

Halofiilisen HMV1-arkkiviruksen virionirakenteen selvittäminen hajotuskokeiden avulla

Jukka Sund

Pro Gradu -tutkielma

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Jyväskylän yliopisto

18.4.2008

2. Alkusanat

Tämä työ tehtiin Helsingin yliopistossa, Bio- ja ympäristötieteenlaitoksen ja Biotekniikan instituutin virologian huippuyksikössä.

Haluaisin kiittää erityisesti ohjaajaani, dosentti Elina Roinetta erinomaisesta ohjauksesta ja motivoinnista niin laboratoriossa, kuin Pro gradu -tutkielman kirjoitusvaiheessa. Kiitokset myös ryhmän johtajalle, professori Dennis Bamfordille, joka on - yhdessä ryhmän muiden työntekijöiden kanssa - onnistunut luomaan rennon, mutta samalla tehokkaan työympäristön laboratorioon. Dennis myös näytti, minne mennä ensimmäiseksi aamulla. Lisäksi haluaisin kiittää FM Maija Pietilää, joka opetti minulle HVM1:n salat ja auttoi kaikissa mahdollisissa asioissa. Myös muut ryhmän työntekijät ansaitsevat kiitokset siitä, että jaksoivat katsella minua jopa puoli vuotta. Kiitokset tekniselle henkilökunnalle: erityisesti Sari Korhoselle, joka piti virustehtaan käynnissä - se helpotti työtäni äärettömän paljon, sekä Riitta Tarkiaiselle, joka jaksoi vastaila kaikkiin kysymyksiini.

Lisäksi haluaisin kiittää vanhempiani tuesta, niin henkisestä, kuin taloudellisesta - he antoivat minulle mahdollisuuden keskittyä pelkästään opiskeluihini. Erityiskiitos mursulaumalle, joka piti minut järjissäni ja antoi muuta ajateltavaa.

3. Tiivistelmä

Jyväskylän yliopisto
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Pro gradu –tutkielman tiivistelmä

Tekijä:	Jukka Sund
Tutkielman nimi:	Halofiilisen HMV1-arkkiviruksen virionirakenteen selvittäminen hajotuskokeiden avulla
English title:	Quantitative dissociation and characterization of the virion structure of a halophilic archaeal virus HMV1
Päivämäärä:	18.4.2008 Sivumäärä: 46 + 6
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Molekyylibiologia
Tutkielman ohjaaja(t):	dos. Elina Roine

Tiivistelmä:

Arkit ovat selviytymisen mestareita; ne kykenevät elämään kylmissä ja kuumissa olosuhteissa, happamissa sekä emäksisissä ympäristöissä ja äärimmäisissä suolapitoisuuksissa. Arkkeja infektoivat virukset tunnetaan huonosti verrattuna eukaryoottisolujen ja bakteerien viruksiin. Arkkiviruksille on yhteistä dsDNA genomi, joka voi olla lineaarinen tai ympyrän muotoinen. *Halorubrum* membrane containing virus 1 (HMV1) on halofiilinen eli suolaisten elinympäristöjen virus. Se eristettiin vuonna 2006 Trapanista, etelä-Italiasta, suolanrikastusaltaasta yhdessä isäntänsä, halofiilisen arkin, *Halorubrum* sp:n kanssa. Morfologialtaan HMV1 on pleomorfinen, mikä on yleistä suolaisten elinympäristöjen arkkiviruksilla.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli löytää erilaisia olosuhteita, joissa HMV1-virioni hajoaa kontrolloidusti. Hajotusten avulla pyritään selvittämään proteiinien lokalisaatio virionissa sekä pohtimaan niiden toimintaa.

Ennen hajotuksia tehtiin säilyvyyskokeita, joissa tutkittiin viruksen infektiivisyyden vähenemistä erilaisissa olosuhteissa, verrattuna käsittelemättömään virukseen. Säilyvyyskokeiden perusteella valittiin parhaat olosuhteet virionin hajottamiseksi. Viruksia pidettiin eri hajotuskäsittelyissä tunti, jonka jälkeen proteiinit eroteltiin liikkuvan vyöhykkeen sentrifugaatiolla lineaarisessa sakkaroosigradientissa. Tämän jälkeen proteiinit analysoitiin trisiini-SDS-PAGElla. Lisäksi hajotetusta virionista analysoitiin glykoproteiinit perjodihappo-schiff-reaktion avulla.

Parhaiksi hajotusolosuhteiksi osoittautuivat +60 °C-lämpötilahajotus alhaisen suolan puskurissa ja Nonidet P40-detergenttihajotus HMV1-puskurissa. Lämpötilahajotuksessa virionista irtosi suurin osa VP2 (virus protein 2) -proteiinista. Detergentti sen sijaan hajotti viruksen kokonaan: VP1 ja suurin osa VP2:sta muuttuivat liukoiksi. Lisäksi VP4 aggregoitui yhdessä VP3:n ja DNA:n kanssa sentrifuugiputken pohjalle, minne kulkeutui myös pieni määrä VP2:ta. Lämpötilahajotuksesta kerätyn, konsentroidun, valoa siroavan vyöhykkeen hajottaminen NP40-detergentillä aiheutti jälleen virionin täydellisen hajoamisen; VP1 ja osa VP2-proteiineista muuttuivat liukoiksi. Tällä kertaa VP4 ei aggregoitunut sentrifuugiputken pohjalle.

Hajotusten perusteella voidaan todeta HMV1:llä olevan lipidivaippa. Lipidivaipan pääasialliset proteiinit taas ovat VP1 ja VP2, nämä proteiinit ovat myös glykosyloituneita. Myös VP3- ja VP4-proteiinien sijantia virionissa pohditaan.

Avainsanat: arkki, halofiilinen, *Halorubrum*, arkkivirus, HMV1, hajotustutkimus, kontrolloitu hajotus, virionin rakenne

Author: Jukka Sund
Title of thesis: Quantitative dissociation and characterization of the virion structure of a halophilic archaeal virus HMV1
Finnish title: Halofilisen HMV1-arkkiviruksen virionirakenteen selvittäminen hajotuskokeiden avulla
Date: 18.4.2008 **Pages:** 46 + 6
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Molecular biology
Supervisor(s): doc. Elina Roine

Abstract:

The archaea are masters of survival, they are found in many extreme and hostile environments. They can be found at high and low temperatures, in acidic and basic environments, even in extreme salinities. Very little is known about archaeal viruses compared to the viruses of the other two domains of life – eukaryotes and bacteria. The viruses of the archaea contain dsDNA genomes, linear or circular. *Halorubrum* membrane containing virus 1 (HMV1), a novel virus infecting the halophilic archaeon *Halorubrum* sp. was isolated from a solar saltern in Italy in 2006. In preliminary studies it was found to be morphologically pleomorphic, which is common to viruses infecting halophilic archaea. The main virion proteins were suggested to be VP2 (Virus Protein 2) and VP4.

The aim of this study was to find suitable conditions for quantitative dissociation of the HMV1 virion. In addition, the localization and function of the structural proteins were to be studied.

The purified virus was subjected to different conditions of dissociation. Before the dissociation studies, changes in the infectivity of the virus were measured in different conditions to determine which treatments would suit the best. After dissociation experiments the dissociation products were analysed by rate zonal centrifugation in a sucrose gradient and subsequently in tricine-SDS-PAGE. In addition, the dissociated viruses were analyzed for glycoproteins by periodic acid-schiff reaction.

The best conditions for dissociation were found to be +60 °C heat treatment and Nonidet P40 detergent treatment. When the virus was subjected to +60 °C for 1 h in low ionic strength conditions, most of the virus protein 2 (VP2) became soluble. After treatment with Nonidet P40 detergent both VP1 and VP2 became soluble, while VP4 was aggregated and pelleted with the DNA to the bottom of the gradient. VP3 and a small portion of VP2 were also found in the pellet. Combining these two treatments in low ionic strength resulted in solubilization of VP1 and VP2, only VP4 stayed in the slowly sedimenting fraction.

The results of the dissociation studies suggest that the virion is enveloped. The main membrane proteins were found to be VP1 and VP2. Glycoprotein analysis shows that both VP1 and VP2 are glycosylated. Results also indicate that VP2 could have a role in host adsorption. In addition, the localization of VP3 and VP4 proteins in the virion is considered.

Keywords: archaeon, halophilic, *Halorubrum*, archaeal virus, HMV1, dissociation study, quantitative dissociation, virion structure

4. Sisällys

1.	Kansilehti	1
2.	Alkusanat	2
3.	Tiivistelmä	3
4.	Sisällys	5
5.	Lyhenteet.....	7
6.	Johdanto	8
6.1.	Arkit – selviytymisen mestarit.....	8
6.2.	Halofiiliset arkit – suolaisten ympäristöjen valtiaat	10
6.3.	Suolaiset elinympäristöt kuhisevat elämää	12
6.4.	Halofiilisen <i>Halorubrum</i> -arkkisuvun edustajat	13
6.5.	Arkkeja infektoivat virukset.....	14
6.5.1.	Arkkivirusten luokittelu ja evoluutio	14
6.5.2.	Sukkulan muotoiset virukset.....	15
6.5.3.	Pullon ja pisaran muotoiset virukset	16
6.5.4.	Lineaariset virukset	17
6.5.5.	Pallon muotoiset virukset	18
6.5.6.	Hännälliset virukset.....	19
6.5.7.	Halofiilisten arkkien virukset.....	20
6.6.	<i>Halorubrum</i> membrane containing virus 1, HMV1	21
7.	Tutkimuksen tarkoitus	22
8.	Materiaali ja menetelmät.....	24
8.1.	Arkki ja virus	24
8.2.	Kasvatusalustat	24

8.3.	Viruksen maljakasvatus	24
8.4.	Viruksen nestekasvatus ja puhdistus.....	24
8.5.	Säilyvyyskokeet.....	25
8.6.	Viruksen hajotus	26
8.7.	Glykoproteiinien määrittäminen.....	28
8.8.	Elektronimikroskopia.....	28
9.	Tulokset.....	29
9.1.	Säilyvyyskokeilla kartoitettiin tarvittavia hajotusolosuhteita	29
9.2.	Hajotusten tulosten perusteella voitiin arvioida proteiinien lokalisaatiota HMV1- virionissa	31
9.2.1.	Lämpökäsittely irrotti viruspartikkelin pinnasta proteiinin	32
9.2.2.	Käsittely NP40-detergentillä aiheutti viruspartikkelin hajoamisen	34
9.2.3.	Lämpökäsitellyn viruspartikkelin hajotus NP40-detergentillä teki VP1:n liukoiseksi	34
9.3.	Sokeriproteiinin analyysi	35
9.4.	Lämpöhajotetun HMV1-virionin elektronimikroskopia.....	35
10.	Tulosten tarkastelu.....	36
10.1.	HMV1-virionin rakenne	36
10.2.	Yhteenveto.....	39
10.3.	Jatkotutkimukset	39
11.	Lähdeluettelo	41
12.	Liitteet	47
12.1.	Liite 1. Kasvatusalustat ja puskurit	47
12.2.	Liite 2. Proteiini-geelelektroforeesi.....	50
12.3.	Liite 3. Hajotusten fraktioiden proteiinipitoisuudet.....	51
12.4.	Liite 4. Gradienttisekoittajan asetukset	52

5. Lyhenteet

BHT	butyloitu hydroksitolueeni (butylated hydroxytoluene)
cfu	pesäkkeen muodostava yksikkö (colony forming unit)
DNA	deoksiribonukleiinihappo (deoxyribonucleic acid)
ds	kaksijuosteinen (double-stranded)
HMV1	<i>Halorubrum</i> membrane containing virus 1
<i>Hrr.</i>	<i>Halorubrum</i>
kDa	kilodalton
MES	4-morfoliini-etaanisulfonihappo
MGM	muokattu kasvatusalusta (modified growth medium)
MOI	infektiokerroin, virusten ja solujen suhde infektoissa (multiplicity of infection)
NP40	Nonidet P40
pfu	plakin muodostava yksikkö (plaque forming unit)
RNA	ribonukleiinihappo (ribonucleic acid)
rRNA	ribosomaalinen RNA
16S rRNA	arkkien ja bakteerien ribosomien pienen alayksikön RNA
rpm	kierrosta minuutissa (rounds per minute)
SDS	natriumdodekyylisulfaatti (sodium dodecyl sulphate)
SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis)
sp.	laji (species)
Tris	trishydroksimetyyliaminometaani
VP	virusproteiini (virus protein)

6. Johdanto

6.1. Arkit – selviytymisen mestarit

Eliöt maapallolla ovat sopeutuneet selviytymään mitä vaativimmissa olosuhteissa. Kylmyys, kuumuus, suolaisuus, hapettomuus, matala tai korkea pH eivät ole esteitä elämälle - korkeintaan haasteita. Kolmesta domeenista arkit ovat selviytymisen mestareita, niitä on kaikkialla: meressä (DeLong, E.F., 2005), meren sedimenteissä (Knittel, K. ym., 2005), kasvien juurissa (Simon, H.M. ym., 2000), makeissa vesissä (Keough, B.P. ym., 2003), maaperässä (Ochsenreiter, T. ym., 2003), soissa (Galand, P.E. ym., 2005) ja jopa ihmisen suolistossa (Lepp, P.W. ym., 2004).

Vuonna 1977 esitettiin että elämä jaettaisiin kolmeen domeeniin kahden sijasta, kun huomattiin että 16S-ribosomi-RNA:ta on kolmea eri tyyppiä. Tällöin kaikki uuteen arkki-domeeniin sijoitetut mikrobit olivat metanogeenejä (Woese, C.R. ja Fox, G.E., 1977). Myös ensimmäiset arkit olivat metanogeenejä. Hapettomassa maailmassa arkit asuttivat merenpohjia yhdessä sulfaatinpelkistäjäbakteerien kanssa. Viimeisimpien tutkimusten mukaan sulfaatin pelkistystä on ollut jo 3,5 miljardia vuotta sitten. Vanhimman, *Methanopyrus*-sukuun kuuluvan arkkilajin arvioidaan olevan noin 2,7 miljardia vuotta vanha. (Shen, Y. ym., 2001; Michaelis, W. ym., 2002).

Arkit jaetaan 16S rRNA:n perusteella kahteen pääjaksoon; krenarkit ja euryarkit. Uusina tulokkaina ovat lisäksi korarkit sekä nanoarkit, joita ei ole vielä hyväksytty pääjaksoiksi (Brochier, C. ym., 2005b; Auchtung, T. ym., 2006). Krenarkit jaetaan edelleen kuuteen lahkoon, joissa on tällä hetkellä kuusi heimoa. Suurin osa krenarkeista on termofiilejä ja hypertermofiilejä, jotka elävät äärimmäisissä lämpötiloissa. Euryarkit taas on jaettu kahdeksaan luokkaan, joissa on kymmenen laukoa. Termofiilejä ja hypertermofiilejä arkkeja löytyy myös euryarkeista, mutta suurin ryhmä tämän pääjakson arkeista ovat kuitenkin äärimmäisiä halofiilejä, jotka elävät erittäin suolaisissa ympäristöissä ja metanogeenejä, jotka tuottavat metaania. (ks. yleiskatsaus Gribaldo, S. ja Brochier-Armanet, C., 2006; National Center of Microbial Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Archaea> 15.10.2007).

Arkit voidaan jakaa kuuteen ryhmään: halofiilit, hypertermofiilit, asidofiilit, nitrifioijat, metanogeenit ja metaanin hapettajat (ks. yleiskatsaus Valentine, D.L., 2007). Suurin osa arkeista on aerebeja tai fakultatiivisesti anaerobeja. Haloarkeista *Halobacterium salinarium* on autotrofi, eli se käyttää auringonvaloa energiantuotantaansa. Asidofiilit sen sijaan ovat eliöitä, jotka elävät happamissa olosuhteissa. Arkeista asidofiilejä ovat *Acidianus*- ja *Sulfolobus*-sukujen edustajat. *Acidianus*-suvun arkit voivat pelkistää hapettomissa olosuhteissa rikkiä. *Sulfolobus*-suvun edustajat taas käyttävät rautaa tai molybdaattia elektronin vastaanottajana hapettomissa olosuhteissa. *Haloferax denitrificans* pystyy pelkistämään nitraattia, lopputuotteena pelkistysreaktiosta syntyy typpeä. *Methanobacterium*-suvun metanogeenit ja osa rikin pelkistäjistä ovat obligaatteja anaerobeja (ks. yleiskatsaus Schäfer, G. ym., 1999).

Arkkien soluseinä eroaa huomattavasti bakteerien soluseinäarakenteista. Arkkien soluseinä ei sisällä mureiinia, vaan pseudomureiinia, metanokondroitiinia, heterosakkaridia tai glutaminyyliglykaania. Bakteereilla sen sijaan, muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta, mureiini on tärkeä osa soluseinää (Kandler, O. ja König, H., 1998). Arkkien lipidit voi tunnistaa eetterisidoksista ja isoprenoidiketjuista kun taas bakteerien lipidit sisältävät esterisidoksia ja suoria rasvahappoketjuja (Koga, Y. ym., 1993). Soluseinä on ensimmäinen puolustuslinja kamppailussa vaikeita olosuhteita vastaan. Arkkien kehittyneet soluseinä- ja lipidirakenteet tarjoavat mahdollisuuden selviytyä niin suolaisissa, kuumissa, kylmissä, kuin happamissa ja emäksisissäkin elinympäristöissä.

Arkit ovat energiansäästön mestareita. Ne kykenevät hyödyntämään ympäristön tarjoaman vähän energian tehokkaasti. Juuri tämän takia arkit ovat valloittaneet ekologiset lokerot, joissa energiaa on vähän ja olosuhteet ovat vaikeat. Tällaisissa elinympäristöissä bakteerit jäävät alakynteen. Arkeilla taas on vaikeuksia, kun ympäristössä on energiaa enemmän; niiden energiantuottomekanismit ovat niin konservoituneita, etteivät ne pärjää bakteerien sopeutuvaisemman metabolian kanssa, silloin kun ympäristö tarjoaisi mahdollisuuden helpompaan energiantuottoon (Valentine, D.L., 2007).

Arkkien genomi on usein yhdessä isossa ja muutamassa pienemmässä replikonissa. Replikonit sisältävät eliölle tärkeitä genejä, tämän takia ne lasketaan usein kromosomeiksi (Baliga, N. ym., 2004). Transkriptio- ja replikaatiokoneisto muistuttavat eukaryoottisolujen vastaavia, replikaatiokoneistoon kuuluu DNA-polymeraaseja, DNA-ligaasi, luokan I ja II

topoisomeraaseja ja primaasi. Myös translaatio on samanlainen kuin eukaryoottisoluilla, tosin yhtenevyksiä bakteereidenkin kanssa löytyy (Ng, W. ym., 2000).

