XVI. VIIRUSEGENEETIKA

1. VIIRUSTE GENEETILINE ORGANISATSIOON

1.1. Viirus: rohkem kui molekul ja vähem kui elusrakk

1.1.1. Viiruste definitsioon

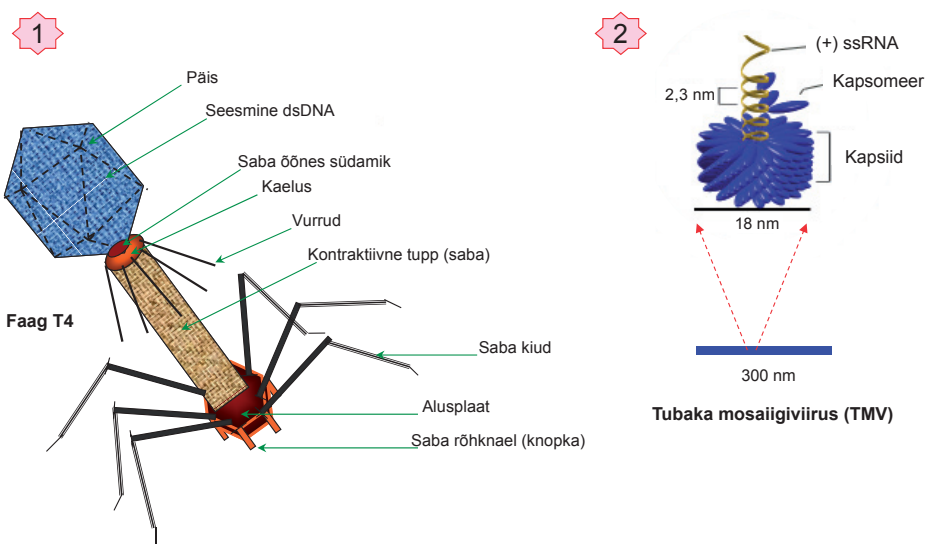
Viirused ei ole elusorganismid. Nad on obligatoorsed rakusisesed parasiidid. Need mõlemad on laialt levinud postulaadid, mida ei kiputa eriti vaidlustama. Ometi on viiruste teaduslik defineerimine märksa komplitseeritum. Võtame ülalnimetatud rakusisese parasiidi kriteeriumi. Selgub, et parasiite on teisigi peale viiruste. Näiteks on rakusisesteks parasiitideks mitmed prokarüootsed organismid, bakterid perekonnast *Rickettsiae* (**riketsiad**) ja *Chlamydiae* (**klamüüdiad**), kes suudavad väljaspool rakku eksisteerida vaid väga lühikest aega. Ka mükoplasma on rakusisene parasiit, kes süstemaatiliselt on ilma rakukestata bakter. Prokarüootset päritolu on ka eukarüootide eluliselt tähtsad organellid: mitokondrid ja kloroplastid, ka nemad pole võimelised eksisteerima väljaspool rakku. Õnneks pole nad rakusisesed parasiidid, vaid rakkude eluks vajalikud nn. võtmeorganellid. Seepärast lisatakse viiruste defineerimisel rakusisese parasiidi parameetrile veel lisaparameetreid.

1. Viiruspartiklid pannakse kokku (assambleeritakse) eelnevalt selleks rakus sünteesitud komponentidest.
2. Viiruspartiklid ei kasva ega jagune.
3. Viiruste genoomis puudub geneetiline informatsioon energia tootmiseks ja valgu sünteesiks: vaid mõned suured viirused võivad moodustada üksikuid valgusünteesi komponente (nt. tRNAd).
4. Viiruse geneetiline materjal ei ole rakusisesest keskkonnast membraaniga eraldatud, vaid on vahetus kontaktis peremeesraku tuuma või tsütoplasmaga.
5. Viirustel on võime moodustada rakust väljuvaid ja uutesse rakkudesse sisenevaid viiruspartikleid. Erandiks on siiski näiteks enamik seeneviiruseid, mille paljunemistsükkel on täielikult rakusisene. Viimasel juhul on viiruste eristamine raku mõnedest mobiilsetest geneetilistest elementidest komplitseeritud.

Viiruste rakusisene parasiitsus on tugevalt spetsiifiline: iga kindlat tüüpi viirus on võimeline nakatama vaid kindlat tüüpi rakke. Lähtuvalt sellest klassifitseeritakse viirused järgmiselt:

1) **bakteriviirused** e. **faagid** (bakteriofaagid);
2) **loomaviirused**;
3) **taimeviirused**;
4) **seente ja ainuraksete viirused**.

Viirusega nakatumisel interakteerub viiruse välispind rakupinna spetsiifiliste **retseptoritega** (ingl. *receptor*). Kuivõrd loomarakul puudub kest, siis loomaviirusi äratundvad retseptorid asuvad otse raku plasmamembraanil. Faagide retseptorid paiknevad aga kas otse rakukestal või rakupinda katvatel **karvakestel** e. **piilidel** (ingl. *pili*). Taimeviirustel ja seeneviirustel e. **mükoviirustel** (ingl. *mycoviruses*) teadaolevalt retseptorid aga puuduvad. Viiruse strateegia on geniaalselt lihtne. Viirus peab modifitseerima mõned rakulised valgud, millega saavutatakse raku metabolismi ümberlülitumine normaalselt raku elutegevuselt viiruse paljundamisele suunatud metabolismile. Niisuguse strateegia osaks on ka see, et potentsiaalne nakatumisvõimeline viirus võib säilida rakus pikka aega latentselt (mitteavaldunult), enne kui induktsiooni (mõjutuse) tulemusel hakatakse tootma uusi viiruspartikleid, mis viib tavaliselt peremeesraku hukkumisele. **Kroonilise** e. **persistentse infektsioonivormi** (ingl. *chronic or persistent infection*), näiteks paljude imetajate viirusinfektsioonide korral (JCV, BKV, HCV inimesel, *Polyoma*-viirus hiirtel), saab viirusosakeste tootmine toimuda siiski ka ilma peremeesraku hukkumiseta. Viiruste paljunemisel saame seega rääkida **viiruste paljunemis-** e. **replikatsioonitsüklist**. Faagidel nimetatakse viirusgeenide mitteavaldumisega seonduvat arengutsüklit **lüsogeenseks tsükliks** ning viirusgeenide avaldumise ja paljunemise tsüklit **virulentseks** e. **lüütiliseks tsükliks**.



Joonis 16.1. Faagi ja viiruse struktuuri skeem. 1. *Escherichia coli* faag T4. 2. Tubaka mosaiigiviirus TMV. dsDNA – kaksikahelaline DNA; (+) ssRNA – informatsioonilise „+"-ahelaga üksikahelaline RNA.

Ja siiski, viirused jäävad ikkagi eelkõige ühenduslüliks elusa ja mitteelusa vahel. Ilmekaks näiteks on **tubaka mosaiigiviirus** (**TMV**) (jn. 16.1). TMV põhjustab tubakalehtedel mosaiikset nekroosi, mis tekitab farmeritele ülisuurt majanduskahju. TMV-d saab kristalliseerida ja kristalliseeritud olekus säilitada aastaid kuskil lauasahtlis. Selles olekus pole viirusel mingeid elusorganismidele iseloomulikke omadusi: ta ei paljune, ei kasva ega arene, ei kasuta energiat ega reageeri keskkonnastiimulitele. Tarvitseb aga raputada neid kristalle vaid tubakalehtedele ja sünnib ime: viirus infitseerib leherakud, paljuneb, kasutab taimeraku toodetud energiat ja reageerib rakulistele signaalidele (keskkonnamõjudele). Seega on viirusel niisuguses olukorras täiesti selgelt avalduvad elussüsteemidele omased tunnused.

1.1.2. Viiruste avastamine

Nimetus **„viirus"** pärineb ladinakeelsest sõnast (ld. *virus*), mis tähendab tõlkes „mürki". Kuni 20. sajandini nimetati viirusinfektsiooni põhjustajateks pea kõiki nakkustekitajaid, ehkki paljudel juhtudel oli tegelikult tegemist hoopis bakteriaalsete haigustega. Eraldi rühmana eristati viiruseid alles 20. sajandi künnisel.

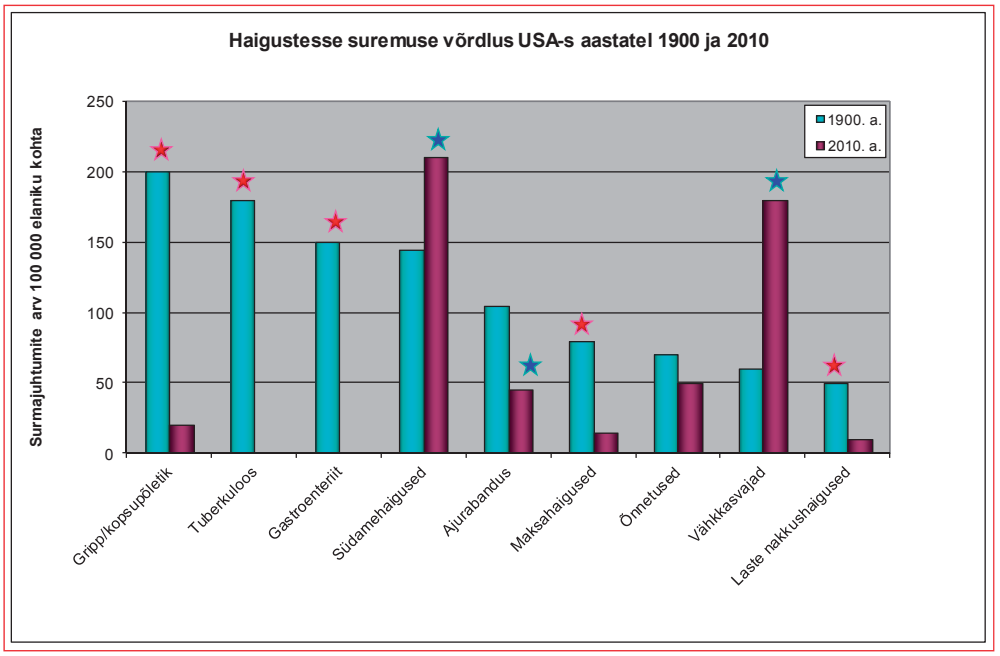
Viirused avastati kui haiguseid põhjustav toimeaine, mis läbib bakterifiltrite poori läbimõõduga kuni 0,4 µm. Bakterirakk on keskmiselt 2–3 µm, **viiruspartikkel** e. **virioon** (ingl. *virion*) aga 20–400 nm pikk. Kahjuks pole viiruste eristamine suuruse alusel osutunud väga efektiivseks. Nimelt on tänapäeval kirjeldatud viiruseid, mille virioonid on suuremad kui 400 nm. Üheks selliseks on 2004. a. avastatud amööbe nakatav **mimiviirus** e. **mimikrimikroob** (ingl. *mimicing microbe*), mida peeti pikka aega grampositiivseks kokiks (bakteriks). Mimiviirus eristub siiski teistest parasiitsetest rakusisestest mikroobidest. Ta on ikosaeedrilise kujuga ja tal pole energiatootmismehhanisme. See viirus on seni teadaolevatest kõige suurema genoomiga (1 181 404 bp e. 1,2 Mb) ning ta kodeerib, erinevalt teistest viirustest, mitmeid translatsiooniga seotud faktoreid ja tRNA-sid ning topoisomeraase, DNA reparatsioonivalke ja polüsahhariidide sünteesiga seotud ensüüme.

Louis Pasteur (1822–1895) oli esimene, kes küll isoleeris viiruse (marutaudiviirus), kuid kes ei eristanud seda haigustekitajat bakterist. Seepärast nimetatakse viiruste avastajaks pigem Vene botaanikut **Dimitri Ivanovsky**t (1864–1920), kes näitas oma katsetega 1892. a., et tubakataime haigestumist põhjustab bakterifiltreid läbiv patogeen (mida ta ise pidas bakteriks), mille **Martinus Beijerinck** (1851–1931) nimetas 1898. a. *vivum fluidum*´iks ja mis tänapäeval kannab nimetust **tubaka mosaiigiviirus**. Järgnevalt avastati mitmed teised viirused:

- 1898 **Friedrich A. J. Löffler** (1852–1915) ja **Paul O. M. Frosch** (1860–1928) – **veiste suu- ja sõrataudi viirus**;
- 1908 taanlased **Vilhelm Ellerman** ja **Olaf Bang** – **kodulindude leukoosi viirus**;
- 1909 **Karl Landsteiner** (1868–1943), **Constantin Lavaditi** (1974–1953) ja **Erwin Popper** (1879–1955) – **inimese poliomüeliidiviirus**;
- 1915 **Frederick W. Twort** (1877–1950) ja 1917 **Félie d`Herelle** (1873–1949) – **bakteriofaagid** bakteritel e. **bakterite sööjad** (ingl. *eater of bacteria*).

Pärast bakteriofaagide avastamist sai uurijate unistuseks hakata kasutama viiruseid patogeensete bakterite (nt. koolera- ja tüüfusetekitajad) hävitamiseks organismis. Kahjuks selgus aga pea, et organism hävitab sissetunginud viirused oma immuunsüsteemi abil ning faagide selline kasutus pole võimalik.

Mida aga viirused kui haigustekitajad endast kujutavad, oli juba ammu selge. Teame, et ülemaailmse gripiepideemia e. **pandeemia** (ingl. *pandemic disease*) ajal 1918. a. suri nn. **Hispaania grippi** maailmas 50–100 miljonit inimest. Võitlus viirustega jätkub tänaseni. Õnneks on see paljus ajalugu. Sajandiga on nii viirustest kui ka bakteritest põhjustatud surmad minimeerunud ning asendunud vähkkasvajatest ja südame-veresoonkonna haigustest põhjustatutega (jn. 16.2). Mõningad uuesti ilmnevad viirushaigused on aga aktualiseerunud. Näiteks probleemid **inimese immuunpuudulikkuse viirusega** e. **HIV-iga** (ingl. *human immunodeficiency virus*), mis põhjustab **omandatud immuunpuudulikkuse sündroomi** e. **AIDS**-i (ingl. *aquired immune deficiency syndrome*) ning **kollatõve** põhjustava **C-hepatiidi viirusega** (ingl. *hepatitis C virus, **HCV***). Need viirused avastati alles 1980. aastatel. Loomadel ja ka inimestel on tänapäeval hakanud ülemaailmselt levima **linnugripi-** (ingl. *bird flu*) **viirused**, järjekordselt uuesti ka **suu- ja sõrataudiviirus** (ingl. *foot and mouth disease virus*). Puugid levitavad inimesele edasikanduvat rasket **puukentsefaliiti** (*Encephalititis viralis ixodidalis*), metsloomad **marutaudi**, mis inimesel võib põhjustada surmaga lõppevat **marutõbe** (raabieseviirus, mis kuulub *Lyssa* viiruste perekonda ja *Rhabdoviridae* sugukonda) jpt. haiguseid.



