

**PIKORNAVIRUSTEN KÄYTTÖ GEENIVEKTOREINA JA
SYÖPÄTERAPIASSA**

SEKÄ

**COXSACKIEVIRUS A7 -ISOLAATTIEN
SEKVENSSIANALYYSI**

Pro gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Biokemian ja elintarvikekemian laitos
Biokemia
Kesäkuu 2011

Jani Ylä-Pelto

TURUN YLIOPISTO
Biokemian ja elintarvikekemian laitos
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

YLÄ-PELTO, JANI: Pikornavirusten käyttö geenivektoreina ja syöpäterapiassa
sekä Coxsackievirus A7 -isolaattien sekvenssianalyysi

Pro gradu -tutkielma, 75 s., 12 liites.
Biokemia
Kesäkuu 2011

Kirjallisessa osassa tarkasteltiin pikornavirusten käyttöä geenivektoreina ja syöpäterapiassa. Pikornavirukset ovat positiivissäikeisiä RNA-virusia, ja niiden genomi koostuu rakenteellisista kuoriproteiineista VP1-VP4 sekä ei-rakenteellisista proteiineista 2A-2C ja 3A-3D. Geenivektoritutkimukset ovat keskittyneet erilaisten inserttien kloonamiseen virusten VP1-VP4-alueelle ja genomien 5'-päähän sekä näiden muutosten vaikutusten seuraamiseen virusten elinkierrossa solu- ja hiirimalleissa. Geenivektoreina on parhaiten toimineet coxsackievirukset B3, B4 ja A9 sekä mengo- ja poliovirus. Niitä on käytetty hiirissä mm. neuronien motorisen BDNF-reseptorin ilmentämiseen sekä hiiren interleukiini-10:n tuottamiseen selkäydinkanavan vaurioiden korjaamiseksi. Syöpäterapiatutkimuksissa on saatu lupaavia tuloksia coxsackieviruksilla A21, A13, A15 ja A18 sekä echo-, Seneca Valley 001- ja EMCV-viruksilla. Viruksilla on saatu mm. rintasyövän pääkasvain ja metastasoituneet etäpesäkkeet häviämään sekä eturauhassyövän kasvaimia pienemään. Seneca Valley 001 -virus on osoittautunut tehokkaaksi syöpiä vastaan, joilla on neuroendokriinisiä ominaisuuksia. Viruksen käyttämistä faasi 2:n kliinisiin kokeisiin ollaan parhaillaan suunnittelemassa pienisoluisen keuhkosityövän ja lasten neuroendokriinisen syövän kohdalla.

Kokeellisessa osassa optimoitiin RT-PCR-menetelmä coxsackievirus A7:n (CV-A7) genomien tuottamiseksi PCR-reaktiolla (FL-PCR). FL-PCR:n optimointi tehtiin vektoreilla, joihin oli kloonattu CV-A7-USSR- (USSR-pcDNA3) ja CV-A7-Parker-isolaattien (Parker-TA) genomit. Menetelmää käytettiin myöhemmin muiden CV-A7-virusisolaattien (275/58, ET1080 ja SVK) tutkimiseen. Näistä isolaateista eristettiin virus-RNA, joka käännettiin cDNA:ksi RT-entsyymillä. PCR:ssä käytetyt, CV-A7-spesifiset koettimet oli suunniteltu aiemmin sekvensoidun CV-A7-sekvenssin (GenBank AY421765) pohjalta. Infektiivisen kloonin tuottamiseksi USSR-pcDNA3- ja Parker-TA-vektoreista tuotettiin PCR:n avulla (T7-PCR) virusgenomin sisältävä DNA-jakso, jonka 5'-päähän muodostui alukkeiden avulla T7RNA-polymeraasipromootori ja 3'-päähän polyA-häntä. Työssä myös sekvenssoitiin ja analysoitiin CV-A7-virusisolaatit Parker, USSR, 275/58, ET1080 ja SVK sekä kloonattiin täyspitkiä virusgenomeja cDNA-muodossa mutaatiokokeita varten.

FL-PCR:n optimointi onnistui, ja neljä viidestä CV-A7-isolaatista sekvenssoitiin. Virusgenomien pituus vaihteli 7403–7405 nt:n välillä. CV-A7-ET1080, -Parker ja -USSR osoittautuivat yli 99 % ja CV-A7-275/58 82,6 % nt samankaltaisiksi koko genomien pituudelta AY421765:en suhteen. Yksittäisten geenien ja proteiinien osalta CV-A7-275/58 oli 75,8–90,4 % nt ja 93,7–98,8 % aa samankaltainen muiden suhteen. Simplot-analyysissä 3B-geenialue oli heterogeenisin. CV-A7-SVK-isolaatti osoittautui echovirus kolmeksi. Infektiivistä kloonaa ei saatu tuotettua T7-PCR-tuotteista.

Avainsanat: coxsackievirus, PCR, pikornavirus, sekvenssointi, syöpäterapia, virusvektori

Kiitokset rakkaalle Veeralle kaikesta tuesta ja kannustuksesta, Petri Sudelle erinomaisesta ohjauksesta, Tainalle ja Matille oikoluvusta sekä koko Virusopin väelle mukavasta erikoistyöajasta.

Sisältö

I Kirjallinen osa

Pikornavirusten käyttö geenivektoreina ja syöpäterapiassa

Tiivistelmä.....	2
1 Pikornavirusten taksonomia, rakenne ja elinkierto.....	4
2 Virusvektorit.....	7
2.1 Pikornavirusvektorit.....	10
3 Pikornavirusgeenivektorien kloonaustrategiat.....	13
3.1 Poliovirusvektorit.....	13
3.2 Coxsackievirusvektorit.....	16
3.2.1 Coxsackievirus B3 (CV-B3).....	16
3.2.2 Coxsackievirus B4 (CV-B4).....	18
3.2.3 Coxsackievirus A9 (CV-A9).....	19
3.3 Mengovirusvektorit.....	20
4 Pikornavirukset ja syöpäterapia.....	21
4.1 Ihmiselle infektiiviset virukset.....	21
4.1.1 Coxsackievirus 21 (CV-A21).....	21
4.1.2 Echovirus 1 (EV1).....	23
4.1.3 Coxsackievirus A13, A15 ja A18 (CV-A13, -A15 ja -A18).....	23
4.2 Eläinperäiset virukset.....	24
4.2.1 Seneca Valley Virus 001 (SVV-001).....	24
4.2.2 Enkefalomyokardiittivirus (EMCV).....	25
5 Yhteenveto.....	27

II Kokeellinen osa

Coxsackievirus A7 -isolaattien sekvenssianalyysi

Tiivistelmä.....	29
1 Johdanto.....	30
1.1 Enterovirusten rakenne ja genomi.....	30
1.2 Coxsackievirus.....	32
1.3 Erikoistyön tavoitteet.....	33
2 Materiaalit ja menetelmät.....	34
2.1 Virukset ja plasmidit.....	34
2.2 Virusten kasvatus syöpäsolulinjoissa.....	37
2.3 Virusten eristys ja käänteistranskriptaasireaktio.....	37
2.4 Pitkä PCR.....	39
2.5 Virusten sekvensointi ja sekvenssianalyysi.....	41
2.6 T7RNA-polymeraasin promoottorialueen ja polyA-hännän tuottaminen infektiivistä kloonista varten USSR-pcDNA3- ja Parker-TA-vektoreista.....	41
2.7 Infektiivisen kloonin tuotto syöpäsoluissa.....	42
3 Tulokset.....	43
3.1 Pitkä PCR.....	43
3.2 Sekvenssianalyysi.....	44
3.3 CV-A7-SVK-isolaatti.....	49
3.4 Infektiivisen kloonin tuotto.....	49

4 Pääteimat	50
4.1 Pitkä PCR	50
4.2 Sekvenssianalyysi	51
4.3 CV-A7-SVK-isolaatti	54
4.4 Infektiivisen kloonin tuotto	56
Kirjallisuus	57
Liite 1	64
Liite 2	73

Lyhenteet

3'-NTR	3'-pään koodaamaton alue, <i>3'-nontranslated region</i>
5'-NTR	5'-pään koodaamaton alue, <i>5' nontranslated region</i>
aa	aminohappo, <i>amino acid</i>
AGMK	<i>african green monkey kidney</i>
APC	<i>adenoidal-pharyngeal-conjunctivis virus</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BDNF	<i>brain derived neurotropic factor</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	lehmän seerumin albumiini, <i>bovine serum albumin</i>
CAR	coxsackie-adenovirusreseptori, <i>coxsackie-adenovirus receptor</i>
CCRCC	<i>clear-cell renal cell carcinoma</i>
cDNA	kopio-DNA, <i>copy DNA</i>
CPE	sytopaattinen efekti, <i>cytopathogenic effect</i>
CRE	cis-reaktiivinen RNA-elementti, <i>cis-reactive RNA element</i>
CTL	sytotoksinen T-lymfosyytti, <i>cytotoxic T-lymphocyte</i>
CV-A	coxsackievirus A
CV-B	coxsackievirus B
Da	dalton
DAF	<i>decay accelerating factor</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoksiribonukleiinihappo, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DOC	deoksikoolihappo, <i>deoxycholic acid</i>
EBI	<i>European Bioinformatics Institute</i>
eGFP	tehostettu vihreää fluoresoiva proteiini, <i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EMCV	enkefalomyokardiittivirus, <i>encephalomyocarditis virus</i>
EV	echovirus, <i>echovirus</i>
EV	enterovirus
FCS	vasikan sikiön seerumi, <i>fetal calf serum</i>
FL-PCR	pitkä PCR, <i>full-length PCR</i>
FMDV	suu- ja sorkkatautivirus, <i>foot-and-mouth disease virus</i>
GFP	vihreää fluoresoiva proteiini, <i>green fluorescent protein</i>
HCAEC	<i>primary human cardiac artery endothelial cells</i>
HEPES	N-2-hydroksietyylipiperatsiini-N'-2-etaanisulfonihappo, <i>N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid</i>
HEV	<i>Ihmisen enterovirus, Human enterovirus</i>
HIF-alfa	<i>hypoxia-inducible factor alfa</i>
HIV	ihmisen immunokatovirus, <i>human immunodeficiency virus</i>
HPV	ihmisen papillomavirus, <i>human papillomavirus</i>
HRV	ihmisen rinovirus, <i>human rhinovirus</i>
i.p.	vatsaonteloon, <i>intraperitoneally</i>
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule 1</i>
ICTV	Kansainvälinen virustaksonomiakomitea, <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IRES	sisäinen ribosomin sitoutumiskohta, <i>internal ribosome entry site</i>
knt	kilonukleotidi

L	leader-proteiini, <i>leader protein</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MCS	kloonausalue, <i>multiple cloning site</i>
MFHF	<i>murine fetal heart fibroblast</i>
mIL-10	hiiren interleukiini-10, <i>mouse interleukin-10</i>
MM	pahanlaatuinen melanooma, <i>malignant melanoma</i>
mRNA	lähetti-RNA, <i>messenger RNA</i>
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NP-40	Nonidet P-40 detergentti, oktyylifenoksipolyetoksietanoli <i>octylphenoxypolyethoxyethanol</i>
nt	nukleotidi
ORF	avoin lukukehys, <i>open reading frame</i>
p.i.	infektion jälkeen, <i>post infection</i>
Panc-1	<i>human pancreatic ductal tumor cells</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos, <i>phosphate buffered saline</i>
PCC	<i>primary cleavage cassette</i>
PCR	polymeraasiketjureaktio, <i>polymerase chain reaction</i>
PV	poliovirus
PVR	poliovirusreseptori, <i>poliovirus receptor</i>
RD	rhabdomyosarkooma, <i>rhabdomyosarcoma</i>
RNA	ribonukleiinihappo, <i>ribonucleic acid</i>
RT	käänteistranskriptaasi, <i>reverse transcriptase</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SIV	apinan immunokatovirus, <i>simian immunodeficiency virus</i>
SVV	Seneca Valley -virus, <i>Seneca Valley virus</i>
THL	Terveysten ja hyvinvoinnin laitos
VHL	von Hippel-Landau syöpäsolujen toimintaa ehkäisevä proteiini, <i>von Hippel- Landau tumor suppressor protein</i>
VP	viruksen kuoriproteiini, <i>viral protein</i>
VPg	<i>viral protein genome linked</i>
WHO	Maailman terveysjärjestö, <i>World Health Organization</i>

I Kirjallinen osa

Pikornavirusten käyttö geenivektoreina ja syöpäterapiassa

Tiivistelmä

Pikornaviruksiin kuuluu monia merkittäviä ihmiselle patogeenisiä viruksia kuten poliovirus, tavallista flunssaa aiheuttava rinovirus sekä aseptista meningiittiä yleisimmin aiheuttavat coxsackievirukset. Pikornavirusten positiivissäikeinen RNA-genomi koostuu rakenteellisista VP1-VP4-kuoriproteiineista ja ei-rakenteellisista 2A-2C- ja 3A-3D-proteiineista, jotka edesauttavat viruksen infektiota ja replikaatiota. Genomia ympäröi VP-proteiineista muodostuva proteiinkuori, joka on malliltaan ikosahedrinen. Partikkeli muodostuu neljän VP-proteiinin alayksiköistä, joita on kussakin partikkelissa 60 kappaletta. Nämä muodostavat järjestäytyneen viruskuoren.

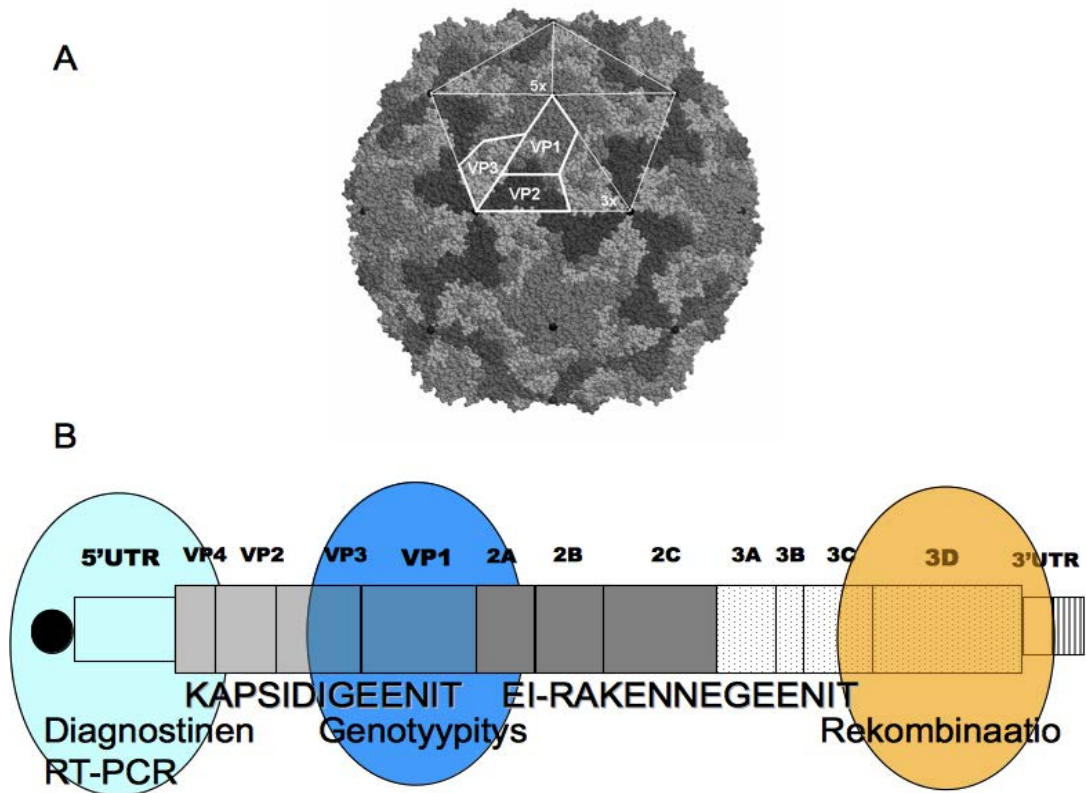
Pikornavirusten genomeja on muokattu sekä virustutkimuksellisista syistä että geenivektoritarkoituksiin. Yksittäisiä virustyypejä on kokeiltu myös geeni- ja syöpäterapiassa sekä natiivissa että muokatussa muodossa. Tutkimukset ovat keskittyneet erilaisten inserttien kloonaukseen virusten VP1-VP4-geenialueille ja genomien 5'-päähän sekä näiden muutosten vaikutusten seuraamiseen virusten elinkierrossa solu- ja hiirimalleissa. Insertin kloonauksen virusgenomiin voidaan tehdä eri tavoin: 5'-NTR-alueen ja ensimmäisen rakenneproteiinin, VP4:n tai VP1- ja 2A-proteiinien väliin käyttäen 2A^{pro}/3D^{pro}-katkaisusekvenssejä insertin ympärillä. Näissä tapauksissa insertin koodaama proteiinituote vapautuu virusrakenteesta. Proteiinien epitooppeja on yritetty ilmentää myös viruksen pinnalla, fuusiona rakenneproteiiniin. Tutkimuksissa on havaittu, että muun muassa insertin koko ja rakenne sekä tuottosolut vaikuttavat insertin ilmentymiseen sekä virusten tuottoon. Muokattuja poliovirusvektoreita on testattu vaihtelevalla menestyksellä hiirissä. Niitä on mm. käytetty neuronien BDNF-reseptorin ilmentämiseen sekä hiiren interleukiini-10:n tuottamiseen selkäydinkanavan vaurioiden korjaamiseksi.

Muutamia heikennettyjä tai heikosti patogeenisiä pikornaviruksia on käytetty myös syöpäterapiassa. Tutkimuksissa on käytetty muun muassa CV-A21-virusta rintasyövän pääkasvaimen ja metastasoituneiden etäpesäkkeiden hävittämisessä sekä CV-A21- ja EV1-viruksia eturauhassyövän kasvaimien pienentämisessä. Seneca Valley 001 -virus on osoittautunut tehokkaaksi sellaisia syöpiä vastaan, joilla on neuroendokriinisiä ominaisuuksia, ja sen käyttämistä faasi 2:n klinisiin kokeisiin ollaan parhaillaan suunnittelemassa. Pikornavirusten menestyksellinen käyttö syöpäkokeissa on ollut lupauksia herättävää, koska virukset ovat luonteeltaan sellaisia, että ne aiheuttivat hiirille vain lieviä oireita. Heikennetyt virukset eivät ole myöskään muuttuneet

patogeeniseksi *in vivo* -tutkimuksissa, vaikka pelkona on ollut terapiaviruksen muuntuminen patogeeniseksi kannaksi mutaatioiden tai rekombinaatioiden kautta.

1 Pikornavirusten taksonomia, rakenne ja elinkierto

Picornaviridae-heimoon kuuluu monia merkittäviä ihmiselle patogeenisiä viruksia kuten poliovirus, tavallista flunssaa aiheuttava rinovirus sekä aseptista meningiittiä yleisimmin aiheuttavat coxsackievirukset. Tämän lisäksi samaan heimoon kuuluu eläimiä infektoiva karanteenivirus, suu- ja sorkkatautivirus. Nämä virukset ovat yleisimmät taudinaiheuttajat maailmassa. Tästä syystä pikornavirukset ovatkin olleet tutkimuksen mielenkiinnon kohteina jo yli sadan vuoden ajan. *Picornaviridae*-heimoon kuuluu tällä hetkellä 12 virussukua: *Enterovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus*, *Teschovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Tremovirus* ja *Avihepatovirus*. *Sapelovirus*-, *Senecavirus*-, *Tremovirus*- ja *Avihepatovirus*-suvut lisättiin *Picornaviridae*-heimoon elokuussa 2009 Kansainvälisen virustaksonomiakomitean (ICTV, engl. International Committee on Taxonomy of Viruses) toimesta, ja samalla rinovirukset sisällytettiin *Enterovirus*-sukuun. ICTV:n tehtävänä on luokitella viruksia niiden rakenteen perusteella ja kehittää viruksille taksonomista järjestelmää. ICTV:n alaisuudessa on monta alakomiteaa, jotka ovat keskittyneet tiettyihin virusheimoihin. *Picornaviridae*-alacomiteaa (Picornavirus Study Group, <<http://www.picornastudysroup.com>>) johtaa Nick Knowles. Hän myös ylläpitää epävirallista, pikornavirustutkijoille tarkoitettua sivustoa (The Picornavirus Home Page, <<http://www.picornaviridae.com>>). Tältä sivustolta löytyvät tuoreimmat tiedot uusista pikornaviruksista ja niiden taksonomiasta. Pikornaviruksia tunnetaan jo yli 300 tyyppiä, ja määrä kasvaa koko ajan. Viruksia löydetään uusista eläinlajeista sekä toisaalta myös ihmisistä, ja niitä myös luokitellaan uudestaan. (Stanway ym. 2005, Picornavirus Study Group, <<http://www.picornastudysroup.com>>) Uusimpana tulokkaana on *Ihmisen rinovirus C* (HRV-C, engl. *Human rinovirus C*), jota löydetään erityisesti alahengitystieinfektiota sairastavilta potilailta (Lamson ym. 2006).



Kuva 1. Pikornaviruksen rakenne. (A) Viruspartikkeli koostuu VP-proteiineista, joita on neljä kappaletta ja jotka järjestyvät ns. pentameereiksi, joista muodostuu ikosahedrinen rakenne. Viruspartikkelin läpimitta on noin 27 nm. (B) Pikornaviruksen yksisäikeinen (+)RNA-genomi on keskimäärin 7100-8900 emäsparia pitkä. Genomista koodautuu pitkä polyproteiini, joka leikataan toiminnallisiksi osiksi viruksen omien 2A/3C-proteaasien avulla. Virusdiagnostiikassa tunnistetaan genomien 5'-päätä, kun taas tyyppityksessä monistetaan VP1-aluetta. 3D-aluetta käytetään rekombinanttien tunnistamiseen. Kuvat P. Susi.

Pikornavirusten yksinkertainen partikkelirakenne ei sisällä membraania vaan pelkän proteiini kuoren, joka koostuu 60 rakenteellisesta osasta, VP-proteiineista (kuva 1a). Nämä ovat järjestyneinä 12 pentameeriksi. Yksi kuoriproteiineista, VP4, ei näy kuvassa, koska se sijaitsee rakenteen sisäpuolella. Viruksen pintaproteiinit ja niiden avaruusrakenteet määrittelevät viruksen kyvyn tarttua solupinnan reseptorimolekyyleihin, ja tätä tietoa on käytetty hyväksi myös muokattaessa pikornaviruksia vektorikäyttöön. Viruspartikkeli suojaa kuoren sisällä olevaa ribonukleinihappogenomia (RNA, engl. ribonucleic acid). Pikornavirukset ovat positiivissäikeisiä, yksinauhaisia RNA-viruksia, ja niiden genomien koko vaihtelee 7100-8900 nukleotidin (nt) välillä (Hulo ym. 2011) (kuva 1b). Koska viruksen genomi on positiivissäikeinen, se toimii soluissa suoraan lähetti-RNA:na (mRNA, engl. messenger RNA). Pikornavirusgenomi on rakentunut niin, että rakenneproteiineja koodaavat geenit

(VP1-4) ovat genomien 5'-päässä ja ei-rakenteellisia proteiineja koodaavat geenit (2A-C ja 3A-D; proteaasit ja RNA-synteesissä tarvittavat geenit) ovat genomien 3'-päässä. Viruksen lisääntyessä muodostuu pitkä polyproteiini, joka pilkotaan toiminnallisiksi proteiineiksi viruksen omien proteaasien, 2A^{pro} ja 3D^{pro}, avulla. Genomin 5'-päähän on kovalenttisesti sitoutunut viruksen itsensä tuottama proteiini, VPg (3B, engl. viral protein genome linked; musta pallo kuvassa 1b). Sen tehtävänä on auttaa genomien replikaatiossa (Steil ja Barton 2009). Koska pikornaviruksia on paljon, on niiden tyypittämiseksi kehitetty geneettisiä keinoja, ja virusgenomin 5'-pää ja VP1 ovat tyypillisimmät monistettavat alueet virusten tunnistamiseksi (Oberste ym. 1999a).

Pikornavirusten elinkierto käsittää monta eri vaihetta. Koska virusserotyyppejä on paljon, on luonnollista, että virukset ovat adaptoituneet käyttämään hyväkseen erilaisia solun omia reseptoreja ja endosytoositeitä. Virusinfektiossa virus kiinnittyy solun pinnalla oleviin reseptoreihin, joita ovat mm. ICAM-1- (engl. intracellular adhesion molecule-1), CAR- (engl. coxsackie-adenovirus receptor), DAF- (engl. decay accelerating factor), LDL- (engl. low density lipoprotein) ja integriinireseptorit. Pikornaviruksille on tyypillistä, että ne tarvitsevat infektiossa useita reseptoreita mutta voivat myös muuntua siten, että ne tunnistavat vain yhden reseptorin. Reseptoriin sitoutumisen jälkeen virus endosytoidaan solun sisään. Endosytoosin varhaisessa vaiheessa virus kulkeutuu solun omia endosytoosireittejä (klatriinivälitteinen, kaveosomaalinen ja näistä riippumattomat reitit) pitkin replikaatiopaikkaan, jossa virus vapauttaa genominsa sytoplasmaan. Virusreplikaatio tapahtuu isäntäsolun avustuksella, ja viruksen genomien päässä oleva VPg-elementti poistetaan ennen kuin translaatio alkaa. Ribosomit aloittavat translaation tunnistamalla sisäisen ribosomin sitoutumiskohdan (IRES, engl. internal ribosome entry site), joka sijaitsee noin 700 emäksen etäisyydellä 5'-päästä, ja ne tuottavat viruksen prekursoripolyproteiinin (P1-P3). Prekursoripolyproteiini pilkotaan translaation aikana yksittäisten virusproteiinien tuottamiseksi. Ne proteiinit, jotka osallistuvat RNA-synteesiin, siirtyvät virus-RNA:n kanssa kalvovesikkeleille, jotka tuottavat viruksen (+)-nauhaisesta RNA:sta (-)-nauhaa. Tuotettu (-)-nauha toimii templaattina tuottamaan lisää (+)-nauhaa, joista osaa käytetään uuden polyproteiinin tuottamiseen. Polyproteiinin rakenteelliset proteiinit, jotka leikataan P1-prekursoriproteiinista, assosioituvat sellaisten tuotettujen (+)-nauhojen kanssa, joissa on VPg-elementti paikallaan. Näin tuotetaan uusia viruspartikkeleja. Valmiit virukset lysoituvat solusta ulos infektoiden uusia soluja ja aloittaen siten uuden infektiokyklin. (Whitton ym. 2005)

2 Virusvektorit

Virusten kyvystä vaikuttaa syöpäkasvaimien toimintaan on tiedetty jo yli 100 vuotta, ja onkolyyttisten virusten historiaa ovat kuvanneet mainiosti Kelly ja Russell (2007). Jo 1800-luvun puolivälistä on julkaistu raportteja tapauksista, joissa luonnollinen virusinfektio on saanut aikaan syöpäkasvaimen regression. Näitä ovat olleet muun muassa influenssa- ja vesirokkovirukset, joiden on sanottu vaikuttaneen myelogeeneisen ja lymfaattisen leukemian regressioon. Jonkin verran tuoreemmat kliiniset tutkimukset 1970- ja 80-luvuilta ovat raportoineet sairastetun tuhkarokon vaikuttaneen leukemian, Hodgkinsin taudin ja Burkittin lymfooman etenemiseen.

Kun viruksia alettiin tutkia aktiivisemmin mahdollisina onkolyyttisinä tekijöinä 1940-luvulla, ensimmäisissä kokeissa käytettiin yleensä aktiivisia, eristettyjä viruksia, joita annettiin suoraan potilaille erilaisilla annostustavoilla. Tämän päivän eettisillä standardeilla aktiivisen, infektiivisen viruksen antaminen potilaalle on varsin kyseenalaista, mutta siihen aikaan etsittiin epätoivoisesti uusia hoitokeinoja syövänhoitoon. Jo käytössä olleet hoitomenetelmät (säteilytys, kirurgia ja kemoterapia) eivät tehonneet kaikkiin syöpälajeihin. Etenkin pahanlaatuisten kasvaimien kohdalla ei juurikaan ollut mitään tehtävissä.

Vuonna 1949 hepatiitti B -virusta (HBV) käytettiin hoitamaan Hodgkinsin lymfoomaa. Tässä kliinisessä kokeessa annettiin 22 potilaalle HBV-virusta, joista neljätolista sai HBV-infektion (yksi kuoli infektiin), seitsemällä lymfooman kliiniset oireet paranivat vähintään kuukaudeksi ja neljällä syöpäkasvaimen koko pieneni. *Flavivirus*-sukuun kuuluvaa Länsi-Niilin virusta (isolaatti Egypt 101) käytettiin 1900-luvun alkupuolella yli 150 kliinisessä kokeessa monenlaisia syöpälajeja vastaan, mutta näissä tutkimuksissa ei saatu juurikaan vaikutuksia syöpäkasvaimeen, vaikka viruksia oli potilaiden veressä ja kasvaimissa todettiin virusten replikaatiota. Näissä tutkimuksissa kohdattiin ongelmia virusten neurotoksisuuden kanssa, etenkin potilailla, joiden immuunijärjestelmä oli heikentynyt. Tämä sai aikaan laaja-alaisen seulonnan mahdollisten uusien onkolyyttisten virusten löytämiseksi. Monet niistä todettiin tehottomiksi tai liian vaarallisiksi tutkimukseen, mutta tutkimuksissa löydettiin myös uusia, lupaavia viruksia. Näitä olivat mm. adenovirukset, herpes simplex -virus, paramyxovirukset, pikornavirukset ja rokkovirukset. Näistä seulonnoista muun muassa vuonna 1956, APC-virusta (engl. adenoidal-pharyngeal-conjunctivis-virus, nykyisin luokiteltu adenovirukseksi) käytettiin hoitamaan kohdunkaulansyöpää, koska sillä todettiin olevan

vähän sivuvaikutuksia. Kliinisissä kokeissa potilailla, jotka reagoivat APC-virukseen, todettiin syöpäkudoksen poistuneen merkittävässä määrin. Tästä huolimatta vaikka APC-virus aiheutti joitain sivuvaikutuksia, kuten verenvuotoa ja nekroosia kasvaimen lähetyvillä, immuunijärjestelmä hävitti nopeasti virusinfektion ja virus ei juuri pidentänyt potilaiden elinikää.

Sikotautivirusta ei ollut aikaisemmin käytetty onkolyyttisenä viruksena vaan enemmänkin immunoterapian osana stimuloimaan immuunijärjestelmää. Japanissa tehdyssä kliinisessä kokeessa vuonna 1974, jossa potilaille annettiin aktiivista, heikentämätöntä sikotautivirusta, saatiin varsin lupaavia tuloksia. Vain 10 % potilaista ei reagoanut virukseen ollenkaan, 37/90 potilaasta kasvain oli pienentynyt yli 50 % tai hävinnyt kokonaan, ja 42 potilaalla kasvainten koko oli pienentynyt alle 50 % tai kasvaimen kasvu oli pysähtynyt. Tämä tutkimus sai tutkijapiireissä paljon huomiota, mutta samanlaisiin tuloksiin ei päästy muissa tutkimuksissa. Näihin aikoihin myös heikentämättömien virusten käyttö tuli tiukemman säätelyn alle ja onkolyyttisten virusten tutkimus väheni rajusti 1970- ja 1980-luvuilla.

Ihmisen solujen viljelyn mahdollistuttua *ex vivo* vuonna 1948 ja niiden siirtäminen koe-eläimiin mahdollisti uusia tutkimussuuntia onkolyyttisten virusten tutkimuksessa. Russian Far East enkefaliitti -viruksella saatiin varsin pian tuloksia, että virus on pystynyt hävittämään kokonaan hiiren sarkooma 180:n kasvaimia tietyissä tapauksissa. Vaikka myöhemmin virus aiheutti tappavan enkefaliitin hiirissä, periaate virusten erinomaisista onkolyyttisistä ominaisuuksista tuli todistettua. Tämän tuloksen seurauksena monia muitakin viruksia, kuten adeno-, vaccinia- ja Länsi-Niilin sekä sen Epygt 101 isolaattiviruksia testattiin eläinmalleissa.

Yksi perusongelmista virusten käytössä syöpäterapiassa oli se, että aikaisemmin saatu immuniteetti johti terapiassa käytettyjen virusten tuhoamiseen ennen kuin ne ehtivät vaikuttaa syöpäkasvaimiin. Sen takia myös eläinvirusten käyttö onkolyyttisinä tekijöinä tuli kiinnostuksen kohteeksi syöpähoidoissa. Muutamia lupaavia kandidaatteja saatiinkin näistä tutkimuksista. Newcastlelta tautia aiheuttavan viruksen todettiin saavan aikaan kasvaimen häviämisen hiirissä ilman sivuvaikutuksia, ja kliinisissä kokeissa sen on todettu antavan jopa 10 vuoden suojan syövän uusiutumiselle toisen asteen melanoomaa vastaan.

Rekombinantititeknikoiden yleistyminen 1990-luvulla sai aikaan uuden aallon onkolyyttisten virusten tutkimuksessa. Viruksia pystyttiin helpommin ja spesifisemmin kohdistamaan syöpäsoluihin ja virusten patogeenisuutta isäntää kohtaan onnistuttiin vähentämään. Tämä mahdollisti uudenlaisen lähestymisen virusgeeniterapiakehityksessä ja -tutkimuksessa. Tätä ennen viruksia yritettiin muokata tutkimuksissa joko enemmän onkolyttisiksi tai spesifisemmiksi syöpäsoluja vastaan virusten evoluution kautta. Eräässä tutkimuksessa 1990-luvun alussa pystyttiin tuhoamaan kaikki syöpäsolut pahanlaatuisessa gliomassa muokatulla herpes simplex -viruksella. Onkolyyttisten virusten tutkimus kulmineitui vuoden 2005 lopussa, kun Kiinan viranomaiset antoivat myyntiluvan ensimmäiselle onkolyttiselle virusgeeniterapiahoidolle, jossa oli käytetty geneettisesti muunneltua adenovirus H101:tä.

2.1 Pikornavirusvektorit

Virusgeenivektorit ovat muokattuja virusgenomeja, jotka ilmentävät viruksen genomiin lisättyä kohdegeeniä kohdesoluissa. Enterovirukset ovat yleisimpiä viruksia, jotka aiheuttavat sekä akuutteja että kroonistuvia sairauksia. Tämän takia virustutkimus mukaan lukien geenivektoritutkimus on keskittynyt muutamaankin tärkeimpään virukseen, joita ovat poliovirus ja enterovirukset (mukaan lukien coxsackievirukset). Erilaisten pikornavirusten kyky hakeutua luonnostaan valikoituihin kohdesoluihin, niiden kyky tunkeutua spesifisesti solun sisään ja kyky replikoitua tehokkaasti tekevät niistä kiinnostavia kohteita geenivektoreita kehitettäessä. Mietittäessä virusvektorien ominaisuuksia pikornaviruksilla on sekä hyviä että huonoja ominaisuuksia. Virusgenomin pieni koko mahdollistaa genomien käsittelyn ilman työläisiä välivaiheita, mutta toisaalta se on myös rajoite, sillä viruksesta ei voi poistaa mitään ilman, että genomista tulee labiili. Virusten rekombinoituminen saattaa johtaa siihen, että insertti poistetaan virusgenomista viruksen lisääntymisen aikana, ja tämä ominaisuus asettaa rajoja sille, kuinka isoja inserttejä pikornavirusvektoreilla ylipäänsä pystytään ilmentämään ja miten insertti pitää kloonata virusgenomiin. Insertin paikka viruksen genomissa vaikuttaa myös merkittävästi sen ominaisuuksiin. Kun RNA muodostaa sekundäärirakenteita, insertin vastaavat rakenteet translaatiovaiheessa voivat merkittävästi haitata viruksen prosessointia ja siten estää uusien virusten syntymisen. Koska pikornavirukset lisääntyvät käyttäen polyproteiini-välivaihetta, pitää insertti kloonata genomiin täsmällisesti ja oikeaan lukuraamiin ja insertin koodaaman proteiinin vapauttamiseen polyproteiinista pitää käyttää viruksen omia, polyproteiinia pilkkovia entsyymejä.

Virusten turvallisuus on tärkein tekijä terapiakäytössä, mutta tätä ei ole varsinaisesti korostettu pikornavirusvektoreita tutkittaessa ja kehitettäessä. Geenivektoreina on tutkittu ja käytetty lähinnä polioviruksia (poliovirus 1; PV1) ja coxsackieviruksia (coxsackievirus B3 ja B4; CV-B3 ja CV-B4). Muutamissa tutkimuksissa on käytetty myös mengovirusta, joka kuuluu *Cardiovirus*-sukuun. Koska pikornavirukset ovat erittäin yleisiä patogeeneja ja RNA-viruksia, on mahdollista, että ne muuntuvat tai omaksuvat uusia ominaisuuksia villityypin viruksilta homologisen rekombinaation kautta. Viruksen kohdistaminen kohdesolukkuun on toinen merkittävä ongelma. Tämän vuoksi pikornavirusten käyttämiä reseptoreja on pyritty tunnistamaan ja virusta on pyritty muokkaamaan reseptorispesifiseksi. Vaihtoehtoisesti pyritään käyttämään

viruksia, joilla on aivan erityinen solu- tai kudoshakuisuus. Taulukossa 1 on esitetty yhteenveto käsiteltävistä pikornavirusvektoreista ja kloonausstrategioista.