Morfologialtaan arkit muistuttavat bakteereita, eikä useimpia voi sen perusteella erottaakaan bakteereista. Kuitenkin myös erikoisempia muotoja löytyy, kuten ohuet neliönmuotoiset haloarkit (Walsby, A.E., 1980; Forterre, P. ym., 2002).

6.2. Halofiiliset arkit – suolaisten ympäristöjen valtiaat

Merivedenhaihdutusaltaat ja suolajärvet ovat usein väriltään punaisia. Tämä johtuu siitä, että haloarkit hallitsevat erittäin suolaisia ekologisia lokeroita. Haloarkkien solukalvossa on bakterioruberiineja sekä bakteriorodopsiineja, jotka saavat aikaan veden punaisuuden. Suolaiset elinympäristöt tarjoavat hyvän elinympäristön monille haloarkki- ja halobakteerilajeille, mikä johtuu hyvästä ravinnepitoisuudesta ja saalistajien vähyydestä. Vaikka tällaiset elinympäristöt kuulostavat karuilta, elää niissä tiheitä mikrobiyhteisöjä (Oren, A., 2002).

Haloarkit kuuluvat *Halobacteria*-luokkaan, joka sisältää 28 haloarkkisukua. *Halobacteria*-luokka vahvistettiin vuonna 2002 (Validaatiolista numero 85, 2002).

Suurin osa suolalammikoissa ja suolarikastusaltaissa tavaituista äärimmäisistä halofiileistä arkeista - arkeista jotka, vaativat suolaa elääkseen - ovat morfologialtaan ohuita, sauvamaisia tai neliön muotoisia ja niillä on kaasua sisältäviä rakkuloita. Ennen vuotta 2004 näitä, Walsbyn arkeiksikin (Walsby, A.E., 1980) kutsuttuja arkkeja ei oltu pystytty lainkaan kasvattamaan laboratorio-olosuhteissa (Bolhuis, H. ym., 2004). Sitten ensimmäinen neliön muotoinen arkkilaji, joka saatiin kasvamaan laboratoriossa, sijoitettiin *Haloquadratum*-sukuun ja nimettiin *Haloquadratum walsbyiksi* (Burns, D. ym., 2007). Muiden haloarkkisukujen eliöitä on pystytty kasvattamaan laboratorioissa jo paljon aikaisemmin. Ne eivät kuitenkaan ole läheskään niin yleisiä luonnossa kuin *Haloquadratum*-suvun jäsenet, sillä vuonna 1999 tehdyn tutkimuksen mukaan yli kaksi kolmasosaa tutkittujen suolanrikastusaltaiden arkeista kuului *Haloquadratum*-sukuun ja alle prosentti muihin, helpommin viljeltäviin haloarkkisukuihin, kuten *Halorubrum*, *Haloferax* ja *Haloarcula*. Nämä tulokset saatiin selville fluorescence in situ hybridization (FISH) –menetelmän avulla (Anton, J. ym., 1999).

Selviytyminen niin hapellisissa kuin hapettomissakin olosuhteissa on osoitus halofiilisten arkkien monitaitoisuudesta. Halofiilisten arkkien solukalvolla on neljä erilaista rodopsiinimolekyyliä, joilla kaikilla on erityisroolinsa energiantuotannossa (ks. yleiskatsaus Spudich, J. ja Luecke, H., 2002). Solukalvo sisältää värilliset molekyylit, saaden aikaan halofiilisille arkeille tunnusomaisen punaisen värin. Tällaisia molekyylejä ovat bakterioruberiini ja rodopsiinit, jotka sisältävät proteiiniosan ja pigmentin (Dworkin, M. ym., 2006). Bakteriorodopsiini on protonipumppu, joka valon energian avulla syntetisoi ATP:ta muodostamalla elektrokemiallisen gradientin solukalvolle. Tätä gradienttia tehostaa halorodopsiini pumppaamalla kloridi-ioneja sytoplasmaan (Schobert, B. ja Lanyi, J., 1982). Aistirodopsiineiksi (engl. Sensory Rhodopsin, SR) kutsuttuja solukalvon proteiineja on kaksi erilaista muotoa: I ja II. Ne ohjaavat arkkia valoa kohti tai siitä pois. SRI ohjaa arkkia kohti vihreää tai oranssia valoa, sen vaikutuksesta arkki myös hylkii UV-aallonpituuksista valoa. SRII taas saa solun välttämään sinistä valoa. Esimerkki valotaksiksesta on *Halobacterium salinarium*, joka on kemoheterotrofi hapellisissa olosuhteissa. Aerobeissa olosuhteissa se pyrkii välttämään liikaa valoa. Happipitoisuuden laskiessa se muuttaa rodopsiiniproteiinien ekspressiota solun pinnalla siten, että oranssia valoa voidaan käyttää energian lähteenä, samalla arkki pyrkii liikkumaan valoa kohti (ks. yleiskatsaus Spudich, J.L., 1998).

Korkea suolapitoisuus aiheuttaa valintapaineen, mikä on aikaansaanut lukuisia sopeumia halofiilisten arkkien soluseinässä ja solun sisällä. Jotta ympäristön korkea NaCl-pitoisuus ei saisi arkkeja surkastumaan, täytyy ionipitoisuuden arkin sisällä olla lähellä ympäristön vastaavaa. Tämän ongelman arkit ratkaisevat tasapainottamalla osmoottisen paineen suurella solunsisäisellä K^+ -pitoisuudella. Arkit myös pumppaavat Cl^- -ioneja solun sisään halorodopsiinin avulla, mikä laajentaa sytoplasmaa mahdollistaen siten solun kasvun sekä jakautumisen. Bakteereilla yleisempi tapa vastustaa ympäristön korkeaa suolapitoisuutta on täyttää sytoplasma orgaanisilla yhdisteillä, kuten β -glutamiinilla ja glysiini-betaiinilla. Poikkeuksia toki löytyy; bakteerilajeja, jotka pumppaavat K^+ ja Cl^- -ioneja solun sisään sekä arkkilajeja, jotka täyttävät sytoplasmansa orgaanisilla yhdisteillä. (Lai, M. ja Gunsalus, R., 1992) (ks. yleiskatsaukset Oren, A. ym., 2002 sekä Möller, V. ja Oren, A., 2003). Sytoplasman korkea KCl-pitoisuus suojaaa DNA:ta yhdessä solukalvon bakterioruberiinin kanssa. Suojaava vaikutus johtuu siitä, että UV-valon aiheuttama

vapaiden radikaalien muodostuminen solun sisällä vähenee (Shahmohammadi, H.R. ym., 1998).

Haloarkit voidaan erottaa halobakteereista soluseinän polaaristen lipidien perusteella. Varsinkin soluseinän fosfolipidikoostumus on halofiilillä arkeilla hyvin samankaltainen: fosfatidyylyglyserofosfaatin metyyliesteri (PGP-Me) ja fosfatidyylyglyseroli (PG) löytyvät kaikkien sukujen membraanista. Muutamilta haloarkeilta löytyy membraanistaan myös fosfatidyylyglyserosulfaattia (PGS). Lisäksi arkkisuvuilla on joitain niille ominaisia fosfolipidejä soluseinissään (ks. yleiskatsaus Kamekura, M. ja Kates, M., 1999). Glykolipidirakenteissa sen sijaan on suuria vaihteluja arkkiheimojen sisällä, mikä helpottaa sukujen taksonomista luokittelua. Halofiilisten arkkien solukalvon sisältämä PGP-Me vastaa lipidikaksoiskalvon stabiloimisesta korkeissa suolapitoisuuksissa. Sen ansiosta kaksoiskalvo ei lysähdy kasaan korkeissakaan NaCl-pitoisuuksissa. Suurin osa, 50 – 80 mol %, halofiilisten arkkien solukalvon polaarista lipideistä on PGP-Me:tä, kun muilla arkeilla sitä ei ole solukalvolla ollenkaan (Tenchov, B. ym., 2006). Lisäksi halofiilisten arkkien solukalvo läpäisee huonosti Cl⁻ ja H⁺ -ioneja, mikä on edellytys selviytymiselle korkeissa suolapitoisuuksissa (van de Vossenberg, J.L. ym., 1999).

Myös haloarkkien proteiinien täytyy kestää sytoplasman korkeaa suolapitoisuutta. Tämän takia proteiinit sisältävät normaalia enemmän happamia aminohappoja, emäksisten aminohappojen pitoisuus taas on normaalia pienempi. Proteiinien suurella seriinipitoisuudella haloarkit kompensoivat hydrofobisten aminohappojen vähyttä (Oren, A. ja Mana, L., 2002). Proteiinien pinnalle muodostuva negatiivinen varaus tekee, yhdessä sytoplasman anionien kanssa, proteiineista vakaampia korkeissa suolapitoisuuksissa (Ebel, C. ym., 2002).

6.3. Suolaiset elinympäristöt kuhisevat elämää

Arkit hallitsevat kaikkein suolaisimpia elinympäristöjä. Suolanrikastusaltaissa, joita käytetään suolan valmistuksessa, NaCl-pitoisuudet vaihtelevat 1,7 M:sta yli 5,0 M:iin. Mitä enemmän suolaa, sitä yksinkertaisempi on ravintoverkko ja sitä suurempi osa eliöstöstä on halofiilisiä arkkeja. Suolapitoisuuden nousu hidastaa eliöiden kasvua, koska ne joutuvat käyttämään paljon energiaa pelkästään selviytymiseen. Saalistuksen puuttuessa eliöt kuitenkin kasvavat suuremmiksi, minkä ansiosta myös biomassa on suurta kaikkein suolaisimmissa altaissa, joita kutsutaan suolankiteytysaltaiksi (Pedros-Alio, C. ym., 2000).

Arkit pystyvät selviytymään jopa Kuolleessameressä, jossa korkean Mg^{2+} -pitoisuuden ja suolaisuuden takia on havaittu leväkukintoja vain vuosina 1980-1982 ja 1992-1996. Tällöin runsaat sateet laimensivat järven pinnan ionipitoisuutta, *Dunaliella*-levä käytti suolapitoisuuden alenemisen hyväkseen ja muodosti nopeasti kukintoja. Levästä vapautunut glyseroli tarjosi hiilenlähteen halofiilille arkeille, joiden määrä järvestä lisääntyi nopeasti. Suurin osa järvestä löydetyistä arkeista tunnistettiin *Haloferax*- ja *Halobaculum*-sukujen edustajiksi. Vuosien 1994-1995 kukinnoissa havaittiin myös suuri määrä viruksia, joiden arveltiin aiheuttaneen arkkikannan pienemisen (ks. yleiskatsaus Oren, A., 1999).

Halofiilisiä arkkeja esiintyy myös Afrikan soodajärvissä, jotka suolaisuuden lisäksi ovat emäksisiä. Tällaisissa elinympäristöissä kukoistavat haloalkalofiiliset arkkisuvut. 16S rRNA-sekvenssien perusteella soodajärvien arkit muistuttavat läheisesti mm. *Natronomonas pharaonista*, *Natrialba magadiitä* (Grant, S. ym., 1999). Muita suolaisia elinympäristöjä, joista halofiilisiä arkkeja on kyetty eristämään ovat Etelänavan suolajärvet, kuten Deep Lake (Bowman, J. ym., 2000) sekä Egyptissä sijaitseva Solar Lake (Cytryn, E. ym., 2000). Halofiilisiä arkkeja on löydetty jopa kaivosten seiniltä New Mexicosta (Vreeland, R.H. ym., 1998).

6.4. Halofiilisen *Halorubrum*-arkkisuvun edustajat

Vuonna 1995 perustetun *Halorubrum*-suvun jäsenet voidaan jakaa kahteen ryhmään; haloalkalofiileihin ja halofiileihin. *Hrr. vacuolatum* ja *Hrr. tibetense* pystyvät kasvamaan korkeassa pH:ssa – ne ovat haloalkalofiiliryhmän edustajat (Feng, J. ym., 2004; Feng, J. ym., 2005). Muut *Halorubrum*-suvun lajit eivät pysty kasvamaan emäksisissä olosuhteissa. *Halorubrum*-suku perustettiin, kun *Hrr. saccharovorum*, *Hrr. sodomense*, *Hrr. trapanicum* NRC 34021 ja *Hrr. lacusprofundi* siirrettiin *Halobacterium*-suvusta uuteen *Halorubrum*-sukuun (McGenity, T.J. ja Grant, W.D., 1995). *Halorubrum*-suvun edustajilla on tärkeä rooli typen ja hiilen kierroissa (Ochsenreiter, T. ym., 2002). Yksi mielenkiintoisimmista *Halorubrum*-suvun edustajista on psykrotrofinen haloarkki, *Hrr. lacusprofundi*. Se eristettiin Etelänavan Deep Lake –suolajärvestä vuonna 1988. Optimi kasvulämpötila *Hrr. lacusprofundille* on +31 - +36 °C, mutta muista halofiileistä arkeista poiketen se pystyy myös kasvamaan +4 °C:ssa. Parhaiten tämä arkki kasvaa Na^+ -konsentraatioissa, jotka ovat 2,5 ja 3,5 M välillä. Syy siihen, että *Hrr. lacusprofundi* pystyy kasvamaan niinkin

kylmässä, löytyy solukalvon lipidirakenteesta, joka pystyy säilyttämään joustavuutensa lämpötiloissa, joissa normaali sytoplasmakalvo jämettyisi ja menettäisi toimintakykynsä (Franzmann ym., 1988).

6.5. Arkkeja infektioivat virukset

Virukset luokitellaan niiden morfologian, isäntien, genomien ja elinkierron mukaan. Määrältään suurin tunnettu virusmorfologiaryhmä on prokaryootteja infektioivat faagit. Suurin osa faageista, yli 96 %, on hännällisiä (ks. yleiskatsaus Ackermann H.W., 2007). International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) on koonnut luokitellut virukset yhteen (Fraquet ym., 2005; ICTV: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>). Virusten tutkimuksessa on tärkeää myös viruksen elinkierron selvittäminen. Virukset voivat olla joko lyyttisiä tai lysogeenisiä. Lyyttiset virukset hajottavat isäntäsolun purkautuessaan ulos siitä. Lyyttisiä viruksia kutsutaan myös virulenteiksi. Lysogeenisessä elinkierrossa virukset integroituvat isännän genomiin proviiruksiksi tai jäävät isännän sytoplasmaan plasmidimuodossa. Ne voivat myöhemmin aktivoitua ja muuttua lyyttisiksi sopivissa olosuhteissa tai solun altistuttua esimerkiksi UV-valolle. Virukset, jotka kykenevät sekä lyyttiseen, että lysogeeniseen elinkiertoon ovat temperaatteja. Jotkut virukset pystyvät myös tunkeutumaan ulos isäntäsolusta hajottamatta sitä, tämä tapahtuu kuroutumalla solukalvon läpi (Campbell, N.A. ja Reece, J.B., 2002)

6.5.1. Arkkivirusten luokittelu ja evoluutio

Arkkivirukset voidaan luokitella isäntäsolun perusteella krenarkkeja infektioiviin sekä euryarkkeja infektioiviin viruksiin. Morfologian perusteella ne luokitellaan lisäksi viiteen ryhmään: fusiformisiin, eli sukkulan muotoisiin, pullon sekä pisaran muotoisiin, lineaarisiin, pallomaisiin ja hännällisiin (Fraquet ym., 2005; ICTV: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>). Ensimmäiset arkkeja infektioivat virukset löydettiin 1974 (Torsvik, T. ja Dundas, I.D., 1974). Ne muistuttivat rakenteeltaan bakteereita infektioivia hännällisiä faageja, minkä takia pitkään luultiinkin, että suurimmalla osalla arkkeja infektioivista viruksista olisi myös ikosaedraalinen kapsidi ja supistuva häntä. Useat, n. 85 % euryarkkeja infektioivista viruksista onkin morfologialtaan hännällisiä. Ne on sijoitettu *Myoviridae*- ja *Siphoviridae*-heimoihin. (ks. yleiskatsaukset Prangishvili, D. ym., 2006a ja Prangishvili, D. ym., 2006b). Krenarkkeja infektioivat arkkivirukset ovat sen sijaan

morfologialtaan paljon monimuotoisempia; ne onkin luokiteltu seitsemään eri heimoon (ks. yleiskatsaus Prangishvili, D. ym., 2006b).

Arkkivirusten tutkimus on vielä lasten kengissä verrattuna eukaryoottien ja bakteerien virusten tutkimukseen - vuoteen 2006 mennessä eukaryootteja infektoivia viruksia on luokiteltu 104 eri heimoa, kun bakteereita infektoivia virusheimoja on 12 ja arkkeja infektoivia vain seitsemän (ks. yleiskatsaus Porter, K. ym., 2007). Virusten perimä voi olla joko DNA:ta tai RNA:ta. Lisäksi perimä voi olla yksi- (engl. single-stranded, ss) tai kaksijuosteista (engl. double-stranded, ds). Kaikkien tähän mennessä löydettyjen arkkivirusten perimä on kuitenkin dsDNA:ta, mikä saattaa viitata siihen, että muinaisten arkkivirusten isäntä oli hypertermofiili metanogeeni. Tätä olettamusta tukee se seikka, että RNA on paljon epävakaampaa korkeissa lämpötiloissa, kuin DNA (ks. yleiskatsaukset Brochier, C. ym., 2005a sekä Prangishvili, D. ym., 2006b)

Nykyään ajatellaankin, että virukset ovat kehittyneet omana ryhmänään. Tämän hypoteesin perustana on, että muinaiset virukset olisivat infektoineet LUCA:a (engl. Last Universal Cellular Ancestor) eli kaikkien solujen kantamuotoa. LUCA:n erilaistuessa elämän kolmeksi domeeniksi - eukaryoottisoluiksi, bakteereiksi ja arkeiksi, virukset olisivat ajautuneet infektoimaan kaikkia kolmea domeenia. Tätä teoriaa tukevat vastaavuudet eukaryoottisoluja, bakteereita ja arkkeja infektoivien virusten rakenteissa; *Sulfolobus* turreted icosahedral virus (STIV) –arkkivirus, PRD1-bakteriofaagi ja adenovirus muistuttavat kaikki kapsidiltaan toisiaan. Erityisesti niiden pääasiallisen kuoriproteiinin rakenne on samankaltainen (ks. yleiskatsaukset Bamford, D. ym., 2005 sekä Prangishvili, D. ym., 2006a). Kaikilla kolmella viruksella olisi siis voinut olla yhteinen kantamuoto.