Joonis 16.2. Erinevatesse haigustesse suremus USA-s, võrreldes aastaid 1900 ja 2010. Punase viisnurgaga on tähistatud viirus- ja bakterhaigused; sinise viisnurgaga veresoonkonna haigused ja kasvajad.

Teiselt poolt on viirustel aga ülimalt positiivne roll molekulaargeneetika tekkes ja arengus. Bakterite viirusinfektsioonil tekib 30 minutiga üle 100 uue viiruspartikli. Lisaks on viiruste lihtne ehitus ja avalduvad fenotüübilised tunnused nendeks hoobadeks, mis viisid geneetiliste katsete tegemise tohutult kiiremaks ja selgepiirilisemaks. Viirusmudelitel selgitati geeni struktuur. Selles valdkonnas tegi esmaavastused 1935.–1937. a. **Max**

Delbrück (1906–1981). Järgnevalt, 1952. a., selgitas **Seymour Benzer** (1921–2007) faagi T4 *rII* mutantidel geeni peenstruktuuri.

1.1.3. Viriooni ehitus ja viiruste klassifikatsioon

Viiruseid klassifitseeritakse kolme põhiomaduse alusel.

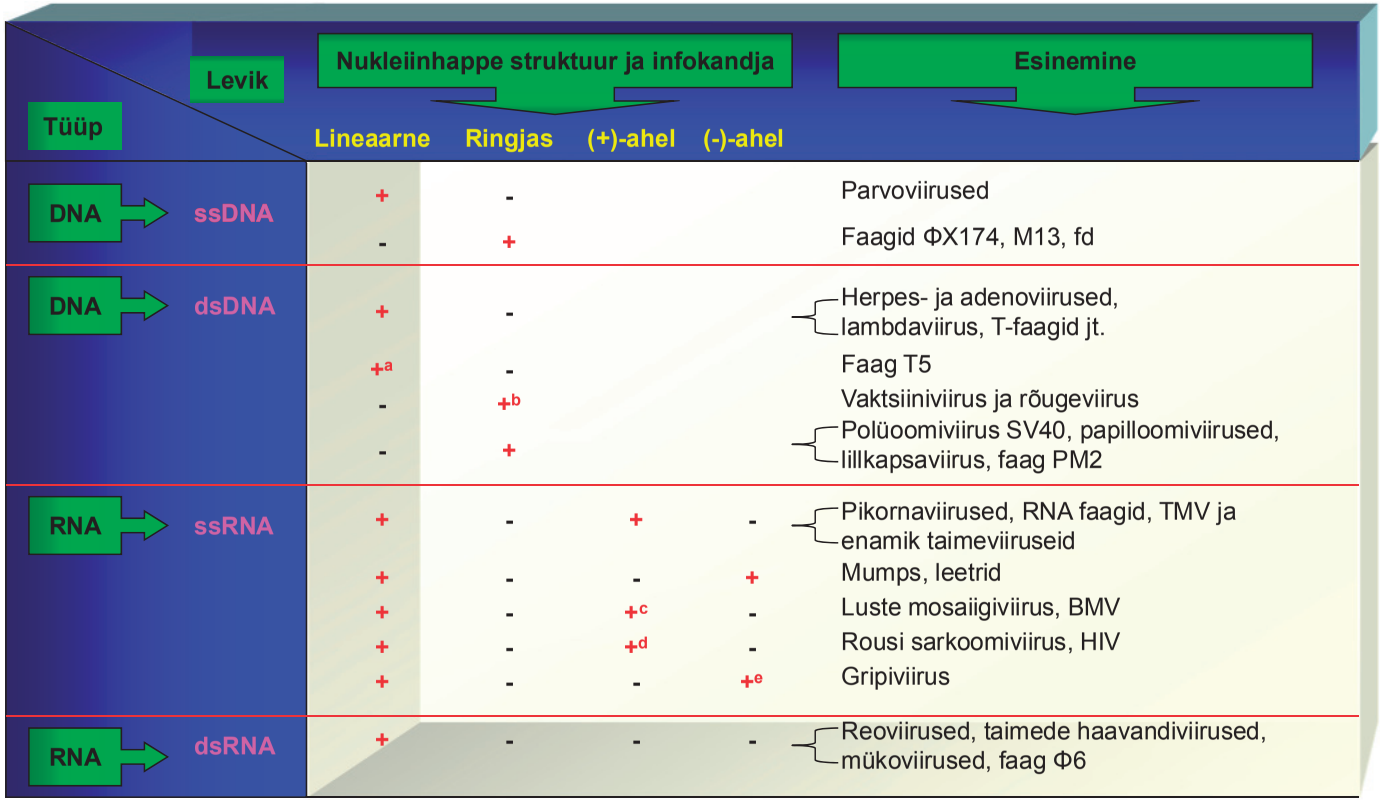
1. Kas viirused sisaldavad geneetilise info kandjana DNA-d või RNA-d?
2. Kas viiruse nukleiinhape on üksik- või kaksikahelaline?
3. Kas viirus on ümbritsetud membraaniga või ei?

Viirused sisaldavad geneetilise info kandjana eritüübilisi nukleiinhappeid, mis kodeerivad viirusespetsiifilisi valke (jn. 16.3).

1. **dsDNA** e. kaksikahelaline DNA (esineb: herpesviirused, adenoviirused, vaktsiiniviirus, rõugeviirus, polüoomiviirused – nt. SV40, papilloomiviirused, lillkapsa mosaiigiviirus (erinevalt teistest replitseerub see viirus aga RNA abil) ning valdav osa bakteriviirustest, nt. T4- ja lambdaviirus).
2. **ssDNA** e. üksikahelaline DNA (esineb: bakteriofaagid – MS13 ja ΦX174, paroviirused).
3. **dsRNA** e. kaksikahelaline RNA (esineb: taimede haavandtõve viirus, rotaviirused, paljud mükoviirused).
4. **ssRNA** e. üksikahelaline RNA (esineb: TMV, paramüksoviirused – mumpsi ja leetrite viirus, leukoosiviirus, retroviirused – HIV, HCV, gripiviirused – H5N1).

DNA genoom on virioonis kas lineaarses vormis või rõngasmolekulina, RNA on aga peaaegu alati lineaarselt (v.a. kollatõveviirus D). Nii DNA kui ka RNA genoomid võivad olla segmenteerunud, mõnedel viirustel asuvad erinevad genoomiosad aga erinevates virioonides. Loomade viirustel on genoomi kõik komponendid ühes virioonis, näiteks on gripiviirustel 8 ja rotaviirustel 10 RNA segmenti. Taimeviirused võivad olla aga ka multikomponentsed (erinevad genoomiosad erinevates virioonides). Osa RNA-viirustega nakatumise järel sünteesitakse rakus viiruse poolt kodeeritud **pöördtranskriptaasi** e. **revertaasi** toimel (mis on tavaliselt nakatunud viiruspartiklis valmiskujul juba olemas) viiruse RNA-le komplementaarset dsDNA-d. dsDNA integreerub seejärel viiruse kodeeritud integraasi abil raku genoomi. Viiruse DNA võib selliselt integreerununa püsida rakus pikka aega **proviirusena** (funktsionaalselt latentsena). Selliseid viiruseid nimetatakse **retroviirusteks** (ingl. *retroviruses*). Seevastu enamikul RNA-viirustel (sh. HCV, TMV, gripiviirused) genoomset RNA-d DNA-ks ümber ei kopeeritagi ning nende genoomi replikatsioon toimub **RNA-sõltuva RNA polümeraasi** abil. Neid viiruseid nimetatakse **riboviirusteks** (ingl. *riboviruses*) ning nende viiruste geneetiline materjal ei integreeru kunagi raku genoomi.

Viiruse nukleiinhapet ümbritseb **valkümbris** e. **kapsiid**, mis kaitseb viiruse nukleiinhapet keskkonnamõjude eest. Genoomse DNA või RNA pakkimisel osalevad spetsiifilised pakkimisvalgud, mis tunnevad nukleiinhappes ära kindlaid pakkimissignaale (nukleiinhappejärjestusi). Pakitud nukleiinhape väldib negatiivsete laengute tõukumist, ta on seotud positiivselt laetud ioonide, polüamiinide ja valkudega. Kapsiidis olevaid valgu monomeere nimetatakse **kapsomeerideks** (ingl. *capsomeres*). Kapsomeerid on omavahel ühendatud mittekovalentsete sidemetega. Viiruse kapsiid on sümmeetriline –



Joonis 16.3. Viirusnukleiinhappe tüübid. ssDNA – üksikahelaline DNA; dsDNA – kaksikahelaline DNA; ssRNA – üksikahelaline RNA; dsRNA – kaksikahelaline RNA. a – üksikahelaliste katketega; b – risti kattuvad DNA otsad; c – segmenteerunud RNA; d – segmenteerunud, kaks ssRNA-ahelat; e – segmenteerunud RNA. Osal viirustel on geneetiliseks materjaliks oma arengutsükli erinevatel etappidel nii RNA kui DNA: retroviiruste ssRNA annab pöördtranskriptsioonil dsDNA, mis võib integreeruda genoomi; hepadnaviirustel on osaliselt üksikahelaline ja osaliselt kaksikahelaline dsDNA, mille info kantakse üle arengutsüklis ka RNA-ks kui geneetilise info kandjaks.

helikaalne (valgu alaüksused paiknevad helikaalselt ümber nukleiinhappe) või **ikosaeedriline,** ingl. *icosahedron* (12-nurkne 20 võrdse kolmnurgaga hulktahukas). Helikaalse kapsiidiga TMV-s (6400 nukleotiidi) on 2130 identset valgu alaüksust pakitud helikaalselt ümber ssRNA nii, et iga alaüksus interakteerub kolme nukleotiidiga. Assambleerumise ühikuks on 34 alaüksust. **Heinz L. Fraenkel-Conrat** (1910–1999) ja **Robley C. Williams** (1908–1995) näitasid 1955. a., et dissotsieerunud valgud ja RNA on võimelised spontaanselt **assambleeruma** (ingl. *molecular self-assambly*). See võimaldas uurijatel hakata katsetes viiruseid kokku pakkima väljaspool rakku. Ikosaeedriline kapsiidi sümmeetria on näiteks adenoviirustel, pikornaviirustel ja faagil ΦX174.

Viiruste kapsiid võib olla ilma katteta e. alasti (paljas). Sellised on näiteks adenoviirused, pikornaviirused, TMV jt. Peale kapsiidi on viirustel veel **ümbris** (ingl. *envelope*), sagedamini on seda loomaviirustel (HIV, HCV, gripiviirused). Ümbris pärineb alati peremeesraku membraanist. Näiteks herpesviiruse puhul on selleks tuumamembraan ja Golgi kompleksi membraanid ning gripiviirusel peremeesraku plasmamembraan. Ümbris sisaldab lipiide ja viirusespetsiifilisi valke: tavaliselt glükosüülimata maatriksvalke ja membraani läbivaid glükoproteiine. Gripiviirusel on eksternaarselt näiteks glükoproteiinsed pinnavalgud **hemaglutiniin** ja **neuraminidaas**, mis võivad sageli muteeruda. Toimuda võib ka viirustevaheline pinnavalkude rekombinatsioon, mille tulemusel saavad moodustuda uut tüüpi pinnavalgud ja/või nende kombinatsioonid. Rekombinantsete pinnavalkude vastu võib organismis immuunsus esialgu täielikult puududa. Üheks ohtlikumaks niisuguseks viiruseks peetakse **linnugripi**viiruse varianti **H5N1**, mis kandub lindudelt üle ka inimesele. Veel on viiruse ümbrises valgukompleksid, mis moodustavad transpordikanaleid (**ioonkanalid**). Ümbrisega viirused võivad olla ka erineva kujuga e. **pleomorfsed** (ingl. *pleomorphic*). Nendel kompleksetel viirustel eristatakse järgmisi alatüüpe:

1) viirustel on ümber DNA mitu valkkesta (nt. rõugeviirused);
2) on kahesuguseid viiruspartikleid (nt. bakuloviirused);
3) on kapsiidi lisastruktuurid (nt. soolekepikese T-grupi faagid).

Kõik *Escherichia coli* T-faagid (T1–T7) on komplekssed viirused, kuid üksteisega välimuselt sarnased: kõikide nende virioonid on **konnakullesenäolised** (ingl. *tad-pole-shaped*). Neil faagidel eristatakse **viiruse päist** (ingl. *head*) ja **viiruse saba** (ingl. *tail*) (jn. 16.1). Päises e. peas on üks dsDNA-molekul koos rea valkudega, mis on organiseeritud ikosaeedriliselt. Saba on püsiva pikkusega ning võib koosneda kahest helikaalsest samateljelisest õõnsast torust. Sisemist toru nimetatakse **südamikuks** (ingl. *core*), välimist **tupeks** (ingl. *sheath*). Paarisarvuliste T-faagide (T2, T4 ja T6) puhul on tupp kontraktiivne e. kokkutõmbevõimeline. Tupe peapoolne ots on ühendatud kaelusega. Tupe teine ots on ühendatud kuuenurkse **alusplaadiga** e. **basaalplaadiga** (ingl. *baseplate*), mille igas nurgas on **rõhknael** e**. knopka** (ingl. *tail pin*), mille abil viirus ankurdab end viirusinfektsioonil pöördumatult peremeesraku külge. Basaalplaadilt algavad ka 6 **sabakiudu** (ingl. *tail fibers*), millede abil faag tunneb ära raku pinnal olevaid faagispetsiifilisi retseptoreid, mis on eri T-faagidel erisugused. Faagi kinnitumine sabakiududega raku pinnale on aga pöörduv protsess. Pärast basaalplaadi fikseerumist saba rõhknaeltega lõhustab alusplaat rakukesta basaalplaadis sisalduva ensüümi **lüsotsüümi** (ingl. *lysozyme*) toimel. Järgnevalt hakkab saba tupp kontrakteeruma (kasutatakse ATP-energiat) nagu väike muskel ning

suruma alusplaati läbi rakumembraani. Plaadis toimuvad konformatsioonilised muutused ning ta avaneb DNA väljutamiseks. Saba südamikus olev toru läbib rakukesta, kuid mitte rakumembraani, ja valkudega seondunud faagi DNA siseneb läbi rakumembraani rakku.

Meeldejätmiseks

- Viirused on obligatoorsed parasiidid, mis saavad reprodutseeruda vaid nakatunud elusrakus.
- Bakteriofaagid on baktereid nakatavad viirused.

