

TEKNIikka JA LIIKENNE

Laboratorioala

OPINNÄYTETYÖ

**SEMLIKI FOREST -VIRUKSEN NSP3-PROTEIINIMUTANTTIEN
KLOONAUS JA TUTKIMINEN**

Työn tekijä: Antti Ahde
Työn ohjaajat: Arja Miettinen-Oinonen
Maarit Neuvonen

Työ hyväksytty: ____ . ____ . 2010

Arja Miettinen-Oinonen
yliopettaja

TIIVISTELMÄ

Työn tekijä: Antti Ahde

Työn nimi: Semliki Forest -viruksen nsP3-proteiinimutanttien kloonaukset ja tutkiminen

Päivämäärä: 20.11.2010

Sivumäärä: 31 s. + 1 liite

Koulutusohjelma: Laboratorioala

Työn ohjaaja: yliopettaja Arja Miettinen-Oinonen

Työn ohjaaja: Jatko-opiskelija Maarit Neuvonen

Tämä työ tehtiin Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutissa Tero Aholan ryhmässä, joka tutkii RNA-virusten replikaatiota ja replikaation inhibitiota. Ryhmän tutkimuskohteena on pääasiassa Semliki Forest -virus, joka on alfavirus. Tässä työssä tutkittiin Semliki Forest -viruksen kolmannen ei-rakenteellisen proteiinin (nsP3) ja amfifysiini II:n kolokalisaatiota sekä sitä, mikä osa nsP3:sta tarvitaan viruksen endosomitargetointiin.

nsP3:ssa on runsaasti proliineja sisältävä alue, jonka on todettu immunosaostus-kokeella sitovan amfifysiini II:ta. nsP3:n on havaittu vuorovaikuttavan replikaatiossa tarvittavien isäntäsolun proteiinien kanssa ja osallistuvan replikaatiokompleksin ohjaamiseen solukalvolta endosomiin.

Proliinialueen poistaminen estää sitoutumisen, mutta edelleen amfifysiini II kolokalisoi osittain virusmutantin replikaatiokompleksin kanssa. Tämän takia tutkittiin, aiheuttaako jokin muu nsP3 sitoutumisen. Proliinialue poistettiin sekvensseistä P1'2'3, P13 ja nsP3. P1'2'3 ja P13 ovat keinotekoisia rakenteita, eivätkä ne pysty hajoamaan yksittäisiksi nsP3:iksi. nsP3:n ja amfifysiini II:n kolokalisaatiota tutkitaan immunofluoresenssimenetelmällä.

Replikaatiokompleksin siirtyminen solukalvolta endosomiin pystytään estämään poistamalla nsP3:sta voimakkaasti fosforoitunut 50 aminohapon jakso, pistemutaatioilla vaikutus ei ole sama. Endosomitargetointi ei siis riipu pelkästään fosforyloinnista. Tämän tutkimiseksi tehtiin viisi nsP3 deleetiorakennetta, joista poistettiin aminohapot: 318 - 368, 359 - 452, 359 - 366, 0 - 318 ja 0 - 368. Deleetiot tehtiin P13- konstruktiin käänteis-polymeraasiketjureaktiolla, jota ekspressoitiin soluissa. Deleetioiden lokalisaatiot tarkasteltiin immunofluoresenssimenetelmällä.

Immunofluoresenssimenetelmällä havaittiin, että nsP3 on vastuussa amfifysiini II:n sitoutumisesta yksinään. nsP3-deleetioiden perustella näyttäisi siltä, että 318 - 368 jälkeinen alue riittäisi endosomitargetointiin, mutta P13-villityyppi ei ekspressoitunut hyvin, joten tuloksia ei voi pitää luotettavina.

Avainsanat: Käänteis-PCR, nsP, replikaatiokompleksi, Semliki Forest -virus

ABSTRACT

Name: Antti Ahde	
Title: Cloning and studying of Semliki Forest virus nsP3-protein mutations	
Date: 20.11.2010	Number of pages: 31 + 1 appendix
Department: Laboratory Sciences	
Instructor: Arja Miettinen-Oinonen Ph. D.	
Supervisor: Maarit Neuvonen, graduate student	
<p>This graduate study was carried out at the Institute of Biotechnology in Tero Ahola's group that studies RNA virus replication and its inhibition. Semliki Forest virus is an alphavirus and it has four non-structural proteins (nsPs) like all the alphaviruses. This study concentrates on nsP3 and contains two parts.</p> <p>In the first part the colocalization of nsP3 and with amphiphysin II was studied. nsP 3 has a region which contains several prolines. In immune precipitation experiment it turned out that the proline region binds amphiphysin II. If the proline region is removed from the protein, the interaction between nsP3 and amphiphysin II is lost. However, amphiphysin II colocalizes weakly also with replication complexes of mutant virus with deleted proline region. One goal of this study was to find out if nsP1 or nsP2 cause this partial colocalization. To study this question, the proline region was removed from P1'2'3, P13 and nsP3. P1'2'3 and P13 are artificial constructs, which can not be cleaved to nsP 1-3. The proteins were expressed in cell culture and visualized with immunofluorescence method.</p> <p>The Second part of this study deals with endosome targeting of the Semliki Forest virus replication complex. Normally replication complex of Semliki Forest virus moves from plasma membrane to endosomes but if a sequence of 50 highly phosphorylated amino acids from C-terminus of nsP3 is removed, the replication complex stays on plasma membrane. However, the effect is not the same with point mutations that abolish the phosphorylation, so it seems that the endosome targeting does not completely depend on phosphorylation. To investigate this phenomenon, five different deletion constructions were made. The following amino acids were removed from the C-terminus of nsP3: 318 - 368, 359 - 452, 359 - 366, 0 - 318 and 0 - 368. The deletions were made with an inverse polymerase chain reaction to P13 (nsP1 + nsP3) plasmid. P13 plasmid without mutations should move from plasma membrane to endosomes. nsP 1 is responsible for the membrane binding of the replication complex. These deletion constructs were expressed in cell culture and visualized with immunofluorescence method.</p> <p>In this graduate study it was observed with immunofluorescence that nsP3 is the only nsP which binds amphiphysin II. With the deletion constructions it seemed that the region after 318 – 368 would be sufficient for endosome targeting, but the localization of wild type P13 did not follow the expected pattern. Therefore, the results can be considered unreliable.</p>	
Keywords: Inverse PCR, nsP, replication complex	

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

LYHENTEITÄ

1	JOHDANTO	1
2	KIRJALLISUUSKATSAUS	2
2.1	Virukset	2
2.2	Alfavirukset	3
2.3	Semliki Forest -virus	3
2.3.1	<i>Replikaatiosykli</i>	3
2.3.2	<i>Konservoituneet sekvenssielementit (CSE)</i>	5
2.3.3	<i>nsP1</i>	6
2.3.4	<i>nsP2</i>	6
2.3.5	<i>nsP3</i>	7
2.3.6	<i>nsP4</i>	7
2.4	Fluoresenssimikroskopia	7
2.5	Transfektio	8
3	TYÖN TAVOITTEET	9
4	MATERIAALIT JA METODIT	10
4.1	nsP3 ΔProliinin -kloonauk	10
4.2	Nsp3:n C-terminuksen deleetioiden kloonauk 4TO_P13 -plasmidiin	12
4.3	Epäsuoravasta-ainevärjäys ja transfektion optimointi	14
5	TULOKSET	16
5.1	ΔProliini-kloonauksen tulokset	16
5.2	Nsp3 C-terminuksen deleetioiden kloonauksen tulokset	18
5.3	ΔProliinin fluoresenssimikroskooppitulokset	19
5.4	Nsp3:n C-terminuksen deleetioiden konfokaalikuvat	23
6	PÄÄTELMÄT	27
	VIITELUETTELO	29
LIITE	SEKVENSSIRINNASTUKSET	—

LYHENTEITÄ

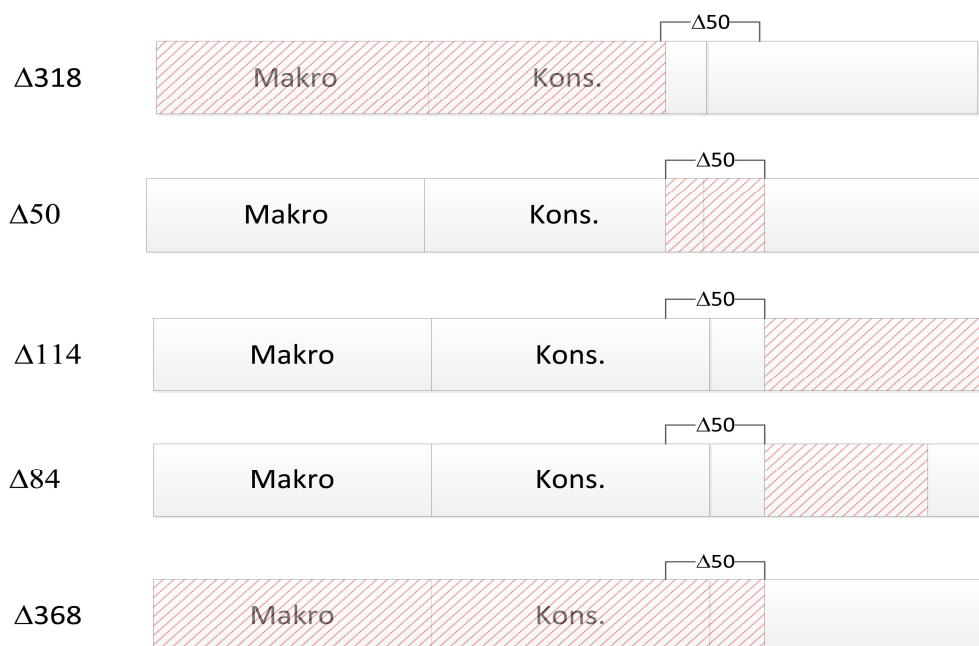
AdoMet	S-adenosyyli-metioniini
ah	Aminohappo
amp	ampisilliini (ampicillin)
bp	emäspari
CPV I	tyypin I sytopaattinen vakulli (cytopathic vacuole)
CSE	konservoitunut sekvenssielementti (conserved sequence element)
DEAE	dietyyliaminoetyli selluloosa (diethylaminoethyl cellulose)
DMSO	dimetyylisulfoksidi
gp	marsu (guine pig)
GTP	guanyylitriposfaatti
kb	kiloemäs
LB-Medium	10 g tryptonia, 5 g hiiva uutetta, 5 g NaCl, ad. 1000 ml H ₂ O
MD	makro domeeni (macro domein)
NEB	New England Biolabs
nsP	ei-rakenteellinen proteiini (non-structural protein)
PBS	8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,4 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 0,2 g KH ₂ PO ₄
PCR	polymeraasiketjureaktio (polymerase chain reaction)
R	kani (rabbit)
SAP	simpukan alkaalinen fosfataasi (shrimp alkaline phosphatase)
SFV	Semliki Forest -virus
SIN	Sindbis

1 JOHDANTO

Semliki Forest -virus (SFV) on alfavirus, jolla on neljä ei-rakenteellista proteiinia (nsP1-4). Tässä työssä tutkittiin SFV:n nsP3:n toimintaa. Työ on kaksiosainen. Ensimmäisessä osassa tutkittiin nsP3:n ja amfifysiini II:n kolokalisaatiota. Virukselle tehdyllä immunosaostuksella amfifysiini II:n on todettu sitoutuvan virukseen ja osoitettu, että nsP3:ssa runsaasti proliinia sisältävä alue aiheuttaa tämän sitoutumisen. Koska amfifysiini II kolokalisoi osittain myös sitoutumiskyvyttömän virusmutantin replikaatiokompleksien kanssa [1], haluttiin selvittää voisiko jokin muu nsP-proteiini olla vastuussa tästä sitoutumisesta. Tämän tutkimiseksi kloonattiin Δ Prolini-mutaatio, josta proliinialue on poistettu, sekvensseihin P1'2'3 (nsP1-3), P13 (nsP1+nsP3) ja nsP3 4TO-plasmideissa. Näiden sekvenssien avulla tutkittiin, vaikuttaako nsP2:n tai nsP1:n läsnäolo kolokalisaation. Näitä sekvenssejä eksperssoitiin DNA-plasmidista soluviljelmissä. Kolokalisaatiota tutkittiin immunofluoresenssimenetelmällä. Normaalisti virusinfektiossa esiintyvä P123 pilkkoontuisi nsP1-3:ksi, mutta P1'2'3-sekvenssissä tämä on estetty tekemällä muutoksia proteiinien väliseen katkaisukohtaan. P13-proteiini on keinotekoinen, eikä sitä esiinny virusinfektiossa, joten se ei pysty pilkkoutumaan nsP1:ksi ja nsP3:ksi. P1'2'3 ja P13 lokalisoituvat normaalisti endosomeihin ja nsP3 muodostaa sytoplasmaan aggregaatteja.

Toisessa osassa tutkittiin viruksen endosomitargetointia. Virusinfektiossa viruksen replikaatiokompleksi siirtyy solukalvolta endosomeihin, mutta jos nsP3:en C-terminuksesta poistetaan 50 aminohapon kokoinen alue (Δ 50), joka on vahvasti fosforyloitunut, virus ei siirry endosomeihin vaan jää solukalvolle [2]. Mikäli tähän alueeseen tehdään pelkkiä pistemutaatioita, vaikutus ei ole sama, joten endosomitargetointi ei näyttäisi johtuvan yksinomaan fosforyloinnista. Targetointisignaalin antamiseen riittävän alueen tutkimiseksi nsP3-proteiiniin C-terminuksesta poistettiin erisuuruisia alueita (kuva 1), joita eksperssoitiin virusvapaassa ympäristössä P13-sekvenssissä 4TO-plasmidissa, koska näin isot deleetiot virusproteiineissa tappaisivat viruksen. P13-proteiini siirtyisi normaalisti solukalvolta endosomeihin. Oletetaan, että Δ 50 estäisi siirtymisen myös näissä olosuhteissa. Kuvan 1 mutaatioilla tutkitaan, estyykö siirtyminen solukalvolta niitä käytettäessä. Eksperssoitujen proteiinien lokalisaatiota tarkasteltiin immunofluoresenssimenetelmällä. Ver-

taamalla deleetioimutanttien lokalisaatioita selvitetään, mikä osa on vastuussa endosomaalisesta lokalisaatiosta.



Kuva 1. nsP3 C-terminuksen deleetiot. Viivoitettu alue on poistettu. Makro tarkoittaa nsP3:n makrodomeenia ja Kons. tarkoittaa alfavirusten välillä konservoitunutta aluetta.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Virukset

Virukset voivat infektoida kaiken tyyppisiä organismeja ja lisääntyä vain isäntäsolussa. Jotkut virukset leviävät eläimestä toiseen eläimeen vertaimevien hyönteisten välityksellä ja kasveista toisiin kasveihin kasveja syövien hyönteisten välityksellä, on kuitenkin olemassa myös muita reittejä. Virusten genomi voi olla viidessä erimuodossa: kaksijuosteinen DNA, yksijuosteinen DNA, kaksijuosteinen RNA ja yksijuosteinen RNA, joka voi olla joko negatiivinen tai positiivinen. RNA:n positiivisuus ja negatiivisuus määritellään siten, että pystyykö RNA toimimaan suoraan lähetti-RNA:na, positiivinen juoste pystyy tähän ja negatiivinen ei. Lisäksi näistä on olemassa yhdistelmä, jossa on yksi DNA-juoste ja yksi RNA-juoste. RNA virukset ovat paljon herkempiä mutaatioille kuin DNA-virukset. Solussa ei ole RNA:ta kopioivaa entsyymiä, joten RNA-viruksilla täytyy olla oma RNA-polymeraasi. RNA-polymeraaseissa ei ole oikolukuaktiivisuutta, joten RNA-virusten genomiin syntyy keskimäärin yksi mutaatio per 10 000 kopioitua nukleotidiä [3].

