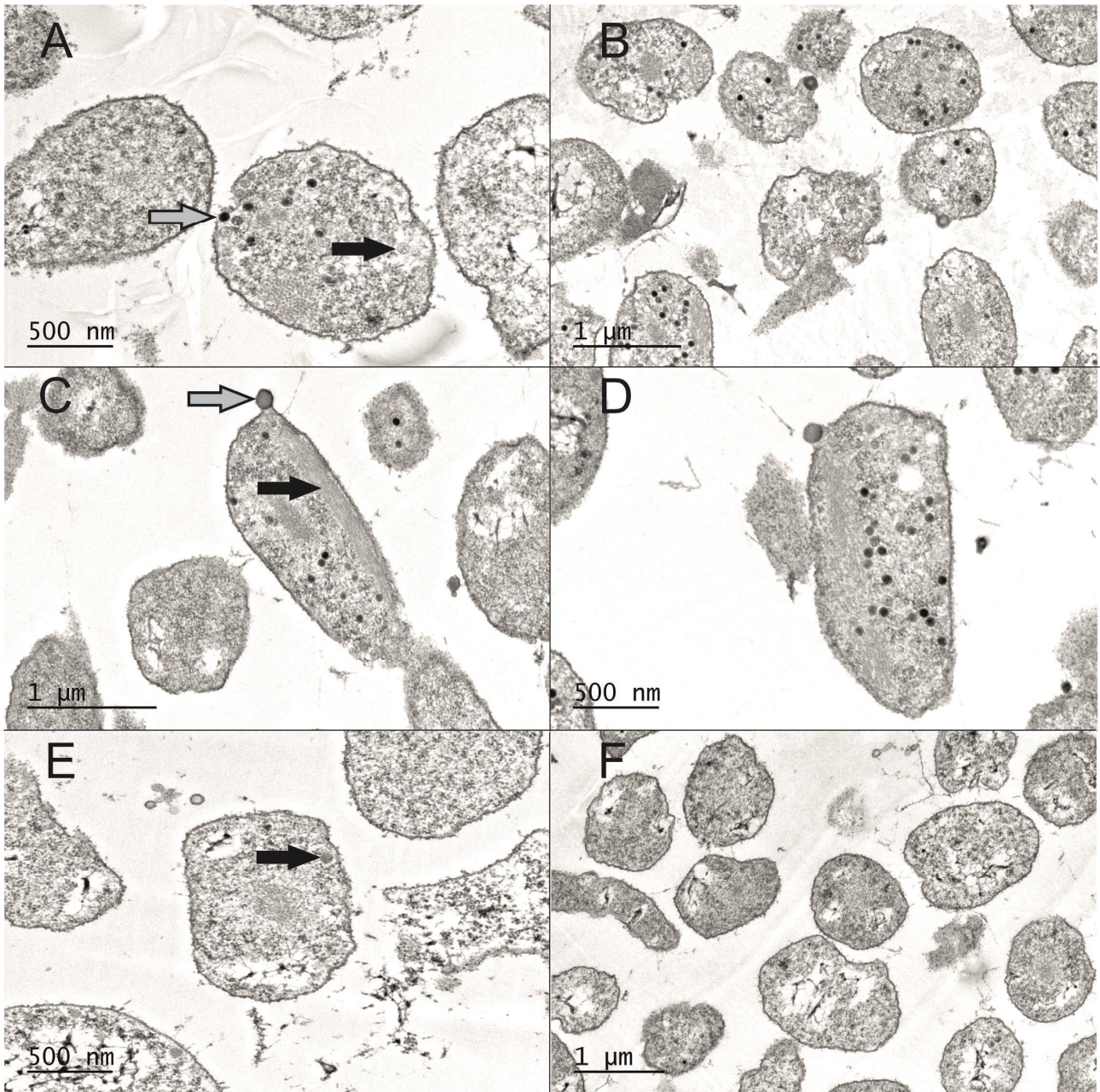
Ohutleikenäytteiden tekoa varten selvitettiin, toimiiko HVTV-1-viruksen elinkierto samalla tavalla MGM-MES-liemessä kuin se toimii tavallisessa MGM-liemessä. Normaalissa MGM-kasvualustassa on puskurina Tris-HCl (pH 7,2), kun taas MGM-MES-alustassa MES (pH 6,2). MGM-liemen Tris-HCl-puskuri reagoi ohutleikkeiden valmistuksessa käytettävän fiksaatiivin kanssa, joten jos MGM-MES-liemikasvatus toimii, ei näytteistä tarvitse erikseen pestä puskuria pois. Absorbanssia seuraamalla voitiin todeta, että *Har. vallismortis* kasvaa sekä MGM-liemessä että MGM-MES-liemessä yhtä hyvin (kuva 9). Infektion jälkeen absorbanssin lasku eli solujen lyysaaminen tapahtui samaan aikaan molemmissa kasvatusliemissä (kuva 9). Infektion jälkeen virusten tuottoa seurattiin, jotta voitiin varmistua virustuotannon olevan samaa luokkaa. Tiitterit jäivät MGM-MES-liemessä hieman alhaisemmiksi, mutta merkittävää eroa ei ollut (kuva 9).



Kuva 9. HVTV-1/*Har. vallismortis*-kasvukäyrää ja virustuottoa tutkittiin MGM- ja MGM-MES-liemissä. Kolmiot kuvaavat MGM-kasvatusta ja ympyrät MGM-MES-kasvatusta. Valkoisella on merkitty kontrollikasvatukset ja mustalla infektoidut kasvatukset. Pylväät kuvaavat tiitteriä eri aikapisteissä: harmaat pylväät kuvaavat MGM-MES-kasvatusta ja mustat tavallista MGM-kasvatusta. 30 min infektion jälkeen solut pestiin, mikä selittää absorbanssin laskun.

4.2.3. Infektoidujen solujen ohutleikkeiden elektronimikroskopia

Ohutleikkeiden läpivalaisuelektronimikroskopiolla haluttiin selvittää, missä vaiheessa infektion jälkeen solujen sisällä nähdään viruspartikkeleita ja milloin aiemmassa tutkimuksessa nähdyt mollurarakenteet muodostuvat (M. K. Pietilä, julkaisematon data). Jostain syystä ohutleikkeiden valmistamiseen käytetty kasvatuksen liyysaus viivästyi noin kahdella tunnilla eli solut hajosivat vasta noin 14 h infektion jälkeen. Tutkittiin näytteet, jotka oli otettu heti infektion jälkeen (eli 0 h), vapaiden virusten poiston jälkeen (n. 1 h), 5, 8, 10, 12, 14 ja 16 h infektion jälkeen. Ohutleikenäytteissä, jotka otettiin heti infektion jälkeen, vapaiden virusten poiston jälkeen ja viisi tuntia infektiosta, ei havaittu muutoksia soluissa eikä viruksia solujen sisällä (kuvia ei esitetä). 8 h infektion jälkeen muutamissa soluissa näkyi täysiä viruspartikkeleita (kuva 10E). 10 tuntia infektion jälkeen (kuva 10A) useissa soluissa oli nähtävissä sekä tyhjiä että täysiä viruspartikkeleita. 12, 14 ja 16 tuntia infektion jälkeen otetuissa näytteissä näkyi sekä tyhjiä että täysiä viruspartikkeleita, solujen sisälle muodostuneita kalvoston näköisiä rakenteita ja solujen pinnalla tummia, pyöreitä "molluroita" (kuva 10B, C ja D). Mollurarakenteita, joiden halkaisija oli arviolta 150 nm, havaittiin olevan solun pinnalla keskimäärin vain yksi. Kaikissa infektoiduissa soluissa ei nähty tätä rakennetta. Kalvostoja ja mollurarakenteita ei havaittu infektioimattomissa soluissa (kuva 10F).

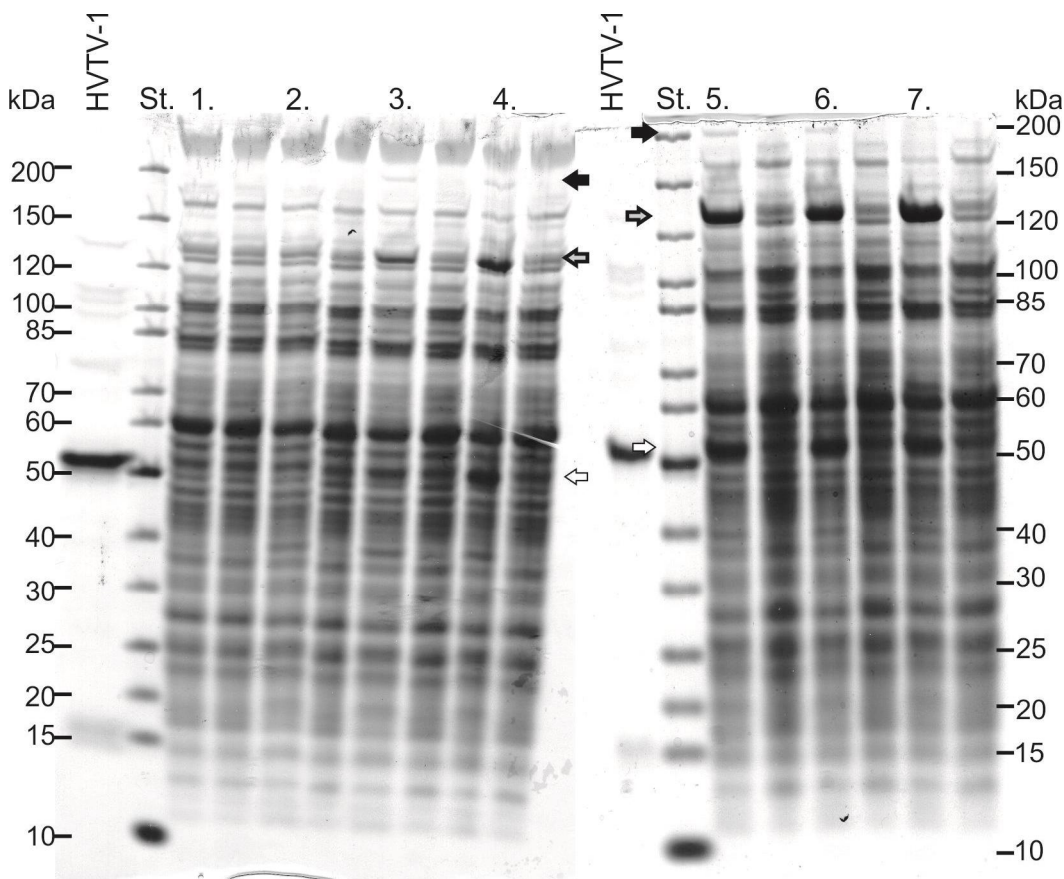


Kuva 10. Infektoiduista *Har. vallismortis*-soluista valmistettiin ohutleikenäytteitä, joita tutkittiin elektronimikroskopiolla. HVTV-1-partikkeleilla infektoiduissa *Har. vallismortis*-solujen ohutleikkeissä näkyi 10 h infektion jälkeen (A) tyhjiä ja täysiä viruspartikkeleita. 12, 14 ja 16 h infektion jälkeen (B,C ja D) soluissa näkyi myös mollurarakenteita sekä kalvoston näköisiä rakenteita. Kuvassa A harmaa nuoli osoittaa täyttä viruspartikkelia ja musta nuoli tyhjää partikkelia. Kuvassa C harmaa nuoli osoittaa mollurarakennetta ja musta nuoli kalvoston näköistä rakennetta. Viruspartikkeleita näkyi muutamissa soluissa ensimmäisen kerran jo 8 h infektiosta (E). Kuvassa E nuoli osoittaa solussa havaittua viruspartikkelia. Kontrollisoluihin ei nähty mollura- tai kalvostorakenteita (F).

4.2.4. Infektoitujen solujen proteiini- ja lipidianalyysit

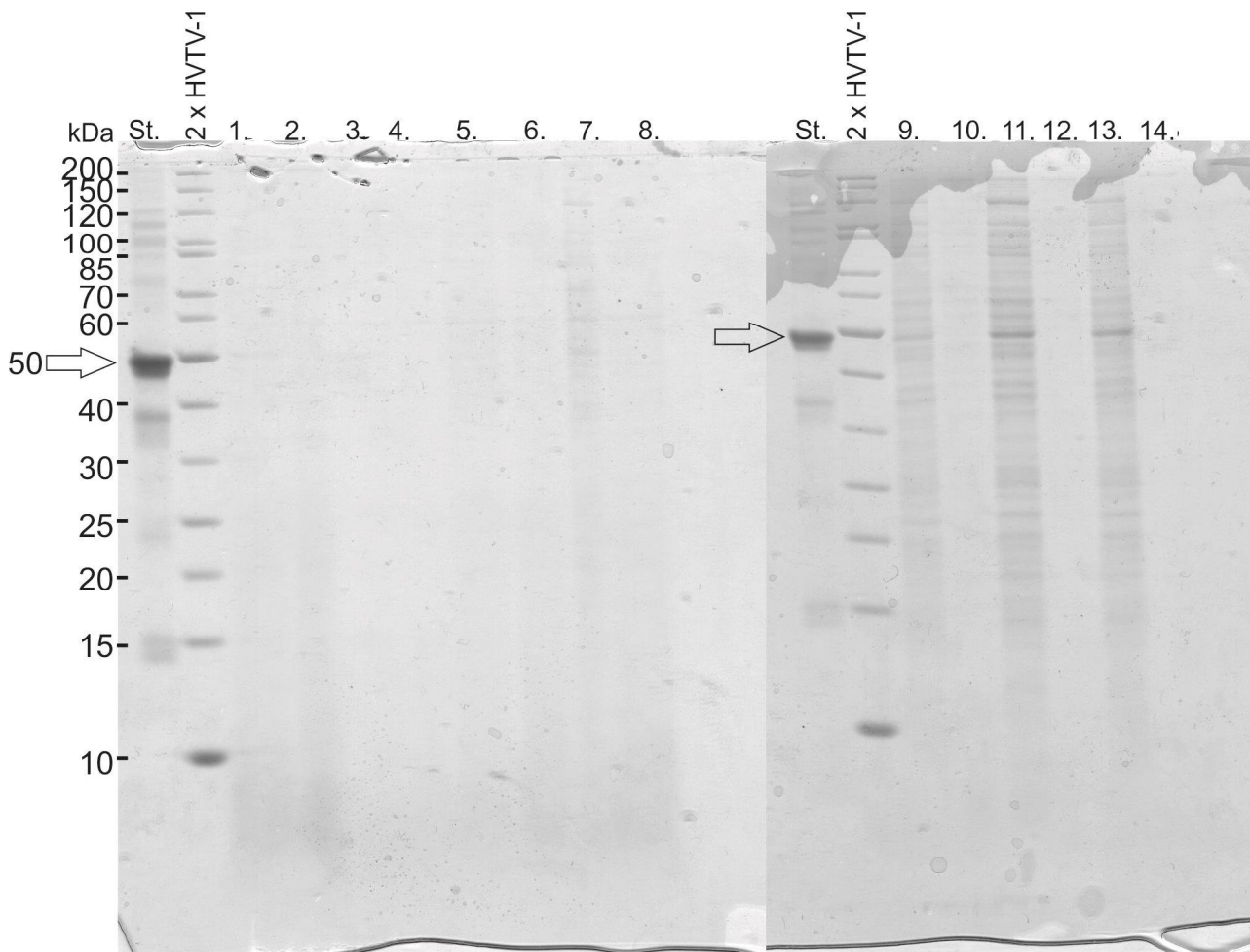
Infektoidusta ja infektoimattomasta kasvatuksista kerättiin näytteitä muutoin samoista aikapisteistä kuin ohutleikkeitä varten, mutta 0 h näytettä ei otettu. Trisiini-SDS-PAGE-geelissä analysoitiin solupellettinäytteet sekä TCA-saostetut supernatanttinäytteet (kappale 3.5.2.), jotta voitiin verrata proteiiniokoostumuksen muutoksia. Saostamattomia supernatanttinäytteitä ja käsittelemättömiä kasvatusnäytteitä ei analysoitu, sillä ne muodostivat sakkaa eivätkä liikkuneet geielektroforeesissa