Taulukko 1. Yhteenveto käsiteltävistä pikornavirusvektoreista ja kloonausstrategioista.

Virus	Alkuperä	Insertti	Insertion kohde	Lähde
Poliovirus 1	Mahoney-kanta	Brain-derived neurotropic factor ja 3C ^{pro} katkaisusekvenssi insertin jälkeen	Genomin 5'-päähän	Jia ym. 2002
	Hyvin heikennetty Sabin-kanta	Ihmisen rinovirus 2:n IRES-alue, johon oli kloonattu <i>Escherichia coli</i> FimH-antigeeniin osa, HIV:n Tat-, SIV:n p17- ja eGFP-geenit sekä insertin jälkeen 2A ^{pro} -katkaisusekvenssi	Polioviruksen IRES-alueen tilalle	Dobrikova ym. 2003
	Mahoney-kanta	Hiiren interleukiini-10 sivustoillaan FMD-viruksen itseleikkautuva ja 2A ^{pro} :n katkaisusekvenssit	VP3- ja VP1-geenien tilalle	Jackson ym. 2005
	Mahoney-kanta	<i>Helicobacter pylori</i> n UreB-geeni	VP2-, VP3- ja VP1-geenien tilalle	Smythies ym. 2005
	Mahoney-kanta	Ihmisen papilloomavirus 16:ta L1-kuoriproteiini kokonaan (1600 nt) tai osittain (n. 270 nt) sivustoillaan 2A ^{pro} :n katkaisusekvenssit	VP1- ja 2A-geenien väliin	Van Kuppeveld ym. 2006
CV-B3	Heikennetty CV-B3/0-kanta	Hiiren interleukiini 4 sivustoillaan 2A ^{pro} -katkaisusekvenssi	VP1- ja 2A ^{pro} -geenien väliin	Chapman ym. 2000a
	Infektiivinen CV-B3/20-kanta	Polioviruksen Mahoney-kannan 5'-NTR-alue	Kloonattiin CV-B3:n 5'-NTR alueen tilalle	Chapman ym. 2000b

	CV-B3/0-kanta	Adenovirus 2:n L1-heksoniantigeeni	VP1- ja 2A ^{pro} -geenien väliin	Höfling ym. 2000
	CV-B3 H3 -kanta	Vihreää fluoresoiva proteiini (GFP)	- (solukasvatuskoe)	Feuer ym. 2000
	CV-B3 H3-kanta	GFP	Genomin 5'-päähän	Lim ym. 2005
CV-B4	Heikennetty CV-B4 JVB-kanta	Ovalbumiini-geeni	VP1-geenin DE-silmukka	Halim ym. 2000a
	Heikennetty CV-B4 JVB-kanta	Osia HIV-1 p24 ^{gag} -geenistä	5'-NTR-alueen ja VP4-geenin väliin sekä VP1-geenin sisälle	Halim ym. 2000b
CV-A9	CV-A9	GFP	VP1- ja 2A-geenien väliin	Heikkilä ym. 2011
Mengovirus	M-kanta	HIV-1:n Nef- ja SIV:n Gag-, Nef- ja Pol-geenien sytotoksisten T-lymfosyytien epitootit erillisinä geeneinä tai fuusiogeeneinä leader-proteiinin kanssa	IRES- ja leader-alueiden väliin	Van der Ryst ym. 1998
	M-kanta	Kloonausalue (MCS) ja EMCVn ensisijainen katkaisukasetti (PCC-alue) sekä 19 eri inserttiä	2A ^{pro} - ja 2B-geenien väliin	Binder ym. 2003

3 Pikornavirusgeenivektorien kloonaustrategiat

3.1 Poliovirusvektorit

Poliovirusten muokkausta on tehty sekä virusten itsensä tutkimiseksi että geeniterapiakäyttöön. Neljää kloonaustrategiaa on käytetty poliovirus genomien muokkaamiseksi (Dobrikova ym. 2003). Ensimmäisessä polioviruksen kuoriproteiinia koodaavaan geeniin (esimerkiksi VP1:een) on insertoitu kohdegeeni. Tämän strategian rajoituksena on se, että insertin on oltava hyvin lyhyt, koska geeni tulee ilmentymään viruksen kuoriproteiinissa ja saattaa tehdä viruksista labiileja. Toisessa strategiassa polioviruksen rakenteellisia proteiineja on korvattu insertoitavalla geenillä, mutta näin tuotetut virusgenomit tarvitsevat solulinjan, joka ekspressoii puuttuvat rakenneproteiinit. Eräässä tutkimuksessa käytettiin yhteisinfektiota Vaccinia-viruksen kanssa, joka ekspressoii polioviruksen kaikkia kapsidiproteiineja (Smythies ym. 2005). Koska tällainen virusgenomi ei pysty tuottamaan uusia viruksia, tämä strategia ei toimi *in vivo*. Kolmannessa muokkausstrategiassa on rakennettu dikistroninen poliovirus sijoittamalla genomiin toinen IRES-alue, joka ohjaa vieraan geenin ekspressiota. Tuotetut virukset ovat kuitenkin olleet labiileja, ja kun on käytetty pitkiä inserttejä, haluttu geeni ei ole pakkautunut virukseen. Neljännessä vaihtoehdossa on käytetty hyväksi tietoa, että pikornavirusten polyproteiini pilkotaan autokatalyyttisesti kahdella virusproteasilla, 2A^{pro} ja 3C^{pro}/3CD^{pro}. Nämä vapauttavat rakenteelliset ja ei-rakenteelliset proteiinit toisistaan tuottaakseen uusia viruksia. Insertti on samassa lukukehyksessä polyproteiinin kanssa, ja sitä seuraa ylimääräinen katkaisukohta, jolloin insertti saadaan vapaaksi polyproteiinista. Tämä strategia mahdollistaa toimivien virusten eristämisen ja suurempien inserttien ilmentämisen genomissa, ja sitä on käytetty useissa poliovirusvektoritutkimuksissa sekä muiden pikornavirusten muokkaamisessa. Seuraavassa esitetään muutamia tutkimuksia, joissa poliovirusta on käytetty heterologisena ekspressiovektorina.

Poliovirusta on käytetty vektorina erityisesti keskushermostotutkimuksissa, koska virus on luonteeltaan neurotrofinen eli keskushermostohakuinen. Jia ym. (2002) käyttivät Poliovirus Mahoney-kantaa, jonka avulla he tutkivat tietyn aivojen motorisen neuronireseptorin (BDNF, engl. brain derived neurotropic factor) ilmentymistä poliovirusreseptoria (CD155) ekspressoivissa ICR-PVRTg21-hiirissä. Insertti kloonattiin viruksen 5'-päähän 3C^{pro}-proteasisekvenssin kanssa, ja virukset kasvatettiin AGMK-soluilla (engl. african green monkey kidney). Viruksia saatiin tuotettua, vaikka

ne olivat stabiileja vain 3 pasaasin ajan. Western-analyysissä löydettiin vapaan proteiinin lisäksi myös fuusioproteiinia VP0:n ja VP3:n kanssa, mutta suurin osa soluista ilmensi sekä PV1- ja BDNF-antigeenejä. Kaiken kaikkiaan BDNF:n tuotto neuroneissa oli lyhyt, mutta koe antoi suuntaa siihen, että rekombinanttivirus voisi toimia geenivektorina.

Dobrikova ym. (2003) tutkivat genomin rakenteellisten ominaisuuksien vaikutusta rekombinanttiviruksen toimintaan kloonamalla neurovirulenttiin PV1 Sabin-virukseen ihmisen rinovirus 2:n (HRV2) IRES-alueen PV1:n oman IRES-alueen tilalle. Kokeita varten HRV2:n IRES-alueen silmukan VI-alue korvattiin toisista organismeista peräisin olevilla geneilla, joita olivat *Escherichia coli* (*E. coli*) FimH-antigeenin osa (102 nt), ihmisen immuunikatoviruksen (HIV, engl. human immunodeficiency virus) Tat-proteiinia koodaava geeni (282), apinan immuunikatoviruksen (SIV, engl. simian immunodeficiency virus) p17-proteiinia koodaava geeni (420) ja tehostettu vihreää fluoresoivaa proteiinia koodaava geeni (eGFP, engl. enhanced green fluorescent protein) (744). Katkaisukohtaksi insertin jälkeen kloonattiin 2A^{pro}-katkaisusekvenssi. Kaikki rekombinantit tuottivat toimivia viruksia, mutta inserttien pysyvyydessä oli suuria eroja. FimH- ja HIV:n Tat-insertit kestivät jopa 20 pasaasin ajan, kun taas SIV:n p17-insertti kesti vain 9 pasaasin ajan ja eGFP vain yhden. Kasvatus tehtiin HeLa-soluissa. Tämän perusteella insertin koko olisi tällä strategialla rajoittunut alle 300 nt:iin. Tätä tukee myös koe, jossa SIV- ja eGFP-inserttejä lyhennettiin 282 nt:iin poistamalla sekvenssiä C-terminaalista päästä, jolloin ne olivat samankokoisia kuin HIV:n Tat-insertti. Tällöin virusvektorien stabiilisuus kasvoi ja insertti ekspressoitui täyden 20 pasaasin ajan. Yleisesti tämä strategia pystyi säilyttämään insertit paljon paremmin kuin aikaisemmin käytetyt. Tässä tutkimuksessa havaittiin myös, että IRES-alueen silmukan sekundaärirakenteen muuttaminen vaikutti merkittävästi virusten stabiilisuuteen.

Jackson ym. (2005) tutkivat, miten hiiren interleukiini-10 (mIL-10, engl. mouse interleukin 10) vaikuttaa selkäydinvaurioiden korjaantumiseen. mIL-10-geeni kloonattiin polioviruksen genomiin VP3- ja VP1-rakenneproteiinien paikalle, ja geenin ympärille luotiin katkaisukohtat 2A^{pro}-proteasille sekä suu- ja sorkkatautiviruksen (FMDV, engl. foot-and-mouth disease virus) itseleikkautuvalle sekvenssille. Koska mIL-10-geeni kloonattiin polioviruksen kuoriproteiinien paikalle, käytettiin Vaccinia-virusta (VV-P1) tuottamaan polioviruksen P1-proteiinia *in vitro*, joka sisältää kuoriproteiinit VP1-VP4. Poliovirusreseptoritransgeenisille (PVR, engl. poliovirus

receptor) hiirille annosteltiin joko mIL-10-replikonia tai vihreää fluoresoivaa proteiinia (GFP, engl. green fluorescent protein) kontrollina selkäydinkanavaan tai lihakseen. Selkäydinkanavaan injektion saaneet hiiret ilmensivät IL-10:ia merkittävästi aivokudoksessa. Lihakseen injektion saaneiden hiirien mIL-10 ekspressio oli myös näkyvää mutta vähäisempää kuin selkäydinkanavaan injektion saaneilla hiirillä, kun taas kontroleissa havaittiin vain vähän mIL-10:n ekspressiota. Smythies ym. (2005) käyttivät vastaavaa ekspressiostrategiaa, kun he tutkivat *Helicobacter pylori* -bakteerin UreB-proteiinin ekspressiota poliovirusreplikonissa ja sen suojaavaa vaikutusta C57BL/6/DAB-hiirissä, jotka ilmentävät poliovirusreseptoria TgPVR. He kloonasivat rakenteellisten geenien VP2, VP3 ja VP1 tilalle UreB-insertin, jonka sivustoilla oli leikkaussekvenssit. Kontrollina käytettiin ihmisen papilloomavirus 11 L1-kapsidiproteiinia. Hiiristä, jotka saivat kolme annosta rekombinanttivirusta kahden viikon aikana ja jotka infektoitiin bakteereilla neljän viikon päästä kokeen aloittamisesta, vain 20 % sai *H. pylori* -infektion verrattuna 80 %:iin kontrolliryhmässä. Rekombinanttia virusta kokeen alussa saaneissa hiirissä bakteerien määrä oli myös alhaisempi kontroleihin verrattuna. Näillä hiirillä oli myös paljon korkeampi pitoisuus UreB-spesifisiä vasta-aineita ja pienempi määrä bakteeri-infektioita.

Viidennessä poliovirusvektoria käyttäneessä tutkimusesimerkissä van Kuppeveld ym. (2002) tutkivat ihmisen papilloomavirus 16 (HPV16) kapsidiproteiini L1:n ilmentymistä polioviruksen Mahoney-kannan genomista ja sen tuottamaa immuunivastetta. Kapsidisekvenssi kloonattiin polioviruksen VP1- ja 2A-proteiinien väliin ja kapsidisekvenssin eteen lisättiin toinen 2A^{pro}-katkaisusekvenssi. Rekombinantit, jotka sisälsivät joko koko L1-kapsidiproteiinin (n. 1600 nt) tai pienen osan siitä (n. 270 nt) lisääntyivät vaihtelevasti Vero-soluilla. Rekombinanttien kasvunopeus oli hiukan hitaampaa kuin kantavektorin. Lyhyempi insertti pysyi genomissa ainakin kymmenen pasaasin ajan, mutta kokonainen kapsidi deletoitui genomista jo ensimmäisen pasaasin aikana, eikä suurin osa tuottuneista viruksista sisältänyt kokonaista inserttiä. Rekombinantit tuottivat viruksen sekapopulaatiosta huolimatta kohtalaisen humoraalisen vasteen C57Bl6/J x CBA1 PVR-transgeenisissä hiirissä.

3.2 Coxsackievirusvektorit

Coxsackievirus B3 (CV-B3) on tutkituin coxsackievirus johtuen sen oletetusta roolista myokardiitissa ja sydänlihaskudoshakuisuudesta. Muutamissa tutkimuksissa on käytetty myös CV-B4- ja CV-A9-viruksia. Yleisimmät strategiat insertin kloonauksessa näiden virusten genomeihin ovat olleet insertin sijoittaminen 5'-päähän koodaamattoman alueen (5'-NTR, engl. 5'-nontranslated region) ja ensimmäisen rakenneproteiinin, VP4:n, tai VP1- ja 2A-proteiinien väliin käyttäen 2A^{pro}/3D^{pro}-katkaisusekvenssejä geenin ympärillä. Nämä strategiat ovat myös toimineet parhaiten. Myös viruksen rakenneproteiinien pinnalla on yritetty ilmentää proteiinien epitooppeja. Tutkimuksissa on havaittu, että mm. insertin koko ja rakenne sekä tuottosolut vaikuttavat insertin ilmentymiseen ja virusten tuottoon. VP1-kuoriproteiinin osana ilmennettyjen inserttien (epitooppien) pituus on rajoittunut 9–10 aminohappoon.

3.2.1 Coxsackievirus B3 (CV-B3)

CV-B3-virusvektoria on käytetty testaamaan leikkauskohtien alttiutta rekombinaatioon, mikä vaikuttaa viruksen stabiiliuteen. Chapman ym. (2000a) rakensivat kaksi virusvektoria käyttäen keinotekoisesti heikennettyä kantavektoria. Hiiren interleukiini-4 (mIL-4, engl. mouse interleukin 4) -sekvenssi insertoitiin VP1- ja 2A^{pro}-geenien väliin niin, että insertin kummallakin puolella oli 2A^{pro}-proteaasin katkaisusekvenssi. Virusvektorit erosivat toisistaan siten, että ensimmäisen vektorin toinen 2A^{pro}-leikkauskohdan sekvenssi oli vain 70 % samanlainen toisen leikkauskohdan kanssa, kun taas toisessa vektorissa nämä sekvenssit olivat identtisiä insertin ympärillä. Interleukiinin tuotto oli molemmissa tehokasta ja mIL-4 pilkkoutui hyvin polyproteiinista, mutta virusvektori, jossa 2A^{pro}-proteaasin leikkauskohdat eivät olleet identtisiä, oli kokeissa stabiilimpi johtuen todennäköisesti alhaisemmasta rekombinaatioalttiudesta. Virusvektorit replikoituivat 5–10 kertaa vähemmän kuin villityypin virus mutta tuottivat virusproteiineja kaksi kertaa enemmän. Tämä johtui todennäköisesti virusvektorin hidastuneesta prosessoinnista soluissa.

Chapman ym. (2000b) rakensivat rokotekäyttöä varten myös kimeerisen virusvektorin, jossa CV-B3:n koko 5'-NTR-alue korvattiin PV1:n 5'-NTR-alueella. Solukokeissa kimeerinen virusvektori lisääntyi kantavektorin tehokkuudella HeLa-soluissa, mutta COS-1-, Panc-1- (engl. human pancreatic ductal tumor cells), HCAEC- (engl. primary

human cardiac artery endothelial cells) ja MFHF-soluissa (engl. murine fetal heart fibroblast) virus oli heikentynyt. Eläinkokeissa rekombinantti osoittautui toimivaksi ja tehokkaaksi rokotteeksi jo yhdellä altistuskerralla. Toisessa vastaavassa CV-B3-työssä adenovirus 2:n L1-heksoniantigeeni kloonattiin VP1- ja 2A^{pro}-proteiinien väliin 2A^{pro}-katkaisusekvenssien kanssa tavoitteena testata multivalenttia rokotetta Ad2:n ja CV-B3:n suhteen (Höfling ym. 2000). HeLa-, COS-1-, HCAEC- ja MFHF-soluja käytettiin solukokeissa, joista selvisi, että HeLa-soluissa villityyppi ja kimeerinen versio lisääntyivät paljon nopeammin kuin muissa solutyypeissä. Rekombinantin viruksen saanto oli huono viivästyneen polyproteiinin prosessoinnin takia, mutta stabiilisuus oli hyvä. Immunisoidut BALB/c-hiiret tuottivat sekä anti-CV-B3- että anti-Ad2-vastaineita.

CV-B3-virukseen on liitetty myös näkyvä merkkigeeni GFP, jota on käytetty tunnistamaan infektoidut solut. Feuer ym. (2002) halusivat selvittää, miten CV-B3 vaikuttaa solun solusykliin. Viruksen replikaation todettiin olevan yhteydessä ja riippuvainen solujakautumisen vaiheisiin. G₀- ja G₂/M-vaiheissa pidettyjen solujen virusten tuotto oli heikentynyt merkittävästi ja virustuotto pysyi latenttina jopa kolme päivää, vaikka ne sisälsivät infektiivistä virus-RNA:ta. Solujen annettaessa jakautua virustuotanto palautui. Samanlainen tulos saatiin ”haavoittamalla” konfluentteja, infektoiduja soluja *in vitro* ja seuraamalla eGFP tuotantoa 24 h myöhemmin, jolloin ”haavan” reunoilla havaittiin GFP-fluoresenssia.

Lim ym. (2005) tutkivat niinkään GFP-proteiinin avulla CV-B3:n ilmentymistä sydänlihassoluissa. He kloonasivat GFP-geenin CV-B3:n genomien 5'-päähän 3C^{pro}-katkaisusekvenssin kanssa. Rekombinanttivirus replikoitui COS7-soluissa miltei samalla voimakkuudella kuin villityyppi, CV-B3-H3. GFP-proteiinia ilmentyi HeLa-soluissa hyvin, mutta sydänlihassoluissa paljon huonommin. Tämä johtui siitä, että lihassolut eivät jakaantuneet ja kuten edellä todettiin, tämä johtaa ongelmiin viruksen replikaatiossa. GFP-ekspressio HeLa-soluissa kesti kuusi pasaasia, mutta jo tässä vaiheessa oli havaittavissa osittain virusgenotyyppisiä, joista GFP-geeni oli poistettu. Rekombinanttiviruksen patogeenisuus oli myös selkeästi alhaisempi kuin villityypin, koska sillä infektoiduista BALB/c-hiiristä ei kuollut yksikään, kun taas kaikki villityypin viruksella infektoidut hiiret kuolivat. GFP:tä ilmentyi kaikissa rekombinanttiviruksen infektoimista sydämistä vielä jopa kahdeksan viikkoa infektion jälkeen (p.i., engl. post infection). Villityypillä ja rekombinantilla viruksella

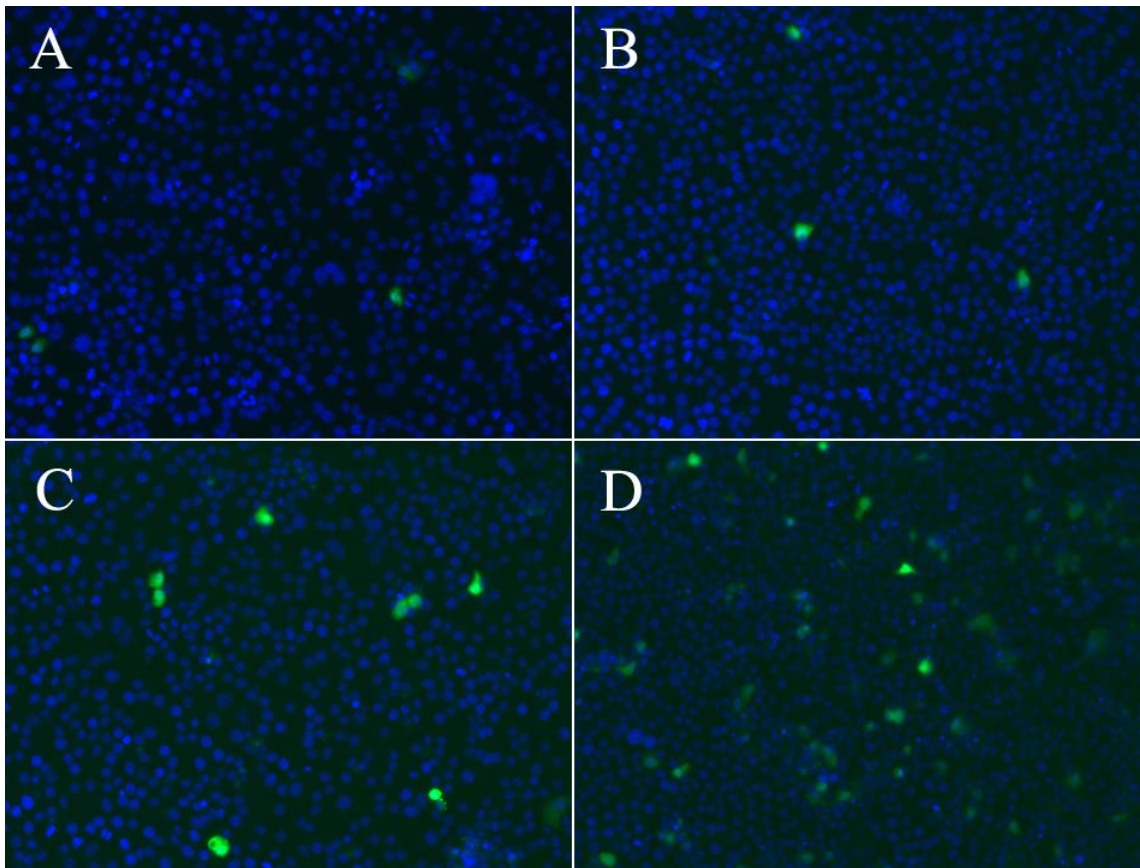
infektoitujen hiirien seerumi pystyi neutralisoimaan CV-B3:n seitsemän päivää p.i. osoituksena immuniteetin muodostumisesta virusta vastaan.

3.2.2 Coxsackievirus B4 (CV-B4)

Coxsackievirus B4 (CV-B4) on CV-B3-viruksen sukulaisvirus ja niin ikään merkittävä viruspatogeeni. Sen merkitystä on tutkittu erityisesti tyypin 1 diabeteksen (T1D) kehittämisessä. (Yin ym. 2002, Maha ym. 2003, Moya-Suri 2005) Virusvektorina sitä on käytetty vain muutamissa tutkimuksissa, jotka liittyvät viruksen rakenteeseen ja patogeenisuuteen. Näillä tuloksilla voi olla merkitystä, koska niissä osoitetaan patogeenisiltään heikennetyn viruksen toimivuutta infektiossa. Tällaista virusvektoria voitaisiin käyttää esimerkiksi T1D-rokotteen kehittämiseen.

Halim ym. (2000a) tutkivat immunogeenisen ovalbumiinisekvenssin ilmentymistä CV-B4:n VP1-kuoriproteiinin DE-silmukassa (aa 128-140). Tämän silmukan on todettu vaikuttavan CV-B4:n stabiilisuuteen ja patogeenisuuteen. Kloonatuista sekvensseistä vain kymmenen aminohapon (aa) insertti tuotti toimivia viruksia, kun taas yllättäen lyhyempi kuuden aa:n insertti tuotti labiileja viruksia. Tämän todettiin johtuvan DE-silmukan proteiini-proteiini-vuorovaikutuksista. Samassa tutkimuksessa todettiin, että VP1:ssä sijaitsevalla treoniini-129:llä on suuri merkitys infektiivisyyteen. Halim ym. (2000b) rakensivat myös CV-B4-rekombinanttiviruksen, joka ekspressoii HIV-1:n p24^{gag}-geenin kolmea osaa kloonattuna kahteen VP1-geenialueeseen ja 5'-NTR- ja VP4-alueiden väliin. p24^{gag}-proteiinin osien ilmentäminen VP1:n DE-silmukasta osoittautui toimivaksi useiden pasaasien ajan. 5'-NTR-VP4-rekombinantti puolestaan oli labiili, mikä vahvisti aiempaa käsitystä siitä, että leader-alueen käyttöä kloonauksessa rajoittaa insertin koko. Rekombinanttivirukset pystyivät myös tuottamaan ja prosessoimaan viruksen kuoriproteiineja samaan tapaan kuin villityyppi ja siten myös ekspressoivat p24^{gag}-proteiinin osia.

3.2.3 Coxsackievirus A9 (CV-A9)



Kuva 2. GFP:tä tuottava coxsackievirus A9. Viruksen lisääntyminen 8 h (A), 10 h (B), 12 h (C) ja 24 h (D) infektiosta. Infektoidut solut näkyvät vihreänä GFP-fluoresenssina. Tummat on värjätty sinisellä (Hoechst). (Heikkilä ym. 2011)

Coxsackievirus A9 (CV-A9) on poikkeuksellinen *Ihmisen enterovirus B* -lajiin kuuluva pikornavirus, koska se käyttää solupinnan αV -integriinireseptoreita hyväkseen (Roivainen ym. 1994, Williams ym. 2004). Tällainen virus voisi olla käyttökelpoinen kohdistettaessa terapiaa syöpäsoluihin, joissa esimerkiksi viruksen käyttämä $\alpha V\beta 3$ -integriini ekspressoituu tehokkaasti. CV-A9-genomiin on äskettäin onnistuneesti liitetty GFP:tä tuottava geeni, ja virus tuotti GFP:tä stabiilisti ainakin yhdeksän elinkiertoa. Insertiokohta oli VP1 ja 2A-geenien välissä Chapman ym. (2000a) mukaisesti. CV-A9-GFP ekspressoisi GFP:tä tehokkaasti (kuva 2), ja viruksen aiheuttamat plakit olivat yhtä suuria kuin natiivin viruksen aiheuttamat, mikä viittaa siihen, että CV-A9-GFP on elinkykyinen ja käyttökelpoinen solu- ja hiirikokeisiin. (Heikkilä ym. 2011).

3.3 Mengovirusvektorit

Cardiovirus-sukuun kuuluvien mengovirusien kloonaukko on käytetty joko 5'-päästä tai poikkeuksellisesti 2A- ja 2B-proteiinien välistä aluetta. Kardioviruksilla on enteroviruksista poiketen genomien 5'-pään NTR-alueella poly(C)-alue, jonka on todettu vaikuttavan viruksen infektiivisyyteen. Tätä aluetta muokkaamalla voidaan vaikuttaa viruksen patogeenisuuteen. (Van der Ryst ym. 1998) Van der Ryst ym. (1998) kehittivätkin erilaisia rekombinantiviruksia kloonamalla HIV-1:n Nef-geenin ja SIV:n Gag-, Nef- ja Pol-geenin sytotoksisten T-lymfosyyttien epitootit (CTL, engl. cytotoxic T-lymphocyte) mengoviruksen genomiin IRES-alueen ja leader-proteiinin (L) väliin fuusiona ja erillisinä geeneinä. Kokeissa havaittiin, että vaikka virukset olivat toimivia ja stabiileja *in vitro*, ne tuottivat erittäin pieniä plakkeja. Lisäksi HIV1:n ja SIV:n geenituotteet olivat vain heikosti immunogeenisiä. L-proteiinin tuotolla fuusiona tai ilman ei ollut vaikutusta rekombinanttien plakkikokoon. Hiiri- ja apinakokeissa L-proteiinin leikkaaminen pois fuusioproteiinista vaikutti virusten infektiivisyyteen.

Binder ym. (2003) tutkivat toista kloonaukkoaluetta mengoviruksen genomissa. He valitsivat 2A^{pro} - ja 2B-geenin välisen alueen heikennetystä villityypin genomista, johon kloonattiin kloonausalue (MCS, engl. multiple cloning site) ja enkefalomyokardiittiviruksen (EMCV, engl. encephalomyocarditisvirus) PCC-alue (engl. primary cleavage cassette) alavirtaan mengoviruksen omasta PCC-alueesta. Tutkimuksessa käytettiin yhteensä 19 erilaista ja erikokoista inserttiä. Genomien prosessointi onnistui hyvin soluissa, ja RNA-transfektion jälkeen vain pisin insertti, tulikärpäsen lusiferaasigeeni, ei tuottanut toimivia viruksia. Yleisesti insertin koko vaikutti merkittävästi virusten lisääntymiseen ja stabiilisuuteen. Hiirikokeissa testatut rekombinantit virukset tuottivat suuremman vasta-ainevasteen kuin villityyppi. Vaikka yli 1000 emäksen inserttejä saatiin ekspressoitumaan, stabiili virusgenomi sietä maksimissaan 500–600 emästä pitkän insertin.

4 Pikornavirukset ja syöpäterapia

Pikornaviruksia on vasta viime aikoina alettu tutkia mahdollisina työkaluina syöpäterapiassa. Tutkimuksissa käytetyt virukset ovat toistaiseksi olleet geneettisesti muokkaamattomia viruksia, mutta on mahdollista, että näihin viruksiin voidaan edellä esitetyillä tavoilla luoda parempia ominaisuuksia, mm. alentunut patogeenisuus tai rekombinaatiokyky tai mahdollisuus ekspressoida syöpäsoluja tuhoavia proteiineja (Dobrikova ym. 2008). Jotta pikornaviruksia tai mitä tahansa muita viruksia voisi käyttää syöpäterapiassa, niillä täytyy potilasturvallisuuden takaamiseksi olla erityisiä ominaisuuksia. Viruksella pitää olla spesifinen solutropismi, jolloin se infektoi vain kohdesoluja jättäen normaalit solut rauhaan. Viruksen täytyy olla isännälle vaaraton, eikä se saa aiheuttaa vakavia sairauksia tai sivuvaikutuksia. Isännän pitää pystyä poistamaan virus elimistöstä helposti immuunipuolustuksen avulla, kun virus on tehnyt tehtävänsä. Virusta pitäisi toisaalta pystyä käyttämään toistuvasti hoitokausien mukaan. Syöpäterapiaoihin tarkoitetut pikornavirukset ovat pärjänneet hiirikokeissa hyvin. Hiiret ovat saaneet vain lieviä oireita mutta pystyneet hävittämään viruksen elimistöstä luonnollisesti kokeen aikana (Shafren ym. 2005, Berry ym. 2008). Tutkimuksissa on tarkasteltu ihmisille infektiivisiä viruksia coxsackievirus A21:tä (CV-A21), echovirus 1:tä (EV1) ja coxsackieviruksia A13, A15 ja A18 (CV-A13, -A15 ja -A18) sekä eläinperäisiä EMCV:tä ja Seneca Valley 001 -virusta (SVV-001).

4.1 Ihmiselle infektiiviset virukset

4.1.1 Coxsackievirus 21 (CV-A21)

Coxsackievirus A21 (CV-A21) on heikosti patogeeninen virus, joka aiheuttaa tavallisesti flunssa- ja ylähengitystieoireita (Shafren ym. 2004). Se tarvitsee ICAM-1- ja DAF-reseptorit tarttuakseen ja infektoidakseen solun. Verrattuna tavallisiin soluihin näiden reseptorien ilmentyminen on selvästi korkeampaa syöpäsoluissa. (Au ym. 2007) Aun tutkimusryhmä tutki, miten CV-A21 toimii terapeuttisena ja onkolyyttisenä viruksena pahanlaatuista myeloomaa (MM, engl. malignant myeloma) vastaan. He osoittivat, että CV-A21 infektoi hyvin ICAM-1- ja DAF-reseptoreja ilmentäviä MM-solulinjoja (U266, RPMI-8226 ja NCI-H929), mutta ei kontrolleina käytettyjä PBMC-soluja (engl. peripheral blood mononuclear cell). Kliinisissä luuydinnäytteissä havaittiin *ex vivo* -kokeissa samanlainen onkolyyttinen efekti kuin *in vitro* -kokeissa. ICAM-1-

reseptoria ilmentävät CD138-positiiviset plasmakävyt tuhoutuivat tilastollisesti enemmän kuin kontrollisolut, mutta syöpäsolujen tuhoutuminen ei vaikuttanut normaalin luuytimen kasvuun tai verisolujen muodostumiseen.

Berry ym. (2008) tutkivat sekä CV-A21:n että echovirus 1:n (EV1; ks. seuraava kappale) vaikutusta tunnettuihin eturauhassyöpäsolulinjoihin (DU145, PC-3 ja LNCaP). Tässä työssä he käyttivät biovalikoitua CV-A21-varianttia, joka tarvitsee vain DAF-reseptorin kiinnittymiseen ja infektointiin. Tutkimukset osoittivat, että CV-A21-variantti infektoi ja tuhosi kaikkia kolmea syöpälinjaa paremmin kuin villityypin CV-A21 johtuen DAF-reseptorin paremmasta sitoutumisesta ja kaveoli-välitteisestä kuljetuksesta soluun. Vastaava efekti havaittiin myös EV1:llä, mikä johtui todennäköisesti siitä, että sen käyttämä reseptori, $\alpha 2\beta 1$ -integroini, käyttää samaa endosytoosimekanismia kuin CV-A21-variantti. Koska kyseessä oli ihmisen papilloomaviruksella kuolemattomaksi tehty solulinja, sen vaikutusta solulinjan reseptorien ekspressiotasoon ei tiedetä. Kaiken kaikkiaan reseptorien ekspressiotaso näyttäisi oleva tärkein vaatimus enterovirus-välitteiselle onkolyysille. SCID-hiirillä (engl. severe immunodeficiency) tehdyt *in vivo* -kokeet PC-3-solulinjan siirännäisillä osoittivat, että kaikki testatut virukset pienensivät tuumorin kokoa selvästi. Molemmat CV-A21-virukset lisääntyivät myös muualla hiiressä, kun taas EV1:n tiitteri laski tasaisesti kokeen aikana. EV1:llä ei löytynyt todisteita viruksen replikaatiosta, ja virus hävisi normaalisti hiiren elimistöstä. Tällä saattaa olla merkitystä arvioitaessa em. virusten käyttöä kliinisissä kokeissa.

CV-A21-virusta on käytetty myös rintasyöpäkokeissa. Skelding ym. (2009) testasivat viruksen tehoa erilaisiin rintasyöpäsolulinjoihin (BT-20, SK-BR-3, ZR-75-1, MDA-MB-231, -453, -157 ja -361, MCF-7 ja T-47D) käyttäen kolmea normaalia rintasolulinjaa kontrolleina (184A1, Hs578Bst ja MCF-10A). Virtausytometritutkimus osoitti, että syöpäsolulinjat ekspressoivat runsaasti virukselle spesifisiä reseptoreja, kun taas normaaleissa solulinjoissa reseptorien ekspressiotaso oli vähäinen. CV-A21 oli selvästi patogeenisempi syöpäsoluissa niin *in vitro* kuin 3D-kasvatuksissa verrattuna kontrolleihin. Merkittävä tulos oli myös se, että virus pystyi pienentämään merkittävästi primäärituumoria ja poistamaan kokonaan metastasoituneet pesäkkeet SCID-hiirikannoista.