2.2 Alfavirukset

Alfavirukset ovat vaipallisia positiivisäikeisiä RNA -viruksia, joiden perimä on noin 11,5 kiloemäksen (kb) kokoinen. Ne leviävät hyttysten välityksellä ihmisiin ja eläimiin. Alfavirukset aiheuttavat nivel tulehduksia, ihottumaa ja aivokuumetta. [4]

Alfavirussuku luokitellaan togavirus-perheeseen. Serologisten ristireaktioiden perusteella alfavirukset voidaan jakaa seitsemään ryhmään, mutta nämä voidaan edelleen ryhmittää kolmeen isompaan ryhmään sekvenssitietojen perusteella: Venezuelan Equine Encephalitis/Eastern Equine Encephalitis eli VEE/EEE-, Sindbis (SIN)- ja Semliki Forest Virus (SFV)-ryhmiiksi. VEE/EEE- ryhmän viruksia esiintyy Amerikassa, ja ne aiheuttavat aivokuumetta. SIN-ryhmän viruksia esiintyy pääasiassa vanhassa maailmassa (Eurooppa, Aasia, Afrikka ja Australia) yhtä virusta lukuun ottamatta. SFV-ryhmä esiintyy vain vanhassa maailmassa. Perimältään alfavirukset ovat hyvin konservoituneita. Laboratoriossa käytetään yleensä SIN- ja SFV-viruksia, joita ei pidetä ihmisille kovin vaarallisina. [5]

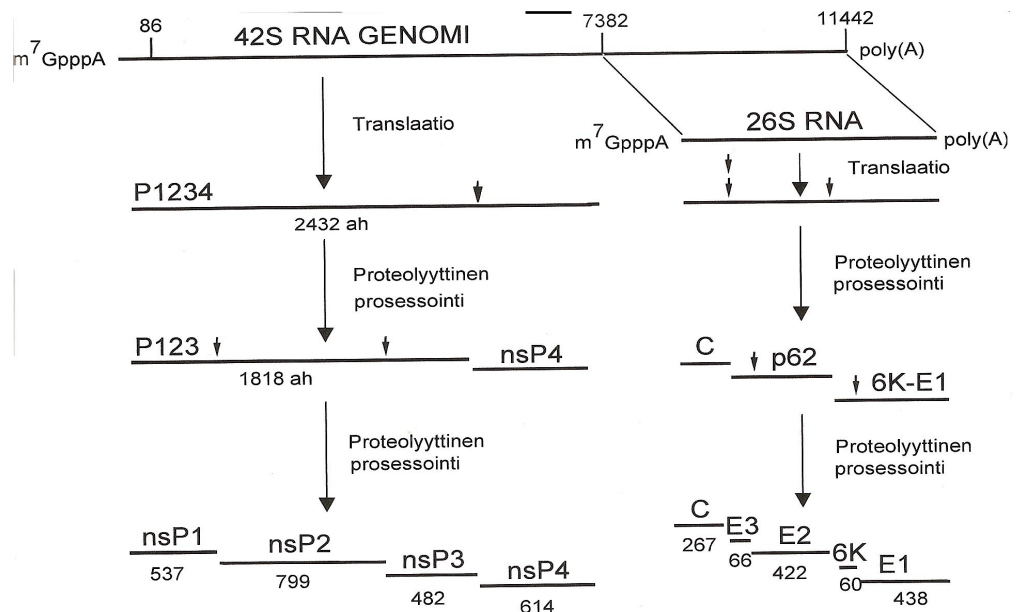
2.3 Semliki Forest -virus

SFV:n RNA-genomi, 42S RNA, on 11 442 emästä pitkä. Genomia suojaa ikosahedraalinen nukleokapsidi, jonka ympärillä on vaippa, joka koostuu isäntäsolun lipideistä. Genomissa on kaksi avointa lukukehystä joiden 5' päissä on cap0-rakenne (m⁷GpppA) ja 3' päissä polyadeniinihäntä [5]. Subgenominen 26S RNA, joka tuotetaan 42S RNA:n miinussäikeestä, on noin kolmasosan 42S RNA:n 3'-päästä. 42S RNA koodaa nonstruktuuriproteiinit (nsP) 1-4 polyproteiinina P1234 (2432 aminohappoa) ja 26S RNA koodaa rakenteelliset proteiinit E1-3, 6K ja kapsidiproteiinin polyproteiinina (1250 aminohappoa). Polyproteiinit pilkotaan viruksen ja isäntäsolun proteaasientsyymeillä. [6]

2.3.1 Replikaatiosykli

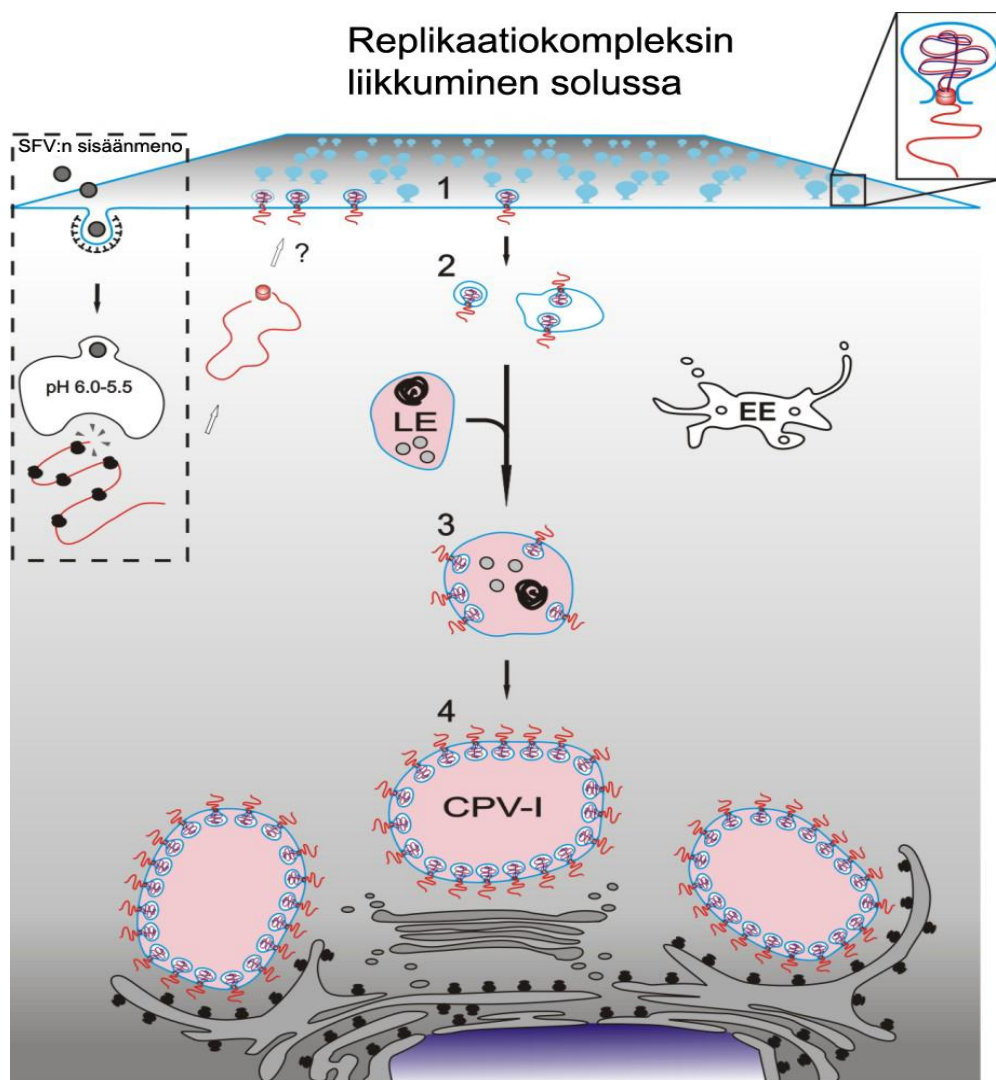
SFV menee solun sisälle klatriini-välitteisellä endosytoosilla, mutta tiettyä reseptoria ei tiedetä [7]. Tämän jälkeen virus joutuu happamaan ympäristöön, mikä saa vaippaproteiinit fuusioitumaan endosomikalvoon [8]. Nukleokapsidi vapautuu soluun ja sen kapsidiproteiinit irtoavat ribosomien avulla vapauttuen RNA:n. RNA:sta transloidaan polyproteiinit P1234. Rakenneproteiinit tuo-

tetaan subgenomisesta RNA:sta polyproteiinina. Polyproteiinien proteolyttinen prosessointi on esitetty kuvassa 2. [6]



Kuva 2. Kaavakuva polyproteiinien proteolyttisestä prosessoinnista [6].

P123 ja nsP4 toimivat yhdessä varhaisena RNA-polymeraasina ja syntetisoivat 42S RNA:n negatiivisensäikeen. Proteolyttisen pilkkoutumisen jälkeen nsP1-4 muodostavat replikaatiokompleksin, joka syntetisoi negatiivisesta säikeestä lisää positiivista säiettä 42S RNA:ta ja subgenomista 26S RNA:ta, josta transloidaan rakenne polyproteiini [6]. Replikaatiokompleksi on aluksi solukalvolla, johon muodostuu kuroumia, joita kutsutaan sferuleiksi, ja joissa replikaatio tarkkaan ottaen tapahtuu. Replikaatiokompleksi käynnistää endosytoosin kaltaisen tapahtuman, jolloin sferulit siirtyvät solukalvolta endosomissa kohti tumaa ja fuusioituvat ja muodostavat lopulta tyypin 1 sytopaattisiin vakuoloihin (CPV-I), jotka ovat muuttuneita endosomeja ja lysosomeja [9]. Sferulit siis pysyvät endosomin pinnalla ja lopulta ne jäävät CPV-I:n pinnalle (kuva 2). Sferulit ovat yhteydessä sytoplasmaan kalvomaisessa kaulassa olevan aukon kautta. Kuvassa 3 on havainnollistettu replikaatiokompleksin liikkumista soluissa. Tällä hetkellä ei tiedetä, miten sferulit muodostuvat ja mikä laukaisee endosytoosi-reaktion, mutta kuten kohdassa 2.3.5 mainitaan, nsP3 on välttämätön, jotta siirtyminen tapahtuu. [10]



Kuva 3. SFV:n replikaatiokompleksin liikkuminen solussa. LE on myöhäinen endosomi ja EE on aikainen endosomi. [10.]

Rakennepolyproteiinista prosessoidaan lopulliset rakenneproteiinit E1-3, 6K ja kapsidiproteiini. Lopuksi 42S +RNA pakataan kapsidiproteiinin muodostamaan nukelokapsidiin ja uusia viruksia vapautuu solusta. [6.]

2.3.2 Konservoituneet sekvenssielementit (CSE)

Genomisessa RNA:ssa on neljä CSE:tä. Yksi on ennen P1234 polyproteiinia koodaavaa aluetta, toinen nsP1:tä koodaavan alueen alkupäässä, kolmas on subgenominen promoottorialue ja neljäs sijaitsee ennen polyadeniinihännettä. CSE 1 on osa negatiivisen säikeen ja positiivisen säikeen promoottoria. Se muodostaa noin 44 ensimmäisestä nukleotidista "stem loopin". nsP1:n alussa sijaitseva CSE 2 on 51 nukleotidin kokoinen. Sen oletetaan pystyvän toimimaan promoottorina negatiivisen säikeen synteessä genomisesta RNA:sta, ja lisäksi se tehostaa molempien säikeiden synteesiä. CSE 4 sijait-

see ennen polyadeniinihantaa, ja se osallistuu kopromoottorina negatiivisen säikeen synteesiin. CSE 3 sijaitsee koodaavien sekvenssien välissä. Subgenomisen RNA:n transkriptio tapahtuu tehokkaasti vain, jos CSE 3 on sekvenssissä. Lisäksi viruksen RNA:n pakkaussignaali on alfaviruksilla usein puoleessa välissä 5' pään puolta. [4]

2.3.3 nsP1

nsP1 on 537 ah:n kokoinen, ja sillä on seuraavat entsyymaattiset aktiivisuudet: guaniini-7-metyylitransferaasi ja guanyylitransferaasi [6]. Näitä aktiivisuuksia tarvitaan cap0-rakenteen tekemiseen. nsP1 siirtää S-adenosyyli-metioniinistä (AdoMet) metyyli-ryhmän GTP:hen, jolloin muodostuu m⁷GTP ja nsP1 sitoutuu kovalenttisesti m⁷GMP:hen, jonka se liittää sekvenssin 5'-päähen [11]; [12]; [13]. Solussa entsyymi muodostaa kompleksin GMP:n kanssa, mikä liitetään sekvenssiin ja metyloidaan AdoMetin avulla [6].

Toinen nsP1:n tehtävä on kalvoihin sitoutuminen. NMR:n avulla on havaittu, että aminohapot 245 - 264 muodostavat amfipaattisen alfa-heliksin, joka on vuorovaikutuksessa happamien fosfolipidien kanssa [6]. nsP1:n aminohapposekvenssissä on myös kohdassa 418 - 420 kysteinejä. Näihin kysteineihin kalvossa olevat palmitaatit muodostavat kovalenttisen sidoksen ja täten lujittavat kalvosidosta [14]. Amfipaattiseen alfa-heliksiin tehtyjen mutaatioiden perusteella on saatu selville, että sen vuorovaikutus kalvon kanssa on välttämätöntä, jotta palmitaatio voisi tapahtua. nsP1:n entsyymaattisille aktiivisuuksille kalvovuorovaikutus on välttämätöntä [15]. nsP1:n vuorovaikutus nsP4-polymeraasin kanssa näyttäisi olevan tärkeää myös negatiivisen RNA-juosteen syntetisoinnissa. [10]

2.3.4 nsP2

nsP2 on 799 ah:n kokoinen, ja sillä on monia entsyymaattisia aktiivisuuksia. N-terminaaliosassa on helikaasiaktiivisuus, jota tarvitaan RNA-replikaation aikana kaksijuosteisen RNA:n purkamiseen [16]. Nukleosiditri-fosfataasiaktiivisuus löytyy myös N-terminaaliosasta. Trifosfataasiaktiivisuutta tarvitaan cap0-rakenteen tekemiseen [6]. Se irrottaa RNA:n 5'-pään gammafosfaatin, mihin nsP1 liittää m⁷GMP:n. C-terminaaliosassa on proteaasiaktiivisuus, joka vastaa P1234-polyproteiinin pilkkomisesta. nsP2 on proteolyttisesti aktiivinen pelkkänä nsP2:na ja ollessaan polyproteiinissa. Infektion alkuvaiheessa transloidaan P1234-polyproteiini, jonka nsP2 (poly-

proteiinissa) katkaisee 3/4-sidoksen *in cis*, loput sidokset katkeavat *in trans* järjestyksessä 1/2 ja 2/3 [4].