2. FAAGIGENEETIKA

2.1. Faagide elutsükkel

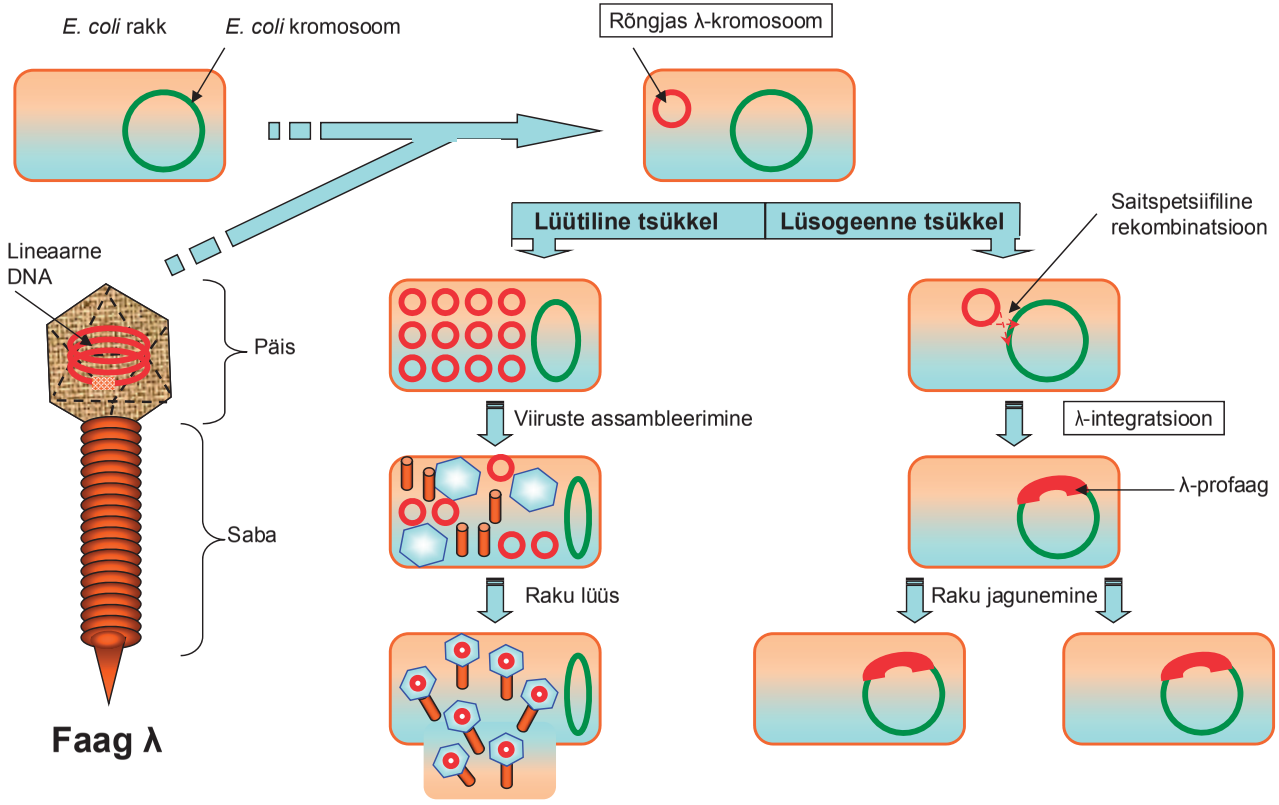
Sõltuvalt paljunemisstrateegiast jaotatakse faagid **virulentseteks** ja **mittevirulentseteks** e. **mõõdukateks**. Virulentsed faagid (nt. *E. coli* T-grupi faagid) põhjustavad kohe ja alati pärast infektsiooni peremeesrakkude hukkumise. Sellist faagi elutsüklit nimetatakse **lüütiliseks tsükliks**. Mõõdukad faagid (nt. *E. coli* faag lambda) valivad pärast bakteriraku nakatumist kas lüütilise tsükli või integreerumise bakteriraku kromosoomi, kus nad saavad säilida põlvkondade vältel ilma aktiivselt funktsioneerimata. Kromosoomi integreerunud faagi nimetatakse **profaagiks** ja vastavat paljunemisstrateegiat **lüsogeenseks tsükliks**. Keskkonnamõjude toimel võib mingil ajamomendil profaag indutseeruda, millele järgnevalt profaag vabaneb kromosoomist ning faag jätkab paljunemist nüüd aga juba lüütilises tsüklis.

2.1.1. λ-faag

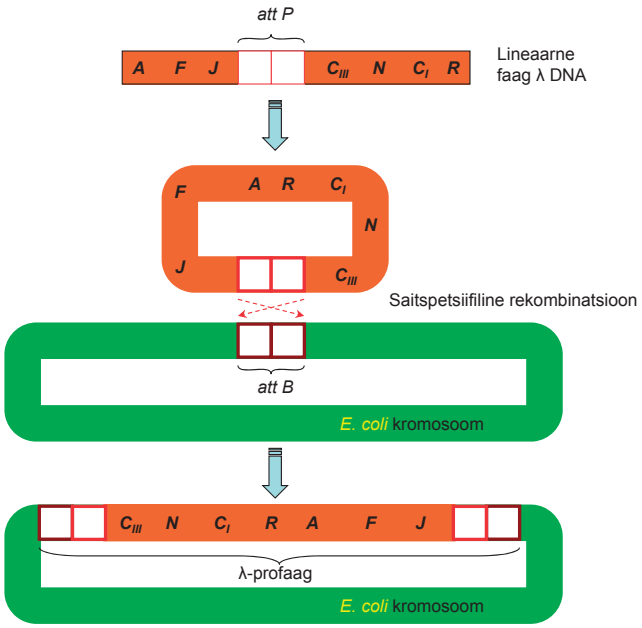
Escherichia coli faag lambda (λ) genoom on 48 502 bp pikkune ning tema dsDNA sisaldab ligi 50 geeni. Faagi päisesse on pakitud lambdafaagi DNA lineaarsel kulul. Pärast rakkude infitseerimist muudetakse lambdafaagi DNA rakus ringikujuliseks DNA-molekuliks. Rakusiseselt on lambdafaagil kaks tsüklit: **lüütiline** ja **lüsogeenne** (jn. 16.4). Sisenedes lüsogeensesse tsüklisse, integreerub faag λ *E. coli* kromosoomi (profaagina). Selle oleku säilimisel ei tohi avalduda lüütilises tsüklis osalevate faagi geenide produktid: faagi DNA replikatsioon, faagi morfogeneesi valgud, rakkude lüüsi põhjustav **lüsotsüüm**. Faag lambda geenide avaldumine on geneetiliselt reguleeritud ning seda käsitleme eraldi osas (vt. ptk. XIV).

Faag λ integratsioon *E. coli* rõngaskromosoomi toimub **sait-spetsiifilisel rekombinatsioonil** (jn. 16.5). Rekombinatsioon toimub spetsiifilistes **seostumissaitides** (ingl. *attachment sites*), milleks on *attP* faag λ kromosoomis ja *attB* bakterikromosoomis. Rekombinatsiooniprotsess on vahendatud faag λ poolt sünteesitud valguga, **λ-integraasiga**, mis on geeni *int* produkt. Tegelikult on *attP*- ja *attB*-järjestused küllaltki erinevad. Saitspetsiifiline rekombinatsioon toimub vaid seostumissaidi keskses piirkonnas, kus nii *attP* kui ka *attB* nukleotiidijärjestused on identsed, nimelt:

GCTTTTTTATACTAA
CGAAAAAATATGATT



Joonis 16.4. *E. coli* faag λ rakusisene lüütiline ja lüsogeenne tsükkel.

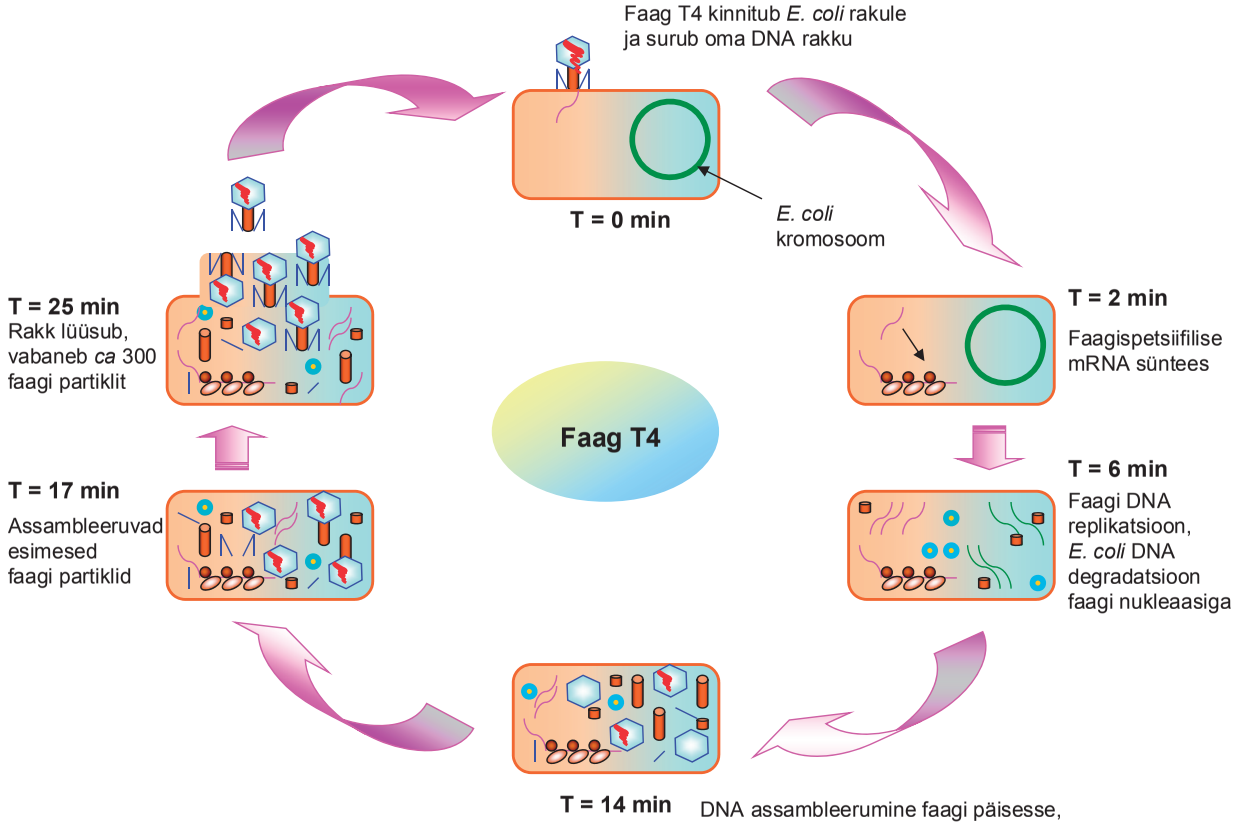


Joonis 16.5. *E. coli* faag λ profaagi integratsioon kromosoomi.

Rekombinatsiooni tulemusel jääb faag lambda DNA genoom kovalentselt bakterikromosoomi koosseisu ning on mõlemalt poolt flankeeritud ülalesitatud ühesuguse 15-nukleotiidse piirkonnaga. Need **otsmised kordusjärjestused** (ingl. *terminal repeats*) on hädavajalikud selleks, et faag λ saaks nukleotiidi täpsusega bakterikromosoomist ka **välja tulla** e. **end välja lõigata** (ingl. *excision*). See pöördmehhanism on väga sarnane faag λ sait-spetsiifilise insertsiooniga. Profaagi väljatulek on nukleotiidi täpsusega toimuv protsess, selle määramisel osalevad nii **λ-integraas** (ingl. λ *integrase*) kui ka λ-*xis*-geeni produkt, **λ-ekstsisionaas** (ingl. *excisionase*). Keskmiselt üks kord iga 10^5 bakteriraku jagunemise kohta toimub profaagi λ spontaanne väljatulek bakterikromosoomist. Faagi eraldumist kromosoomist saab indutseerida keskkonnamõjuritega, näiteks UV-kiirgusega.

2.1.2. T-faagid

Escherichia coli T-faagid on **virulentsed** dsDNA-faagid. Nad jaotuvad nn. **paarisarvulisteks T-faagideks** (T2, T4, T6), mille genoomid on suuremad kui 168 000 bp, ja **paarituarvulisteks T-faagideks** (T1, T3, T5, T7), mille genoomid on väiksemad (nt. on faagi T5 genoomi suurus *ca* 39 000 bp). Paarituarvulised T-faagid on nii seroloogiliste kui ka morfoloogiliste tunnuste põhjal sarnased, ehkki nad on vaid kaugelt suguluses. Paarisarvulised T-faagid on seevastu üksteisega lähedalt suguluses, nende DNA on 80% ulatuses homoloogne, geenide järjekord ja regulatsioon sarnased. Enimuuritud paarisarvuliseks T-faagiks on faag T4. Paarisarvulised T-faagid on väga komplitseeritud ehitusega (jn. 16.1). Nende struktuurivalkude ja faagide assambleerimisel osalevate valkude geenid haaravad enda alla üle 40% faagi genoomist, kusjuures 24 geeni osaleb faagi pea morfogeneesis, 25 geeni saba ja sabakiudude moodustumises, lisaks faagi assambleerimisel osalevaid valke kodeerivad geenid.



Joonis 16.6. Bakteriofaag T4 elutsükkel. T – aeg minutites alates nakatumise hetkest.