kunnolla. Analysoiduista geeleistä pystyttiin näkemään myös, milloin viruksen rakenneproteiinien tuotto alkaa vertaamalla solunäytettä 2x puhdistettuun virukseen. Solupellettien 8 % Trisiini-SDS-PAGE-geeleissä (kuva 11) nähdään viruksen pääasiallisen kapsidiproteiinin, n. 50 kDa, muodostuminen 8 h infektion jälkeen otetussa näytteessä. 8 h infektion jälkeen soluissa on tuotettu myös 200 ja 130 kDa:n kokoisia proteiineja, joita ei näy kontrollinäytteissä eivätkä ne vastaa virusstandardin proteiineja. Supernatanttinäytteitä analysoitiin geielektroforeesilla, jotta nähtäisiin, onko kasvualustaan vapautuneissa proteiineissa eroja infektoidun ja infektoimattoman kasvatuksen välillä. TCA-saostetuista supernatanteista ajetuissa 14 % trisiini-SDS-PAGE -geeleissä (kuva 12) infektoidussa kasvatuksessa proteiineja nähdään geelissä vasta lyysauksen jälkeen otetuissa näytteissä. Lyysaus tapahtui noin 12 h infektion jälkeen. Lyysaus jälkeen geelissä näkyi lukuisia proteiinivyöhykkeitä, mutta niistä pystyttiin erottamaan pääasiallisen kapsidiproteiinin vyöhyke sekä aiemmin 8 % trisiini-SDS-PAGE-geeleissä (kuva 11) havaittu 130 kDa:n kokoinen proteiini.



Kuva 11. 8 % Trisiini-SDS-PAGE-geeleissä analysoidut, kasvatuksista valmistetut solupellettinäytteet. Musta nuoli osoittaa 200 kDa:n, ja harmaa nuoli 130 kDa:n kokoiset uudet proteiinivyöhykkeet sekä valkoinen nuoli viruksen pääasiallisen kapsidiproteiinin vyöhykkeet.

Näytteiden järjestys geelissä: 2 x HVTV-1, molekyylipainostandardi, 1. heti vapaiden virusten poiston jälkeen otettu näyte, 2. 5 h infektion alusta, 3. 8 h infektion alusta, 4. 10 h infektion alusta, 2x HVTV-1, molekyylipainostandardi, 5. 12 h infektion alusta, 6. 14 h infektion alusta, 7. 16 h infektion alusta. Varsinaisen näytteen oikealla puolella on aina saman aikapisteen infektoimaton kontrolli.

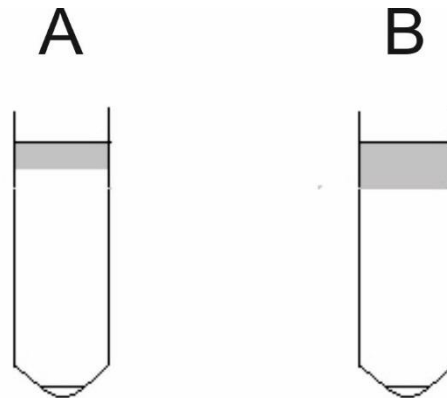


Kuva 12. 14 % Trisiini-SDS-PAGE –geeleissä ajetus, TCA-saostetut supernatanttinäytteet. Proteiinvyöhykkeet näkyvät supernatantissa vasta 12 h infektion jälkeen. Viruksen pääasiainen kapsidiproteiini on merkitty nuolella. Näytteiden järjestys geelissä vasemmalta oikealle: molekyylipainostandardi, 2 x HVTV-1, 1. heti vapaiden virusten poiston jälkeen otettu näyte, 3. 5 h infektion alusta, 5. 8 h infektion alusta, 7. 10 h infektion alusta, molekyylipainostandardi, 2 x HVTV-1, 9. 12 h infektion alusta, 11. 14 h infektion alusta, 13. 16 h infektion alusta. Varsinaisen näytteen oikealla puolella on aina saman aikapisteen infektoimaton kontrolli.

Seuraavaksi haluttiin tutkia, mitä geenituotteita infektoiduissa soluissa aletaan tuottaa 8 h infektion jälkeen, kun geelissä havaittiin uusia proteiineja (kuva 11). Geelipalasta, joka sisälsi 130 kDa:n proteiinvyöhykkeen, tunnistettiin massaspektrometriaa käyttämällä peptidisekvenssejä. Peptidisekvenssejä verrattiin HVTV-1-viruksen ja *Har. vallismortis*-kannan genomien peptidikirjastoihin ja saatiin osuvia lukuisiin eri proteiineihin. Taulukko tuloksista on liitteessä 5. Vastaavuuksia saatiin sekä viruksen että isännän proteiineihin. Eniten tunnistettuja peptidejä löytyi HVTV-1-viruksen geenituotteesta 21, jonka on ennustettu olevan ribonukleotidien reduktasi (Pietilä ym., 2013b). Myös ribonukleotidireduktaasin ennustettu molekyylipaino täsmää.

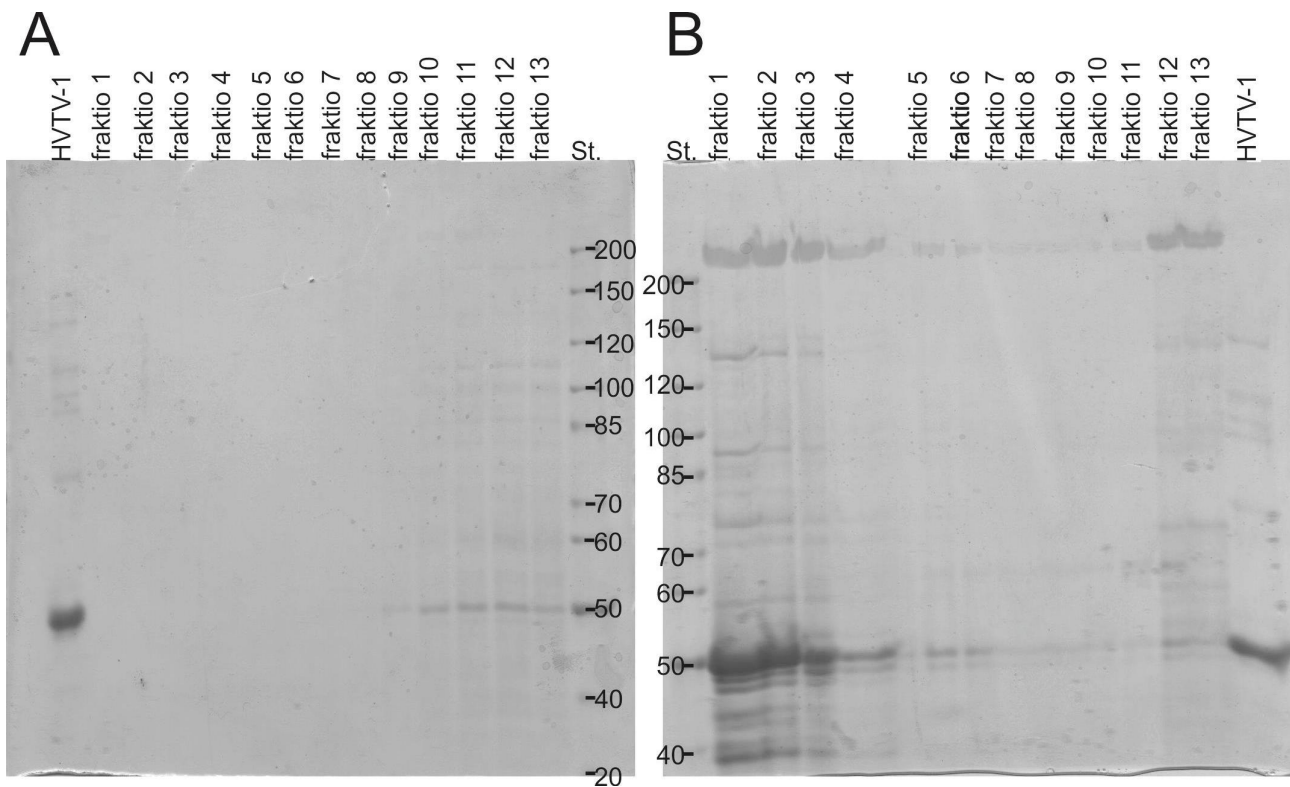
Työssä testattiin, onko mollurarakenteita mahdollista puhdistaa kuten aiemmin tutkittuja arkeonien pyramidirakenteita (kappale 1.4.7). Puhdistukseen käytetty *Har. vallismortis*-kasvatus oli infektoitu 16 tuntia aiemmin. Kasvatus, josta solut ja soluriekaleet oli poistettu, saostettiin polyetyleeniglykolilla (PEG) seuraavasti: osa saostettiin 5 ja toinen osa 10 % PEG:llä ja kasvatuksesta otettiin myös saostamaton näyte. Saostuksen jälkeen putken pohjalle muodostunut pelletti oli 5 % PEG:llä käsitellyssä näytteessä pieni kun taas 10 % PEG-saostetun näytteen pelletti oli huomattavasti suurempi. Sakkaroosigradiettiin sentrifugoitiin saostamaton, 5 ja 10 % PEG-käsitelty näytteet. Saostamattomasta näytteestä ei gradientissa muodostunut näkyvää vyöhykettä toisin kuin 5 ja 10 % PEG-käsitellyistä (kuva 12). 5 % PEG-saostetusta

näytteestä ajatus gradientissa näkyi putken yläosassa n. 1 cm levyinen sinertävän harmaa vyöhyke. 10 % PEG-saostetusta näytteestä ajatus gradientissa näkyi vyöhyke samassa kohdassa, mutta se oli n. 1,5 cm leveä. Molemmissa putkissa näkyi myös pieni pelletti.



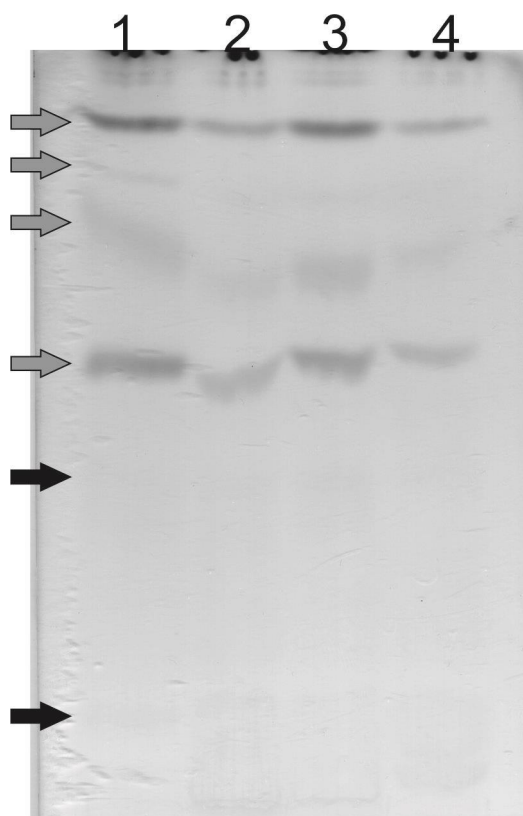
Kuva 13. Mollurarakenteen puhdistaminen sakkaroosigradientissa. PEG-käsitellyistä supernatanteista ajetuissa sokerigradienteissa nähtiin sinertävän harmaat vyöhykkeet, 10 % PEG -käsitelystä (B) leveämpi kuin 5 % PEG-käsitelystä (A).

Kun sakkaroosigradientit PEG-saostamattomasta sekä 10 % PEG-saostetusta näytteestä fraktioitiin ja ajettiin 8 % SDS-PAGE-geeliin, nähtiin proteiinvyöhykkeitä pääosin putken pinnasta otetuissa fraktioissa sekä liuotetusta pelletistä (kuva 14). Saostamattoman näytteen gradientissa näkyi selvästi 50 kDa:n kokoinen pääasiallinen kapsidiproteiini neljässä ensimmäisessä fraktioissa sekä liuotetussa pelletissä (kuva 14). 10 % PEG-saostetun näytteen gradientissa nähtiin selvästi enemmän proteiineja, joista yksi oli 130 kDa:n proteiini fraktioissa 1 ja 2 (kuva 14B). Proteiinvyöhykkeitä nähtiin kaikissa fraktioissa, mutta eniten niitä oli fraktioissa 1-6 ja liuotetussa pelletissä. Pääasiallisen kapsidiproteiinin vyöhyke näkyi voimakkaana.