2.3.5 nsP3

nsP3:n N-terminaaliosassa on macro-domeeni (MD), jota esiintyy myös eukarioteissa ja prokaryoteissa, joten voidaan sanoa, että domeeni on säilynyt evoluutiossa laajalti. Alfaviruksissa MD:n on todettu sitovan poly(ADP-riboosia) ja polyadeniinia [18]. nsP3:n keskeinen osa on alfavirusten välillä konservoitu. C-terminuksen osa on vaihteleva jopa alfavirusten välillä.

Vaikuttaa siltä, että nsP3 on vastuussa replikaatiokompleksin ohjaamisesta endosomeihin sekä vuorovaikutuksessa monien replikaatioon tarvittavien isäntäsolun proteiinien kanssa [1]. C-terminuksen alueella on runsaasti proliineja sisältävä alue, jonka on todettu, immunosaostus-kokeen perusteella, sitovan amfifysiini II -proteiinia [1]. Amfifysiini II on proteiini, joka osallistuu kalvojen taivuttamiseen, mutta sen funktiota alfavirusten infektiiossa ei tiedetä. C-terminuksessa on myös vahvasti fosforiloitunut osa, joka on noin 50 aa:n kokoinen. Mikäli tämä alue poistetaan viruksesta, niin virus ei siirry solukalvolta endosomeihin [2]. Mikäli tähän alueeseen tehdään vain pistemutaatioita, vaikutus ei ole sama kuin koko alueen poistamisella [1].

2.3.6 nsP4

nsP4 on 614 aa:n kokoinen. Sen tiedetään olevan RNA-polymeraasin katalyyttinen yksikkö [19].

2.4 Fluoresenssimikroskopia

Usein kun tutkitaan jotakin molekyyllitasolla, ongelmaksi tulee molekyylin näkeminen tai detektointi. Fluoresenssi on yksi tapa tämän ongelman ratkaisemiseksi. Fluoresenssiin liittyvät ilmiöt emissio ja eksitaatio. Eksitaatiolla tarkoitetaan sitä, kun atomi absorboi energiaa, jolloin sen elektronit siirtyvät korkeammalle energiatasolle. Elektronin palatessa takaisin alemmalle energiatasolle se emittoi fotonin eli valoa. Korkeammalla energiatasolla osa elektronin energiasta purkautuu lämmöksi, joten eksitaatiovalon aallonpituus on pitempi (pienempi energiataso) kuin emissiovalon. Vahvasti fluoresoivia molekyyliä kutsutaan fluorokromeiksi. Fluoresenssimikroskoopilla eksitaatiovalon ja näytteen välissä on suodatin, jolla valitaan haluttu eksitaatioal-

lonpituus. Eksitaatiovalo osuu säteen jakavaan peiliin ja heijastuu näytteeneseen, jolloin näytteestä heijastuu emissiovalo, joka pääsee säteen jakavasta peilistä läpi. Emissio- ja eksitaatiospektrit ovat usein laajoja, joten toisen fluorokromin eksitaatiohuippu voi olla toisen fluorokromin eksitaatiospektrin juurella, jolloin tämäkin antaa hieman emissiota. Mikäli näytteestä heijastettava valo pääsisi suoraa okulaareille, aiheuttaisivat edellä mainitut asiat taustaa kuvaan. Tämän välttämiseksi näytteen ja okulaarien väliin on laitettu emissiosuodatin, joka päästää läpi vain emissioaallonpituudella ja suuremmilla aallonpituuksilla olevan valon. Tavallisessa fluoresenssimikroskoopissa kuvaan välittyy myös valoa fokuksen ulkopuolelta. Sen sijaan konfokaalimikroskoopissa fokuksen ulkopuolinen valo suodatetaan pois neulansilmän avulla. Fokuksessa oleva valo osuu juuri neulansilmän kohdalle ja pääsee siitä läpin, kun taas fokuksen ulkopuolella oleva valo jää neulansilmän reunojen ulkopuolelle. Konfokaalimikroskooppi on muillakin tavoin tarkempi kuin tavallinen fluoresenssimikroskooppi. Eksitaatioon yleensä käytetään laseria, jolloin vain pieni osa näytteestä on valossa kerrallaan. Tämän ansioista näyte voidaan ikään kuin skannata, jolloin saadaan solu lohkottua kuviksi. [20; 21.]

2.5 Transfektio

Eukaryoottisoluihin voidaan viedä DNA:ta virusvektoreiden avulla, mutta jos tämä tehdään jotenkin muuten, niin puhutaan transfektiosta. Transfektioon voidaan käyttää erilaisia kemikaaleja, lipidejä tai fysikaalisia keinoja. DNA:ta viedessä soluun DNA:n fosfaattiselkärangan negatiivinen varaus aiheuttaa ongelman, koska solukalvo on myös negatiivisesti varautunut. Transfektiossa DNA:n varaus neutraloidaan tai saatetaan positiiviseksi ja tämän avulla ongelma kierretään. Tähän käytetään esimerkiksi kalsiumfosfaattia ja DEAE-dextrania tai kationisia lipidipohjaisia reagensseja. On myös olemassa fysikaalisia menetelmiä. Yleisesti ottaen kemialliset menetelmät ovat helppokäyttöisimpiä, sen jälkeen lipidit, ja vaikeakäyttöisimpiä ovat fysikaaliset menetelmät. Fysikaalisilla menetelmillä pystytään kuitenkin transfektoimaan soluja, joita on vaikea transfektoida, ja myös yksittäisiä soluja. Transfektiotehokkuuteen vaikuttaa solujen kunto, konfluenssi (kasvutiheys), pasaasi, kontaminaatiot, DNA:n laatu ja määrä. Transfektio pitää aina optimoida. Lipidejä käytettäessä täytyy etsiä sopiva suhde DNA:n ja lipidien välille. [22.]

3 TYÖN TAVOITTEET

Tämän työn tavoitteina oli tutkia, vaikuttavatko nsP1 tai nsP2 amfifysiini II:n sitoutumiseen replikaatiokompleksiin, kun amfifysiini II:n sitoutuminen nsP3-proteiiniin on estetty. Tämän tutkimiseksi sekvensseistä P1'2'3 (nsP1-3), P13 (nsP1+3) ja nsP3 poistetaan nsP3:n proliinia sisältävä alue, jonka tiedetään sitovan amfifysiini II:ta ja näiden deleetioproteiinien avulla tutkitaan immunofluoresenssimenetelmällä, sitoutuuko amfifysiini II mihinkään näistä. Virusinfektiossa viruksen replikaatiokompleksit sijaitsevat endosomeissa ja sisältävät kaikki nsP:t 1-4. Replikaatiokompleksin ulkopuolella replikaatioproteiinit eivät ole vuorovaikutuksesta keskenään. P1'2'3 ja P13 ovat keinotekoisia eivätkä ne pysty pilkkoutumaan yksittäisiksi nsP-proteiineiksi, joten ne muistuttavat sijainniltaan viruksen replikaatiokomplekseja. Aiempien tutkimusten mukaan P1'2'3:n ja P13:n pitäisi solussa lokalisoitua endosomeihin ja pelkän nsP3:n tulisi muodostaa aggregaatteja [1; 23].

Toinen työn tavoite oli tutkia, mikä osa nsP3:sta vastaa replikaatiokompleksin siirtymisestä solukalvolta endosomeihin. Jos nsP3:n C-terminuksesta poistetaan vahvasti fosforyloitunut 50 aminohaponalue, replikaatiokompleksi jää solukalvolle. Pistemutaatioilla ei päästä samaan vaikutukseen, joten siirtyminen ei näyttäisi olevan riippuvainen yksinomaan fosforyloinnista. Tämän tutkimiseksi nsP3:n C-terminukseen tehtiin erisuuruisia deleetioita, joita ekspressoitiin solussa ja tarkasteltiin immunofluoresenssimenetelmällä. Deleetiot tehtiin P13-sekvenssissä, koska nsP1 on vastuussa replikaatiokompleksin sitoutumisesta solukalvoon ja tämä sekvenssi ei pysty pilkkoutumaan. Näin suuria deleetioita ei olisi voitu tehdä virukseen, koska virus olisi kuollut niistä. P13 lokalisoituu normaalisti endosomeihin.

4 MATERIAALIT JA METODIT

4.1 nsP3 Δ Proliinin -kloonaus

Δ Proliinimutaatio kloonattiin 4TO_P1'2'3-, 4TO_P13- ja 4TO_nsP3-konstrukteihin. 4TO on plasmidi missä on ampicilliiniresistanssigeeni ja CMV-promoottori, jonka alla nsP:t ovat ja eukaryoottisolut tunnistavat sen.

Bsu36I (NEB) ja Tth111I (NEB) restriktioentsyymeillä leikattiin viruksen infektiivisestä cDNA:sta, johon oli tehty proliinideleetio (pSFV4 Δ Proliooni), Δ Proliinin sisältävä nsP3-alue, ja pcDNA4TO_nsP3 (4TO_nsP3, vektori) avattiin samoilla entsyymeillä, jolloin nsP3:ssa on paikka Δ Proliinisekvenssille. Nämä leikkaukset ajettiin 1 % agarosigeelillä, missä oli etidumbromidia (Sigma) DNA:n visualisoimiseksi UV-valossa. Agarosigeeliltä leikattiin pSFV4 Δ Proliinista 489 emäsparin (bp) kokoinen DNA-pala ja 4TO_nsP3:sta leikattiin noin 6000 bp:n kokoinen DNA-pala. Nämä puhdistettiin Promegan Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System -kitillä ohjeen mukaisesti.

4TO_nsP3 -vektori käsiteltiin shrimp alkaline phosphatase (SAP) -entsyymillä vapaiden fosfaattiryhmien poistamiseksi, jolloin vektori ei liigatoitu kiinni itsensä kanssa, taulukon 1 reaktion mukaan.

Taulukko 1. SAP-reaktio

SAP (NEB)	1 μ l
10 x SAP puskuri (NEB)	2 μ l
4TO_nsP3-vektori	17 μ l

Δ Proliooni-insertti liitettiin SAP -käsiteltyyn 4TO_nsP3 vektoriin taulukon 2 liigaatioreaktiolla.

Taulukko 2. Δ Proliooni + 4TO_nsP3-ligaatio

	Δ Proliooni + 4TO_nsp3	vektorikontrolli
Δ Proliooni	7 μ l	-
4TO_nsp3	1 μ l	1 μ l
T4 ligaasi (Fermentas)	1 μ l	1 μ l
Puskuri	2 μ l	2 μ l
H ₂ O	9 μ l	16 μ l

Reaktioita inkuboitiin 3 h + 14 °C:ssa. Vektorikontrollin avulla nähtiin, kuinka hyvin ligaatio on onnistunut, eli sulkeutuiko vektori kiinni ilman inserttiä. Tämän jälkeen liigaatioreaktioseos transformoitiin 100 μ l:aan *E. coli* DH5 α -

bakteereita ja lämpöshokin jälkeen lisättiin 500 µl SOC-liuosta. Ligaatioseosta pipetoitiin 10 µl transformaatioon ja lopuksi bakteerit pelletöitiin, minkä jälkeen suurin osa supernatantista kaadettiin pois ja bakteerit suspensoitiin jäljelle jääneeseen SOC-kasvatusliuokseen (noin 100 µl:aan). Bakteerit maljattiin LB + 0,1 mg/ml amp -maljoille. Maljoja inkuboitiin yön yli +37 °C:ssa. Vektorikontrollimaljalla oli pesäkkeitä myös, joten insertin sisältävän pesäkkeen löytämiseksi tehtiin pesäke polymeraasiketjureaktio (PCR) 10 pesäkkeestä, jokaisesta pesäkkeestä tehtiin myös uusi malja. Pesäke-PCR:n reaktio on esitetty taulukossa 3. Pesäke-PCR:ssä monistettiin nsP3:sta ΔProlinin sisältävä alue jolloin tyhjästä vektorista pitäisi monistua noin 450 bp pienempi DNA-fragmentti.

Taulukko 3. PCR-reaktio ja protokolla

PCR reaktio				Protokolla	
10 x Taq puskuri		5 µl	1.	95 °C	5 min
dNTP (10 mM)	0,2 mM	1 µl	2.	95 °C	30 s
Aluke F9 (100 µM) (Geneset SA) 5' GGC GAA ACA ATG GAC AAC ATC #G# 3'	1 µM	0,5 µl	3.	55 °C	30s
Aluke SFV3_end (100 µM) (Geneset SA) 5' TGC ATG ATT ATG CAC CCG CGC GGC CTA GTC 3'	1 µM	0,5 µl	4.	72 °C	1 min
MgCl ₂	2 mM	4 µl	5.	kohtaan 2	x 29
Taq polymeraasi	2,5 U	0,5 µl	6.	72 °C	5 min
H ₂ O		38,5 µl			
	yhteensä	50 µl			

PCR-reaktiot analysoitiin 1 % agarosigeelillä. Visualisointi tehtiin, kuten edellä on mainittu. Oikeiden pesäkkeiden tulisi antaa noin 700 bp:n kokoinen DNA-pala. Oikeista pesäkkeistä tuotettiin plasmidi-DNA:ta Macherey-Nalgen NucleoSpin kitin ohjeen NucleoSpin Plasmid: Isolation of High-copy plasmid DNA from *E. coli* -protokollalla. Tuotetut DNA:t tarkistettiin taulukon 4 restriktioanalyysillä.

Taulukko 4. ΔProlinin restriktioanalyysit

Agel (NEB)	1 µl	KpnI (Promega)	1 µl
HpaI (NEB)	1 µl	10 x Puskuri J (Promega)	2 µl
10 x Puskuri 4 (NEB)	2 µl	DNA	1 µg
DNA	1 µg	H ₂ O	ad. 20 µl
H ₂ O	ad. 20 µl		

4TO_nsP3 Δ Proliinista leikattiin Δ Proliooni (insertti) irti ja 4TO_P13 (vektori) ja 4TO_P1'2'3 (vektori) -plasmidit avattiin taulukon 5 osoittamalla tavalla.

Taulukko 5. 4TO_P13-, 4TO_P1'2'3- ja 4TO_nsP3- Δ Proliooni plasmidien leikkaukset

	P13	P1'2'3	nsP3 Δ Proliooni
Eco81 (Fermentas)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Xbal (Fermentas)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
10 x Tango puskuri (Fermentas)	2 μ l	2 μ l	2 μ l
DNA	1 μ g	1 μ g	1 μ g
H2O	ad. 20 μ l	ad. 20 μ l	ad. 20 μ l

Leikkaukset ajettiin 1 % agarosigeelillä ja Δ Proliooni DNA-pala leikattiin geelistä irti ja puhdistettiin Promegan Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System -kitillä ohjeen mukaisesti. Taulukossa 6 on P13 + Δ Proliooni ja P1'2'3+ Δ Proliooni –ligaatiot. Transformaatio ja DNA-tuotto toteutettiin kuten aikaisemminkin.