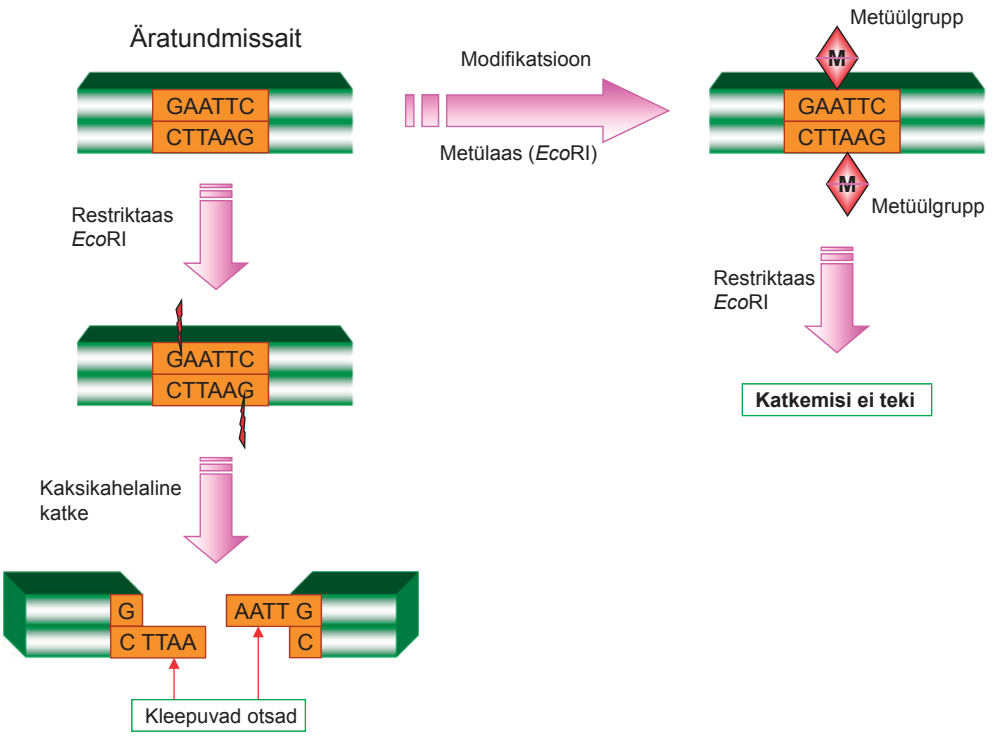
Faagi T4 elutsükli pikkus on 25 minutit. Tema genoom on *ca* 168 800 bp pikkune ja sisaldab ligi 150 iseloomustatud geeni (jn. 16.6). Faag T4 on **virulentne** e. **lüütiline faag**. Kohe pärast viiruse DNA tungimist rakku toimub **faagi varaste valkude** (ingl. *early phage proteins*) translatsioon faagi mRNA transkriptilt (mis sünteesitakse mõni minut pärast faagi DNA rakku sisenemist). Osa neist varastest valkudest on nukleaasid, mis degradeerivad peremeesraku DNA mononukleotiidideks, millega omakorda pidurdatakse täielikult raku enda DNA, RNA ja valkude süntees. Teiseks faagi „relvaks" on invasiooniline tegevus, kus faagi varased valgud on võimelised seonduma peremeesraku RNA polümeraasiga ja modifitseerima selle nii, et ta pole enam võimeline ära tundma peremeesraku geenide promootoreid, lülitades need lihtsalt välja. Küll on aga modifitseeritud RNA polümeraas võimeline seonduma jätkuvalt faagi varaste geenide promootoritele, sünteesima uusi varaseid valke, mis modifitseerivad edasi RNA polümeraasi. Muudetud RNA polümeraas tunneb nüüd ära ka faagide hiliste geenide promootorid ja lülitab need sisse. Seega saavutatakse RNA polümeraasi järkjärgulise modifikatsiooniga peremeesraku geenide väljalülitamine ja faagi geenide järkjärguline sisselülitamine. Nüüd, mil rakk on alistatud, on vaja kasutada raku komponente faagi enda paljundamiseks ja arenguks. Selleks toimub infektsioonitsükli keskosas **faagi hiliste valkude** (ingl. *late phage proteins*) sünteesi induktsioon. Need valgud on faagi pea ja saba tarvis, faagi DNA lahtilõikamiseks ning faagiosakeste assambleerimiseks. Umbes 15 minutit pärast faagi rakku tungimist on rakk pungil täis faagi järglasi. Lõpuks, 25. minutil, lüüsib viiruse poolt eelnevalt rakus sünteesitud vaba lüsotsüüm rakuseina, rakk hävib ja vabanevad 100–300 uut faagi partiklit.

2.1.3. Restriktsiooni-modifikatsioonisüsteem

Faagi varaste geenide produktid (nukleaasid) degradeerivad mittemetüülitud tsütosiiniga (C) bakteri-DNA mononukleotiidideks, mida edaspidi kasutatakse varuosadena faagi-DNA sünteesil. Faagi T4 enese DNA on selle degradatsiooni suhtes resistentne, sest tsütosiini asemel on faagi DNA-s juba faagi ensüümide poolt sünteesitud **5-hüdroksümetüültsütosiin** (ingl. 5-hydroxymethylcytosine, *HMC*), mis lisatakse faagi DNA genoomi replikatsiooni käigus. Faag sünteesib lisaks veel ka spetsiifilist valku, mis osaleb faagi genoomi replikatsioonil ja takistab C nukleotiidi lülitumist HMC asemele faagi DNA-sse.

Kuid ka bakterid püüavad end kaitsta võõra DNA eest. **Werner Arber** (snd. 1929) avastas, et mõningates *E. coli* tüvedes on faag T4 paljunemine takistatud. Selgus, et bakterid kodeerivad **endonukleaaside** e. restriktsiooniensüümide e. **restriktaaside** sünteesi. Restriktaasid avastati 1970. a. **Hamilton Smith**i (snd. 1931) ja **Daniel Nathans**i (1928–1999) poolt. Neile koos W. Arberiga anti nimetatud avastuste eest 1978. a. Nobeli preemia. Restriktaasid degradeerivad nii C-sisaldusega DNA ja harvemini ka HMC-sisaldusega DNA, sest nad tunnevad ära 4–6 bp pikkuseid DNA-järjestusi, kus põhjustavad DNA katkemisi, tekitades niiviisi kas **kleepuvate** või **tömpide DNA-otstega DNA-fragmente**. Edasist DNA degradatsiooni viib läbi rakusisene **eksonukleaas** *ExoV*. Raku enda DNA on aga samades restriktaaside äratundmissaitides spetsiifiliselt metüülitud, mistõttu peremeesraku DNA on ise kaitstud. Sellise bakterite kaitsesüsteemiga suudavad mõned faagid edukalt toime tulla. Näiteks faagide T2 ja T4 (mitte aga T6) DNA GATC-järjestuste adeniin on enamasti metüülitud positsioonis nr. 6. Metülatsiooni läbiviiv faagi ensüüm on valgu tasandil sarnane *E. coli* **Dam-metülaasiga**. *E. coli* tüves RI on restriktaas

***Eco*RI ja** sellele vastav **metülaas** (ingl. *methylase*), mis metüülib adeniini restriktaasi poolt äratuntavas järjestuses **GAATTC** (jn. 16.7). Viirused on aga evolutsioonis enamgi õppinud. Nad on kaitsestrateegia lahendanud selliselt, et viirusgeenid kodeerivad ensüümi **glükosüültransferaasi** (ingl. *glycosyltransferase*), mille abil lisatakse glükoosijääk HMC-jäägi hüdroksüülgrupile. **Glükosüülitud HMC**-na pole DNA enam restriktaaside suhtes tundlik. Järelikult on restriktsiooni-modifikatsiooni süsteemi bioloogiliseks funktsiooniks võõra DNA degradatsioon, faagid on aga evolutsiooni käigus õppinud selle süsteemi toimet vältima.



Joonis 16.7. Restriktsiooni-modifikatsioonisüsteem bakterites (restriktaas *Eco*RI näitel). Restriktaaside põhjustatud DNA fragmenteerumine spetsiifilistes äratundmissaitides, andes üheahelaliste kleepuvate lõppudega DNA. Metülaasid modifitseerivad (metüülivad) 4–6 bp pikkuseid restriktaaside äratundmissaite ja muudavad need restriktaaside suhtes resistentseks.

Levinumad on **tüüp I** ja **tüüp II restriktsiooni-modifikatsioonisüsteemid** (ingl. *restriction modification systems*). Esimesel juhul on tegemist ühe oligomeerse valguga, teisel juhul aga kahe geeni poolt kodeeritud kahe erineva valguga. **Tüüp III** restriktaasid on valgud, mis koosnevad kahe geeni (*mod* ja *res*) kodeeritud valgu alaüksustest ja mis funktsioneerivad DNA äratundmisel, **modifitseerimisel** (**Mod**) või **restriktsioonil** (**Res**). **Tüüp IV** restriktaasid on heterogeenne grupp ensüüme, koosnedes ühe või kahe geeni poolt kodeeritud valgust, mis erinevalt teistest lõikavad vaid modifitseeritud DNA-d.

Meeldejätmiseks

- Faag lambdal (λ) on rakus kaks alternatiivset olekut: lüütiline tsükkel, mis viib raku lüüsini ja faagiosade vabanemisele, ning lüsogeenne tsükkel, mille puhul faagi DNA on integreerunud bakteriraku kromosoomi.
- Faag lambda integreerub kromosoomi saitspetsiifilisel rekombinatsioonil seondumissaitide (*att*-saidid) homoloogsuse alusel.
- Integreerunud profaag lambda flankeerub 15-nukleotiidiliste *att*-kordusjärjestustega, mis on vajalikud profaagi nukleotiidi-täpsusega väljatulekuks kromosoomist.
- Bakteriofaag T4 on lüütiline faag, mis lüüsib infektsioonijärgselt *E. coli* rakke.
- Rakku tungiv faagide DNA muudetakse resistentseks faagide enda poolt kodeeritud nukleaasi suhtes tsütosiini hüdroksümetüülimisega 5-hüdroksümetüültsütosiiniks.
- Paarisarvulised T-faagid kaitsevad end rakuliste endonukleaasidele toime eest enda DNA glükosüülimisega.
- Restriktaaside (tüübid I–IV) restriktsiooni-modifikatsioonisüsteemide restriktsioonilised ja modifikatsioonilised funktsioonid on eristatud, nad esinevad kas erinevate valkude või ühe valgu erinevate alaüksuste koosseisus.

2.2. Geenide peenstruktuur

2.2.1. Faagilaigud

Faagilaikude morfoloogia (ingl. *phage plaque morphology*) on üks väheseid ja lihtsalt detekteeritavaid faagide fenotüübilisi tunnuseid, mida kasutatakse eelkõige geneetilistes uuringutes. Kui Petri tassi tardsöötmele on külvatud bakterirakud, milledest osa on nakatatud faagiga, siis nakatatud bakterirakud lüüsuvad, nakatavad vabanenud faagiosakestega kõrvalolevad bakterid, mis omakorda lüüsitakse ning protsess kordub mitmed tsüklid. Tulemuseks moodustub rakuvaba tsoon e. **faagilaik** (ingl. *phage plaque*). Sõltuvalt faagi ja bakteri genotüübist on faagilaikude morfoloogia erinev ning sõltub eelkõige kahe faktori funktsioonide koostoimest:

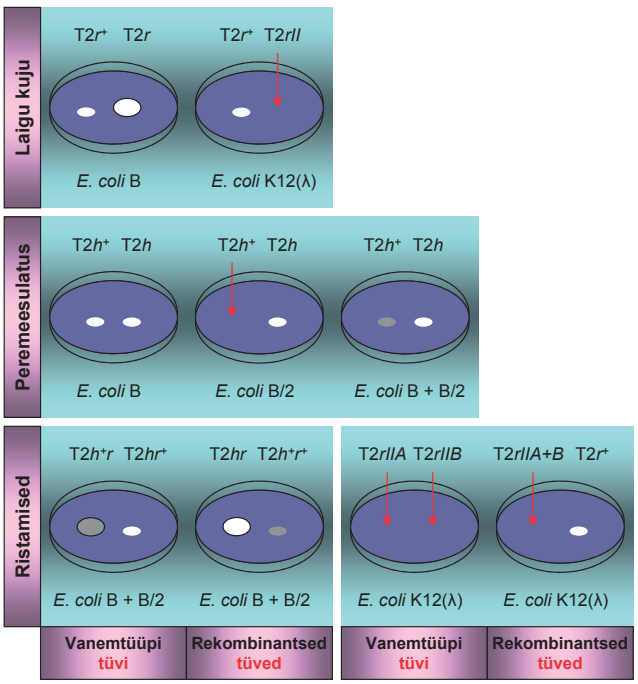
1) bakteri ja faagi füsioloogilisest interaktsioonist;
2) faagi genotüübist.

Faagi T4 morfoloogilised mutandid e. ***r*-mutandid** (ingl. *rapid lysis mutants*) on järgmised (jn. 16.8):

1) r^+ – metsiktüüpi faagid moodustavad väikesi säbruliste servadega laike;
2) r^- – faag moodustab suuri selgete servadega laike.

Teine lihtsalt jälgitav faagi fenotüüp on seotud faagi peremeeste ringiga e. **peremeesulatusega** (ingl. *host range*). Peremeesulatusega T2-faagi mutandid on võimelised infitseerima vaid ühtesid bakteritüvesid, mitte aga teisi (jn. 16.8). *Näiteks E. coli* tüve B rakud on infitseeritavad metsiktüüpi T-faagidega, bakteri mutantne tüvi B/2 on aga resistentne faagi T2 infektsioonile. Mutandil *E. coli* B/2 on mutatsiooni tagajärjel muutunud faagi T2 pinnaretseptor ja faag T2 ei saa enam rakupinnaga seonduda. Seevastu faagi

mutant T2*h* on võimeline infitseerima nii algtüve *E. coli* B, kui ka tema mutanti B/2. Ka faagi T2 ning tema mutandi T2*h* laikude morfoloogia on sarnane, kuid neid saab teineteisest eristada siis, kui infitseerida faagiga tüvede B ja B/2 segu, kus läbipaistvad laigud tekivad söötmel vaid nakatamisel mutandiga T2*h*. Faag T2-ga (tähistatakse T2h^+) nakatamisel on faagilaigud hägused, sest see faag lüüsib küll *E. coli* B-tüve rakud, kuid laikude territooriumil jätkavad kasvu tüve B/2 rakud, mis muudavad faagilaigu hägusaks.

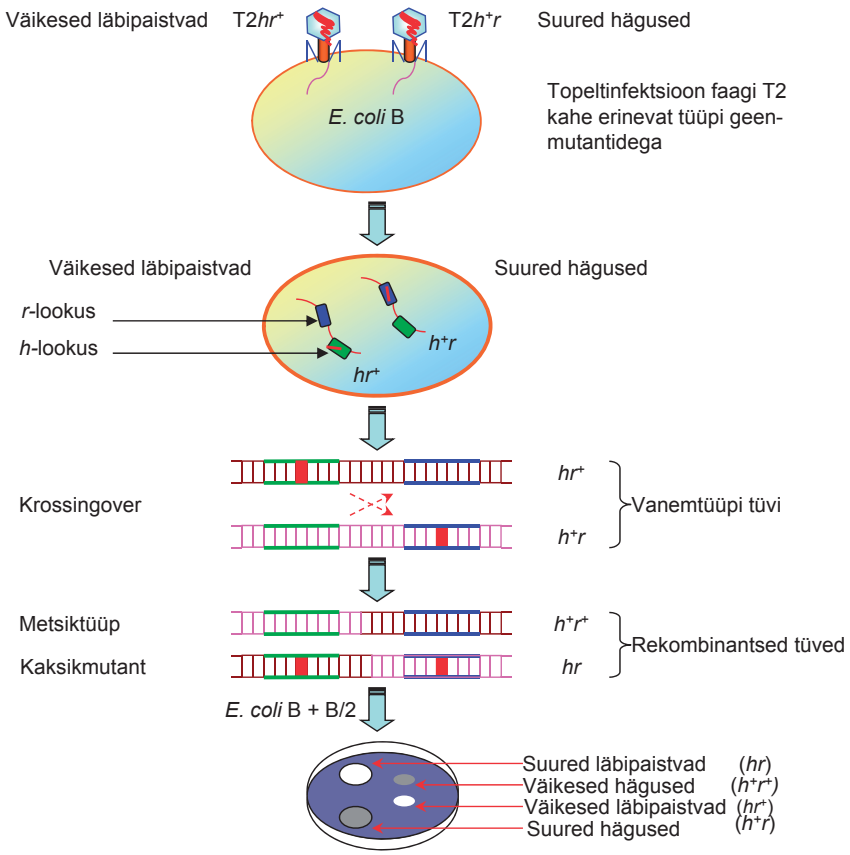


Joonis 16.8. Faag T2 fenotüübid. Metsiktüüpi faag T2r^+ – *E. coli* B Petri tassil väikesed säbrulised laigud; mutant T2*r* – *E. coli* B Petri tassil suured laigud; mutant T2*rII* – *E. coli* K12 (λ) Petri tassil laike ei teki. Peremeesulatusega mutant T2h^+ annab laike *E. coli* B tassil, aga ei anna laike mutant *E. coli* B/2-ga, kuid annab hägusaid laike kahe tüve (B+B/2) segul. *E. coli* tüvede B ja B/2 segu kahegeensel ristamisel annavad vanemtüüpi suured hägusad (T2h^+r) ja väikesed läbipaistvad (T2hr^+) faagid rekombinatsed suured läbipaistvad (T2*hr*) ja väikesed hägusad (T2h^+r^+) laigud. *rII*-mutantide ristamisel annavad *E. coli* K12 (λ) tüves geenisisese krossingoveri korral laike vaid metsiktüüpi faagid.