Kuva 14. Mollurarakenteen puhdistamisessa kerättyjen sokerigradianttifraktioiden analysointi 8 % SDS-PAGE-geelissä. Geelissä nähdään käsittelemättömän (A) ja 10 % PEG-käsitellyn näytteen (B) sokerigradiantin fraktiot. Fraktiot on numeroitu keräysjärjestyksen mukaan eli fraktio 1. on putken pinnasta ja fraktio 13. putken pohjasta. Molekyylipainostandardi on geelissä A viimeisessä kaivossa ja geelissä B ensimmäisessä kaivossa. 2 x HVTV-1 on geelissä A ensimmäisessä kaivossa ja geelissä B viimeisessä kaivossa.

Ohutlevykromatografialla tutkittiin HVTV-1-infektion mahdollisesti aiheuttamia lipidikoostumuksen muutoksia *Har. vallismortis*-soluissa. Ohutlevykromatografian perusteella voitaisiin päätellä, muodostuvatko infektion aiheuttaman rakenteet (mollurat ja kalvoston näköiset rakenteet) mahdollisesti lipideistä. 16 h infektion jälkeen otetuista näytteistä tehdyssä lipidien ohutlevykromatografiassa (kuva 14) nähtiin sekä infektoiduissa että infektoimattomissa kontrollinäytteissä kuusi vyöhykettä, mutta ei merkittäviä eroja.



Kuva 15. Infektoitujen solujen lipidikoostumuksen muutoksia tutkittiin ohutlevykromatografialla. Lipidien ohutlevykromatografiassa kaikista näytteistä nähtiin kuusi vyöhykettä, jotka on merkitty kuvaan nuolilla. Mustat nuolet osoittavat alkuperäisessä kuvassa nähtyjä vyöhykettä, joita mustavalkoisessa kuvassa ei saatu näkymään. Näytteet: 1. 9 ml infektoidusta kasvatuksesta valmistettu näyte, 2. ja vastaava näyte infektoimattomasta kasvatuksesta, 3. 14 ml infektoidusta kasvatuksesta valmistettu näyte ja 4. ja vastaava näyte infektoimattomasta kasvatuksesta.

5. Tulosten tarkastelu

5.1. Adsorptio

Adsorptio on virusten infektiokyklin ensimmäinen ja usein rajoittavin vaihe. Adsorption tehokkuuteen ja nopeuteen vaikuttavat useat tekijät kuten reseptorien määrä ja saavutettavuus solun pinnalla, mahdollisen superinfektioekskluusion muodostuminen ja reseptorien saturoituminen (Poranen ym., 2002, Folimonova 2012). HVTV-1-viruksen adsorption nopeutta on tutkittu aiemmin (Pietilä ym., 2013b) ja tässä työssä saadut tulokset vastaavat aiempaa. HVTV-1-viruksen infektiokyklin aiemmassa tutkimuksessa adsorptiota on tarkasteltu kuitenkin vain aikapisteissä 15, 30 ja 60 min infektion jälkeen. Tämä tutkimus antaa yksityiskohtaisempaa tietoa viruksen adsorption alusta, sillä adsorptiota mitattiin 1, 5, 15, 30 ja 60 min aikapisteissä. Merkittävin osuus adsorptiosta tapahtuikin jo ensimmäisten minuuttien aikana. Adsorptiotestin tuloksista (kuva 1) nähdään, että HVTV-1-viruksen adsorptio *Har. vallismortis*-soluihin oli hyvin nopeaa. Jo minuutin kuluttua infektion alusta yli 30 % viruksista oli adsorptoitunut ja korkeimmillaan adsorptoituneita viruksia oli noin 70 %. Adsorption nopeudessa ja tehokkuudessa on suurta vaihtelua halofiilisiä prokaryootteja infektoivien hännällisten virusten välillä. Lähes kaikilla haloarkeoniviruksilla, joiden adsorptiota on tutkittu, adsorptio solun pintaan kestää jopa muutamia tunteja (Kukkaro & Bamford, 2009). Poikkeuksena muihin aiemmin tutkittuihin haloarkeoniviruksiin on hypertermofiilisen, *Sulfolobus islandicus*-arkeonin SIRV-2-virus (kappale 1.4.5), jonka adsorptio on hyvin nopeaa (Quemin ym., 2013). Tässä työssä tutkitun HVTV-1-viruksen adsorptiota isäntäsolun pinnalle näyttäisi tapahtuvan noin puolen tunnin ajan infektion alusta. Viimeisten aikapisteiden, 30 ja 60 min, välillä merkittävää adsorptoitumista ei enää tapahdu. Tähän havaintoon pohjautuen työn muissa adsorptiotesteissä käytettiin puolen tunnin adsorptioaikaa. Adsorption nopeutta kuvaavan vakion (adsorption rate constant) mukaan nopeimmin adsorptiota tapahtuu 0-1 min aikavälillä eli heti solujen infektoinnin jälkeen. Tällä aikavälillä adsorptiovakio oli 7×10^{-9} ml/min eli adsorptio oli nopeaa. Aiemmin HVTV-1-viruksen adsorptiovakioksi aikavälillä 0-15 min. on laskettu $3,1 \times 10^{-10}$ (Pietilä ym. 2013b). Aiemmin tutkittujen haloarkeonivirusten adsorptiovakiot ovat pääasiassa vaihdelleet välillä 1×10^{-10} - $2,9 \times 10^{-13}$ ml/min (Luk ym., 2014, Kukkaro & Bamford, 2009, Pietilä ym., 2013b). SIRV-2-viruksen adsorptio on nopeaa ja sen adsorption vakioksi onkin määritetty 2×10^{-8} ml/min (Quemin ym., 2013), joten kuin SIRV-2-viruksen, myös HVTV-1-virionien adsorptio on jopa poikkeuksellisen nopeaa.

Har. vallismortis-solujen pinnalla olevien HVTV-1 -reseptorien mahdollista saturoitumista testattiin 30 minuutin adsorptioajalla. Tällä testillä on mahdollista saada viitteitä reseptorien määrästä ja siitä, sitovatko reseptorit mahdollisesti useita viruksia kerralla. Tämän testin tuloksista (kuva 2) nähdään, että infektiioon käytettyjen HVTV-1-partikkelien määrää nostettaessa alun MOI 5×10^{-6} :sta aina MOI 50:en ei adsorptoitumattomien virusten osuus nouse. Tulos viittaisi siihen, että reseptorit eivät saturoidu eli solujen pinnalla on todennäköisesti paljon reseptoreja tai vaihtoehtoisesti samaan reseptoriin voi sitoutua samanaikaisesti lukuisia viruksia. HVTV-1-viruksen adsorption ollessa nopeaa ei tulos ollut yllättävä, vaan adsorption nopeus viittaa myös reseptorien helppoon saavutettavuuteen.

Kun adsorptiokohtaa tutkittiin läpivalaisuelektronimikroskopiolla, nähtiin, että HVTV-1-viruspartikkelit sitoutuivat häntärakenteillaan *Har. vallismortis*-solujen pinnalla näkyviin pitkiin arkellamaisiin rakenteisiin (kuva 4). Parhaiten tämä oli nähtävissä käsittelemättömissä näytteissä, joissa arkellat olivat pitkiä ja niihin oli kiinnittyneenä useita viruksia. Pestyissä näytteissä viruksia näkyi vähemmän ja arkellat olivat ilmeisesti katkeilleet. Pestyjen solujen pinnalla näkyi vain lyhyitä ulokkeita ja useissa soluissa ei niitäkään. Reseptorisaturaatiokokeen tulokset ja läpivalaisumikroskopiolla nähty virusten adsorptoituminen tukevat toisiaan, sillä arkelloja oli solujen pinnalla useampia ja arkelloihin nähtiin kiinnittyvän useita viruksia (kuva 4). Samanlaisia tuloksia on saatu aiemmin SIRV-2-viruksen adsorptiota tutkittaessa. Myös sen adsorptio on nopeaa ja sen reseptorina toimii isäntäsolun arkellarakenteet, jotka eivät saturoidu (Quemin ym., 2013).

Superinfektioeston tarkoituksena oli selvittää, voidaanko jo kertaalleen infektoitu solu infektoida uudelleen samalla viruksella vai muodostuuko soluun superinfektioekskluusio. Tällä tarkoitetaan tilannetta, jossa virusinfektio tekee solusta resistentin uudelleeninfektioitumiselle samalla tai hyvin läheistä sukua olevalla viruksella. Tutkituista arkeonien viruksista vain SIRV-2 muodostaa superinfektioekskluusion (Quemin ym., 2013). Superinfektioekskluusio näkyisi tuloksissa adsorptoituneiden virusten pienentyvänä määränä. Jos ekskluusiota ei muodostu, ei adsorptioprosenteissa pitäisi näkyä merkittäviä muutoksia. Testin tuloksista ei kuitenkaan voitu tehdä johtopäätöksiä kumpaankaan suuntaan. Sille, että isäntäsolumatto oli täysin syöty, ei löydetty varmaa selitystä. Kontrollisolut eivät hajooneet. Se, että isäntäsolumatto oli täysin syöty, voisi viitata virusten reversiibeliin sitoutumiseen ensimmäisessä infektiossa, jolloin jo infektoituun soluun sitoutuneet virukset voisivat irrota ja infektoida uusia soluja. Lysogeenisen viruksen indusoitumista isäntäsolusta pidän epätodennäköisenä. Uusia viruksia olisi täytynyt vapautua suuria määriä, jotta koko isäntäsolumatto olisi syöty, eikä testissä kulunut aika riittäisi uusien virionien muodostamiseen ja vapautumiseen. Tämän asian tarkempi selvittäminen vaatisi lisää tutkimusta, jota tämän työn puitteissa ei pystytty tekemään. Kontrollista plakkeja muodostui noin 200 viitaten siihen, että yksikään partikkeli ei sitoutuisi pestyihin soluihin. Tämän tuloksen voi selittää läpivalaisuelektronimikroskopiasta kerätyllä tiedolla: HVTV-1-viruksen reseptorit eli solun pinnan arkellarakenteet irtoavat pesujen yhteydessä.

5.2. HVTV-1-viruspartikkelien puhdistus

HVTV-1-partikkeleita puhdistettiin kontrolliksi virustuotannon ja viruksen indusoimien rakennemuutosten tutkimiseen geelielektroforeesilla. Viruksen infektiivisyyttä ja viruspuhdistuksen toimivuutta seurattiin ottamalla näytteitä puhdistuksen eri vaiheista ja titraamalla näytteet (taulukko 3). Puhdistusvaiheista haluttiin tietoa, jotta mahdolliset ongelmakohtat on helpompi tunnistaa. Tuloksista nähdään, että viruksen infektiivisyys katosi PEG-saostuksen aikana. Tässä työssä liikkuvan vyöhykkeen sentrifugoinnissa sokerigradiettiin muodostui kaksi vyöhykettä putken yläosaan (kuva 5). Kerätty alempi vyöhyke jäi cesiumkloridigradietissa putken keskiosaan (kuva 5). Aiemmissä puhdistuksissa infektiivistä virusta sisältäneen vyöhykkeen on nähty ajautuvan putken alaosaan molemmissa gradienttisentrifugoinneissa (Maija Pietilä, henkilökohtainen tiedonanto). Kun tässä työssä puhdistetut HVTV-1-partikkelit analysoitiin SDS-PAGE-geelissä, nähtiin niille tyypillinen proteiinikoostumus kahta poikkeusta lukuun ottamatta (kuva 6). Puhdistetun viruksen proteiinikoostumuksesta puuttui n. 40 kDa:n kokoinen proteiini kokonaan ja toisaalta puhdistettuun näytteeseen oli jäänyt n. 30 kDa:n kokoinen epäpuhtaus, joka aiemmissä puhdistuksissa oli jäänyt sokerigradiettiin. Epäpuhtaus oli luultavasti peräisin sokerigradientin ylemmästä vyöhykkeestä, joka ei erottunut kunnolla kerätyistä, alemmasta vyöhykkeestä. Proteiinigeelielektroforeesi kuitenkin osoittaa, että 2x puhdistettu HVTV-1-näyte koostuu viruspartikkeleista, vaikka ne eivät olekaan infektiivisiä.

Kun puhdistettuja viruspartikkeleita tutkittiin läpivalaisuelektronimikroskoopilla (kuva 3), nähtiin, että lähes kaikilta viruksilta puuttui häntä eikä irrallisia häntiä havaittu. Kun vielä huomioidaan, että virukset menettivät infektiivisyytensä, voidaan pohtia, onko SDS-PAGE-geelistä puuttuva proteiinivyöhyke mahdollisesti viruksen häntäproteiini tai yksi niistä. Toisaalta läpivalaisuelektronimikroskopialla nähtiin myös, että negatiiviväri oli päässyt kapsidin sisään ja genomi oli purkautunut ulos kapsideista. Tämän havainnon perusteella puuttuva proteiinivyöhyke voi olla myös nukleoproteiini. Proteiinivyöhyke voi tietenkin olla myös jokin muu rakenneproteiini, jonka puuttumista ei läpivalaisuelektronimikroskoopilla voitu havaita.

Haasteista huolimatta tällä puhdistuksella saatiin puhdasta virusta geelistandardiksi. Tätä puhdistettua virusta voidaan infektiivisyyden menetyksestä huolimatta käyttää geelistandardina, sillä siitä nähdään pääasiallinen kapsidiproteiini, johon vertaamalla näytteiden viruspitoisuutta voidaan arvioida.

Proteiinikoostumuksessa ei myöskään ole niin suuria eroja, että ne vaikuttaisivat tulosten tulkintaan. Syytä sille, miksi viruspuhdistus ei onnistunut normaalisti, ei tiedetä. Vastaava puhdistustulos on saatu aiemminkin, jolloin kerättyjen partikkelien infektiivisyys oli myös hävinnyt (M. K. Pietilä, henkilökohtainen tiedonanto).

5.3. HVTV-1-infektiosykli

Solut infektoitiin logaritmisessa kasvuvaiheessa aiempaa tutkimusta mukailien (Pietilä ym., 2013b). Tutkittujen hännällisten haloarkeonivirusten infektiiosykleissä solunsisäisen ajan on havaittu olevan melko pitkä (Pietilä ym., 2013 b). HVTV-1- infektion alusta solujen hajoamiseen kului noin 12 tuntia eli infektiiosyklin solunsisäinen vaihe on pitkä ja kasvukäyrä vastaa aiemmin saatuja tuloksia (Pietilä ym., 2013b).