Taulukko 6. P13 + Δ Proliooni ja P1'2'3 + Δ Proliooni –ligaatiot

	P13+ Δ Proliooni	P1'2'3 + Δ Proliooni
Vektori	2,3 μ l	2 μ l
Insertti	7,7 μ l	15 μ l
T4 ligaasi (Fermentas)	1 μ l	1 μ l
10 x T4 puskuri (Fermentas)	2 μ l	2 μ l
H2O	7 μ l	-

Restriktioanalyysit tehtiin samalla reaktiolla kuin taulukossa 5, mutta DNA:ta pipetoitiin 1 μ l ja lopputilavuus asetettiin vedellä 20 μ l:ksi.

4.2 Nsp3:n C-terminuksen deleetioiden kloonaukset 4TO_P13 -plasmidiin

pcDNA4TO_P13-plasmidiin tehtiin seuraavat deleetiot endosomitargetoinnin tutkimiseksi: Δ 50 (nsP3-proteiinin aminohapot 318 - 368 poistettu), Δ 84 (359 - 452), Δ 114 (359 - 366), Δ 318 (0 - 318) ja Δ 368 (0 - 368). Deleetiot tehtiin käänteis-PCR:llä, jossa alukkeet suunnitellaan asettumaan ikään kuin "väärin päin". Normaalisti alukkeet menevät toisiaan kohti, mutta käänteis-PCR:ssä monistetaan koko plasmidi ja jätetään alukkeiden väliin jäävä alue pois. Taulukossa 7 on listattu käytetyt alukkeet.

Taulukko 7. Deleetioihin käytettävät alukkeet. Kaikki alukkeet tilattiin Sigma-Aldrichilta.

Deleetio	Alukkeet
Δ318	1: 5'-TGAAGAACTAGAGTATCACGCAGGTGCA-3' 2: 5'-GTTAGTCCGCGGAAGTATGCCGCATCTAC-3'
Δ50	3: 5'-CCTGTTCCGACCCGACGGTACCTTCAGTG-3' 4: 5'-TACGAGCCAATGGCTCCCATAGTAGTGAC-3'
Δ114	5: 5'-TTTGCAGTCGTGTGACATCGACTCGATC-3' 6: 5'-TAAGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGC-3';
Δ84	5: 5'-TTTGCAGTCGTGTGACATCGACTCGATC -3' 7: 5'-GACTTTGACGAGCACGAGGTCGATGCGT-3'
Δ368	1: 5'-TGAAGAACTAGAGTATCACGCAGGTGCA-3' 4: 5'-TACGAGCCAATGGCTCCCATAGTAGTGAC-3'

Käänteis-PCR:n reaktio on taulukossa 8.

Taulukko 8. Käänteis-PCR:n reaktio ja protokolla

Reaktio			Protokolla		
Plasmidi	20 ng	1 µl	1.	98 °C	30 s
Aluke A	50 pmol	1 µl	2.	98 °C	10 s
Aluke B	50 pmol	1 µl	3.	72 °C	4 min
5 X Phusion HF buffer (Finnzymes)		10 µl	4.	Vaiheeseen 2.	x 20
dNTP (10 mM)	0,2 mM	1 µl	5.	72 °C	10 min
DMSO		1 µl	6.	4 °C	
H ₂ O		34 µl			
Phusion Hot Start polymeraasi (Finnzymes)	2 U	1 µl			
Yhteensä		50 µl			

1/10 PCR-reaktiosta analysoitiin 1 % TBE-agarosigeelillä oikeankokoisten PCR-fragmenttien havaitsemiseksi. PCR-reaktioon lisättiin DpnI (NEB) restriktioentsyymiä ja inkuboitii 2 h 37 °C:ssa templaatti-DNA:n tuhoamiseksi. PCR-tuotteet puhdistettiin Promegan Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System -kitillä ohjeen mukaisesti, mutta eluoiitiin 44 µl:aan vettä. Puhdistettuun DNA:han lisättiin 1/10 10 x ligaasipuskuria (NEB) ja 1 µl T4 DNA-kinaasia (NEB) fosfaattiryhmien lisäämiseksi. Seosta inkuboitii puoli tuntia 37 °C:ssa ja tämän jälkeen T4 DNA-kinaasi inaktivoitiin pitämällä reaktiota 20 min 65 °C:ssa. PCR:illä tuotetut DNA:t suljettiin taulkon 9 ligaatio-reaktiolla, kontrollireaktioon ei lisätty T4 DNA -ligaasia (Fermentas). Kontrollireaktiolla tarkistetaan, ettei alkuperäistä templaattia ole jäljellä.

Taulukko 9. PCR tuotteiden ligaatio

PCR tuote	2 µl
10 x T4 -puskuri (Fermentas)	4 µl
T4 ligaasi (Fermentas)	1 µl
H ₂ O	33 µl
Yhteensä	40 µl

Ligatoidut PCR-tuotteet ja kontrollireaktio transformoitiin *E. coli* DH5 α -bakteereihin. Ligaatioseoksia pipetoitiin transformaatioon 5 μ l ja kaikki bakteerit maljattiin LB+ 0,1 mg/ml amp -maljoille. Jokaiselta maljalta tuotettiin neljästä pesäkkeestä plasmidia Macher Nalgen NucleoSpin -kitin ohjeen NucleoSpin Plasmid: Isolation of High-copy plasmid DNA from *E. coli* -protokollalla. Konstruteille tehtiin restriktioanalyysit taulukon 10 mukaan.

Taulukko 10. Deleetioiden restriktioanalyysit

Δ 318		Δ 50, Δ 84, Δ 114	
PfIml	1,5 μ l	Bsu36I	1 μ l
SacII	1 μ l	NotI	1 μ l
10 x Puskuri 2 (NEB)	2 μ l	10 x Puskuri 3 (NEB)	2 μ l
BSA	0,5	BSA	0,5 μ l
DNA	500 ng	DNA	500 ng
H ₂ O	ad. 20 μ l	H ₂ O	ad. 20 μ l
Δ 368			
NheI	1 μ l		
AgeI	1 μ l		
10 x Puskuri 1 (NEB)	2		
10 x BSA	2		
DNA	500 ng		
H ₂ O	ad. 20 μ l		

Restriktioanalyysin jälkeen Δ 50, Δ 84 ja Δ 114 lähetettiin sekvensoitavaksi alukkeilla F9 (5' GGC GAA ACA ATG GAC AAC ATC #G# 3'), joka sitoutuu nsP3:n puoliväliin ja nsp12#5 (5' ATA CCA TGG CGG CGT ATT GGA TTG GGT TT 3'), Δ 318 ja Δ 368 lähetettiin sekvensoitavaksi alukkeella nsp12#5.

4.3 Epäsuoravasta-ainevärjäys ja transfektion optimointi

Transfektion optimoinnilla etsittiin olosuhteita, joissa mahdollisimman suuri osa soluista ekspressoisi transfektoitua proteiinia. Transfektion optimoinnissa käytettiin 4TO_P1'2'3 -konstruktia. Transfektioagensseina optimoinnissa käytettiin Invitrogenin Lipofectamin LTX:ää ja Fermentaksen Exgeniä. 24-kuoppalevyllä, jossa oli peitinlasit, transfektoitiin 4 kuoppaa BSRT7/5-soluja ja 8 kuoppaa HeLa soluja, joista 4:lle kasvatusmedia vaihdettiin MEM + 0,2 % BSA + glutamiiniin ennen transfektiota, loput tehtiin normaalissa seerumia sisältävässä ravintonesteessä. Solut olivat noin 70 % konfulentteina. Optimointiin tehtiin neljä erilaista transfektiota. Pipetoitujen reagenssien määrät ovat taulukossa 11. Transfektioseokset tehtiin valmistajien ohjeiden mukaan. Optimoinnit tehtiin kahdella aikapisteellä 7 h ja 18 h.

Taulukko 11. Optimoinnin transfektioreaktiot

	Transfektio 1		Transfektio 2	Transfektio 3	Transfektio 4
DNA	1 µg	DNA	600 ng	600 ng	1000 ng
NaCl (150 mM)	100 µl	Plus reagent	0,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Exgen	3,3 µl	Lipofectamin LTX	1,3 µl	1,3 µl	3 µl

Transfektoidut solut värjättiin vasta-aineilla. Vasta-ainevärjyksessä pesuun käytettiin Dulbecco + 0,2 % BSA:ta. Kuopista poistettiin kasvatusmedia ja lisättiin noin 400 µl 4 % PFA:ta ja inkuboitiin 20 min RT solujen fiksatoimiseksi. Solut pestiin kolme kertaa ja lisättiin noin 400 µl:aa 50 mM NH₄Cl (PBS:ssä) ja inkuboitiin 15 min RT. Inkuboinnin jälkeen näytteet pestiin kolme kertaa ja permembalisoitiin noin 400 µl:lla Triton X-100:aa (PBS:ssä), inkuboitiin 1 min RT ja jälleen pestiin kolme kertaa. Primääreina vasta-aineina käytettiin nsP1 marsu (gp) ja nsP3 kani (R), jotka laimennettiin 1:200 ja 1:2000 dulbecco + 0,2 % BSA:han. Vasta-ainevärjäys tehtiin pipetoimalla 80 µl:aa vasta-aineseosta parafilmille ja peitinlasit nostettiin näiden päälle ja inkuboitiin 1 h +4 °C:ssa. inkuboinnin jälkeen pestiin kolme kertaa 5 minuuttia kuoppalevyssä. Sekundääriset vasta-aineet olivat gp-TRITC, joka laimennettiin 1:250, ja alexa R 488, joka laimennettiin 1:250. Sekundääri-vasta-ainevärjykset tehtiin samalla tavalla kuin primäärit vasta-aineet. Tämän jälkeen pestiin kolme kertaa 5 min. Peitinlasit nostettiin kuoppalevyiltä, kastettiin 5 kertaa vedessä ja laitettiin objektilasille, mihin oli pipetoitu 4 µl mo-wolia.

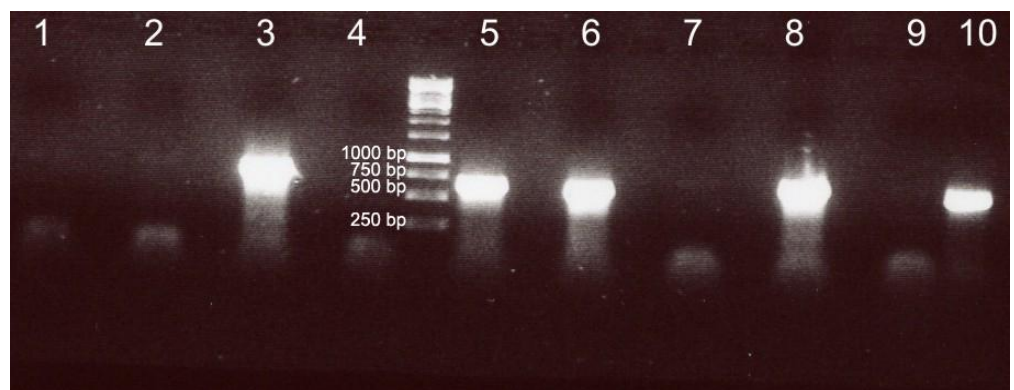
Varsinasiin ΔProliini-näytteisiin käytettiin primääreina vasta-aineina amphiphysin2 (H100) R (Santa Cruz Biotechnology) ja αnsp3 gp, sekundaarisina alexa gp 488 (Invitrogen) ja alexa R 568 (Invitrogen). nsP3-deleetioihin käytettiin primaareina vasta-aineina αnsp1 R ja αnsp3 gp, sekundaarisina alexa gp 488 (Invitrogen) ja alexa R 568 (Invitrogen). Lisäksi näytteet värjättiin DAPI:lla sekundaari-vasta-aineiden jälkeen ennen pesua. 14,3 mM DAPI-kantaliuosta lisättiin 0,5 µl 50 ml:aan Dulbecco BSA:ta. Tätä pipetoitiin noin 400 µl peitinlaseille sekundaari-vasta-aineiden jälkeen. Tämän jälkeen tehtiin jälkifiksaatio samalla tavalla kuin ensimmäinen fiksaatio. Solujen katsomiseen käytettiin Olympus BX61 -mikroskooppia ja nsP3-deleetioita katsottiin lisäksi Leica TCS SP5 -konfokaalimikroskoopilla.

5 TULOKSET

5.1 Δ Proliini-kloonauksen tulokset

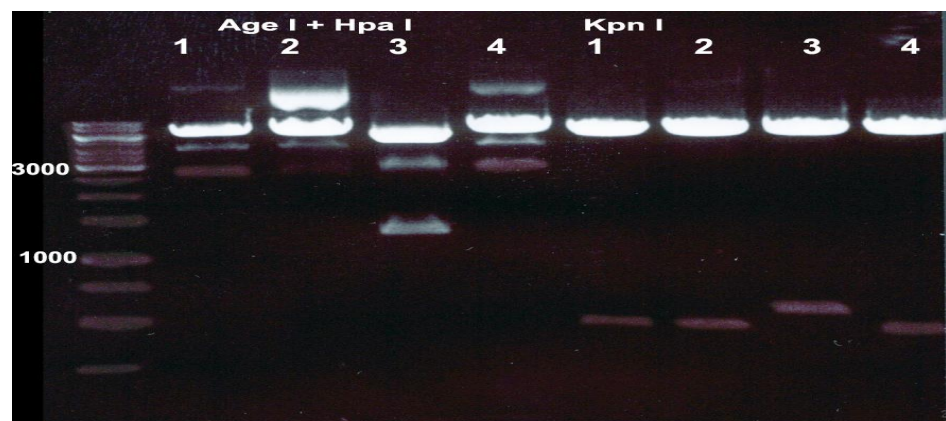
Δ Proliini-mutaatio kloonattiin 4TO_P1'2'3 (nsP1-3), 4TO_P13 (nsP1+3) ja 4TO_nsP3 -konstrukteihin.

Kaikissa geeleissä käytettiin DNA-markerina Fermentaksen GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder SM0311. Pesäke PCR:n tulokset ovat kuvassa 4. Pesäke PCR:n näytteistä numero 3, 5, 6 ja 10 olivat oikean kokoisia (noin 700 bp) ja näistä tuotettiin plasmidia.



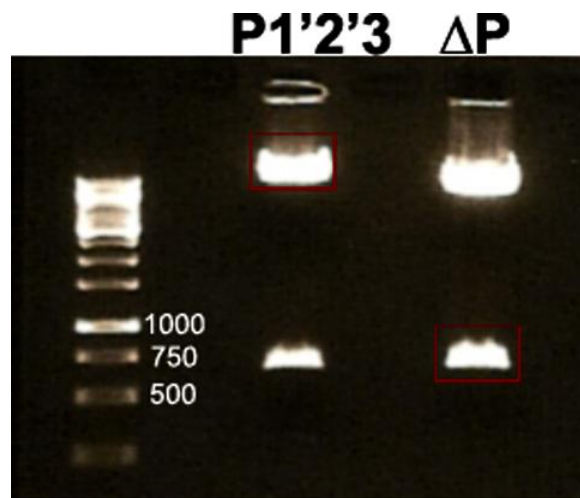
Kuva 4. Pesäke PCR:n tulokset agarosigeelillä, oikean kokoinen DNA-pala on noin 700 bp

Tuotettujen plasmidien restriktioanalyysit ovat kuvassa 5. Age I + Hpa I -digestiosta pitäisi tulla noin 1400 bp ja Kpn I -digestiosta pitäisi tulla noin 500 bp. Vain näyte 3 (pesäke 6) digestoitui oikein.