4.1.2 Echovirus 1 (EV1)

Echovirus 1 (EV1) on mielenkiintoinen virus syöpäterapiaan, koska se on luonnostaan heikosti patogeeninen ihmisissä. Se käyttää reseptorinaan $\alpha 2\beta 1$ -integroiniä, jota myös monet syöpäsolulinjat ekspressoivat runsaasti. Shafren ym. (2005) tutkivat vastaavasti EV1:n onkolyttisiä vaikutuksia munasarjasyöpää vastaan. Tutkimuksessa käytettiin kahdeksaa munasarjasyöpäsolulinjaa (2008, DOV13, JAM, OVCA-429, OVCAR-3, OVHS-1, OAW-42, IGROV-1) ja normaalia munasarjan epiteelisolulinjaa (E6/E7). EV1 infektioi ja tuhosi kaikkia käytettyjä syöpäsolukantoja *in vitro* -kokeissa. EV1:n aiheuttamaa onkolyysiä verrattiin myös CV-A21:n ja echovirus 7:n (EV7) onkolyysiin samoissa olosuhteissa ja sen todettiin olevan voimakkaampaa. Koska EV1 sitoutuu $\alpha 2\beta 1$ -integroiniin, johon sitoutuu myös kollageeni I, tutkimuksessa arvioitiin, että tämä kilpailutilanne voi myös estää syöpäsolujen metastasoitumisen. EV1-infektio tuhosi tehokkaasti syöpäsolut myös 3D-syöpäsolukokeessa. SCID-hiirissä sekä ihonalainen injektio syöpäsolusiirrännäiseen että injektio kauempana injektio paikasta olevaan kudokseen johti merkittävään syöpäsolujen vähenemiseen. EV1 hävisi hiiristä seitsemän päivän kuluessa, millä saattaa olla merkitystä taudin uusiutuessa. Mikäli henkilössä muodostuu neutraloivia virusvasta-aineita, voi virusvektorin toistuva käyttö olla mahdotonta. Haley ym. (2009) tutkivat EV1:n kohdentumista neljään mahasyöpäsolulinjaan (MKN-45, AGS, Hs746T ja NCI-N87). EV1 infektioi hyvin kolmea neljästä mahasyöpälinjasta, ja SCID-hiirissä istutettujen kasvainten koko saatiin merkittävästi pienennettyä yhdellä virusinjektiolla vatsaonteloon (*i.p.*, engl. intraperitoneally).

4.1.3 Coxsackievirus A13, A15 ja A18 (CV-A13, -A15 ja -A18)

Aivan viime aikoina on myös tullut lupaavia tuloksia coxsackievirus A13, A15 ja A18 (CV-A13, -A15, -A18) ominaisuuksista onkolyttisinä viruksina. Nämä virukset kuuluvat *Ihmisen enterovirus C* -lajiin (HEV-C, engl. *Human enterovirus C*) ja ovat lievästi patogeenisiä ihmisissä. Virukset käyttävät ICAM-1-reseptoria tarttuakseen ja infektoidakseen soluja. Au ym. (2011) tutkivat CV-A13 Flores-kannan, CV-A15 G-9-kannan ja CV-A18 G-13-kannan onkolyttisiä ominaisuuksia pahanlaatuista melanoomaa vastaan SCID-hiirissä ja soluviljelmissä. Tutkimuksessa käytettiin SK-Mel-28, SK-Mel-RM, ME4405 ja MV3-syöpäsolulinjoja. Virukset infektoivat soluja

hyvin, mutta eivät niin hyvin kuin aikaisemmin oli onnistuttu CV-A21:llä (Au ym. 2007). Hiirikokeet suoritettiin parhaiten solukokeissa menestyneellä SK-Mel-28-syöpäsolulinjalla. Hiirissä olevien kasvaimien todettiin pienentyneen merkittävästi 35 päivää viruksen injektion jälkeen suoraan kasvaimeen verrattuna kontrolliin. Tehokkain virus oli CV-A18, jolla testatuista hiiristä 5/5 todettiin kasvaimen täydellinen häviäminen 48 päivän jälkeen injektioista. CV-A15:ta kasvain hävisi 2/5 hiirestä ja CV-A13 0/5. Tässä tutkimuksessa käytetyt virukset on ehdotettu luokitettavaksi jo aikaisemmin (Brown ym. 2003) ja sen perusteella CV-A15 G-5-kanta on nyt luokiteltu CV-A11:ta ja CV-A18 G-18-kanta on luokiteltu CV-A13:ta (The Picornavirus Home Page <<http://www.picornaviridae.com>>). Näytteiden ikä ja aiempi nimeämiskäytäntö voivat olla syynä tutkimuksessa käytettyihin vanhoihin serotyypin nimiin. Kuitenkin näiden tulosten perusteella CV-A13:a Flores- ja G-18-kantojen välillä näyttäisi olevan merkittävä ero, miten ne vaikuttavat syöpäkasvaimien kasvuun ja häviämiseen.

4.2 Eläinperäiset virukset

4.2.1 Seneca Valley Virus 001 (SVV-001)

Pikornaviruksia löydetään koko ajan lisää. Erityisen kiinnostavaa tämä on siksi, että on löydetty myös viruksia, jotka ovat oireettomia ihmisissä mutta tuhoavat ihmisen syöpäsoluja. Seneca Valley Virus 001 -viruksella (SVV-001) ei ole tunnettuja haittavaikutuksia ihmisissä, mikä tekee siitä hyvän kandidaatin onkolyyttisenä viruksena (Reddy ym. 2007, Wadhwa ym. 2007). SVV-001:n keksivät Neotropix-nimisen yrityksen tutkijat, ja sen uskotaan olevan peräisin lehmistä. Reddy ym. (2007) tutkivat SVV-001-viruksen onkolyyttisiä ominaisuuksia 138 eri syöpäsolulinjalla. Virukset tuotettiin PER.C6-solulinjalla. Tutkimuksessa kävi ilmi, että viruksella on selviä onkolyyttisiä ominaisuuksia sellaisia syöpiä kohtaan, joilla on neuroendokriinisiä ominaisuuksia. Normaaleihin soluihin viruksella ei ollut haitallisia vaikutuksia. Hiirillä tehdyt *in vivo* -kokeet osoittivat, että viruksen annostuksen toksisuusraja oli erittäin suuri. Ainoa tutkimuksessa havaittu mitattava mutta ohimenevä muutos oli hiirien painon ja valkosolujen määrän lasku käytettäessä suurimpia annostuksia. Syöpäsolusiirrännäiskokeissa, jotka tehtiin keuhkosyöpälinjalla H446 ja neuroendokriinisellä retinoblastomasolulinjalla Y79, virus oli tehokas jopa pienimmillä annostuksilla [10^7 ja 10^8 viruspartikkelia/kg (vp/kg)]. H446-solujen aiheuttaman

tuumorin täydellinen katoaminen saavutettiin yhdellä *i.v.* (suonensisäisesti, engl. intravenously) injektiolla. Tämän arveltiin johtuvan viruksen pienestä koosta ja replikaatiosyklin nopeudesta. Viruksen replikaatio oli selvästi rajoittunut tietynlaisiin soluihin, eikä virus tuottanut mutanteja normaaleissa oloissa. Tämä osoitti, että viruksen genomi on stabiili.

SVV-001 on tutkimuksissa ehtinyt jo ensimmäisiin kliinisiin kokeisiin. Rudin ym. (2011) tekivät faasin 1 kliinisen kokeen 30 potilaalla, joilla oli todettu neuroendokriinisiä piirteitä omaava syöpä, mukaan lukien pienisolainen keuhkosityöpä. Annoskoot vaihtelivat 10^7 - 10^{11} vp/kg. Tutkimuksen tuloksissa todetaan, että potilaat sietivät hyvin virusta kaikilla annostuksilla ja viruksen poistuminen kehosta tapahtui odotusten mukaisesti. Syöpäsoluissa todettiin viruksen replikaatiota normaalien solujen pisyessä virusvapaina syöpäkasvaimien läheisyydessä ja virusreplikaatio säilyi aktiivisena jopa 28 päivää ensimmäisestä virusaltistuksesta. Yhden kliiniseen kokeeseen osallistuneen potilaan pienisolainen keuhkosityöpä ei edennyt kymmeneen kuukauteen virusaltistuksen jälkeen, ja koehenkilö on vielä elossa kolme vuotta kliinisten kokeiden jälkeen. SVV-001:lle on tällä hetkellä suunnitteilla faasin 2 kliiniset kokeet pienisoluisen keuhkosityövän ja lasten neuroendokriinisen syövän osalta.

4.2.2 Enkefalomyokardiittivirus (EMCV)

EMCV-virus on pikornavirus, joka infektoi monia nisäkäs- ja lintulajeja, mutta suoraa yhteyttä viruksen infektiivisyyteen ihmisissä ei ole todistettu (Roos ym. 2010). Tämän vuoksi Roos ym. (2010) tutkivat tämän onkolyttistä vaikutusta pahanlaatuisessa munuaisyövässä (CCRCC, engl. clear-cell renal cell carcinoma), joka on yksi vastustuskykyisimmistä syöivistä sädehoitoa ja kemoterapiaa kohtaan. Vain 4–6 % soluista saadaan tuhottua kemoterapialla ja metastasoituneen CCRCC-syövän selviytymisaika on keskimäärin kymmenen kuukautta. Solujen tuottama selviytymistekijän NF- κ B:n (engl. nuclear factor kappa B) inaktivaatio vähentää EMCV:n infektiivisyyttä aktivoimalla solun apoptoosiprosessin. CCRCC-solut yliekspressoivat hypoksiaa indusoiva tekijä alfaa (HIF- α , engl. hypoxia-inducible factor α), koska näiltä syöpäsoluilta puuttuu von Hippel-Landau -syöpäsolujen toimintaa ehkäisevä proteiini (VHL, engl. von Hippel-Landau tumor suppressor protein), joka saa aikaan HIF- α :n hajoittamisen merkitsemällä proteiinin polyubikitiinillä. HIF- α -

proteiinin yliekspressio johtaa NF- κ B:n aktiivisuuden nousuun ja anti-apoptoottisen signaloinnin voimistumiseen. Tämä tekee CCRCC-soluista alttiimpia EMCV:n infektiolle. Tutkimuksessa EMCV-virus tuhosi merkittävästi CCRCC-soluja soluviljelmissä, jotka olivat menettäneet VHL-proteiiniaktiivisuuden verrattuna VHL-aktiivisiin soluihin. VHL:n aktiivisuuden palautus tai HIF- α /NF- κ B:n inhibointi CCRCC-soluissa laski rajusti EMCV:n infektiivisyyttä, mikä todistaa EMCV:n infektion olevan HIF- α /NF- κ B-selviytymisreiteistä riippuvainen. Lisäksi virus sai aikaan kasvaimien koon pienenemisen hiirissä *in vivo*. Tämän johdosta EMCV-virus voi tehota myös muunlaisiin syöpälajeihin, joissa on kohonnut aktiivisuus HIF- α /NF- κ B-signaalireiteissä.

5 Yhteenveto

Pikornavirukset ovat tutkimuksissa toimineet hyvin niin geenivektoreina kuin syöpäterapiassa. Pikornavirusvektoritutkimukset ovat keskittyneet insertin koon ja insertiokohdan tutkimiseen käyttäen malleina lähinnä poliovirusta ja coxsackievirusia. Virusten tuottamat ja ilmentämät geenit ovat usein antaneet erinomaisen vasteen hiirikokeissa ja suojanneet suurinta osaa hiiriä jälkeensä tehdyttä infektiolta. Insertiokohdan valitseminen on merkittävin tekijä viruksen stabiiliuden kannalta. Parhaimmat strategiat polioviruksen käyttämiseen geenivektorina ovat joko ylimääräisen IRES-alueen kloonaminen genomiin ohjaamaan insertin translaatiota tai insertin kloonaminen rakenneproteiinien jälkeen samaan lukukehykseen ylimääräisen katkaisukohtien kanssa. Coxsackievirusilla paras kohta näyttäisi olevan joko 5'-pään alkuun ennen rakenteellisia proteiineja katkaisukohtien kanssa tai fuusiona VP1- ja 2A^{pro}-proteiinien väliin. Syöpäterapiassa lieväoireisilla pikornaviruksilla on saavutettu merkittäviä tuloksia niin hiirikokeissa kuin kliinisillä näytteillä. Miltei jokaisessa tutkimuksessa kasvaimien koko ja määrä on saatu alenemaan merkittävästi. Myöskään patogeenisuus ei ole ollut ongelma, koska virukset ovat olleet joko heikennettyjä tai luonteeltaan sellaisia, että ne eivät aiheuttaneet hiirille kuin lieviä oireita. Heikennetyt virukset eivät ole myöskään muuttuneet patogeenisiksi *in vivo* -tutkimuksissa vaikka pelkona on terapiaviruksen muuntuminen patogeenseksi kannaksi rekombinaation kautta (Dobrikova ym. 2008).

Pikornaviruksiin kuuluu koko joukko viruksia, joiden taudinkuva on lievä, ja näiden virusten käyttöä geenivektoreina pitäisikin tutkia enemmän. Virusten käyttö lääketieteessä tulee varmasti tulevaisuudessa olemaan yhä suuremman tutkimuksen kohteena. Kunhan virukset saadaan kehitettyä kliinisten kokeiden tasolle, ne tulevat olemaan erinomainen lisä muiden syöpähoitojen rinnalla. Vaikka pikornavirukset ovat yleisiä taudinaiheuttajia, tämä voi olla myös etu, sillä immuniteetin muodostuminen yhdelle serotyypille ei tee kehoa vastustuskykyiseksi toista serotyyppiä vastaan. Tällöin voitaneen käyttää erityyppisiä pikornaviruksia saman taudin jatkohoidoissa.

II Kokeellinen osa

Coxsackievirus A7 -isolaattien sekvenssianalyysi

Tiivistelmä

Coxsackievirus A7 (CV-A7) on 7400 nukleotidin (nt) pituinen positiivissäikeinen, yksinauhainen RNA-virus ja kuuluu *Human enterovirus A* -lajiin. Työssä tutkittiin viittä oletettua CV-A7-virusta: Parker, USSR, 275/58, ET1080 ja SVK. CV-A7-Parker, CV-A7-USSR ja CV-A7-275/58 on eristetty 1950-luvulla ja CV-A7-SVK vuonna 2003. CV-A7-ET1080:n oletettiin olevan peräisin WHO:n kokoelmista 1980-luvulta. CV-A7-USSR on polioviruksen ja EV71:n lisäksi ainoa pikornavirus, joka on aiheuttanut alaraajahalvausepidemioita ihmisessä. Vain yksi sekvensoitu genomi (Parker-sekvenssi, GenBank AY421765) on julkaistu tähän mennessä.

Työssä optimoitiin reaaliaikainen PCR-menetelmä CV-A7-viruksen genomin tuottamiseksi PCR-reaktiolla (FL-PCR). FL-PCR:n optimointiin käytettiin plasmidivektoreita, joihin oli kloonattu CV-A7-USSR- (USSR-pcDNA3) ja CV-A7-Parker-isolaattien (Parker-TA) genomit. Kehitettyä menetelmää käytettiin muiden isolaattien tutkimiseen. Kolmesta muusta CV-A7-virusisolaatista (275/58, ET1080 ja SVK) eristettiin virus-RNA, joka käännettiin kopio-DNA:ksi (cDNA) Improm-II käänteistranskriptaasientsyymillä PCR:ää varten. PCR:ssä käytetyt, CV-A7-spesifiset koettimet oli suunniteltu aiemmin sekvensoidun AY421765:n pohjalta. Työssä myös sekvensoitiin ja analysoitiin Parker-, USSR-, 275/58-, ET1080- ja SVK-isolaatit sekä kloonattiin täyspitkiä virusgenomeja cDNA-muodossa mutaatiokokeita varten. Infektiivisen kloonin tuottamiseksi USSR-pcDNA3- ja Parker-TA-vektoreista tuotettiin PCR:n avulla (T7-PCR) virusgenomin sisältävä DNA-jakso, jonka 5'-päähän muodostui alukkeiden avulla T7RNA-polymeraasipromoottori ja 3'-päähän polyA-häntä.

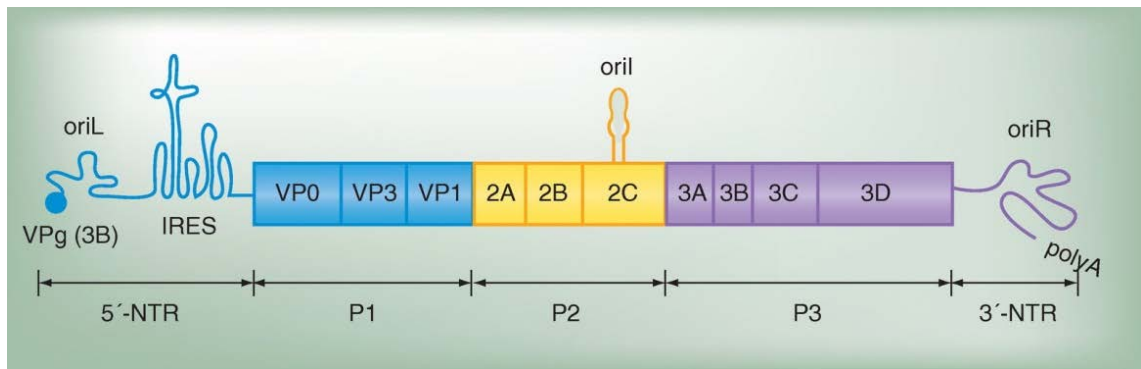
FL-PCR:n optimointi onnistui, ja neljä viidestä CV-A7-isolaatista sekvensoitiin. Virusgenomien pituus vaihteli 7403–7405 nt välillä (CV-A7-275/58:ssa ylimääräinen ja CV-A7-Parkerin puuttuva nukleotidi osuivat koodaamattomalle alueelle). Virusgeenejä ja -proteiineja verrattiin AY421765:en, ja koko genomin pituudelta CV-A7-ET1080, CV-A7-Parker ja CV-A7-USSR osoittautuivat yli 99 % ja CV-A7-275/58 82,6 % nt samankaltaisiksi. Yksittäisten geenien ja proteiinien osalta CV-A7-275/58 oli 75,8–90,4 % nt ja 93,7–98,8 % aa samankaltainen muihin verrattuna. Simplot-analyysissä 3B-geenialue oli heterogeenisin. CV-A7-SVK-isolaatista ei saatu CV-A7-alukkeilla PCR-tuotetta ja osittaisen VP1-alueen tyyppityksen mukaan isolaatti osoittautui olevan echovirus 3. Infektiivistä kloonia ei saatu tuotettua T7-PCR-tuotteista.

1 Johdanto

Enterovirukset ovat yleisimpiä ihmiselle tauteja aiheuttavia viruksia. Enterovirusiin kuuluu merkittäviä taudinaiheuttajia kuten rinovirus, poliovirus ja enterovirus 71 (EV71). Jopa miljardi ihmistä saa vuosittain enterovirustartunnan. Useimmat enterovirusten aiheuttamista infektiosta ovat oireettomia tai lieväoireisia mutta aiheuttavat myös vakavia infektoita. Tyypillisiä enterovirusten aiheuttamia sairauksia ovat muun muassa lievät ylähengitysteiden sairaudet kuten nuha, kuumeinen ihottuma (enterorokko), aseptinen aivokalvontulehdus ja halvaus. Suurin osa nimetyistä enterovirusserotyypeistä löydettiin ja serotyyppitettiin vuosien 1947 ja 1963 välisenä aikana, jolloin soluviljely ja hiiren käyttö yleistyivät polioviruksen ja muiden keskushermostoa infektoivien virusten tutkimuksessa. Alun perin enterovirukset luokiteltiin niiden kliinisen taudinkuvan (erit. poliovirus), replikaation ja taudinkuvan perusteella käyttäen vastasyntyneitä hiiriä infektiomalleina. (Palacios ja Oberste 2005) Tyypillisesti coxsackievirus A (CV-A) aiheuttaa velttohalvausoireita ja coxsackievirus B (CV-B) aivo-oireita (Dalldorf 1950). Echovirukset sen sijaan kasvavat soluviljelyssä mutta eivät aiheuta sairautta hiirissä. Nykyisin enterovirukset tyypitetään geneettisesti geenisekvenssejä vertaamalla ja nimetään numeroimalla. (Palacios ja Oberste 2005) Tällä hetkellä *Enterovirus*-sukuun kuuluu 10 viruslajia. Enterovirustyyppiä tunnetaan yli 250 kappaletta, kun mukaan lasketaan myös rinovirustyyppit, ja määrä lisääntyy koko ajan. Tässä työssä tutkitut coxsackievirus A7 (CV-A7) -virukset kuuluvat *Ihmisen enterovirus A* -lajiin (HEV-A, *Human enterovirus A*). (Stanway ym. 2005)

1.1 Enterovirusten rakenne ja genomi

Enterovirukset ovat rakenteeltaan positiivissäikeisiä, yksinauhaisia RNA-viruksia. Virusgenomi toimii infektoituneessa solussa lähetti-RNA:n (mRNA, engl. messenger RNA) tavoin, eli siitä transloituu proteiini ilman välivaiheita. Genomin pituus on noin 7500 nukleotidia (nt). Viruksen varsinainen genomi transloidaan yhtenä isona polyproteiinina, jonka koko on noin 200 kilodaltonia (kDa). Itse virus on pieni, noin 30 nm halkaisijaltaan. (Hyypiä ym. 1997) Se muodostuu 60 identtisestä yksiköstä, jotka koostuvat kuoriproteiineista nimeltä VP1-VP4 (viruksen kuoriproteiini, engl. virus protein 1-4). Viruksen kuori on järjestäytynyt ikosahedraalisesti siten, että kuoriproteiinit VP1-VP3 ovat ulkopuolella ja VP4 kuoren sisäpuolella.



Kuva 1. Enterovirusten genomien rakenne. (Cameron ym. 2010)

Poliovirus, joka on enterovirusten prototyyppivirus (kuva 1), koostuu alussa olevasta 5'-pään koodaamattomasta alueesta (5'-NTR, engl. 5' non-translated region), itse genomista, joka transloituu polyproteiinina, sekä 3'-pään koodaamattomasta alueesta (3'-NTR, engl. 3' non-translated region) genomien lopussa. 5'-NTR-alue sisältää sisäisen ribosomin sitoutumiskohdan (IRES, engl. internal ribosome entry site) ja cis-replikaatiotekijän (oriL) (CRE, engl. cis-acting replication element). IRES-rakenne mahdollistaa translaation aloituksen ilman 5'-päässä olevaa 5'-m⁷G-cap-rakennetta, ja CRE-rakenteilla on keskeinen rooli negatiivisen RNA-nauhan synteesissä.

Transloituva polyproteiini on jakautunut kolmeen osaan: P1, P2 ja P3. P1-proteiinit sisältävät viruksen kuoriproteiinit VP1-VP4. VP0-proteiini prosessoituu autokatalyyttisesti VP4- ja VP2-proteiineiksi. P2-proteiinit 2A^{pro}, 2B ja 2C muuttavat isäntäsolun olosuhteet suotuisiksi tehokkaalle genomien replikaatiolle. 2B ja 2C vuorovaikuttavat solukalvolla, ja niiden on osoitettu muodostavan vesikkeleitä, jotka toimivat replikaatiokomplekseina (RC, engl. replication complex) virukselle. 2C sisältää toisen CRE-rakenteen (oriI). P3-proteiineihin kuuluvat 3A, 3B (VPg), 3C^{pro} ja 3D^{pol}. 3A:n karboksyyli-pää toimii hydrofobisena solukalvon ankkurina, 3B (tai VPg, engl. viral protein genome linked) toimii RNA-polymeraasin alukkeena ja aktivaattorina. VPg on myös sitoutuneen jokaisen RNA-genomin 5'-päähen. (Cameron ym. 2010) 3D^{pol} on RNA:sta riippuvainen RNA-polymeraasi. Kun polyproteiini on transloitu, yksittäiset proteiinit pilkotaan viruksen omilla proteaaseilla 2A^{pro} ja 3C^{pro}. Polyproteiinin jälkeen viruksen genomissa on vielä 3'-NTR-alue, johon sisältyy kolmas CRE-rakenne (oriR) (Cameron ym. 2010), ja polyA-häntä, joka on noin 20–150 adenosiinin pituinen (Steil ja Barton 2009).

1.2 Coxsackievirus

Coxsackievirus löydettiin ensimmäisen kerran kesällä 1947 Coxsackien kylästä Yhdysvalloista, jolloin New Yorkin alueella tutkittiin viittä erillistä polioepidemiatapausta (Dalldorf ja Sickels 1948, Dalldorf 1949, Dalldorf ja Gifford 1951). Coxsackievirustutkimuksen alkuvaiheissa viruksen tutkiminen oli haasteellista. Siihen aikaan polioepidemioiden olivat yleisiä. Dalldorf (1950) totesi, että coxsackievirusta esiintyi yleisesti ja usein polioviruksen kanssa, mikä vaikeutti yleisesti polioviruksen aiheuttaman infektion ja coxsackieviruksen aiheuttaman infektion erottamista. Vuoteen 1950 mennessä coxsackievirus oli löydetty ja luokiteltu seitsemän kappaletta: viisi CV-A:ta ja kaksi CV-B:tä (Melnick 1950). Vuonna 1957 tunnettiin jo 18 CV-A:ta ja viisi CV-B:tä (Dalldorf 1957a).

CV-A7 oli yleinen virus 1940–60-luvuilla (Melnick ja Kaplan 1950, Silverthorne ym. 1951, Dalldorf ja Albrecht 1955, Habel ja Loomis 1957, Grist ja Bell 1984). Kuitenkin 60-luvun jälkeen virus on kadonnut kokonaan. Skotlannissa tehdyt tutkimukset vahvistavat, että Euroopassakin CV-A7 oli ollut yleinen tänä aikana, mutta tämän jälkeen virus on kadonnut kokonaan. Saman laboratorion samalta alueelta tekemä myöhempi kartoitus enterovirusten yleisyydestä osoittaa, että CV-A7 on pysynyt poissa vuosina 1973–1997. (Grist ja Bell 1984, Nairn ja Clements 1999) Blomqvist ym. (2008) tyypittivät 1121 HEV-A-virusta, jotka oli eristetty vuosien 2001–2007 aikana, ja tutkimuksessa ei löydetty yhtäkään CV-A7-virusta. Virusta ei ole viime vuosinakaan tavattu epidemiologisissa tutkimuksissa, ja sen esiintyvyys nykypopulaatiossa on siten tuntematon.

Tässä työssä käytetyt CV-A7-virusnäytteet olivat alkuperäisiä American Type Culture Collectionin (ATCC) virusnäytteitä siltä ajalta, kun ne ensi kertaa eristettiin. Seuraavassa esitellyistä viruksista käytetään jatkossa nimityksiä CV-A7-Parker, CV-A7-USSR, CV-A7-275/58, CV-A7-ET1080 ja CV-A7-SVK. CV-A7-Parker (ATCC nro VR-166) on eristetty vuonna 1949 (Dalldorf 1953), CV-A7-USSR (AB-IV) vuonna 1952 (VR-319), CV-A7-275/58 vuonna 1958 (VR-673) ja CV-A7-SVK vuonna 2003. Taudinkuvastaan huolimatta CV-A7-275/58 todettiin ei-hiiripatogeeniseksi, ja on esitetty, että se olisi echovirus (Richter ym. 1971). Tästä huolimatta tämä virus on ATCC:n sivuilla CV-A7-viruksena. CV-A7-USSR-isolaatti (Chumakov ym. 1956 [venäjäksi]; Habel ja Loomis 1957) aiheutti polion kaltaisen paralyyttisen alaraajahalvauksen mutta neutralisoitui CV-A7-vasta-aineilla (Habel ja Loomis 1957).

CV-A7-ET1080:n epäillään olevan sama kuin CV-A7-USSR, eikä siitä ole juurikaan muuta tietoa kuin, että sen epäillään olevan Maailman terveysjärjestön (WHO, engl. World Health Organization) käyttämä tunniste CV-A7:lle. CV-A7-sekvenssit ovat kiinnostavia, koska CV-A7 on polion ja EV71:n lisäksi ainoa virustyyppi, joka on todistettavasti aiheuttanut velttohalvausepidemioita (engl. flaccid paralysis). Kirjallisuudessa on aiemmin julkaistu vain yksi CV-A7-isolaatin sekvenssi (Parker-isolaatti, GenBank AY421765, Oberste ym. 2004a) osana HEV-A-lajin tyyppikantojen sekvenssointityötä.

1.3 Erikoistyön tavoitteet

Työn ensimmäisenä tavoitteena oli optimoida pitkä polymeerasiketjureaktio (FL-PCR, engl. full-length polymerase chain reaction), jotta CV-A7-viruksen genomi voitaisiin kloonata yhdellä PCR-reaktiolla. FL-PCR-menetelmä vähentäisi työvaiheiden määrää, jolloin genomia ei tarvitsisi enää kloonata paloissa ja liittää näitä paloja erikseen vektoriin täyspitkän genomien koostamiseksi. Tämän johdosta genomia voitaisiin käyttää *in vitro* -transkriptioreaktiossa ennen solutransfektiota. Tämä tekniikka helpottaisi merkittävästi virusten elinsyklin ja mutaatioiden yhteyden selvittämistä sekä mahdollistaisi *in vivo* -kokeet, joissa tutkitaan muokattujen virusten ominaisuuksia solu- ja hiirimalleissa. Kun FL-PCR-reaktio on saatu toimimaan CV-A7-viruksilla, voidaan genomi kloonata spesifisillä alukkeilla taustavektoriin. Nämä alukkeet tulevat sisältämään promoottorialueen T7RNA-polymeraasille 5'-alukkeessa, joka vastaa genomien prosessoinnista solussa. 3'-alukkeessa on polyT-häntä, joka tuottaa infektiivisyyden kannalta välttämättömän polyA-hännän viruksen genomiin. Työn toisena tavoitteena oli tutkia viittä CV-A7-virusta, sekvenssoida virukset, selvittää sekvenssien perusteella niiden eroavaisuudet ja miten nämä eroavaisuudet ovat riippuvuussuhteessa kirjallisuudessa kuvattuihin oireisiin.

2 Materiaalit ja metodit

2.1 Virukset ja plasmidit

Työssä sekvensoitiin viittä virusta, joista kolme oli alun perin saatu ATCC:ltä. Nämä olivat CV-A7-Parker, CV-A7-USSR ja CV-A7-275/58. Lisäksi sekvensointiin CV-A7-ET1080, joka oli alun perin WHO:lta. Kaikki virukset ovat alun perin serotyypitetty CV-A7-viruksiksi hevosen antiseerumilla, joka on tuotettu WHO:n toimesta (Kamitsuka ym. 1965). CV-A7-SVK-virus oli saatu Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitokselta (THL), missä se oli tunnistettu CV-A7-virukseksi neutralisaatiokokeissa.

Taulukko 1. Virusten kloonaukseen ja sekvensointiin käytetyt alukkeet.

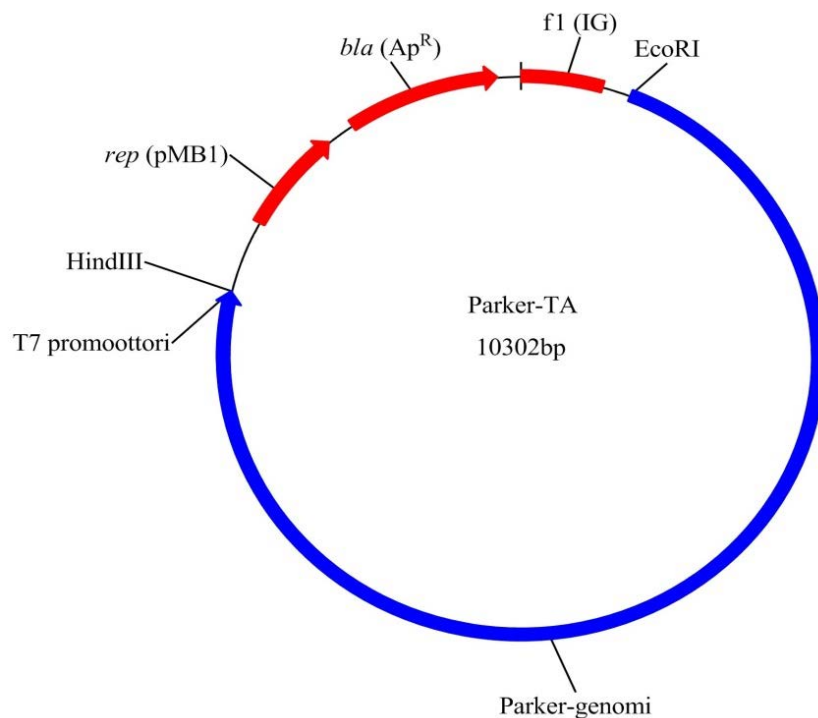
Aluke	Sekvenssi (5'-3')	Koordinaatti ^a
CV-A7-AF-HindIII ^b	cgtattaagcttTTAAAACAGCCTGTGGGTTGT C	5'-aluke
CV-A7-A1F	TCCTCCGGCCCCCTGAAT	448-465
CV-A7-A2F	TCGACAATTACAACGCAAGAAGCG	1010-1033
CV-A7-A3F	ATTGAGACAAGCTGTTACTCA	1690-1710
CV-A7-A4F	TAGTGGTTCTGGGTAGCGCT	2352-2371
CV-A7-A5F	CTGCTGAGACAGGATCGTCT	2580-2599
CV-A7-A6F	GCAAACCGACCCAATCAGTTA	3156-3176
CV-A7-A7F	TATAGTCTCCACGGGCGGGAA	3691-3711
CV-A7-BF-EcoRI ^b	tatagcgaattcCTTTGGCACAGGATTTACTGA	3811-3831
CV-A7-B2F	AACTACATGCAGTTCAAGAGC	4401-4420
CV-A7-B3F	AGAATACAATAATAGATCAG	5008-5027
CV-A7-B4F	GAGTTGGTTGATGAACAAGG	5564-5583
CV-A7-B5F	ACAAGCCTTGTCTTCTAAATA	6097-6117
CV-A7-B6F	ACACCCACCCACGTGTACCGCA	6744-6764
CV-A7-B7F	TTAAACCTACAGCTTTGAGCTGAA	7318-7341
CV-A7-A1R	AAGCAGCCAGAATAAAGATAAAAAG	567-590
CV-A7-A2R	TACTGTGAGCTGCGCGACCCTATC	980-1003
CV-A7-A3R	TTAACTCCATGGGCAAACCT	1711-1730
CV-A7-A4R	CGATGTTGGCTAGCTTGAGTGTTA	2524-2547
CV-A7-A5R	CCTTGGGCAGTAGTGGATGAGA	3450-3471
CV-A7-A6R	CTCCTAATGACGATGACAAGTGC	3929-3951
CV-A7-A7R	TATAACGAACCTTGGAGGTGAATGA	4706-4729
CV-A7-AR-EcoRI ^b	taatcggaattcGGTTTTTGAGGATCTTCTCCA	3911-3891
CV-A7-B2R	CATCAACCAACTCGACCGCATCTA	5553-5567
CV-A7-B3R	GGACTTCCCTTCTTGATT	6433-6451
CV-A7-B4R	ACAAATCTTTCGTACTIONCGTCCTTC	7210-7233
CV-A7-BR-NotI-EcoRI ^b	tacatagaattcgcggccgcGCTATTCTGGTTATAA CAAATTA	3'-aluke
CV-A7-275-1F	GGGTGGTATTGGAAATTCCCTGA	1179-1201
CV-A7-275-1R	GTTGGCCGGGTAACGGACGTTTT	225-247

CV-A7-275-2F	ATGCCGGTTCAGGGGACTAGCAA	2718-2740
CV-A7-275-2R	GCTTTAGTGGTATTCTGTGCAGC	2469-2491
CV-A7-275-3F	ATACCTGAAACACCGACCAATGT	5190-5212
CV-A7-275-3R	CTTGTTGCTTGTATCCGTCGAAA	4562-4584
CV-A7-275-4F	TCATCGGGGATCCACATTGGTGGG	5854-5876
CV-A7-275-4R	AAGTGACAACACCCCCACATTGT	5819-5841
CV-A7-275-5F	GCTTTTTACCAGATCATCAATTCCC	7066-7090
CV-A7-275-5R	CGTCTCCATACGCCACCATGTTT	6899-6921
CV-A7-275-6F	TCCTGCTACCGGGTGCCTCTTCGC	6601-6625
CV-A7-275-7F	AAAACCAAATTTCCAACCTTAGAGCA	4243-4267
CV-A7-275-8F	TGCTAATAGAATGCAGGCAATGCTT	2141-2165
CV-A7-275-9F	GCGGAGGCGTGTGGTTACAGTGATA	960-984
T7-CV-A7-F ^c	atagcggaattctaatacgaactactatagggTTTAAAACA GCCTGTGGGTTGTC	5'-aluke
T7-CV-A7-R- pA ^c	ttttttttttttttttttttttttttttttGCTATTCTGGTTATAA CAAA	3'-aluke

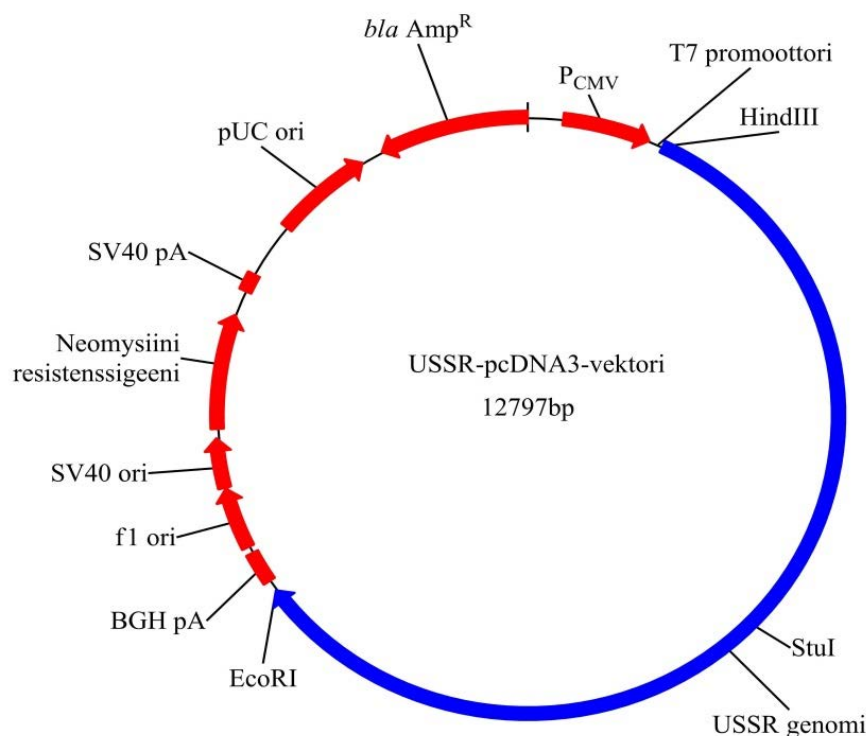
^a Alukkeiden koordinaatit perustuvat AY421765:een paitsi CV-A7-275 alukkeet, joiden koordinaatit perustuvat sekvensoituun CV-A7-275/58 isolaattiin (GenBank GU942820).