2.2.2. Rekombinatsioonanalüüs

1946. aastal avastasid **Max L. H. Delbrück** (1906–1981) ja **Alfred Hershey** (1908–1997) teineteisest sõltumatult faagide geneetilise rekombinatsiooni. Nad avastasid juhuslike mutatsioonide põhjustatud bakterite resistentsuse viiruste suhtes, mille eest said mõlemad 1969. a. koos **Salvador E. Luria**ga (1912–1991) Nobeli teaduspreemia. Mikroobitüve nakatamist kahe erineva faagiga nimetatakse **faagide ristamiseks**. A. Hershey nakatas *E. coli* B-tüve baktereid faagi T2 kahe mutantse tüvega (genotüübid h^+r ja $h\ r^+$) ning sai faagide järglaskonna, millega infitseeris bakteritüvede B ja B/2 segu (jn. 16.9). Selgus, et 98% faagide järglaskonnast olid vanemtüübiga, 2% olid aga rekombinantsed (h^+r^+ ja $h\ r$). See näitas, et faagi *h*- ja *r*-geenide vahekaugus on 2 geneetilise kaardi ühikut (vt. ptk V). Kõiki nelja tüüpi faagilaike eristati järgmiselt:

1) h^+r – suured hägusad;
2) $h\ r^+$ – väikesed selged;
3) h^+r^+ – väikesed hägusad;
4) $h\ r$ – suured selged.



Joonis 16.9. Faagi T2 laikude morfoloogia ja peremeesulatusega mutantide ristamisel toimuv geneetiline rekombinatsioon. *E. coli* B-rakkude topeltinfitseerimisel vanemtüüpi *h+r* (suured hägusad) ja hr^+ (väikesed läbipaistvad) faagidega saadakse *E. coli* B + B/2 segul lisaks vanemtüübile rekombinantsed suured läbipaistvad (*hr*) ja väikesed hägusad ($h^+ r^+$) laigud.

Käsitletud katse võimaldas teha veel kaks olulist järeldust.

1. Faagide rekombinatsioon on retsiprookne e. vastastikune protsess.
2. Faagide rekombinatsioon pole samane rakkudes toimuva kromosoomide meioo-tilise rekombinatsiooniga, sest faagidel ei ole meioosi.

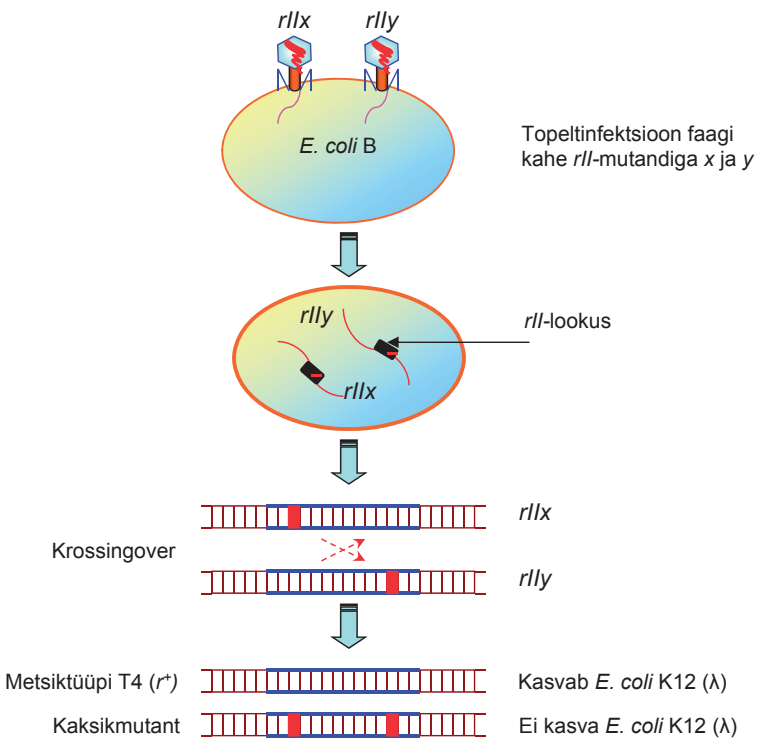
Retsiprooksus tähendab, et mõlemat rekombinantset faagiklassi on enam-vähem võrdselt. Teisel juhul võib toimuda faagidevaheline rekombinatsioon faagi elutsüklis suvalisel aja-momendil, mil faagiosakesed pole pakitud kapsiidi ning kus üksteisele võib järgneda mitu geneetilise vahetuse tsüklit.

1950. aastate keskel kaardistas **Seymour Benzer** (1921–2007) faagi T4 *rII*-lookuse kahe järjestikku paikneva geeni *rIIA* ja *rIIB* peenstruktuuri. Ta määras nende kahe geeni vahelise rekombinatsiooni alusel 2400 *rII* mutanti 304 erinevasse punkti e. **saiti**. Hilise-mates uurimustes lisandusid neile veel 4 saiti (seega kokku 308 saiti). Ta näitas, et geene saab eristada nii mutatsiooniliselt kui ka rekombinatsiooniliselt.

S. Benzer uuris kõrvutiasetsevaid *rII*-geene järgmistel põhjustel.

1. Faagi *rII* mutandid moodustavad suuri selgepiirilisi laike, mis on lihtsalt eristatavad metsiktüüpi T4-laikudest (väikesed hägusa servaga laigud).
2. Uued *rII* mutandid tekivad suhteliselt kõrge sagedusega (1 *r* : 100000 r^+ järglaskonna kohta e. 10^{-6}) ja mutageenidega saab tõsta sagedust veel ühe suurusjärgu võrra.
3. T4 *rII* mutandid ei kasva (on letaalsed), metsiktüüpi T4 faagid aga kasvavad tüves *E. coli* K12(λ).
4. Nii T4 *rII* mutandid kui ka metsiktüüpi T4 on võimelised kasvama *E. coli* tüves B.

Kaks sõltumatut *rII* mutanti ristati *E. coli* tüves B ning faagide järglaskonda analüüsiti *E. coli* tüves K12(λ), kus saavad kasvada vaid rekombinatsiooni tulemusel tekkinud metsiktüüpi faagid (jn. 16.10). Kasvada ei saa ei vanemtüübiga mutandid ega rekombinantsed kaksikmutandid. Oodatavalt oli rekombinatsioonisagedus väga madal, sest kaks kõrvutiasetsevat geeni paiknesid geneetilisel kaardil väga lähestikku, kuid kasutatud testsüsteem võimaldas neid hõlpsasti detekteerida. Kui kindla hulga faagidega nakatamisel ilmus K12(λ)-plaadil 20 faagilaiku, siis näitas see, et kokku oli moodustunud 40 rekombinanti, kuivõrd eeldataval retsiprooksel rekombinatsioonil tekkisid ka kaksikmutandid, kuid neid ei saa K12(λ) tüves määrata. Rekombinatsioonisageduse leidmiseks on



Joonis 16.10. Geenisisene krossingover faag T4 *rII*-mutantidel *E. coli* B-tüves. Geenisisesel rekombinatsioonil moodustuvad metsiktüüpi faagid ja kaksikmutandid. Metsiktüüpi (r^+) faagid T4 kasvavad, kaksikmutandid aga ei kasva *E. coli* K12 (λ) tüves.

vaja eelnevalt määrata **faagi tiiter** (ingl. *phage titre*), s.o. kui palju baktereid nakatavaid faage on ühes ruumalaühikus. Kui algset faagipreparaati oli lahjendatud 10^6 korda ja kui *E. coli* B-rakkude nakatamisel saadi 100 faagilaiku, siis oli algses faagipreparaadis 10^8 faagi (100×10^6). Meie näites, kus saime 40 rekombinantset faagi (metsiktüüpi ja kaksikmutanti) oli kahe mutandi vaheline rekombinatsioonisagedus $40/10^8 = 0{,}0000004$ e. 4×10^{-7}. Üldiselt väljendatult saame arvutada rekombinatsioonisageduse ja geenidevahelise kauguse geneetilisel kaardil järgmiselt:

$$\text{rekombinatsioonisagedus} = \frac{(2 \times \text{metsiktüüpi rekombinantide arv})}{\text{järglaslaikude koguarv}}$$

Geenide kaugus kaardil (rekombinantide %) = (2 x laikude arv *E. coli* tüves K12(λ)) / laikude arv *E. coli* tüves B x 100.

Leitud rekombinatsioonisagedus on veidi ülehinnatud, sest siin ei arvestata spontaansete revertantide tekke sagedust. Viimaste arv tuleks rekombinatsioonisagedusest maha arvata.

Meeldejätmiseks

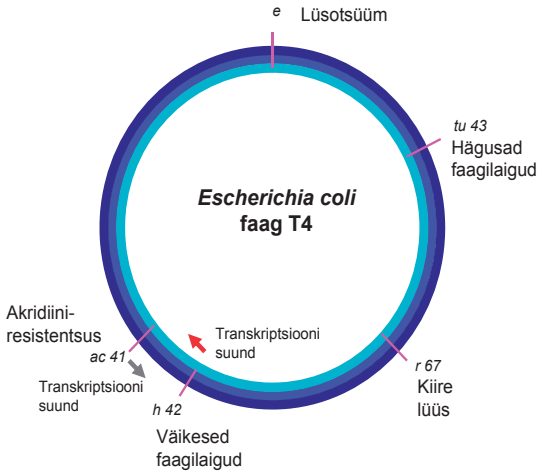
- S. Benzer kaardistas üle 2400 mutatsiooni faagi T4 *rII* lookuse 308 kindlasse saiti.
- Mutatsioonide ja rekombinatsiooni väikseim ühik on üks nukleotiidipaar.

2.3. Genoomi struktuur

2.3.1. Terminaalne redundantsus ja tsirkulaarsed permutatsioonid

Faag T4 kogu geneetiline info paikneb ühes lineaarses DNA-molekulis. Tavaliste kahefaktoriliste mutantide ristamistel ja rekombinatsioonisageduste jälgimisel leiti, et peremeesulatusega mutatsioon *h*42, akridiiniresistentsust määrav mutatsioon *ac*41 ja faagi laigu kuju määrav mutatsioon *r*67 peavad asetsema faag T4 geneetilisel kaardil järjekorras *h*42 – *ac*41 – *r*67. Ent andmete kontrollil kolmefaktorilistes ristamistes saadi samade geenide puhul teistsugune järjestus: *ac*41 – *h*42 – *r*67. Vastuolu on lihtsalt lahendatav, kui muuta faag T4 kromosoom ringikujuliseks (jn. 16.11). Ringikujulisel kaardil, alustades geenist *ac*41 ja liikudes kellaosutile vastupidises suunas, saadi, et mutatsioon *h*42 on kaardil tõepoolest mutatsioonide *ac*41 ja *r*67 vahel – sarnaselt kolmepunktilisel ristamistel saadud tulemustega. Kui alustada ringikujulisel kaardil aga mutatsioonist *h*42 ja liikuda kellaosuti liikumise suunas, siis saadakse järjestus *h*42 – *ac*41 – *r*67 – nii nagu kahepunktilisel ristamisel. Küsimus on selles, kuidas moodustub faagi T4 tsirkulaarne geneetiline kaart faagi lineaarsest DNA-st.

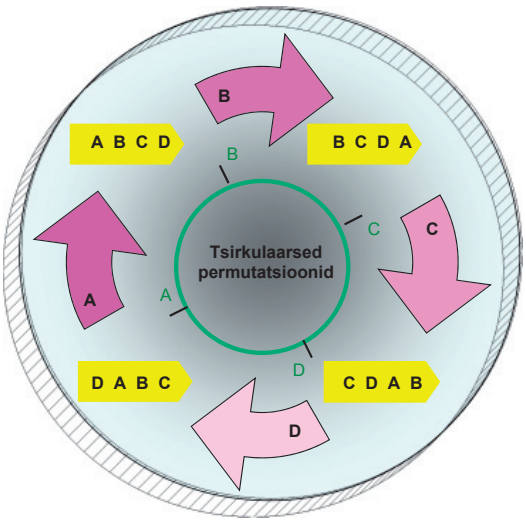
1960. aastate keskel oletas **George Streisinger** (1927–1984), et faagi T4 kromosoom on **otsmiselt korduv** e. **terminaalselt reduntantne** (ingl. *terminally redundant*) ja **tsirkulaarselt** e. **rõngasjalt permuteerunud** (ingl. *circularly permutated*). Järgnevalt leidsid mõlemad hüpoteesid kinnituse.



Joonis 16.11. *E. coli* faag T4 geenide *ac41–h42–r67* lugemisjärjestus ringikujulisel kromosoomil. Mutantsed alleelid: *e* (endolüsiin = lüsotsüüm); *tu* (hägused laigud); *r* (kiire lüüs); *ac* (akridiiniresistentsus). Transkriptsioon kellaosuti liikumise suunas (punane nool), alates *h42*-st saame geenide järjestuse *h42–ac41–r67*. Transkriptsioon kellaosuti liikumisele vastassuunas (hall nool), alates *ac41*-st saame geenide järjestuse *ac41–h42–r67*.

Terminaalselt redundantsed DNA-molekulid sisaldavad lineaarse molekuli mõlemas otsas täpselt samu nukleotiidijärjestusi. Näiteks järjestusel AAGGCCTTGACTA…….. TACGTAAGGCCTT on identsed järjestused – AAGGCCTT.