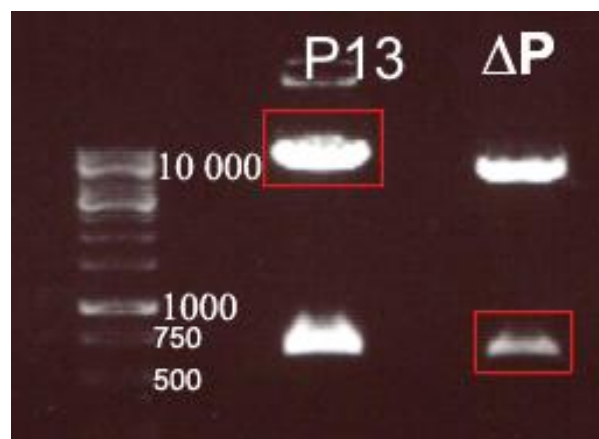


Kuva 5. Tuotettujen 4TO_nsP3 Δ Prolini -plasmidien restriktioanalyysi

4TO_nsp3 Δ Proliinin, 4TO_P13:n ja 4TO_P1'2'3:n digestiot ovat kuvissa 6 ja 7. Molemmissa digestioissa vektorin koko oli noin 10 000 bp ja insertin koko oli noin 600 bp.



Kuva 6. P1'2'3:n ja Δ Proliinin digestiot. Neliöissä olevat kohdat leikattiin irti.

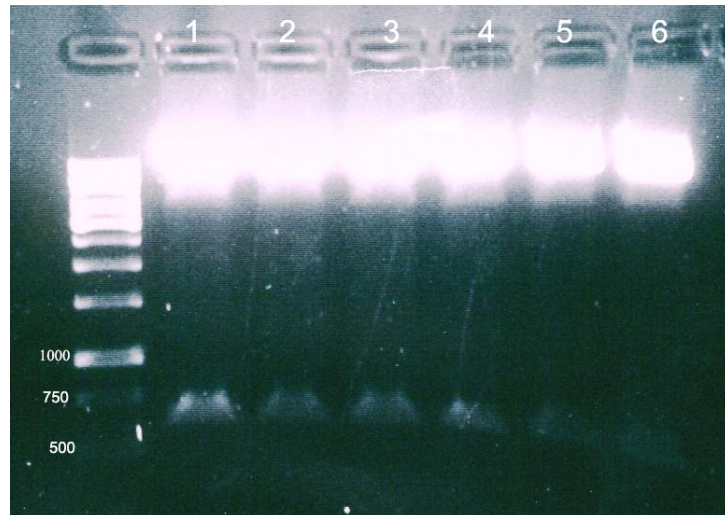


Kuva 7. P13:n ja Δ Proliinin:n digestiot. Punaisella merkatut kohdat leikattiin irti.

P1'2'3 Δ Proliinin ja P13 Δ Proliinin restriktioanalyysit ovat kuvassa 8 ja 9. Oikein digestoituneen DNA-fragmentin koko oli noin 600 bp.



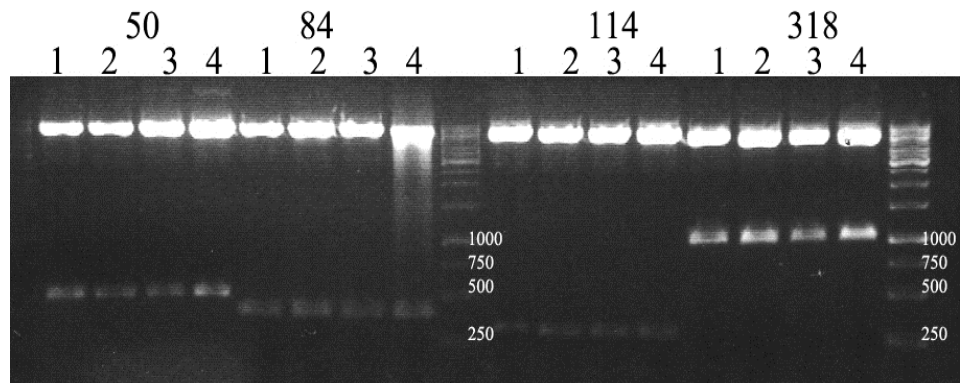
Kuva 8. P13 Δ Proliinin restriktioanalyysi



Kuva 9. P1'2'3 ΔProlinin restriktioanalyysi

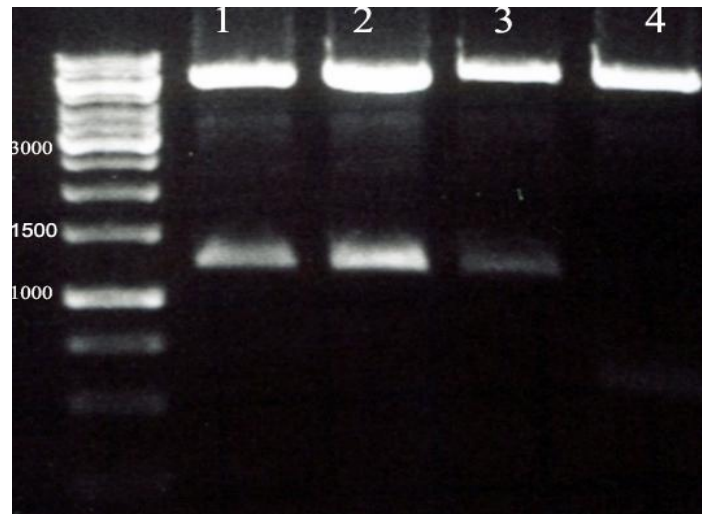
5.2 Nsp3 C-terminuksen deleetioiden kloonausten tulokset

4TOP13 Δ50:n, Δ84:n, Δ114:n ja Δ318:n restriktioanalyysit ovat kuvassa 10. Digestioista pitäisi tulla seuraavanlaiset DNA-palat: Δ50:stä noin 500 bp, Δ84:stä noin 400, Δ114:stä noin 260 bp:n kokoinen pala ja Δ318:sta noin 1000 bp. Kuvasta 10 nähdään, että kaikki tuotetut plasmidit sisältävät inseritin. Näiden tulosten perusteella sekvensointiin lähetettiin Δ50 plasmidi numero 2, Δ84 plasmidi numero 3, Δ114 plasmidi numero 4 ja Δ318 plasmidi numero 4.



Kuva 10. Δ50:n, Δ84:n, Δ114:n ja Δ318:n plasmidien restriktioanalyysit

Kuvassa 11 on $\Delta 368$:n restriktioanalyysi. Odotetun DNA-palan koko oli noin 1200 bp, mikä saatiin kaikista plasmideista paitsi neljänestä. Sekvensoitavaksi lähetettiin plasmidi numero 2.

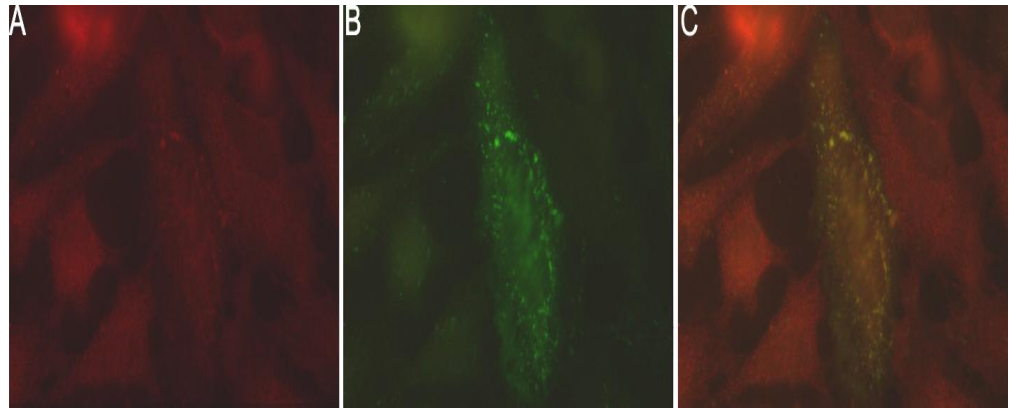


Kuva 11. $\Delta 368$:n restriktioanalyysi

Kaikki sekvensointitulokset ovat liitteessä 1. Sekvensoinneissa ei tullut esille ylimääräisiä mutaatioita, vaikka kolmessa sekvenssissä on yksi pistemutaatio samassa kohtaa, mutta se on todennäköisesti ollut jo alkuperäisessä plasmidissa, mitä käytettiin templaattina PCR:ssä.

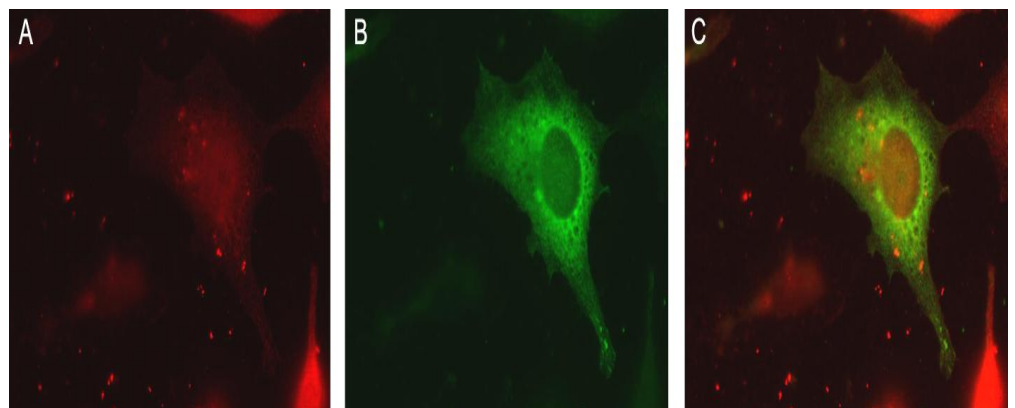
5.3 Δ Proliinin fluoresenssimikroskooppitulokset

Δ Proliini P1'2'3:n, P13:n, nsP3:n ja villityypin kuvissa amfifysiini II on värjätty punaisella (Alexa 568) ja nsP3 vihreällä (alex 488). Kuvassa 12 on P1'2'3-villityypin kuvat. Kuvan 12 A-kohdassa on amfifysiini II:n värjäys, missä punaiset kohdat osoittavat amfifysiini II:n lokalisaatiota ja B-kohdassa nsP3 on värjätty, missä vihreät kohdat osoittavat nsP3:n lokalisaatiota. Kohdassa C kohdat A ja B on yhdistetty. Mikäli punainen ja vihreä ovat samassa kohdassa, muuttuu väri keltaiseksi, mikä kertoo, että näissä kohdissa on kolokalisaatiota. Kuvista nähdään, että amfifysiini II ja nsP3 ovat kolokalisoituneet.



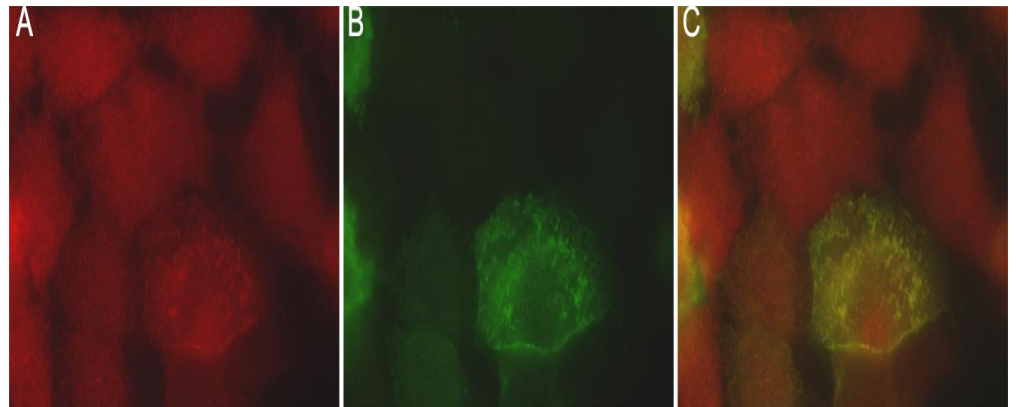
Kuva 12. P1'2'3-villityyppi. A-kuvassa on amfifysiini II, B-kuvassa nsp3 ja C-kuvassa nämä on yhdistetty.

Kuvassa 13 on P1'2'3 Δ Prolini-mutaation kuvat. nsP3 on ekspresoitunut hyvin ja kuvassa on tyypillinen lokalisaatio P1'2'3-plasmidille, proteiinit ovat tuman lähellä. Amfifysiini II on kasautunut solussa muutamaankin kohtaan, mutta näissä kohdissa ei nähdä nsP3:sta, joten kolokalisaatiota ei ole, toisin kuin villityypissä.



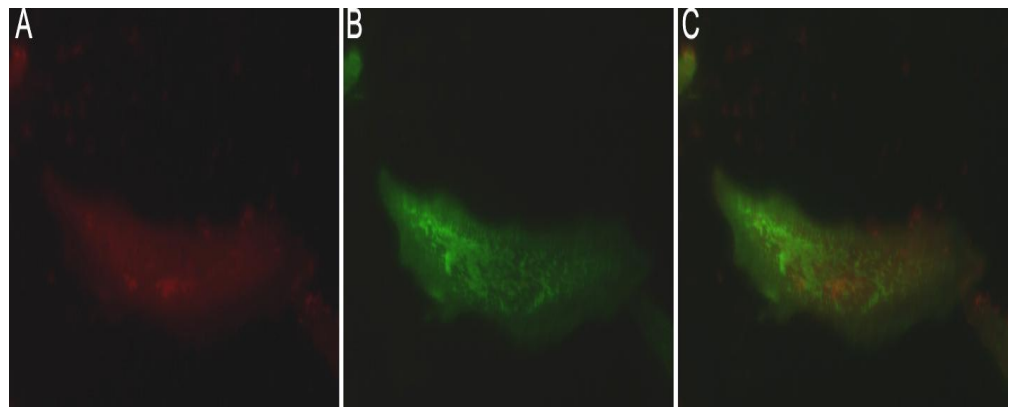
Kuva 13. P1'2'3 Δ Prolini. A-kuvassa on amfifysiini II, B-kuvassa nsp3 ja C-kuvassa nämä on yhdistetty.

P13-villityyppi on kuvassa 14 mistä nähdään, että amfifysiini II ja P13 ovat kolokalisoituneet.