^b Restriktioentsyymit on esitetty alukkeissa pienillä kirjaimilla.

^c Näitä alukkeita käytettiin T7RNA-polymeraasin promoottorialueen ja polyA-hännän tuottamiseen CV-A7-USSR- ja CV-A7-Parker-isolaateille. T7RNA-polymeraasin promoottorialue ja polyT-häntä on esitetty alukkeissa pienillä kirjaimilla.



Kuva 2. Parker-TA-kloonausvektori.



Kuva 3. USSR-pcDNA3-kloonausvektori.

Pitkän PCR:n optimoinnissa käytettiin kahta plasmidivektoria, joihin oli kloonattu CV-A7-Parker ja CV-A7-USSR-genomit. CV-A7-Parker oli kloonattu TA-vektoriin (kuva 2) nimeltä pTZ57R/T (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). Genomi oli kloonattu vektoriin tasapäisenä, kokonaisena palana MCS-alueelle (engl. multiple cloning site) sisältäen polyA-hännän ja käyttäen CV-A7-A-HindIII-F ja CV-A7-BR-NotI-EcoRI-alukkeita (taulukko 1).

CV-A7-USSR-genomi oli kloonattu USSR-pcDNA3-vektoriin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (kuva 3). USSR-pcDNA3-vektori rakennettiin ns. kolmoisligaatiolla. Ensin kloonattiin CV-A7-AF-HindIII- ja CV-A7-AR-EcoRI-alukkeilla 4000 nukleotidin pala, joka kloonattiin pGEM7-vektoriin (Promega, Madison, WI, USA). Toinen pala kloonattiin CV-A7-BF-EcoRI- ja CV-A7-BR-NotI-EcoRI-alukkeilla niin ikään pGEM7-vektoriin. Nämä palat oli suunniteltu siten, että ne menevät osittain toistensa päälle. Tämän päälle menevän alueen sisällä on StuI-leikkauskohta, jota käytettiin kloonauksen seuraavassa vaiheessa. pcDNA3-vektori linearisoitiin HindIII-StuI-kohdista. Molemmista pGEM7-vektoreista eristetyt HindIII-StuI ja StuI-EcoRI-palat

yhdistettiin toisiinsa ja pcDNA3-vektorin HindIII-EcoRI-kohtaan kolmoisligaatio-reaktiossa.

2.2 Virusten kasvatus syöpäsolulinjoissa

Sekvensoitavat virukset kasvatettiin apinan munuaisen epiteelisoluissa (B-Vero). Ylläpitoliuoksena käytettiin Dulbecco's Modified Eagle Medium -kasvatusliuosta (DMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA), 6 % N-2-hydroksietyylipiperatsiini-N'-2-etaanisulfonihappoa (HEPES, MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA), 7 % vasikan sikiön seerumia (FCS, engl. fetal calf serum, PromoCell GmbH, Heidelberg, Saksa) ja 250 mg/ml gentamisiiniä (Biomedical Industries, Kibbutz beit HaEmek, Israel). Infektiivisen kloonin kasvattamisessa käytettiin BSR T7/5-soluja. Nämä solut ovat olleet alun perin hamsterin poikasten munuaissolulinja BHK-21, johon on stabiilisti transfektoitu T7RNA-polymeraasigeeni (Buchholz ym. 1999). Kasvatusliuoksena näille soluille käytettiin DMEM, 6 % HEPES, 7 % FCS, 250 mg/ml gentamisiiniä ja 700 µg/ml genitisiiniä (Gibco, Grand Island, NY, USA).

2.3 Virusten eristys ja käänteistranskriptaasireaktio

Virusten eristys B-Vero-soluista tehtiin mukaillen aiempaa protokollaa (Abraham ja Colonna 1984). Viruskasvatus jäädytettiin ja sulatettiin kolme kertaa virusten vapauttamiseksi infektoiduista soluista. Seos sentrifugoitiin (Sorvall RC5C, 10400 x g, +4 °C, 20 min), ja virus saostettiin käyttäen polyetyleeniglykolia (PEG 6000, 70 g/l) ja natriumkloridia (22 g/l) yön yli sekoituksessa +4 °C:ssa. Saostuma erotettiin supernatantista ja sentrifugoitiin (Sorvall RC-5B, 10800 x g, +4 °C, 20 min). Supernatantti poistettiin, ja saostuma liuotettiin puskuriin, jossa oli fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS, engl. phosphate-buffered saline) ja 0,5 mM MgCl₂:a. Tämän jälkeen lisättiin 3 mg/ml deoksikoolihappoa (DOC, deoxycholic acid, Merck) ja 6 µl/ml NP-40:ää (Nonidet P-40, BDH Laboratory Supplies, Poole, England). Seos sentrifugoitiin (Eppendorf Centrifuge 5810 R, 1260 x g, +4 °C, 5 min), ja supernatantti siirrettiin neljään Ultra Clear -putkeen (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA) lineaarisen sakkaroosigradientin (5-20 %) päälle. Supernatantti ja sokerigradientti sentrifugoitiin (LKB Bromma 2331 Ultrospin 70, 151000 x g, +4 °C, 2 t, mode: slow),

ja neljän putken sisältö jaettiin kerroksittain 48 lasiputkeen, joissa oli 500 µl PBS + 0,5 mM MgCl₂ -puskuria.

Fraktioista 7–30 pipetoitiin 96-kuoppaiselle B-vero-soluja sisältävälle levyille. Kuoppiin lisättiin B-vero-solujen ylläpitoliuosta [medium 199 (MP Biomedicals LLC, Solon OH, USA), 2 % lehmän seerumin albumiini (BSA, engl. bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 250 mg/ml gentamisiini], ja virus titrattiin vielä kolmeen seuraavaan kuoppaan. Levyä inkuboitiin yön yli +37 °C:ssa. Seuraavana päivänä valittiin 6–7 kuoppaa, joissa oli eniten virusta. Vastaavien lasiputkien sisältö yhdistettiin steriiliin ultrasentrifuugiputkeen, ja putket huuhdeltiin vielä PBS + 0,5 mM MgCl₂ -puskurilla. Liuos jaettiin tasan kolmeen putkeen ja lisättiin 15 ml PBS + 0,5 mM MgCl₂ -puskuria. Putket sentrifugoitiin (LKB Bromma 2331 Ultraspinn 70, 98600 x g, +4 °C, 2 t, mode: normal), ja saostuma liuotettiin uudestaan PBS + 0,5 mM MgCl₂ -puskuriin. Jokaisesta putkesta otettiin näyte proteiinimääritystä varten. Proteiinikonsentraatio määritettiin kaupallisella määritysmenetelmällä (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)

Virus-RNA:n eristyksen jälkeen kopio-deoksiribonukleinihapporeaktio (cDNA, engl. copy deoxyribonucleic acid) tehtiin Improm-II käänteistranskriptaasientsyymillä (engl. reverse transcriptase (RT) enzyme, Promega, Madison, WI, USA). cDNA-reaktion komponentit on kuvattu taulukossa 2. Reaktiovaiheet olivat alukkeen sitoutumisvaihe 25 °C:ssa viisi minuuttia, pidennysvaihe 40 °C:ssa 60 minuuttia ja RT-entsyymin inaktivointi 70 °C:ssa 15 minuuttia.

Taulukko 2. cDNA-reaktion komponentit.

Komponentti	Tilavuus [μ L]
Virus-RNA	5
Aluke CV-A7-BR-NotIEcoRI 10 μ M	1
Yhteensä (RNA-Aluke seos)	6
5x ImProm-II (M-MLV) puskuri	4
25 mM MgCl ₂	2
10 mM dNTP (jokaista 2,5 mM)	4
RNasin ribonukleaasi-inhibiittori	1
ddH ₂ O	3
ImProm-II RT-entsyymi	1
RNA-Aluke seosta	6
Yhteensä	21

2.4 Pitkä PCR

Virusgenomin sisältävät kloonausvektorit pitkän PCR:n optimointia varten tuotettiin *E. colin* XL1 Blue -kannoissa. Vektorit eristettiin, ja niiden oikeellisuus varmistettiin molemmille vektoreille restriktioanalyysillä XbaI-restriktioentsyymillä. Kun kloonausvektorien oikeellisuudesta oltiin varmistuttu, kloonausvektoreilla ja CV-A7-AF-HindIII- ja CV-A7-BR-NotI-EcoRI-alukkeilla ajettiin gradientti-PCR-reaktio lämpötila-alueilla 55-63 °C ja 60-72 °C. Kaikissa gradientti-PCR-reaktioissa käytettiin entsyyminä Phusion DNA-polymeraasia (Finnzyme, Espoo, Suomi). Gradientti-PCR-reaktion vaiheet olivat alkudenaturaatio 98 °C viisi minuuttia, 25 syklin ajan denaturaatio 98 °C:ssa 30 sekuntia. Alukkeen sitoutumisvaiheessa lämpötilat jakautuivat tasaisesti yhdeksän reaktion kesken asetetulle lämpötila-alueelle, ja vaiheen kesto oli 30 sekuntia. Pidennysvaihe oli 72 °C:ssa viisi minuuttia. 25 syklin jälkeen viimeinen pidennysvaihe oli 72 °C:ssa kymmenen minuuttia. Gradientti-PCR:t ajettiin iCycler gradientti-PCR-laitteella (Biorad, Hercules, CA, USA). Gradientti-PCR:n komponentit on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Gradientti-PCR-reaktion komponentit.

Komponentti	Tilavuus [μL]
5x Phusion-puskuri	10
10mM dNTP (jokaista 2,5 mM)	4
5'- ja 3'-alukkeet (10 μM)	2,5 + 2,5
Templatti	5
Phusion DNA-polymeraasi	0,5
ddH ₂ O	25,5
Yhteensä	50

Gradientti-PCR-reaktioiden perusteella FL-PCR-reaktioon valittiin alukkeen sitoutumislämpötilaksi molemmille kloonausvektoreille 65 °C. FL-PCR-tuotteen tuottamiseksi cDNA reaktiosta otettiin 5 μL varsinaiseen FL-PCR-reaktioon. Reaktiovaiheet olivat alkudenaturaatio 98 °C:ssa yksi minuutti, 30 syklin ajan denaturaatio 98 °C:ssa 30 sekuntia, alukkeen sitoutumisvaihe 65 °C:ssa 30 sekuntia ja pidennysvaihe 72 °C:ssa neljä minuuttia. 30 syklin jälkeen viimeinen pidennysvaihe oli 72 °C:ssa seitsemän minuuttia. Kaikissa FL-PCR-reaktioissa käytettiin entsyyminä Phusion DNA-polymeraasia. FL-PCR-reaktion komponentit on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. FL-PCR-reaktion komponentit.

Komponentti	Tilavuus [μL]
5x Phusion puskuuri	5
10mM dNTP (jokaista 2,5 mM)	2
5'- ja 3'-alukkeet (10 μM)	1,25 + 1,25
cDNA reaktiota	5
Phusion-entsyymi	0,25
ddH ₂ O	10,25
Yhteensä	25

Tuotteet eristettiin 0,8 % agarosigeeliltä ja DNA eristettiin geeliltä NucleoSpin Extract II -kitillä (Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren, Germany) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Menetelmässä eristettävä geelinäyte sulatettiin NT-puskuriin, ja DNA

sidottiin pylvään membraanille. Tämän jälkeen pylväs pestiin NT3-etanolipuskurilla. Pylväs kuivattiin hyvin inkuboimalla 70 °C:ssa viisi minuuttia etanolipesun jälkeen, jonka jälkeen eluutio suoritettiin valmiiksi 70 °C:een lämmitetyllä NE-puskurilla.

2.5 Virusten sekvensointi ja sekvenssianalyysi

Virukset sekvensoitiin ns. gene walking -tekniikalla (Chinault ja Carbon 1979). Virussekvenssit sekvensoitiin Turun biotekniikan keskuksessa käyttäen ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer -sekvensointilaitetta (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Sekvensoinnissa käytettiin alukkeita, jotka on esitetty taulukossa 1. Alukkeiden konsentraatio sekvensointireaktiossa oli 1 µM. Sekvensointireaktion koko oli 6 µl, ja näytteen konsentraatio reaktiossa oli vähintään 8,4 ng/µl, jolla saatiin sekvensointiin optimaalinen määrä näytettä (50 ng). Sekvensoitujen genomien kokoaminen ja tarkastaminen suoritettiin Bioedit-ohjelmalla (versio 7.0.9.0) sekä nukleiinihappo- ja proteiinisekvenssikohdistukset EMBL-EBI:n (European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute) ClustalW2-ohjelmalla (versio 2.0.12) (Chenna ym 2003). Proteiinisekvensseille käytettiin GONNET-matriisia (Gonnet ym. 1992). Virusten väliset eroavaisuudet laskettiin PHYLIP-ohjelmistopakettin (Phylogeny Inference Package; versio 3.68) dnadist- ja protdist-ohjelmilla (Felsenstein 1989). Sekvenssivertailut tehtiin NCBI:n (National Center for Biotechnology Information) BLAST-haulla (engl. Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul ym. 1990).

2.6 T7RNA-polymeraasin promoottorialueen ja polyA-hännän tuottaminen infektiivistä kloonina varten USSR-pcDNA3- ja Parker-TA-vektoreista

Infektiivinen klooni tuotettiin virusgenomeista T7-CV-A7-F- ja T7-CV-A7-R-pA-alukkeilla (taulukko 1). 5'-pään alukkeeseen oli suunniteltu T7RNA-polymeraasin transkription aloituskohta, ja 3'-pään alukkeeseen polyT-häntä, jonka pituus oli 30 tymiiniä. PCR-reaktioissa käytettiin samaa protokollaa kuin virusgenomien tuottamisessa. Alukkeen sitoutumisvaiheen lämpötilat olivat CV-A7-USSR-isolaatille 62 °C ja CV-A7-Parker-isolaatille 50 °C.

2.7 Infektiivisen kloonin tuotto syöpäsoluissa

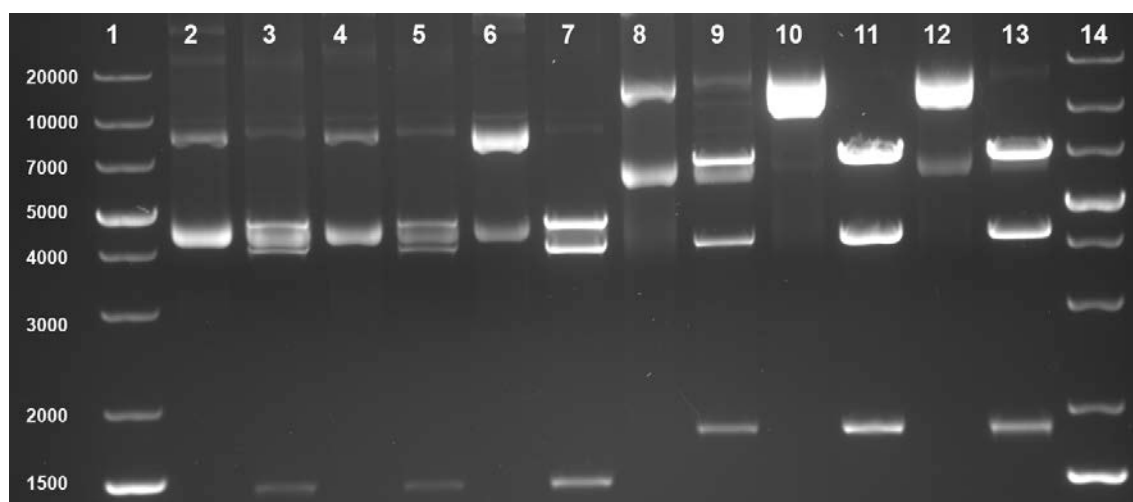
Infektiivisten kloonien tuottamiseen käytettiin BSR T7/5 -soluja, jotka ilmentävät T7RNA-polymeraasientsyymiä. Genomit transfektoitiin soluihin käyttäen Fugene6-transfektiooliuosta (Roche, Indianapolis, IN, USA). BSR T7/5 -solut kasvatettiin kasvatuspulloissa (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Tanska), laskettiin Bürkerin kammion avulla (VWR International, Helsinki, Suomi) ja jaettiin 24-kuoppaiselle levyille (90000 solua/kaivo). Soluja kasvatettiin levyllä, kunnes kaivo oli kasvanut umpeen.

Kolme näytettä transfektoitiin rinnakkaisina: pcDNA3-vektori (negatiivinen kontrolli), CV-A7-Parker-isolaatti, CV-A7-USSR-isolaatti ja solukontrolli (ei transfektiota). Transfektio suoritettiin lisäämällä putkeen A transfektoitava näyte ja putkeen B DMEM-mediumia ilman seerumia ja antibiootteja sekä Fugene6-transfektiooliuosta DNA:Fugene6-suhteella 3:1. Putken B liuos yhdistettiin putken A liuokseen ja seosta inkuboitiin 15 minuuttia. Solukaivoista poistettiin kasvatusliuos, ja seos lisättiin solujen päälle samalla sekoittaen. Tämän jälkeen lisättiin vielä 150 µl kasvatusliuosta. Soluja inkuboitiin lämpökaapissa kolmen tunnin ajan, jonka jälkeen kasvatusliuos vaihdettiin. Solujen kuntoa ja infektion ilmentymistä seurattiin mikroskoopilla, ja kasvatusliuos vaihdettiin päivittäin.

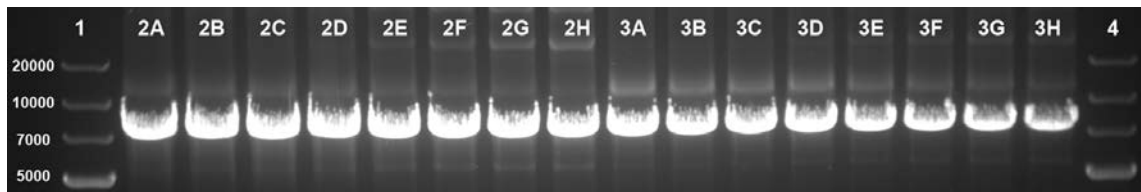
3 Tulokset

3.1 Pitkä PCR

Pitkän PCR:n optimointi aloitettiin käyttäen projektissa aiemmin tuotettuja kloonauksvektoreja Parker-TA ja USSR-pcDNA3. Kloonauksvektorit tuotettiin *E. coli* XL1 Blue -kannassa. Näille eristetyille kloonauksvektoreille tehtiin restriktioanalyysi XbaI-restriktioentsyymillä (kuva 4). XbaI-restriktioentsyymi leikkaa Parker-TA-vektorin 1455, 4146 ja 4701 nukleotidin ja USSR-pcDNA3-vektorin 1874, 4146 ja 6797 nukleotidin paloihin. Gradientti-PCR-reaktiosta saatiin oikeankokoinen tuote koko lämpötila-alueella (kuva 5) eli annealing-lämpötilalla ei ollut suurta merkitystä PCR-reaktion onnistumiseen. Koska tuotteiden määrä oli koko lämpötila-alueella suunnilleen sama, valittiin FL-PCR-reaktioon molemmille kloonauksvektoreille alukkeen sitoutumislämpötilaksi 65 °C.



Kuva 4. Restriktioanalyysi XbaI-restriktioentsyymillä kolmesta kloonauksvektorieeristyksestä. Kaistat vasemmalta: 1. Fermentas 1 kb Plus DNA Ladder, 2., 4. ja 6. Parket-TA-kloonauksvektorieeristykset 1, 2 ja 3; 3., 5. ja 7. Parker TA-kloonauksvektorieeristykset 1, 2 ja 3 XbaI-restriktioentsyymireaktion jälkeen; 8., 10. ja 12. USSR-pcDNA3-kloonauksvektorieeristykset 1, 2 ja 3; 9., 11. ja 13. USSR-pcDNA3-kloonauksvektorieeristykset 1, 2 ja 3 XbaI-restriktioentsyymireaktion jälkeen.



Kuva 5. Gradientti-PCR-reaktio uusilla kloonausvektoreilla lämpötila-alueella 60-72 °C (A. 72,0 °C, B. 71,2 °C, C. 69,7 °C, D. 67,5 °C, E. 64,4 °C, F. 62,4 °C, G. 60,9 °C, H. 60,0 °C). Kaistat vasemmalta: 1. Fermentas 1 kb Plus DNA Ladder, 2. CV-A7-Parker-genomi tuotettuna Parker-TA-kloonausvektorista, 3. CV-A7-USSR-genomi tuotettuna USSR-pcDNA3-kloonausvektorista, 4. Fermentas 1 kb Plus DNA Ladder.

FL-PCR-reaktioiden saannot olivat CV-A7-275/58:n alle 10 ng/μl, CV-A7-ET1080:lla 5-20 ng/μl sekä CV-A7-Parkerilla ja CV-A7-USSR:llä 50-100 ng/μl. CV-A7-275/58:n ja CV-A7-ET1080:n kohdalla yhdistettiin yleisesti 2-3 FL-PCR-reaktiota, jotta puhdistuksen jälkeen saataisiin tarpeeksi DNA:ta sekvensointia varten.

3.2 Sekvenssianalyysi

Virusten genomien pituudet vaihtelivat 7403-7405 nukleotidin välillä. Avoimen lukekehysten (ORF, engl. open reading frame) pituus oli kaikilla viruksilla 2192 aminohappoa (aa). CV-A7-275/58:lla oli ylimääräinen nukleotidi kohdassa 103 ja CV-A7-Parker-isolaatilta puuttui nukleotidi kohdasta 7396. Nämä muutokset sijoittuivat virusten genomien 5'-NTR- ja 3'-NTR-alueilla. Kaikki analyysit ja vertailut virusten genomien suhteen tehtiin vertaamalla niitä ainoaan, aikaisemmin sekvensoituun CV-A7-virukseen (GenBank AY421765, Oberste ym. 2004a). Kun sekvensoituja viruksia CV-A7-Parker, CV-A7-USSR ja ET-1080 verrattiin nukleotiditasolla koko genomien pituudelta, osoittautuivat CV-A7-Parker sekä CV-A7-USSR 99,9 % ja CV-A7-ET1080 100 % samanlaisiksi. Neljännellä viruksella, CV-A7-275/58:lla, erot vaihtelivat nukleotiditasolla 75,8–90,4 % ja proteiinitasolla 94,0–98,8 % välillä. Taustatiedot sekvensoiduista viruksista ja tarkempi sekvenssianalyysi virusgeneittäin on esitetty taulukoissa 5 ja 6.

Taulukko 5. Yleiset ominaisuudet sekvensoiduista viruksista.

GenBank nro	Iso-laatti	Oireet ja eristysvuosi	Pituus nt	5' NTR	ORF nt (aa)	3' NTR	Samanlaisuus (%) ^a
GU942823	Parker	päänsärky, 1949	7403	742	6579 (2193)	82	99,9
GU942822	USSR	velttohalvaus, 1952	7404	742		83	99,9
GU942821	ET1080	ei tiedossa, 1962	7404	742		83	100
GU942820	275/58	aivokalvontulehdus, 1958	7405	743		83	82,6

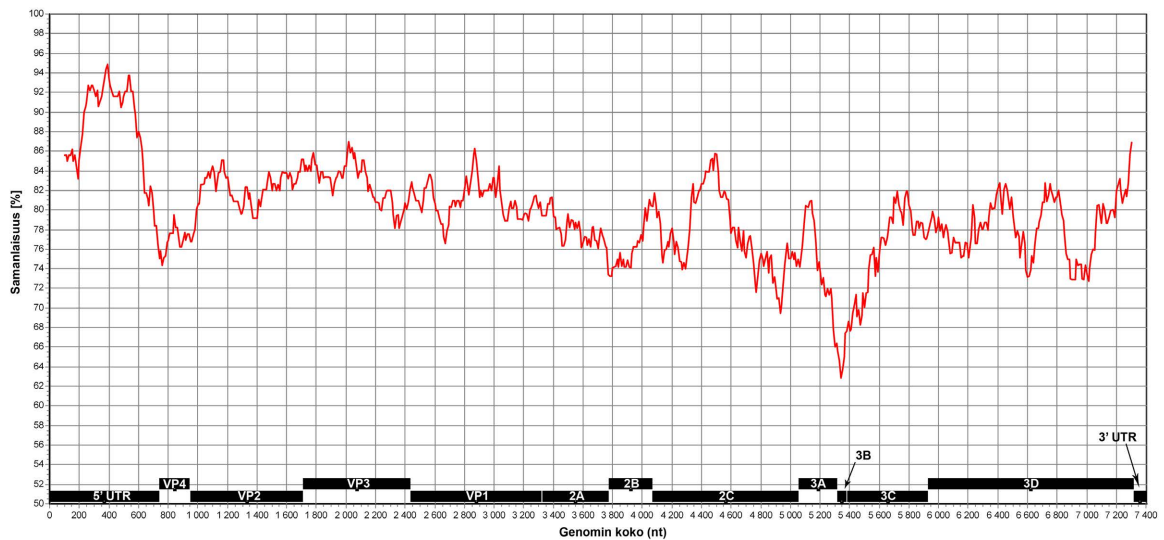
^a Samanlaisuus on määritetty koko genomien pituudelta nukleotiditasolla.

Taulukko 6. Viruksen genomien osa-alueiden vertailu nukleotidi- ja aminohappotasolla CV-A7-275/58:n ja AY421765:n välillä

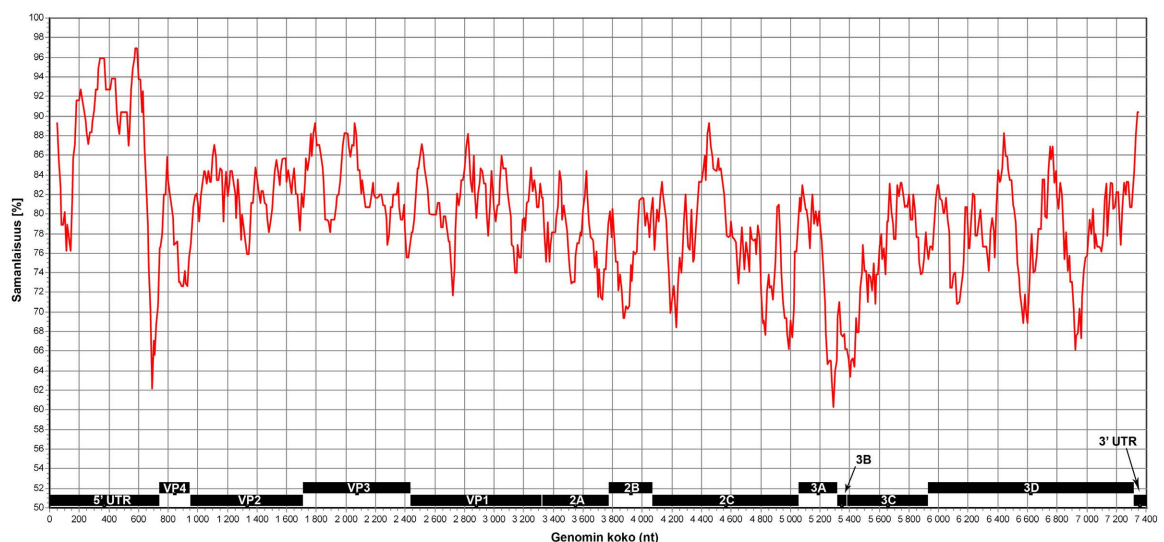
Osa-alue	nt (aa) %	Koko nt (aa)	Osa-alue	nt (aa) %	Koko nt (aa)
5'-NTR	88,4	742	2C	80,5 (98,8)	987 (329)
VP4	81,6 (94,2)	207 (69)	3A	79,5 (98,8)	258 (86)
VP2	84,3 (97,6)	762 (254)	3B	75,8 (95,5)	66 (22)
VP3	84,4 (98,3)	726 (242)	3C	79,2 (94,0)	549 (183)
VP1	83,3 (95,3)	888 (296)	3D	81,5 (94,8)	1386 (462)
2A	80,7 (94,0)	450 (150)	3'-NTR	90,4	83
2B	80,5 (97,0)	297 (99)			

Simplot-ohjelmalla (versio 3.5.1) (Lole ym. 1999) saatiin verrattua sekvenssejä koko genomien pituudelta. Ohjelma vertaa kahta tai useampaa sekvenssiä keskenään määritellyltä matkalta (kuvat 6 ja 8: 200 nukleotidin liukuva ikkuna, kuva 7: 100 nukleotidin liukuva ikkuna) ja laskee tälle matkalle sekvenssien välisen samanlaisuusarvon, josta muodostuu kuvaajan piste ikkunan keskikohtaan. Tämän takia kuvaajan alusta ja lopusta puuttuu havaintopisteitä. Tämä aukko on aina puolet liukuvan ikkunan koosta. Seuraavaksi liukuva ikkuna liikkuu määritellyn matkan sekvenssiä pitkin (kuvat 6 ja 7: kymmenen nukleotidia, kuva 8: 20 nukleotidia), ja ohjelma laskee uuden samanlaisuusarvon tälle sekvenssi-ikkunalle. Tällä menetelmällä käydään koko sekvenssi läpi ja saadaan visualisoitua sekvenssien välistä eroa. Simplot-analyysit AY421765:n ja CV-A7-275/58:n välillä ovat esitettynä kuvissa 6 ja 7. Kuvassa 8 on

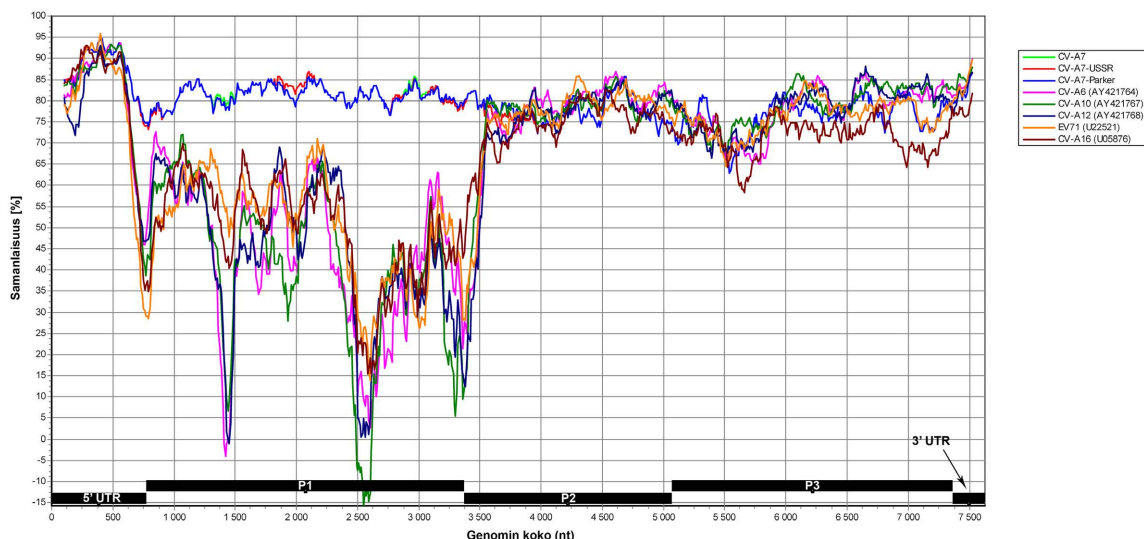
verrattu CV-A7-275/58:a kahdeksaan muuhun virukseen [CV-A7 (GenBank nro AY421765), enterovirus 71 (EV71, U22521), CV-A7-USSR (GU942822), CV-A7-Parker (GU942823), CV-A16 (U05876), CV-A6 (AY421764), CV-A12 (AY421768), CV-A10 (AY421767)]. Kuvaajien laskennassa käytettiin 2-parametristä Kimura-nukleotidisubstituutiomatriisia (Kimura 1980).



Kuva 6. Simplot-vertailu CV-A7-275/58:n ja AY421765:n välillä nukleotiditasolla koko genomin pituudelta 200 nukleotidin liukuvalla ikkunakoolla 10 nukleotidin välein.



Kuva 7. Simplot-vertailu CV-A7-275/58:n ja AY421765:n välillä nukleotiditasolla koko genomin pituudelta 100 nukleotidin liukuvalla ikkunakoolla 10 nukleotidin välein.



Kuva 8. Simplot-vertailu CV-A7-275/58:n ja 8 lähisukuisen viruksen välillä [CV-A7 (GenBank nro AY421765), CV-A7-USSR (GU942822), CV-A7-Parker (GU942823) enterovirus 71 (EV71, U22521), CV-A16 (U05876), CV-A6 (AY421764), CV-A12 (AY421768), CV-A10 (AY421767)] nukleotiditasolla koko genomin pituudelta 200 nukleotidin liukuvalla ikkunakoolla 20 nukleotidin välein.

CV-A7-275/58:a verrattiin myös joidenkin tärkeimpien osa-alueiden osalta muihin viruksiin, jotka on esitetty taulukoissa 7 ja 8. Vertailussa käytetyt virukset olivat: CV-A7 (GenBank nro AY421765), enterovirus 71 (EV71, U22521), CV-A16 (U05876), CV-A6 (AY421764), CV-A9 (D00627), CV-A12 (AY421768), CV-A10 (AY421767), poliovirus 1 (PV1, AF111982), PV2 (M12197) ja PV3 (AJ293918). Tässä työssä sekvensoiduille viruksille on saatu seuraavat GenBank-numerot: CV-A7-275/58 GU942820, CV-A7-ET1080 GU942821, CV-A7-USSR GU942822 ja CV-A7-Parker GU942823.

Taulukko 7. CV-A7-275/58:n nukleotidisekvensivertailu muihin viruksiin [CV-A7 (GenBank nro AY421765), CV-A7-USSR (GU942822), CV-A7-Parker (GU942823) enterovirus 71 (EV71, U22521), CV-A16 (U05876), CV-A6 (AY421764), CV-A12 (AY421768), CV-A10 (AY421767)].

Alue	CV-A7	EV71	CV-A16	CV-A6	CV-A12	CV-A10	CV-A9	PV1	PV2	PV3
5' NTR	88.4	83.1	85.0	84.4	83.2	85.2	85.2	73.1	71.2	74.0
FL	82.6	76.0	74.9	76.0	75.8	75.8	60.3	58.5	58.5	58.6
VP4	81.6	67.1	66.7	75.8	73.4	71.0	62.7	56.5	59.9	60.3
VP2	84.3	70.1	70.2	64.2	64.7	67.2	54.5	55.8	50.3	54.3
VP1	83.3	61.3	62.0	59.3	58.8	58.9	45.5	46.0	46.3	45.3
3B	75.8	72.7	69.7	71.2	74.2	77.3	54.5	54.5	56.1	59.1
3D	81.5	81.8	77.7	83.8	83.8	83.9	62.7	64.1	64.9	63.9

Taulukko 8. CV-A7-275/58:n aminohapposekvensivertailu muihin viruksiin [CV-A7 (GenBank nro AY421765), CV-A7-USSR (GU942822), CV-A7-Parker (GU942823) enterovirus 71 (EV71, U22521), CV-A16 (U05876), CV-A6 (AY421764), CV-A12 (AY421768), CV-A10 (AY421767)].