Tsirkulaarselt permuteerunud DNA-molekulid saadakse lineaarsete järjestuste väljalõikamisel rõngasjast DNA-st, kui lineaarse DNA lõikude väljalõikamiskohad rõngakujulises DNA-s jaotuvad juhuslikult (jn. 16.12).



Joonis 16.12. Faag T4 tsirkulaarsed permutatsioonid. Rõngasjas, kordistunud faagi DNA lõigatakse lineaarseteks DNA-molekulideks. Erinevate lõikekohtade tõttu tekivad erinevad DNA-molekulid, mis sisaldavad samu geene, kuid erinevaid fragmendi algusgeene.

Kõikides faagi T4 kromosoomides on samad geenid, kuid erinevad korduste otsmised järjestused (geenid). Järelikult on **tsirkulaarselt permuteerunud** DNA-molekulid samal ajal ka **terminaalselt redundantsed**, näiteks:

abcdef …….xyzabc;
defghi ……. xyzabcdef;
ghijkl ……. xyzabcdefghi;
jne.

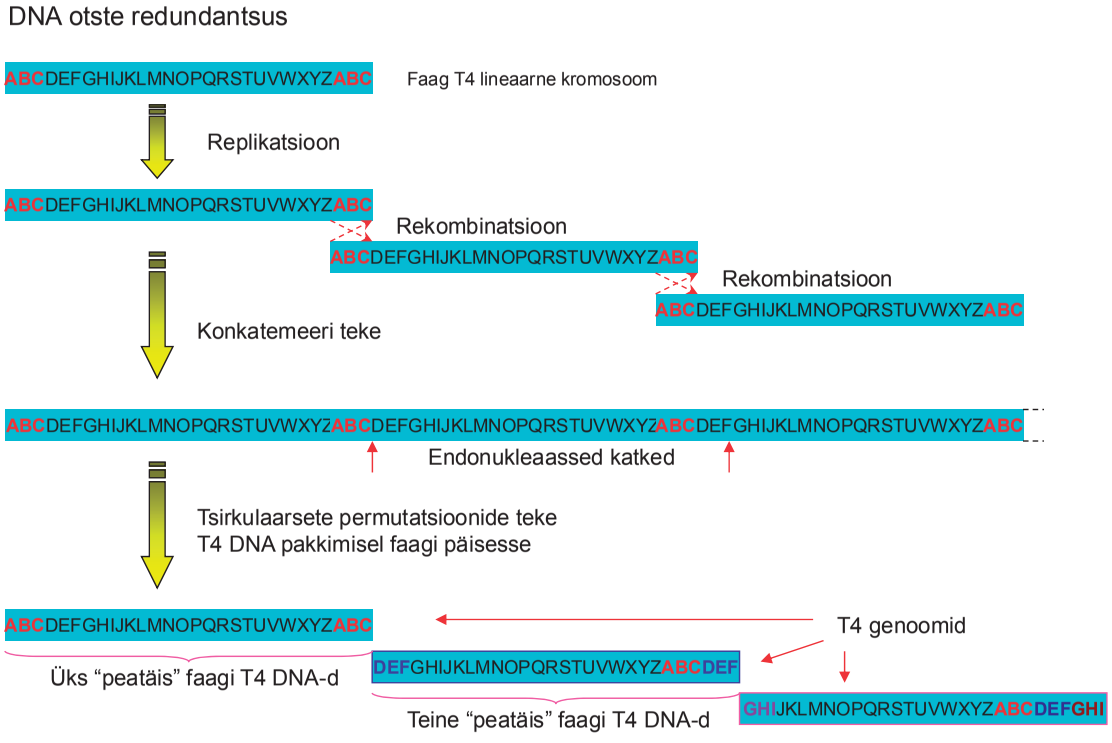
Seega on näiteks segment *d* kord lineaarse DNA-molekuli otsas, teinekord aga DNA-molekuli keskel.

Kuidas saab aga vanem-DNA, mis on näiteks redundantne *abc*-lõigus, moodustada *def*, *ghi* jne redundantsete otstega lineaarseid DNA molekule? Vastus seisneb T4 replikatsiooni eripäras ning selles, kuidas faagi T4 DNA pakitakse faagi päisesse. T4 DNA replikatsioonil rekombineeruvad terminaalselt redundantsete lõikude homoloogia alusel erinevad lineaarsed DNA-d, moodustades pika DNA ühendmolekuli, mida nimetatakse **konkatemeeriks** (ingl. *concatemers*). Konkatemeer sisaldab rea faagi T4 genoome, mis on üksteisega ühendatud ilma otsmisi korduseid kasutamata **pea-saba tüüpi mehhanismi** alusel (jn. 16.13).

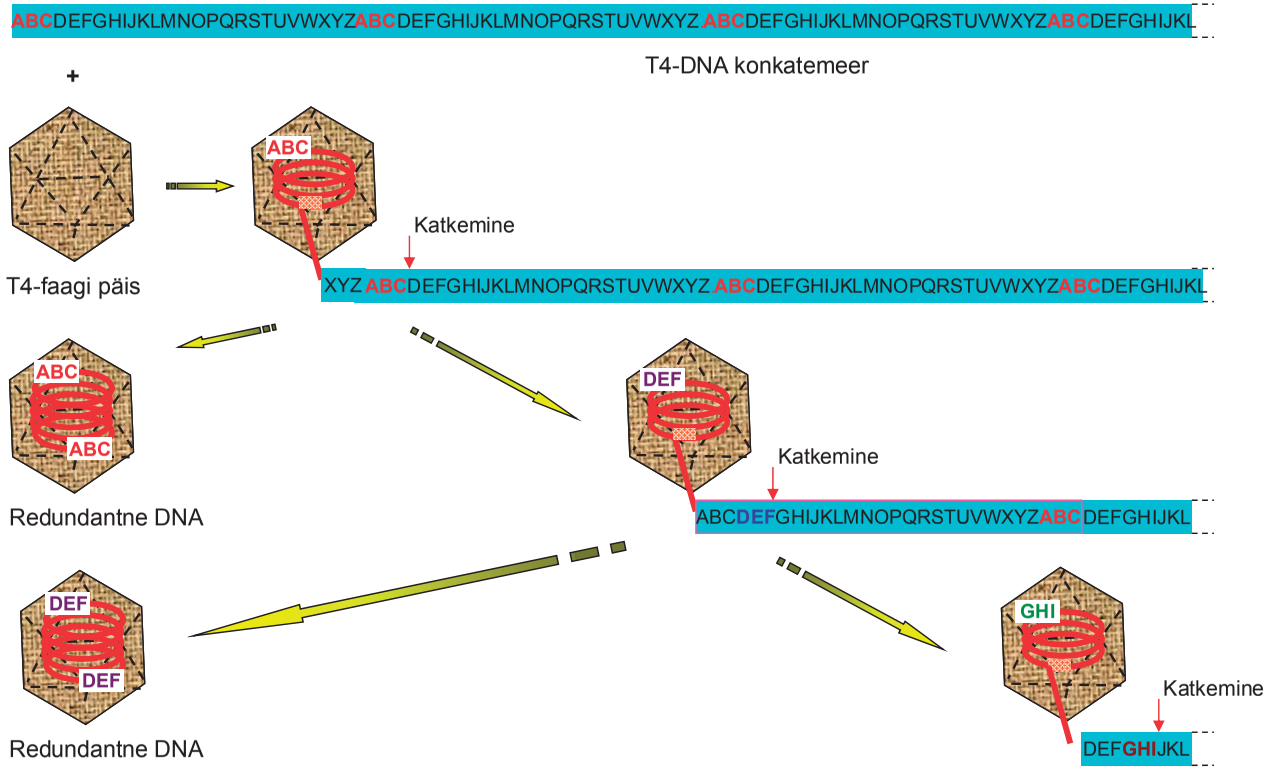
Faagi DNA pakkimine päisesse käib nii, et pakkimine võib alata suvalisest nukleotiidist (s.t. erinevalt enamikust viirustest puudub paarisarvulistel T-faagidel pakkimissignaal) ja see toimub seni, kuni päis on DNA-d täis. Kui lisada faagi DNA-le mingi uus DNA-lõik, peab faag pakkimisel tavaliselt kaotama sama suure lõigu oma DNA-d. Faagi päisesse lihtsalt ei mahu rohkem DNA-d. Faag T4 puhul esineb olukord, kus faagi päisesse mahub DNA-d veidi rohkem kui faagi enda genoom. Kui konkatemeeris on geenid lineaarselt järjestuses *abc ……..xyz*, siis pakitakse faagi päisesse seesama järjestus ning sellele lisatakse järgmisest järjestusest esimesed *abc*-järjestused. Järelejäänud DNA algab nüüd juba järjestusega *def* ja faag T4 genoomi kokkupakkimise järel lisandub redundantselt kolmandast lõigust korduspiirkond *def* jne. (jn. 16.14). Sellist DNA pakkimismehhanismi nimetatakse **täispäismehhanismiks** (ingl. *headful mechanism*). Sama mehhanism esineb ka näiteks faagidel T2, T6 ja P1.

2.3.2. Faagide heterosügootsus

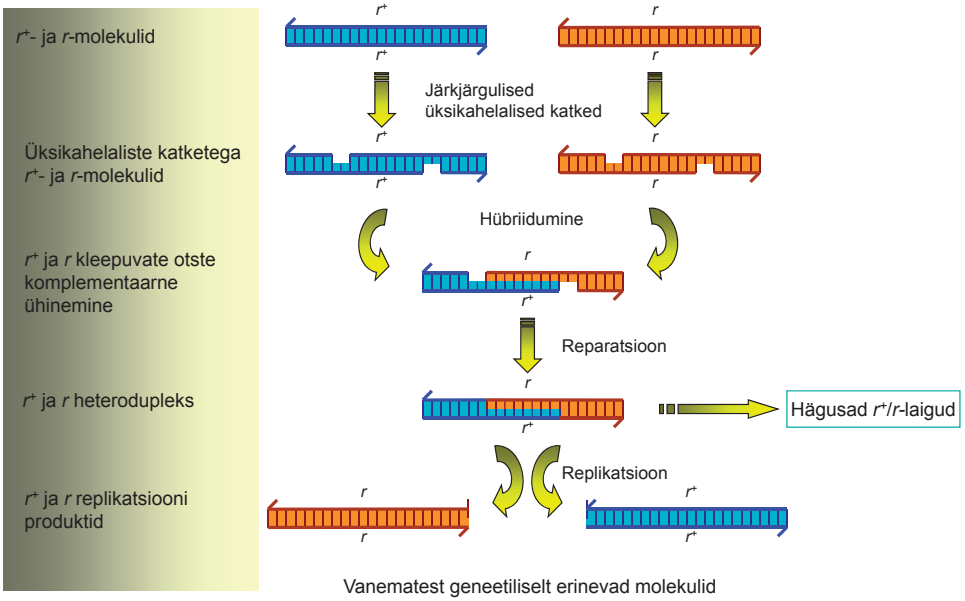
Kui mitte arvestada mõnede faagide DNA-molekulide lõppudes olevaid redundantseid geene, on kõik faagi geenid ühealleelsed. 1951. a. näitasid **Alfred Hershey** ja **Martha Chase** (1927–2003), et mõningatel juhtudel ilmneb faagidel heterosügootsus. Faagil T2 esines *r*- ja r^+-faagide ristamistel faagilaike, millel olid samal ajal nii vanema kui ka mutandi omadused, neil olid nn. **hägusad laigud** (ingl. *mottled plaques*). Selliseid laike moodustavatel faagidel peavad olema esindatud korraga mõlemad alleelid. Selgus, et faagi *r*- ja r^+-DNA rekombinatsioonil võivad vaheetapis *r*-lookuses moodustuda heteroduplekside, kus üks DNA-ahel sisaldab *r*-alleeli, teine aga r^+-alleeli (jn. 16.15). **Heteroduplekside** (ingl. *heteroduplex*) sisaldava DNA-molekuli replikatsiooonil toimub lahknemine ja üks tütarmolekul omandab *r* ning teine r^+.



Joonis 16.13. Konkatemeerse replikatiivse faag T4 kromosoomi moodustumine pea–saba tüüpi rekombinatsioonil ja endonukleaassel väljalõikamisel terminaalselt redundantsete piirkondadega tsirkulaarselt permuteerunud faagi DNA teke. Konkatemeer: sama genoomi lineaarsed kordused. Terminaalne redundantsus: faag T4 lineaarse kromosoomi otstes on otsekordused. Tsirkulaarsed permutatsioonid: lineaarsetes DNA-molekulides on samad faag T4 geenid, mis moodustuvad tsirkulaarsest molekulist, kuid neil on erinevad otsmised kordused (ABC, DEF, GHI jne.).



Joonis 16.14. Tsirkulaarselt permuteerunud terminaalselt redundantsete T4-kromosoomide moodustumine täispäismehhanismi alusel.



Joonis 16.15. Heterodupleks-molekulide moodustumine faag T2 rekombinatsioonil ja geneetiliselt erinevate molekulide teke ühest vanemmolekulist (mudel). Kahe DNA-molekuli rekombinatsioonil moodustub rekombinantne molekul, mis sisaldab *r*-alleeli ühes ahelas ja r^+-alleeli teises ahelas. Heterodupleks-DNA-molekuliga faagiosake annab hägusaid r^+/*r*-laike.