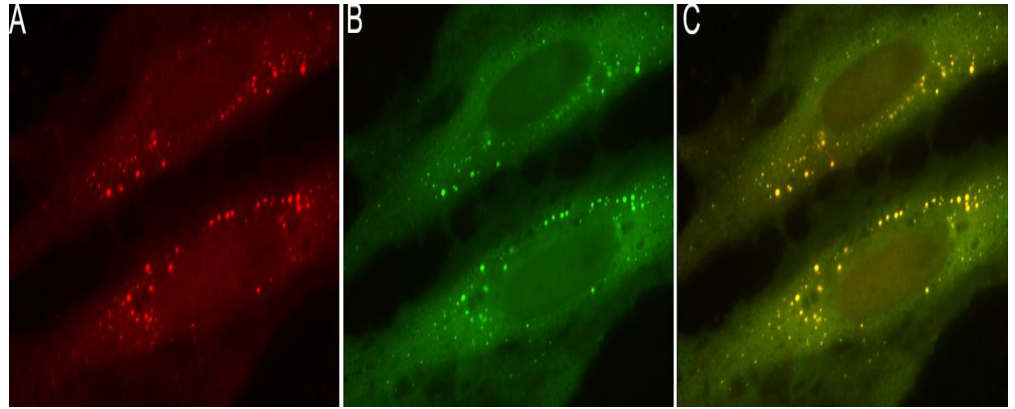
Kuva 14. P13-villityyppi. A-kuvassa on amfifysiini II, B-kuvassa nsp3 ja C-kuvassa nämä on yhdistetty.

Kuvasta 15 nähdään, että P13 Δ Proliinin nsP3 on solun vasemmassa osassa ja amfifysiini II on solun keskiosassa, joten kolokalisaatiota ei ole.



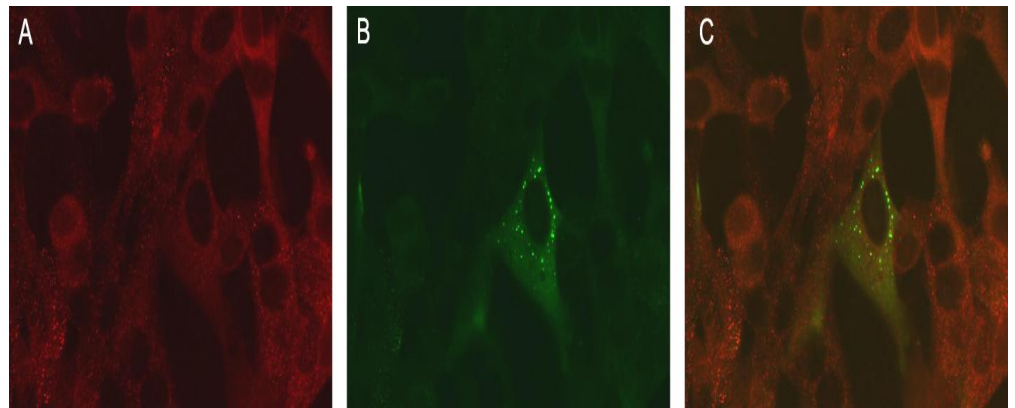
Kuva 15. P13 Δ Proliniini. A-kuvassa on amfifysiini II, B-kuvassa nsp3 ja C-kuvassa nämä ovat yhdistetty.

nsP3-villityypin värjäys on kuvassa 16. Villityypin värjäyksessä näkyvät kirkkaat pisteet ovat nsP3:n muodostamia aggregaatteja. Tämä fenotyyppi on tyypillinen nsP3:lle. Amfifysiini II on lokalisoitunut myös näihin aggregaatteihin myös, joten nsp3 ja amfifysiini II kolokalisoidivat.



Kuva 16. nsP3-villityyppi. A-kuvassa on amfifysiini II, B-kuvassa nsp3 ja C-kuvassa nämä on yhdistetty.

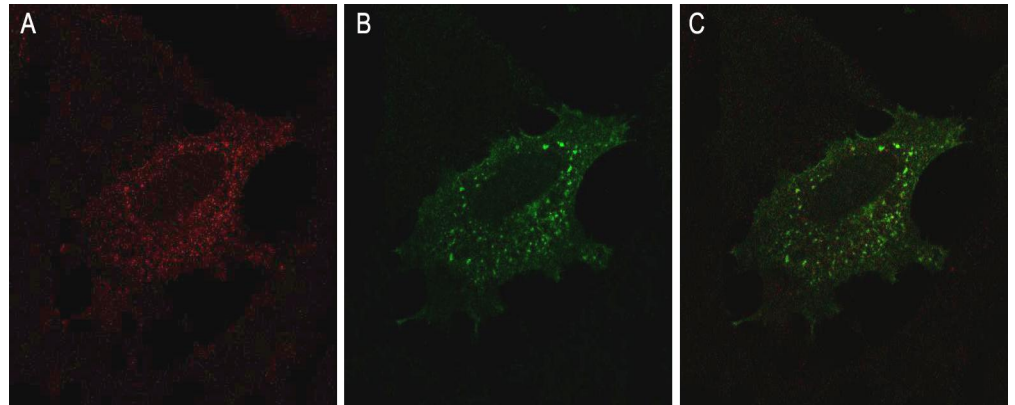
Kuvassa 17 on nsP3 Δ Prolini, jossa nsP3 on tyypillisessä fenotypissään, muodostanut aggregaatteja. Amfifysiini II on levittäytynyt soluun, joten nsP3 ja amfifysiini II eivät kolokalisoi.



Kuva 17. nsP3 Δ Prolini. A-kuvassa on amfifysiini II, B-kuvassa nsp3 ja C-kuvassa nämä on yhdistetty.

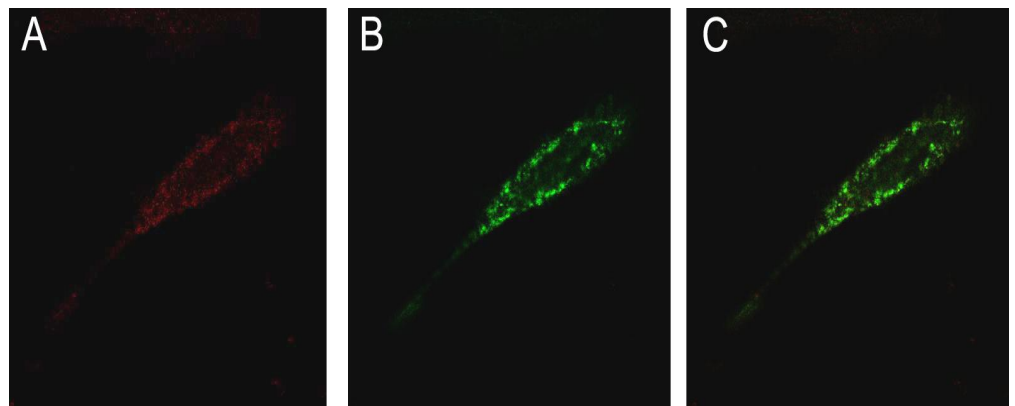
5.4 Nsp3:n C-terminuksen deleetioiden konfokaalikuvat

nsP3-deleetioiden kuvissa nsP1 on värjätty punaiseksi (Alexa 568), nsP3 vihreäksi (Alexa 488) ja lopuksi nämä on yhdistetty. Kuvien leikkeet alkavat solun pinnalta. Kuvassa 18 on $\Delta 50$ -värjäys. Solun pohjalta olevissa kuvissa nähdään kirkkaita pisteitä, joten $\Delta 50$ on mahdollisesti kiinni solukalvon pohjassa. nsP1:n antama signaali on heikompia kuin nsP3:n.



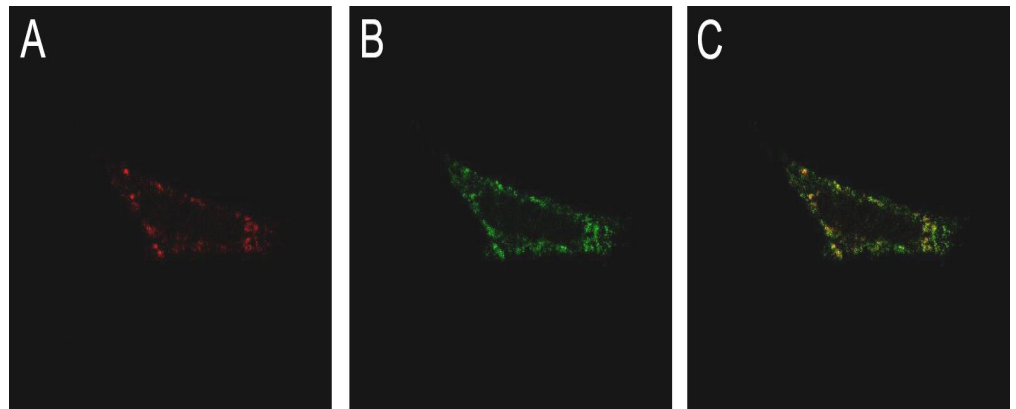
Kuva 18. $\Delta 50$ Konfokaalikuvat solun pohjalta (15/19 leike)

Kuvassa 19 on toinen $\Delta 50$ solu, jossa nsP3 on lokalisoitunut solukalvon läheisyyteen.



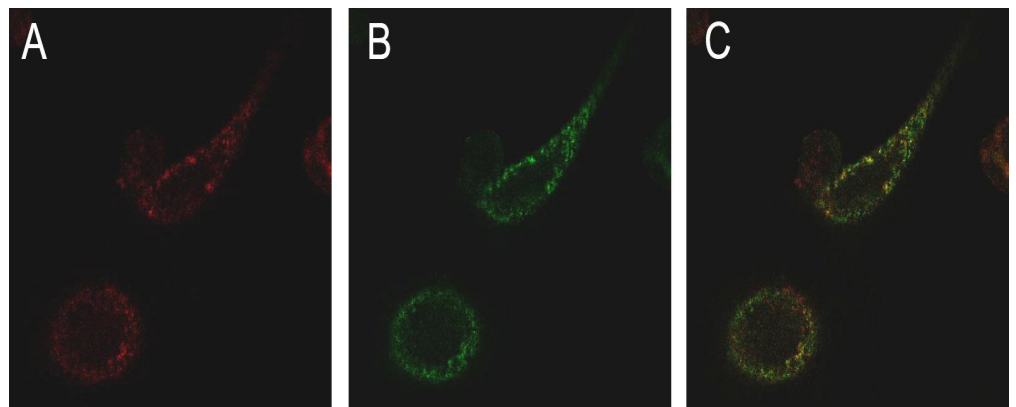
Kuva 19. $\Delta 50$ Konfokaalikuvat solun keskeltä (15/25 leike)

$\Delta 84$:n Konfokaalikuvat ovat kuvassa 20 ja niistä nähdään, että nsP3 ja nsP1 ovat kolokalisoituneet solukalvon läheisyyteen.



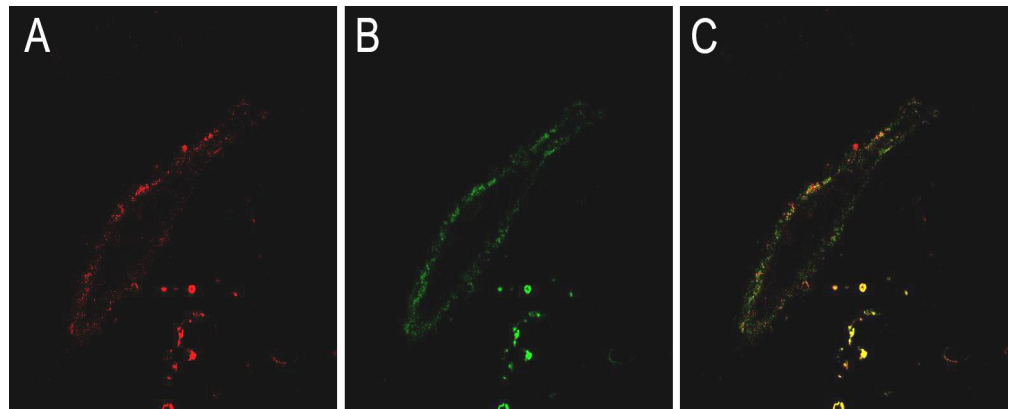
Kuva 20. $\Delta 84$ Konfokaalikuvat. Kuvat ovat solun keskeltä (18/35 leike).

$\Delta 114$:n kuvissa (kuva 21) nsP1 ja nsP3 ovat solukalvon tuntumassa, mutta näyttää kuitenkin, että ne ovat solun sisällä.



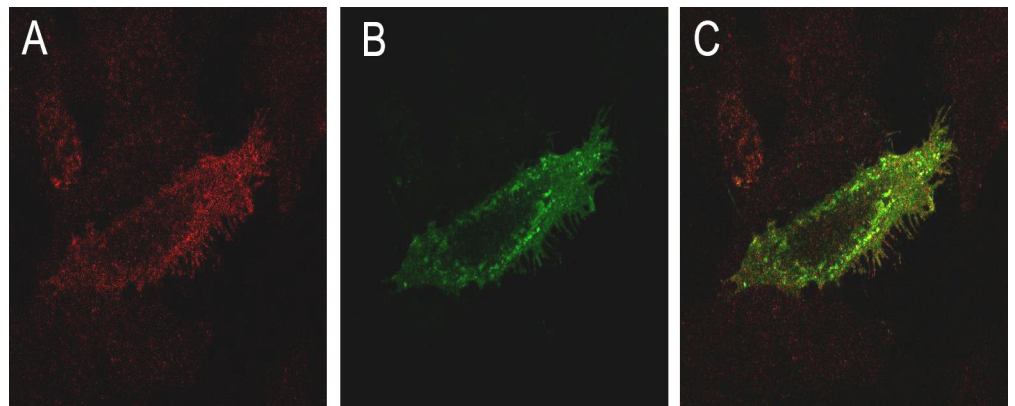
Kuva 21. $\Delta 114$ Konfokaalikuvat. Kuvat ovat solun keskeltä leikeestä 20/40.

Kuvassa 22 $\Delta 318$ solun keskeltä olevissa kuvissa näkyy kalvolla nsP1:n ja nsP3:n kolokalisaatiota.



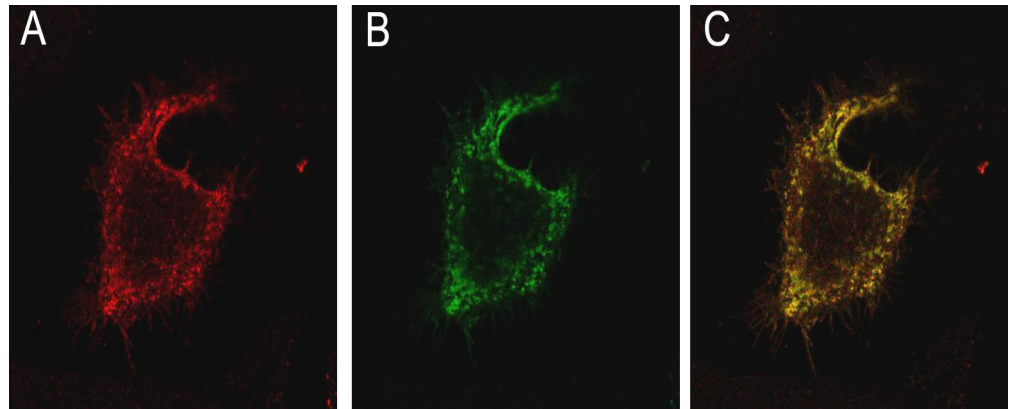
Kuva 22. $\Delta 318$ Konfkaalikuvat. Kuvat ovat solun keskeltä leike 14/26. Keskellä alhaalla olevat kirkkaan pisteet ovat epäspesifistä taustaa.