Jotta voitiin tutkia infektion etenemistä isäntäsolussa adsorption jälkeen, infektoituista soluista valmistettiin ohutleikenäytteitä seuraavissa aikapisteissä: heti infektion jälkeen, eli 0 h, vapaiden virusten poistamisen jälkeen (n. 1 h) sekä 5, 8, 10, 12, 14 ja 16 h infektion jälkeen. Aiemmassa tutkimuksessa (Pietilä ym., 2013b) ohutleikkeet oli valmistettu aikapisteistä 0, 5, 10 ja 12 h infektion jälkeen, joten tässä työssä tarkasteltavat näytteet antavat yksityiskohtaisempaa tietoa infektion solunsisäisen syklin kulusta. Ohutleikkeistä haluttiin selvittää, missä aikapisteessä viruskapsideja näkyy solujen sisällä ja missä infektiiosyklin vaiheessa erikoinen mollurarakenne muodostuu isäntäsoluihin.

Läpivalaisuelektronimikroskopiolla selvitettiin, että osassa soluja voidaan nähdä viruspartikkeleita jo 8 h infektion jälkeen. 10 h infektion jälkeen sekä myöhemmissä aikapisteissä (kuva 10) solujen sisällä nähtiin tyhjiä ja täysiä partikkeleita. Tyhjiä partikkeleita näkyi soluissa vielä viimeisissäkin aikapisteissä viitaten siihen, ettei kaikkia kapsideja pakata ennen lyysistä. Viruksen adsorptio tapahtuu siis hyvin nopeasti infektion jälkeen, mutta virustuoton käynnistymiseen kuluu vielä 8 tuntia. Elektronimikroskopiolla saatua tietoa virustuotannon käynnistymisestä tukee myös se, että trisiini-SDS-PAGE-geeleeissä (kuva 11) viruksen pääasiallisen kapsidiproteiinin vyöhyke tulee näkyviin 8 h infektion jälkeen otetusta näytteestä.

5.4. Infektoiduissa soluissa elektronimikroskopiolla näkyvät rakenteelliset muutokset ja niiden analysointi

Aiemman tutkimuksen yhteydessä HVTV-1-viruksella infektoitujen *Har. vallismortis*-solujen pintaan on EM:lla havaittu muodostuvan ulkonevia mollurarakenteita (Maija Pietilä, henkilökohtainen tiedonanto). Tässä työssä havaittiin, että 12 h infektion jälkeen osaan soluista oli muodostunut myös tummiksi värjäytyviä mollurarakenteita. Mollurarakenteita nähtiin siis noin 2 tuntia ennen solujen lyysausta, sillä tässä kasvatuksessa lyysaus viivästyi ja tapahtui vasta 14 h infektion jälkeen. Nämä rakenteet olivat pyöreitä ja sijaitsivat solun sisällä aivan soluseinässä kiinni. Tällaisten rakenteiden muodostuminen infektoituun soluun virustuotannon ollessa jo selvästi käynnissä voisi viitata niiden tarpeellisuuteen joko virusten maturoitumisessa tai uusien virionien vapautumisessa. Valitettavasti käytetyllä ohutleikenäytemenetelmällä on mahdollista nähdä vain ehjät solut, joten epäselväksi jää mitä mollurarakenteelle tapahtuu lyysuksen yhteydessä. Aukeaako rakenne mahdollisesti solun sisälle tai ulkopuolelle, kuten viruksen indusoimat pyramidirakenteet (kappale 1.4.7), rikkooko se mahdollisesti isäntäsolun seinän, jääkö se lyysuksen yhteydessä kiinni soluseinään vai irtoaako se solusta? Ohutleikkeiden elektronimikroskopiassa ei kuitenkaan nähty auenneita mollurarakenteita. Tässä työssä analysoitiin vain kokonaisia soluja, joten ei tiedetä, mitä molluralle lyysanneissa soluissa tapahtuu. Tarkemman tiedon saamiseksi olisi hyvä tutkia myös soluriekaleet. 12, 14 ja 16 h infektion jälkeen otetuissa näytteissä näkyi myös, kuinka solun sisälle on muodostunut laajoja alueita, jotka näyttävät kalvorakenteelta. Tällaisia rakenteita näkyi vain soluissa, joissa oli sisällä myös viruskapsideja, joten voidaan olettaa, että muutos johtuu virusinfektiosta.

Isäntäsoluissa näkyvät muutokset voivat olla yhteydessä virusten vapauttamiseen solusta, mutta ne voisivat toisaalta olla myös eukaryoottisolujen virustehtaita vastaavia rakenteita. Useat eukaryoottisoluja infektoivat virukset aiheuttavat infektoidussa solussa laajaa solutukirangan, soluelinten ja membraanien uudelleenjärjestäytymistä, mikä mahdollistaa viruksen tehokkaamman replikaation ja uusien virusten kokoamisen suotuisassa mikroympäristössä. Virustehtaiden tiedetään antavan suojaa isäntäsolun antiviraalisilta suojamekanismeilta sekä konsentroidun replikaation ja virusten maturoitumiseen tarvittavia resursseja (Netherton ja Wileman, 2011). Virustehtaat ovat hyvin komplekseja ja dynaamisia rakenteita, jotka muuttuvat infektiocyklin vaiheiden mukaan (Novoa ym., 2005). Tämän työn tulosten perusteella en usko, että mollurarakenteet tai kalvostot ovat virustehtaita. Elektronimikroskopialla ei havaittu, että viruspartikkeleita olisi konsentroitunut erityisesti näiden rakenteiden läheisyyteen tai niiden sisälle. Mollurat ja kalvostot myös muodostuvat vasta, kun täysiä viruspartikkeleita on jo tuotettu solun sisälle.

Ohutleikkeiden kontrasti syntyy niitä valmistettaessa käytettävästä fiksaatiivista, osmiumtetroksidista. Varsinaisina väreinä jälkivärjäyksessä käytettiin uranyyliasettaattia ja lyijysitraattia. Näillä väreillä ja fiksaatiivilla näytteistä värjäytyvät soluseinä, membraanit, nukleiinihapot, nukleoproteiinit, fosfolipoproteiinit, proteiinit, ribonukleoproteiinit, ribosomit, virusten pinnat ja lipidit (M. Lindman, tiedoksianto. Elektronimikroskopian yksikkö, Helsingin yliopisto). Tämän tiedon perusteella ohutleikkeissä nähdyt molemmat viruksen indusoimat rakennemuutokset voisivat periaatteessa olla kalvostoa, proteiinia tai DNA:han liittyviä rakenteita.

Trisiini-SDS-PAGEssa (kuva 11) nähdään virusinfektion aiheuttamia proteiinimuutoksia aikaisimmillaan 8 tuntia infektion jälkeen solupelletinäytteissä. Nämä n. 200 ja 130 kDa:n kokoiset proteiinvyöhykkeet voimistuvat myöhemmin otetuissa näytteissä. Kyseisiä vyöhykkeitä ei muodostu infektoimattomista soluista, eikä niitä näy myöskään puhdistetuissa HVTV-1-partikkeleissa, joten niiden voidaan olettaa olevan peräisin infektion solussa aiheuttamista muutoksista. Kyseiset proteiinit saattavat olla osa mollura- ja kalvorakenteita. Se, että vyöhykkeet näkyvät geelissä haaleina jo ennen kuin kumpaakaan muodostuvaa rakennetta nähdään elektronimikroskopialla, voi selittyä sillä, että kyseisiä proteiineja on jo tuotettu, mutta niitä ei ole vielä järjestetty solun sisällä näkyviksi rakenteiksi. Trisiini-SDS-PAGE-geeli ajettiin myös infektoidusta kasvatuksesta valmistetuille supernatantinäytteille (kuva 12). Näistä geeleistä nähdään, että kyseiset proteiinit löytyvät supernatantista vasta solujen lysattua, eli niitä ei eritetä solusta kasvuympäristöön.

Tässä työssä selvitettiin myös, olisiko mollurarakenteita mahdollista saada puhdistettua erilleen, kuten SIRV-2-viruksen indusoimia pyramidirakenteita (kappale 1.4.7). Puhdistus tehtiin kasvatukselle, jonka infektoinnista oli kulunut 16 tuntia. Kasvatuksesta poistettiin soluriekaleet ja supernatantille tehtiin PEG-saostus. Saostamaton ja saostettu näyte ajettiin sakkaroosigradientteihin, jotka fraktioitiin geelielektroforeesianalyysia varten. Fraktioidut sakkaroosigradientit ajettiin SDS-PAGE-geelissä (kuva 14), josta nähtiin, että 10 % PEG-saostetussa näytteessä 130 kDa:n kokoinen proteiini ajautui fraktioissa 2 ja 3, gradientin pinnasta alaspäin laskien. Se ei tällä menetelmällä kuitenkaan puhdistunut erilleen, vaan ajautui samassa fraktiossa lukuisten muiden proteiinien kanssa. 200 kDa:n kokoista proteiinia ei nähdä fraktioista ajetuissa geeleissä lainkaan. Jatkossa puhdistuksessa voisi kokeilla pidempää sentrifugointiaikaa ja mollurarakenteen puhdistamista solu- ja soluriekalepelletistä, sillä geelielektroforeesin perusteella suurin osa 130 kDa:n proteiinista oli siellä.

130 kDa:n proteiinille tehtiin massaspektrometria-analyysi, jonka tuloksista (liite 4) nähdään, että vyöhykkeen kohdalla geelissä on useita eri proteiineja. Selkeästi eniten osumia oli HVTV-1-viruksen geenituotteeseen 21, jonka on ennustettu olevan ribonukleotidireduktaasi (Pietilä ym., 2013b). Ribonukleotidireduktaasi on entsyymi, joka katalysoi deoksiribonukleiinihappojen synteesin ribonukleiinihappoista eli se mahdollistaa DNA-synteesin ja voi osallistua DNA:n korjaukseen (Berg ym.,

2006). Jos 130 kDa proteiini liittyy mollura- tai kalvorakenteisiin, tämän tiedon valossa voisi olettaa näiden rakenteiden olevan alueita, joihin viruksen DNA-synteesi on keskittynyt. Jos näin on, miten selittyvät jo ennen näiden rakenteiden ilmestymistä nähtävät täydet virionit? Ehkä DNA-synteessin keskittyminen tietyille alueelle tehostaa virus-DNA:n tuottoa, mutta ei kuitenkaan ole välttämätöntä. Näin ollen täysiä viruksia voisi olla valmiina jo ennen toimintojen keskittämistä tietyille alueille isäntäsolussa. Todennäköisempänä vaihtoehtona pidän kuitenkin sitä, että infektion loppupuolella muodostuvat rakenteet liittyvät virustuoton sijaan virusten maturoitumiseen ja ribonukleotidireduktaasi osallistuisi esimerkiksi maturoitumiseen liittyvään genomimuokkaukseen.

Toinen rakennemuutos solun sisällä näytti kalvostolta, joten ohutlevykromatografialla analysoitiin myös infektoidussa solussa mahdollisesti tapahtuvat muutokset lipidikoostumuksessa. Merkittäviä muutoksia ei kuitenkaan havaittu, joten kalvostot rakentuvat samoista lipideistä kuin infektoimattomien solujen kalvot, jos ne ovat lipidikalvoja.

5.5. Yhteenveto ja jatkossa tutkittavaa

Tässä työssä selvitettiin HVTV-1-infektion kulkua *Har. vallismortis*-soluissa. HVTV-1-viruksen adsorption todettiin olevan tehokasta ja tutkittujen haloarkeonivirusten keskuudessa jopa poikkeuksellisen nopeaa. HVTV-1-partikkelien havaittiin kiinnittyvän reseptoriinsa hännällään ja reseptoreina todettiin toimivan isäntäsolun pinnan arkellarakenteet. Yhteen arkellaan voi kiinnittyä useita viruksia eivätkä reseptorit saturoidu edes korkeilla MOI-arvoilla. Arkellojen todettiin olevan hauraita rakenteita, jotka katkeilevat ja irtoavat solun pinnasta helposti. Vaikka HVTV-1:n adsorptio tapahtuu nopeasti, on sen infektiosyklin solun sisäinen aika pitkä. Virustuotanto soluissa alkaa vasta noin kahdeksan tuntia infektion jälkeen, jolloin viruspartikkeleita havaitaan osassa soluja. Virukset vapautuvat lyysaamalla vasta noin 12 tuntia infektion jälkeen, kuten on aiemmin todettu (Pietilä ym., 2013b).

HVTV-1 -infektio indusoi isäntäsolussa kahden erikoisen rakenteen muodostumisen. Solun sisälle, aivan soluseinään kiinni, muodostuu pyöreä, halkaisijaltaan noin 150 nm:n kokoinen mollurarakenne. Soluihin muodostuu myös laajoja kalvostonnäköisiä rakenteita. Molemmat rakenteet havaitaan soluissa ensimmäistä kertaa noin kaksi tuntia ennen solujen lyyssausta. Samaan aikaan, kun nämä rakenteet ilmaantuvat soluihin, nähdään infektoitujen solujen proteiinikoostumuksessa kaksi muutosta. Virusinfektio saa aikaan 130 ja 200 kDa:n kokoisten proteiinien tuoton soluissa. 130 kDa:n kokoinen proteiini identifioitiin ribonukleotidireduktaasiksi, joka on viruksen geenituote. Ribonukleotidireduktaasi katalysoi DNA synteesin ribonukleeeinihapoista ja voi osallistua DNA:n korjaukseen. Näiden viruksen indusoimien rakenteiden merkitystä infektiosyklille ei voida tämän työn perusteella sanoa varmasti. Kuitenkin erityisesti mollurarakenteen ilmestyminen soluseinän yhteyteen juuri ennen lyyssausta, antaisi viitteitä sen merkityksestä joko virusten maturoitumisessa tai isäntäsolun lyyssaamisessa.

Jos adsorptiota haluaisi jatkossa tutkia tarkemmin ja varmistua adsorptiokohdasta, voisi läpivalaisuelektronimikroskopiolla tarkastella näytteitä, joissa on vain infektiivisiä HVTV-1-partikkeleita ja puhdistettua arkellaa. Arkella-rakenteita saisi todennäköisesti puhdistettua melko helposti sentrifugointimenetelmillä.