Alue	CV-A7	EV71	CV-A16	CV-A6	CV-A12	CV-A10	CV-A9	PV1	PV2	PV3
ORF	96.3	86.2	86.9	85.8	85.6	85.5	57.3	55.6	55.6	55.3
VP4	94.2	68.1	72.5	88.4	84.1	85.5	60.3	59.4	59.4	58.8
VP2	97.6	83.1	79.5	71.7	71.7	73.6	53.8	54.6	54.0	53.6
VP1	95.3	60.5	63.9	59.0	56.5	57.3	38.0	36.1	36.0	35.0
3B	95.5	90.9	90.9	95.5	95.5	95.5	59.1	50.0	50.0	50.0
3D	94.8	94.2	94.2	96.3	96.5	97.2	65.8	68.5	67.9	67.9

Taulukko 9. CV-A7-275/58:n (1), CV-A7-Parkerin (2) ja CV-A7-USSR:n (3) konservoituneet (A), osittain konservoituneet (B) sekä täysin muuttuneet (C) aminohapot verrattuna AY421765:een.

		VP 4	VP 2	VP 3	VP 1	2 A	2 B	2 C	3 A	3 B	3 C	3D	Yhteensä	Osuus [%]
1	A	3	4	2	10	4	3	2	1	1	7	15	51	63,8
	B	0	1	1	2	2	0	1	0	0	4	6	17	21,3
	C	1	1	1	2	3	0	1	0	0	0	3	12	15
2	A	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	4	50
	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	4	50
3	A	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5	83,3
	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	3	13,3

ClustalW2-ohjelmalla verrattiin aminohappojen konservoituneisuutta AY421765:n, CV-A7-275/58:n, CV-A7-USSR:n, CV-A7-Parkerin sekä CV-A7-ET1080:n välillä. CV-A7-275/58 sisälsi 51 konservoitunutta, 17 osittain konservoitunutta ja 12 täysin muuttunutta aminohappomuutosta (taulukko 9). Samat arvot CV-A7-Parker-isolaatille olivat 4, 0 ja 4 sekä CV-A7-USSR-isolaatille 5, 0 ja 3. Muutosten tarkempi levittäytyminen eri geenien alueelle on esitetty liitteessä 2. Nukleotidisekvenssille tehdyn saman analyysin perusteella muutokset olivat levittäytyneet koko genomien alueelle (liite 1).

3.3 CV-A7-SVK-isolaatti

CV-A7-SVK-isolaattia ei saatu sekvensoitua AY421765:n sekvenssin perusteella suunnitelluilla koettimilla. CV-A7-SVK-isolaatille tehtiin osittainen VP1-alueen määrittäminen tyypitys-RT-PCR:llä. Tämän kokeen tuloksena CV-A7-SVK osoittautui echovirus 3:ksi (Echo3). Tämän jälkeen virukselle tehtiin neutralisaatiokoe Echo3-virusta neutralisoivilla vasta-aineilla. Tämän kokeen tulokset vahvistivat, että kyseessä on Echo3-virus eikä CV-A7-virus kuten THL:n alkuperäinen analyysi oli osoittanut. Näiden tulosten perusteella CV-A7-SVK jätettiin sekvensointityön ulkopuolelle.

3.4 Infektiivisen kloonin tuotto

CV-A7-USSR- ja CV-A7-Parker-virusten cDNA-kloonien transfektio BSR T7/5 -soluihin ei tuottanut klooneja. T7RNA-polymeraasipromootorin taakse kloonatut CV-A7-cDNA-kloonit, CV-A7-Parker ja CV-A7-USSR, transfektoitiin BSR T7/5 -soluihin rinnakkaisina. Mukana oli myös solukontrolli ja negatiivinen kontrolli, jossa soluille pipetoitiin pcDNA3-vektoria. Soluja visualisoitiin mikroskoopin avulla infektion havaitsemiseksi. Solukontrolli kasvoi koko kokeen ajan hyvin. Koska virusinfektiosta ei saatu silmämääräisesti arvioiden havaintoja, oletettiin, että *in vivo* -transkriptiota ei ollut tapahtunut ja virusta ei ollut muodostunut soluissa. Aikaisemmin T7RNA-polymeraasipromootorin alle kloonatun CV-A9-viruksen *in vivo* -transfektio on saatu onnistumaan GMK- (engl. green monkey kidney) ja HeLa-soluilla käyttämällä ns. ko-transfektiossa T7RNA-polymeraasia tuottavaa plasmidia (Heikkilä ym. 2011).

4 Päätelmät

4.1 Pitkä PCR

Tämän työn tavoite oli saada FL-PCR-reaktio optimoitua CV-A7-viruksille. Menetelmä perustui aikaisempaan tutkimukseen, jossa CV-A9-virusgenomi on onnistuneesti saatu tuotettua yhtenä PCR-tuotteena Virusopilla. Aikaisemmat kloonauksen- ja tuottomenetelmät ovat olleet monivaiheisia sekä aikaa vieviä, ja FL-PCR-menetelmää ei ole juurikaan käytetty enteroviruksilla. (Heikkilä ym. 2011)

Optimointi aloitettiin käyttäen aiemmissa projekteissa tuotettuja kloonauksenvektoreita. Gradientti-PCR:ssä ei kuitenkaan saatu tuotettua oikeankokoista tuotetta, vaikka koko lämpötila-alue 55–72 °C käytiin läpi. Koska nämä vektorit olivat jo aika vanhoja, plasmidivektorit päätettiin tuottaa ja puhdistaa uudelleen. Kun kloonauksenvektori oli tuotettu *E. coli* XL1 Blue -kannassa, saatiin heti seuraavalla gradientti-PCR:llä oikeankokoista PCR-tuotetta. Gradientti-PCR osoitti, että alukkeen sitoutumislämpötilalla testatulla lämpötila-alueella 60–72 °C ei ollut juurikaan merkitystä CV-A7-Parkerin ja CV-A7-USSR:n genomien tuottamisen suhteen (kuva 5). CV-A7-USSR:n kohdalla tuotteen määrä alkoi vähentyä hieman alemmilla lämpötiloilla. Tämän johdosta valittiin kummallekin genomille alukkeen sitoutumislämmöksi 65 °C testatun lämpötila-alueen keskikohdasta jatkoreaktioiden helpottamiseksi ja nopeuttamiseksi. FL-PCR-reaktioissa käytettiin alusta asti Phusion DNA-polymeraasia, ja työn aikana ei tullut tarvetta arvioida DNA-polymeraasin vaihtoa. Phusionin DNA-polymeraasin etuihin kuului saatavuuden lisäksi sen tarkkuus, nopeus sekä erittäin alhainen virhetaso, joka on erityisen tärkeää sekvensointitöissä. Lisäksi polymeraasi pystyy valmistajan mukaan kopioimaan jopa 20 knt:n λ DNA-templanteja, mikä teki tästä polymeraasista erinomaisen kopioimaan CV-A7-virusten 7,4 knt:n genomeja.

Työn aikana CV-A7-275/58:n ja CV-A7-ET1080:n genomien tuottaminen osoittautui hankalammaksi kuin CV-A7-Parkerin ja CV-A7-USSR:n genomien. Vaikka agarosigeelianalyysi PCR-tuotteista osoitti tuotetta olevan runsaasti, tuotteen eristämisen ja puhdistamisen jälkeen tuotteen saanto oli varsin pieni. Tämän takia työn aikana yritettiin erilaisia geelieristysmenetelmiä ja -kittejä saannon nostamiseksi. Lopulta päädyttiin käyttämään NucleoSpin Extract II -geelieristyskittiä, joka valmistajan (Macherey-Nagel GmbH) mukaan pystyy eristämään jopa 10 knt:n DNA-

tuotteita. Geelieristysten aikana tälläkin kitillä tuli ongelmia saannon suhteen, ja osasyiksi tähän osoittautui etanolipesuvaihe, jonka jälkeen etanolia ei saatu poistettua kokonaan sentrifugoimalla. Kun eristyskolonnia lämmitettiin sentrifugoinnin lisäksi, geeleiltä pystyttiin eristämään jonkin verran enemmän DNA:ta reaktiota kohti. Lopullista syytä siihen, miksi DNA:n eristys oli niin hankalaa CV-A7-275/58:n ja CV-A7-ET1080:n kohdalla, ei saatu yksiselitteisesti selville. Mahdollista on, että RT-PCR-reaktion saanto oli alun perin pienempi, koska reaktiossa käytetyt alukkeet oli suunniteltu AY421765:n mukaan, ja näin ne eivät olleet aivan komplementaarisia virusten genomien kanssa. Tämän reaktion saantoa ei seurattu eikä reaktiota optimoitu lainkaan työn aikana, koska reaktio sisälsi vielä infektiivistä virus-RNA:ta RT-PCR-vaiheen jälkeen.

4.2 Sekvenssianalyysi

Sekvenssianalyysin perusteella CV-A7-Parker, CV-A7-USSR ja CV-A7-ET1080 olivat hyvin samanlaisia ja CV-A7-275/58 hyvinkin erilainen verrattuna aiemmin sekvensoituun AY421765:een. CV-A7-USSR:n oli raportoitu aiheuttaneen velttohalvausta potilaissa (Voroshilova ja Chumakov 1959), ja tässä työssä CV-A7-USSR osoittautui hyvin samanlaiseksi AY421765:n kanssa. Tämän takia tähän työhön otettiin mukaan myös CV-A7-Parker-isolaatti uudestaan sekvensoitavaksi isolaatin sekvenssin alkuperän varmistamiseksi.

CV-A7-USSR-isolaatti on eristetty Karagandasta, Kazakshtanista, entisestä Neuvostoliitosta vuonna 1952 kahdelta potilaalta, joilla oli todettu polion kaltaista velttohalvausta ja jotka myöhemmin kuolivat polion aiheuttamaan neurologiseen tautiin (Chumakov ym. 1956 [venäjäksi], Habel ja Loomis 1957, Voroshilova ja Chumakov 1959). CV-A7-USSR:n ohella EV71:n (Hayward ym. 1989) ja polioviruksen on raportoitu aiheuttavan velttohalvausepidemoita. On myös raportoitu, että CV-A1 ja CV-A14 ovat aiheuttaneet polion kaltaisia patologisia vaurioita hiirissä ja apinoissa sekä velttohalvausta hiirissä (Dalldorf 1957b). Tutkimuksissa saatiin selville, että polioviruksen vasta-aineita sisältävä seerumi ei neutraloinut CV-A7-USSR-virusta, eivätkä CV-A7-USSR-viruksen vasta-aineet neutraloineet yhtäkään kolmesta poliovirustyyppistä. Kattavista ja monien laboratoriodien varmistamien (USA, Ruotsi, Romania) eläinkokeiden sekä serologisten ja patologisten tutkimusten perusteella saadut

tulokset osoittivat myös, että CV-A7-USSR:n aiheuttama velttohalvaus ei ollut satunnaista, ohimenevää tai hiljalleen lievenevää. (Voroshilova ja Chumakov, 1959) Kun amerikkalaiset tutkijat analysoivat saman näytteen vuotta myöhemmin, he totesivat, että virus neutralisoitui CV-A7-vasta-aineilla (Habel ja Loomis 1957).

Olisiko mahdollista, että Neuvostoliitossa analysoitu isolaatti oli alunperin CV-A7, mutta paralyttiset oireet olivatkin jonkin muun viruksen aiheuttamia? Voroshilovan ja Chumakovin (1959) tutkimusten ja analyysien perusteella tämä ei ollut mahdollista. Hovi ja Roivainen (1993) totesivat, että CV-A7 voi ristireagoida, kuten myös muutkin enterovirukset, vasta-aineiden kanssa, jotka oli tuotettu poliovirukselle spesifisen VP1-alueen peptidisekvenssin avulla immunisoiduissa kaneissa. Mahdollisesti tässä on voinut tapahtua Melnickin ja Kaplanin (1950) sekä Dalldorfin ja Weigandin (1958) tutkimuksissaan mainitsema ilmiö: toistuvat enterovirusinfektiot voivat kumuloitua ja aiheuttaa loppujen lopuksi muutoksen taudin diagnoosissa ei-paralyttisestä paralyttiseksi.

Sekvenssianalyysi nukleotiditasolla osoittaa, että CV-A7-275/58 on merkittävästi erilainen verrattuna muihin työssä sekvensoituihin viruksiin ja GenBank-tietokannasta haettuun virukseen. Kun tarkastellaan virusten nukleotidisekvenssiä, nähdään, että sekvenssivertailussa sekvenssien erilaisuudet ovat levittäytyneet melko tasaisesti koko genomien matkalle (liite 1). Simplot-analyysissä vaihteluiden yleinen suunta, kun genomia tarkastellaan 5'-3'-suuntaan, on laskeva, mikä on epätavallista enteroviruksille (kuva 6 ja 7). Normaalisti suurin vaihtelu nähdään vain rakenteellisten proteiinien kohdalla, ja ei-rakenteelliset proteiinit ovat paljon konservoituneempia (Oberste ym. 2004a). Vaihtelu on suurimmillaan 3B-alueella vastaa VPg-proteiinin (engl. virus protein genome linked) tuottamisesta. VPg on 22 aminohappoa pitkä proteiini, joka on sitoutunut kovalenttisesti tyrosiinihydroksyylin kautta viruksen RNA:n 5'-päähen fosfodiesterisidoksella. Infektoituneessa solussa on kahta muotoa VPg-proteiinista: VPg ja VPgpUpUOH. Polioviruksella (enterovirusten prototyypivirus) tehtyjen tutkimusten perusteella on saatu selville, että VPg prosessoidaan viruksen genomissa olevien CRE-rakenteiden avulla VPgpUpUOH:ksi. Virusproteiini 3CD stimuloi VPg-proteiinin uridylaatiota ja RNA-riippuvainen RNA-polymeraasi 3Dpol katalysoi reaktiota. VPgpUpUOH jää kiinni RNA-polymeraasiin ja toimii niin positiivisen kuin negatiivisen RNA-nauhan alukkeena. (Steil ja Barton 2009) Viruksen replikaatioon voivat vaikuttaa myös CV-A7-275/58:n ylimääräinen nukleotidi 103 ja CV-A7-Parker-isolaatin puuttuva nukleotidi 7396, jotka osuivat genomien ei-transloiville alueille.

Koska 5'-NTR- ja 3'-NTR-alueet toimivat CRE-rakenteina viruksen replikaatiossa (Steil ja Barton 2009), nämä eroavaisuudet voivat vaikuttaa viruksen kykyyn monistua infektoituneessa solussa.

Kun Simplot-kuvaajan ikkunakokoa pienennetään 100 nukleotidiin (kuva 7), tulee esille myös erilaisuus 5'-NTR-alueella, mikä on samaa luokkaa kuin aiemmin 3B-alueella. Suurin erilaisuus osuu lähelle 5'-NTR-alueen ja genomien rajakohtaan, mikä voi vaikuttaa viruksen polyproteiinin translaation aloitukseen IRES-alueella. Suuri ikkunakoko lisää etäisyys-matriisilla tehtyjen tulosten tarkkuutta mutta laskee mahdollisuutta löytää todisteita pienemmistä rekombinaatiokohdista sekvenssissä.

Siirryttäessä aminohappotasolle virusten erilaisuus häviää miltei kokonaan. Selvästikään kaikki muuttuneet nukleinihapot eivät aiheuta muutoksia aminohapposekvenssiin. CV-A7-275/58:n polyproteiinin 80 muuttuneesta aminohaposta 63,8 % oli konservoituneita, 21,3 % osittain konservoituneita ja 15 % täysin muuttuneita aminohappoja (taulukko 9). Suurimmat muutokset olivat VP1- ja 3D-alueilla. Nämä alueet ovat niitä, jotka vaihtelevat eniten enterovirusilla (Oberste ym. 1999b, Oberste ym. 2004b) ja joiden avulla virusten tyyppi määritetään. Vertailemalla VP1- ja 3D-alueita voidaan tehdä myös havaintoja rekombinaatiotapahtumista. Seuraavaksi eniten muutoksia on tapahtunut 2A- ja 3C-alueilla. 2A- ja 3C-alueet vastaavat viruksen lisääntymisessä polyproteiinin pilkkomisesta itsenäisiksi proteiineiksi. Kuitenkin muutokset näillä alueilla olivat suurimmaksi osaksi konservoituneita. 2A-alueella on kolme täysin muuttunutta aminohappoa. Näiden perusteella voidaan pitää mahdollisena, että CV-A7-275/58:n prosessointi infektoituneissa soluissa olisi erilaista verrattuna muihin sekvensoituihin viruksiin. Onko infektion kulku hitaampaa tai nopeampaa, siihen ei voida ottaa kantaa tämän tutkimuksen perusteella. Ilman tarkempia solukokeita ei voida sanoa, vaikuttaako tämä erilaisuus merkittävästi CV-A7-275/58:n infektiivisyyteen ja monistumiseen.

Kun enterovirusia luokitellaan, kahta virusta voidaan sanoa erilaisiksi, jos nukleotiditaso on alle 75 % tai proteiinitason samanlaisuus alle 85 % (Oberste ym. 2004). Rekombinaation tapahtuessa enterovirusilla muutos on yleisesti suurinta VP1- ja 3D-alueilla (Oberste ym. 1999b, Oberste ym. 2004b). Nukleinihapposekvenssin vertailussa muihin lähisukuisiin viruksiin (taulukko 7 ja 8) nähdään, että vaikka CV-A7-275/58 on sekvenssiltään varsin erilainen verrattuna muihin CV-A7-isolaatteihin, se on kuitenkin pääosin samankaltaisempi CV-A7-

isolaattien kanssa verrattuna muihin HEV-A-lajin viruksiin. Muutamia lieviä yhtäläisyyksiä voidaan nähdä muihin lähisukuisiin viruksiin 5'-NTR-alueella. Jopa CV-A9, joka on *Ihmisen enterovirus B* (HEV-B, engl. *Human enterovirus B*), on miltei samalla tasolla yhtäläisyydessä kuin HEV-A-virukset. Mielenkiintoisin kohta on kuitenkin 3D-alue, jossa kaikilla muilla HEV-A-viruksilla paitsi CV-A16:lla on suurempi yhtäläisyys CV-A7-275/58:aan kuin CV-A7-isolaateilla keskenään. Tämä osoittaa, että CV-A7-virusten ja muiden HEV-A-lajin virusten välillä on jossain vaiheessa voinut tapahtunut rekombinaatiota. Simplot-kuvaaja CV-A7-275/58:n eroavaisuuksista muihin HEV-viruksiin (kuva 8) vahvistaa tätä näkemystä ja osoittaa myös konservoituneisuutta 5'-NTR-alueella. Ei-rakenteellisten geenien osalta (2A-2C ja 3A-3D) nähdään samanlaista profiilia HEV-A-virusten suhteen (kuva 8). 5'-NTR-alueella samanlaisuus kasvaa lähestyttäessä 5'-NTR-alueen ja genomien rajaa.

Polyproteiinialueen vertailussa nähdään selvästi, että CV-A7-275/58 on lähinnä CV-A7:ä muiden HEV-A-virusten ollessa samankaltaisuuden rajamailla. Kapsidialueen vertailussa näkyy joitain yhteyksiä muihin HEV-A-viruksiin. Kapsidialue on aminohappotasollakin genomien heterogeenisin alue. Selviä yhteyksiä nähdään myös VP4-alueella CV-A6, CV-A12 ja CV-A10 kanssa. Samoin VP2-alueella löytyy hieman korkeampaa samanlaisuutta EV71:n kanssa. 3B- ja 3D-alueet eivät osoita mitään näkyvää eroavaisuutta HEV-A-virusten kanssa. CV-A9:n ja poliovirusten kanssa taas samanlaisuus laskee merkittävästi niin kuin voisi olettaa.

4.3 CV-A7-SVK-isolaatti

Työssä oli myös mukana Slovakiasta peräisin oleva CV-A7-SVK-isolaatti, joka oli saatu tyypitettyinä CV-A7:ksi THL:lta. Aluksi myös tätä virusta yritettiin sekvensoida, mutta se osoittautui varsin hankalaksi. Mitkään käytetyistä alukkeista eivät tarttuneet virussekvenssiin. Tämän tuloksen myötä CV-A7-SVK-isolaatin alkuperää alettiin epäillä ja virukselle tehtiin osittaisen VP1-alueen tyypitys-RT-PCR-ajo ja PCR-tuotteen sekvensointi sekä neutralisaatiokoe. Osittaisen VP1-alueen sekvensoinnin perusteella, mikä on yleinen tapa tunnistaa ja luokitella viruksia, CV-A7-SVK osoittautui echovirus kolmeksi (Echo3). Tämä tulos vahvistui osaksi neutralisaatiokokeella, jossa virus neutralisoitui osittain Echo3-vasta-aineilla. Al-Hello ym. (2008) löysivät samanlaisen viruksen oli alun perin tyypitetty CV-A9:ksi. Kapsidialueen analyysi paljasti, että virus

olikin echovirus 11 (Echo11). Neutralisaatiokokeissa tämä virus neutralisoitui hyvin niin CV-A9- kuin Echo11-spesifisillä vasta-aineilla. Samanlaisia tuloksia saivat myös Savolainen-Kopra ym. (2009) Echo11-kannoista, joita he testasivat THL:ssä. Tämä osoittaa, että ilmiö, joka tässäkin työssä kohdattiin, ei ole harvinainen.

Tyypitystulosten eroavaisuudet käytettäessä erilaisia menetelmiä osoittavat heikkouden virusten tunnistamiseen käytettävissä menetelmissä. Neutralisaatiokokeet olivat ennen yleinen tapa luokitella ja tunnistaa viruksia. Neutralisaatiokokeet perustuvat risteäviin polyklonaalisiin antiseerumeihin, jotka on tuotettu hyperimmunisoiduissa hevosissa tai apinoissa. Tällä hetkellä on kaksi vaihtoehtoa, joista näitä antiseerumipaketteja saadaan: Lim Benyesh-Melnick pooli ja Hollannin terveystieteiden pooli (The National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, Hollanti). Kun neutralisaatiokoe on saatu näillä pooleilla, tunnistaminen täytyy vielä tehdä polyklonaalisella monovalentilla antiseerumilla. Neutralisaatiomenetelmien käytössä on monia huonoja puolia:

- Neutralisaatiokokeen tekeminen on aikaa vievää ja kallista.
- Poolien sisältämien antiseerumien ikä on jo noin 40 vuotta.
- Pooleja on rajallinen määrä, ja uusien antiseerumien tekeminen on epätodennäköistä.
- Poolit eivät pysty tunnistamaan yhä kasvavaa määrää uusia viruksia, koska ovat aina jäljessä uusimpien löydettyjen virusten suhteen.
- Jotkut virukset voivat jäädä tunnistamatta, jos näyte sisältää monia eri serotyyppejä, ja lisäpuhdistuksia täytyy tehdä näytteelle virusten erottamiseksi.
- Aggregoituneita viruksia ei yleisesti pystytä tunnistamaan.
- Antigeeninen siirtymä aiheuttaa uusien serotyyppien syntymisen, joita ei enää tunnusteta referenssiviruksilla tehdyillä antiseerumeilla.

Edellä mainituista syistä molekulaariset tyypitysmenetelmät ovat syrjäyttäneet neutralisaatiokokeiden tekemisen. Näissä menetelmissä spesifisillä PCR-alukkeilla saadaan monistettua viruksen genomia, josta pystytään tunnistamaan virus vertaamalla sitä tietokannoissa oleviin muihin viruksiin. Tällä hetkellä yleisin tapa tyypittää ja tunnistaa enteroviruksia on sekvensoida osittainen VP1-geeni spesifisillä alukkeilla. (Nasri ym. 2007)

4.4 Infektiivisen kloonin tuotto

Työn loppupuolella yritettiin saada vielä tuotettua infektiivinen kloni CV-A7-USSR- ja CV-A7-Parker-isolaattien cDNA:sta mutta tässä kuitenkin epäonnistuttiin. Solut sekä kontrolli- että transfektiokaivoissa kasvoivat hyvin, mutta selvää sytopaattista efektiä (engl. cytopathogenic effect) ei todettu kummankaan viruksen kohdalla. Syitä tähän voi olla useita: transfektoidun DNA:n määrä, transfektioaineen (Fugene6) määrä tai solujen kunto ennen transfektiota. Ehkä suurimmat syyt kokeen epäonnistumiseen olivat tekijän kokemattomuus kokeen toteutuksessa ja työajan loppuminen. Myöhemmissä kokeissa todistettiin, että tässä työssä tuotetut cDNA-kloonit, joissa oli T7RNA-polymeraasipromoottori ja polyA-häntä, toimivat ja tuottivat infektiivisiä klooneja (Sittig ym. 2011 Suullinen tiedonanto).

Kirjallisuus

- Abraham, G., ja Colonno, R.J. (1984). Many rhinovirus serotypes share the same cellular receptor. *J Virol* 51, 340-345.
- Al-Hello, H., Paananen, A., Eskelinen, M., Ylipaasto, P., Hovi, T., Salmela, K., Lukashev, A.N., Bobegamage, S., & Roivainen, M. (2008). An enterovirus strain isolated from diabetic child belongs to a genetic subcluster of echovirus 11, but is also neutralised with monotypic antisera to coxsackievirus A9. *J Gen Virol* 89, 1949-1959.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- Au, G.G., Beagley, L.G., Haley, E.S., Barry, R.D., & Shafren, D.R. (2011). Oncolysis of malignant human melanoma tumors by Coxsackieviruses A13, A15 and A18. *Virol J* 8, 22-27.
- Au, G.G., Lincz, L.F., Enno, A., & Shafren, D.R. (2007). Oncolytic Coxsackievirus A21 as a novel therapy for multiple myeloma. *Br J Haematol* 137, 133-141.
- Berry, L., Au, G., Barry, R., & Shafren, D. (2008). Potent oncolytic activity of human enteroviruses against human prostate cancer. *Prostate* 68, 577-587.
- Binder, J.J., Hoffman, M.A., & Palmenberg, A.C. (2003). Genetic stability of attenuated mengovirus vectors with duplicate primary cleavage sequences. *Virology* 312, 481-494.
- Blomqvist, S., Paananen, A., Savolainen-Kopra, C., Hovi, T., & Roivainen, M. (2008). Eight years of experience with molecular identification of human enteroviruses. *J Clin Microbiol* 46, 2410-2413.
- Brown, B., Oberste, M.S., Maher, K., & Pallansch, M.A. (2003). Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J Virol* 77, 8973-8984.
- Buchholz, U.J., Finke, S., & Conzelmann, K.K. (1999). Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* 73, 251-259.
- Cameron, C.E., Suk Oh, H., & Moustafa, I.M. (2010). Expanding knowledge of P3 proteins in the poliovirus lifecycle. *Future Microbiol* 5, 867-881.
- Chapman, N., Kim, K., Tracy, S., Jackson, J., Höfling, K., Leser, J., Malone, J., & Kolbeck, P. (2000a). Coxsackievirus expression of the murine secretory protein interleukin-4 induces increased synthesis of immunoglobulin G1 in mice. *J Virol* 74, 7952-7962.
- Chapman, N., Ragland, A., Leser, J., Höfling, K., Willian, S., Semler, B., & Tracy, S. (2000b). A group B coxsackievirus/poliovirus 5' nontranslated region chimera can act as an attenuated vaccine strain in mice. *J Virol* 74, 4047-4056.

Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., & Thompson, J.D. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31, 3497-3500.

Chinault, A., ja Carbon, J. (1979). Overlap hybridization screening: isolation and characterization of overlapping DNA fragments surrounding the leu2 gene on yeast chromosome III. *Gene* 5, 111-126.

Chumakov, M., Voroshilova, M., Zhevandrova, V., Mironova, L., Itselis, F., & Robinzon, I. (1956). [Isolation and investigation of the IV immunological type of poliomyelitis virus.]. *Vopr Virusol* 1, 16-19.

Dalldorf, G. (1949). Suggested studies of poliomyelitis. *N Y State J Med* 49, 1330.

Dalldorf, G. (1950). The Coxsackie viruses. *Bull N Y Acad Med* 26, 329-335.

Dalldorf, G. (1953). The coxsackie virus group. *Ann N Y Acad Sci* 56, 583-586.

Dalldorf, G. (1957a). Brief review of Coxsackie viruses in 1956. *Ann N Y Acad Sci* 67, 209-211.

Dalldorf, G. (1957b). Neuropathogenicity of group A Coxsackie viruses. *J Exp Med* 106, 69-76.

Dalldorf, G., ja Albrecht, R. (1955). Chronological association of poliomyelitis and coxsackie virus infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 41, 978-982.

Dalldorf, G., ja Gifford, R. (1951). Clinical and epidemiologic observations of Coxsackie-virus infection. *N Engl J Med* 244, 868-873.

Dalldorf, G., ja Sickles, G.M. (1948). An Unidentified, Filtrable Agent Isolated From the Feces of Children With Paralysis. *Science* 108, 61-62.

Dalldorf, G., ja Weigand, H. (1958). Poliomyelitis as a complex infection. *J Exp Med* 108, 605-616.

Dobrikova, E.Y., Broadt, T., Poiley-Nelson, J., Yang, X., Soman, G., Giardina, S., Harris, R., & Gromeier, M. (2008). Recombinant oncolytic poliovirus eliminates glioma *in vivo* without genetic adaptation to a pathogenic phenotype. *Mol Ther* 16, 1865-1872.

Dobrikova, E.Y., Florez, P., & Gromeier, M. (2003). Structural determinants of insert retention of poliovirus expression vectors with recombinant IRES elements. *Virology* 311, 241-253.

Felsenstein, J. (1989). PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5, 164-166.

Feuer, R., Mena, I., Pagarigan, R., Slifka, M.K., & Whitton, J.L. (2002). Cell cycle status affects coxsackievirus replication, persistence, and reactivation *in vitro*. *J Virol* 76, 4430-4440.

- Gonnet, G.H., Cohen, M.A., & Benner, S.A. (1992). Exhaustive matching of the entire protein sequence database. *Science* 256, 1443-1445.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D., & Métoz, F. (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15, 305-308.
- Grist, N.R., ja Bell, E.J. (1984). Paralytic poliomyelitis and nonpolio enteroviruses: studies in Scotland. *Rev Infect Dis* 6 *Suppl* 2, S385-386.
- Habel, K., ja Loomis, L. (1957). Cocksackie A7 virus and the Russian poliovirus Type 4. *Proc Soc Exp Biol Med* 95, 597-605.
- Haley, E., Au, G., Carlton, B., Barry, R., & Shafren, D. (2009). Regional administration of oncolytic Echovirus 1 as a novel therapy for the peritoneal dissemination of gastric cancer. *J Mol Med* 87, 385-399.
- Halim, S.S., Collins, D.N., & Ramsingh, A.I. (2000a). A therapeutic HIV vaccine using coxsackie-HIV recombinants: a possible new strategy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16, 1551-1558.
- Halim, S.S., Ostrowski, S.E., Lee, W.T., & Ramsingh, A.I. (2000b). Immunogenicity of a foreign peptide expressed within a capsid protein of an attenuated coxsackievirus. *Vaccine* 19, 958-965.
- Hayward, J.C., Gillespie, S.M., Kaplan, K.M., Packer, R., Pallansch, M., Plotkin, S., & Schonberger, L.B. (1989). Outbreak of poliomyelitis-like paralysis associated with enterovirus 71. *Pediatr Infect Dis J* 8, 611-616.
- Heikkilä, O., Kainulainen, M., & Susi, P. (2011). A combined method for rescue of modified enteroviruses by mutagenic primers, long PCR and T7 RNA polymerase-driven *in vivo* transcription. *J Virol Methods* 171, 129-133.
- Hovi, T., ja Roivainen, M. (1993). Peptide antisera targeted to a conserved sequence in poliovirus capsid VP1 cross-react widely with members of the genus Enterovirus. *J Clin Microbiol* 31, 1083-1087.
- Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., & Le Mercier, P. (2011). ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res* 39 *Suppl* 1, D576-582.
- Hyypiä, T., Hovi, T., Knowles, N.J., & Stanway, G. (1997). Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J Gen Virol* 78, 1-11.
- Höfling, K., Tracy, S., Chapman, N., Kim, K.S., & Smith Leser, J. (2000). Expression of an antigenic adenovirus epitope in a group B coxsackievirus. *J Virol* 74, 4570-4578.
- Jackson, C.A., Messinger, J., Peduzzi, J.D., Ansardi, D.C., & Morrow, C.D. (2005). Enhanced functional recovery from spinal cord injury following intrathecal or intramuscular administration of poliovirus replicons encoding IL-10. *Virology* 336, 173-183.

- Jia, Q., Liang, F., Ohka, S., Nomoto, A., & Hashikawa, T. (2002). Expression of brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system of mice using a poliovirus-based vector. *J Neurovirol* 8, 14-23.
- Kamitsuka, P.S., Lou, T.Y., Fabiyi, A., & Wenner, H.A. (1965). Preparation and standardization of coxsackievirus reference antisera. I. For twenty-four group A viruses. *Am J Epidemiol* 81, 283-306.
- Kelly, E., ja Russell, S.J. (2007). History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther* 15, 651-659.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111-120.
- Knowles, N. (ylläpitäjä). 01.10.2008. Picornaviridae Study Group [WWW-dokumentti]. <<http://www.picornastudysroup.com>> (Luettu 31.05.2011)
- Knowles, N. (ylläpitäjä). 27.04.2011. The Picornavirus Home Page [WWW-dokumentti]. <<http://www.picornaviridae.com>> (Luettu 31.05.2011)
- Lamson, D., Renwick, N., Kapoor, V., Liu, Z., Palacios, G., Ju, J., Dean, A., St George, K., Briese, T., & Lipkin, W. (2006). MassTag polymerase-chain-reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza-like illness in New York State during 2004-2005. *J Infect Dis* 194, 1398-1402.
- Lim, B., Shin, J., Lee, S., Kim, D., Choi, D., Choe, S., Knowlton, K., & Jeon, E. (2005). Long-term cardiac gene expression using a coxsackieviral vector. *J Mol Cell Cardiol* 38, 745-751.
- Lole, K., Bollinger, R., Paranjape, R., Gadkari, D., Kulkarni, S., Novak, N., Ingersoll, R., Sheppard, H., & Ray, S. (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 73, 152-160.
- Maha, M.M., Ali, M.A., Abdel-Rehim, S.E., Abu-Shady, E.A., El-Naggar, B.M., & Maha, Y.Z. (2003). The role of coxsackieviruses infection in the children of insulin dependent diabetes mellitus. *J Egypt Public Health Assoc* 78, 305-318.
- Melnick, J.L. (1950). The poliomyelitis, encephalomyocarditis, and coxsackie groups of viruses. *Bacteriol Rev* 14, 233-244.
- Melnick, J.L., ja Kaplan, A.S. (1950). Dual antibody response to coxsackie and poliomyelitis viruses in patients with paralytic poliomyelitis. *Proc Soc Exp Biol Med* 74, 812-815.
- Moya-Suri, V., Schlosser, M., Zimmermann, K., Rjasanowski, I., Gurtler, L., & Mentel, R. (2005). Enterovirus RNA sequences in sera of schoolchildren in the general population and their association with type 1-diabetes-associated autoantibodies. *J Med Microbiol* 54, 879-883.

- Nairn, C., ja Clements, G.B. (1999). A study of enterovirus isolations in Glasgow from 1977 to 1997. *J Med Virol* 58, 304-312.
- Nasri, D., Bouslama, L., Pillet, S., Bourlet, T., Aouni, M., & Pozzetto, B. (2007). Basic rationale, current methods and future directions for molecular typing of human enterovirus. *Expert Rev Mol Diagn* 7, 419-434.
- Oberste, M., Maher, K., Kilpatrick, D., Flemister, M., Brown, B., & Pallansch, M. (1999a). Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* 37, 1288-1293.
- Oberste, M., Peñaranda, S., Maher, K., & Pallansch, M. (2004a). Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A. *J Gen Virol* 85, 1597-1607.
- Oberste, M.S., Maher, K., Kilpatrick, D.R., & Pallansch, M.A. (1999b). Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 73, 1941-1948.
- Oberste, M.S., Maher, K., & Pallansch, M.A. (2004b). Evidence for frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J Virol* 78, 855-867.
- Palacios, G., ja Oberste, M.S. (2005). Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J Neurovirol* 11, 424-433.
- Reddy, P.S., Burroughs, K.D., Hales, L.M., Ganesh, S., Jones, B.H., Idamakanti, N., Hay, C., Li, S.S., Skele, K.L., Vasko, A.J., Yang, J., Watkins, D.N., Rudin, C.M. & Hallenbeck, P.L. (2007). Seneca Valley virus, a systemically deliverable oncolytic picornavirus, and the treatment of neuroendocrine cancers. *J Natl Cancer Inst* 99, 1623-1633.
- Richter, F., Rhodes, A., Macpherson, L., & Labzoffsky, N. (1971). A possible new enterovirus serotype isolated in Ontario. *Arch Gesamte Virusforsch* 35, 218-222.
- Roivainen, M., Piirainen, L., Hovi, T., Virtanen, I., Riikonen, T., Heino, J., & Hyypiä, T. (1994). Entry of coxsackievirus A9 into host cells: specific interactions with alpha v beta 3 integrin, the vitronectin receptor. *Virology* 203, 357-365.
- Roos, F.C., Roberts, A.M., Hwang, II, Moriyama, E.H., Evans, A.J., Sybingco, S., Watson, I.R., Carneiro, L.A., Gedye, C., Girardin, S.E., Ailles, L.E., Jewet, M.A., Milosevic, M., Wilson, B.C., Bell, J.C., Der, S.D. & Ohh, M. (2010). Oncolytic targeting of renal cell carcinoma via encephalomyocarditis virus. *EMBO Mol Med* 2, 275-288.
- Rudin, C.M., Poirier, J.T., Senzer, N.N., Stephenson, J., Jr., Loesch, D., Burroughs, K.D., Reddy, P.S., Hann, C.L., & Hallenbeck, P.L. (2011). Phase I clinical study of Seneca Valley Virus (SVV-001), a replication-competent picornavirus, in advanced solid tumors with neuroendocrine features. *Clin Cancer Res* 17, 888-895.