Kuvassa 23 nähdään $\Delta 318$ solun pohjalla olevia filapodeja, joita nsP1 usein muodostaa.



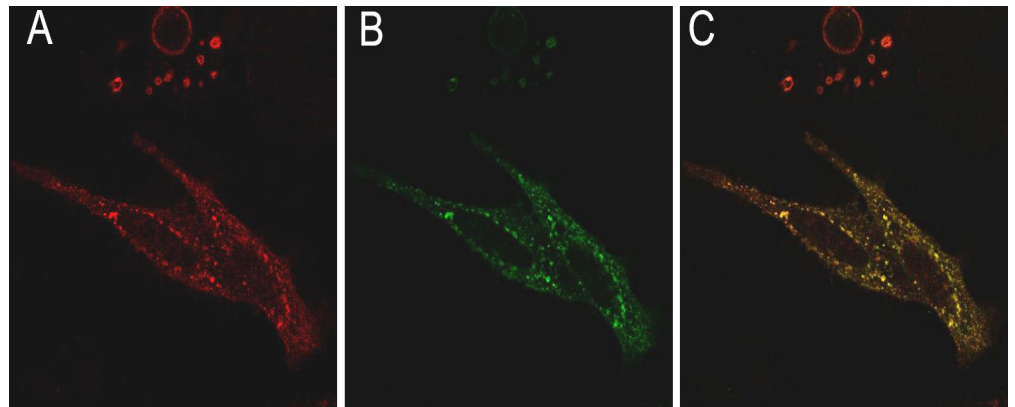
Kuva 23. $\Delta 318$ Konfokaalikuvat. Kuvat ovat solun pohjalta 21/23 leike.

Kuvassa 24 on $\Delta 368$ solu kuvattuna 38/42-leikkeestä. $\Delta 368$ on lokalisoitunut solukalvolle ja endosomeihin. Lisäksi nsP1 on muodostanut filopodeja kuten kuvassa 23.



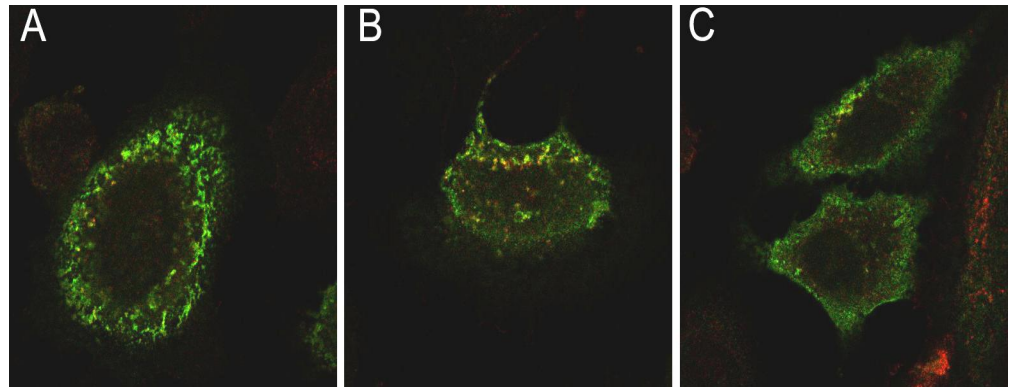
Kuva 24. $\Delta 368$ kuvattuna 38/42 -leikkeestä

$\Delta 368$:sta on toisen solun kuvat kuvassa 25. Tässä kuvassa näkyy selkeämmin kuin kuvassa 24, että $\Delta 368$ on mennyt endosomeihin.



Kuva 25. $\Delta 368$ kuvattuna 33/41 -leikkeestä

Kuvassa 26 on näytteitä P13 -villityyppi soluista. Solut ovat hyvin erilaisia ja etenkin ekspressiotasot vaihtelevat suuresti.



Kuva 26. P13 -villityypin konfokaali kuvat kolmesta näytteestä.

6 PÄÄTELMÄT

Δ Proliini-tutkimusten tarkoituksena oli selvittää, mitkä virusproteiineista (nsP1, nsP2 ja nsP3) pystyvät aiheuttamaan kolokalisaation amfifysiini II:n kanssa ja pystytäänkö tämä kolokalisaatio poistamaan Δ Proliini-mutaatiolla. Tutkimuksessa nähtiin että, amfifysiini II ja villityypit kolokalisoidivat ja Δ Proliini-mutaatioilla eivät. nsP3:n tyypillinen fenotyyppi on agregaattien muodostus soluun [10] ja tämä pystyttiin toistamaan nsP3-villityypillä ja mutaatiolla. P1'2'3:n ja P13:n pitäisi siirtyä solukalvolta endosomeihin [10; 23], mutta tätä fenotyyppiä ei pystytty toistamaan näillä konstrukteilla. Näytteissä ne olivat lähinnä levittäytyneet sattumanvaraisesti soluihin. Tuloksista voidaan päätellä, että amfifysiini II sitoutuu nimenomaan nsP3:een eikä muihin virusproteiineihin. P13-plasmidi vaikutti olevan toksinen soluille, sillä P13-näytteissä oli paljon enemmän kuolleita soluja, kuin muissa konstrukteissa. Jatkotutkimuksia varten kannattaisi ekspressiotasoa optimoida, jotta saataisiin toistettavia fenotyyppijä.

nsP3-deleetioiden tarkoituksena oli kartoittaa, mikä kohta nsP3:sta aiheuttaa viruksen siirtymisen solukalvolta endosomeihin. Tätä varten tehtiin 5 eri deleetiota: Δ 50 (aminohapot 318 - 368), Δ 84 (359 - 452), Δ 114 (359 - 366), Δ 318 (0 - 318) ja Δ 368 (0 - 368). Nämä deleetiot kloonattiin 4TO_P13-plasmidiin. Mutaatioissa nsP1-signaali oli usein heikkoa ja Δ 318- ja Δ 368-deleetioilla proteiiniekspressio taso oli korkeampi, kuin muilla konstrukteilla joten tuloksia ei voi verrata hyvin keskenään. Kuitenkin kuvien 25 (Δ 368), 23

($\Delta 318$) ja 18 ($\Delta 50$) perusteella P13 näyttäisi siirtyneen endosomeihin. Kuitenkaan saatujen tulosten perusteella ei pystytä tekemään vahvoja päätelmiä, sillä P13-villityyppi, mihin deleetioiden käyttäytymistä pitäisi verrata, ei ekspersoitunut tasaisesti ja villityypillä ei pystytty saamaan toistettavia fenotyyppisiä. Jatkotutkimuksia varten olisi tärkeää, että löydettäisiin olosuhteet, joissa villityypillä saataisiin toistettavia fenotyyppisiä. Mutaatioiden $\Delta 50$, $\Delta 84$ ja $\Delta 114$ ekspressio taso pitäisi saada korkeammaksi. Deleetiot voitaisiin kloonata P1'2'3-konstruktioon, joka ei ole niin toksinen kuin P13. Tämän avulla voitaisiin saada ekspressiotasoa korkeammaksi ja toistettavia fenotyyppisiä.

VIITELUETTELO

- [1] Neuvonen, M. 2010. Jatko-opiskelija, Biotekniikan instituutti, Helsinki. Keskustelu 5.10.2010.
- [2] Balistreri, G., (2010). Structure, Function and Intracellular Dynamics of Alphavirus Replication Complexes. Väitöskirja, Helsingin yliopisto. Helsinki: Yliopistopaino. 2010, s 45 - 46.
- [3] Domingo E., et al., Emergence and selection of RNA virus variants: memory and extinction. *Virus Res.* 2002, vol. 82, 39 - 44
- [4] Jose J., Snyder JE. & Kuhn RJ., A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* 2009, Vol. 4, s 837 - 856.
- [5] Strauss J. & Strauss E., The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. *Microbiological Reviews.* 1994, Vol. 58, s 491 - 562.
- [6] Kääriäinen L. & Ahola T., Functions of alphavirus nonstructural proteins in RNA replication. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2002, Vol 71, s 187 - 222
- [7] Helenius A., et al., On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *J. CELL BIOLOGY.* 1980, vol. 84, S 404 - 420.
- [8] Gibbons DL., et al., Multistep Regulation of Membrane Insertion of the Fusion Peptide of Semliki Forest Virus. *J Virol.* 2004, 78, s 3312 - 3318.
- [9] Kujala P., et al., Biogenesis of the Semliki Forest Virus RNA Replication Complex. *J Virol.* 2001, 75, s 3873 - 3884.
- [10] Spuul P., Cellular membranes as a playground for Semliki Forest Virus replication complex. Väitöskirja, Helsingin yliopisto. Helsinki: Yliopistopaino. 2010, s 14 - 22; 58 - 59.
- [11] Mi S. & Stollar V., Expression of Sindbis virus nsP1 and methyltransferase activity in Escherichia coli. *Virology.* 1991, 184, s 423 - 427.

- [12] Laakkonen P., et al., Expression of Semliki Forest virus nsP1-specific methyltransferase in insect cells and in *Escherichia coli*. *J Virol.* 1994, 68, s 7418 - 7425.
- [13] Ahola T. & Kääriäinen L., Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995, 92, s 507 - 511.
- [14] Ahola T., et al., The effects of palmitoylation on membrane association of Semliki forest virus RNA capping enzyme.. *J Biol Chem.* 1996, 271, s 2857 - 28571.
- [15] Ahola T., et al., Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *EMBO J.* 1999, 18, 3164 - 3172.
- [16] Gomez de Cedrón M., et al., RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. *FEBS Lett.* 1999, 1, s 19 - 22.
- [17] Karras GI., et al., The macro domain is an ADP-ribose binding module. *EMBO J.* 2005, 24, s 1911 - 1920.
- [18] Neuvonen M. & Ahola T., Differential Activities of Cellular and Viral Macro Domain Proteins in Binding of ADP-Ribose Metabolites. *J Mol Biol.* 2009, 385, s 212 - 225.
- [19] Hahn, Y.S., et al., Mapping of RNA- temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: complementation group F mutants have lesions in nsP4. *J. Virol.* 1989, 63, s 1194 - 1202.
- [20] Spring, K R. & Davidson, M W. Introduction to Fluorescence Microscopy. [verkkodokumentti, viitattu 15.10.2010]. Saatavissa: <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>.
- [21] Paddock, S W., Fellers, T J. & Davidson, Michael W. Confocal Microscopy: Basic Concepts. [verkkodokumentti, viitattu 15.10.2010]. Saatavissa: <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/confocalintrobasics.html>.

- [22] Promega. Protocols & Applications Guide: Transfection. [verkkodokumentti, viitattu 20.10.2010]. Saatavissa:
http://www.promega.com/guides/transfxn_guide/Default.htm
- [23] Vihinen H., et al., Elimination of Phosphorylation Sites of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP3. *J Biol Chem.* 2001, 276, s 5745-5752.

SEKVENSSIRINNASTUKSET

Δ318 sekvenssi rinnastus

>lcl|5415 C1_12.5
Length=1131

Score = 915 bits (495), Expect = 0.0
Identities = 495/495 (100%), Gaps = 0/495 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 2651 GTTAGTCCGCGGAAGTATGCCGCATCTACGACGGACCACTCAGATCGGTCGTTACGAGGG 2710
          |||
Sbjct 172 GTTAGTCCGCGGAAGTATGCCGCATCTACGACGGACCACTCAGATCGGTCGTTACGAGGG 231

Query 2711 TTTGACTTGGACTGGACCACCGACTCGTCTTCCACTGCCAGCGATAACCATGTCGCTACCC 2770
          |||
Sbjct 232 TTTGACTTGGACTGGACCACCGACTCGTCTTCCACTGCCAGCGATAACCATGTCGCTACCC 291

Query 2771 AGTTTGCAGTCGTGTGACATCGACTCGATCTACGAGCCAATGGCTCCCATAGTAGTGACG 2830
          |||
Sbjct 292 AGTTTGCAGTCGTGTGACATCGACTCGATCTACGAGCCAATGGCTCCCATAGTAGTGACG 351

Query 2831 GCTGACGTACACCCTGAACCCGACGATCGCGGACCTGGCGGCAGATGTGCATCCTGAA 2890
          |||
Sbjct 352 GCTGACGTACACCCTGAACCCGACGATCGCGGACCTGGCGGCAGATGTGCATCCTGAA 411

Query 2891 CCCGCAGACCATGTGGACCTCGAGAACCCGATTCTCCACCGCGCCGAAGAGAGCTGCA 2950
          |||
Sbjct 412 CCCGCAGACCATGTGGACCTCGAGAACCCGATTCTCCACCGCGCCGAAGAGAGCTGCA 471

Query 2951 TACCTTGCCTCCCGCGCGGGAGCGACCGGTGCCGCGCCGAGAAAGCCGACGCCTGCC 3010
          |||
Sbjct 472 TACCTTGCCTCCCGCGCGGGAGCGACCGGTGCCGCGCCGAGAAAGCCGACGCCTGCC 531

Query 3011 CCAAGGACTGCGTTTAGGAACAAGCTGCCTTTGACGTTTCGGCGACTTTGACGAGCACGAG 3070
          |||
Sbjct 532 CCAAGGACTGCGTTTAGGAACAAGCTGCCTTTGACGTTTCGGCGACTTTGACGAGCACGAG 591

Query 3071 GTCGATGCGTTGGCCTCCGGGATTACTTTCCGAGACTTCGACGACGTCCTGCGACTAGGC 3130
          |||
Sbjct 592 GTCGATGCGTTGGCCTCCGGGATTACTTTCCGAGACTTCGACGACGTCCTGCGACTAGGC 651

Query 3131 CGCGCGGGTGCATAA 3145
          |||
Sbjct 652 CGCGCGGGTGCATAA 666

```

Score = 313 bits (169), Expect = 2e-88
Identities = 169/169 (100%), Gaps = 0/169 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1529 ATACCTGTTCTCGACGCGTCGTCAGCCAGGGATGCTGAACAAGAGGAGAAGGAGAGGTTG 1588
          |||
Sbjct 4 ATACCTGTTCTCGACGCGTCGTCAGCCAGGGATGCTGAACAAGAGGAGAAGGAGAGGTTG 63

Query 1589 GAGGCCGAGCTGACTAGAGAAGCCTTACCACCCCTCGTCCCATCGCGCCGCGGAGACG 1648
          |||
Sbjct 64 GAGGCCGAGCTGACTAGAGAAGCCTTACCACCCCTCGTCCCATCGCGCCGCGGAGACG 123

Query 1649 GGAGTCGTCGACGTCGACGTTGAAGAAGTAGAGTATCACGCAGGTGCAG 1697
          |||
Sbjct 124 GGAGTCGTCGACGTCGACGTTGAAGAAGTAGAGTATCACGCAGGTGCAG 172

```

Δ 368 Sekvenssi rinnastus

>lcl|28789 C5_12.5
Length=1140

Score = 638 bits (345), Expect = 0.0
Identities = 345/345 (100%), Gaps = 0/345 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 2801 TACGAGCCAATGGCTCCCATAGTAGTGACGGCTGACGTACACCCTGAACCCGAGGCATC 2860
          |||
Sbjct 172 TACGAGCCAATGGCTCCCATAGTAGTGACGGCTGACGTACACCCTGAACCCGAGGCATC 231