6.5.2. Sukkulan muotoiset virukset

Sukkulan muotoisten eli fusiformisten virusten ryhmässä on sekä krenarkkeja että euryarkkeja infektoivia viruksia. Niitä esiintyy sekä suolaisissa, että kuumissa ja happamissa ympäristöissä - suolanrikastusaltaissa ja kuumissa lähteissä (Oren, A. ym., 1997; Rice, G. ym., 2001). Hypertermofiilisiä *Sulfolobus*-krenarkkeja infektoivat *Fuselloviridae*-heimon virukset, jotka ovat morfologialtaan ja genomiltaan yhtenäisiä. Kaikilla on pieni häntä ja niillä on pituudeltaan samaa kokoluokkaa oleva dsDNA-genomi. *Fuselloviridae*-heimoon kuuluvat *Sulfolobus* spindle-shaped virus 1 (SSV1) ja SSV2 ovat

temperaatteja, eli ne voivat olla joko lyyttisiä tai lysogeenisiä. Lyyttinen sykli voidaan aiheuttaa UV-käsittelyllä (Martin, A. ym., 1984; Stedman, K. ym., 2003).

Acidianus two-tailed virus (ATV) on *Bicaudaviridae*-heimon ainoa edustaja. Sen erikoisuutena on solun ulkopuolinen kehitys, jollaista ei olla havaittu millään muulla viruksella. ATV infektoi *Acidianus*-suvun krenarkkeja, jotka hajoavat uusien virionien tunkeutuessa ulos solusta. Virionit ovat sitruunan muotoisia tullessaan ulos solusta, eikä niillä ole häntää. Sopivissa olosuhteissa ne kasvattavat kaksi pitkää häntää molempiin napoihin, jotka saattavat toimia adsorptiossa isäntäsoluun (Häring, M. ym., 2005a).

Euryarkkeja infektoivat *Salterprovirus*-sukuun kuuluvat haloarkkivirukset *Haloarcula hispanica* virus 1 (His1) ja His2. Ne infektoivat nimensä mukaisesti *Haloarcula*-heimon äärimmäisiä halofiileja euryarkkeja (Bath, C. ym., 2006). Haloarkkiviruksista kerrotaan enemmän kappaleessa 6.5.7. Näiden lisäksi euryarkeista on löydetty kaksi sukkulan muotoista viruksen kaltaista partikkelia, VLP:tä (engl. Virus Like Particle) Vuonna 2003 eristettiin ensimmäistä kertaa hypertermofiilisestä euryarkista viruksen kaltainen partikkeli, joka nimettiin PAV1:ksi (*Pyrococcus abyssi* virus 1) (Geslin, C. ym., 2003). Samankaltainen partikkeli oli aiemmin eristetty metanogeenisestä *Methanococcus voltae*-kannasta (Wood, A. ym., 1989).

6.5.3. Pullon ja pisaran muotoiset virukset

Tähän morfologiaryhmään kuuluu *Ampullaviridae*- ja *Guttaviridae*-heimon hypertermofiilisiä krenarkkeja infektoivat *Acidianus* bottle-shaped virus (ABV) ja *Sulfolobus neozealandicus* droplet-shaped virus (SNDV). ABV on morfologialtaan ainutlaatuinen virusten maailmassa - se muistuttaa pulloa. Epätavallisesta rakenteesta on hyötyä infektoissa. Virionin suipon pään proteiinirakenteet ovat epävakaampia kuin muut, mikä viittaa siihen, että DNA injektoidaan isäntäsoluun suiposta päästä. Virionin toinen puoli on leveämpi ja sen päässä on levymäinen rakenne, jossa on ohuita rihmoja. Niiden merkitystä ei vielä tunneta (Häring, M. ym., 2005b).

SNDV on pisaran muotoinen virus, jonka suipommassa päässä on tiheä muodostelma ohuita rihmoja. Rihmojen on ehdotettu toimivan adsorptiossa isäntäsoluun - niiden välityksellä virukset kiinnittyvät johonkin solun pinnan reseptoreista. SNDV:n genomi ei integroidu isännän perimään. Virukset tunkeutuvat ulos solusta vasta solun ollessa

stationäärisessä kasvuvaiheessa, eli kasvun loputtua. Erikoista SNDV:n genomissa on sen muokkaus metyyliiryhmillä - SNDV on ainoa krenarkkeja infektoiva virus, jonka DNA on metyloitu. Viruksen isännän DNA sitävastoin ei ole muokattu metyyliiryhmillä (Arnold, H. ym., 2000b).

6.5.4. Lineaariset virukset

Lineaariset arkkivirukset infektoivat kuumissa olosuhteissa eläviä krenarkkeja (Rice, G. ym., 2001). Tällaisia ovat *Sulfolobus*, *Acidianus* ja *Thermoproteus* –sukujen krenarkit. Lineaariset virukset jaetaan *Rudiviridae*- ja *Lipothrixviridae*-heimoihin. *Rudiviridae*-heimon virukset ovat jäykkiä, helikaalisia sauvoja. *Lipothrixviridae*-heimon edustajat sen sijaan ovat notkeita, pitkiä ja filamenttımaisia (ks. yleiskatsaus Rachel, R. ym., 2002). *Lipothrixviridae*-heimon virukset ovat myös vaipallisia. *Rudiviridae*-heimoön kuuluvilla viruksilla ei sen sijaan ole lainkaan virionia ympäröivää vaippaa. Lineaarisilla viruksilla on lineaarinen dsDNA-genomi (ks. yleiskatsaus Prangishvili, D. ja Garrett, R., 2005).

Rudiviridae-heimoön kuuluvat *Sulfolobus islandicus* rod-shaped virus 1 (SIRV1) ja SIRV2 sekä *Acidianus* rod-shaped virus 1, ARV1 (ks. yleiskatsaus Prangishvili, D. ja Garrett, R., 2005). SIRV1:n SIRV2:n sauvamaisen kapsidin päissä on kolme lyhyttä rihmaa, joiden merkitystä ei vielä tunneta. SIRV1:n ja 2:n genomit eivät sisällä integraaseja, mikä on tavallista lineaarisille arkkiviruksille. Ne eivät myöskään lyysaa isäntää. Uusien virionien purkauduttua ulos soluista isäntiä ei pystytä enää infektoimaan samalla viruslajilla (Prangishvili, D. ym., 1999). ARV1 on morfologialtaan hyvin samankaltainen SIRV1:n ja 2:n kanssa - sauvamainen virus, jonka päissä kolme lyhyttä rihmaa. ARV1:n arvellaan käyttävän rihmoja adsorptiossa isäntään. *Rudiviridae*-heimon viruksia on eristetty Islannista ja Italiasta. Myös pohjois-Amerikasta kuumista lähteistä on löydetty morfologialtaan samankaltaisia viruksia (Vestergaard, G. ym., 2005).

Lineaarisista arkkiviruksista *Lipothrixviridae*-heimon edustajien kirjo on morfologialtaan monipuolisin. Eroavaisuuksia esiintyy viruksen ydinosassa, genomissa ja replikaatiokoneistossa, joiden perusteella heimo jaetaan neljään sukuun: *Alphalipothrixvirus*, *Betalipothrixvirus*, *Gammalipothrixvirus* ja *Deltalipothrixvirus*. α -*lipothrixvirus*-suvun ainoa jäsen on *Thermoproteus tenax* virus 1, TTV1. β -*lipothrixvirus*-sukuun kuuluvat TTV2 ja TTV3 sekä *Sulfolobus islandicus* filamentous virus, SIFV (ks. yleiskatsaus Prangishvili, D. ja Garrett, R., 2005). SIFV:n kapsidin päissä on kuudesta

rihmasta koostuva rakenne, joka avautuu isäntäsolun solukalvon havaitessaan. Tämän rakenteen avulla viruksen on ehdotettu tarttuvan isäntäsoluun infektion alussa. SIFV:n virioni muistuttaa läheisesti TTV1:tä, 2:ta ja 3:a, kahden jälkimmäisen morfologiaa ei olla kuitenkaan vielä tutkittu kovin yksityiskohtaisesti. Genomiltaan SIFV muistuttaa yllättävän paljon SIRV1:tä, molempien isäntäkirjo on myös samankaltainen (Arnold, H. ym., 2000a). γ - ja δ -*lipothrixvirus*-sukujen jäsenet ovat *Acidianus filamentous virus 1* (AFV1) ja AFV2 - molemmat muodostavat omat sukunsa. AFV1 on morfologialtaan filamenttimainen, virionin päissä on kouria muistuttavat rakenteet, joiden avulla virus kiinnittyy isäntäsolun värekarvoihin (Bettstetter, M. ym., 2003). AFV2 eroaa kaikista muista *Lipothrixviridae*-heimon viruksista siinä, että se ei sisällä lainkaan lipidejä vaipassaan. Näin se on sijoitettu kokonaan omaan sukuunsa. Sen kapsidin päissä on pulloharjaa muistuttavat rakenteet, joiden avulla AFV2 adsorboituu isäntäsoluun (Häring, M. ym., 2005c).

6.5.5. Pallon muotoiset virukset

Morfologialtaan pallon muotoisiin viruksiin kuuluu krenarkkeja ja euryarkkeja infektoivia viruksia. Pallomaisia viruksia löytyy kuumista, happamista ja suolaisista elinympäristöistä. *Globuloviridae*-heimoon luokitellaan termofiilisiä krenarkkeja infektoivat *Pyrobaculum spherical virus*, PSV ja *Thermoproteus tenax spherical virus 1*, TTSV1. PSV on ensimmäinen löydetty *Pyrobaculum*-suvun krenarkkeja infektoiva virus. Se on ainoa tunnettu pallon muotoinen DNA-virus, jolla on lipidejä sisältävä vaippa. PSV ei lyysaa isäntää vaan tekee siitä kantajan. PSV:n genomi on erikoinen – geenipankkia tutkittaessa vain TTSV1:ltä löytyy sekvenssihomologioita PSV:n kanssa, miltään muulta tunnetulta virukselta ei löydy samankaltaisuuksia sekvenssissä. Molempien genomit ovat lineaarista dsDNA:ta ja virukset ovat myös morfologialtaan samankaltaisia (Häring, M. ym., 2004; Ahn, D. ym., 2006).

Kaksi pallon muotoista virusta on vielä luokittelemattomia; *Sulfolobus turreted icosahedral virus* (STIV) ja *Serpentine Lake hispanica 1 -virus* (SH1). Mielenkiintoista näissä arkkiviruksissa on niiden kapsidin ikosaedraalinen morfologia. Kuten jo kappaleessa 3.5.1 mainittiin ikosaedraalisia viruksia esiintyy jokaisessa elämän kolmessa domeenissa, mikä on erityisen mielenkiintoista virusten evoluution kannalta (ks. yleiskatsaus Bamford, D. ym., 2005). STIV infektoi kuumissa ja happamissa olosuhteissa eläviä *Sulfolobus*-suvun krenarkkeja. Sen morfologiassa erityistä ovat mahdollisesti isännän tunnistuksessa ja

infektiossa toimivat piikit, joita on kapsidin viisinkertaisissa symmetria-akseleissa (Rice, G. ym., 2004). SH1 on STIV:n tavoin ikosaedraalinen virus. Se infektoi halofiilisiä *Haloarcula hispanica* -euryarkkeja. SH1 pystyy infektoimaan myös *Halorubrum*-suvun arkkeja. Lisäksi se on harvoja arkkiviruksia, jotka lyysaavat isännän (Porter, K. ym., 2005). Halofiilisten arkkien viruksista kerrotaan lisää kappaleessa 6.5.7.

6.5.6. Hännälliset virukset

Virukset, joilla on ikosaedraalinen pää ja helikaalinen häntä on yleisin morfologiatyyppi bakteereita infektoivilla bakteriofaageilla sekä euryarkkeja infektoivilla viruksilla. Yhtään hännällistä krenarkkia infektoivaa virusta ei tunneta (ks. yleiskatsaus Dyll-Smith, M. ym., 2003).

Myoviridae-heimoon kuuluvat arkkivirukset ϕ H ja ϕ Ch1. ϕ H infektoi halofiilistä euryarkkia, *Halobacterium salinariumia*. Sillä on lineaarinen dsDNA, joka ei integroidu isännän genomiin vaan säilyy plasmidina isännän solulimassa. ϕ H-virionit lyysaavat isännän tunkeutuessaan on ulos (Schnabel, H. ym., 1982; Schnabel, H., 1984). Ainoa tunnettu haloalkalofiilisiä arkkeja infektoiva virus on ϕ Ch1. Se on temperaatti virus joka infektoi *Natrialba magadiita*. Morfologialtaan ϕ Ch1 muistuttaa läheisesti ϕ H:ta, myös genomi on ϕ H:n tapaan lineaarinen dsDNA, sillä erotuksella, että ϕ Ch1:n perimä pystyy integroitumaan isännän genomiin. ϕ Ch1:n häntä on supistumiskykyinen. Erikoinen piirre ϕ Ch1:n genomissa on, että se on Dam-metyloitu. Mielenkiintoista tässä on, että isännän DNA ei ole muokattua. Metyloinnin merkitys voi olla suojautuminen isännän nukleaseilta (Witte, A. ym., 1997).

Siphoviridae-heimoon kuuluvat metanogeenistä arkkia, *Methanothermobacter marburgensis* infektoivat virukset, ψ M1 ja sen deleetiomutantti ψ M2. Genomiltaan nämä hännälliset virukset ovat sirkulaarista dsDNA:ta, elinkierroltaan luultavasti temperaatteja, vaikka integraasigeenejä ei vielä ollakaan tunnistettu (Pfister, P. ym., 1998). Vielä luokittelemattomia hännällisiä arkkiviruksia ovat halofiilisiä euryarkkeja infektoivat HF1 ja HF2, jotka ovat tutkituimpia hännällisiä arkkiviruksia. Ne eristettiin samasta suolanrikastusaltaasta ja ovat morfologialtaan identtisiä. HF1:n ja HF2:n elinkierrot ovat lyyttisiä, mutta niiden isäntäkirjo on täysin erilainen (Nuttall, S. ja Dyll-Smith, M., 1993). Koska HF1:n ja HF2:n genomit ovat alkupäästään täysin identtistä, mutta loppuosistaan

vain 87 %:sti samankaltaista, on esitetty että HF1 ja HF2 olisivat aikojen saatossa rekombinoituneet kolmannen, HF-sukuisen viruksen kanssa (Tang, S. ym., 2004).

6.5.7. Halofiilisten arkkien virukset

Halofiilisiä arkkeja infektoivia viruksia on morfologialtaan kolmea erilaista, kuten aiemmissa kappaleissa on mainittu. Hännälliset HF1 ja HF2 sekä ϕ H ja ϕ Ch1 edustavat yhtä yleisimmistä virusmorfologioista virusten maailmassa. Suurin osa löydetyistä halofiilisiä euryarkkeja infektoivista viruksista onkin hännällisiä. Poikkeuksena ovat *Haloarcula*-suvun arkkeja infektoivat virukset, sukulan muotoiset His1 ja His2, sekä SH1, joka on morfologialtaan pallon muotoinen (ks. yleiskatsaus Ackermann H.W., 2007).

Suurin osa haloviruksista on lyyttisiä, ϕ Ch1 on yksi harvoista temperaateista viruksista (Witte, A. ym., 1997; yleiskatsaus Dyll-Smith, M. ym., 2003). Mielenkiintoinen elinkierron muoto, jota on havaittu myös halofiilillä arkeilla, on persistentti infektio. Persistentin infektion avulla virus pystyy selviämään suolapitoisuuden noususta pysymällä solun sisällä ja muuttamalla virulentimmaksi vasta, kun olosuhteet muuttuvat suotuisammiksi. His1:n ja His2:n arvioidaan olevan infektiovaltaaan persistenttejä. Jotkut haloviruksista, kuten ϕ Ch1 pystyvät integroitumaan isännän genomiin, toiset taas ovat plasmidimuodossa isännän sisällä, esimerkkinä ϕ H (ks. yleiskatsaus Porter, K. ym., 2007).

Halofiilisten arkkien viruksia on löydetty niin Kuolleestamerestä, kuin suolalammikoista ja suolanrikastusaltaista, jopa fermentoidusta kalakastikkeesta. Muutamat halovirukset ovat löytyneet laboratorioden arkkikannoista. Halovirusten merkitystä suolaisten elinympäristöjen ravintoverkoissa on tutkittu jonkin verran. Kuolleenmeren ravintoverkkoa tutkittaessa havaittiin, että haloviruksia on paljon enemmän verrattuna halofiilisiin arkkeihin ja halotolerantteihin bakteereihin. Saalistuksen ollessa olematonta, pääteltiin, että virukset harventavat järven arkkikantaa ja osallistuvat näin orgaanisen hiilen ja typen kiertoihin. Arveltiin myös että virukset edistävät horisontaalista geenien siirtymistä halofiilisten bakteerien välillä (Oren, A. ym., 1997). Suolanrikastusaltaissa tilanne on toinen, viruksilla ei arvella olevan kovin suurta merkitystä arkkikyhteisön koon säätelyssä (Pedros-Alio, C. ym., 2000). Tämä voi kuitenkin muuttua lähitulevaisuudessa, sillä yhtään virusta, joka infektoisi neliön muotoisia haloarkkeja ei ole vielä löydetty. Koska tämä arkkiryhmä on selvästi yleisin äärimmäisen suolaisissa elinympäristöissä, viruksen löytyminen saattaisi horjuttaa nykyisiä näkemyksiä

suolanrikastusaltaiden ravintoverkon rakenteesta (ks. yleiskatsaus Dyall-Smith, M. ym., 2003).

6.6. *Halorubrum* membrane containing virus 1, HMV1

Trapanissa, Italiassa sijaitsevasta suolanrikastusaltaasta eristettiin vuonna 2006 arkki, jonka havaittiin 16S rRNA vertailujen perusteella olevan läheistä sukua *Halorubrum jeotgalin* ja *Halorubrum lacusprofundin* kanssa. (Pietilä, M. ym., käsikirjoitus) Arkki nimettiin *Halorubrum* PV6:ksi. Toisesta suolanrikastusaltaasta otetusta vesinäytteestä löydettiin virus, joka kykeni infektoimaan *Halorubrum* PV6-kantaa. Tämä virus nimettiin *Halorubrum* membrane containing virus 1:ksi (HMV1). (Pietilä, M., 2007).