Savolainen-Kopra, C., Al-Hello, H., Paananen, A., Blomqvist, S., Klemola, P., Sobotova, Z., & Roivainen, M. (2009). Molecular epidemiology and dual serotype specificity detection of echovirus 11 strains in Finland. *Virus Res* 139, 32-38.

Shafren, D., Au, G., Nguyen, T., Newcombe, N., Haley, E., Beagley, L., Johansson, E., Hersey, P., & Barry, R. (2004). Systemic therapy of malignant human melanoma tumors by a common cold-producing enterovirus, coxsackievirus a21. *Clin Cancer Res* 10, 53-60.

Shafren, D., Sylvester, D., Johansson, E., Campbell, I., & Barry, R. (2005). Oncolysis of human ovarian cancers by echovirus type 1. *Int J Cancer* 115, 320-328.

Silverthorne, N., Armstrong, M.P., Goodfellow, A.M., Roy, T.E., Ritchie, R.C., & Donohue, W.L. (1951). Studies on poliomyelitis in Ontario; IV. Further observations on the spread of poliomyelitis and coxsackie infections in small communities. *Can Med Assoc J* 64, 309-317.

Skelding, K., Barry, R., & Shafren, D. (2009). Systemic targeting of metastatic human breast tumor xenografts by Coxsackievirus A21. *Breast Cancer Res Treat* 113, 21-30.

Smythies, L.E., Novak, M.J., Waites, K.B., Lindsey, J.R., Morrow, C.D., & Smith, P.D. (2005). Poliovirus replicons encoding the B subunit of *Helicobacter pylori* urease protect mice against *H. pylori* infection. *Vaccine* 23, 901-909.

Stanway, G., Brown, F., Christian, P., Hovi, T., Hyypiä, T., King, A.M.Q., Knowles, N.J., Lemon, S.M., Minor, P.D., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C. & Skern, T. (2005). Family *Picornaviridae*. Kirjassa: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L.A. (toim.). *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, London, UK, 757-778.

Steil, B.P., ja Barton, D.J. (2009). Conversion of VPg into VPgpUpUOH before and during poliovirus negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 83, 12660-12670.

Van der Ryst, E., Nakasone, T., Habel, A., Venet, A., Gomard, E., Altmeyer, R., Girard, M., & Borman, A.M. (1998). Study of the immunogenicity of different recombinant Mengo viruses expressing HIV1 and SIV epitopes. *Res Virol* 149, 5-20.

van Kuppeveld, F.J., de Jong, A., Dijkman, H.B., Andino, R., & Melchers, W.J. (2002). Studies towards the potential of poliovirus as a vector for the expression of HPV 16 virus-like-particles. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34, 201-208.

Voroshilova, M., ja Chumakov, M. (1959). Poliomyelitis-Like Properties of AB-IV-Coxsackie A7 Group of Viruses. *Prog med Virol* 2, 106-170.

Wadhwa, L., Hurwitz, M.Y., Chevez-Barrios, P., & Hurwitz, R.L. (2007). Treatment of invasive retinoblastoma in a murine model using an oncolytic picornavirus. *Cancer Res* 67, 10653-10656.

Whitton, J., Cornell, C., & Feuer, R. (2005). Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat Rev Microbiol* 3, 765-776.

Williams, C.H., Kajander, T., Hyypiä, T., Jackson, T., Sheppard, D., & Stanway, G. (2004). Integrin alpha v beta 6 is an RGD-dependent receptor for coxsackievirus A9. *J Virol* 78, 6967-6973.

Yin, H., Berg, A.K., Tuvemo, T., & Frisk, G. (2002). Enterovirus RNA is found in peripheral blood mononuclear cells in a majority of type 1 diabetic children at onset. *Diabetes* 51, 1964-1971.

Liite 1

Nukleotidisekvenssirinnastus neljän sekvensoidun genomien ja AY421765:n välillä. Eroavaisuudet sekvenssien välillä on merkitty punaisella.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
AY421765 TTTAAACAGCCTGTGGGTTGTCCCAACCACAGGGCCCACTGGGCGTTAGCACTCTGGTATTACGGTACCTTTGTGCGCCTGTTTATA
ET1080   TTTAAACAGCCTGTGGGTTGTCCCAACCACAGGGCCCACTGGGCGTTAGCACTCTGGTATTACGGTACCTTTGTGCGCCTGTTTATA
Parker   TTTAAACAGCCTGTGGGTTGTCCCAACCACAGGGCCCACTGGGCGTTAGCACTCTGGTATTACGGTACCTTTGTGCGCCTGTTTATA
USSR     TTTAAACAGCCTGTGGGTTGTCCCAACCACAGGGCCCACTGGGCGTTAGCACTCTGGTATTACGGTACCTTTGTGCGCCTGTTTATA
275/58   TTTAAACAGCCTGTGGGTTGTCCCAACCACAGGGCCCACTGGGCGTTAGCACTCTGGTATTACGGTACCTTTGTGCGCCTGTTTATA

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
AY421765 ACCCTCCCAA-CTGTAATTAGAAGCAACACAGTCGATCAATAGTAGGCGTGACGCACCAGTCACGCTTGTGATCAAGCACTTCTGTT
ET1080   ACCCTCCCAA-CTGTAATTAGAAGCAACACAGTCGATCAATAGTAGGCGTGACGCACCAGTCACGCTTGTGATCAAGCACTTCTGTT
Parker   ACCCTCCCAA-CTGTAATTAGAAGCAACACAGTCGATCAATAGTAGGCGTGACGCACCAGTCACGCTTGTGATCAAGCACTTCTGTT
USSR     ACCCTCCCAA-CTGTAATTAGAAGCAACACAGTCGATCAATAGTAGGCGTGACGCACCAGTCACGCTTGTGATCAAGCACTTCTGTT
275/58   TTCTCCCAAATTGCAACTTAGAAGCAATGCACTCCGATCAATAGTAGGCGTGACGCACCAGTCGCTTGTGATCAAGCACTTCTGTT

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
AY421765 TCCCGGACCGAGTATCAATAGACTGCTCAGCGGTTGAAGGAGAAAAACGTTTCGTTACCCGACCACTACTTCGAAAAACCTAGTAGCAC
ET1080   TCCCGGACCGAGTATCAATAGACTGCTCAGCGGTTGAAGGAGAAAAACGTTTCGTTACCCGACCACTACTTCGAAAAACCTAGTAGCAC
Parker   TCCCGGACCGAGTATCAATAGACTGCTCAGCGGTTGAAGGAGAAAAACGTTTCGTTACCCGACCACTACTTCGAAAAACCTAGTAGCAC
USSR     TCCCGGACCGAGTATCAATAGACTGCTCAGCGGTTGAAGGAGAAAAACGTTTCGTTACCCGACCACTACTTCGAAAAACCTAGTAGCAC
275/58   TCCCGGACCGAGTATCAATAGACTGCTCAGCGGTTGAAGGAGAAAAACGTTTCGTTACCCGACCACTACTTCGAAAAACCTAGTAGCAC

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
AY421765 CATGAAGGTTGCGGAGTGTTCGCTCGGCACTTCCCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGT
ET1080   CATGAAGGTTGCGGAGTGTTCGCTCGGCACTTCCCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGT
Parker   CATGAAGGTTGCGGAGTGTTCGCTCGGCACTTCCCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGT
USSR     CATGAAGGTTGCGGAGTGTTCGCTCGGCACTTCCCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGT
275/58   TATGAAGGTTGCGGAGTGTTCGCTCGGCACTTCCCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGT

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
AY421765 GGCTGCGCTGGCGGCCTGCCTATGGGGTAACCATAGGACGCTCTAATACGGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCC
ET1080   GGCTGCGCTGGCGGCCTGCCTATGGGGTAACCATAGGACGCTCTAATACGGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCC
Parker   GGCTGCGCTGGCGGCCTGCCTATGGGGTAACCATAGGACGCTCTAATACGGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCC
USSR     GGCTGCGCTGGCGGCCTGCCTATGGGGTAACCATAGGACGCTCTAATACGGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCC
275/58   GGCTGCGCTGGCGGCCTGCCTATGGGGTAACCATAGGACGCTCTAATACGGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCC

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
AY421765 TCCGGCCCCGAAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCGCGCCCCCATTCAGGAGGTAGCGCGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGA
ET1080   TCCGGCCCCGAAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCGCGCCCCCATTCAGGAGGTAGCGCGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGA
Parker   TCCGGCCCCGAAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCGCGCCCCCATTCAGGAGGTAGCGCGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGA
USSR     TCCGGCCCCGAAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCGCGCCCCCATTCAGGAGGTAGCGCGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGA
275/58   TCCGGCCCCGAAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCGCGCCCCCATTCAGGAGGTAGCGCGTCGTAACGGGCAACTCTGCAGCGGA

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
AY421765 ACCGACTACTTTGGGTGTCCTGTTTCCCTTTTATCTTTATCTGGCTGCTTATGGTGACAATTGACAGATTGTTACCATATAGCTATTGG
ET1080   ACCGACTACTTTGGGTGTCCTGTTTCCCTTTTATCTTTATCTGGCTGCTTATGGTGACAATTGACAGATTGTTACCATATAGCTATTGG
Parker   ACCGACTACTTTGGGTGTCCTGTTTCCCTTTTATCTTTATCTGGCTGCTTATGGTGACAATTGACAGATTGTTACCATATAGCTATTGG
USSR     ACCGACTACTTTGGGTGTCCTGTTTCCCTTTTATCTTTATCTGGCTGCTTATGGTGACAATTGACAGATTGTTACCATATAGCTATTGG
275/58   ACCGACTACTTTGGGTGTCCTGTTTCCCTTTTATCTTTATCTGGCTGCTTATGGTGACAATTGACAGATTGTTACCATATAGCTATTGG

      640     650     660     670     680     690     700     710     720
AY421765 ATTGGCCATCCGGTCAAGCAGAGCGATTATCTACCAATTTATTGGATTTATCCCACTGCACACTCGTGAATATAACACATTACTGCTG
ET1080   ATTGGCCATCCGGTCAAGCAGAGCGATTATCTACCAATTTATTGGATTTATCCCACTGCACACTCGTGAATATAACACATTACTGCTG
Parker   ATTGGCCATCCGGTCAAGCAGAGCGATTATCTACCAATTTATTGGATTTATCCCACTGCACACTCGTGAATATAACACATTACTGCTG
USSR     ATTGGCCATCCGGTCAAGCAGAGCGATTATCTACCAATTTATTGGATTTATCCCACTGCACACTCGTGAATATAACACATTACTGCTG
275/58   ATTGGCCATCCGGTCAAGCAGAGCGATTATCTACCAATTTATTGGATTTATCCCACTGCACACTCGTGAATATAACACATTACTGCTG

      730     740     750     760     770     780     790     800     810
AY421765 ATACTGAGTTTGGCAAAGCAAATGGGCGCTCAAATATCAACACAAAAATCTGGCTCCCATGAGACGGGTAACATCGCTACTGAGGGAT
ET1080   ATACTGAGTTTGGCAAAGCAAATGGGCGCTCAAATATCAACACAAAAATCTGGCTCCCATGAGACGGGTAACATCGCTACTGAGGGAT
Parker   ATACTGAGTTTGGCAAAGCAAATGGGCGCTCAAATATCAACACAAAAATCTGGCTCCCATGAGACGGGTAACATCGCTACTGAGGGAT
USSR     ATACTGAGTTTGGCAAAGCAAATGGGCGCTCAAATATCAACACAAAAATCTGGCTCCCATGAGACGGGTAACATCGCTACTGAGGGAT
275/58   GATATGAAATTTCAATACAAACAAATGGGCGCTCAAATATCAACACAAAAATCTGGCTCCCATGAGACGGGTAACATCGCTACTGAGGGAT