Meeldejätmiseks

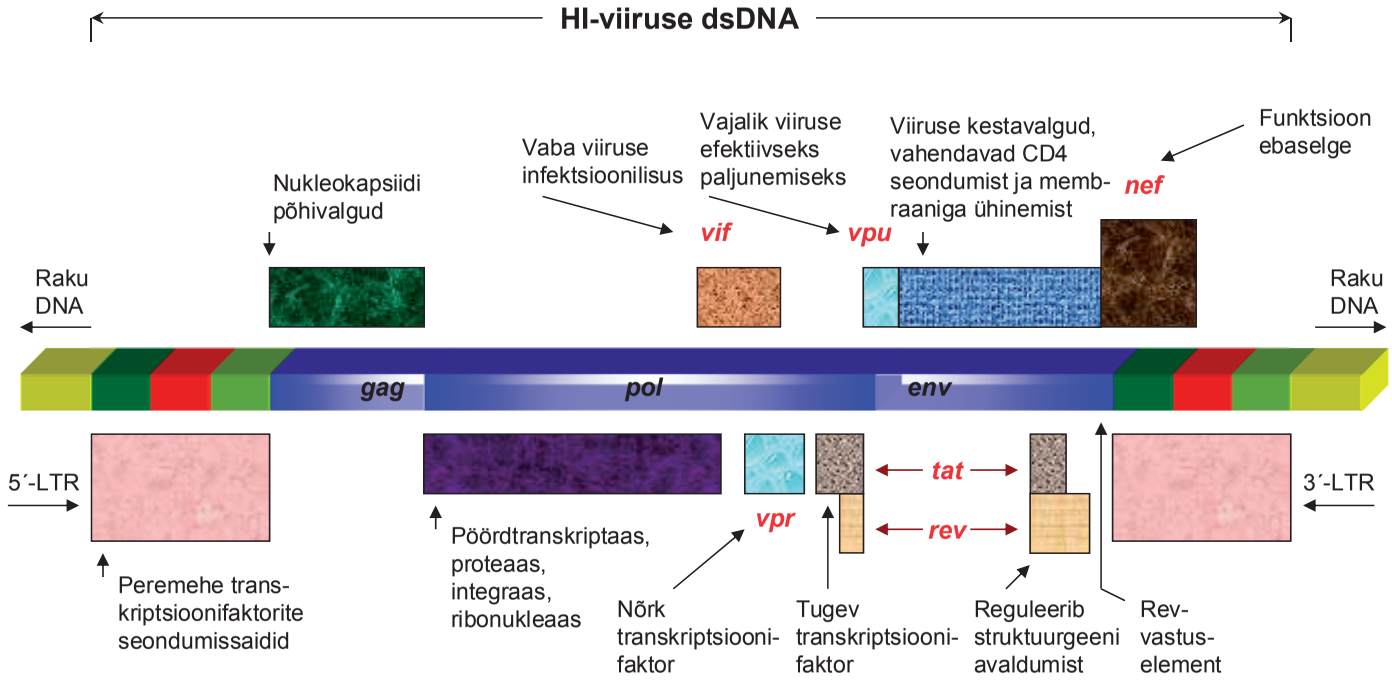
- Faagil T4 on ringikujuline geneetiline kaart, kuid lineaarne kromosoom.
- Faag T4 moodustab ringikujulise geneetilise kaardi, kuna T4 kromosoom on terminaalselt redundantne ja tsirkulaarselt (ringjalt) permuteerunud.
- Kaksikahelalise DNA-molekuli katkemisel võivad moodustuda üksikahelalised otsad, mis komplementaarsuse põhimõttel paardumisel moodustavad DNA heterodupleksi, kus DNA üks ahel sisaldab ühe ja teine teise alleeli geneetilist infot.

3. EUKARÜOOTIDE VIIRUSED

Alljärgnevalt käsitleme eukarüootsetest viirustest kolme geneetiliselt enim uuritud viirust. Nendeks on AIDS-i, grippi ja nahakasvajaid (papilloome) põhjustavad viirused.

3.1. AIDS-i põhjustav viirus – HIV

1981. aastal täheldati USA-s homoseksuaalsetel meestel immuunpuudulikkusest tingitud fataalse lõpuga kopsupõletiku juhtusid, mille oli põhjustanud parasiit *Pneumocystis carinii*. Normaalse immuunsüsteemiga inimesed sellest parasiidist põhjustatud kopsupõletikku ei haigestu. Haigussündroomi hakati nimetama **AIDS**-iks ja haigust põhjustavat



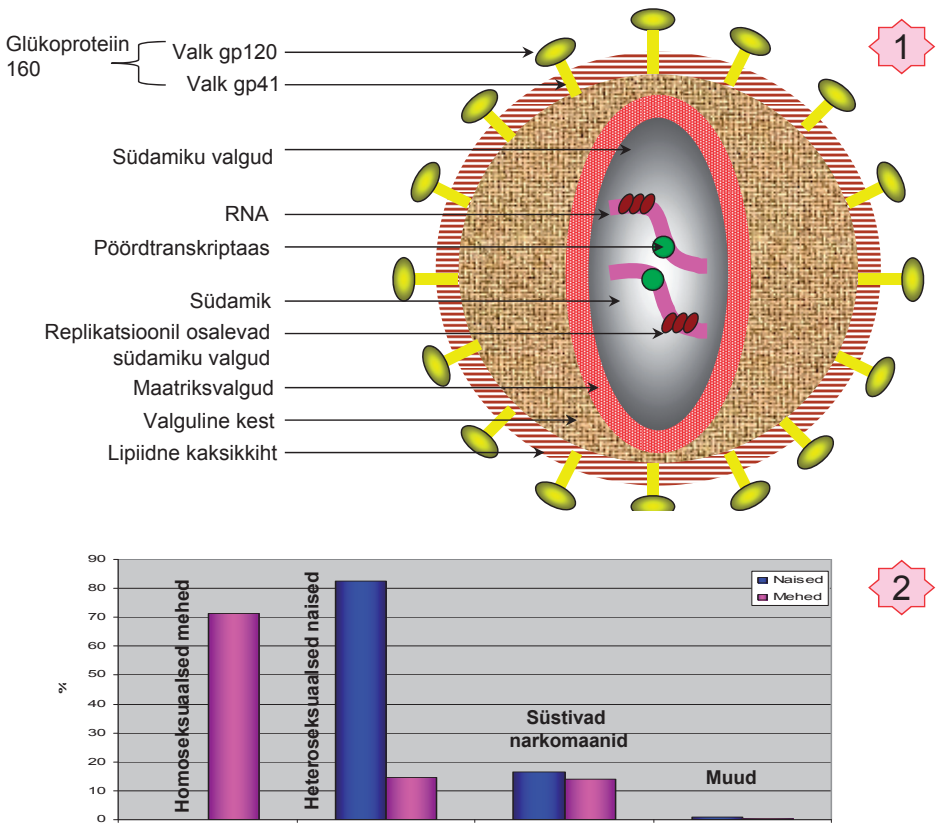
Joonis 16.16. Peremeesraku kromosoomi integreerunud HI-viiruse (inimese immuunpuudulikkuse viirus) geneetiline kaart. *gag*, *env*, *pol* – viiruse struktuurgeenid. *nef*, *rev*, *tat*, *vif*, *vpr*, *vpu* – regulatoorsed geenid. HIV-valgud, mis on seotud viiruse paljunemise ja assambleerimisega ning mis on kõigil retroviirustel (*gag* – kapsiidivalk, *env* – viirusümbrise glükoproteiin; *pol* – pöördtranskriptaas ja integraas).

RNA **retroviirust HIV**-ks. Edasi levis viirus pandeemiliselt. Sajandivahetusel oli maailmas juba 30 miljonit sellesse viirusesse nakatunud inimest, kusjuures mõnedes Aafrika piirkondades (Tansaania jt.) on nakatunud iga neljas täiskasvanu. HIV levib vere kaudu otsesel kontaktil (nii homoseksuaalide kui ka veenisiseseid süste tegevate narkomaanide vahel) (jn. 16.16; jn. 16.17). Käesoleval sajandil levib viirus üha rohkem ka heteroseksuaalidel. USA-s püsib siiski juba 10 viimast aastat AIDS-i uusnakatumiste sagedus samal tasemel (*ca* 40 000 juhtu aastas).

3.1.1. Genoom

HIV-i genoom on veidi alla 10 kb suurune (jn. 16.16). Nagu teistelgi retroviirustel on HIV-i genoomis kolm ühisgeeni (s.t. geeni, mis on kõigil retroviirustel). Need on järgmised:

gag – määrab kapsiidivalgu;
pol – määrab pöördtranskriptaasi, integraasi ja ribonukleaasi;
env – determineerib viiruse ümbrises asuva glükoproteiini.



Joonis 16.17. Inimese immuunpuudulikkuse viiruse (HIV) struktuur (1) ja levik 2007. a. USA-s riskigruppides (2). Viiruse südamik sisaldab geneetilist materjali (2 ssRNA-molekuli) ja replikatsiooni läbiviivaid valke. Valguline kapsiid on ümbritsetud peremeesrakust pärit lipiidse kaksikkihilise membraaniga. Viirusspetsiifilised valgud (glükoproteiin 160) paiknevad membraani süvistatult. AIDS-i leviku riskigrupid on homoseksuaalsed mehed ja süstivad narkomaanid.

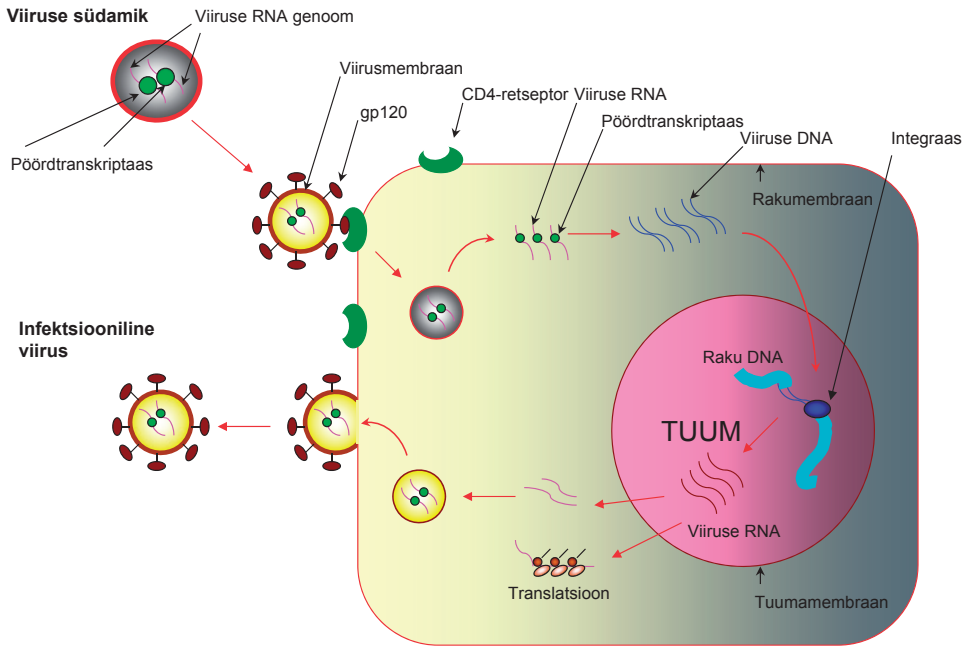
HIV-i genoomis on veel 6 regulaatorvalku kodeerivat regulaatorgeeni (*nef, rev, tat, vif, vpr, vpu*). Geenidest väljapoole jäävad HIV-proviiruse pikad **lõpmised kordusjärjestused** e. **LTR**-id. LTR-id sisaldavad kindlaid piirkondi (elemente) transkriptsioonifaktorite seondumiseks. HIV-geenid kattuvad osaliselt üksteisega (nagu mõned geenid bakteriofaagil ΦX174).

3.1.2. Struktuur ja elutsükkel

HIV-virioon on sfääriline ja sisaldab halvasti väljendunud **ikosaeedrilise** kujuga viiruskapsiidi. Viiruskapsiid on kaetud lipiidse membraaniga, mis on pärit infitseeritud peremeesrakust (jn. 16.17). Lipiidsest membraanist ulatuvad välja **pulgakommikujulised moodustised** (ingl. *lollipop structures*), millede tüviosa on 41 kd suurune valk (tähistatakse **gp41**) ja peaosa 120 kd suurune valk (tähistatakse **gp120**). HIV-i genoomiks on kaks identset RNA-molekuli, mis on koos pöördtranskriptaasiga pakitud viiruskapsiidi. HIV-infektsioonil toimub HIV-i spetsiifiline seondumine tema **gp120-valgu** abil helper-T-rakkude membraanil asuvate **CD4-retseptoritega**. Kuivõrd helper-T-rakkude funktsiooniks on aktiveerida organismi teisi immuunsüsteemi rakke, siis helper-T-rakkude inaktiveerimise ja hävitamisega lakkabki organismi immuunsüsteemi normaalne funktsioneerimine. Lisaks asuvad CD4-retseptorid ka teist tüüpi immuunrakkudel, makrofaagidel. Raku nakatamiseks HIV-iga on vajalikud ka abiretseptorid (CCR5, CXCR4). Kui HIV-virioonid on rakuga seondunud, siis liitub tema membraan rakumembraaniga ja viiruskapsiid koos temas paikneva RNA ja ensüümidega siseneb raku tsütoplasmasse.

Rakku sisenenud viiruskapsiidis paikneva viiruse RNA-molekulilt sünteesitakse pöördtranskriptaasi abil viiruse kaksikahelaline DNA (dsDNA), mis vabaneb kapsiidi valkudest, siseneb tuuma ja integreerub ensüümi integraas abil peremeesraku juhuslikesse DNA punktidesse (jn. 16.18). Integreerunud viirus-DNA-lt toimub peremeesraku RNA polümeraasi abil transkriptsioon, mille tulemusel saadakse suures koguses nii viiruse mRNA-sid kui ka viiruse genoomse RNA koopiaid. Rakus moodustuvad uued assambleeritud viiruspartiklid, mis rakust välja pungudes kattuvad membraaniga ning infitseerivad uusi CD4-retseptoritega rakke.