Morfologialtaan HMV1 on pleomorfinen. Partikkelit ovat kooltaan keskimäärin 44 x 55 nm, joten HMV1 on varsin pieni verrattuna muihin arkkiviruksiin. Virusten havaittiin olevan herkkiä kloroformille, mikä viittasi siihen, että partikkelit saattavat sisältää lipidejä. Myös partikkelin tiheys, 1,29 g/ml (CsCl), viittasi lipidien olemassaoloon. HMV1:n kapsidi koostuu neljästä proteiinista, kooltaan 12, 20, 70 ja 85 kDa (Pietilä, M., 2007).

HMV1:n infektion aikana elävien solujen määrä ei vähene merkittävästi, eli solut eivät lyysaa. Tämän voi selittää kaksi seikkaa: joko yksittäiset solut tuottavat suuria määriä viruksia, jolloin vain pieni osa isäntäarkeista lyysaa, tai isännissä tapahtuu muutoksia, jotka estävät virusten ulospääsyn kasvun stationäärivaiheessa. Nämä syyt voivat peittää HMV1:n virulentisuuden. Yksi varteenotettava vaihtoehto on myös persistentti infektio, jossa isännästä vapautuu jatkuvasti pieniä määriä viruksia. (Pietilä, M., 2007)

HMV1:n perimä on muiden haloarkkivirusten tapaan DNA:ta (Pietilä, M. ym., käsikirjoitus).

7. Tutkimuksen tarkoitus

HMV1 on uusi, halofiilistä *Halorubrum* sp. arkkia infektoiva virus. Se on morfologialtaan pleomorfinen. Aiemmissä tutkimuksissa on keskitytty viruksen puhdistuksen kehittämiseen ja elinkierron tutkimiseen. Niissä HMV1:llä ehdotettiin olevan lipidivaippa ja virionin todettiin koostuvan neljästä rakenneproteiinista (Pietilä, M., 2007). Näiden tietojen varmistamiseksi tehtiin sarja hajotustutkimuksia, joiden tarkoituksena oli selvittää HMV1-virionin proteiinirakenne.

Hajotustutkimukset muodostavat perustan virusten rakennetutkimukselle. Esimerkiksi PM2:n virionin rakennetta pyrittiin tutkimaan hajotuksien avulla: PM2:n kapsidi hajotettiin jäädytys-sulatuskäsittelyn avulla ja kelatoimalla kalsiumioneja. Tällöin viruksen DNA:ta ympäröivä lipidirakenne paljastui. Samalla pystyttiin selvittämään mitkä proteiineista olivat yhteydessä lipidikalvoon (Kivelä, H. ym., 2002). Vaikka hajotustutkimukset ovatkin yleisiä menetelmiä virustutkimuksessa, halofiilisiä arkkeja infektoivien virusten hajotustutkimukset ovat harvinaisia. SH1:n virionin rakenne selvitettiin hajotustutkimusten avulla vuonna 2006. Virus saatiin hajotettua parhaiten urealla ja matalalla ionivahvuudella. Hajotustutkimuksen avulla voitiin olettaa mitkä proteiinit muodostavat kapsidin, samalla huomattiin, että SH1:n kapsidi muistuttaa läheisesti PRD1:n vastaavaa (Kivelä, H. ym., 2006).

Usein käytettyjä hajotuskäsittelyitä viruksilla ovat erilaiset detergenttikäsittelyt. Erityisen käytännöllisiä detergenttikäsittelyt ovat vaipallisten virusten rakennetutkimuksissa. Detergenttien lipidikalvoja rikkovat ominaisuudet johtuvat niiden rakenteesta; detergenttimolekyylit ovat amfipaattisia, eli niillä on polaarinen osa ja hydrofobinen eli vettä hylkivä häntäosa. Amfipaattisuuden ansiosta detergenttimolekyylit pyrkivät muodostamaan misellejä, eli palloja, joissa hydrofobiset hännät pyrkivät pois veden ulottuvilta ja kasautuvat toistensa läheisyyteen muodostaen näin pallon ytimen. Samalla polaariset päät pyrkivät veden läheisyyteen ja muodostavat pallon pinnan. Kohdatessaan lipidikalvon detergenttimolekyylit sekoittavat kalvon rakenteen ja muodostavat yhdessä kalvon lipidien kanssa misellejä (Garavito, R.M. ja Ferguson-Miller, S., 2001). Monia proteaaseja, kuten trypsiiniä, proteinaasi K:ta ja pronaasia käytetään myös usein virionien hajotuksissa. Muita hyviä keinoja virionin hajottamiseen ovat kaotrooppiset aineet, kuten

urea sekä, varsinkin halofiilisilla viruksilla, matala inonivahvuus (Kivelä, H. ym., 2002, Kivelä, H. ym., 2006).

Hajotustutkimusten pyrkimyksenä on löytää käsittely, jossa virioni hajoaa kontrolloidusti. Tämä tarkoittaa sitä, että virionista yritetään irrottaa yksi proteiinilaji kerrallaan. Jos virus hajoaa kokonaan, ei proteiinien sijaintia virionissa voida arvioida. Hajotusten perustana ovat säilyvyystutkimukset, joissa tutkitaan viruksen infektiivisyyden laskua verrattuna käsittelemättömään virukseen. Infektiivisyyden lasku viittaa viruksen inaktivaatioon, mikä taas johtuu mahdollisesti virionin hajoamisesta. Säilyvyystutkimusten avulla voidaan tehdä alustavia määriä niistä aineista ja olosuhteista, jotka saavat aikaan virionin hajoamisen.

Tämän työn tavoitteena on löytää olosuhteet, joissa HNV1-virioni hajoaa kontrolloidusti. Hajotuksista saatujen tietojen perusteella on tarkoitus tehdä oletuksia proteiinien lokalisaatiosta viruspartikkelissa sekä pohtia niiden toimintaa.

8. Materiaali ja menetelmät

8.1. Arkki ja virus

Isäntä, *Halorubrum* sp. ja sitä infektoiva virus, HMV1 eristettiin vuonna 2006 Italiasta, Trapanin kaupungissa sijaitsevasta suolanrikastusaltaasta (Pietilä, M., 2007). Isäntää kasvatettiin aerobisesti +37 °C:ssa, ja sen kasvua nesteviljelmässä seurattiin absorbanssimittauksilla 550 nm aallonpituudella Clormic-absorbanssimittarilla (Selecta Clormic).

8.2. Kasvatusalustat

Kasvatusalustana käytettiin muokattua kasvatusalustaa (MGM; 1000 ml sisältää: 5 g peptoni [OXOID], 1 g hiivauute [Bacto] ja 768 ml 30 % [w/V] keinotekoinen suolavesi, pH 7,2), jonka perustana oli 30 % (w/V) keinotekoinen suolavedesi (SW). Suolavedestä laimennettiin eri pitoisuudet MGM-kasvatusliemeen (23 %), MGM-maljoihin (20 %) ja MGM-pehmyt agariin (18 %) (Nuttall, S. ja Dyall-Smith, M., 1993; The HaloHandBook: <http://www.microbiol.unimelb.edu.au/people/dyallsmith/HaloHandBook/>). Viruspuskurina käytettiin HMV1-puskuria, joka sisältää 1,5 M NaCl, 100 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 7,5. Vaihtoehtoisesti käytettiin alhaisen suolan puskuria (50 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 7,5). Kasvatusalustojen tarkemmat valmistusohjeet löytyvät liitteestä 1.

8.3. Viruksen maljakasvatus

Virussuspensiot laimennettiin 23 % MGM-liemeen tai HMV1-puskuriin. Kukin viruslaimennos (100 µl) sekoitettiin isäntäsolususpension (300 µl) ja pehmytagarin (3 ml) kanssa, minkä jälkeen seos levitettiin MGM maljoille. Maljoja kasvatettiin kolme yötä +37 °C:ssa. Haihtumisen vähentämiseksi maljat laitettiin kannellisiin rasioihin, joihin laitettiin lisäksi vesiastia.

8.4. Viruksen nestekasvatus ja puhdistus

Tätä työtä varten HMV1-virus saatiin valmiiksi puhdistettuna. Virus puhdistettiin aiemmin määritellyn puhdistusmenetelmän mukaan (Pietilä, M. ym., käsikirjoitus). Viruspuhdistukset suoritti Sari Korhonen. Eksponentiaalisen kasvuvaiheen *Hrr.* sp.-arkit

23 % MGM-liemessä (solutiheys n. 4×10^8 solua/ml) pestiin kuolleiden solujen sekä soluriekaleiden poistamiseksi: arkit pelletoititiin (Sorvall SLA 1500; 8000 rpm, 25 min, +10 °C) ja resuspensoitiin tuoreeseen 23 % MGM-liemeen. Tämän jälkeen arkit infektoitiin HMV1-viruksella MOI (infektiokerroin, virusten ja solujen suhde infektoissa engl. multiplicity of infection) 25. Infektoituja viljelmiä kasvatettiin aerobisesti +37 °C ravistuksessa 24 h, minkä jälkeen virukset olivat valmiita puhdistusta varten.

8.5. Säilyvyyskokeet

Säilyvyyskokeissa mitattiin viruksen infektiivisyyden inaktiivisuutta eri olosuhteissa verrattuna käsittelemättömiin, eli kontrolliviruksiin. Kaikissa säilyvyyskokeissa kokonaistilavuutena oli 100 µl. Kokeiden jälkeen viruksista tehtiin sopivat laimennossarjat MGM-liemeen, minkä jälkeen laimennokset titrattiin.

Lämpötila- ja pH-kestävyyskokeissa viruksia pidettiin eri käsittelyissä 30 min. Viruslysaatti, jonka alkuperäinen tiitteri oli 1×10^{13} pfu / ml, laimennettiin ennen kokeita 1:1000. Lämpötilakokeissa käytettiin +20 – +60 °C lämpötiloja. pH-kokeissa viruslaimennosta pidettiin jäillä pH 5,5 - 8,9:ssä. Puskurina emäksisellä pH-alueella (7,2 - 8,9) käytettiin muokattua HMV1-puskuria, joka sisälsi 1,5 M NaCl, 20 mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl. Happamalla pH-alueella (5,5-6,5) Tris-HCl:n tilalla käytettiin 20 mM MESiä.

Detergenttisäilyvyyskokeissa virussuspensiota, jonka tiitteri oli 1×10^{10} pfu / ml pidettiin eri käsittelyissä 1 h huoneenlämmössä. Triton X-100 (BDH Chemicals, PA, USA) ja Nonidet P40 (LKB, Bromma, Ruotsi) -kokeissa käytettiin 0,01 – 0,5% (V/V) -konsentraatioita. HMV1:n säilyvyys ureassa sekä guanidiini hydrokloridissa (Fluka), tutkittiin 1 - 4 M (V/V) pitoisuuksissa. BHT-kokeissa (butyloitu hydroksitolueeni) käytetyt detergenttipitoisuudet olivat 0,1 - 3,0 mM (V/V). Tutkimuksissa käytetyt detergentit liuotettiin HMV1-puskuriin.

Suolasäilyvyyskokeissa tutkittiin virusten säilyvyyttä eri NaCl-pitoisuuksissa. Puskurina käytettiin HMV1-puskuria, jonka NaCl-pitoisuutta vaihdeltiin. Virussuspensioiden (tiitteri 1×10^{11} Pfu / ml) tiitterit määritettiin eri aikapisteissä (3 h, 6 h, 24 h ja 48 h) +20 °C:ssä. Käytetyt NaCl pitoisuudet olivat 0,5 M; 1,0 M; 1,2 M; 1,5 M; 2,0 M; 2,5 M ja 3,1 M..

Jäädytys-sulatuskokeissa verrattiin viruksen säilyvyyttä glyserolissa ja HVM1-puskurissa. Virussuspensio (tiitteri 1×10^{10} Pfu / ml) jäädytettiin pitämällä niitä -20 °C:ssa yön yli, minkä jälkeen virukset sulatettiin. Tämän jälkeen sulatetuista viruksista tehtiin laimennossarja, josta sitten titrattiin sopivat laimennokset. Virukset jäädytettiin uudelleen -20 °C:ssa yön yli ja titraukset suoritettiin uudestaan kuten edellisenä päivänä. Kokeen aikana virukset jäädytettiin yhteensä kolme kertaa.

8.6. Viruksen hajotus

HVM1-viruksen hajottamiseksi kokeiltiin useita olosuhteita. Hajotuskäsittelyjen yhteenveto on koottu taulukkoon 2.

Parhaiden hajotusolosuhteiden löytämiseksi virukset hajotettiin ensin pienessä mittakaavassa. Näin voitiin kokeilla useampia käsittelyjä nopeammin. Pienen mittakaavaavan hajotuksissa käytettiin $50 \mu\text{g}$ konsentroitua virusta yhtä käsittelyä kohden. Viruksia pidettiin eri hajotusolosuhteissa 1 h huoneenlämmössä, minkä jälkeen liukoiset proteiinit eroteltiin liikkuvan vyöhykkeen sentrifugaatiolla (Beckman SW50.1; 40 000 rpm, 1 h 28 min, $+15$ °C) lineaarisessa 5-20 % (w/V) sakkaaroosigradientissa. Gradientissa käytettiin samaa puskuria kuin hajotuksessa oli aiemmin käytetty. Osa hajotuksista analysoitiin käyttämällä pidempää sentrifugointia (40 000 rpm, 3 h, $+15$ °C, Beckman SW50.1), jotta hajotustuotteet saatiin erottumaan paremmin toisistaan.

Lupaavimmat hajotuskäsittelyt toistettiin suuressa mittakaavassa, näin saatiin selkeämmät tulokset. Näissä hajotuksissa käytettiin $100 \mu\text{g}$ konsentroitua virusta yhtä käsittelyä kohden. Virukset laimennettiin HVM1-puskuriin tai alhaisen suolan puskuriin. Tämän jälkeen seokseen lisättiin tarvittavat aineet hajotusolosuhteiden luomiseksi siten, että lopputilavuudeksi tuli $360 \mu\text{l}$. Viruksia käsiteltiin hajotusolosuhteissa 1 h, huoneenlämmössä, lämpötilahajotuksissa 1 h tietyssä lämpötilassa. Hajotuksen jälkeen virukset analysoitiin lineaarisessa 5-20 % (w/V) sakkaroosigradientissa käyttäen samaa puskuria kuin hajotuksissa. Kokeiltiin myös SDS:n, guanidiini hydrokloridin, urean ja Nonidet P40:n lisäämistä sakkaroosigradienttiin. Proteiinien erottelemiseksi tiheyden ja aerodynaamisen pinta-alan perusteella, hajotetut virukset sentrifugoitiin (Sorvall TH641; 30 000 rpm, 2 h 30 min, $+15$ °C). Paremman erottelun aikaansaamiseksi kokeiltiin myös proteiinien sentrifugoimista 35 000 rpm, 3 h 40 min, $+15$ °C (Beckman SW41Ti). Proteiinit analysoitiin 14 % trisiini-SDS-PAGEssa. Trisiini-SDS-PAGE poikkeaa

tavallisesta SDS-PAGEsta siinä, että se erottelee paremmin pieniä proteiineja (Schägger, H ja von Jagow, G., 1987).

Yhdistelmähajotuksessa 100 µg konsentroitua HMV1-virusta hajotettiin ensin 1 h +60 °C:ssa, alhaisen suolan puskurissa. Hajonneet viruspartikkelit sentrifugoitiin liikkuvan vyöhykkeen sentrifugaatiolla (Beckman SW41Ti; 35 000 rpm, 3 h 40 min, +15 °C) 5-20 % (w/V) sakkaroosigradientissa, joka oli tehty alhaisen suolan puskuriin. Sentrifugoinnin jälkeen sentrifuugiputkista kerättiin valoa siroava vyöhyke, joka konsentroidiin samalla tavalla, kuin virusta puhdistettaessa (kappale 8.5). Konsentroidun vyöhykkeen partikkelit hajotettiin 0,1 % (V/V) Nonidet P40-käsittelyllä, 1 huoneen lämmössä, alhaisen suolan puskurissa. Hajotetut viruspartikkelit ladattiin 5-20 % (w/V) sakkaroosigradienttiin alhaisen suolan puskurissa ja sentrifugoitiin liikkuvan gradientin sentrifugaatiolla (Beckman SW41Ti; 35 000 rpm, 3 h 40 min, +15 °C). Tämän jälkeen tulokset analysoitiin samalla tavalla kuin muissakin hajotuksissa.

Kontrollina käytettiin 100 µg konsentroitua HMV1-virusta, jota pidettiin huoneenlämmössä 1 h. Liikkuvan vyöhykkeen sentrifugaatio ja proteiinien analysointi kontrolliviruksilla suoritettiin samalla tavalla, kuin hajotetuilla viruksilla.

Taulukko 2. Käytetyt hajotusolosuhteet, puskurit sekä sentrifugointien pituudet. Kaikissa kokeissa viruksia käsiteltiin 1 h huoneenlämmössä, lukuun ottamatta lämpötilahajotuksia, joissa viruksia käsiteltiin 1 h eri lämpötiloissa.

Hajotus	Hmv1-puskuri	Alhaisen suolan puskuri	Sentrifugoinnin kesto, pitkä / lyhyt
Detergentihajotukset			
0,05 – 0,2 % SDS (V/V)	Kyllä	Kyllä	Molemmat
0,5 % Triton X-100 (V/V)	Kyllä	Ei	Lyhyt
0,1 % Nonidet P40 (V/V)	Kyllä	Kyllä	Molemmat
Lämpötilahajotukset			
+50 - +70 °C	Ei	Kyllä	Molemmat
Muita olosuhteita			
pH 2	Kyllä	Ei	Lyhyt
Jäädytyslatus	Kyllä	Ei	Lyhyt
3 M Urea (V/V)	Kyllä	Ei	Lyhyt
2 M Guanidiini hydrokloridi (V/V)	Kyllä	Ei	Lyhyt
Yhdistelmähajotus			
+60 °C + 0,1 % Nonidet P40 (V/V)	Ei	Kyllä	Pitkä

Liikkuvan vyöhykkeen sentrifugaation jälkeen fraktioiden viruspitoisuudet mitattiin spektrofotometrillä (Eppendorf BioPhotometer) 260 nm:n aallonpituudella. Tämän jälkeen proteiinit saostettiin 10 % (V/V) trikloorietikkahapolla (TCA): näytteitä pidettiin jäällä 30 minuuttia 10 % TCA:ssa, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin (13 000 rpm, 30 min, +4 °C) ja proteiinisakka kerättiin talteen. Proteiinit liuotettiin 40 µl:aan 1,5 x näytepuskuria (1000 µl 1,5 x näytepuskuri sisältää: 500 µl 3 x näytepuskuria, 50 µl 2-merkcaptoetanolia, 450 µl milliQ-vettä), keitettiin 5 minuuttia ja analysoitiin trisiini-SDS-PAGE-geelissä (110 V, 60 mA / geeli, n. 16 h). Elektroforeesin jälkeen proteiinit värjättiin ServaBlau R-liuoksessa 1 h. Ylimääräinen väri poistettiin 10 % (V/V) etikkahapolla yön yli.