Mollurarakenteen puhdistamista olisi myös mielenkiintoista yrittää vielä eri menetelmillä. Myös soluriekaleiden tarkastelu elektronimikroskopiolla voisi tuoda lisätietoa siitä, mitä mollurarakenteelle solujen lyyssatessa tapahtuu. Mollurarakenteen puhdistamista voisi olla järkevää yrittää solupellettinäytteistä, sillä geelielektroforeesien perusteella viruksen indusoimaa 130 kDa:n kokoista proteiinia jää enemmän pellettiin kuin supernatanttiin. Mikäli mollurarakenne saataisiin puhdistettua, sitä voisi tarkastella myös immuno-elektronimikroskopiolla. Jatkossa myös viruksen indusoimaa 200 kDa

kokoista proteiinia voisi tutkia tarkemmin tekemällä sille massaspektrometria-analyysi, kuten toiselle viruksen indusoimalle proteiinille tehtiin.

6. Kiitokset

Tämä työ tehtiin Helsingin yliopiston Biotieteiden laitoksen ja Biotekniikan instituutin Molekyyli virologian ohjelman tutkimusryhmässä. Kirjoittaja kiittää EU ESFRI Instructiin kuuluvan Virus- ja makromolekyylikompleksituottokeskuksen (ICVIR) henkilökuntaa ja mahdollisuutta käyttää keskuksen laitteistoja. ICVIR on Helsingin yliopiston tutkimusinfrastruktuuri.

Suurin kiitos tämän työn onnistumisesta kuuluu ehdottomasti ohjaajalleni, tohtori Maija Pietilälle. Hänen apunsa kokeiden suunnittelussa ja neuvot käytännön työssä olivat merkittävässä osassa työn toteutuksessa. Ohjaajani oli aina helposti ja nopeasti tavoitettavissa myös kirjoitusvaiheessa. Opin häneltä paljon työn kirjallisesta raportoinnista ja hänen kommenttinsa tekivät käsikirjoituksestani paremman. Lisäksi haluan kiittää erityisesti tutkimusryhmän johtajaa, akatemiaprofessoria Dennis Bamfordia työn mahdollistamisesta.

Kiitos laboratorion tekniselle henkilökunnalle, joiden tekemä työ helpotti merkittävästi useita työvaiheita. Haluan kiittää myös kaikkia laboratoriossamme työskenteleviä mutkattoman, viihtyisän ja avuliaan työilmapiirin luomisesta.

Lopuksi haluan vielä kiittää perhettäni ja läheisiäni, jotka mahdollistivat kirjoittamistyön pikkulapsiarjen pyörteissä. Lämmin kiitos kaikesta avusta ja tuesta!

7. Lähteet

- Abrescia, N., Bamford, D. H., Grimes, J. M., Stuart D. I. (2012). Structure Unifies the Viral Universe. *Annual Review of Biochemistry* Vol. 81: 795-822.
- Ackermann, HW. (1999). Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. *Advances in Virus Research* 51: 135–201.
- Ackermann, HW. (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology* 154:245–251.
- Ackermann, HW., DuBow, M. S. (1987). Viruses of Prokaryotes. General Properties of Bacteriophages, Vol. I, *CRC Press*, Boca Raton. s.202.
- Adams M.H. (1959). Bacteriophages. *Interscience Publishers, Inc*, New York.
- Alber, S-V., Meyer, B. H. (2011) The archaeal cell envelope. *Nature Reviews Microbiology* 9: 414-426.
- Albers S-V., Jarrell K. F. (2015). The archaellum: how Archaea swim. *Frontiers in Microbiology* 6:23.
- Albers, S-V., Elferink, M. G., Charlebois, R.L., Sensen, C.W., Driessen, A.J., Konings, W.N. (1999). Glucose transport in the extremely thermoacidophilic *Sulfolobus solfataricus* involves a high-affinity membrane-integrated binding protein. *Journal of Bacteriology* 14: 4285-91.
- Andrei, A-S., Banciu, H. L., Oren, A. (2012). Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiology Letters* vol.3, 1: 1-9.
- Antón, J., Rosselló-Mora, R., Rodríguez-Valera, F., Amann, R. (2000). Extremely Halophilic Bacteria in Crystallizer Ponds from Solar Salterns. *Applied and Environmental Microbiology* 7: 3052-3057.
- Arnold, H.P., Ziese, U., Zillig, W. (2000). SNDV, a novel virus of the extremely thermophilic and acidophilic archaeon *Sulfolobus*. *Virology*, 272:409–416.
- Atanasova, N. S., Bamford, D. H., Oksanen, H. M. (2015)b. Haloarchaeal virus morphotypes. *Biochimie*, 2015, DOI: 10.1016/j.biochi.2015.07.002, in press.
- Atanasova, N. S., Demina, T. A., Buivydas, A., Bamford, D. H., Oksanen, H. M. (2015)a. Archaeal Viruses Multiply: Temporal Screening in a Solar Saltern. *Viruses* Vol. 7, 4: 1902-1926.
- Atanasova, N. S., Oksanen, H. M., Bamford, D.H. (2015)c. Haloviruses of archaea, bacteria, and eukaryotes. *Current Opinion in Microbiology* Vol. 25: 40–48.
- Atanasova, N. S., Roine, E., Oren, A., Bamford, D. H., Oksanen, H. M. (2012). Global network of specific virus-host interactions in hypersaline environments. *Environmental Microbiology* 14: 426–440.
- Bai, X-C., McMullan, G., Scheres, S. H. W. (2015). How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends in Biochemical Sciences* 1:49-57.
- Baltimore, D. (1971). Expression of Animal Virus Genomes. *Bacteriological Reviews* 3: 235-241.

- Bamford D. H., Ravantti, J. J., Rönholm, G., Laurinavičius, S., Kukkaro, P., Dyll-Smith, M., Somerharju, P., Kalkkinen, N., Bamford, J. K. (2005). Constituents of SH1, a novel lipid-containing virus infecting the halophilic euryarchaeon *Haloarcula hispanica*. *Journal of Virology* 79:9097–9107.
- Bamford, D. H., Mindich, L. (1984). Characterization of the DNA-protein complex at the termini of the bacteriophage PRD1 genome. *Journal of Virology* 2:309–315.
- Baptiste, E., Brochier, C., Boucher, Y. (2005). Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* 1: 353-363.
- Bayley, D. P., Jarrell, K. F. (1998). Further evidence to suggest that archaeal flagella are related to bacterial type IV pili. *Journal of Molecular Evolution* 46, 370–373.
- Beijerinck, M. W. (1898). Über ein Contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter. *Verhandelingen der Koninklijke akademie van Wetenschappen te Amsterdam* 65: 1–22. Englanniksi kääntetty: Johnson, J., Ed. (1942) *Phytopathological classics. American Phytopathological Society* 7:33–52.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2002). *Biochemistry*, 5th Edition. *W. H. Freeman and Company*, New York, s.718-720.
- Bettstetter, M., Peng, X., Garrett, R.A., Prangishvili, D. (2003). AFV1, a novel virus infecting hyperthermophilic archaea of the genus *Acidianus*. *Virology* 315:68–79.
- Bize, A., Karlsson, E. A., Ekefjard, K., Quax, T. E., Pina, M., Prevost, M. C. (2009). A unique virus release mechanism in the Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:11306–11311.
- Bolduc, B., Shaughnessy, D. P., Wolf, Y., I., Koonin, E., V., Roberto, F. F., Young, M. (2012). Identification of Novel Positive-Strand RNA Viruses by Metagenomic Analysis of Archaea-Dominated Yellowstone Hot Springs. *Journal of Virology* 10:5562-5573.
- Boujelben, I., Gomariz, M., Martínez-García, M., Santos, F., Peña, A., López, C., Antón, J., Maalej, S. Spatial and seasonal prokaryotic community dynamics in ponds of increasing salinity of Sfax solar saltern in Tunisia. *Antonie van Leeuwenhoek* Vol. 101, 4: 845-857.
- Boulant, S., Stanifer, M., Lozach, P-Y. (2015). Dynamics of Virus-Receptor Interactions in Virus Binding, Signaling, and Endocytosis. *Viruses* 7: 2794-2815.
- Bradley, M. K., Johnson, J.E. (2014). Assembly and Maturation of a T = 4 Quasi-Equivalent Virus Is Guided by Electrostatic and Mechanical Forces. *Viruses* 8:3348-3362.
- Brewer, GJ. (1980). Control of membrane morphogenesis in bacteriophage. *International Review of Cytology* 68:53–96.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., Forterre P. (2008). Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology* 6: 245–252.
- Cann, A. J. (2005)a. *Principles of Molecular Virology*, Fourth Edition. *Elsevier Academic Press*, San Diego, s. 294.

- Cann, A. J. (2005)b. Principles of Molecular Virology, Fourth Edition. *Elsevier Academic Press*, San Diego, s. 104-129.
- Casasnovas, JM. (2013). Virus-receptor interactions and receptor-mediated virus entry into host cells. *Sub-cellular biochemistry* 68:441-66.
- Caspar, D., Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 27:1–24.
- Castón, J. R., Carrascosa J. L. (2013). The basic architecture of viruses. *Sub-cellular Biochemistry* 68: 53-75.
- Cavicchioli, R. (2011). Archaea – Timeline of the third domain. *Nature Reviews Microbiology* 9: 51-60.
- Claverie, J. M., Abergel, C., Ogata, H. (2009). Mimivirus. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 328:89–121.
- Comeau, A. M., Hatfullb, G. F., Krischa, H., M., Lindellc, D., Mannd, N. H., Prangishvili, D. (2008). Exploring the prokaryotic virosphere *Research in Microbiology* 159:306–313.
- Craig, L., Pique, M. E., Tainer, J. A. (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 2: 363-378.
- Crowley, D.J., Boubriak, I., Berquist, B. R. (2006). The *uvrA*, *uvrB* and *uvrC* genes are required for repair of ultraviolet light induced DNA photoproducts in *Halobacterium* sp. NRC-1. *Saline Systems* 2: 11.
- DasSarma, S., DasSarma, P. (2012). Halophiles. Encyclopedia of life sciences. *John Wiley & Sons*, Chichester, s. 1-11.
- Deng, Y., Almsheerqi, Z.A., Ng, M. M. L., Kohlwein, S.D. (2010). Do viruses subvert cholesterol homeostasis to induce host cubic membranes? *Trends in Cell Biology* 20: 371-379.
- Eichler, J. (2003). Facing extremes: archaeal surface-layer (glyco)proteins. *Microbiology* 149: 3347-3351.
- Eisenberg, H., Mevarech, M., Zacchai, G. (1992). Biochemical, structural, and molecular genetic aspects of halophilism. *Advances in Protein Chemistry* 43: 1–62.
- Elkins, J. G., Podar M., Graham, D. E., Makarova, K. S., Wolf, Y., Randau L., Hedlund B. P., Brochier-Armanet, C., Kunin, V., Anderson, I., Lapidus, A., Goltsman, E., Barry, K., Koonin, E. V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N., Wanner, G., Richardson, P., Keller, M., Stetter, K. O. (2008). A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 8102–8107.
- Erdmann, S., Chen, B., Huang, X., Deng, L., Liu, C., Shah, S. A., Le Moine Bauer, S., Sobrino, C. L., Wang, H., Wei, Y., Garret, R. A., Huang, L., Lin, L. (2013). A novel single-tailed fusiform Sulfolobus virus STSV2 infecting model Sulfolobus species. *Extremophiles* 18:51–60.
- Fagan, R. P., Fairweather, N. F. (2014). Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nature Reviews Microbiology* 12: 211–222.
- Fenner, F. (2008). History of Virology: Vertebrate Viruses. Encyclopedia of Virology (kolmas painos), *Elsevier Academic Press*, San Diego, s. 455–459.

- Folimonova, S.Y., (2012). Superinfection exclusion is an active virus-controlled function that requires a specific viral protein. *Journal of Virology* vol. 86, 10: 5554-5561.
- Fröls, S., Ajon, M., Wagner, M., Teichmann, D., Zolghard, B., Folea, M., Boekema, E. J., Driessen A. J., Schleper, C., Albers, S.-V. (2008). UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation. *Molecular Microbiology* 70: 938–952.
- Fu, C-Y, Wang, K., Gan, L., Lanman, J., Khayat, R., Young, M. J., Jensen, G. J., Doerschuk, P.C., Johnson, J. E. (2010). In vivo assembly of an archaeal virus studied with whole-cell electron cryotomography. *Structure* 12: 1579-1586.
- Garcia-Heredia, I., Martin-Cuadrado, A. B., Mojica, F. J., Santos, F., Mira, A., Antón, J., Rodriguez-Valera, F. (2012). Reconstructing viral genomes from the environment using fosmid clones: the case of haloviruses. *PLoS One* Vol. 7, 3.
- Geslin, C., Gaillard, M., Flament, D., Rouault, K., Le Romancer, M., Prieur, D., Erauso, G. (2007). Analysis of the first genome of a hyperthermophilic marine virus-like particle, PAV1, isolated from *Pyrococcus abyssi*. *Journal of Bacteriology* 189:4510–4519.
- Gonzalez, C., Gutierrez, C., Ramirez, C. (1978). Halobacterium vallismortis sp. nov. An amyolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Canadian Journal of Microbiology* Vol. 24, 6: 710–715.
- Goodwin, CM., Xu, S., Munger, J. (2015). Stealing the Keys to the Kitchen: Viral Manipulation of the Host Cell Metabolic Network. *Trends in Microbiology* doi:10.1016/j.tim.2015.08.007.
- Happonen, L. J., Oksanen, E., Liljeroos, L., Goldman, A., Kajander, T., Butcher, S. J. (2013). The structure of the NTPase that powers DNA packaging into *Sulfolobus* turreted icosahedral virus 2. *Journal of Virology* 87:8388–8398.
- Harrison, B. D., Wilson, T. M. (1999). Milestones in the research on tobacco mosaic virus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 354(1383):521-9.
- Hechler T., Pfeifer F. (2009). Anaerobiosis inhibits gas vesicle formation in halophilic archaea. *Molecular Microbiology* 71:132–145.
- Henneberger, R., Moissl, C., Amann, T., Rudolph, C., Huber R. (2006). New Insights into the Lifestyle of the Cold-Loving SM1 Euryarchaeon: Natural Growth as a Monospecies Biofilm in the Subsurface. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 192–199.
- Horn, C., Paulmann, B., Kerlen, G., Junker, N., Huber, H. (1999). In vivo observation of cell division of anaerobic hyperthermophiles by using a high-intensity dark-field microscope. *Journal of Bacteriology* 181: 5114–5118.
- Huang, Q., Dong, C. Z., Dong, R. M., Jiang, H., Wang, S., Wang, G., Fang, B., Ding, X., Niu, L., Li, X., Zhang, C., Dong, H. (2011). Archaeal and bacterial diversity in hot springs on the Tibetan Plateau, China. *Extremophiles* 5: 549-563.
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C., Stetter, K.O. (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417: 63-67.