      820     830     840     850     860     870     880     890     900
AY421765 CCACCATAAACTTTACTAATATCAATTACTACAAGGACTCCTACGCTGCCTCAGTAGCAAGCAAGACTTTACTCAAGATCCGGGGAAAT
```

ET1080 CCACCATAAACTTTACTAATATCAATTACTACAAGGACTCCTACGTCGCTCAGCTAGCAAGCAAGACTTTACTCAAGATCCGGGGAAAT
 Parker CCACCATAAACTTTACTAATATCAATTACTACAAGGACTCCTACGTCGCTCAGCTAGCAAGCAAGACTTTACTCAAGATCCGGGGAAAT
 USSR CCACCATAAACTTTACTAATATCAATTACTACAAGGACTCCTACGTCGCTCAGCTAGCAAGCAAGACTTTACTCAAGATCCGGGGAAAT
 275/58 CCACCATAAACTTTACTAATATCAATTACTACAAGGACTCCTACGTCGCTCAGCTAGCAAGCAAGACTTTACTCAAGATCCGGGGAAAT

910 920 930 940 950 960 970 980 990
 AY421765 TCACCAGCCCGGTCCTAGATGTTTTATCAGAGATGGCAGCACCCTGCAATCACCAGCAGCAGAAGCATGTGGATACAGTGATAGGGTCG
 ET1080 TCACCAGCCCGGTCCTAGATGTTTTATCAGAGATGGCAGCACCCTGCAATCACCAGCAGCAGAAGCATGTGGATACAGTGATAGGGTCG
 Parker TCACCAGCCCGGTCCTAGATGTTTTATCAGAGATGGCAGCACCCTGCAATCACCAGCAGCAGAAGCATGTGGATACAGTGATAGGGTCG
 USSR TCACCAGCCCGGTCCTAGATGTTTTATCAGAGATGGCAGCACCCTGCAATCACCAGCAGCAGAAGCATGTGGATACAGTGATAGGGTCG
 275/58 TCACCAGCCCGGTCCTAGATGTTTTATCAGAGATGGCAGCACCCTGCAATCACCAGCAGCAGAAGCATGTGGATACAGTGATAGGGTCG

1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 AY421765 CGCAGCTCAGTAGGTAACCGACAATTACAACGCAAGAAGCGGCTAATGTGATTGTCGCTTATGGGAGTGGCCACAATATTGTCCTG
 ET1080 CGCAGCTCAGTAGGTAACCGACAATTACAACGCAAGAAGCGGCTAATGTGATTGTCGCTTATGGGAGTGGCCACAATATTGTCCTG
 Parker CGCAGCTCAGTAGGTAACCGACAATTACAACGCAAGAAGCGGCTAATGTGATTGTCGCTTATGGGAGTGGCCACAATATTGTCCTG
 USSR CGCAGCTCAGTAGGTAACCGACAATTACAACGCAAGAAGCGGCTAATGTGATTGTCGCTTATGGGAGTGGCCACAATATTGTCCTG
 275/58 CGCAGCTCAGTAGGTAACCGACAATTACAACGCAAGAAGCGGCTAATGTGATTGTCGCTTATGGGAGTGGCCACAATATTGTCCTG

1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170
 AY421765 ACACCTGACGCTACAGCGGTGGACAAGCCCACTCGTCTGACGCTCAGTCAATAGATTTTATACACTAGACACCAAGATTGGTCATCTA
 ET1080 ACACCTGACGCTACAGCGGTGGACAAGCCCACTCGTCTGACGCTCAGTCAATAGATTTTATACACTAGACACCAAGATTGGTCATCTA
 Parker ACACCTGACGCTACAGCGGTGGACAAGCCCACTCGTCTGACGCTCAGTCAATAGATTTTATACACTAGACACCAAGATTGGTCATCTA
 USSR ACACCTGACGCTACAGCGGTGGACAAGCCCACTCGTCTGACGCTCAGTCAATAGATTTTATACACTAGACACCAAGATTGGTCATCTA
 275/58 ACACCTGACGCTACAGCGGTGGACAAGCCCACTCGTCTGACGCTCAGTCAATAGATTTTATACACTAGACACCAAGATTGGTCATCTA

1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 AY421765 GTTCAAAGGGGTGGTATTGGAAATCCCAGATATTCTAGCGGAACTGGAGTCTTCGGTCAAATGCACAGTCCACTTTTGTATAGGT
 ET1080 GTTCAAAGGGGTGGTATTGGAAATCCCAGATATTCTAGCGGAACTGGAGTCTTCGGTCAAATGCACAGTCCACTTTTGTATAGGT
 Parker GTTCAAAGGGGTGGTATTGGAAATCCCAGATATTCTAGCGGAACTGGAGTCTTCGGTCAAATGCACAGTCCACTTTTGTATAGGT
 USSR GTTCAAAGGGGTGGTATTGGAAATCCCAGATATTCTAGCGGAACTGGAGTCTTCGGTCAAATGCACAGTCCACTTTTGTATAGGT
 275/58 GTTCAAAGGGGTGGTATTGGAAATCCCAGATATTCTAGCGGAACTGGAGTCTTCGGTCAAATGCACAGTCCACTTTTGTATAGGT

1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350
 AY421765 CAGGGTTTTGCATTACGTTCAATGCAATGCCAGCAAGTTTCATCAGGGAGCACTATTGGTTGCAGTCTTACCAGAATATGTTACTGGTA
 ET1080 CAGGGTTTTGCATTACGTTCAATGCAATGCCAGCAAGTTTCATCAGGGAGCACTATTGGTTGCAGTCTTACCAGAATATGTTACTGGTA
 Parker CAGGGTTTTGCATTACGTTCAATGCAATGCCAGCAAGTTTCATCAGGGAGCACTATTGGTTGCAGTCTTACCAGAATATGTTACTGGTA
 USSR CAGGGTTTTGCATTACGTTCAATGCAATGCCAGCAAGTTTCATCAGGGAGCACTATTGGTTGCAGTCTTACCAGAATATGTTACTGGTA
 275/58 CAGGGTTTTGCATTACGTTCAATGCAATGCCAGCAAGTTTCATCAGGGAGCACTATTGGTTGCAGTCTTACCAGAATATGTTACTGGTA

1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 AY421765 CTGTGCTGGCAACTGGACTTGAGAATACTCACCACCATACGCTGCTACTCAGCCTGGTGCTACAGGGTTTGAGTTGACCAACCCGT
 ET1080 CTGTGCTGGCAACTGGACTTGAGAATACTCACCACCATACGCTGCTACTCAGCCTGGTGCTACAGGGTTTGAGTTGACCAACCCGT
 Parker CTGTGCTGGCAACTGGACTTGAGAATACTCACCACCATACGCTGCTACTCAGCCTGGTGCTACAGGGTTTGAGTTGACCAACCCGT
 USSR CTGTGCTGGCAACTGGACTTGAGAATACTCACCACCATACGCTGCTACTCAGCCTGGTGCTACAGGGTTTGAGTTGACCAACCCGT
 275/58 CTGTGCTGGCAACTGGACTTGAGAATACTCACCACCATACGCTGCTACTCAGCCTGGTGCTACAGGGTTTGAGTTGACCAACCCGT

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530
 AY421765 ACATTTAGACGCTGGGATCCCGTTGAGCCAGTTGTTAGTGTGCCCTCACCAGTGGATTAACCTTCGAACCTAACAACCTGTGCCACTATAG
 ET1080 ACATTTAGACGCTGGGATCCCGTTGAGCCAGTTGTTAGTGTGCCCTCACCAGTGGATTAACCTTCGAACCTAACAACCTGTGCCACTATAG
 Parker ACATTTAGACGCTGGGATCCCGTTGAGCCAGTTGTTAGTGTGCCCTCACCAGTGGATTAACCTTCGAACCTAACAACCTGTGCCACTATAG
 USSR ACATTTAGACGCTGGGATCCCGTTGAGCCAGTTGTTAGTGTGCCCTCACCAGTGGATTAACCTTCGAACCTAACAACCTGTGCCACTATAG
 275/58 ACATTTAGACGCTGGGATCCCGTTGAGCCAGTTGTTAGTGTGCCCTCACCAGTGGATTAACCTTCGAACCTAACAACCTGTGCCACTATAG

1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 AY421765 TGGTACCATAACATTAACAGCGTCCCTTTTGGATTGCGCCTTAAACCATTGCAATTTGCGTTTAGTAGTGATTCCAGTCTCACCCCTTGGGT
 ET1080 TGGTACCATAACATTAACAGCGTCCCTTTTGGATTGCGCCTTAAACCATTGCAATTTGCGTTTAGTAGTGATTCCAGTCTCACCCCTTGGGT
 Parker TGGTACCATAACATTAACAGCGTCCCTTTTGGATTGCGCCTTAAACCATTGCAATTTGCGTTTAGTAGTGATTCCAGTCTCACCCCTTGGGT
 USSR TGGTACCATAACATTAACAGCGTCCCTTTTGGATTGCGCCTTAAACCATTGCAATTTGCGTTTAGTAGTGATTCCAGTCTCACCCCTTGGGT
 275/58 TGGTACCATAACATTAACAGCGTCCCTTTTGGATTGCGCCTTAAACCATTGCAATTTGCGTTTAGTAGTGATTCCAGTCTCACCCCTTGGGT

1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710
 AY421765 TCCTGCAAGGGGCCACCAACAATCCCATAACCATCAGTGGCCCTATGAACTCCGAGTTCTCTGGATTGAGACAAGCTGTTACTC
 ET1080 TCCTGCAAGGGGCCACCAACAATCCCATAACCATCAGTGGCCCTATGAACTCCGAGTTCTCTGGATTGAGACAAGCTGTTACTC
 Parker TCCTGCAAGGGGCCACCAACAATCCCATAACCATCAGTGGCCCTATGAACTCCGAGTTCTCTGGATTGAGACAAGCTGTTACTC
 USSR TCCTGCAAGGGGCCACCAACAATCCCATAACCATCAGTGGCCCTATGAACTCCGAGTTCTCTGGATTGAGACAAGCTGTTACTC
 275/58 TCCTGCAAGGGGCCACCAACAATCCCATAACCATCAGTGGCCCTATGAACTCCGAGTTCTCTGGATTGAGACAAGCTGTTACTC

275/58 TCCTGCAGGGGGCCACCCACGATCCCTATAACCATCACAGTGGCTCCCATGAAATCAGAGTTTCTGGGTTGAGGCAAGCTGTACAC

1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800

AY421765 AAGGTTTGCCCATGGAGTTAAAACCCGGCACCAACCAATTTCTACCACCGACGATGGTGTATCAGCCCTATACTGCCTGGGTTCCACC

ET1080 AAGGTTTGCCCATGGAGTTAAAACCCGGCACCAACCAATTTCTACCACCGACGATGGTGTATCAGCCCTATACTGCCTGGGTTCCACC

Parker AAGGTTTGCCCATGGAGTTAAAACCCGGCACCAACCAATTTCTACCACCGACGATGGTGTATCAGCCCTATACTGCCTGGGTTCCACC

USSR AAGGTTTGCCCATGGAGTTAAAACCCGGCACCAACCAATTTCTACCACCGACGATGGTGTATCAGCCCTATACTGCCTGGGTTCCACC

275/58 AAGGATTGCCCATGGAACTGAACTCCGGTACCAACCAATTTCTCAGACCCGACGATGGTGTATCAGCCCTATACTGCCGGGTTCCACC

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890

AY421765 CAACACCAGTAATACATATTCCTGGGGAAGTTAGAAAACCTCTTAGAGCTGTGTCAAATGACACAATAATGGAAGTTAAACAATCTTACCA

ET1080 CAACACCAGTAATACATATTCCTGGGGAAGTTAGAAAACCTCTTAGAGCTGTGTCAAATGACACAATAATGGAAGTTAAACAATCTTACCA

Parker CAACACCAGTAATACATATTCCTGGGGAAGTTAGAAAACCTCTTAGAGCTGTGTCAAATGACACAATAATGGAAGTTAAACAATCTTACCA

USSR CAACACCAGTAATACATATTCCTGGGGAAGTTAGAAAACCTCTTAGAGCTGTGTCAAATGACACAATAATGGAAGTTAAACAATCTTACCA

275/58 CAACACCAGTGATACACATCCTGGGGAAGTTAGAAAACCTCTTAGAGCTGTGTCAAATGACACAATAATGGAAGTTAAACAATCTTACCA

1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980

AY421765 CGAATGAAGCCACTCCCATGGAGCGCTTGCGCATACCCGTACAAGTCCAAACACAGTCGGGTGAATGTGCGCAGCATTCAAAGCTGATC

ET1080 CGAATGAAGCCACTCCCATGGAGCGCTTGCGCATACCCGTACAAGTCCAAACACAGTCGGGTGAATGTGCGCAGCATTCAAAGCTGATC

Parker CGAATGAAGCCACTCCCATGGAGCGCTTGCGCATACCCGTACAAGTCCAAACACAGTCGGGTGAATGTGCGCAGCATTCAAAGCTGATC

USSR CGAATGAAGCCACTCCCATGGAGCGCTTGCGCATACCCGTACAAGTCCAAACACAGTCGGGTGAATGTGCGCAGCATTCAAAGCTGATC

275/58 CCAATGAGGCAACCACTATGGAACTCGCCTACGCATACCAAGTGCAGACAGTCGGTGAATGTGCGCAGCATTCAAAGCTGATC

1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070

AY421765 CTGGGCTTGATGGCCATGGCAATCCACTATGGTTGGGCAGCTTTGTAGATATTACACCAATGGTCAGGGTCTTTAAAAATAACTTTCA

ET1080 CTGGGCTTGATGGCCATGGCAATCCACTATGGTTGGGCAGCTTTGTAGATATTACACCAATGGTCAGGGTCTTTAAAAATAACTTTCA

Parker CTGGGCTTGATGGCCATGGCAATCCACTATGGTTGGGCAGCTTTGTAGATATTACACCAATGGTCAGGGTCTTTAAAAATAACTTTCA

USSR CTGGGCTTGATGGCCATGGCAATCCACTATGGTTGGGCAGCTTTGTAGATATTACACCAATGGTCAGGGTCTTTAAAAATAACTTTCA

275/58 CCGGCTTGATGGTCCGTGGCACTCCACTATGGTGGGCAGCTTTGTAGATATTACACTCAGTGGTCAGGTTCTTTAAAAATAACTTTCA

2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160

AY421765 TGTTCCACGGGTCATTTATGGCCACTGGGAAAATGCTGATAGCCTACACTCCTCCTGGTGGCTCTCTGCCGCCAACAGAATGCAGGCCAA

ET1080 TGTTCCACGGGTCATTTATGGCCACTGGGAAAATGCTGATAGCCTACACTCCTCCTGGTGGCTCTCTGCCGCCAACAGAATGCAGGCCAA

Parker TGTTCCACGGGTCATTTATGGCCACTGGGAAAATGCTGATAGCCTACACTCCTCCTGGTGGCTCTCTGCCGCCAACAGAATGCAGGCCAA

USSR TGTTCCACGGGTCATTTATGGCCACTGGGAAAATGCTGATAGCCTACACTCCTCCTGGTGGCTCTCTGCCGCCAACAGAATGCAGGCCAA

275/58 TGTTCACTGGATCATTTATGGCTACAGGGAAAATGCTGATAGCCTACACTCCTCCTGGTGGCTCTCTGCCGCCAACAGAATGCAGGCCAA

2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250

AY421765 TGCTGGGCACCCACGTCATCTGGGATTTGGTTTGAATCATCTGTGCACACTAGTTGTACCATGGATTAGCAACACTCATTATCGCTCGC

ET1080 TGCTGGGCACCCACGTCATCTGGGATTTGGTTTGAATCATCTGTGCACACTAGTTGTACCATGGATTAGCAACACTCATTATCGCTCGC

Parker TGCTGGGCACCCACGTCATCTGGGATTTGGTTTGAATCATCTGTGCACACTAGTTGTACCATGGATTAGCAACACTCATTATCGCTCGC

USSR TGCTGGGCACCCACGTCATCTGGGATTTGGTTTGAATCATCTGTGCACACTAGTTGTACCATGGATTAGCAACACTCATTATCGCTCGC

275/58 TGCTGGGTTACTCAGTCATATGGGATTTGGTTTGAATCATCTGTGCACACTAGTTGTACCATGGATTAGCAACACTCATTATCGCTCGC

2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340

AY421765 AGGCCACTGGCAGCTTCTTTGATTACTATGCCACTGGCATAGTATCTCTATGGTACCAGACAAATTTCTGTCGTCCTATAGGTGCGCCAA

ET1080 AGGCCACTGGCAGCTTCTTTGATTACTATGCCACTGGCATAGTATCTCTATGGTACCAGACAAATTTCTGTCGTCCTATAGGTGCGCCAA

Parker AGGCCACTGGCAGCTTCTTTGATTACTATGCCACTGGCATAGTATCTCTATGGTACCAGACAAATTTCTGTCGTCCTATAGGTGCGCCAA

USSR AGGCCACTGGCAGCTTCTTTGATTACTATGCCACTGGCATAGTATCTCTATGGTACCAGACAAATTTCTGTCGTCCTATAGGTGCGCCAA

275/58 AGGCCACTGGCAATTTCTTTGATTACTATGCCACTGGTATAGTCTCTGTTGGTACCAGACAACTTCTGTTGTTCCCATCGGTGCTCCAA

2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430

AY421765 CTA CTGCTTATATAGTGGTTCTGGGTAGCGCTCAAAGAATTTCCACATGCGGCTATGCAGGGACACTAGTGAAC TGACACAAGCCGAC

ET1080 CTA CTGCTTATATAGTGGTTCTGGGTAGCGCTCAAAGAATTTCCACATGCGGCTATGCAGGGACACTAGTGAAC TGACACAAGCCGAC

Parker CTA CTGCTTATATAGTGGTTCTGGGTAGCGCTCAAAGAATTTCCACATGCGGCTATGCAGGGACACTAGTGAAC TGACACAAGCCGAC

USSR CTA CTGCTTATATAGTGGTTCTGGGTAGCGCTCAAAGAATTTCCACATGCGGCTATGCAGGGACACTAGTGAAC TGACACAAGCCGAC

275/58 CCACTGCTTATATAGTGGTTCTGGGTAGCTCAGAAAATTTTACCATGCGACTGTGCAGGGATACCAGTGAATGTCACAGTCTGCGG

2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520

AY421765 AGTATCAGGGAGACGAAATAGTCGACCTAATCGAGAGTGTGTACAGAATACCCTAAAGCCATTACCAGCTCAATCGACACCAAAACTG

ET1080 AGTATCAGGGAGACGAAATAGTCGACCTAATCGAGAGTGTGTACAGAATACCCTAAAGCCATTACCAGCTCAATCGACACCAAAACTG

Parker AGTATCAGGGAGACGAAATAGTCGACCTAATCGAGAGTGTGTACAGAATACCCTAAAGCCATTACCAGCTCAATCGACACCAAAACTG

USSR AGTATCAGGGAGACGAAATAGTCGACCTAATCGAGAGTGTGTACAGAATACCCTAAAGCCATTACCAGCTCAATCGACACCAAAACTG

275/58 AGTATCAAGGAGATGAGATGTGCACTCATGTGAGAGTGTGTACAGAATACCCTAAAGCTATTACTAGCTCAATCGACACCAAACTG

2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610

AY421765 GTGCTAACACTCAAGCTAGCCAACATCGTATAGGCTTGGGGGAGGTTCCCGCTCTTCAAGCTGCTGAGACAGGATCGTCTTCGCTCGTTT
ET1080 GTGCTAACACTCAAGCTAGCCAACATCGTATAGGCTTGGGGGAGGTTCCCGCTCTTCAAGCTGCTGAGACAGGATCGTCTTCGCTCGTTT
Parker GTGCTAACACTCAAGCTAGCCAACATCGTATAGGCTTGGGGGAGGTTCCCGCTCTTCAAGCTGCTGAGACAGGATCGTCTTCGCTCGTTT
USSR GTGCTAACACTCAAGCTAGCCAACATCGTATAGGCTTGGGGGAGGTTCCCGCTCTTCAAGCTGCTGAGACAGGATCGTCTTCGCTCGTTT
275/58 GCGCAACTCAAGCTAGCCAACATCGTATAGGCTTGGGGGAGGTTCCCGCTCTTCAAGCTGCTGAGACAGGATCGTCTTCGCTCGTTT

2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
AY421765 CGGACAAGAACATGATAGAAACAAGATGTGTCGTAACAACAACACAGCACAGAGGAAACCAGCATTACAAACTTCTACTCCAGGGCGGGCC
ET1080 CGGACAAGAACATGATAGAAACAAGATGTGTCGTAACAACAACACAGCACAGAGGAAACCAGCATTACAAACTTCTACTCCAGGGCGGGCC
Parker CGGACAAGAACATGATAGAAACAAGATGTGTCGTAACAACAACACAGCACAGAGGAAACCAGCATTACAAACTTCTACTCCAGGGCGGGCC
USSR CGGACAAGAACATGATAGAAACAAGATGTGTCGTAACAACAACACAGCACAGAGGAAACCAGCATTACAAACTTCTACTCCAGGGCGGGCC
275/58 CAGACAAGAACATGATAGAAACAAGATGTGTCGTAACAACAACACAGCACAGAGGAAACCAGCATTACAAACTTCTACTCCAGGGCGGGCC

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790
AY421765 TAGTGGGGTTGTGAACATGCCAGTACAAGGAACCAGCAACACAAAGGGTTTCGCAAAGTGGGGATAGATATAATGGGCTTTGTGCAGA
ET1080 TAGTGGGGTTGTGAACATGCCAGTACAAGGAACCAGCAACACAAAGGGTTTCGCAAAGTGGGGATAGATATAATGGGCTTTGTGCAGA
Parker TAGTGGGGTTGTGAACATGCCAGTACAAGGAACCAGCAACACAAAGGGTTTCGCAAAGTGGGGATAGATATAATGGGCTTTGTGCAGA
USSR TAGTGGGGTTGTGAACATGCCAGTACAAGGAACCAGCAACACAAAGGGTTTCGCAAAGTGGGGATAGATATAATGGGCTTTGTGCAGA
275/58 TAGTGGGGTTGTGAACATGCCAGTACAAGGAACCAGCAACACAAAGGGTTTCGCAAAGTGGGGATAGATATAATGGGCTTTGTGCAGA

2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880
AY421765 TGAGGCGCAAACCTTGAGCTCATGACATACATGAGATTCTCCGCCGAGTTTACGTTTCGTAGCCAGCACTCCTGGGGGAGAGACTACTAACC
ET1080 TGAGGCGCAAACCTTGAGCTCATGACATACATGAGATTCTCCGCCGAGTTTACGTTTCGTAGCCAGCACTCCTGGGGGAGAGACTACTAACC
Parker TGAGGCGCAAACCTTGAGCTCATGACATACATGAGATTCTCCGCCGAGTTTACGTTTCGTAGCCAGCACTCCTGGGGGAGAGACTACTAACC
USSR TGAGGCGCAAACCTTGAGCTCATGACATACATGAGATTCTCCGCCGAGTTTACGTTTCGTAGCCAGCACTCCTGGGGGAGAGACTACTAACC
275/58 TGAGGCGCAAACCTTGAGCTCATGACATACATGAGATTCTCCGCCGAGTTTACGTTTCGTAGCCAGCACTCCTGGGGGAGAGACTACTAACC

2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970
AY421765 TTATACTGCAATACATGTATGCACCTCCCGGAGCTCCGCTGCCAACAGGGCGGATTCATACGAATGGCAAACATCCACTAACCCCTCTA
ET1080 TTATACTGCAATACATGTATGCACCTCCCGGAGCTCCGCTGCCAACAGGGCGGATTCATACGAATGGCAAACATCCACTAACCCCTCTA
Parker TTATACTGCAATACATGTATGCACCTCCCGGAGCTCCGCTGCCAACAGGGCGGATTCATACGAATGGCAAACATCCACTAACCCCTCTA
USSR TTATACTGCAATACATGTATGCACCTCCCGGAGCTCCGCTGCCAACAGGGCGGATTCATACGAATGGCAAACATCCACTAACCCCTCTA
275/58 TTATACTGCAATACATGTATGCACCTCCCGGAGCTCCGCTGCCAACAGGGCGGATTCATACGAATGGCAAACATCCACTAACCCCTCTA

2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040 3050 3060
AY421765 TTATCAGCAAGATGGCGGACCCACCCGCTCAGGTATCGGTTCCATTCTCTTCTCCTGCATCAGCATATCAGTGGTTCTATGATGGCTACC
ET1080 TTATCAGCAAGATGGCGGACCCACCCGCTCAGGTATCGGTTCCATTCTCTTCTCCTGCATCAGCATATCAGTGGTTCTATGATGGCTACC
Parker TTATCAGCAAGATGGCGGACCCACCCGCTCAGGTATCGGTTCCATTCTCTTCTCCTGCATCAGCATATCAGTGGTTCTATGATGGCTACC
USSR TTATCAGCAAGATGGCGGACCCACCCGCTCAGGTATCGGTTCCATTCTCTTCTCCTGCATCAGCATATCAGTGGTTCTATGATGGCTACC
275/58 TTATCAGCAAGATGGCGGACCCACCCGCTCAGGTATCGGTTCCATTCTCTTCTCCTGCATCAGCATATCAGTGGTTCTATGATGGCTACC

3070 3080 3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150
AY421765 CCACATTTGGGAAACACCCAATAGATCAGGACTTCCAATATGGCATGTGCCCAAACAACATGATGGGCACATCTGTGTGCCGATGATCG
ET1080 CCACATTTGGGAAACACCCAATAGATCAGGACTTCCAATATGGCATGTGCCCAAACAACATGATGGGCACATCTGTGTGCCGATGATCG
Parker CCACATTTGGGAAACACCCAATAGATCAGGACTTCCAATATGGCATGTGCCCAAACAACATGATGGGCACATCTGTGTGCCGATGATCG
USSR CCACATTTGGGAAACACCCAATAGATCAGGACTTCCAATATGGCATGTGCCCAAACAACATGATGGGCACATCTGTGTGCCGATGATCG
275/58 CCACATTTGGGAAACACCCAATAGATCAGGACTTCCAATATGGCATGTGCCCAAACAACATGATGGGCACATCTGTGTGCCGATGATCG

3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240
AY421765 GTGGGGCAAACCGACCCAATCAGTTACCATACGTATATACATGAGATTAAGCATATCCGTGCATGGGTGCCCGGCCACTGAGGAGTC
ET1080 GTGGGGCAAACCGACCCAATCAGTTACCATACGTATATACATGAGATTAAGCATATCCGTGCATGGGTGCCCGGCCACTGAGGAGTC
Parker GTGGGGCAAACCGACCCAATCAGTTACCATACGTATATACATGAGATTAAGCATATCCGTGCATGGGTGCCCGGCCACTGAGGAGTC
USSR GTGGGGCAAACCGACCCAATCAGTTACCATACGTATATACATGAGATTAAGCATATCCGTGCATGGGTGCCCGGCCACTGAGGAGTC
275/58 GTGGGGCAAACCGACCCAATCAGTTACCATACGTATATACATGAGATTAAGCATATCCGTGCATGGGTGCCCGGCCACTGAGGAGTC

3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330
AY421765 AGAATTACACTATGAGGAATTACCCGAACCTACAACGGGGCGCAATAAAATGTACATCAAAAAGCAGAGCTACCATAAACCTTAGGAA
ET1080 AGAATTACACTATGAGGAATTACCCGAACCTACAACGGGGCGCAATAAAATGTACATCAAAAAGCAGAGCTACCATAAACCTTAGGAA
Parker AGAATTACACTATGAGGAATTACCCGAACCTACAACGGGGCGCAATAAAATGTACATCAAAAAGCAGAGCTACCATAAACCTTAGGAA
USSR AGAATTACACTATGAGGAATTACCCGAACCTACAACGGGGCGCAATAAAATGTACATCAAAAAGCAGAGCTACCATAAACCTTAGGAA
275/58 AGAATTACACTATGAGGAATTACCCGAACCTACAACGGGGCGCAATAAAATGTACATCAAAAAGCAGAGCTACCATAAACCTTAGGAA

3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 3410 3420
AY421765 AATTTGGCCAACCAATCCGGAGCAATTTATGTGGGGAGCTACAGAGTGGTAAACAGGCATTGGCAACCCACAATGACTGGAAAACCTGG
ET1080 AATTTGGCCAACCAATCCGGAGCAATTTATGTGGGGAGCTACAGAGTGGTAAACAGGCATTGGCAACCCACAATGACTGGAAAACCTGG

Parker AATTTGGCCAACATCCGGAGCAATTTATGTGGGGAGCTACAGAGTGGTAAACAGGCATTGGCAACCCACAATGACTGGAAAAACCTGG
USSR AATTTGGCCAACATCCGGAGCAATTTATGTGGGGAGCTACAGAGTGGTAAACAGGCATTGGCAACCCACAATGACTGGAAAAACCTGG
275/58 AATTTGGCCAGCAATCTGGAGCAATTTATGTGGGCACTACAGGTTAGTAAATAGCACCTAGCCACCCACAATGACTGGCCGAACCTGG

3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510
AY421765 TGTGGGAGGACAGTTCAGAGATTTGTTAGTCTCATCCACTACTGCCAAGGCTGTGATACCATCGCCCGGTGTGACTGTCAAACGGGGG
ET1080 TGTGGGAGGACAGTTCAGAGATTTGTTAGTCTCATCCACTACTGCCAAGGCTGTGATACCATCGCCCGGTGTGACTGTCAAACGGGGG
Parker TGTGGGAGGACAGTTCAGAGATTTGTTAGTCTCATCCACTACTGCCAAGGCTGTGATACCATCGCCCGGTGTGACTGTCAAACGGGGG
USSR TGTGGGAGGACAGTTCCAAATTTGTTAGTCTCATCCACTACTGCCAAGGCTGTGATACCATCGCCCGGTGTGACTGTCAAACGGGGG
275/58 TGTGGGAGGATAGTTCAGAGACTTGTGTTGTTATCATCCACTACTGCCAAGGCTGTGATACCATCGCCCGGTGCACTGCAGACTGGGA

3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
AY421765 TGTATTATTGCAATCCCGTAGAAAACATTATCCAGTCAGTTTCTCTAAGCCAGTTTCGTTTTCTGGAAGCTAGTGTGACTACCCGG
ET1080 TGTATTATTGCAATCCCGTAGAAAACATTATCCAGTCAGTTTCTCTAAGCCAGTTTCGTTTTCTGGAAGCTAGTGTGACTACCCGG
Parker TGTATTATTGCAATCCCGTAGAAAACATTATCCAGTCAGTTTCTCTAAGCCAGTTTCGTTTTCTGGAAGCTAGTGTGACTACCCGG
USSR TGTATTATTGCAATCCCGTAGAAAACATTATCCAGTCAGTTTCTCTAAGCCAGTTTCGTTTTCTGGAAGCTAGTGTGACTACCCGG
275/58 TGTATTATTGCAATCCCGTAGAAAACATTATCCAGTCAGTTTCTCTAAGCCAGTTTCGTTTTCTGGAAGCTAGTGTGACTACCCGG

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690
AY421765 CAAGGTACCAATCTCACCTCATGTTAGTCAAGGGCACTCAGAACCCGGTACTGTGGGGGCATCCTCAGATGCCAGCACGGCGTGGTTG
ET1080 CAAGGTACCAATCTCACCTCATGTTAGTCAAGGGCACTCAGAACCCGGTACTGTGGGGGCATCCTCAGATGCCAGCACGGCGTGGTTG
Parker CAAGGTACCAATCTCACCTCATGTTAGTCAAGGGCACTCAGAACCCGGTACTGTGGGGGCATCCTCAGATGCCAGCACGGCGTGGTTG
USSR CAAGGTACCAATCTCACCTCATGTTAGTCAAGGGCACTCAAAACCCGGTACTGTGGGGGCATCCTCAATGCCAGCACGGCGTGGTTG
275/58 CAAGGTACCAATCTCACCTCATGTTAGTCAAGGGCACTCAAAACCCGGTACTGTGGGGGCATCCTCAATGCCAGCACGGCGTGGTTG

3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780
AY421765 GTATAGTCTCCACGGGCGGGAATGGTCTAGTGGGTTTTGCTGATGTGAGAGACCTTTTGTGGCTAGATGAGGAAGCCATGGAGCAAGGGG
ET1080 GTATAGTCTCCACGGGCGGGAATGGTCTAGTGGGTTTTGCTGATGTGAGAGACCTTTTGTGGCTAGATGAGGAAGCCATGGAGCAAGGGG
Parker GTATAGTCTCCACGGGCGGGAATGGTCTAGTGGGTTTTGCTGATGTGAGAGACCTTTTGTGGCTAGATGAGGAAGCCATGGAGCAAGGGG
USSR GTATAGTCTCCACGGGCGGGAATGGTCTAGTGGGTTTTGCTGATGTGAGAGACCTTTTGTGGCTAGATGAGGAAGCCATGGAGCAAGGGG
275/58 GTATAGTCTCCACGGGCGGGAATGGTCTAGTGGGTTTTGCTGATGTGAGAGACCTTTTGTGGCTAGATGAGGAAGCCATGGAGCAAGGGG

3790 3800 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870
AY421765 TGTCTGATTACATCAAGGGACTTGGTGTGCTTTGGCACAGGATTTACTGACGCGGTTCCAGAGAAGTTGAGGCCCTGAAGAACCCT
ET1080 TGTCTGATTACATCAAGGGACTTGGTGTGCTTTGGCACAGGATTTACTGACGCGGTTCCAGAGAAGTTGAGGCCCTGAAGAACCCT
Parker TGTCTGATTACATCAAGGGACTTGGTGTGCTTTGGCACAGGATTTACTGACGCGGTTCCAGAGAAGTTGAGGCCCTGAAGAACCCT
USSR TGTCTGATTACATCAAGGGACTTGGTGTGCTTTGGCACAGGATTTACTGACGCGGTTCCAGAGAAGTTGAGGCCCTGAAGAACCCT
275/58 TGTCTGATTACATCAAGGGACTTGGTGTGCTTTGGCACAGGATTTACTGACGCGGTTCCAGAGAAGTTGAGGCCCTGAAGAACCCT

3880 3890 3900 3910 3920 3930 3940 3950 3960
AY421765 TAATCGGGTCTGAGGGTGTGTGGAGAAGATCCTCAAAAACCTGGTGAAGCTTATTCCGCACTTGTATCGTCATTAGGAGTGATTATG
ET1080 TAATCGGGTCTGAGGGTGTGTGGAGAAGATCCTCAAAAACCTGGTGAAGCTTATTCCGCACTTGTATCGTCATTAGGAGTGATTATG
Parker TAATCGGGTCTGAGGGTGTGTGGAGAAGATCCTCAAAAACCTGGTGAAGCTTATTCCGCACTTGTATCGTCATTAGGAGTGATTATG
USSR TAATCGGGTCTGAGGGTGTGTGGAGAAGATCCTCAAAAACCTGGTGAAGCTTATTCCGCACTTGTATCGTCATTAGGAGTGATTATG
275/58 TAATCGGGTCTGAGGGTGTGTGGAGAAGATCCTCAAAAACCTGGTGAAGCTTATTCCGCACTTGTATCGTCATTAGGAGTGATTATG

3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050
AY421765 ATATGGTACATTGACAGCAACTCGCCCTGATTGGATGTCGCGGAAGCCCGTGGGCTGGATTAATCAAAAACAGCATCCATCCTGG
ET1080 ATATGGTACATTGACAGCAACTCGCCCTGATTGGATGTCGCGGAAGCCCGTGGGCTGGATTAATCAAAAACAGCATCCATCCTGG
Parker ATATGGTACATTGACAGCAACTCGCCCTGATTGGATGTCGCGGAAGCCCGTGGGCTGGATTAATCAAAAACAGCATCCATCCTGG
USSR ATATGGTACATTGACAGCAACTCGCCCTGATTGGATGTCGCGGAAGCCCGTGGGCTGGATTAATCAAAAACAGCATCCATCCTGG
275/58 ATATGGTACATTGACAGCAACTCGCCCTGATTGGATGTCGCGGAAGCCCGTGGGCTGGATTAATCAAAAACAGCATCCATCCTGG

4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130 4140
AY421765 GCATTCCAATGGCCAGAAGCAGGGTGTACTTGGTTGAAGAAGTTCAACGACATGGCAAATGCTGCAAAGGGCTCGAGTGGATCTCTA
ET1080 GCATTCCAATGGCCAGAAGCAGGGTGTACTTGGTTGAAGAAGTTCAACGACATGGCAAATGCTGCAAAGGGCTCGAGTGGATCTCTA
Parker GCATTCCAATGGCCAGAAGCAGGGTGTACTTGGTTGAAGAAGTTCAACGACATGGCAAATGCTGCAAAGGGCTCGAGTGGATCTCTA
USSR GCATTCCAATGGCCAGAAGCAGGGTGTACTTGGTTGAAGAAGTTCAACGACATGGCAAATGCTGCAAAGGGCTCGAGTGGATCTCTA
275/58 GCATTCCAATGGCCAGAAGCAGGGTGTACTTGGTTGAAGAAGTTCAACGACATGGCAAATGCTGCAAAGGGCTCGAGTGGATCTCTA

4150 4160 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230
AY421765 ACAAAATCAGCAAGTTTCATCGATTGGCTCAAGGAAAAGATAATCCAGCCGCAAAAAGAAAGTTGAGTTTTTGAACAATTTGAAGCAAC
ET1080 ACAAAATCAGCAAGTTTCATCGATTGGCTCAAGGAAAAGATAATCCAGCCGCAAAAAGAAAGTTGAGTTTTTGAACAATTTGAAGCAAC
Parker ACAAAATCAGCAAGTTTCATCGATTGGCTCAAGGAAAAGATAATCCAGCCGCAAAAAGAAAGTTGAGTTTTTGAACAATTTGAAGCAAC
USSR ACAAAATCAGCAAGTTTCATCGATTGGCTCAAGGAAAAGATAATCCAGCCGCAAAAAGAAAGTTGAGTTTTTGAACAATTTGAAGCAAC
275/58 ACAAAATCAGCAAGTTTCATCGATTGGCTCAAGGAAAAGATAATCCAGCCGCTGCAAGGAAAAGTTGAGTTTTTGAACAATTTGAAGCAAC

4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320
AY421765 TTCCCTTACTGGAAAACCAATCTCCAACCTGGAAACAATCAGCTGCCTCGCAAGAAGACCTTGAGGCAATGTTTGGTAATGTGTCGTATC
ET1080 TTCCCTTACTGGAAAACCAATCTCCAACCTGGAAACAATCAGCTGCCTCGCAAGAAGACCTTGAGGCAATGTTTGGTAATGTGTCGTATC
Parker TTCCCTTACTGGAAAACCAATCTCCAACCTGGAAACAATCAGCTGCCTCGCAAGAAGACCTTGAGGCAATGTTTGGTAATGTGTCGTATC
USSR TTCCCTTACTGGAAAACCAATCTCCAACCTGGAAACAATCAGCTGCCTCGCAAGAAGACCTTGAGGCAATGTTTGGTAATGTGTCGTATC
275/58 TTCCCTTACTGGAAAACCAATCTCCAACCTGGAAACAATCAGCTGCCTCGCAAGAAGACCTTGAGGCAATGTTTGGTAATGTGTCGTATC

4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400 4410
AY421765 TTGCCCATTTCTGCCGCAAAATTTCAACCATTATATGCGACAGAAGCTAAAAGGGTATATGCTTTAGAAAAGAGGATGAACAACACATACATGC
ET1080 TTGCCCATTTCTGCCGCAAAATTTCAACCATTATATGCGACAGAAGCTAAAAGGGTATATGCTTTAGAAAAGAGGATGAACAACACATACATGC
Parker TTGCCCATTTCTGCCGCAAAATTTCAACCATTATATGCGACAGAAGCTAAAAGGGTATATGCTTTAGAAAAGAGGATGAACAACACATACATGC
USSR TTGCCCATTTCTGCCGCAAAATTTCAACCATTATATGCGACAGAAGCTAAAAGGGTATATGCTTTAGAAAAGAGGATGAACAACACATACATGC
275/58 TTGCCCATTTCTGCCGCAAAATTTCAACCATTATATGCGACAGAAGCTAAAAGGGTATATGCTTTAGAAAAGAGGATGAACAACACATACATGC

4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500
AY421765 AGTTCAAGAGCAAACACCGTATTGAACCTGTATGTTAATCATCAGAGGCTCCCCAGGCACGGGTAAGTCACCTTGCCACAGGCATCATTG
ET1080 AGTTCAAGAGCAAACACCGTATTGAACCTGTATGTTAATCATCAGAGGCTCCCCAGGCACGGGTAAGTCACCTTGCCACAGGCATCATTG
Parker AGTTCAAGAGCAAACACCGTATTGAACCTGTATGTTAATCATCAGAGGCTCCCCAGGCACGGGTAAGTCACCTTGCCACAGGCATCATTG
USSR AGTTCAAGAGCAAACACCGTATTGAACCTGTATGTTAATCATCAGAGGCTCCCCAGGCACGGGTAAGTCACCTTGCCACAGGCATCATTG
275/58 AGTTCAAGAGCAAACACCGTATTGAACCTGTATGTTAATCATCAGAGGCTCCCCAGGCACGGGTAAGTCACCTTGCCACAGGCATCATTG

4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590
AY421765 CTAGGGCCATTGCTGATAAATACCCTCTAGTGTCTACTCCTCCGCCAGATCCAGATCCTTTGACGGGTACAAAACAGCAAGTTGTCA
ET1080 CTAGGGCCATTGCTGATAAATACCCTCTAGTGTCTACTCCTCCGCCAGATCCAGATCCTTTGACGGGTACAAAACAGCAAGTTGTCA
Parker CTAGGGCCATTGCTGATAAATACCCTCTAGTGTCTACTCCTCCGCCAGATCCAGATCCTTTGACGGGTACAAAACAGCAAGTTGTCA
USSR CTAGGGCCATTGCTGATAAATACCCTCTAGTGTCTACTCCTCCGCCAGATCCAGATCCTTTGACGGGTACAAAACAGCAAGTTGTCA
275/58 CTAGGGCCATTGCTGATAAATACCCTCTAGTGTCTACTCCTCCGCCAGATCCAGATCCTTTGACGGGTACAAAACAGCAAGTTGTCA

4600 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680
AY421765 CTGTCAATGGATGATCTCTGCCAAAATCCAGATGGGAAAGACATGTCTCTGTTCTGTCAAATGGTTTCCACTGTAGACTTCATTCCGCCCA
ET1080 CTGTCAATGGATGATCTCTGCCAAAATCCAGATGGGAAAGACATGTCTCTGTTCTGTCAAATGGTTTCCACTGTAGACTTCATTCCGCCCA
Parker CTGTCAATGGATGATCTCTGCCAAAATCCAGATGGGAAAGACATGTCTCTGTTCTGTCAAATGGTTTCCACTGTAGACTTCATTCCGCCCA
USSR CTGTCAATGGATGATCTCTGCCAAAATCCAGATGGGAAAGACATGTCTCTGTTCTGTCAAATGGTTTCCACTGTAGACTTCATTCCGCCCA
275/58 CTGTCAATGGATGATCTCTGCCAAAATCCAGATGGGAAAGACATGTCTCTGTTCTGTCAAATGGTTTCCACTGTAGACTTCATTCCGCCCA

4690 4700 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770
AY421765 TGGCCTCCTTGGAAAGAGAAAGGAGTGTCAATTCACCTCCAAGTTCGTTATAGCATCAACTAATGCCAGCAACATCATAGTTCCAACAGTGT
ET1080 TGGCCTCCTTGGAAAGAGAAAGGAGTGTCAATTCACCTCCAAGTTCGTTATAGCATCAACTAATGCCAGCAACATCATAGTTCCAACAGTGT
Parker TGGCCTCCTTGGAAAGAGAAAGGAGTGTCAATTCACCTCCAAGTTCGTTATAGCATCAACTAATGCCAGCAACATCATAGTTCCAACAGTGT
USSR TGGCCTCCTTGGAAAGAGAAAGGAGTGTCAATTCACCTCCAAGTTCGTTATAGCATCAACTAATGCCAGCAACATCATAGTTCCAACAGTGT
275/58 TGGCCTCCTTGGAAAGAGAAAGGAGTGTCAATTCACCTCCAAGTTCGTTATAGCATCAACTAATGCCAGCAACATCATAGTTCCAACAGTGT

4780 4790 4800 4810 4820 4830 4840 4850 4860
AY421765 CAGACTCCGACGCCATCCGTAGGCGATTCTTTATGGACTGTGACATCGAAGTACTGATTCTTATAAGACAGACTTGGGCAGGCTTGATG
ET1080 CAGACTCCGACGCCATCCGTAGGCGATTCTTTATGGACTGTGACATCGAAGTACTGATTCTTATAAGACAGACTTGGGCAGGCTTGATG
Parker CAGACTCCGACGCCATCCGTAGGCGATTCTTTATGGACTGTGACATCGAAGTACTGATTCTTATAAGACAGACTTGGGCAGGCTTGATG
USSR CAGACTCCGACGCCATCCGTAGGCGATTCTTTATGGACTGTGACATCGAAGTACTGATTCTTATAAGACAGACTTGGGCAGGCTTGATG
275/58 CAGACTCCGACGCCATCCGTAGGCGATTCTTTATGGACTGTGACATCGAAGTACTGATTCTTATAAGACAGACTTGGGCAGGCTTGATG

4870 4880 4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950
AY421765 CTGGAAGGGCTGCCAAATTTGTGCTCAGAAAACAACACCCGCTAACTTTAAAAGATGTAGTCCACTAGTATGTGGGAAAGCTATCCAATTGA
ET1080 CTGGAAGGGCTGCCAAATTTGTGCTCAGAAAACAACACCCGCTAACTTTAAAAGATGTAGTCCACTAGTATGTGGGAAAGCTATCCAATTGA
Parker CTGGAAGGGCTGCCAAATTTGTGCTCAGAAAACAACACCCGCTAACTTTAAAAGATGTAGTCCACTAGTATGTGGGAAAGCTATCCAATTGA
USSR CTGGAAGGGCTGCCAAATTTGTGCTCAGAAAACAACACCCGCTAACTTTAAAAGATGTAGTCCACTAGTATGTGGGAAAGCTATCCAATTGA