8.7. Glykoproteiinien määrittäminen

Glykoproteiinit värjättiin GelCode® Glycoprotein Staining Kitin (Pierce Biotechnology Rockford, IL, USA) avulla. Värjäys perustuu perjodihappo-schiff-reaktioon. HNV1-virionille tehtiin lämpötilahajotus, minkä jälkeen proteiinit analysoitiin 15 % SDS-PAGElla yhdessä positiivisen (piparjuuriperoksidaasi) ja negatiivisen (soijapavun trypsiini-inhibiittori) kontrollin kanssa. Polyakryyliamidigeelin värjäys tehtiin GelCode® Glycoprotein Staining Kitin ohjeiden mukaan.

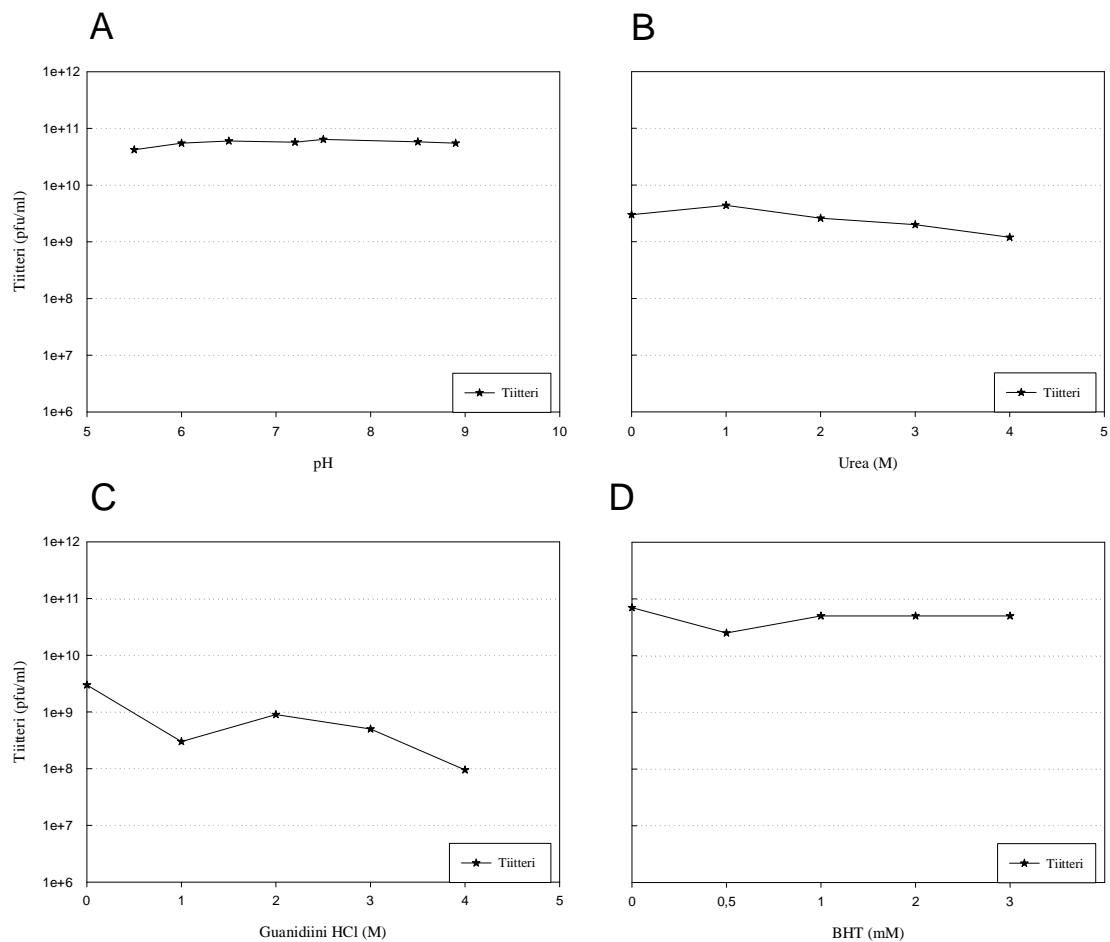
8.8. Elektronimikroskopia

Elektronimikroskopointia varten 100 µg konsentroitua HNV1-virusa lämpökäsiteltiin +60 °C:ssa 1 h, minkä jälkeen hajotustuotteet erotettiin tiheyden perusteella liikkuvan gradientin sentrifugaatiolla 5-20 % (w/V) lineaarisessa sakkaroosigradientissa. Valoa siroava vyöhyke kerättiin talteen ja konsentroituihin Amicon Ultra 4 konsentraattorilla (MWCO 100 000) ohjeiden mukaan. Puskurina käytettiin HNV1-puskuria. Läpivalaisuelektronimikroskopointia (TEM) varten viruskonsentraatista tehtiin sopivia laimennoksia HNV1-puskuriin. 10 µl viruslaimennosta pipetoitiin hilalle, näytteen annettiin adsorboitua minuutin ajan. Tämän jälkeen näyte värjättiin 1 % (V/V) kaliumfosfowolframaatilla pH 6,5 ja annettiin värjäytyä 15 s, jonka jälkeen ylimääräinen väri poistettiin suodatinpaperilla. Mikroskopointi tehtiin JEOL 1200 EX – elektronimikroskoopilla. Mikroskopoinnin suoritti dosentti Elina Roine.

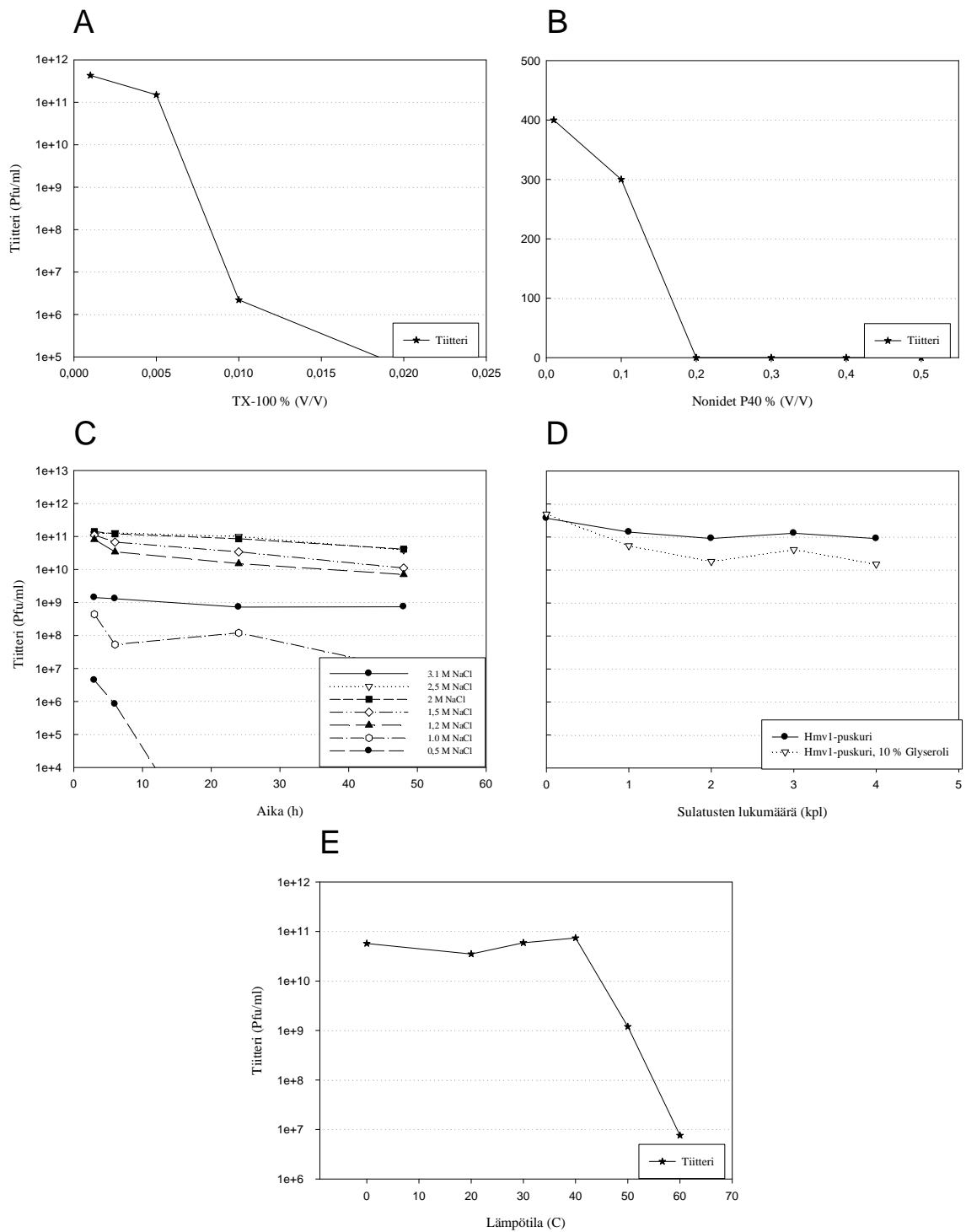
9. Tulokset

9.1. Säilyvyyskokeilla kartoitettiin tarvittavia hajotusolosuhteita

Ennen hajotuskäsittelyjä kartoitettiin HVM1:n säilyvyys eri olosuhteissa (Kuva 1). Havaittiin, että HVM1 kesti hyvin pH:n muutoksia. 4 M guanidiini hydrokloridi aiheutti viruksen infektiivisyyden satakertaisen putoamisen, mutta kokeillut pitoisuudet olivat liian pieniä virionin hajotukseen. Urea-käsittelyissä suurin kokeiltu pitoisuus (4 M) aiheutti vain pienen infektiivisyyden laskun. BHT-käsittelyillä ei ollut vaikutusta viruksen infektiivisyyteen.



Kuva 1. HVM1-viruksen infektiivisyyden säilyvyys. Viruksen säilyvyys eri pH-arvoissa (A), urea- (B) ja guanidiini hydrokloridi-pitoisuuksissa, M (C) sekä BHT-pitoisuuksissa, mM (D).



Kuva 2. HMV1-viruksen infektiivisyyden säilyvyys eri olosuhteissa. Paneeleissa (A) ja (B) HMV1:n säilyvyys TX-100:ssä ja Nonidet P40:ssä. Infektiivisyyden säilyvyys eri NaCl-pitoisuuksissa eri aikapisteissä +15 °C:ssä (C). Infektiivisyyden säilyvyys jäädytys-sulatuskäsittelyiden aikana HMV1-puskurissa sekä HMV1-puskurissa, johon lisätty 10 % (V/V) glyseroli (D). Infektiivisyyden säilyvyys eri lämpötiloissa, joissa virusta pidettiin 1 h (E).

Detergentit sen sijaan hajottivat viruksen jo pienissä pitoisuuksissa, mikä viittasi siihen, että viruspartikkeli saattaa sisältää lipidikalvon. Jo 0,01 % (V/V) pitoisuus Triton X-100:aa ja Nonidet P40:tä saivat HMV1:n infektiivisyyden häviämään (Kuva 2A ja B).

Virus kesti korkeita ionipitoisuuksia, mutta matalissa pitoisuuksissa se hajosi. 1,0 M NaCl-pitoisuuden kohdalla HMV1:n infektiivisyys alkoi laskea ja 0,5 M NaCl-konsentraatioissa virus inaktivoitui kokonaan jo 24:n tunnin jälkeen (Kuva 2C). Tutkittaessa lämpötilan vaikutusta viruksen infektiivisyyteen, havaittiin että infektiivisyys alkoi laskea +45 °C:ssa, +60 °C:ssa infektiivisyys oli pudonnut lähes puoleen alkuperäisestä. Alle +40 °C – lämpötiloissa viruksen infektiivisyys pysyi ennallaan (Kuva 2E). Jäädystyskokeissa verrattiin infektiivisyyttä HMV1-puskurin ja HMV1-puskurin, joka sisälsi 10 % (V/V) glyserolia, välillä. Virus vaikuttaa säilyvän hieman paremmin ilman glyserolia. Kokeilluilla pakastussulatuskäsittelyjen määrällä ei näyttänyt olevan vaikutusta viruksen infektiivisyyteen (Kuva 2D).

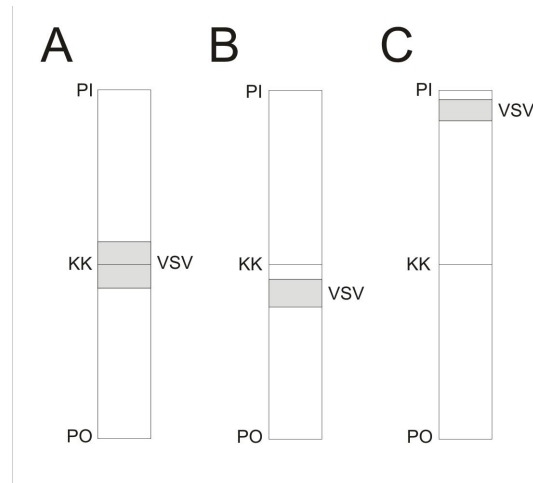
Kestävyysskokeiden perusteella valittiin lupaavimmilta vaikuttaneet käsittelyt hajotuksia varten.

9.2. Hajotusten tulosten perusteella voitiin arvioida proteiinien lokalisaatiota HMV1-virionissa

Korkeassa ionipitoisuudessa Nonidet P40-detergentti hajotti HMV1-viruksen kontrolloidusti, matalassa ionipitoisuudessa samanlaisen hajoamisen sai aikaan lämpökäsittely. Hajotusolosuhteina kokeiltiin myös matalaa ionipitoisuutta, jäädystyssulatuskäsittelyä, matalaa pH:ta, ureaa, guanidiini hydrokloridia sekä SDS ja Triton X-100 –detergenttejä eri konsentraatioissa. Näissä kokeissa proteiineja ei kuitenkaan saatu irrotettua kontrolloidusti liukoiseen muotoon, vaan virus hajosi joko täydellisesti tai vain pieni osa proteiineista irtosi virionista. Triton X-100 häiritsevi proteiinien ajautumista elektroforeesissa, VP4-proteiinin kohdalla liikkui oli iso, väritön epäpuhtaus, joka oli luultavasti Triton X-100:aa (tulosta ei esitetty).

Kokeiltiin myös SDS:n, guanidiini hydrokloridin, urean ja Nonidet P40:n lisäämistä 5-20 % sakkaroosigradiettiin, jotta estettäisiin mahdollinen hajonneiden virusten spontaani uudelleen kokoaminen tai niiden aggregoituminen ja pystyttäisiin pitämään yllä sama hajotusolosuhde myös sentrifugoinnin aikana. HMV1-puskurin korkea suolapitoisuus

vaikeutti kuitenkin kokeiltujen yhdisteiden liukenemista sakkaroosiin; ne aggregoituivat ja estivät gradientin muodostumisen. Alhaisen suolan puskuriin Nonidet P40 ja SDS saatiin liukenemaan. Suuret detergenttipitoisuudet haittasivat kuitenkin proteiinien liikkumista elektroforeesissa ja polyakryyliamidigeelin resoluutio oli huono (tulosta ei esitetty).

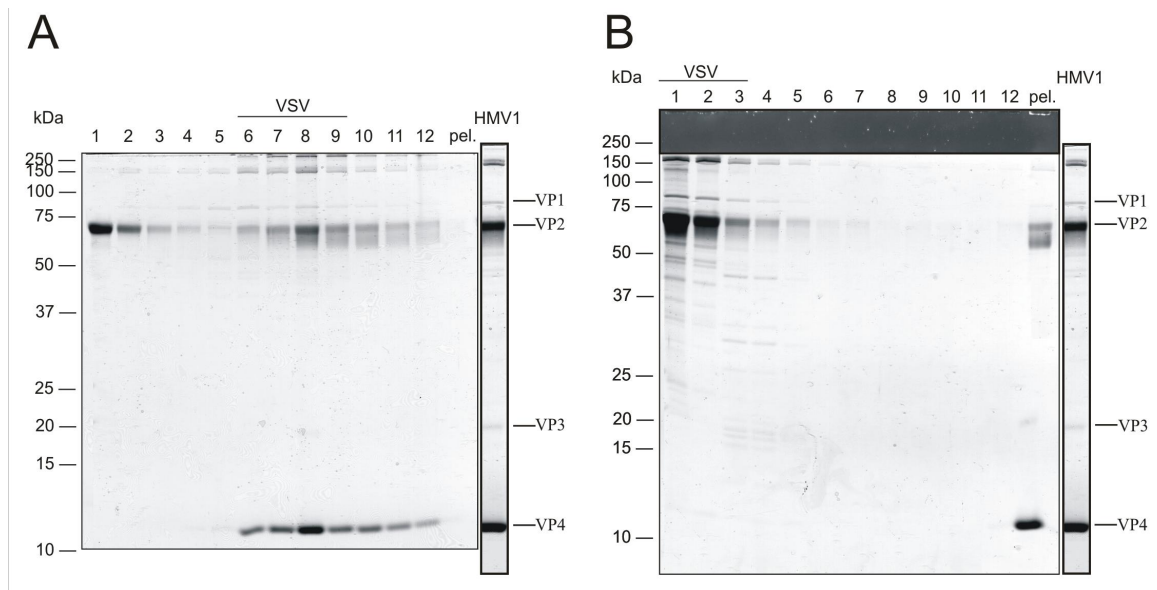


Kuva 3. Valoa siroavan vyöhykkeen sijainti sentrifuugiputkessa eri käsittelyiden jälkeen. 60 °C –hajotus (Beckman SW41Ti; 35 000 rpm, 3 h 40 min, +15 °C) (A). Hajottamaton virus (Sorvall TH641; 30 000 rpm, 2 h 30 min, +15 °C) (B). NP40-käsitelty virus (Sorvall TH641; 30 000 rpm, 2 h 30 min, +15 °C) (C). PI = putken pinta, KK = putken keskikohta, PO = putken pohja, VSV = valoa siroava vyöhyke

9.2.1. Lämpökäsittely irrotti viruspartikkelin pinnasta proteiinin

Ensimmäisissä +60 °C -lämpötilahajotuskokeissa havaittiin, että pieni osa VP2-proteiinista muuttui liukoiseksi ja ajautui sentrifuugiputken yläosaan. Suurin osa VP2-proteiineista oli kuitenkin pinnan ja virionin välisissä fraktioissa, minkä vuoksi ei vielä voitu olla varmoja, oliko virus hajonnut kontrolloidusti. Sentrifugaatioajan pidennys toi toivotun tuloksen, liukoiset proteiinit erottuivat paremmin valoa siroavasta vyöhykkeestä. VP1, osa VP2:sta ja VP4 pysyivät edelleen yhdessä valoa siroavassa vyöhykkeessä (kuva 4A). Valoa siroava vyöhyke sentrifuugiputkessa oli edelleen samassa kohdassa, kuin kontrollissa (kuva 3). Valoa siroavan vyöhykkeen infektiivisyys oli kuitenkin merkittävästi pienempi, kuin käsittelemättömän viruksen (tulosta ei esitetty). Massaspektrometrinen analyysi osoitti, että viruskapsidista irronnut 70 kDa proteiini (VP2) ja kapsidiin kiinni jäänyt molekyylipainoltaan vastaavan kokoinen proteiini olivat identtisiä peptidimassoiltaan.