- Häring, M., Rachel, R., Peng, X., Garrett, R. A., Prangishvili, D. (2005). Viral diversity in hot springs of Pozzuoli, Italy, and characterization of a unique archaeal virus, *Acidianus* bottle-shaped virus, from a new family, the Ampullaviridae. *Journal of Virology* Vol. 79, 15: 9904–9911.
- Iwanowski, D. (1892). Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. *Bulletin Scientifique publié par l'Académie Impériale des Sciences de Saint-Petersbourg / Nouvelle Serie III* 35: 67—70. Englanniksi käännetty: Johnson, J., Ed. (1942) Phytopathological classics. *American Phytopathological Society* 7:27–30.
- Jaakkola, S. T., Penttinen, R. K., Viléna, S. T., Jalasvuori, M., Rönholm, G., Bamford, J. K., Bamford D. H., Oksanen, H.M. (2012). Closely Related Archaeal Haloarcula hispanica Icosahedral Viruses HHIV-2 and SH1 Have Nonhomologous Genes Encoding Host Recognition Functions. *Journal of Virology* 9:4734-4742.
- Jacobs, BL., Langland, JO., Kibler, KV., Denzler, KL., White, SD., Holechek, SA., Wong, S., Huynh, T., Baskin, CR. (2009). Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral research* 1:1-13.
- Jain, S., Caforio, A., Driessen, A. J. M. (2014). Biosynthesis of archaeal membrane ether lipids. *Frontiers in Microbiology* 5: 641.
- Jarrell, K. F., Albers, S-V. (2012). The archaeellum: an old motility structure with a new name. *Trends in Microbiology* 7: 307-312.
- Jarrell, K. F., Bayley, D. P., Kostyukova, A. S. (1996). The archaeal flagellum: a unique motility structure. *Journal of Bacteriology* 178: 5057–5064.
- Jarrell, K. F., Ding, Y., Meyer, B. H., Albers, S-V., Kaminski, L., Eichler, J. (2014). N-Linked Glycosylation in Archaea: a Structural, Functional, and Genetic Analysis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78: 304–341.
- Jarrell, K. F., Ding, Y., Nair, D. B., Siu, S. (2013). Surface Appendages of Archaea: Structure, Function, Genetics and Assembly. *Life (Basel)* 3: 86-117.
- Kielian, M., Jungerwirth, S. (1990). Mechanisms of enveloped virus entry into cells. *Molecular Biology & Medicine* 1:17-31.
- King, A., Adams, M., Carstens, E., Lefkowitz, E. (2012). Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier Academic Press, San Diego*. s. 3-7.
- Klingl A. (2014). S-layer and cytoplasmic membrane – exceptions from the typical archaeal cell wall with a focus on double membranes. *Frontiers in Microbiology* 5: 624.
- Kozubal, M. A., Romine, M., Jennings, Rd., Jay Z. J., Tringe, S. G., Rusch, D. B., Beam, J. P., McCue, L. A., Inskeep, W. P. (2013). Geoarchaeota: a new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park. *The ISME Journal* 3: 622-34.
- Kukkaro, P., Bamford, D. H. (2009). Virus-host interactions in environments with a wide range of ionic strengths. *Environmental Microbiology Reports* Vol. 1, 1: 71-77.
- Labrie, S.J., Samson, J.E., Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology* Vol. 8, 5: 317-327.

- Lassak, K., Neiner, T., Ghosh, A., Klingl, A., Wirth, R., Albers, S-V. (2012). Molecular analysis of the crenarchaeal flagellum. *Molecular Microbiology* 83(1): 110-124.
- Leiman, P. G., Shneider, M. M. (2012). Contractile tail machines of bacteriophages. *Advances in experimental medicine and biology* 726:93-114.
- Lemay, SG., Panja, D., Molineux, IJ. (2013). Role of osmotic and hydrostatic pressures in bacteriophage genome ejection. *Physical Review. E, Statistical, nonlinear and soft matter physics* 2:022714.
- List of procaryotic names with standing in nomenclature (LPSN), <http://www.bacterio.net>
- Lucas, W. (2010). Viral Capsids and Envelopes: Structure and Function. *eLS*.
- Luk, A., Williams, T. J., Erdmann, S., Papke, R. T., Cavicchioli, R. (2014). Viruses of Haloarchaea. *Life* Vol. 4, 4: 681-715.
- Lustig, A., Levine, A. J. (1992). One Hundred Years of Virology. *Journal of Virology*. 8: 4629-4631.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2003). Brock, Biology of Microorganisms, 10th Edition. *Prentice Hall*, New Jersey, s.159-160.
- Makarova, K. S., Yutin, N., Bell, S. D., Koonin, E. V. (2010). Evolution of diverse cell division and vesicle formation systems in Archaea. *Nature Reviews Microbiology* 8, 731–741.
- Más, V., Melero, JA. (2013). Entry of enveloped viruses into host cells: membrane fusion. *Sub-cellular biochemistry* 68: 467-487.
- Mateu, M. G. (2013)a. Structure and Physics of Viruses. *Sub-cellular Biochemistry* 68: 3-51.
- Mateu, M. G. (2013)b. Assembly, stability and dynamics of virus capsids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1–2:65–79.
- Mochizuki, T., Krupovic, M., Pehau-Arnaudet, G., Sakoc, Y., Forterre, P., Prangishvili, D., (2012). Archaeal virus with exceptional virion architecture and the largest single-stranded DNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 33: 13386–13391.
- Mochizuki, T., Sako, Y., Prngishvili, D. (2011). Provirus induction in hyperthermophilic archaea: characterization of *Aeropyrum pernix* spindle-shaped virus 1 and *Aeropyrum pernix* ovoid virus 1. *Journal of Bacteriology* 193:5412–5419.
- Mochizuki, T., Yoshida, T., Tanaka, R., Forterre P., Sako, Y., Prangishvili, D. (2010). Diversity of viruses of the hyperthermophilic archaeal genus *Aeropyrum*, and isolation of the *Aeropyrum pernix* bacilliform virus 1, APBV1, the first representative of the family *Clavaviridae*. *Virology* 402:347–354.
- Moissl, C., Rachel, R., Briegel, A., Engelhardt, H., Huber, R. (2005). The unique structure of archaeal 'hami', highly complex cell appendages with nano-grappling hooks. *Molecular Microbiology* 56: 361–370.
- Molineux, I. J., Panja, D. (2013). Popping the cork: mechanisms of phage genome ejection. *Nature Reviews Microbiology* 11: 194-204.

- Müller, DW., Meyer, C., Gürster, S., Küper, U., Huber, H., Rachel, R., Wanner, G., Wirth, R., Bellack, A. (2009). The Iho670 fibers of *Ignicoccus hospitalis*: a new type of archaeal cell surface appendage. *Journal of Bacteriology* 191: 6465-6468.
- Netherton, C. L., Wileman, T. (2011). Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Current Opinion in Virology* 1:381-387.
- Netherton, C., Moffat, K., Brooks, E., Wileman, T. (2007). A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. *Advances in Virus Research* 70:101-82.
- Nickell, S., Hegerl, R., Baumeister, W., Rachel, R. (2003). *Pyrodictium cannulae* enter the periplasmic space but do not enter the cytoplasm, as revealed by cryo-electron tomography. *Journal of Structural Biology* 141: 34-42.
- Nikhil, A. T., Bardy, S. L., Jarrell, K. F. (2001). The archaeal flagellum: a different kind of prokaryotic motility structure. *FEMS Microbiology Reviews* 2:147-174.
- Novoa, R. R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H., Risco C. (2005). Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biology of the Cell* 97: 147-172.
- Nunoura, T., Takaki, Y., Kakuta, J., Nishi, S., Sugahara, J., Kazama, H., Chee, G-J., Hattori, M., Kanai, A., Atomi, H., Takai, K., Takami, H. (2011). Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Research* 8: 3204-3223.
- Nuttall, S. D., Dyall-Smith, M. L. (1993). HF1 and HF2: Novel Bacteriophages of Halophilic Archaea. *Virology* 197:678-684.
- Oikkonen, V. M., Bamford, D. H. (1989). Quantitation of the adsorption and penetration stages of bacteriophage phi 6 infection. *Virology* 1:229-238.
- Oren, A. (2002)a. Molecular ecology of extremely halophilic archaea and bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 39: 1-7.
- Oren, A. (2002)b. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* Vol. 28, 1: 56-63.
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 4: 2-13.
- Oren, A. (2013). The Function of Gas Vesicles in Halophilic Archaea and Bacteria: Theories and Experimental Evidence. *Life (Basel)* 3:1-20.
- Oren, A. (2014). Taxonomy of halophilic Archaea: Current status and future challenges. *Extremophiles* 18: 825-834.
- Oren, A., Arahal, D. R., Ventosa, A. (2009). Emended descriptions of genera of the family Halobacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 637-642.

- Peabody, C. R., Chung, Y. J., Yen, M. R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A. P., Saier, M. H. Jr. (2003). Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology* 149: 3051–3072.
- Pennazio, S. (2011). Viruses: are they living entities? *Theoretical Biology Forum* 1: 45-56.
- Pieper, U., Kapadia, G., Mevarech, M., Herzberg, O. (1998). Structural features of halophilicity derived from the crystal structure of dihydrofolate reductase from the Dead Sea halophilic archaeon, Haloferax volcani. *Structure* 6: 75-88.
- Pietilä, M. K., Laurinavicius, S., Sund, J., Roine, E., Bamford, D. H. (2010). The single-stranded DNA genome of novel archaeal virus halorubrum pleomorphic virus 1 is enclosed in the envelope decorated with glycoprotein spikes. *Journal of Virology* 84:788-98.
- Pietilä, M. K., Atanasova, N. S., Manoleb, V., Liljeroos, L., Butcher, S. J., Oksanen, H. M., Bamford, D. H. (2012). Virion Architecture Unifies Globally Distributed Pleolipoviruses Infecting Halophilic Archaea. *Journal of Virology* 9:5067-5079.
- Pietilä, M. K., Atanasova, N. S., Oksanen, H. M., Bamford, D. H. (2013)a. Modified coat protein forms the flexible spindle-shaped virion of haloarchaeal virus His1. *Environmental Microbiology* 15, 1674–1686.
- Pietilä, M. K., Demina, T. A., Atanasova, N.S., Oksanen H. M., Bamford, D. H. (2014). Archaeal viruses and bacteriophages: comparisons and contrasts. *Trends in Microbiology* Vol. 22, 6:334–344.
- Pietilä, M. K., Laurinmäki, P., Russell, D. A., Ko, C-C., Jacobs-Sera, D., Butcher, S. J., Bamford, D. H., Hendrix, R. W. (2013)b. Insights into head-tailed viruses infecting extremely halophilic archaea. *Journal of Virology* Vol. 87, 6: 3248-3260.
- Pietilä, M. K., Laurinmäki, P., Russell, D. A., Ko, C-C., Jacobs-Sera, D., Hendrix, R. W., Bamford, D. H., Butcher, S. J. (2013)c. Structure of the archaeal head-tailed virus HSTV-1 completes the HK97 fold story. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 110, 26: 10604–10609.
- Pina, M., Bize, A., Forterre, P., Prangishvili, D. (2011). The archeoviruses. *FEMS Microbiology Reviews* Vol. 36, 6: 1035 – 1054.
- Poranen, M. M., Daugelavicius, R., Bamford, D. H. (2002). Common principles in viral entry. *Annual Review in Microbiology* 56: 521–538.
- Porter, K., Russ, B.E., Dyall-Smith, M.L. (2007). Virus–host interactions in salt lakes. *Current Opinion in Microbiology* Vol. 10, 4: 418–424.
- Prangishvili, D, Quax, T., (2011). Exceptional virion release mechanism: one more surprise from archaeal viruses. *Current Opinion in Microbiology* Vol. 14, 3: 315-320.
- Prangishvili, D. (2013). The Wonderful World of Archaeal Viruses. *Annual Review of Microbiology* 67: 565-585.

- Prangishvili, D., Arnold, H.P., Götz, D., Ziese, U., Holz, I., Kristjansson, J.K., Zillig, W. (1999). A novel virus family, the *Rudiviridae*: structure, virus-host interactions and genome variability of the *Sulfolobus* viruses SIRV1 and SIRV2. *Genetics* 152:1387–1396.
- Prangishvili, D., Garrett, R. A., Koonin, E. V. (2006). Evolutionary genomics of archaeal viruses: unique viral genomes in the third domain of life. *Virus research* 1: 52-67.
- Prangishvili, D., Koonin, E. V., Krupovic, M. (2013). Genomics and biology of Rudiviruses, a model for the study of virus-host interactions in Archaea. *Biochemical Society Transactions* 41:443–450.
- Prangishvili, D., Krupovic, M. (2012). A new proposed taxon for double-stranded DNA viruses, the order “Ligamenvirales”. *Archives of Virology* 157:791–795.
- Prangishvili, D., Vestergaard, G., Häring, M., Aramayo, R., Basta, T., Reinhard, R., Garrett, R. A. (2006). Structural and genomic properties of the hyperthermophilic archaeal virus ATV with an extracellular stage of the reproductive cycle. *Journal of Molecular Biology*, 359:1203–1216.
- Purohit, PK., Inamdar, MM., Grayson, PD., Squires, TM., Kondev, J., Phillips, R. (2005). Forces during bacteriophage DNA packaging and ejection. *Biophysical Journal* 88:851–866.
- Quax, T. E., Lucas, S., Reimann, J., Pehau-Arnaudet, G., Prevost, M. C., Forterre, P., Albers, S-V., Prangishvili, D. (2011). Simple and elegant design of a virion egress structure in Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 8:3354-3359.
- Quemin, E. R., Lucas, S., Daum, B., Quax, T. E., Kuhlbrandt, W., Forterre, P. (2013). First insights into the entry process of hyperthermophilic archaeal viruses. *Journal of Virology* Vol. 87, 24: 13379–13385.
- Quemin, E. R., Quax, T. E. (2015). Archaeal viruses at the cell envelope: entry and egress. *Frontiers in microbiology* 6:552.
- Rachel, R., Wyschkony, I., Riehl, S., Huber, H. (2002). The ultrastructure of *Ignicoccus*: Evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea* 1: 9-18.
- Reed, C. J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V., Evilia, C. (2013). Protein Adaptations in Archaeal Extremophiles. *Archaea* 2013; 2013.
- Reynolds, D. R., Chapman, J. W., Harrington, R. (2006). The Migration of Insect Vectors of Plant and Animal Viruses. *Advances in Virus Research* 67:453-517.
- Rieger, G., Rachel, R., Hermann, R., Stetter, K.O. (1995). Ultrastructure of the hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium abyssi*. *Journal of Structural Biology* Vol. 115, 1: 78-87.
- Rudolph, C., Wanner, G., Huber, R. (2001). Natural Communities of Novel Archaea and Bacteria Growing in Cold Sulfurous Springs with a String-of-Pearls-Like Morphology. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2336–2344.
- Rybicki, E. (1990). The classification of organisms at the edge of life, or problems with virus systematics. *South African Journal of Science* 86:182-186.