Query 2861 GCGGACCTGGCGGCAGATGTGCATCCTGAACCCGAGACCATGTGGACCTCGAGAACCCG 2920
          |||
Sbjct 232 GCGGACCTGGCGGCAGATGTGCATCCTGAACCCGAGACCATGTGGACCTCGAGAACCCG 291

Query 2921 ATTCCTCCACCGGCCCGAAGAGAGCTGCATACCTTGCCTCCCGCGCGGGGAGCGACCG 2980
          |||
Sbjct 292 ATTCCTCCACCGGCCCGAAGAGAGCTGCATACCTTGCCTCCCGCGCGGGGAGCGACCG 351

Query 2981 GTGCCGGCGCCGAGAAAGCCGACGCCTGCCCAAGGACTGCGTTTAGGAACAAGCTGCCT 3040
          |||
Sbjct 352 GTGCCGGCGCCGAGAAAGCCGACGCCTGCCCAAGGACTGCGTTTAGGAACAAGCTGCCT 411

Query 3041 TTGACGTTTCGGCGACTTTGACGAGCACGAGGTCGATGCGTTGGCTCCGGGATTACTTTC 3100
          |||
Sbjct 412 TTGACGTTTCGGCGACTTTGACGAGCACGAGGTCGATGCGTTGGCTCCGGGATTACTTTC 471

Query 3101 GGAGACTTCGACGACGTCCTGCGACTAGGCCGCGCGGGTGCATAA 3145
          |||
Sbjct 472 GGAGACTTCGACGACGTCCTGCGACTAGGCCGCGCGGGTGCATAA 516

```

Score = 311 bits (168), Expect = 7e-88
Identities = 168/168 (100%), Gaps = 0/168 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1529 ATACCTGTTCTCGACGCGTCGTCAGCCAGGGATGCTGAACAAGAGGAGAAGGAGAGTTG 1588
          |||
Sbjct 4 ATACCTGTTCTCGACGCGTCGTCAGCCAGGGATGCTGAACAAGAGGAGAAGGAGAGTTG 63

Query 1589 GAGGCCGAGCTGACTAGAGAAGCCTTACCACCCCTCGTCCCATCGCGCCGCGGAGACG 1648
          |||
Sbjct 64 GAGGCCGAGCTGACTAGAGAAGCCTTACCACCCCTCGTCCCATCGCGCCGCGGAGACG 123

Query 1649 GGAGTCGTCGACGTCGACGTTGAAGAACTAGAGTATCACGCAGGTGCA 1696
          |||
Sbjct 124 GGAGTCGTCGACGTCGACGTTGAAGAACTAGAGTATCACGCAGGTGCA 171

```

$\Delta 50$ Sekvenssi rinnastus

>lcl|10809 C2_F9
Length=1127

Score = 638 bits (345), Expect = 0.0
Identities = 345/345 (100%), Gaps = 0/345 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 2801 TACGAGCCAATGGCTCCCATAGTAGTGACGGCTGACGTACACCCTGAACCCGCAGGCATC 2860
          |||
Sbjct 219 TACGAGCCAATGGCTCCCATAGTAGTGACGGCTGACGTACACCCTGAACCCGCAGGCATC 278

Query 2861 GCGGACCTGGCGGCAGATGTGCATCCTGAACCCGCAGACCATGTGGACCTCGAGAACCCG 2920
          |||
Sbjct 279 GCGGACCTGGCGGCAGATGTGCATCCTGAACCCGCAGACCATGTGGACCTCGAGAACCCG 338

Query 2921 ATTCCTCCACCGCGCCGAAGAGAGCTGCATACCTTGCCCTCCCGCGCGGGGAGCGACCG 2980
          |||
Sbjct 339 ATTCCTCCACCGCGCCGAAGAGAGCTGCATACCTTGCCCTCCCGCGCGGGGAGCGACCG 398

Query 2981 GTGCCGGCGCCGAGAAAGCCGACGCCTGCCCAAGGACTGCGTTTAGGAACAAGCTGCCT 3040
          |||
Sbjct 399 GTGCCGGCGCCGAGAAAGCCGACGCCTGCCCAAGGACTGCGTTTAGGAACAAGCTGCCT 458

Query 3041 TTGACGTTTCGGCGACTTTGACGAGCACGAGGTCGATGCGTTGGCCTCCGGGATTACTTTC 3100
          |||
Sbjct 459 TTGACGTTTCGGCGACTTTGACGAGCACGAGGTCGATGCGTTGGCCTCCGGGATTACTTTC 518

Query 3101 GGAGACTTCGACGACGTCCTGCGACTAGGCCGCGCGGGTGCATAA 3145
          |||
Sbjct 519 GGAGACTTCGACGACGTCCTGCGACTAGGCCGCGCGGGTGCATAA 563

```

Score = 388 bits (210), Expect = 3e-111
Identities = 213/214 (99%), Gaps = 1/214 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 2437 GGTGAACGATTCCGATTCATCAACACCTCCAGGACAGTGCCTGCCTGTGCGCTACGC 2496
          |||
Sbjct 6 GGT-AACGATTCCGATTCATCAACACCTCCAGGACAGTGCCTGCCTGTGCGCTACGC 64

Query 2497 AATGACAGCAGAACGGATCGCCCGCCTTAGGTCACACCAAGTTAAAAGCATGGTGGTTTG 2556
          |||
Sbjct 65 AATGACAGCAGAACGGATCGCCCGCCTTAGGTCACACCAAGTTAAAAGCATGGTGGTTTG 124

Query 2557 CTCATCTTTTCCCCTCCCGAAATACCATGTAGATGGGGTGCAGAAGGTAAAGTGCAGAA 2616
          |||
Sbjct 125 CTCATCTTTTCCCCTCCCGAAATACCATGTAGATGGGGTGCAGAAGGTAAAGTGCAGAA 184

Query 2617 GGTTCTCCTGTTCGACCCGACGGTACCTTCAGTG 2650
          |||
Sbjct 185 GGTTCTCCTGTTCGACCCGACGGTACCTTCAGTG 218

```


Δ84 Sekvenssi Rinnastus

>lcl|3719 C4_3_F9

Length=1143

Score = 656 bits (355), Expect = 0.0

Identities = 358/359 (99%), Gaps = 1/359 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 39  ACGATTCCGATTCATCAACACCTCCCAGGACAGTGCCTGCCTGTGCCGCTACGCAATGA 98
          |||
Sbjct 9   ACGATTCCGATTCATC-ACACCTCCCAGGACAGTGCCTGCCTGTGCCGCTACGCAATGA 67

Query 99  CAGCAGAACGGATCGCCCGCCTTAGGTCACACCAAGTTAAAAGCATGGTGGTTTGCTCAT 158
          |||
Sbjct 68  CAGCAGAACGGATCGCCCGCCTTAGGTCACACCAAGTTAAAAGCATGGTGGTTTGCTCAT 127

Query 159 CTTTTCCCCTCCCAGAAATACCATGTAGATGGGGTGCAGAAGGTAAAGTGCGAGAAGGTTC 218
          |||
Sbjct 128 CTTTTCCCCTCCCAGAAATACCATGTAGATGGGGTGCAGAAGGTAAAGTGCGAGAAGGTTC 187

Query 219 TCCTGTTCGACCCGACGGTACCTTCAGTGGTTAGTCCGCGGAAGTATGCCGCATCTACGA 278
          |||
Sbjct 188 TCCTGTTCGACCCGACGGTACCTTCAGTGGTTAGTCCGCGGAAGTATGCCGCATCTACGA 247

Query 279  CGGACCACTCAGATCGGTCGTTACGAGGGTTTGACTTGGACTGGACCACCGACTCGTCTT 338
          |||
Sbjct 248  CGGACCACTCAGATCGGTCGTTACGAGGGTTTGACTTGGACTGGACCACCGACTCGTCTT 307

Query 339  CCACTGCCAGCGATACCATGTGCTACCCAGTTTGCAGTCGTGTGACATCGACTCGATC 397
          |||
Sbjct 308  CCACTGCCAGCGATACCATGTGCTACCCAGTTTGCAGTCGTGTGACATCGACTCGATC 366

```

Score = 169 bits (91), Expect = 1e-45

Identities = 91/91 (100%), Gaps = 0/91 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 649  CGACTTTGACGAGCAGGAGGTCGATGCGTTGGCCTCCGGGATTACTTTCCGAGACTTCGA 708
          |||
Sbjct 366  CGACTTTGACGAGCAGGAGGTCGATGCGTTGGCCTCCGGGATTACTTTCCGAGACTTCGA 425

Query 709  CGACGTCCTGCGACTAGGCCGCGGGGTGCA 739
          |||
Sbjct 426  CGACGTCCTGCGACTAGGCCGCGGGGTGCA 456

```

>lcl|6521 C4_12.5

Length=1139

Score = 1941 bits (1051), Expect = 0.0

Identities = 1126/1158 (98%), Gaps = 22/1158 (1%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 29  ATA-CCTGTTCTCGACGCGTCGTAGCCAGGGATGCTGAACAAGAGGAGAAGGAGAGGTT 87
          |||
Sbjct 2   ATATCCTGTTCTCGACGCGTCGTAGCCAGGGATGCTGAACAAGAGGAGAAGGAGAGGTT 61

Query 88  GGAGGCCGAGCTGACTAGAGAAGCCTTACCACCCCTCGTCCCATCGCGCCGGCGGAGAC 147
          |||
Sbjct 62  GGAGGCCGAGCTGACTAGAGAAGCCTTACCACCCCTCGTCCCATCGCGCCGGCGGAGAC 121

Query 148 GGGAGTCGTCGACGTCGACGTTGAAGAACTAGAGTATCACGCAGGTGCAGCACCATCCTA 207
          |||
Sbjct 122 GGGAGTCGTCGACGTCGACGTTGAAGAACTAGAGTATCAGGCAGGTGCAGCACCATCCTA 181

Query 208  CAGAGTTAAGAGAGCAGACATAGCCACGTGCACAGAAGCGGCTGTGGTTAACGCAGCTAA 267
          |||
Sbjct 182  CAGAGTTAAGAGAGCAGACATAGCCACGTGCACAGAAGCGGCTGTGGTTAACGCAGCTAA 241

Query 268  CGCCCGTGGAAGTGTAGGGGATGGCGTATGCAGGGCCGTGGCGAAGAAATGGCCGTGACG 327
          |||
Sbjct 242  CGCCCGTGGAAGTGTAGGGGATGGCGTATGCAGGGCCGTGGCGAAGAAATGGCCGTGACG 301

Query 328  CTTTAAGGGAGAAGCAACACCAGTGGGCACAATTAACAGTCATGTGCGGCTCGTACCC 387
          |||

```

```

Sbjct 302 CTTTAAGGGAGAAGCAACACCAGTGGGCACAATTA AAAACAGTCATGTGCGGCTCGTACCC 361
Query 388 CGTCATCCACGCTGTAGCGCCTAATTTCCTCTGCCACGACTGAAGCGGAAGGGGACCGCGA 447
          |||
Sbjct 362 CGTCATCCACGCTGTAGCGCCTAATTTCCTCTGCCACGACTGAAGCGGAAGGGGACCGCGA 421
Query 448 ATTGGCCGCTGTCTACCGGGCAGTGGCCGCCGAAGTAAACAGACTGTCACTGAGCAGCGT 507
          |||
Sbjct 422 ATTGGCCGCTGTCTACCGGGCAGTGGCCGCCGAAGTAAACAGACTGTCACTGAGCAGCGT 481
Query 508 AGCCATCCCGCTGCTGTCCACAGAGTGTTCAGCGCGGAAGAGATAGGCTGCAGCAATC 567
          |||
Sbjct 482 AGCCATCCCGCTGCTGTCCACAGAGTGTTCAGCGCGGAAGAGATAGGCTGCAGCAATC 541
Query 568 CCTCAACCATCTATTACAGCAATGGACGCCACGGACGCTGACGTGACCATCTACTGCAG 627
          |||
Sbjct 542 CCTCAACCATCTATTACAGCAATGGACGCCACGGACGCTGACGTGACCATCTACTGCAG 601
Query 628 AGACAAAAGTTGGGAGAAGAAAATCCAGGAAGCCATAGACATGAGGACGGCTGTGGAGTT 687
          |||
Sbjct 602 AGACAAAAGTTGGGAGAAGAAAATCCAGGAAGCCATAGACATGAGGACGGCTGTGGAGTT 661
Query 688 GCTCAATGATGACGTGGAGCTGACCACAGACTTGGTGAGAGTGCACCCGGACAGCAGCCT 747
          |||
Sbjct 662 GCTCAATGATGACGTGGAGCTGACCACAGACTTGGTGAGAGTGCACCCGGACAGCAGCCT 721
Query 748 GGTGGGTCGTAAGGGCTACAGTACCCTGACGGGTCGCTGTACTCGTACTTTGAAGGTAC 807
          |||
Sbjct 722 GGTGGGTCGTAAGGGCTACAGTACCCTGACGGGTCGCTGTACTCGTACTTTGAAGGTAC 781
Query 808 GAAATCAACCAGGCTGCTATTGATATGGCAGAGATACTGACGTTGTGGCCAGACTGCA 867
          |||
Sbjct 782 GAAATCAACCAGGCTGCTATTGATATGGCAGAGATACTGACGTTGTGGCCAGACTGCA 841
Query 868 AGAGGCAAACGAACAGATATGCCTATACGCGCTGGGCGAAACAATGGACAACATCAGATC 927
          |||
Sbjct 842 AGAGGCAAACGAACAGATATGCCTATACGCGCTGGGCGAAACAATGGACAACATCAGATC 901
Query 928 CAAATGTCCGGTGAACGATTCCGATTCATCAACACCTCCAGGACAGTGCCCTGCCTGTG 987
          |||
Sbjct 902 CAAATGTCCGGTGAACGATTCCGATTCATCAACACCTCCAGGACAGTGCC-TGCCTGTG 960
Query 988 CCGCTACGCAATGACAGCAGAACGGATCGCCCGCCTTAGGTCACACCAAGTTAAAAGCAT 1047
          |||
Sbjct 961 CCGCTACGCAATGACAGCAGAACGGATCGCCCGCCT-AGGTCACACCAAGTGAA--GCAT 1016
Query 1048 GGTGGTTTGCTCATCTTTTCCCTCCCGAAATACCATGTAGATGGGGTGCAGAAGGTAAA 1107
          |||
Sbjct 1017 GGTGGTT-GCTCATCTCT-CCCTCC-GAA-TACCATGTAGATGGGGTGCAGACG-TA-- 1069
Query 1108 GTGCGAGAAGGTTCTCCTGTTGACCCGACGGTACCTTCAGTGGTTAGTCCGCGGAAGTA 1167
          |||
Sbjct 1070 GTGCGAGCACGTTCTTCTGT-CGAC--GACGGTACGT-CA-TGGT-AGTC-GCGGAA-TC 1121
Query 1168 T-GCCGCATCTACGACGG 1184
          |||
Sbjct 1122 TTGCCGAATCTACGACGG 1139

```