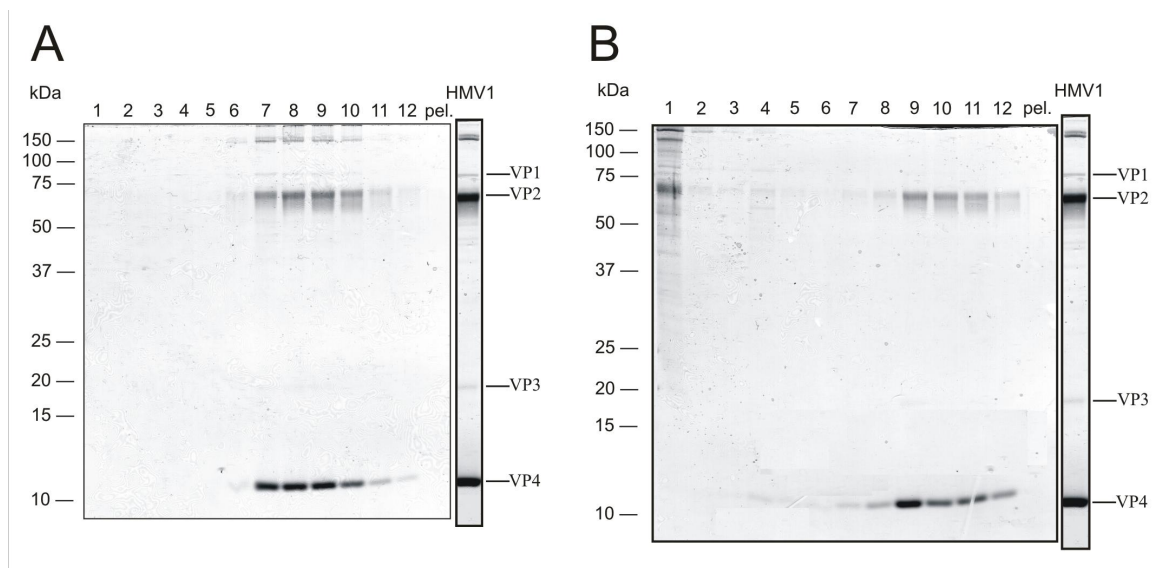
Tämän tiedon perusteella todettiin, että kyseessä on sama proteiini, eikä kaksi samankokoista proteiinia (Nisse Kalkkinen, suullinen tiedonanto).



Kuva 4. HMV1-virionin hajotus ja proteiinien erottelu liikkuvan vyöhykkeen sentrifugaatiolla. Geelikuvien vasemmalla puolella sijaitsevat proteiinistandardien mukaiset molekyylipainot. Oikealla puolella on esitetty HMV1-virionin proteiinit. Sentrifugiputken fraktiot vasemmalta oikealle: (1) pinta, (pel) pelletti. Virukset hajotettu 60 °C lämpökäsittelyllä alhaisen suolan puskurissa ja proteiinit eroteltu pitkällä sentrifugaatiolla (**A**). Virukset hajotettu 0,1 % (V/V) Nonidet P40-käsittelyllä HMV1-puskurissa ja proteiinit eroteltu lyhyellä sentrifugaatiolla (**B**). Geelikuvan yläpuolella on esitetty ylägeeli värjättyinä etidium bromidilla DNA:n sijainnin osoittamiseksi. vsv= valoa siroava vyöhyke

9.2.2. Käsittely NP40-detergentillä aiheutti viruspartikkelin hajoamisen

0,1 % (V/V) Nonidet P40-detergenttikäsittely irrotti VP1- ja VP2-proteiinit liukoisiksi. Samalla VP4-proteiinit, joiden mukana liikkui myös DNA ja pieni määrä VP2:ta, ajautuivat sentrifuugiputken pohjalle. Pieni osa VP2-proteiineista sekä VP3 löytyivät pohjafraktiosta. Liikkuvan vyöhykkeen sentrifugaation jälkeen voitiin havaita, että valoa siroava vyöhyke oli sentrifuugiputken yläosassa (Kuva 4B).



Kuva 5. Konsentroidun, 60 °C lämpökäsitellyn HMV1-virionin hajotus 0,1 % (V/V) Nonidet P40-detergentillä. **(A)** Konsentroituu, 60 °C lämpökäsitelty HMV1-virioni. **(B)** Konsentroituu, 60 °C lämpökäsitelty HMV1-virioni hajotettu 0,1 % (V/V) Nonidet P40-detergentillä. Tiedot esitetty, kuten kuvassa 3.

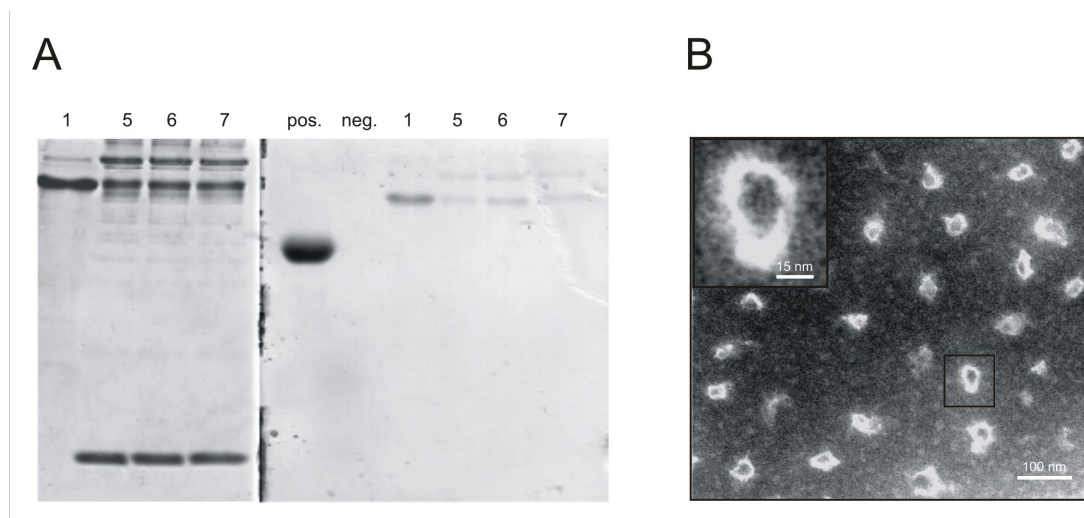
9.2.3. Lämpökäsitellyn viruspartikkelin hajotus NP40-detergentillä teki VP1:n liukoiseksi

Kun +60 °C -hajotuksen valoa siroava vyöhyke kerättiin, konsentroidiin ja sentrifugoitiin liikkuvan vyöhykkeen sentrifugaatiolla sekä analysoitiin trisiini-SDS-PAGEssa, voitiin havaita, että VP1 ja VP4 olivat edelleen valoa siroavassa vyöhykkeessä. Myös osa VP2-proteiineista oli edelleen kiinni virionissa (Kuva 5A). Käsittelemällä lämpötilahajotettu virioni edelleen 0,1 % (V/V) NP40-detergentillä alhaisessa ionipitoisuudessa, saatiin siitä irrotettua VP1-proteiini sekä osa VP2-proteiinista liukoiseen fraktioon. Loput VP2-proteiinista ja VP4-proteiini liikkuivat edelleen yhdessä, valoa siroavaa vyöhykettä ei sentrifuugiputkessa kuitenkaan enää ollut. Tällä kertaa Nonidet P40 -käsittely ei

aiheuttanut VP4:n aggregoitumista sentrifuugiputken pohjalle. VP3-proteiinin sijaintia ei pystytty havaitsemaan (kuva 5B).

9.3. Sokeriproteiininanalyysi

Sokeriproteiininanalyysia varten virukset lämpökäsiteltiin +60 °C:ssa, proteiinit eroteltiin liikkuvan vyöhykkeen sentrifugaatiolla ja tulokset analysoitiin SDS-PAGElla. Sokeriosia sisältävät proteiinit tunnistettiin GelCode® Glycoprotein Staining Kitin avulla. VP1- ja VP2-proteiinien todettiin olevan glykosyloituneita, toisin kuin VP3:n ja VP4:n (kuva 6A).



Kuva 6. HMV1:n sokeriproteiininanalyysi ja läpivalaisuelektronimikroskooppikuva. **(A)** +60 °C-lämpötilahajotettu virioni, josta kerätty fraktiot 1, 5, 6, 7. Fraktioiden proteiinit värjätty ServaBlau R -proteiinivärillä (vasemmalla). Oikealla sokeriproteiinit värjätty perjodihappo-schiff-reaktiolla. pos= positiivinen kontrolli, neg= negatiivinen kontrolli. **(B)** Konsentroidu +60 °C-lämpötilahajotuksen valoa siroava vyöhyke värjätty 1 % kaliumfosfowolframaatilla. Vasemmassa yläkulmassa on esitetty laatikon sisällä oleva yksittäinen virioni suurennettuna. 1:10 laimennos, 25000 kertainen suurennos. Mittajanojen pituudet: 100 nm isossa kuvassa, 15 nm suurennoksessa.

9.4. Lämpöhajotetun HMV1-virionin elektronimikroskopia

+60 °C:ssa hajotetun HMV1-virionin valoa siroava vyöhyke kerättiin ja konsentroidiin läpivalaisuelektronimikroskopointia varten. Näytteistä löydettiin partikkeleita, joiden havaittiin olevan pleomorfisia, kooltaan keskimäärin 40 x 50 nm. Joukossa oli myös hajonneita virioneita (Kuva 6B)

10. Tulosten tarkastelu

10.1. H MV1-virionin rakenne

Pietilä (2007) osoitti, että H MV1-virionin pääasialliset proteiinit ovat VP2 ja VP4. Näiden, ja virionin muiden proteiinien lokalisaation tukimiseksi tehtiin sarja hajotuskokeita, joita edelsivät säilyvyyskokeet.

Säilyvyyskokeiden tulokset osoittivat, että virus kestää hyvin pH:n vaihteluja sekä eri urea-konsentraatioita. Aiempien tutkimusten (Pietilä, M., 2007) perusteella voitiin olettaa, että H MV1-virionilla voisi olla membraani; pleoforminen muoto, kloroformiherkkyys ja partikkelin tiheys viittasivat kaikki membraanin olemassaoloon. Detergenttialtistukset vahvistavat entisestään näitä oletuksia. Detergentit hajottavat lipidikalvoja muodostamalla misellejä yhdessä kalvon lipidimolekyylien kanssa (Garavito, R.M. ja Ferguson-Miller, S., 2001). H MV1-viruksella detergenttikäsittelyt aiheuttavat infektiivisyyden romahtamisen jo pieninä konsentraatioina (Kuva 2A ja B). Detergenttihajotuksista NP40-käsittely oli ainoa, jonka perusteella pystyttiin arviomaan proteiinien sijaintia virionissa. Muut detergentit tekivät kaikki proteiinit liukoisiksi, eikä niiden sijaintia virionissa tällöin pystytty pohtimaan.

NP-40-käsittelyssä havaittiin, että VP4 ajautui gradientin pohjaan. Koska VP4 on kooltaan melko pieni proteiini, voidaan päätellä, että se muodosti jonkinlaisia aggregaatteja (Kuva 4B). VP1 ja VP2 muuttuvat liukoisiksi detergenttikäsittelyssä, tämän perusteella niiden voidaan päätellä olevan kiinni H MV1:n lipidimembraanissa viruksen pinnalla. VP4:n aggregoituminen viittasi siihen, että se ei sijaitse membraanissa.

Lämpötilahajotuksessa ainoa virionista irtoava proteiini on VP2. Pieni osa proteiineista jää kuitenkin edelleen kiinni virioniin. Koska VP1 irtoaa virionista vain detergenttikäsittelyllä, voisi VP1 sijaita tiukemmin lipikalvon sisällä ja VP2 taas enemmän lipidikalvon pinnalla. Lämpötilahajotuksessa virioniin kiinni jäävät VP2-proteiinit ovat luultavasti kiinni VP1-proteiineissa tai tiukemmin kiinni lipidikalvossa, kuin VP1. Toinen vaihtoehto on, että osa VP2 proteiineista on kiinni VP4-proteiineissa, tähän viittaavat detergenttihajotuksen tulokset, jossa osa VP2:sta aggregoituu VP4:n kanssa gradientin pohjalle (Kuva 4B). Tämä hypoteesi täytyy kuitenkin vielä varmistaa massaspektrometrisillä analyyseilla, sillä VP4:n kanssa ajautuva proteiini ei välttämättä ole VP2. Myös yhdistetyssä lämpö- ja

detergenttihajotuksessa osa VP2-proteiineista jää VP4:n yhteyteen, kun samaan aikaan kaikki VP1-proteiinit irtoavat virionista (Kuva 5B).

Glykoproteiinianalyysi osoitti VP1:n ja VP2:n sisältävän sokeriosia (Kuva 6A). Tämä tulos tukee päätelmää, että VP1 ja VP2 ovat membraaniproteiineja, koska usein juuri viruksen pinnan proteiinit ovat glykolysoituneita. Aiemmin tehdyissä tutkimuksissa on havaittu, että viruskapsidin muodostavat proteiinit sisältävät usein sokeriosia (Vigerust, D.J. ja Shepherd, V.L., 2007). Erityisen tarkasti on tutkittu eukaryoottisolujen virusten sokeriproteiineja. Virukset käyttävät isäntäsolun proteiinienmuokkauskoneistoa sokeriosien lisäämiseen. Sokeroitujen proteiinien on havaittu toimivan viruksen adsorptiossa isäntäsoluun, esimerkiksi reseptorin tunnistuksessa ja siihen kiinnittymisessä. Lipidivaipassa kiinni olevien glykoproteiinien koostumusta muuttamalla virukset pystyvät välttelemään immunipuolustusta, mikä on tyypillistä HIV1:lle ja influenssa A-virukselle. Virukset käyttävät sokeriproteiineja myös fuusiossa isäntäsoluun (Vigerust, D.J. ja Shepherd, V.L., 2007).

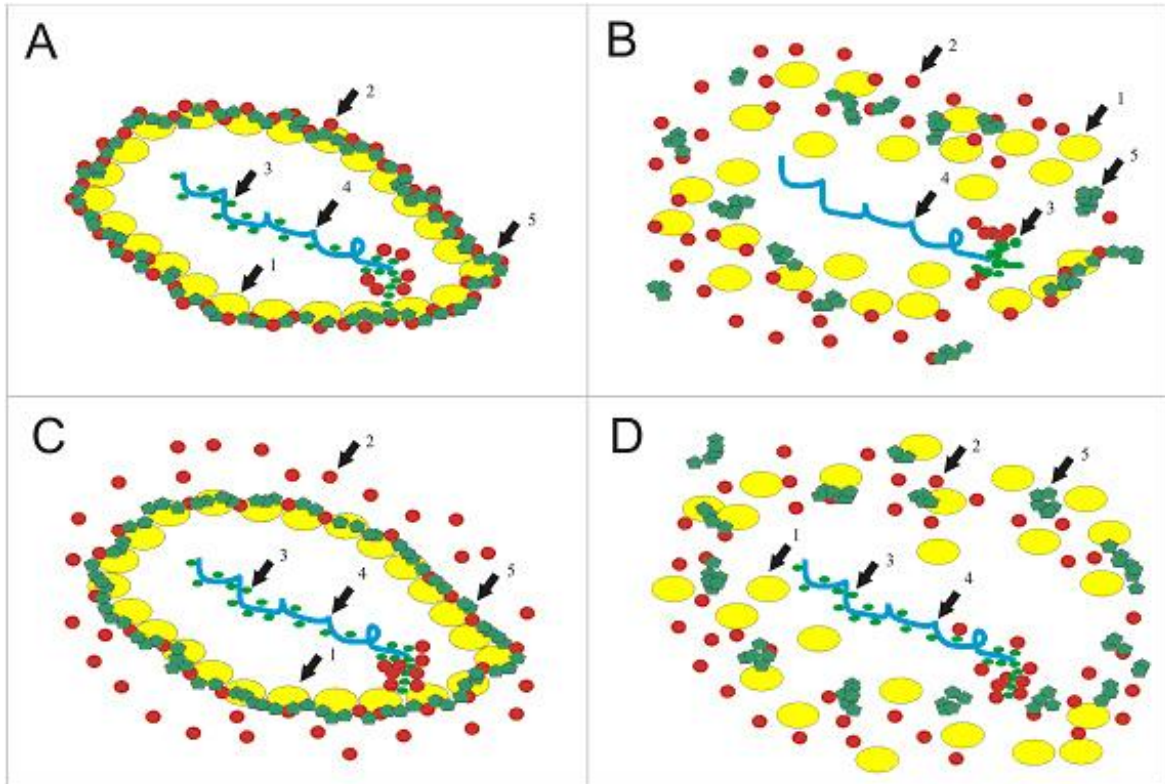
Koska lämpöhajotuksessa osa VP2:sta irtoaa virionista (Kuva 4A) ja säilyvyyskokeessa viruksen infektiivisyys romahtaa +60 °C:n kohdalla (Kuva 2E), voidaan olettaa että VP2 toimii infektion alkuvaiheessa. Usein virukset tunnistavat juuri glykolysoituneiden proteiinien avulla isännän solunpinnan reseptorit (Vigerust, D.J. ja Shepherd, V.L., 2007). Lisäksi konsentroidun 60 °C:n hajotuksen valoa siroavan vyöhykkeen - eli viruksen, josta suurin osa VP2:sta on poistettu – infektiivisyys oli todella pieni (tulosta ei esitetty). Tämä viittaa edelleen siihen, että VP2:lla voisi olla rooli tarttumisessa isäntäsolun pintaan.