- Schwarz, F., Aebi, M. (2011). Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology* 21: 576–582.
- Senčilo, A., Roine, E. (2014). A Glimpse of the genomic diversity of haloarchaeal tailed viruses. *Frontiers in Microbiology* 5:84.
- Sieczkarski, SB., Whittaker, GR. (2005). Viral entry. *Current topics in microbiology and immunobiology* 285:1-23.
- Sime-Ngando, T., Lucas, S., Robin, A., Pause Tucker, K., Colombet, J., Bettarel, Y., Desmond, E., Gribaldo, S., Forterre, P., Breitbart, M., Prangishvili, D. (2011). Diversity of virus–host systems in hypersaline Lake Retba, Senegal. *Environmental Microbiology* 8:1956–1972.
- Snyder, J.C., Benjamin Bolduc, Mark J. Young (2015). 40 Years of archaeal virology: Expanding viral diversity. *Virology* Vol. 479-480: 369–378.
- Snyder, J.C., Brumfield, S.K., Peng, N., She, Q, Young, M. J. (2011). *Sulfolobus* turreted icosahedral virus c92 protein responsible for the formation of pyramid-like cellular lysis structures. *Journal of Virology* 85:6287–6292.
- Sorokin, D. Y., Berben, T., Melton, E. D., Overmars, L., Vavourakis, C. D., Muyzer G. (2014). Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles* 5: 791–809.
- Spagnolo, J.F., Rossignol, E., Bullitt, E., Kirkegaard, K. (2010). Enzymatic and nonenzymatic functions of viral RNA-dependent RNA polymerases within oligomeric arrays. *RNA* 16: 382–393.
- Stedman, K. M., Schleper, C., Rumpf, E., Zillig, W. (1999). Genetic requirements for the function of the archaeal virus SSV1 in *Sulfolobus solfataricus*: construction and testing of viral shuttle vectors. *Genetics* 152:1397–1405.
- Streif, S., Staudinger, W. F., Marwan W., Oesterhelt, D. (2008). Flagellar Rotation in the Archaeon *Halobacterium salinarum* Depends on ATP. *Journal of Molecular Biology* Vol. 384, Issue 1: 1–8.
- Stubbs, G., Kendall, A. (2012). Helical viruses. *Advances in experimental medicine and biology* 726:631-658.
- Suomalainen, M. (2002). Lipid Rafts and Assembly of Enveloped Viruses. *Traffic* 10:705–709.
- Suomalainen, M., Greber, U. (2013). Uncoating of non-enveloped viruses. *Current Opinion in Virology*. Vol. 3, 1: 27–33.
- Suttle, C. A. (2007). Marine viruses – major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology* 5:801-812.
- Tang, L., Johnson, J. E. (2002). Structural biology of viruses by the combination of electron cryomicroscopy and X-ray crystallography. *Biochemistry* 39: 11517-24.
- Temin, H. M., Baltimore, D. (1972). RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses. *Advances in Virus Research* 17:129–86.

- Torreblanca, M., Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M., Kates, M. (1986). Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 8:89–99.
- Veesler, D., Ng, T-S., Sendamarai, A. K., Eilers, B. J., Lawrence M. C., Lok, S-M., Young, M. J., Johnson, J. E., Fu, C-Y. (2013). Atomic structure of the 75 MDa extremophile *Sulfolobus* turreted icosahedral virus determined by CryoEM and X-ray crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 14: 5504–5509.
- Weigel, C., Seitz, H. (2006). Bacteriophage replication modules. *FEMS microbiology reviews* 3:321-81.
- Weinbauer M. G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews* 2:127 – 181.
- Welsch, S., Müller, B., Kräusslich, H-G. (2007). More than one door – Budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS letters* 11:2089-2097.
- Whitfield, A., Falk, B., Rotenberg, D. (2015). Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* 479-480: 278–289
- Winker, S., Woese, C.R. (1991). A definition of the domains Archaea, Bacteria and Eucarya in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics. *Systematic and Applied Microbiology* Vol. 14, 4: 305-310.
- Wirth, J. F., Snyder, J. C., Hochstein, R. A., Ortmann, A. C., Willits, D. A., Douglas, D., Young, M. J. (2011). Development of a genetic system for the archaeal virus *Sulfolobus* turreted icosahedral virus (STIV). *Virology* 415:6–11.
- Witte, A., Baranyi, U., Klein, R., Sulzner, M., Luo, C., Wanner, G., Krüger, D. H., Lubitz, W. (1997). Characterization of *Natrobacterium magadii* phage ϕ Ch1, a unique archaeal phage containing DNA and RNA. *Molecular Microbiology* 23:603-616.
- Woese, C. R., Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5088–5090.
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 87, 12: 4576-4579.
- Voetteler, J., Sundquist, W. I. (2013). Virus Budding and the ESCRT Pathway. *Host Cell & Microbe* 14(3): 232-241.
- Voyles, B. A. (2002) *The Biology of Viruses*, Second Edition. *McGraw-Hill Companies*, New York.
- Xiang, X., Chen, L., Huang, X., Luo, Y., She, Q., Huang, L. (2005). *Sulfolobus tengchongensis* spindle-shaped virus STSV1: virus-host interactions and genomic features. *Journal of Virology* 79:8677–8686.
- Yang, Y., Cui, H-L., Zhou, P-J., Liu, S-J. (2007). *Haloarcula amylyolytica* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from Aibi salt lake in Xin-Jiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:103-106.

Zhang, Z., Liu, Y., Wang, S., Yang, D., Cheng, Y., Hu, J., Chen, J., Mei, Y., Shen, P., Bamford, D. H., Chen, X. (2012). Temperate membrane-containing halophilic archaeal virus SNJ1 has a circular dsDNA genome identical to that of plasmid pHH205. *Virology*, 434:233–241.

Zolghadr, B., Klingl, A., Rachel, R., Driessen, A. J., Albers, S-V. (2011). The bindosome is a structural component of the *Sulfolobus solfataricus* cell envelope. *Extremophiles* 2: 235-44.

Liitteet

Liite 1, Kasvatusalustojen valmistusohjeet

23 % (w/v) MGM-liemi (pH, 7,2)

1 litraan:

peptoni (OXOID)	5 g
hiivauute (Bacto)	1 g
30% (w/v) suolavesi	768 ml
kraanavesi	täydennä tilavuus litraan

20 % (w/v) MGM-maljat (pH 7,2)

1 litraan:

peptoni (OXOID)	5 g
hiivauute (Bacto)	1 g
agar (Bacto)	14 g
30 % (w/v) suolavesi	666 ml
kraanavesi	334 ml

18 % (w/v) MGM-pehmytagar (pH 7,2)

1 litraan:

peptoni (OXOID)	5 g
hiivauute (Bacto)	1 g
agar (Bacto)	4 g
30 % (w/v) suolavesi	600 ml
kraanavesi	400 ml

Liite 2, Bradfordin reagenssin koostumus:

0,2 g Coomassie Brilliant blue G 250 (MERCK)

100 ml ETAX A etanoli 94,0 % 96,0 til. %

200 ml orto-Phosphoric acid 85 % p.a.

700 ml tislattua RO-vettä

Liite 3, Proteiinigeelielektroforeesi

14 % ja 8 % Trisiini-SDS-PAGE

<u>Yksi geeli (n. 15 x 17 cm)</u>	<u>14 % erotusgeeli</u>	<u>8 % erotusgeeli</u>	<u>5 % ylägeeli</u>
30/8 % AB ¹	16,3 ml	9,6 ml	1,7 ml
Glyseroli	4,6 g	4,6 g	-
Geelipuskuri	11,6 ml	11,6 ml	2,5 ml
Vesi	4,5 ml	11,2 ml	5,8 ml
TEMED ²	12 µl	12 µl	10 µl
10 % APS ³	117 µl	117 µl	100 µl

Geelipuskuri

3,0 M Tris-base
0,3 % SDS

Anodipuskuri

0,2 M Tris-base

Katodipuskuri

0,1 M Tris-base
0,1 M Trisiini
0,1 % SDS

8 % SDS-PAGE

<u>Yksi geeli (n. 15 x 17 cm)</u>	<u>8 % erotusgeeli</u>	<u>5 % ylägeeli</u>
40 % AB ⁴	7 ml	-
1:4 puskuri	10,5 ml	-
Vesi	17,5 ml	-
MR Spacer	-	10 ml
TEMED	20,5 µl	10 µl
10 % APS	200 µl	100 µl

Ila geelipuskuri

3 M Tris-base

Ilb geelipuskuri

30 g Tris-base
30 g Tris-base
30 g NaH₂PO₄*H₂O
Täydennä tilavuus 500 ml deionisoidulla vedellä.

1:4 puskuri

100 ml 3M Tris-base (pH 8,6)
4 ml 10% SDS
100 ml vesi

MR Spacer

62,5 ml 40% AB⁴
62,5 ml Ilb geelipuskuri
5 ml 10 % SDS
tilavuus täytetään 500 ml vedellä.

3 x näytekupusuri:

IIb geelipuskuri	10 ml
10 % SDS	10 ml
0,5M EDTA (pH 7,5)(etyleenidiamiinitetraetikkahappo)	0,4 ml
2-merkaptoetanol	0,1 ml
87 % glyseroli	10 ml
Bromfenolisini	10 mg

1,5 x näytekupusuri valmistetaan laimentamalla 3x näytekupusuria tislattulla deionisoidulla vedellä 1:2 ja lisäämällä 2-merkaptoetanolia 50 µl/ 1,0 ml valmista näytekupusuria.

¹ 30/8 % AB; akryyliamidi-monomeeriseos: 30 % (w/v) akryyliamidi, 0,8 % (w/v) bisakryyliamidi

² TEMED; N,N,N', N' –tetrametyylietyleenidiamiini

³ APS; ammoniumpersulfaatti

⁴ 40 % AB; akryyliamidi-monomeeriseos: 40 % (w/v) akryyliamidi , bisakryyliamidi 37,5:1.(Bio-Rad)

Liite 4, massa-analyysin tulokset

Virusperäiset proteiinit lihavoitu.

Kuvaus	Osumia	Kattavuus	Proteiineja	Uniikkeja peptidejä	Peptidit	Molekyylipaino [kDa]
Ribonucleoside-diphosphate reductase OS=Halovirus HVTV-1 GN=21 PE=3 SV=1 - [L7THS3_9VIRU]	1170,81	59,21	1	43	44	110,3
Elongation factor 2 OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=fusA PE=3 SV=1 - [MOJSTO_HALVA]	268,63	65,52	2	33	33	80,3
Ribonucleoside-diphosphate reductase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_10973 PE=3 SV=1 - [MOJE54_HALVA]	288,70	45,64	1	33	34	113,5
Alanine--tRNA ligase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=alaS PE=3 SV=1 - [MOJ752_HALVA]	220,79	44,44	1	29	29	102,8
DNA-directed RNA polymerase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_03207 PE=3 SV=1 - [MOJPH8_HALVA]	151,25	42,00	1	29	29	108,9
MCP domain-containing signal transducer OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_10231 PE=4 SV=1 - [MOJG95_HALVA]	154,41	35,19	1	20	20	85,4
UvrABC system protein A OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=uvrA PE=3 SV=1 - [MOJTNO_HALVA]	119,72	44,51	1	31	31	109,1
Valine--tRNA ligase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=valS PE=3 SV=1 - [MOJC71_HALVA]	118,93	33,04	1	19	19	103,2
Uncharacterized protein OS=Halovirus HVTV-1 GN=113 PE=4 SV=1 - [L7TNO7_9VIRU]	104,38	26,43	1	20	20	118,5
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_06723 PE=4 SV=1 - [MOJLX7_HALVA]	107,58	21,93	1	12	12	95,6
Leucyl-tRNA ligase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=leuS PE=3 SV=1 - [MOJKZO_HALVA]	81,46	28,81	1	20	20	100,5
Putative nuclease/nucleic acid binding OB-fold tRNA/helicase-type OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_16491 PE=4 SV=1 - [MOJ202_HALVA]	80,71	26,73	1	15	15	78,4
Phosphoenolpyruvate carboxylase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_10666 PE=3 SV=1 - [MOJGG6_HALVA]	65,15	28,84	1	19	19	102,9
Type 2 DNA topoisomerase 6 subunit B OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=top6B PE=3 SV=1 - [MOJLZ8_HALVA]	61,89	29,52	1	17	17	87,4
Zeta toxin OS=Halovirus HVTV-1 GN=115 PE=4 SV=1 - [L7TGZ4_9VIRU]	52,19	16,45	1	17	17	146,2