275/58 CTGGAAGGGCTGCCAAATTTGTGCTCAGAAAACAACACCCGCTAACTTTAAAAGATGTAGTCCACTAGTATGTGGGAAAGCTATCCAATTGA

4960 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040
AY421765 GAGATAGGAAATCCAAGTTCGGTATAGTGTGGACACAGTAATTCAGAGCTTATTAGAGAATACAATAATAGATCAGCTATTGGGAACA
ET1080 GAGATAGGAAATCCAAGTTCGGTATAGTGTGGACACAGTAATTCAGAGCTTATTAGAGAATACAATAATAGATCAGCTATTGGGAACA
Parker GAGATAGGAAATCCAAGTTCGGTATAGTGTGGACACAGTAATTCAGAGCTTATTAGAGAATACAATAATAGATCAGCTATTGGGAACA
USSR GAGATAGGAAATCCAAGTTCGGTATAGTGTGGACACAGTAATTCAGAGCTTATTAGAGAATACAATAATAGATCAGCTATTGGGAACA
275/58 GAGATAGGAAATCCAAGTTCGGTATAGTGTGGACACAGTAATTCAGAGCTTATTAGAGAATACAATAATAGATCAGCTATTGGGAACA

5050 5060 5070 5080 5090 5100 5110 5120 5130

AY421765 CCATAGAAGCACTATTTTCAGGGACCCCAAAAATTTAGACCTATTAGAATTAGCCTCGAGGAAAAGCCCGCACCTGATGCCATTAGTGACT
ET1080 CCATAGAAGCACTATTTTCAGGGACCCCAAAAATTTAGACCTATTAGAATTAGCCTCGAGGAAAAGCCCGCACCTGATGCCATTAGTGACT
Parker CCATAGAAGCACTATTTTCAGGGACCCCAAAAATTTAGACCTATTAGAATTAGCCTCGAGGAAAAGCCCGCACCTGATGCCATTAGTGACT
USSR CCATAGAAGCACTATTTTCAGGGACCCCAAAAATTTAGACCTATTAGAATTAGCCTCGAGGAAAAGCCCGCACCTGATGCCATTAGTGACT
275/58 CCATAGAAGCACTATTTTCAGGGACCCCAAAAATTTAGACCTATTAGAATTAGCCTCGAGGAAAAGCCCGCACCTGATGCCATTAGTGACT

5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200 5210 5220
AY421765 TACTTGTAGTGTGATAGTGAGGAAGTTCGGCAATATTGCAGGGACCAGGGGTGGATAATACTGAAACCCCTACAAATGTGGAGCGCC
ET1080 TACTTGTAGTGTGATAGTGAGGAAGTTCGGCAATATTGCAGGGACCAGGGGTGGATAATACTGAAACCCCTACAAATGTGGAGCGCC
Parker TACTTGTAGTGTGATAGTGAGGAAGTTCGGCAATATTGCAGGGACCAGGGGTGGATAATACTGAAACCCCTACAAATGTGGAGCGCC
USSR TACTTGTAGTGTGATAGTGAGGAAGTTCGGCAATATTGCAGGGACCAGGGGTGGATAATACTGAAACCCCTACAAATGTGGAGCGCC
275/58 TACTTGTAGTGTGATAGTGAGGAAGTTCGGCAATATTGCAGGGACCAGGGGTGGATAATACTGAAACCCCTACAAATGTGGAGCGCC

5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300 5310
AY421765 ATCTAAATAGGGCTGTTCTTGTAAATGCAGTCAATTGCTACGGTGTGGCAGTAGTGTCTCTTGTCTATGTTATCTACAAGCTCTTTGCAG
ET1080 ATCTAAATAGGGCTGTTCTTGTAAATGCAGTCAATTGCTACGGTGTGGCAGTAGTGTCTCTTGTCTATGTTATCTACAAGCTCTTTGCAG
Parker ATCTAAATAGGGCTGTTCTTGTAAATGCAGTCAATTGCTACGGTGTGGCAGTAGTGTCTCTTGTCTATGTTATCTACAAGCTCTTTGCAG
USSR ATCTAAATAGGGCTGTTCTTGTAAATGCAGTCAATTGCTACGGTGTGGCAGTAGTGTCTCTTGTCTATGTTATCTACAAGCTCTTTGCAG
275/58 ATCTAAATAGGGCTGTTCTTGTAAATGCAGTCAATTGCTACGGTGTGGCAGTAGTGTCTCTTGTCTATGTTATCTACAAGCTCTTTGCAG

5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400
AY421765 GCTTCCAGGGTGTCTTATTCTGGCGCACCAAGCAGGTGTTGAAGAGACCGGTACTGAGGACCCCACTGTGCAAGGGCCGAGTCTTGACT
ET1080 GCTTCCAGGGTGTCTTATTCTGGCGCACCAAGCAGGTGTTGAAGAGACCGGTACTGAGGACCCCACTGTGCAAGGGCCGAGTCTTGACT
Parker GCTTCCAGGGTGTCTTATTCTGGCGCACCAAGCAGGTGTTGAAGAGACCGGTACTGAGGACCCCACTGTGCAAGGGCCGAGTCTTGACT
USSR GCTTCCAGGGTGTCTTATTCTGGCGCACCAAGCAGGTGTTGAAGAGACCGGTACTGAGGACCCCACTGTGCAAGGGCCGAGTCTTGACT
275/58 GCTTCCAGGGTGTCTTATTCTGGCGCACCAAGCAGGTGTTGAAGAGACCGGTACTGAGGACCCCACTGTGCAAGGGCCGAGTCTTGACT

5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490
AY421765 TTGCTCTTTCCCTTCTGCGTAGGAACATCAAAACAAGCTCAGACTGATCAAGGTCATTTCACTATGTTGGGTATTCGCGATCGACTGGCCA
ET1080 TTGCTCTTTCCCTTCTGCGTAGGAACATCAAAACAAGCTCAGACTGATCAAGGTCATTTCACTATGTTGGGTATTCGCGATCGACTGGCCA
Parker TTGCTCTTTCCCTTCTGCGTAGGAACATCAAAACAAGCTCAGACTGATCAAGGTCATTTCACTATGTTGGGTATTCGCGATCGACTGGCCA
USSR TTGCTCTTTCCCTTCTGCGTAGGAACATCAAAACAAGCTCAGACTGATCAAGGTCATTTCACTATGTTGGGTATTCGCGATCGACTGGCCA
275/58 TTGCTCTTTCCCTTCTGCGTAGGAACATCAAAACAAGCTCAGACTGATCAAGGTCATTTCACTATGTTGGGTATTCGCGATCGACTGGCCA

5500 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580
AY421765 TCTTGC CGCGTCATGCACAACCAGGAAAGACCATTGGGTTGAACACAAACTGGTCAATGCTTTAGATCGCGTCGAGTTGGTTGATGAAC
ET1080 TCTTGC CGCGTCATGCACAACCAGGAAAGACCATTGGGTTGAACACAAACTGGTCAATGCTTTAGATCGCGTCGAGTTGGTTGATGAAC
Parker TCTTGC CGCGTCATGCACAACCAGGAAAGACCATTGGGTTGAACACAAACTGGTCAATGCTTTAGATCGCGTCGAGTTGGTTGATGAAC
USSR TCTTGC CGCGTCATGCACAACCAGGAAAGACCATTGGGTTGAACACAAACTGGTCAATGCTTTAGATCGCGTCGAGTTGGTTGATGAAC
275/58 TCTTGC CGCGTCATGCACAACCAGGAAAGACCATTGGGTTGAACACAAACTGGTCAATGCTTTAGATCGCGTCGAGTTGGTTGATGAAC

5590 5600 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670
AY421765 AAGGAGTTAATCTAGAACTCACCTTAGTCACCTTGGATACCAATGAGAAAATTTAGAGATATCACTAAGTTTATCCAGAGGTAATAAGCG
ET1080 AAGGAGTTAATCTAGAACTCACCTTAGTCACCTTGGATACCAATGAGAAAATTTAGAGATATCACTAAGTTTATCCAGAGGTAATAAGCG
Parker AAGGAGTTAATCTAGAACTCACCTTAGTCACCTTGGATACCAATGAGAAAATTTAGAGATATCACTAAGTTTATCCAGAGGTAATAAGCG
USSR AAGGAGTTAATCTAGAACTCACCTTAGTCACCTTGGATACCAATGAGAAAATTTAGAGATATCACTAAGTTTATCCAGAGGTAATAAGCG
275/58 AAGGAGTTAATCTAGAACTCACCTTAGTCACCTTGGATACCAATGAGAAAATTTAGAGATATCACTAAGTTTATCCAGAGGTAATAAGCG

5680 5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760
AY421765 GAGCTAGTGATGCAACCTTAGTGATCAATACTGAGCACATGCCATCTATGTTCTGACCTGTGGGTGACGTGGTGCAATACGGGTTCTTAA
ET1080 GAGCTAGTGATGCAACCTTAGTGATCAATACTGAGCACATGCCATCTATGTTCTGACCTGTGGGTGACGTGGTGCAATACGGGTTCTTAA
Parker GAGCTAGTGATGCAACCTTAGTGATCAATACTGAGCACATGCCATCTATGTTCTGACCTGTGGGTGACGTGGTGCAATACGGGTTCTTAA
USSR GAGCTAGTGATGCAACCTTAGTGATCAATACTGAGCACATGCCATCTATGTTCTGACCTGTGGGTGACGTGGTGCAATACGGGTTCTTAA
275/58 GAGCTAGTGATGCAACCTTAGTGATCAATACTGAGCACATGCCATCTATGTTCTGACCTGTGGGTGACGTGGTGCAATACGGGTTCTTAA

5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840 5850
AY421765 ATCTTAGTGGTAAACCTACCCACAGAACCATGATGTACAACCTTCCCACAAAAGCGGGCCAGTGTGGTGGTGTGGTTACCTCAGTAGGGA
ET1080 ATCTTAGTGGTAAACCTACCCACAGAACCATGATGTACAACCTTCCCACAAAAGCGGGCCAGTGTGGTGGTGTGGTTACCTCAGTAGGGA
Parker ATCTTAGTGGTAAACCTACCCACAGAACCATGATGTACAACCTTCCCACAAAAGCGGGCCAGTGTGGTGGTGTGGTTACCTCAGTAGGGA
USSR ATCTTAGTGGTAAACCTACCCACAGAACCATGATGTACAACCTTCCCACAAAAGCGGGCCAGTGTGGTGGTGTGGTTACCTCAGTAGGGA
275/58 ATCTTAGTGGTAAACCTACCCACAGAACCATGATGTACAACCTTCCCACAAAAGCGGGCCAGTGTGGTGGTGTGGTTACCTCAGTAGGGA

5860 5870 5880 5890 5900 5910 5920 5930 5940
AY421765 AAATTATTGGAATCCACATTGGTGGGAATGGACGCCAGGGGTTCTGTGCAGGCTGAAAAGAGGCTATTTTGTAAAGTGAGCAAGGGGAAA
ET1080 AAATTATTGGAATCCACATTGGTGGGAATGGACGCCAGGGGTTCTGTGCAGGCTGAAAAGAGGCTATTTTGTAAAGTGAGCAAGGGGAAA
Parker AAATTATTGGAATCCACATTGGTGGGAATGGACGCCAGGGGTTCTGTGCAGGCTGAAAAGAGGCTATTTTGTAAAGTGAGCAAGGGGAAA
275/58 AAATTATTGGAATCCACATTGGTGGGAATGGACGCCAGGGGTTCTGTGCAGGCTGAAAAGAGGCTATTTTGTAAAGTGAGCAAGGGGAAA

USSR AAATTATTGGAATCCACATTGGTGGGAATGGACGCCAGGGGTTCTGTGCAGGTCTGAAAAGAGGCTATTTTGTAAGTGAGCAAGGGGAAA
275/58 AGATCATCGGATCCACATTGGTGGGAATGGTCGTCAGGCTTCTGTGCTGGTTGAAAGAGGAGTTATTTTGCAGTGAAACAGGGAGAA

5950 5960 5970 5980 5990 6000 6010 6020 6030
AY421765 TTCAGTGGATGAAGCCCAATAAGGAGACTGGCAGGTTGAACATCAATGGGCCACCCGCACAAAACCTGAACCCAGTGTGTTCTATGATG
ET1080 TTCAGTGGATGAAGCCCAATAAGGAGACTGGCAGGTTGAACATCAATGGGCCACCCGCACAAAACCTGAACCCAGTGTGTTCTATGATG
Parker TTCAGTGGATGAAGCCCAATAAGGAGACTGGCAGGTTGAACATCAATGGGCCACCCGCACAAAACCTGAACCCAGTGTGTTCTATGATG
USSR TTCAGTGGATGAAGCCCAATAAGGAGACTGGCAGGTTGAACATCAATGGGCCACCCGCACAAAACCTGAACCCAGTGTGTTCTATGATG
275/58 TTCAATGGATGAAGCCCAACAAAGAACTGGGAGGTTGAACATCAACGGTCCACCCGACTAAACTGGAGCCAGTGTGTTCCATGATG

6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100 6110 6120
AY421765 TATTTGAGGGTAAACAAGGAGCCAGCTGTCTTACTAGTAAAGATCCCAGACTAGAGGTAGACTTTGAACAAGCCTTGTCTTCTAAATACG
ET1080 TATTTGAGGGTAAACAAGGAGCCAGCTGTCTTACTAGTAAAGATCCCAGACTAGAGGTAGACTTTGAACAAGCCTTGTCTTCTAAATACG
Parker TATTTGAGGGTAAACAAGGAGCCAGCTGTCTTACTAGTAAAGATCCCAGACTAGAGGTAGACTTTGAACAAGCCTTGTCTTCTAAATACG
USSR TATTTGAGGGTAAACAAGGAGCCAGCTGTCTTACTAGTAAAGATCCCAGACTAGAGGTAGACTTTGAACAAGCCTTGTCTTCTAAATACG
275/58 TTTTCAGGGGCAACAAGGAGCCAGCTGTCTTACTAGTAAAGATCCAGGTTAGAGGTGACTTTGAGCAGGCCCTATTTCTAAATACG

6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200 6210
AY421765 TGGGAAATGTACTGCACGAACCTGATGAGTACGTGACCCAGGAGCAGCTACATTATGCTAATCAATTGAAGCAGCTGGACATCAATACCA
ET1080 TGGGAAATGTACTGCACGAACCTGATGAGTACGTGACCCAGGAGCAGCTACATTATGCTAATCAATTGAAGCAGCTGGACATCAATACCA
Parker TGGGAAATGTACTGCACGAACCTGATGAGTACGTGACCCAGGAGCAGCTACATTATGCTAATCAATTGAAGCAGCTGGACATCAATACCA
USSR TGGGAAATGTACTGCACGAACCTGATGAGTACGTGACCCAGGAGCAGCTACATTATGCTAATCAATTGAAGCAGCTGGACATCAATACCA
275/58 TTGGTAAACACACTACATGAACCTGATGAGTATGTAACCCAGGCCCTTCATTAGCNAACAGTTGAAGCAGCTGGACATCAATACCTA

6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300
AY421765 ACAAGATGAGCATGGAGGAAGCGTGTCTATGGCACTGAAAATTTAGAAGCTATTGACCTCCACACTAGTGTCTGGTTACCCATACAGTACGC
ET1080 ACAAGATGAGCATGGAGGAAGCGTGTCTATGGCACTGAAAATTTAGAAGCTATTGACCTCCACACTAGTGTCTGGTTACCCATACAGTACGC
Parker ACAAGATGAGCATGGAGGAAGCGTGTCTATGGCACTGAAAATTTAGAAGCTATTGACCTCCACACTAGTGTCTGGTTACCCATACAGTACGC
USSR ACAAGATGAGCATGGAGGAAGCGTGTCTATGGCACTGAAAATTTAGAAGCTATTGACCTCCACACTAGTGTCTGGTTACCCATACAGTACGC
275/58 GCAAGATGAGTATGGAGGAAGCTATGTTATGGAAGCTGTAATCAGAAAGCATTGACTTACACTAGTGTCTGGTTACCCATACAGTACCTT

6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390
AY421765 TGGGTATCAAGAAGAGGGACATCCTTGATCCAAGTACTAGAGATGTTTCTAAAATGAAGCTTTACCTGGACAATATGGCCTAGATCTAC
ET1080 TGGGTATCAAGAAGAGGGACATCCTTGATCCAAGTACTAGAGATGTTTCTAAAATGAAGCTTTACCTGGACAATATGGCCTAGATCTAC
Parker TGGGTATCAAGAAGAGGGACATCCTTGATCCAAGTACTAGAGATGTTTCTAAAATGAAGCTTTACCTGGACAATATGGCCTAGATCTAC
USSR TGGGTATCAAGAAGAGGGACATCCTTGATCCAAGTACTAGAGATGTTTCTAAAATGAAGCTTTACCTGGACAATATGGCCTAGATCTAC
275/58 TGGCATTAAAGAAGAGGGACATCCTTGATCCGGTACCAGAGATATCCAAATGAAGTTCTACTGGACAATATGGATGGATATAC

6400 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480
AY421765 CTTACTCCACTTATGTGAAAGATGAGCTTAGATCACTAGACAAAATCAAGAAAGGGAAGTCCCGCCTGATTGAAGCCAGTAGTCTAAATG
ET1080 CTTACTCCACTTATGTGAAAGATGAGCTTAGATCACTAGACAAAATCAAGAAAGGGAAGTCCCGCCTGATTGAAGCCAGTAGTCTAAATG
Parker CTTACTCCACTTATGTGAAAGATGAGCTTAGATCACTAGACAAAATCAAGAAAGGGAAGTCCCGCCTGATTGAAGCCAGTAGTCTAAATG
USSR CTTACTCCACTTATGTGAAAGATGAGCTTAGATCACTAGACAAAATCAAGAAAGGGAAGTCCCGCCTGATTGAAGCCAGTAGTCTAAATG
275/58 CTTACTCCACTTATGTGAAAGATGAGCTTAGATCCCTAGATCCCTAGACAAAATCAAGAAAGGGAAGTCCCGCCTGATTGAAGCCAGTAGTCTAAATG

6490 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570
AY421765 ATTCTGTTTACCTTAGAATGACTTTTGGCCATCTGTATGAGGTGTTTTCATGCCAACCCAGGGACGGTAACCGGTTACGACAGTAGGTTGTA
ET1080 ATTCTGTTTACCTTAGAATGACTTTTGGCCATCTGTATGAGGTGTTTTCATGCCAACCCAGGGACGGTAACCGGTTACGACAGTAGGTTGTA
Parker ATTCTGTTTACCTTAGAATGACTTTTGGCCATCTGTATGAGGTGTTTTCATGCCAACCCAGGGACGGTAACCGGTTACGACAGTAGGTTGTA
USSR ATTCTGTTTACCTTAGAATGACTTTTGGCCATCTGTATGAGGTGTTTTCATGCCAACCCAGGGACGGTAACCGGTTACGACAGTAGGTTGTA
275/58 ATTCTGTTTACCTCAGATGACTTTTGGCAACTTATGAAGTGTTCACGCCAACCCAGGAACTTAACCTGGGTCAGCTGTGGGTGTA

6580 6590 6600 6610 6620 6630 6640 6650 6660
AY421765 ATCCAGACGTGTTTGGAGTAAACTCCCAGTTTGTCTCCAGGGTCGCTCTTTGCATTTGACTATTTCAGGATATGACGCTAGTCTTAGTCT
ET1080 ATCCAGACGTGTTTGGAGTAAACTCCCAGTTTGTCTCCAGGGTCGCTCTTTGCATTTGACTATTTCAGGATATGACGCTAGTCTTAGTCT
Parker ATCCAGACGTGTTTGGAGTAAACTCCCAGTTTGTCTCCAGGGTCGCTCTTTGCATTTGACTATTTCAGGATATGACGCTAGTCTTAGTCT
USSR ATCCAGACGTGTTTGGAGTAAACTCCCAGTTTGTCTCCAGGGTCGCTCTTTGCATTTGACTATTTCAGGATATGACGCTAGTCTTAGTCT
275/58 ACCCTGATGTGTTCTGGAGTAAATCCCAATCTGCTACCGGGTCGCTCTTTGCATTTGACTATTTCAGGATATGACGCTAGTCTTAGTCT

6670 6680 6690 6700 6710 6720 6730 6740 6750
AY421765 CTGTGTGGTTTAGAGCTTTAGAAAATAGTCTCGGGAGGTCGGTTACTCAGAGGAAGCAGTGTCTCTTATAGAGGGAATCAACCACACCC
ET1080 CTGTGTGGTTTAGAGCTTTAGAAAATAGTCTCGGGAGGTCGGTTACTCAGAGGAAGCAGTGTCTCTTATAGAGGGAATCAACCACACCC
Parker CTGTGTGGTTTAGAGCTTTAGAAAATAGTCTCGGGAGGTCGGTTACTCAGAGGAAGCAGTGTCTCTTATAGAGGGAATCAACCACACCC
USSR CTGTGTGGTTTAGAGCTTTAGAAAATAGTCTCGGGAGGTCGGTTACTCAGAGGAAGCAGTGTCTCTTATAGAGGGAATCAACCACACCC
275/58 CTGTGTGGTTTAGAGCTTTGAAGTGTCTTACGAGAGTTGGTTACCAGAGGAAGCTGTGCTCTTATAGAGGGAATCAACCACACCC

6760 6770 6780 6790 6800 6810 6820 6830 6840
AY421765 ACCACGTGTACCGCAACAAGACCTATTGTGTTCTTGGTGGGATGCCTCAGGCTGTTTCAGGCACCTCTATCTTCAATTCAATGATCAATA
ET1080 ACCACGTGTACCGCAACAAGACCTATTGTGTTCTTGGTGGGATGCCTCAGGCTGTTTCAGGCACCTCTATCTTCAATTCAATGATCAATA
Parker ACCACGTGTACCGCAACAAGACCTATTGTGTTCTTGGTGGGATGCCTCAGGCTGTTTCAGGCACCTCTATCTTCAATTCAATGATCAATA
USSR ACCACGTGTACCGCAACAAGACCTATTGTGTTCTTGGTGGGATGCCTCAGGCTGTTTCAGGCACCTCTATCTTCAATTCAATGATCAATA
275/58 ATCACGTGTACCGCAACAAGACCTATTGTGTTCTTGGTGGGATGCCTCAGGCTGTTTCAGGCACCTCTATCTTCAATTCAATGATCAATA

6850 6860 6870 6880 6890 6900 6910 6920 6930
AY421765 ATATAATTATTAGAACCCTCTTGATCAAGACGTTTAAAGGGATAGACCTTGATGAGTTGAATATGGTGGCATAACGGAGATGATGTATTAG
ET1080 ATATAATTATTAGAACCCTCTTGATCAAGACGTTTAAAGGGATAGACCTTGATGAGTTGAATATGGTGGCATAACGGAGATGATGTATTAG
Parker ATATAATTATTAGAACCCTCTTGATCAAGACGTTTAAAGGGATAGACCTTGATGAGTTGAATATGGTGGCATAACGGAGATGATGTATTAG
USSR ATATAATTATTAGAACCCTCTTGATCAAGACGTTTAAAGGGATAGACCTTGATGAGTTGAATATGGTGGCATAACGGAGATGATGTATTAG
275/58 ACATAATTATTAGAACCCTCTTGATCAAGACGTTTAAAGGGATAGACCTTGATGAGTTGAATATGGTGGCATAACGGAGATGATGTATTAG

6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000 7010 7020
AY421765 CTAGCTACCTTTTCCATTGATTGCTCAGAATTAGCAAAAACAGGTAAGAGTATGGGTTAACTATGACACCAGCTGATAAATCACCT
ET1080 CTAGCTACCTTTTCCATTGATTGCTCAGAATTAGCAAAAACAGGTAAGAGTATGGGTTAACTATGACACCAGCTGATAAATCACCT
Parker CTAGCTACCTTTTCCATTGATTGCTCAGAATTAGCAAAAACAGGTAAGAGTATGGGTTAACTATGACACCAGCTGATAAATCACCT
USSR CTAGCTACCTTTTCCATTGATTGCTCAGAATTAGCAAAAACAGGTAAGAGTATGGGTTAACTATGACACCAGCTGATAAATCACCT
275/58 CAGTTACCCATTTCTTATTGATGTTTGGAGCTGGCAAGAACCGGTAAGGAGTATGGACTAACGATGACACCTGCCGACAAATCACCT

7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100 7110
AY421765 GTTTC AATGAAGTTACCTGGGAAAATGCCACCTTCTGAAAGAGGGGGTTCCTTCCTGATCATCAGTTCCTTTCCATCCACCCACAAA
ET1080 GTTTC AATGAAGTTACCTGGGAAAATGCCACCTTCTGAAAGAGGGGGTTCCTTCCTGATCATCAGTTCCTTTCCATCCACCCACAAA
Parker GTTTC AATGAAGTTACCTGGGAAAATGCCACCTTCTGAAAGAGGGGGTTCCTTCCTGATCATCAGTTCCTTTCCATCCACCCACAAA
USSR GTTTC AATGAAGTTACCTGGGAAAATGCCACCTTCTGAAAGAGGGGGTTCCTTCCTGATCATCAGTTCCTTTCCATCCACCCACAAA
275/58 GTTTC AATGAAGTTACCTGGGAAAATGCCACCTTCTGAAAGAGGGGGTTCCTTCCTGATCATCAGTTCCTTTCCATCCACCCACAAA

7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200
AY421765 TGCCTATGAGAGAAATCCATGAGTCCATACGTTGGACAAAGGATGCACGCAACACCCAAGACCATGTACGCTCTCTTTGTCTGTTGGCAT
ET1080 TGCCTATGAGAGAAATCCATGAGTCCATACGTTGGACAAAGGATGCACGCAACACCCAAGACCATGTACGCTCTCTTTGTCTGTTGGCAT
Parker TGCCTATGAGAGAAATCCATGAGTCCATACGTTGGACAAAGGATGCACGCAACACCCAAGACCATGTACGCTCTCTTTGTCTGTTGGCAT
USSR TGCCTATGAGAGAAATCCATGAGTCCATACGTTGGACAAAGGATGCACGCAACACCCAAGACCATGTACGCTCTCTTTGTCTGTTGGCAT
275/58 TGCCATGAGAGAAATCCATGAGTCCATACGTTGGACAAAGGATGCACGCAACACCCAAGACCATGTACGCTCTCTTTGTCTGTTGGCAT

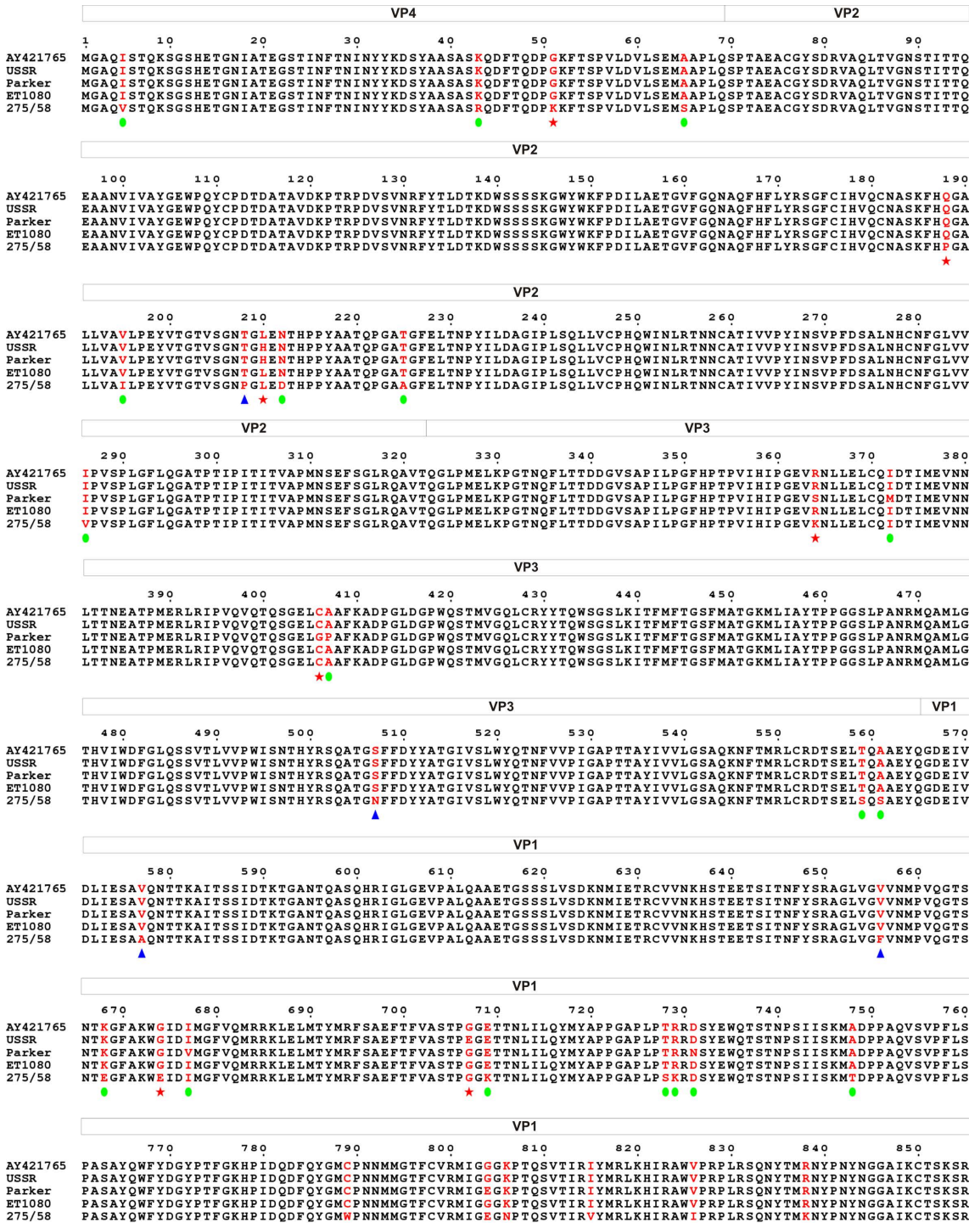
7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290
AY421765 GGCATAATGGGAAGGACGAGTACGAAAAGATTTGTAAGCACAATTAGATCAGTCCCAATTGGAAAAGCGTTAGCTATACCAAATTTTGA
ET1080 GGCATAATGGGAAGGACGAGTACGAAAAGATTTGTAAGCACAATTAGATCAGTCCCAATTGGAAAAGCGTTAGCTATACCAAATTTTGA
Parker GGCATAATGGGAAGGACGAGTACGAAAAGATTTGTAAGCACAATTAGATCAGTCCCAATTGGAAAAGCGTTAGCTATACCAAATTTTGA
USSR GGCATAATGGGAAGGACGAGTACGAAAAGATTTGTAAGCACAATTAGATCAGTCCCAATTGGAAAAGCGTTAGCTATACCAAATTTTGA
275/58 GGCATAATGGGAAGGACGAGTACGAAAAGATTTGTAAGCACAATTAGATCAGTCCCAATTGGAAAAGCGTTAGCTATACCAAATTTTGA

7300 7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380
AY421765 ATTTGAGAAGAAATGGCTTGAATTATTTTAAACCTACAGCTTTGAGCTGAACCCACCAGAAATCTGGTCGTGTTAATGACTGGTGGGG
ET1080 ATTTGAGAAGAAATGGCTTGAATTATTTTAAACCTACAGCTTTGAGCTGAACCCACCAGAAATCTGGTCGTGTTAATGACTGGTGGGG
Parker ATTTGAGAAGAAATGGCTTGAATTATTTTAAACCTACAGCTTTGAGCTGAACCCACCAGAAATCTGGTCGTGTTAATGACTGGTGGGG
USSR ATTTGAGAAGAAATGGCTTGAATTATTTTAAACCTACAGCTTTGAGCTGAACCCACCAGAAATCTGGTCGTGTTAATGACTGGTGGGG
275/58 ATTTGAGAAGAAATGGCTTGAATTATTTTAAACCTACAGCTTTGAGCTGAACCCACCAGAAATCTGGTCGTGTTAATGACTGGTGGGG

7390 7400
AY421765 GTAAATTTGTTATAACCAGAATAGC
ET1080 GTAAATTTGTTATAACCAGAATAGC
Parker GTAAATTTGTTATAACAGAATAGC
USSR GTAAATTTGTTATAACCAGAATAGC
275/58 GTAAATTTGTTATAACCAGAATAGC

Liite 2

Aminohapposekvenssirinnastus neljän sekvensoidon viruksen ja AY421765:n välillä. Rinnastuksessa poikkeavat aminohapot on merkitty punaisella. Vihreällä ympyrällä on merkitty konservoituneet, sinisellä kolmiolla osittain konservoituneet muutokset ja punaisella tähdellä kokonaan muuttuneet aminohapot. Virusgeenit on merkitty aminohapposekvenssin yläpuolelle. Kuva on tehty ESPrift-ohjelmalla, versio 2.1 (Gouet ym. 1999).



VP1 2A

860 870 880 890 900 910 920 930 940 950

AY421765 ATITTLGKFGQQSGAIYVGSYRVVNRHLATHNDWKNLWVEDSSRDLLVSSSTTAQGGCDTIARCDCCQGTGVYCNRRKHYVVSFSKPSFVFVEASEY
 USSR ATITTLGKFGQQSGAIYVGSYRVVNRHLATHNDWKNLWVEDSSKNLLVSSSTTAQGGCDTIARCDCCQGTGVYCNRRKHYVVSFSKPSFVFVEASEY
 Parker ATITTLGKFGQQSGAIYVGSYRVVNRHLATHNDWKNLWVEDSSRDLLVSSSTTAQGGCDTIARCDCCQGTGVYCNRRKHYVVSFSKPSFVFVEASEY
 ET1080 ATITTLGKFGQQSGAIYVGSYRVVNRHLATHNDWKNLWVEDSSRDLLVSSSTTAQGGCDTIARCDCCQGTGVYCNRRKHYVVSFSKPSFVFVEASEY
 275/58 ATITTLGKFGQQSGAIYVGNRYRVVNRHLATHNDWANLWVEDSSRDLLVSSSTTAQGGCDTIARCNCCQGTGVYCNRRKHYVVSFSKPSLIFVEASEY

2A 2B

960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040

AY421765 YPARYQSHLMLAQGHSEPGDCGGILRCQHGVVGIIVSTGGNGLVGFADVRDLLWDEEAMEQGVSDYIKGLGDAFGTGFDAVSRVEALKNHILIG
 USSR YPARYQSHLMLAQGHSEPGDCGGILRCQHGVVGIIVSTGGNGLVGFADVRDLLWDEEAMEQGVSDYIKGLGDAFGTGFDAVSRVEALKNHILIG
 Parker YPARYQSHLMLAQGHSEPGDCGGILRCQHGVVGIIVSTGGNGLVGFADVRDLLWDEEAMEQGVSDYIKGLGDAFGTGFDAVSRVEALKNHILIG
 ET1080 YPARYQSHLMLAQGHSEPGDCGGILRCQHGVVGIIVSTGGNGLVGFADVRDLLWDEEAMEQGVSDYIKGLGDAFGTGFDAVSRVEALKNHILIG
 275/58 YPARYQSHLMLAQGHSEPGDCGGILRCQHGVVGIIVSTGGNGLVGFADVRDLLWDEEAMEQGVSDYIKGLGDAFGTGFDAVSRVEALKNHILIG

2B 2C

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140

AY421765 SEGAVEKILKLNVLKLSALVIVIRSDYDMVTLTATLALIGCRGSPWAWIKSKTASILGIPMAQKQCATWLKFFNDMANAAKGLEWISNKISKFID
 USSR SEGAVEKILKLNVLKLSALVIVIRSDYDMVTLTATLALIGCRGSPWAWIKSKTASILGIPMAQKQCATWLKFFNDMANAAKGLEWISNKISKFID
 Parker SEGAVEKILKLNVLKLSALVIVIRSDYDMVTLTATLALIGCRGSPWAWIKSKTASILGIPMAQKQCATWLKFFNDMANAAKGLEWISNKISKFID
 ET1080 SEGAVEKILKLNVLKLSALVIVIRSDYDMVTLTATLALIGCRGSPWAWIKSKTASILGIPMAQKQCATWLKFFNDMANAAKGLEWISNKISKFID
 275/58 SEGAVEKILKLNVLKLSALVIVIRSDYDMVTLTATLALIGCRGSPWAWIKSKTASILGIPMAQKQCATWLKFFNDMANAAKGLEWISNKISKFID

2C

1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230

AY421765 WLKEKIIPAAKEKVEFLNLLKQLPFLLENQISNLEQSAASQEDLEAMFGNVSYLAHFCKRFQPLYATEAKRVYALEKRMNNYMQFQSKHRIEVPVCL
 USSR WLKEKIIPAAKEKVEFLNLLKQLPFLLENQISNLEQSAASQEDLEAMFGNVSYLAHFCKRFQPLYATEAKRVYALEKRMNNYMQFQSKHRIEVPVCL
 Parker WLKEKIIPAAKEKVEFLNLLKQLPFLLENQISNLEQSAASQEDLEAMFGNVSYLAHFCKRFQPLYATEAKRVYALEKRMNNYMQFQSKHRIEVPVCL
 ET1080 WLKEKIIPAAKEKVEFLNLLKQLPFLLENQISNLEQSAASQEDLEAMFGNVSYLAHFCKRFQPLYATEAKRVYALEKRMNNYMQFQSKHRIEVPVCL
 275/58 WLKEKIIPAAKEKVEFLNLLKQLPFLLENQISNLEQSAASQEDLEAMFGNVSYLAHFCKRFQPLYATEAKRVYALEKRMNNYMQFQSKHRIEVPVCL

2C

1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330

AY421765 IIRGSPGTGKSLATGIARAIADKYHSSVYSLPDPDFDGYKQVVTVMDDLQCNPDGKDMSLFCQMSTVDFIPPMASLEEKGVSTSKFVIA
 USSR IIRGSPGTGKSLATGIARAIADKYHSSVYSLPDPDFDGYKQVVTVMDDLQCNPDGKDMSLFCQMSTVDFIPPMASLEEKGVSTSKFVIA
 Parker IIRGSPGTGKSLATGIARAIADKYHSSVYSLPDPDFDGYKQVVTVMDDLQCNPDGKDMSLFCQMSTVDFIPPMASLEEKGVSTSKFVIA
 ET1080 IIRGSPGTGKSLATGIARAIADKYHSSVYSLPDPDFDGYKQVVTVMDDLQCNPDGKDMSLFCQMSTVDFIPPMASLEEKGVSTSKFVIA
 275/58 IIRGSPGTGKSLATGIARAIADKYHSSVYSLPDPDFDGYKQVVTVMDDLQCNPDGKDMSLFCQMSTVDFIPPMASLEEKGVSTSKFVIA

2C

1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420

AY421765 STNASNIIIVPTVSDSDAIRRRFFMDCDIEVTDYSYKTDLGRLDAGRAAKLCSNNNTANFKRCSPLVCGKAIQLRDRKSKVRYSDVTVISELIREYN
 USSR STNASNIIIVPTVSDSDAIRRRFFMDCDIEVTDYSYKTDLGRLDAGRAAKLCSNNNTANFKRCSPLVCGKAIQLRDRKSKVRYSDVTVISELIREYN
 Parker STNASNIIIVPTVSDSDAIRRRFFMDCDIEVTDYSYKTDLGRLDAGRAAKLCSNNNTANFKRCSPLVCGKAIQLRDRKSKVRYSDVTVISELIREYN
 ET1080 STNASNIIIVPTVSDSDAIRRRFFMDCDIEVTDYSYKTDLGRLDAGRAAKLCSNNNTANFKRCSPLVCGKAIQLRDRKSKVRYSDVTVISELIREYN
 275/58 STNASNIIIVPTVSDSDAIRRRFFMDCDIEVTDYSYKTDLGRLDAGRAAKLCSNNNTANFKRCSPLVCGKAIQLRDRKSKVRYSDVTVISELIREYN

2C 3A

1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520

AY421765 NRSIAIGNTIEALFQGGPKFRPIRISLEEKPADDAISDLLASVDSSEVRQYCRDQGWIIPEPTNVERHNLRAVLVMSIATVAVVSVLVYIYKIL
 USSR NRSIAIGNTIEALFQGGPKFRPIRISLEEKPADDAISDLLASVDSSEVRQYCRDQGWIIPEPTNVERHNLRAVLVMSIATVAVVSVLVYIYKIL
 Parker NRSIAIGNTIEALFQGGPKFRPIRISLEEKPADDAISDLLASVDSSEVRQYCRDQGWIIPEPTNVERHNLRAVLVMSIATVAVVSVLVYIYKIL
 ET1080 NRSIAIGNTIEALFQGGPKFRPIRISLEEKPADDAISDLLASVDSSEVRQYCRDQGWIIPEPTNVERHNLRAVLVMSIATVAVVSVLVYIYKIL
 275/58 NRSIAIGNTIEALFQGGPKFRPIRISLEEKPADDAISDLLASVDSSEVRQYCRDQGWIIPEPTNVERHNLRAVLVMSIATVAVVSVLVYIYKIL

3A 3B 3C

1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610

AY421765 FAGFQGAYSGAPKQVLRKRPVLRATVQGPGLDFALSLLRRNIKAQTDQGHFTMLGIRDRLAIPLRHAQPGKTIWVEHKLNVLDLDAVELVDEQGV
 USSR FAGFQGAYSGAPKQVLRKRPVLRATVQGPGLDFALSLLRRNIKAQTDQGHFTMLGIRDRLAIPLRHAQPGKTIWVEHKLNVLDLDAVELVDEQGV
 Parker FAGFQGAYSGAPKQVLRKRPVLRATVQGPGLDFALSLLRRNIKAQTDQGHFTMLGIRDRLAIPLRHAQPGKTIWVEHKLNVLDLDAVELVDEQGV
 ET1080 FAGFQGAYSGAPKQVLRKRPVLRATVQGPGLDFALSLLRRNIKAQTDQGHFTMLGIRDRLAIPLRHAQPGKTIWVEHKLNVLDLDAVELVDEQGV
 275/58 FAGFQGAYSGAPKQVLRKRPVLRATVQGPGLDFALSLLRRNIKAQTDQGHFTMLGIRDRLAIPLRHAQPGKTIWVEHKLNVLDLDAVELVDEQGV

3C

1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710

AY421765 NLELTLVTLDTNEKFRDITKFIPEVVISGASDATLVINTEHMPMSFVPGDVGQYGFNLNSGKPTHRTMMYNFPTKAGCCGGVTVSVGKIIGIHIG
 USSR NLELTLVTLDTNEKFRDITKFIPEVVISGASDATLVINTEHMPMSFVPGDVGQYGFNLNSGKPTHRTMMYNFPTKAGCCGGVTVSVGKIIGIHIG
 Parker NLELTLVTLDTNEKFRDITKFIPEVVISGASDATLVINTEHMPMSFVPGDVGQYGFNLNSGKPTHRTMMYNFPTKAGCCGGVTVSVGKIIGIHIG
 ET1080 NLELTLVTLDTNEKFRDITKFIPEVVISGASDATLVINTEHMPMSFVPGDVGQYGFNLNSGKPTHRTMMYNFPTKAGCCGGVTVSVGKIIGIHIG
 275/58 NLELTLVTLDTNEKFRDITKFIPEVVISGASDATLVINTEHMPMSFVPGDVGQYGFNLNSGKPTHRTMMYNFPTKAGCCGGVTVSVGKIIGIHIG

3C 3D

1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800

AY421765 GNGRQGPCAGLKRGYFVSEQGEIQWMPKNETGRLNINPTTRTKLEPVSFVDVFEKNKEPAVLTSKDPRLVDFEQALFSKYVGNVLEHPDEYVT
 USSR GNGRQGPCAGLKRGYFVSEQGEIQWMPKNETGRLNINPTTRTKLEPVSFVDVFEKNKEPAVLTSKDPRLVDFEQALFSKYVGNVLEHPDEYVT
 Parker GNGRQGPCAGLKRGYFVSEQGEIQWMPKNETGRLNINPTTRTKLEPVSFVDVFEKNKEPAVLTSKDPRLVDFEQALFSKYVGNVLEHPDEYVT
 ET1080 GNGRQGPCAGLKRGYFVSEQGEIQWMPKNETGRLNINPTTRTKLEPVSFVDVFEKNKEPAVLTSKDPRLVDFEQALFSKYVGNVLEHPDEYVT
 275/58 GNGRQGPCAGLKRGYFVSEQGEIQWMPKNETGRLNINPTTRTKLEPVSFVDVFEKNKEPAVLTSKDPRLVDFEQALFSKYVGNVLEHPDEYVT

3D

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900

AY421765 QAALHYANQLKQLDINTNKMSMEACYGTENLEAIDLHTSAGYPSYTLGKKRDLIDPTTRDVSKMKLYLDKYGLDLPYSTVVKDELRSLDKIKK
 USSR QAALHYANQLKQLDINTNKMSMEACYGTENLEAIDLHTSAGYPSYTLGKKRDLIDPTTRDVSKMKLYLDKYGLDLPYSTVVKDELRSLDKIKK
 Parker QAALHYANQLKQLDINTNKMSMEACYGTENLEAIDLHTSAGYPSYTLGKKRDLIDPTTRDVSKMKLYLDKYGLDLPYSTVVKDELRSLDKIKK
 ET1080 QAALHYANQLKQLDINTNKMSMEACYGTENLEAIDLHTSAGYPSYTLGKKRDLIDPTTRDVSKMKLYLDKYGLDLPYSTVVKDELRSLDKIKK
 275/58 QAALHYANQLKQLDINTNKMSMEACYGTENLEAIDLHTSAGYPSYTLGKKRDLIDPTTRDVSKMKLYLDKYGLDLPYSTVVKDELRSLDKIKK

3D

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990

AY421765 GKSRLIEASSLNDVYLRTMFGHLYEVFHPANPGVTGSAVGCNPDVFWKSLPILLLPSLFAFDYSYDASLSPVWFRALEIVLREYVGYSEEAVALS
 USSR GKSRLIEASSLNDVYLRTMFGHLYEVFHPANPGVTGSAVGCNPDVFWKSLPILLLPSLFAFDYSYDASLSPVWFRALEIVLREYVGYSEEAVALS
 Parker GKSRLIEASSLNDVYLRTMFGHLYEVFHPANPGVTGSAVGCNPDVFWKSLPILLLPSLFAFDYSYDASLSPVWFRALEIVLREYVGYSEEAVALS
 ET1080 GKSRLIEASSLNDVYLRTMFGHLYEVFHPANPGVTGSAVGCNPDVFWKSLPILLLPSLFAFDYSYDASLSPVWFRALEIVLREYVGYSEEAVALS
 275/58 GKSRLIEASSLNDVYLRTMFGHLYEVFHPANPGVTGSAVGCNPDVFWKSLPILLLPSLFAFDYSYDASLSPVWFRALEIVLREYVGYSEEAVALS

	3D																																																																																												
	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080	2090																																																																																			
AY421765	I	E	G	I	N	H	T	H	H	V	R	N	K	T	Y	C	V	L	G	G	M	P	S	G	C	S	G	T	S	I	F	N	S	M	I	N	N	I	I	R	T	L	L	I	K	T	F	R	G	I	D	L	D	E	L	N	M	V	A	Y	G	D	D	V	L	A	S	Y	P	F	F	I	D	C	S	E	L	A	K	T	G	K	E	Y	G	L	T	M	T	P	A	D	K
USSR	I	E	G	I	N	H	T	H	H	V	R	N	K	T	Y	C	V	L	G	G	M	P	S	G	C	S	G	T	S	I	F	N	S	M	I	N	N	I	I	R	T	L	L	I	K	T	F	R	G	I	D	L	D	E	L	N	M	V	A	Y	G	D	D	V	L	A	S	Y	P	F	F	I	D	C	S	E	L	A	K	T	G	K	E	Y	G	L	T	M	T	P	A	D	K
Parker	I	E	G	I	N	H	T	H	H	V	R	N	K	T	Y	C	V	L	G	G	M	P	S	G	C	S	G	T	S	I	F	N	S	M	I	N	N	I	I	R	T	L	L	I	K	T	F	R	G	I	D	L	D	E	L	N	M	V	A	Y	G	D	D	V	L	A	S	Y	P	F	F	I	D	C	S	E	L	A	K	T	G	K	E	Y	G	L	T	M	T	P	A	D	K
ET1080	I	E	G	I	N	H	T	H	H	V	R	N	K	T	Y	C	V	L	G	G	M	P	S	G	C	S	G	T	S	I	F	N	S	M	I	N	N	I	I	R	T	L	L	I	K	T	F	R	G	I	D	L	D	E	L	N	M	V	A	Y	G	D	D	V	L	A	S	Y	P	F	F	I	D	C	S	E	L	A	K	T	G	K	E	Y	G	L	T	M	T	P	A	D	K
275/58	I	E	G	I	N	H	T	H	H	V	R	N	K	T	Y	C	V	L	G	G	M	P	S	G	C	S	G	T	S	I	F	N	S	M	I	N	N	I	I	R	T	L	L	I	K	T	F	R	G	I	D	L	D	E	L	N	M	V	A	Y	G	D	D	V	L	A	S	Y	P	F	F	I	D	C	L	E	L	A	R	T	G	K	E	Y	G	L	T	M	T	P	A	D	K

	3D																																																																																													
	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190																																																																																				
AY421765	S	P	C	F	N	E	V	T	W	E	N	A	T	F	L	K	R	G	F	L	P	D	H	Q	F	P	F	L	I	H	P	T	M	P	R	E	I	H	E	S	I	R	W	T	K	D	A	R	N	T	Q	D	H	V	R	S	L	C	L	L	A	W	H	N	G	K	D	E	Y	E	R	F	V	S	T	I	R	S	V	P	I	G	K	A	L	A	I	P	N	F	E	N	L	R
USSR	S	P	C	F	N	E	V	T	W	E	N	A	T	F	L	K	R	G	F	L	P	D	H	Q	F	P	F	L	I	H	P	T	M	P	R	E	I	H	E	S	I	R	W	T	K	D	A	R	N	T	Q	D	H	V	R	S	L	C	L	L	A	W	H	N	G	K	D	E	Y	E	R	F	V	S	T	I	R	S	V	P	I	G	K	A	L	A	I	P	N	F	E	N	L	R
Parker	S	P	C	F	N	E	V	T	W	E	N	A	T	F	L	K	R	G	F	L	P	D	H	Q	F	P	F	L	I	H	P	T	M	P	R	E	I	H	E	S	I	R	W	T	K	D	A	R	N	T	Q	D	H	V	R	S	L	C	L	L	A	W	H	N	G	K	D	E	Y	E	R	F	V	S	T	I	R	S	V	P	I	G	K	A	L	A	I	P	N	F	E	N	L	R
ET1080	S	P	C	F	N	E	V	T	W	E	N	A	T	F	L	K	R	G	F	L	P	D	H	Q	F	P	F	L	I	H	P	T	M	P	R	E	I	H	E	S	I	R	W	T	K	D	A	R	N	T	Q	D	H	V	R	S	L	C	L	L	A	W	H	N	G	K	D	E	Y	E	R	F	V	S	T	I	R	S	V	P	I	G	K	A	L	A	I	P	N	F	E	N	L	R
275/58	S	P	C	F	N	E	V	T	W	E	N	A	T	F	L	K	R	G	F	L	P	D	H	Q	F	P	F	L	I	H	P	T	M	P	R	E	I	H	E	S	I	R	W	T	K	D	A	R	N	T	Q	D	H	V	R	S	L	C	L	L	A	W	H	N	G	K	E	E	Y	E	R	F	V	S	T	I	R	S	V	P	V	G	K	V	L	A	I	P	N	F	E	N	L	R

	3D						
	2190						
AY421765	R	N	W	L	E	L	F
USSR	R	N	W	L	E	L	F
Parker	R	N	W	L	E	L	F
ET1080	R	N	W	L	E	L	F
275/58	R	N	W	L	E	L	F