Nonidet P40 -käsittelystä saatujen tulosten perusteella voidaan arvioida parhaiten VP4:n sijaintia ja toimintaa HVM1-virionissa. Siinä saatiin selville, että DNA kulkeutuu yhdessä VP4:n kanssa sentrifuugiputken pohjalle. Vaikuttaa siltä, että VP4 voisi olla DNA:han sitoutuva proteiini, joita tarvitaan genomien replikaatiossa ja transkriptiossa.

Virionin morfologian perusteella voidaan arvioida, mitkä proteiinit toimivat adsorptiossa isäntään. Yleisiä infektion alkuvaiheessa toimivia proteiiniirakenteita ovat virionin pinta-olokkeet, eli piikkirakenteet (Boer, R. ym., 2006). Pinta-olokkeiden tutkimuksessa on käytetty butyloitua hydroksitolueenia eli BHT:ta (Wanda, P. ym., 1976). Sen on havaittu vähentävän erityisesti sellaisten virusten infektiivisyyttä, joilla on lipidipitoinen vaippa. BHT ei kuitenkaan toimi detergenttien tavoin: se ei riko viruksen lipidimembraania, vaan

hajottaa proteiini-proteiinisidoksia. Tällaisia sidoksia on muutamissa virusten piikkirakenteissa (Li,T. ym., 1993). Yleensä jo pienet BHT-konsentraatit aikaansaavat infektiivisyyden rajun laskun, jos virionin piikeissä on proteiini-proteiinisidoksia. Säilyvyyskokeiden tulokset osoittavat, että H MV1 ei ole herkkä BHT:lle käytetyissä konsentraatioissa (Kuva 1D). BHT ei siis hajota H MV1:n mahdollisia piikkejä ainakaan näissä olosuhteissa. Tämän tuloksen perusteella voidaan olettaa, että VP1:n ja VP2:n välillä ei ole proteiini-proteiinisidoksia, se, onko jompikumpi piikkiproteiini, selviää lisätutkimuksilla. On myös mahdollista että korkea suolapitoisuus on heikentänyt BHT:n kykyä rikkoa proteiinien välisiä sidoksia. Tulosten varmistamiseksi täytyisi vielä kokeilla korkeampia BHT-pitoisuuksia tai alhaisempaa suolapitoisuutta.

Virionin proteiinesta VP3 oli vaikein tutkittava. Tämä johtuu siitä, että sen määrä viruksessa on pieni. Hajotustutkimuksissa vain Nonidet-detergenttihajotuksessa voitiin havaita VP3:n aggregoituvan sentrifuugiputken pohjalle yhdessä VP4:n kanssa. Muissa hajotustutkimuksissa VP3:a ei havaittu lainkaan. Koska myös osa VP2:sta aggregoituu sentrifuugiputken pohjalle NP40-hajotuksessa, voisi VP3 olla yhteydessä niihin VP2-proteiineihin, joilla on vuorovaikutussuhde VP4-proteiinien kanssa (Kuva 4B). Koska VP3:n määrä H MV1-virionissa on niin pieni, sitä on vaikea havaita muissa hajotustutkimuksissa ilman sen aggregoitumista. Muissa hajotuskokeissa VP3 liikkuu mahdollisesti yhdessä VP4:n kanssa, eli se jakautuu useampaan fraktioon, jolloin sitä on vaikea havaita polyakryyliamidigeeleistä. Viruksen määrää hajotustutkimuksissa pitää lisätä, jotta voidaan paremmin tutkia VP3:n liikkumista erilaisissa olosuhteissa. Vaihtoehtoisesti voidaan kokeilla herkempää proteiinien värjäysmenetelmää, tällainen voisi olla hopeanitraattivärjäys.



Kuva 7. Arvio HMV1-virionin hajoamisesta eri olosuhteissa. Ehjä HMV1-virioni (A). Hajotus Nonidet P40-detergentillä (B), +60 °C lämpökäsittelyllä (C). Konsentroidun +60 °C lämpökäsittelyn virionin hajotus Nonidet P40-detergentillä (D). 1=VP1 2=VP2 3=VP4 4=DNA 5=lipidikalvo

10.2. Yhteenveto

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää uuden, halofiilistä *Halorubrum* sp. –arkkia infektoivan HMV1-viruksen virionin rakenne hajotuskokeiden avulla. Hajotusolosuhteet valittiin säilyvyyskokeiden perusteella, joissa tutkittiin viruksen infektiivisyyden muutoksia. Parhaiksi hajotuskäsittelyiksi osoittautuvat Nonidet P40-detergenttikäsittely, sekä 60 °C-lämpötiläkäsittely. Suoritettujen hajotuskokeiden perusteella tehtiin seuraavat päätelmät: 1) HMV sisältää lipidivaipan 2) VP1 ja VP2 ovat kiinni lipidivaipassa 3) VP2 toimii mahdollisesti adsorptiossa isäntäsoluun 4) VP4 saattaa olla DNA:han sitoutuva proteiini 5) VP1:n ja VP2:n välillä ei ole proteiini-proteiinisidoksia. Hajotusten vaikutuksia HMV1-virioniin on arvioitu kuvassa 7.

10.3. Jatkotutkimukset

Tähän asti tehdyillä tutkimuksilla on pystytty löytämään toimiva puhdistusmenetelmä HMV1:lle, saatu tietoa sen elinkierrosta ja virionin rakenteesta (Pietilä, M., 2007). Tutkittavaa ja oivallettavaa on vielä paljon jäljellä

Jatkotutkimuksista ensiarvoisen tärkeä on genomien sekvensoiminen, jolloin pystytään yhdistämään proteiini sitä koodaavaan geeniin. Näin voidaan selvittää proteiinien tehtävät virionissa.

Tulevaisuuden haasteeksi jää myös viruksen lipidivaipan koostumuksen selvittäminen. Ainakin puhdistetun ja konsentroidun viruksen väri viittaa siihen, että HMPV1 saa lipidivaipansa isännältä - molemmat ovat punaisia. Lipidien analysointimenetelmää HMPV1:lle täytyy vielä parantaa riittävän tarkkojen tuloksien saamiseksi. Lisäksi viruksen elinkierto täytyy selvittää entistä tarkemmin - onko se lyyttinen vai lysogeeninen? Yksi vaihtoehto voisi olla persistentti infektio, mikä on yleinen elinkierron muoto monilla halofiilisiä arkkeja infektoivilla viruksilla (Porter, K. ym., 2007).

Selvitettävää on myös edelleen viruksen proteiinirakenteessa. VP3:n rooli täytyy tutkia tarkemmin. Mielenkiintoista on selvittää, ovatko polyakryyliamidigeleissä esiintyvät isot, 150 kDa:n kokoiset bändit, viruksen proteiineja vai pelkkiä epäpuhtauksia. Massaspektrometriset analyysit, yhdessä genomien sekvensoimisen kanssa tarjoavat ratkaisun tähän ongelmaan. Näiden proteiinkandidaattien tutkimusta helpottavat myös uudet hajotustutkimukset. Lisäksi DNA:n liikkumista ei pystytty selvittämään NP40-hajotusta lukuunottamatta. Jotta voidaan varmistaa, että VP4 todella on DNA:han sitoutuva proteiini, täytyy selvittää, miten DNA liikkuu esimerkiksi lämpötilahajotuksissa.

Vasta näiden tutkimusten jälkeen HMPV1 voi löytää oman paikkansa arkkivirusten maailmasta – maailmasta, jonka tutkimus voi antaa vastauksia useisiin virusten evoluutiota koskeviin kysymyksiin.

11. Lähdeluettelo

- Ackermann, H.-W. 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol.* 152:227-243.
- Ahn, D., S. Kim, J. Rhee, K. PyoKim, J. Pan ja J. Oh. 2006. TTSV1, a new virus-like particle isolated from the hyperthermophilic crenarchaeote *Thermoproteus tenax*. *Virology*,. 351:280-290.
- Anton, J., E. Llobet-Brossa, F. Rodriguez-Valera ja R. Amann. 1999. Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ.Microbiol.* 1:517-523.
- Arnold, H., U. Ziese ja W. Zillig. 2000. SNDV, a Novel Virus of the Extremely Thermophilic and Acidophilic Archaeon *Sulfolobus*. *Virology*,. 272:409-416.
- Auchtung, T., C. Takacs-Vesbach ja C. Cavanaugh. 2006. 16S rRNA Phylogenetic Investigation of the Candidate Division "Korarchaeota". *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5077-5082.
- Baliga, N., R. Bonneau, M. Facciotti, M. Pan, G. Glusman, E. Deutsch, P. Shannon, Y. Chiu, R. Weng, R. Gan, P. Hung, S. Date, E. Marcotte, L. Hood ja W. Ng. 2004. Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: A halophilic archaeon from the Dead Sea. *Genome Res.* 14:2221-2234.
- Bamford, D., J. Grimes ja D. Stuart. 2005. What does structure tell us about virus evolution? *Current Opinion in Structural Biology.* 15:655-663.
- Bath, C., T. Cukalac, K. Porter ja M. Dyall-Smith. 2006. His1 and His2 are distantly related, spindle-shaped haloviruses belonging to the novel virus group, Salterprovirus. *Virology*,. 350:228-239.
- Bettstetter, M., X. Peng, R. Garrett ja D. Prangishvili. 2003. AFV1, a novel virus infecting hyperthermophilic archaea of the genus *acidianus*. *Virology*,. 315:68-79.
- Boer, R., B.Boson, W. Spaan, F.-L. Cosset ja J. Corver. 2006. Important Role for the Transmembrane Domain of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein during Entry. *J. Virol.* 80:1302-1310.
- Bogomolni, R.A., R.A. Baker, R.H. Lozier ja W. Stoeckenius. 1976. Light-driven proton translocations in *Halobacterium halobium*. *Biochim.Biophys.Acta.* 440:68-88.
- Bolhuis, H., E.M.t. Poele ja F. Rodriguez-Valera. 2004. Isolation and cultivation of Walsby's square archaeon. *Environ.Microbiol.* 6:1287-1291.
- Bowman, J., S. McCammon, S. Rea ja T. McMeekin. 2000. The microbial composition of three limnologically disparate hypersaline Antarctic lakes. *FEMS Microbiology Letters.* 183:81-88.
- Brochier, C., P. Forterre ja S. Gribaldo. 2005a. An emerging phylogenetic core of Archaea: phylogenies of transcription and translation machineries converge following addition of new genome sequences. *BMC Evol.Biol.* 5:36.
- Brochier, C., S. Gribaldo, Y. Zivanovic, F. Confalonieri ja P. Forterre. 2005b. Nanoarchaea: representatives of a novel archaeal phylum or a fast-evolving euryarchaeal lineage related to Thermococcales? *Genome Biol.* 6:R42.
- Burns, D., P. Janssen, T. Itoh, M. Kamekura, Z. Li, G. Jensen, F. Rodriguez-Valera, H. Bolhuis ja M. Dyall-Smith. 2007. *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57:387-392.

- Cytryn, E., D. Minz, R. Oremlja ja Y. Cohen. 2000. Distribution and Diversity of Archaea Corresponding to the Limnological Cycle of a Hypersaline Stratified Lake (Solar Lake, Sinai, Egypt). *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3269-3276.
- DeLong, E.F. 2005. Microbial community genomics in the ocean. *Nat Rev Micro.* 3:459-469.
- Dyall-Smith, M., S. Tang ja C. Bath. 2003. Haloarchaeal viruses: how diverse are they? *Research in Microbiology.* 154:309-313.
- Ebel, C., L. Costenaro, M. Pascu, P. Faou, B. Kernel, F. Proust-DeMartin ja G. Zaccai. 2002. Solvent Interactions of Halophilic Malate Dehydrogenase. *Biochemistry.* 41:13234-13244.
- Feng, J., P. Zhou ja S. Liu. 2004. Halorubrum xinjiangense sp. nov., a novel halophile isolated from saline lakes in China. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54:1789-1791.
- Feng, J., P. Zhou, Y. Zhou, S. Liu ja K. Warren-Rhodes. 2005. Halorubrum alkaliphilum sp. nov., a novel haloalkaliphile isolated from a soda lake in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55:149-152.
- Ferris, J.M. ja H.R. Burton. 1988. The annual cycle of heat content and mechanical stability of hypersaline Deep Lake, Vestfold Hills, Antarctica. *Hydrobiologia.* 165:115-128.
- Forterre, P., C. Brochier ja H. Philippe. 2002. Evolution of the Archaea. *Theoretical Population Biology.* 61:409-422.
- Galand, P.E., H. Fritze, R. Conrad ja K. Yrjala. 2005. Pathways for Methanogenesis and Diversity of Methanogenic Archaea in Three Boreal Peatland Ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2195-2198.
- Garavito, R.M. ja S. Ferguson-Miller. 2001. Detergents as Tools in Membrane Biochemistry. *J. Biol. Chem.* 276:32403-32406.
- Geslin, C., M. LeRomancer, G. Erauso, M. Gaillard, G. Perrot ja D. Prieur. 2003. PAV1, the First Virus-Like Particle Isolated from a Hyperthermophilic Euryarchaeote, "Pyrococcus abyssi". *J. Bacteriol.* 185:3888-3894.
- Grant, S., W.D. Grant, B.E. Jones, C. Kato ja L. Li. 1999. Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern. *Extremophiles.* 3:139-145.
- Gribaldo, S. ja C. Brochier-Armanet. 2006. The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 361:1007-1022.
- Hartmann, R., H.D. Sickinger ja D. Oesterhelt. 1980. Anaerobic growth of halobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:3821-3825.
- Häring, M., X. Peng, K. Brügger, R. Rachel, K. Stetter, R. Garrett ja D. Prangishvili. 2004. Morphology and genome organization of the virus PSV of the hyperthermophilic archaeal genera Pyrobaculum and Thermoproteus: a novel virus family, the Globuloviridae. *Virology.* 323:233-242.
- Häring, M., R. Rachel, X. Peng, R. Garrett ja D. Prangishvili. 2005a. 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. *J. Virol.* 79:9904-9911.
- Häring, M., G. Vestergaard, K. Brugger, R. Rachel, R. Garrett ja D. Prangishvili. 2005b. Structure and Genome Organization of AFV2, a Novel Archaeal Lipothrixvirus with Unusual Terminal and Core Structures. *J. Bacteriol.* 187:3855-3858.
- Kamekura, M. ja M. Kates. 1999. Structural diversity of membrane lipids in members of Halobacteriaceae. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:969-972.

- Kandler, O. ja H. König. 1998. Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 54:305-308.
- Keough, B.P., T.M. Schmidt ja R.E. Hicks. 2003. Archaeal Nucleic Acids in Picoplankton from Great Lakes on Three Continents. *Microb.Ecol.* 46:238-248.
- Kivelä, H., N. Kalkkinen ja D. Bamford. 2002. Bacteriophage PM2 Has a Protein Capsid Surrounding a Spherical Proteinaceous Lipid Core. *J. Virol.* 76:8169-8178.
- Kivelä, H., E. Roine, P. Kukkaro, S. Laurinavičius, P. Somerharju ja D. Bamford. 2006. Quantitative dissociation of archaeal virus SH1 reveals distinct capsid proteins and a lipid core. *Virology*, 356:4-11.
- Klein, R., U. Baranyi, N. Rossler, B. Greineder, H. Scholz ja A. Witte. 2002. Natrialba magadii virus phiCh1: first complete nucleotide sequence and functional organization of a virus infecting a haloalkaliphilic archaeon. *Mol.Microbiol.* 45:851-863.
- Knittel, K., T. Losekann, A. Boetius, R. Kort ja R. Amann. 2005. Diversity and Distribution of Methanotrophic Archaea at Cold Seeps. *Appl.Environ.Microbiol.* 71:467-479.
- Koga, Y., M. Nishihara, H. Morii ja M. Akagawa-Matsushita. 1993. Ether polar lipids of methanogenic bacteria: structures, comparative aspects, and biosyntheses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 57:164-182.
- Lai, M. ja R. Gunsalus. 1992. Glycine betaine and potassium ion are the major compatible solutes in the extremely halophilic methanogen Methanohalophilus strain Z7302. *J. Bacteriol.* 174:7474-7477.
- Lepp, P.W., M.M. Brinig, C.C. Ouverney, K. Palm, G.C. Armitage ja D.A. Relman. 2004. Methanogenic Archaea and human periodontal disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101:6176-6181.
- Li, T., D.H. Bamford, J.K.H. Bamford ja G.J. Thomas. 1993. Structural Studies of the Enveloped dsRNA Bacteriophage θ of *Pseudomonas syringae* by Raman Spectroscopy : I. The Virion and Its Membrane Envelope. *Journal of Molecular Biology*. 230:461-472.
- Martin, A., S. Yeats, D. Janekovic, W.D. Reiter, W. Aicher ja W. Zillig. 1984. SAV 1, a temperate u.v.-inducible DNA virus-like particle from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius* isolate B12. *EMBO J.* 3:2165-2168.
- McGenity, T.J. ja Grant, W.D. 1995. Transfer of *Halobacterium saccharovororum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC 34021 and *Halobacterium lacusprofundi* to the genus *Halorubrum* gen. nov., as *Halorubrum saccharovororum* comb. nov., *Halorubrum sodomense* comb. nov., *Halorubrum trapanicum* comb. nov., and *Halorubrum lacusprofundi* comb. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 18: 237-243.
- Michaelis, W., R. Seifert, K. Nauhaus, T. Treude, V. Thiel, M. Blumenberg, K. Knittel, A. Gieseke, K. Peterknecht, T. Pape, A. Boetius, R. Amann, B. Jorgensen, F. Widdel, J. Peckmann, N. Pimenov ja M. Gulin. 2002. Microbial Reefs in the Black Sea Fueled by Anaerobic Oxidation of Methane. *Science*. 297:1013-1015.
- Möller, V. ja A. Oren. 2003. Metabolism of chloride in halophilic prokaryotes. *Extremophiles*. 7:261-266.
- Ng, W., S. Kennedy, G. Mahairas, B. Berquist, M. Pan, H. Shukla, S. Lasky, N. Baliga, V. Thorsson, J. Sbrogna, S. Swartzell, D. Weir, J. Hall, T. Dahl, R. Welti, Y. Goo, B. Leithauser, K. Keller, R. Cruz, M. Danson, D. Hough, D. Maddocks, P. Jablonski, M. Krebs, C. Angevine, H. Dale, T. Isenbarger, R. Peck, M. Pohlschroder, J. Spudich, K. Jung, M. Alam, T. Freitas, S. Hou, C. Daniels, P. Dennis, A. Omer, H. Ebhardt, T. Lowe, P. Liang, M. Riley, L. Hood ja S. DasSarma. 2000. From the Cover: Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97:12176-12181.
- Nuttall, S. ja M. Dyal-Smith. 1993. HF1 and HF2: Novel Bacteriophages of Halophilic Archaea. *Virology*. 197:678-684.