Transmembrane oligosaccharyl transferase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_04636 PE=4 SV=1 - [MOJQE1_HALVA]	65,84	17,67	1	11	11	103,7
MCP domain-containing signal transducer OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_19957 PE=4 SV=1 - [MOIZA7_HALVA]	73,15	25,24	2	9	13	78,5
DNA polymerase OS=Halovirus HVTV-1 GN=91 PE=3 SV=1 - [L7TKF2_9VIRU]	46,28	21,36	1	14	14	104,0
Transducer protein cost/halobacterial transducer protein IV OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_01460 PE=4 SV=1 - [MOJT59_HALVA]	42,54	19,51	1	11	11	85,8
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_07348 PE=4 SV=1 - [MOJMB1_HALVA]	40,51	18,84	1	10	10	90,1
Putative oxidoreductase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_12835 PE=4 SV=1 - [MOJCO9_HALVA]	32,37	16,77	1	12	12	110,0
MCP domain-containing signal transducer OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_03192 PE=4 SV=1 - [MOJST9_HALVA]	34,44	17,74	1	10	10	84,9
Cobalamin biosynthesis protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_17507 PE=4 SV=1 - [MOIYU5_HALVA]	26,92	8,57	1	10	10	142,0
Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit E OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=gatE PE=3 SV=1 - [MOIYH2_HALVA]	31,36	21,19	1	9	9	67,8
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_07907 PE=4 SV=1 - [MOJMO4_HALVA]	23,61	10,54	1	7	7	102,8
Cytochrome-like protein Fbr OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_01395 PE=4 SV=1 - [MOJV68_HALVA]	28,16	9,37	1	5	5	83,4
DNA gyrase subunit A OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=gyrA PE=3 SV=1 - [MOJQC3_HALVA]	18,57	10,67	1	8	8	90,3
Chaperone protein DnaK OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=dnaK PE=3 SV=1 - [MOIVNO_HALVA]	22,16	13,41	1	7	7	68,4
DNA polymerase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_11923 PE=3 SV=1 - [MOJCU9_HALVA]	18,41	7,49	1	6	6	106,9
DNA topoisomerase 1 OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=topA PE=3 SV=1 - [MOJCE8_HALVA]	21,57	9,55	1	6	6	91,7
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_05005 PE=4 SV=1 - [MOJQ77_HALVA]	26,12	15,34	1	6	6	63,1
MCP domain-containing signal transducer OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_05735 PE=4 SV=1 - [MOJJQ5_HALVA]	19,27	14,18	1	7	7	84,3
TrII protein OS=Haloarcula vallismortis GN=trII PE=4 SV=1 - [Q9UXSO_HALVA]	24,89	9,96	2	2	7	82,5
Type II secretion system protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_07483 PE=4 SV=1 - [MOJF6_HALVA]	12,70	9,88	1	6	6	94,4
Isoleucine--tRNA ligase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=ileS PE=3 SV=1 - [MOJ6Z3_HALVA]	15,84	6,61	1	5	5	121,9
UvrD/REP helicase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_02132 PE=4 SV=1 - [MOJNR3_HALVA]	13,83	5,36	1	5	6	129,0
Dipeptide ABC transporter dipeptide-binding protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_18772 PE=4 SV=1 - [MOIWW4_HALVA]	13,19	8,94	1	4	4	67,6
Methionine--tRNA ligase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=metG PE=3 SV=1 - [MOJCC7_HALVA]	12,95	8,33	1	5	5	81,8
Aconitate hydratase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_02167 PE=4 SV=1 - [MOJS37_HALVA]	13,77	10,65	1	5	5	70,7
Chemotaxis protein CheA OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_02367 PE=4 SV=1 - [MOJS78_HALVA]	13,08	6,94	1	4	4	71,8
Cell division control protein 48 OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_15681 PE=3 SV=1 - [MOJ1G2_HALVA]	12,74	7,40	1	4	4	83,1
Prohead protease OS=Halovirus HVTV-1 GN=119 PE=4 SV=1 - [L7TJC6_9VIRU]	13,20	9,11	1	4	4	70,5
von Willebrand factor type A OS=Halovirus HVTV-1 GN=57 PE=4 SV=1 - [L7THWO_9VIRU]	8,55	6,33	1	4	4	82,0
Cytochrome c oxidase subunit I OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_03621 PE=3 SV=1 - [MOJMW5_HALVA]	10,05	5,34	1	2	2	61,3
MCP domain-containing signal transducer OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_13630 PE=4 SV=1 - [MOJ6K6_HALVA]	13,92	9,11	1	4	4	67,7

MCP domain-containing signal transducer OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_16481 PE=4 SV=1 - [MOIYV8_HALVA]	7,04	5,31	1	3	3	63,0
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_06718 PE=4 SV=1 - [MOJKX6_HALVA]	9,52	4,48	1	3	3	94,4
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_16686 PE=4 SV=1 - [MOJ168_HALVA]	10,93	8,86	1	2	2	52,7
Oxidoreductase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_02922 PE=4 SV=1 - [MOJTE2_HALVA]	7,99	4,21	1	3	3	111,3
Major capsid protein OS=Halovirus HVTV-1 GN=120 PE=4 SV=1 - [L7TGZ9_9VIRU]	6,22	6,56	1	2	2	50,8
Cation-transporting ATPase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_05260 PE=4 SV=1 - [MOJL16_HALVA]	3,79	1,74	1	1	1	90,8
DNA polymerase II large subunit OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=polC PE=3 SV=1 - [MOJ3J8_HALVA]	3,98	0,93	1	1	1	154,2
Thermosome alpha subunit OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_11848 PE=3 SV=1 - [MOJCT5_HALVA]	4,12	6,74	1	2	2	53,6
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_02567 PE=4 SV=1 - [MOJSD2_HALVA]	5,62	3,37	1	2	2	75,1
Bifunctional malic enzyme oxidoreductase/phosphotransacetylase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_11578 PE=4 SV=1 - [MOJC92_HALVA]	3,48	4,40	1	1	2	81,4
Phosphoribosylformylglycinamide synthase 2 OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=purL PE=3 SV=1 - [MOJM20_HALVA]	4,71	3,74	1	2	2	75,9
Heterodisulfide reductase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_14507 PE=4 SV=1 - [MOJ605_HALVA]	5,42	3,60	1	2	2	77,3
Iron-binding protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_16191 PE=4 SV=1 - [MOJ1S2_HALVA]	5,44	10,18	1	2	2	41,0
Cell division control protein 48 OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_16821 PE=3 SV=1 - [MOJ027_HALVA]	4,97	2,83	1	2	2	81,8
Thermosome subunit alpha OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_08402 PE=3 SV=1 - [MOJHU0_HALVA]	5,15	6,79	1	2	2	58,4
Phosphoenolpyruvate synthase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_11758 PE=4 SV=1 - [MOJEI7_HALVA]	4,09	3,12	1	2	2	83,2
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_19142 PE=4 SV=1 - [MOIY00_HALVA]	6,13	3,59	1	2	2	67,3
YonJ-like protein OS=Halovirus HVTV-1 GN=34 PE=4 SV=1 - [L7TGT3_9VIRU]	1,77	2,09	1	1	1	48,7
Cytochrome c oxidase polypeptide I OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_07363 PE=3 SV=1 - [MOJJ14_HALVA]	1,79	1,85	1	1	1	65,4
Ferredoxin-nitrite reductase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_14422 PE=4 SV=1 - [MOJ485_HALVA]	1,94	3,06	1	1	1	65,4
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_17662 PE=4 SV=1 - [MOIVA2_HALVA]	1,96	0,97	1	1	1	96,6
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_18597 PE=4 SV=1 - [MOIVS6_HALVA]	1,65	4,32	1	1	1	49,3
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_12570 PE=4 SV=1 - [MOJ932_HALVA]	2,11	6,98	1	1	1	23,5
A-type ATP synthase subunit I OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_18107 PE=4 SV=1 - [MOIXE4_HALVA]	1,77	1,21	1	1	1	80,6
MCP domain-containing signal transducer OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_12158 PE=4 SV=1 - [MOJES0_HALVA]	2,53	2,56	1	1	1	57,5
Chromosome partition protein Smc OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=smc PE=3 SV=1 - [MOJG31_HALVA]	2,19	2,18	1	1	1	134,7
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_11993 PE=4 SV=1 - [MOJGK7_HALVA]	1,67	1,40	1	1	1	106,4
ABC transporter permease OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_09183 PE=4 SV=1 - [MOJEN9_HALVA]	1,71	4,51	1	1	1	40,6
Elongation factor 1-alpha OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=tuf PE=3 SV=1 - [MOJSR8_HALVA]	3,29	3,09	1	1	1	45,7
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_09683 PE=4 SV=1 - [MOJH64_HALVA]	1,65	15,94	1	1	1	15,1

Archaeosine tRNA-ribosyltransferase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_18602 PE=4 SV=1 - [MOIVGO_HALVA]	1,65	1,01	1	1	1	65,9
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_14467 PE=4 SV=1 - [MOJ7T1_HALVA]	2,36	4,31	1	1	1	44,2
Transcription initiation factor IIB OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=tfb PE=3 SV=1 - [MOJMY8_HALVA]	1,71	2,48	1	1	1	36,1
Protein-export membrane protein SecF OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=secF PE=3 SV=1 - [MOIVC4_HALVA]	2,09	5,92	1	1	1	31,1
Phosphoglucomutase/phosphomannomutase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_04571 PE=3 SV=1 - [MOJMF1_HALVA]	0,00	10,11	1	1	1	48,0
Serine--tRNA ligase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=serS PE=3 SV=1 - [MOJN70_HALVA]	1,65	2,17	1	1	1	52,2
Membrane protein Pan1 OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_06908 PE=4 SV=1 - [MOJJ57_HALVA]	1,69	3,66	1	1	1	41,9
Succinyl-CoA synthetase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_16106 PE=4 SV=1 - [MOJ1Q5_HALVA]	2,12	2,00	1	1	1	74,2
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_14929 PE=4 SV=1 - [MOJ6H8_HALVA]	1,71	3,44	1	1	1	31,3
Protease HtpX homolog OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=htpX PE=3 SV=1 - [MOJL17_HALVA]	2,03	9,25	1	1	1	32,6
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_00100 PE=4 SV=1 - [MOJUX8_HALVA]	1,88	1,37	1	1	1	116,5
Trehalose utilization protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_12825 PE=4 SV=1 - [MOJ8W8_HALVA]	1,96	3,47	1	1	1	29,0
50S ribosomal protein L15e OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=rpl15e PE=3 SV=1 - [MOJQH2_HALVA]	3,27	7,14	1	1	1	22,4
Putative ski2-type helicase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_06250 PE=3 SV=1 - [MOJP66_HALVA]	1,87	2,13	1	1	1	86,7
Alkylhydroperoxidase AhpD family core domain-containing protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_17772 PE=4 SV=1 - [MOIX90_HALVA]	1,71	4,74	1	1	1	21,5
Retinal pigment epithelial membrane protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_12790 PE=4 SV=1 - [MOJCZ9_HALVA]	2,44	4,53	1	1	1	53,7
AP-endonuclease/AP-lyase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_09118 PE=4 SV=1 - [MOJHX7_HALVA]	1,68	4,35	1	1	1	35,7
ATPase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_07932 PE=4 SV=1 - [MOJMO9_HALVA]	1,86	0,93	1	1	1	119,9
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_01175 PE=4 SV=1 - [MOJR86_HALVA]	2,28	7,47	1	1	1	25,6
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_17852 PE=4 SV=1 - [MOIY28_HALVA]	2,74	2,69	1	1	1	73,5
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_19492 PE=4 SV=1 - [MOIWC8_HALVA]	1,81	9,04	1	1	1	20,6
4-aminobutyrate aminotransferase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_02002 PE=3 SV=1 - [MOJS55_HALVA]	1,72	2,05	1	1	1	48,2
Cytochrome b(C-terminal)/b6 OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_15201 PE=4 SV=1 - [MOJ096_HALVA]	1,66	3,54	1	1	1	28,6
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_08631 PE=3 SV=1 - [MOJJFO_HALVA]	4,44	2,14	1	1	1	70,7
Shikimate kinase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=aroK PE=3 SV=1 - [MOJ274_HALVA]	1,64	2,74	1	1	1	30,4
Dihydroorotase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_12730 PE=4 SV=1 - [MOJB14_HALVA]	1,93	3,58	1	1	1	48,0
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_16131 PE=4 SV=1 - [MOIYM9_HALVA]	2,09	5,08	1	1	1	21,2
Proteasome-activating nucleotidase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=pan PE=3 SV=1 - [MOIW62_HALVA]	1,67	3,71	1	1	1	45,5
DNA binding protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_14522 PE=4 SV=1 - [MOJ4A3_HALVA]	1,64	6,19	1	1	1	20,5
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_16451 PE=4 SV=1 - [MOIZ91_HALVA]	2,49	1,53	1	1	1	80,3
Glycosyltransferase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_04965 PE=4 SV=1 - [MOJKZ6_HALVA]	2,27	9,75	1	1	1	36,1

MCP domain-containing signal transducer OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_06579 PE=4 SV=1 - [MOJTO_HALVA]	2,67	2,47	1	1	1	59,9
Light and oxygen sensing histidine kinase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_05180 PE=4 SV=1 - [MOJQCO_HALVA]	2,02	2,16	1	1	1	144,1
Threonine--tRNA ligase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=thrS PE=3 SV=1 - [MOIW02_HALVA]	2,54	1,56	1	1	1	73,7
Phosphomethylpyrimidine synthase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=thiC PE=3 SV=1 - [MOJQR5_HALVA]	1,79	2,92	1	1	1	52,0
Uncharacterized protein OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_06673 PE=4 SV=1 - [MOJLW7_HALVA]	1,89	1,33	1	1	1	136,8
NADH dehydrogenase/oxidoreductase OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_17151 PE=3 SV=1 - [MOJ150_HALVA]	1,92	1,96	1	1	1	64,0
NADH dehydrogenase subunit L (Ubiquinone) OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_17121 PE=4 SV=1 - [MOJ092_HALVA]	3,19	1,58	1	1	1	74,8
NADH dehydrogenase subunit N (Ubiquinone) OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_17111 PE=3 SV=1 - [MOIX53_HALVA]	2,18	2,33	1	1	1	53,5
Extracellular solute-binding protein family 5 OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=C437_01225 PE=4 SV=1 - [MOJRA9_HALVA]	1,64	1,38	1	1	1	62,2
V-type ATP synthase subunit C OS=Haloarcula vallismortis ATCC 29715 GN=atpC PE=3 SV=1 - [MOIVI3_HALVA]	1,88	2,24	1	1	1	40,4