- Ochsenreiter, T., F. Pfeifer ja C. Schleper. 2002. Diversity of Archaea in hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies. *Extremophiles*. 6:267-274.
- Ochsenreiter, T., D. Selezi, A. Quaiser, L. Bonch-Osmolovskaya ja C. Schleper. 2003. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environ.Microbiol.* 5:787-797.
- Oesterhelt, D. ja W. Stoeckenius. 1973. Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 70:2853-2857.
- Oren, A., G. Bratbak ja M. Heldal. 1997. Occurrence of virus-like particles in the Dead Sea. *Extremophiles*. 1:143-149.
- Oren, A. 1999. Microbiological studies in the Dead Sea: future challenges toward the understanding of life at the limit of salt concentrations. *Hydrobiologia*. 405:1-9.
- Oren, A. 2002. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol.Ecol.* 39:1-7.
- Oren, A., M. Heldal, S. Norland ja E. Galinski. 2002. Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles*. 6:491-498.
- Oren, A. ja L. Mana. 2002. Amino acid composition of bulk protein and salt relationships of selected enzymes of *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic bacterium. *Extremophiles*. 6:217-223.
- Pedros-Alio, C., J.I. Calderon-Paz, M.H. MacLean, G. Medina, C. Marrase, J.M. Gasol ja N. Guixa-Boixereu. 2000. The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiol.Ecol.* 32:143-155.
- Pfister, P., A. Wasserfallen, R. Stettler ja T. Leisinger. 1998. Molecular analysis of *Methanobacterium* phage PsiM2. *Mol.Microbiol.* 30:233-244.
- Pietilä, M. 2007. Uuden halofiilisen HMV1-arkkiviruksen puhdistaminen ja karakterisoiminen. Pro gradu – tutkielma.
- Porter, K., P. Kukkaro, J.H. Bamford, C. Bath, H. Kivelä, M. Dyll-Smith ja D. Bamford. 2005. SH1: A novel, spherical halovirus isolated from an Australian hypersaline lake. *Virology*,. 335:22-33.
- Porter, K., B. Russ ja M. Dyll-Smith. 2007. Virus–host interactions in salt lakes. *Current Opinion in Microbiology*,. 10:418-424.
- Prangishvili, D., H. Arnold, D. Gotz, U. Ziese, I. Holz, J. Kristjansson ja W. Zillig. 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. ja R. Garrett. 2005. Viruses of hyperthermophilic Crenarchaea. *Trends in Microbiology*,. 13:535-542.
- Prangishvili, D., P. Forterre ja R.A. Garrett. 2006a. Viruses of the Archaea: a unifying view. *Nat Rev Micro*. 4:837-848.
- Prangishvili, D., R. Garrett ja E. Koonin. 2006b. Evolutionary genomics of archaeal viruses: Unique viral genomes in the third domain of life. *Virus Research*. 117:52-67.
- Prangishvili, D., G. Vestergaard, M. Häring, R. Aramayo, T. Basta, R. Rachel ja R. Garrett. 2006c. 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.

- Rachel, R., M. Bettstetter, B.P. Hedlund, M. Håring, A. Kessler, K.O. Stetter ja D. Prangishvili. 2002. Remarkable morphological diversity of viruses and virus-like particles in hot terrestrial environments. *Arch.Virol.* 147:2419-2429.
- Rice, G., K. Stedman, J. Snyder, B. Wiedenheft, D. Willits, S. Brumfield, T. McDermott ja M. Young. 2001. Viruses from extreme thermal environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 98:13341-13345.
- Rice, G., L. Tang, K. Stedman, F. Roberto, J. Spuhler, E. Gillitzer, J. Johnson, T. Douglas ja M. Young. 2004. From The Cover: The structure of a thermophilic archaeal virus shows a double-stranded DNA viral capsid type that spans all domains of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 101:7716-7720.
- Schafer, G., M. Engelhard ja V. Muller. 1999. Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:570-620.
- Schnabel, H., W. Zillig, M. Pfaffle, R. Schnabel, H. Michel ja H. Delius. 1982. Halobacterium halobium phage oH. *EMBO J.* 1:87-92.
- Schnabel, H. 1984. An Immune Strain of Halobacterium halobium Carries the Invertible L Segment of Phage Phi H as a Plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 81:1017-1020.
- Schobert, B. ja J. Lanyi. 1982. Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J. Biol. Chem.* 257:10306-10313.
- Schägger, H. ja G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry.* 166:368-379.
- Shahmohammadi, H.R., E. Asgarani, H. Terato, T. Saito, Y. Ohyama, K. Gekko, O. Yamamoto ja H. Ide. 1998. Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of Halobacterium salinarium against DNA-damaging agents. *J.Radiat.Res.(Tokyo).* 39:251-262.
- Shen, Y., R. Buick ja D.E. Canfield. 2001. Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archaean era. *Nature.* 410:77-81.
- Simon, H.M., J.A. Dodsworth ja R.M. Goodman. 2000. Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. *Environ.Microbiol.* 2:495-505.
- Spudich, J.L. 1998. Variations on a molecular switch: transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins. *Mol.Microbiol.* 28:1051-1058.
- Spudich, J. ja H. Luecke. 2002. Sensory rhodopsin II: functional insights from structure. *Current Opinion in Structural Biology.* 12:540-546.
- Stedman, K., Q. She, H. Phan, H. Arnold, I. Holz, R. Garrett ja W. Zillig. 2003. Relationships between fuselloviruses infecting the extremely thermophilic archaeon Sulfolobus: SSV1 and SSV2. *Research in Microbiology.* 154:295-302.
- Tang, S., S. Nuttall ja M. Dyal-Smith. 2004. Haloviruses HF1 and HF2: Evidence for a Recent and Large Recombination Event. *J. Bacteriol.* 186:2810-2817.
- Tenchov, B., E. Vescio, G.D. Sprott, M. Zeidel ja J. Mathai. 2006. Salt Tolerance of Archaeal Extremely Halophilic Lipid Membranes. *J. Biol. Chem.* 281:10016-10023.
- Torsvik, T. ja I.D. Dundas. 1974. Bacteriophage of Halobacterium salinarium. *Nature.* 248:680-681.
- Valentine, D.L. 2007. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nat Rev Micro.* 5:316-323.

- Validaatiolista numero 85. Validation list no.85: Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52:685-690.
- van de Vossenbergh, J.L., A.J. Driessen, W.D. Grant ja W.N. Konings. 1999. Lipid membranes from halophilic and alkali-halophilic Archaea have a low H⁺ and Na⁺ permeability at high salt concentration. *Extremophiles.* 3:253-257.
- Vestergaard, G., M. Häring, X. Peng, R. Rachel, R. Garrett ja D. Prangishvili. 2005. A novel rudivirus, ARV1, of the hyperthermophilic archaeal genus Acidianus. *Virology.* 336:83-92.
- Vigerust, D. J. ja V.L. Shepherd. 2007. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends In Microbiology.* 15:211-218.
- Vreeland, R.H., Piselli Jr., A. F., S. McDonnough ja S.S. Meyers. 1998. Distribution and diversity of halophilic bacteria in a subsurface salt formation. *Extremophiles.* 2:321-331.
- Walsby, A.E. 1980. A square bacterium. *Nature.* 283:69-71.
- Wanda, P., J. Cupp, W. Snipes, A. Deith, T. Rucinsky, L. Polish ja J. Sands. 1976. Inactivation of the enveloped bacteriophage phi6 by butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole. *Antimicrob.Agents Chemother.* 10:96-101.
- Witte, A., U. Baranyi, R. Klein, M. Sulzner, C. Luo, G. Wanner, D.H. Kruger ja W. Lubitz. 1997. Characterization of Natronobacterium magadii phage PhiCh1, a unique archaeal phage containing DNA and RNA. *Mol.Microbiol.* 23:603-616.
- Woese, C.R. ja G.E. Fox. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74:5088-5090.
- Wood, A., W. Whitman ja J. Konisky. 1989. Isolation and characterization of an archaeobacterial viruslike particle from Methanococcus voltae A3. *J. Bacteriol.* 171:93-98.

12. Liitteet

12.1. Liite 1. Kasvatusalustat ja puskurit

Liuosten ja kasvatusalustojen valmistusohjeet perustuvat The Halohandbook 2006:ssa esitettyihin ohjeisiin. (The HaloHandBook: [http://www.microbiol.unimelb.edu.au/people/dyall smith/HaloHandBook/](http://www.microbiol.unimelb.edu.au/people/dyall%20smith/HaloHandBook/))

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

	<u>1 litra</u>
peptoni (OXOID)	5 g
hiivauute (Bacto)	1 g
30 % (w/V) suolavesi, pH 7,2	768 ml (tehty kraanaveteen)

Liuota magneettisekoituksessa. Täytä tilavuus kylmällä kraanavedellä. Autoklavoi sokeriohjelmalla (15lb, 30 min)

18 % MGM-pehmytagar, pH 7,2

	<u>1 litra</u>
peptoni (OXOID)	5 g
hiivauute (Bacto)	1 g
agar (Bacto)	4 g
30 % suolavesi, pH 7,2	600 ml (tehty kraanaveteen)
kraanavettä	400 ml

Mittaa aineet kattilaan ja keitä, kunnes agar sulaa. Autoklavoi sokeriohjelmalla.

20 % MGM-maljat (pH 7,2)

	<u>1 litra</u>
peptoni (OXOID)	5 g
hiivauute (Bacto)	1 g
agar (Bacto)	14 g
20 % suolavesi, pH 7,2	666 ml (tehty kraanaveteen)
kraanavettä	334 ml

Mittaa aineet kattilaan ja keitä, kunnes agar sulaa. Autoklavoi sokeriohjelmalla.

30 % suolavesi MGM-alustojen valmistukseen**1. Punnitse**

	<u>1 litra</u>
NaCl	240 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	30 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	35 g
KCl	7 g
1 M Tris-HCl, pH 7,2	80 ml

2. Liuota kylmään kraanaveteen magneettisekoituksessa.

3. Lisää CaCl₂ steriilistä 1 M CaCl₂-liuoksesta

	<u>1 litra</u>
1 M CaCl ₂	5 ml

4. Täytä tilavuus kylmällä kraanavedellä.

5. Säilytä +4 °C:ssa.

30 % suolavesi puskureiden valmistukseen**1. Punnitse**

	<u>1 litra</u>
NaCl	240 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	30 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	35 g
KCl	7 g
1 M Tris-HCl, pH 7,2	80 ml

2. Liuota steriiliin milliQ-veteen magneettisekoituksessa.

3. Lisää CaCl₂ steriilistä 1 M CaCl₂-liuoksesta.

	<u>1 litra</u>
1 M CaCl ₂	5 ml

4. Täytä tilavuus steriilillä milliQ-vedellä.

5. Suodata 0,2 µm suodattimen läpi.

6. Säilytä +4 °C:ssa.

HMV1-puskuri

	<u>1 litra</u>
5 M NaCl	300 ml
1 M MgCl ₂	100 ml
1 M CaCl ₂	1 ml
1 M Tris-HCl, pH 7,5	20 ml

Täytä tilavuus steriilillä milliQ-vedellä.

Alhaisen suolan puskuri

	<u>1 litra</u>
5 M NaCl	10 ml
1 M MgCl ₂	100 ml
1 M CaCl ₂	1 ml
1 M Tris-HCl, pH 7,5	20 ml

Täytä tilavuus steriilillä milliQ-vedellä.

Sakkarosiliuokset HMV1-puskurissa

	<u>1 litra</u>
5 M NaCl	300 ml
1 M MgCl ₂	100 ml
1 M CaCl ₂	1 ml
1 M Tris-HCl, pH 7,5	20 ml
sakkarosi	50 g (5 % sakkarosi) tai 200 g (20 %)

Täytä tilavuus steriilillä milliQ-vedellä

Sakkarosiliuokset alhaisen suolan puskurissa

	<u>1 litra</u>
5 M NaCl	10 ml
1 M MgCl ₂	100 ml
1 M CaCl ₂	1 ml
1 M Tris-HCl, pH 7,5	20 ml
sakkarosi	50 g (5 % sakkarosi) tai 200 g (20 %)

Täytä tilavuus steriilillä milliQ-vedellä

12.2. Liite 2. Proteiinigeelielektroforeesi

14 % trisiini-SDS-PAGE

<u>Yhteen geeliin</u> (~15×17 cm)	14 % erotusgeeli	5 % ylägeeli
AB ^a	16,3 ml	1,7 ml
Glyseroli	4,6 g	-
Geelipuskuri	11,6 ml	2,5 ml
Vesi	4,5 ml	5,8 ml
TEMED ^b	12 µl	12 µl
10 % APS ^c	117 µl	100 µl

^a AB; akryyliamidi-monomeeriseos (30 % (w/V) akryyliamidi ja 0,8 % (w/V) bisakryyliamidi)

^b TEMED; N,N,N',N'-tetrametyylietyleeniamiini

^c APS; ammoniumpersulfaatti

<u>Geelipuskuri (pH 8,45)</u>	<u>Anodipuskuri (pH 8,9)</u>	<u>Katodipuskuri</u>
3 M Tris-base	0,2 M Tris-base	0,1 M Tris-base
0,3 % SDS		0,1 M Trisiini
		0,1 % SDS
<u>3 × näytepuskuri</u>		
ylempi geelipuskuri	10 ml	ylempi geelipuskuri:
10 % SDS	10 ml	30 g Tris-base
0,5 M EDTA ^d (pH 7,5)	0,4 ml	30 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O
β-merkaptetanoli	1 ml	täydennä tilavuus 500 ml milliQ
87 % glyseroli	10 ml	vedellä
bromifenolisininen	10 mg	

^d EDTA; etyleenidiamiinitetraetikkahappo

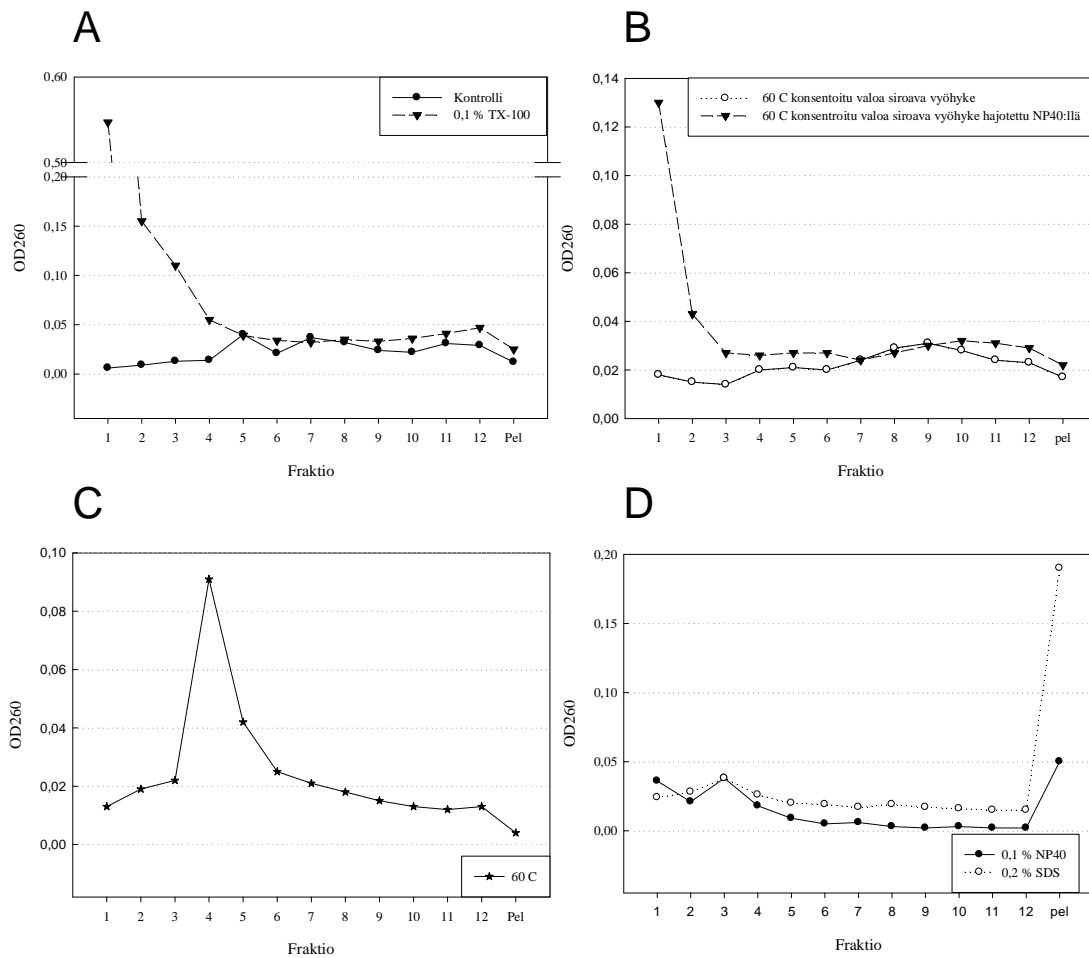
Serva Blau R –proteiiniväri

0,04 % (w/V) Serva Blau R

25 % (V/V) isopropanoli

10 % (V/V) etikkahappo

12.3. Liite 3. Hajotusten fraktioiden proteiinipitoisuudet



Kuva 8. Hajotusten fraktioiden absorbanssit mitattu 260 nm allonpituudella. Virionit hajotettu TX-100:lla HMV1-puskurissa (**A**). Konsentroidun, valo siroavan vyöhykkeen fraktioiden proteiinipitoisuudet alhaisen suolan puskurissa ja konsentroidu, valo siroava vyöhyke hajotettu NP40:llä alhaisen suolan puskurissa (**B**). Virionit hajotettu 60 °C:ssa alhaisen suolan puskurissa (**C**) sekä NP40-detergentillä ja SDS:llä HMV1-puskurissa (**D**).

12.4. Liite 4. Gradienttisekoittajan asetukset

Roottori	Aika (min)	Kulma (°)	Nopeus (rpm)
SW41			
Alhaisen suolan puskuri	2,25	81,5	15
HMV1-puskuri	3	81,5	14
SW50.1			
Alhaisen suolan puskuri	2,60	86,5	25
HMV1-puskuri	0,47	77,5	15