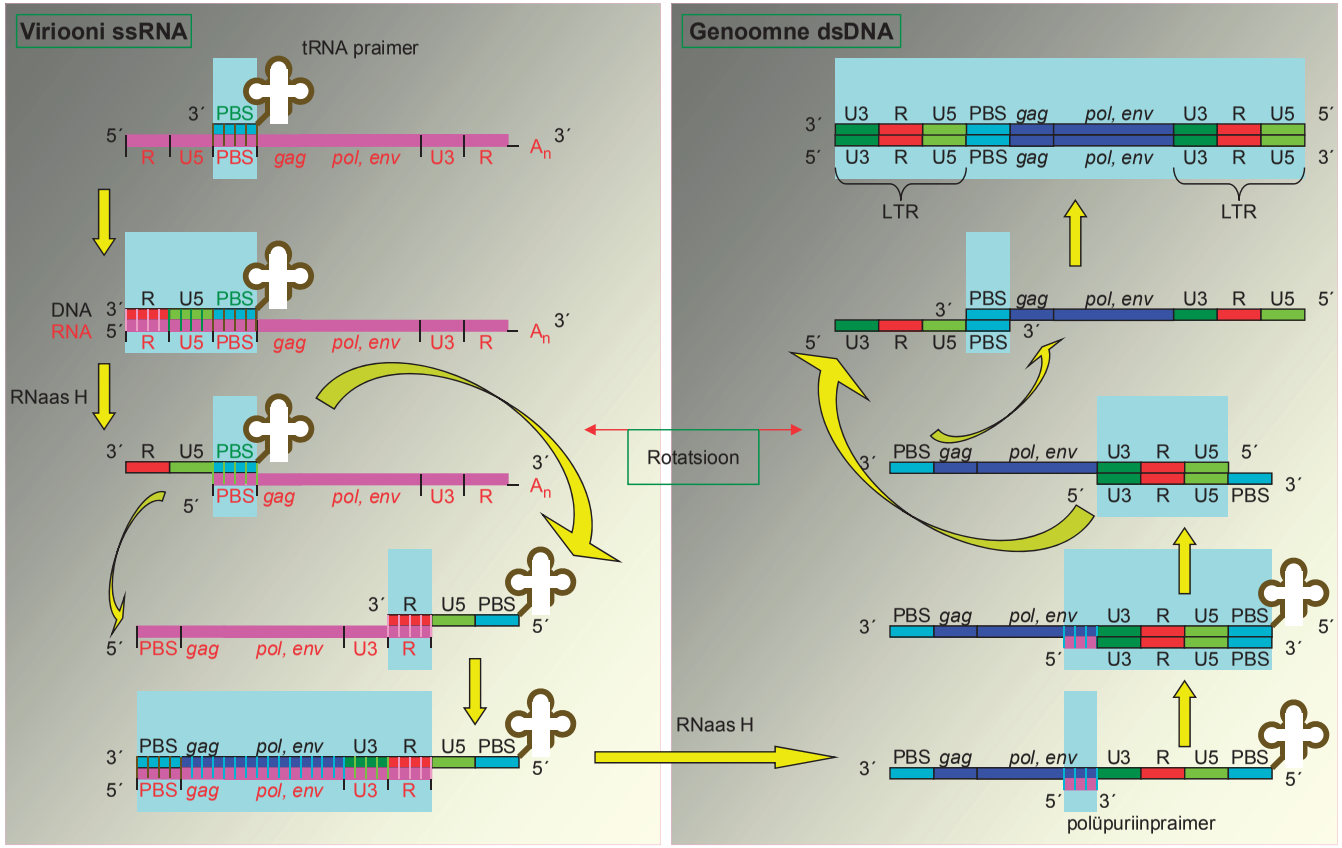
DNA süntees HIV-genoomselt RNA-lt on mitmeetapiline protsess (jn. 16.19). Kõigepealt sünteesib pöördtranskriptaas RNA-ga komplementaarse üksikahelalise DNA. Genoomse RNA **praimeri seondumise saiti** e. **PBS-i** (ingl. *primer binding site*) on seondunud sellega komplementaarse järjestusega tRNA, mis asub koos viiruse genoomiga kapsiidis ja on seega tulnud rakku prehübriidunult koos viiruse genoomse RNA-ga. Pöördtranskriptaas kasutab seda **tRNA-d praimerina**, et sünteesida molekuli 3′-ots kaksikahelaliseks. Järgnevalt degradeerib **ribonukleaas H** (**RNaas H**) RNA-DNA dupleksis oleva RNA. DNA koopia kordusjärjestus paardub genoomse RNA 3′-otsas asuva **kordusjärjestusega R.** Seejärel „hüppab" DNA R-piirkond HIV-i RNA 5′-otsast HIV-i RNA 3′-otsa. Seepärast saab DNA süntees jätkuda eelnevalt sünteesitud DNA 3′-osalt, kasutades matriitsina HIV-i RNA 5′-regiooni. Järgnevalt degradeerib RNaas H RNA-DNA dupleksist RNA, v.a. spetsiifiline **polüpuriiniala**, mis koosneb kümmekonnast A- ja G-jäägist ja mida kasutatakse praimerina teise DNA-ahela sünteesil. Süntees toimub jällegi kaheetapiliselt, nii et algul sünteesitakse genoomist 3′-pool, kõrvaldatakse RNA praimer ja tRNA ning seejärel toimub hüpe, s.t. teise DNA-ahela 3′-otsas olev PBS hübriidub temale komplementaarse PBS-ga esimese DNA-ahela 3′-otsas, kusjuures mõlemad



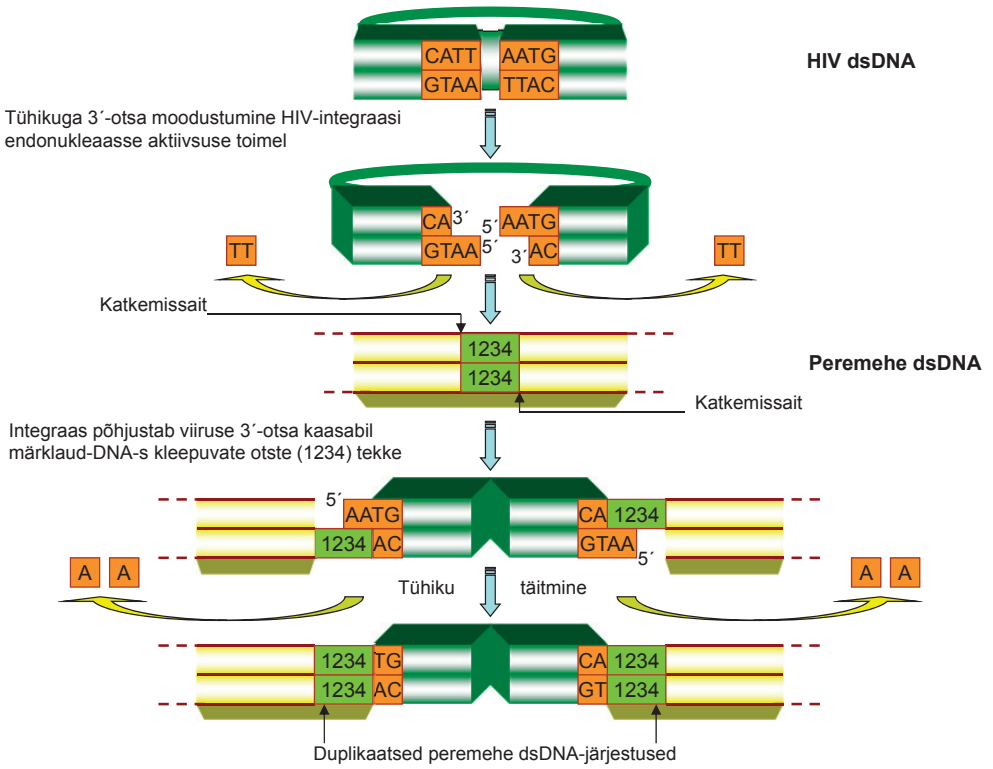
Joonis 16.18. Inimese immuunpuudulikkuse viiruse (HIV) elutsükkel. Viirusvalk gp120 ja raku CD4 retseptorvalk interakteeruvad ja viirus saab tungida rakku. Pöördtranskriptsioonil sünteesitakse viiruse dsDNA, mis integreerub raku DNA-ga. Viiruse dsDNA-lt sünteesitakse viiruse ssRNA, mis liigub peremeesraku tsütoplasmasse, kus teda transleeritakse ja kasutatakse uute viirusosakeste assambleerimisel. Viirusosakesed väljutatakse rakust ja kaetakse rakumembraaniga (ümbrisega).

käituvad praimeritena. Lõpptulemusel tekib kaksikahelaline DNA, mille mõlemates otstes on sünteesitud **pikad otsmised kordusjärjestused** e. **LTR**-id (ingl. *long terminal repeats*).

HIV-DNA integreerumisel raku genoomi põhjustab endonukleaasse aktiivsusega **integraas** LTR-desse üksikahelalisi katkeid, mille tulemusena tekivad DNA kleepuvad otsad, kus 3′-otsad on kahe nukleotiidi võrra lühemad kui 5′-otsad, s.t. esinevad **3′-tühemiga otsad** (ingl. *3′ recessed ends*) (jn. 16.20). 3′-otste kaudu atakeeritakse **märklaud-DNA** (ingl. *target DNA*) fosfodiestersidemeid, mistõttu need katkevad, moodustuvad üksikahelalised DNA otsad, mis seejärel taasühinevad viirus-DNA-ga. Seega tekivad uued fosfodiestersidemed HIV-i DNA 3′-otste ning peremeesraku 5′-fosfaatide vahel. Üksikahelalised alad täidetakse raku DNA reparatsiooniensüümide poolt, ligeeritakse kokku ning lõpptulemusel ongi HIV-i DNA kovalentselt seotud peremeesraku genoomi. Erinevalt faag lambdast ei välju HIV-i (ega teiste retroviiruste) DNA integreeritud seisundist, vaid jääb sellesse olekusse alatiseks. Kui integreerumine toimus sugurakkude kromosoomidesse, pärandub selline RNA-viiruse pöördtranskriptsioonil tehtud DNA-koopia peremehe järglastele. Sellisel viisil päranduvat peremeesraku genoomis olevat retroviirust nimetatakse **endogeenseks retroviiruseks** (ingl. *endogenous retrovirus*).



Joonis 16.19. HI-viriooni ssRNA konversioon dsDNA-ks integreerituna peremeesraku kromosoomi. 1. Pöördtranskriptaas ja primer-tRNA on viiruspartiklis seondunud viiruse genoomse ssRNA-ga. 2. Pöördtranskriptaas teostab DNA-ahela sünteesi RNA matriitsilt. R – kordusjärjestus; U5 ja U3 – unikaalsed järjestused 5′- ja 3′-otstes; PBS – praimeri seondumissait; An – polü(A)-saba; *gag*, *pol* ja *env* – viirusvalkude geenid; polüpuriinpraimer; puriinide A- ja G-rikas ala; LTR – pikk terminaalne kordusjärjestus.



Joonis 16.20. HI-viiruse dsDNA integratsioon peremeesraku kromosoomi.

Kui inimene on nakatunud HIV-iga, järgneb mõnekuuline akuutne faas, mille vältel nakatanul on palavik, pea- ja liigesevalud ning nakatanu veres leidub palju HIV-partikleid. Järgnevalt viirus lokaliseerub. HIV-partiklite arvukus veres väheneb ja haigussümptomid kaovad ning viirus lokaliseerub lümfisüsteemi. Latentne periood kestab tavaliselt 8–10 aastat ning selle perioodi vältel on organism ise võimeline HIV-partikleid hävitama. Lõppfaas tekib siis, kui 75% helper-T-rakkudest on hävinud ning organismi immuunsüsteem ei suuda enam viiruse vastu võidelda. Immuunsüsteemi puudulikkuse tõttu võib organism hukkuda ka nn. lihtsatesse nakkustesse haigestumisel (nagu kopsupõletik). Tänapäeva ravimid võimaldavad viirusnakkuse latentset perioodi pikendada. Samuti on osa inimesi mõnede HIV-geneetiliste haiguste vastu resistentsed. Neil isikutel võib olla näiteks homosügootses olekus deletsioon T-abirakkude abiretseptori CCR5 alleelis.

Meeldejätmiseks

- Retroviiruse genoom on diploidne üksikahelaline RNA, milles on vähemalt kolm geeni: *gag* (kodeerib viiruskapsiidi valku), *pol* (kodeerib pöördtranskriptaasi/integraasi valke) ja env (kodeerib viiruse lipiidsesse kesta sängitatud valku).
- Inimese retroviirus HIV infitseerib immuunsüsteemi rakke ja põhjustab eluaegse haigestumise AIDS-i.

- Retroviiruste geneetilise materjali sisenemisele peremeesraku kromosoomi eelneb pöördtranskriptsioon, mille käigus sünteesitakse proviiruse DNA mõlemasse otsa pikad terminaalsed kordusjärjestused e. LTR-id.

3.2. Gripiviirus

3.2.1. Seagripp H1N1

Gripp A viirused, eelkõige aga selle **alatüüp H1N1,** on inimesel kõige sagedamini esinevad gripiviirused. Alatüübi nimetus tuleneb viirusel esinevast kahest pinnaantigeenist: **hemaglutiniini tüübist H1** ja **neuraminidaasi tüübist N1**. Nimetatud viirustüübi erinevate tüvede levik võib olla nii **endeemne** (lokaalne) kui ka **pandeemne** (ülemaailmne). Mõned tüved põhjustavad grippi inimesel, teised H1N1 tüved levivad sigadel (seagripp) või lindudel (linnugripp). Juunis 2009 määratles **Maailma Tervishoiuorganisatsioon** (ingl. *World Health Organization, WHO*) sigadelt pärit H1N1-tüve pandeemse levikuga gripiviiruse uueks tüveks. Seda esmalt USA-s isoleeritud gripiviirust nimetatakse meedias ka seagrippi põhjustavaks viiruseks. Tegelikult koosneb see viirustüvi nelja erisuguse gripiviiruse genoomi osadest – Põhja-Ameerika seagripi, Põhja-Ameerika linnugripi, inimese gripi ning Aasia/Euroopa seagripi viiruse geneetilistest elementidest. Seejuures on kõik neli sama H1N1-alatüübi erinevad tüved. Rekombinantse viirustüve geneetilisel iseloomustamisel selgus, et viiruse 9 geenist oli **hemaglutiniinigeen** sarnane 1999. aastani Ameerikas levinud seagripi viiruse omaga, **neuraminidaasi-** ja **maatriksvalgugeenid** aga nüüdisaegse Euroopa seagripi omaga ja ülejäänud geenidest 6 olid sea-, linnu- ja inimesegripi viirustüvede geenide segu. Sellise geneetilise ülesehitusega gripiviirust polnud varem isoleeritud. Tulenevalt gripiviiruse struktuurist oli põhjust karta, et nimetatud viirustüvi võib levida inimeste, lindude ja sigade seas. Seagripi H1N1 levik oli 2009. a. lõpuseisuga dokumenteeritud 208 riigis ja viirus oli põhjustanud *ca* 15 000 surmajuhtu.

Pandeemse gripiviiruse üheks koletumaks näiteks ajaloost on nn. **Hispaania gripp**, millesse suri aastatel 1918–1919 üle maailma 50–100 miljonit inimest. Hispaania gripp nõudis erinevalt tavagripist palju just laste ja noorukite elusid. Selle gripi iseloomulikuks tunnuseks oli kopsunakkus. Kopsudes stimuleeriti immuunsüsteemi rakud, vabanesid tsütokiniinid, mis stimuleerisid omakorda leukotsüütide migratsiooni kopsudesse. Järgnes kopsukoe hävimine ja koevedeliku kogunemine kopsudesse. Sarnase toimega on ka tänapäeval leviva linnugripi viiruse alatüüp H5N1.

3.2.2. Linnugripp H5N1

Gripp A viiruse **alatüüp H5N1** on muteerunud paljudeks erineva patogeensusega variantideks, mis kõik kuuluvad siiski genotüüpi Z. H5N1 isoleeriti esmalt 1996. a. Hiinas kodulindudelt ning järgnevalt 1997. a. Hongkongis (Hiina erimajanduspiirkond) inimestelt. Tema pinnaantigeenid on hemaglutiniin tüüp 5 ja neuraminidaas tüüp 1. Praegu on linnugripi H5N1 levik veel endeemne, seostudes eelkõige Kagu-Aasiaga, kuid tal on pikemas perspektiivis potentsiaal saada pandeemseks. On näidatud, et viiruse hemaglutiniini geeni muteerumisel võib linnugripiviirus nakatada ka inimesi.

3.2.3. Gripiviiruse genoom

Gripiviiruste genoom on geneetilise info edasikandumise kontekstis nn. (–)-ahelaline ning fragmenteerunud, koosnedes 7–8 erinevast üksikahelalisest (ssRNA) RNA-segmendist (nad on nagu erinevad viiruskromosoomid!). **Genoomi fragmentatsioon** (ingl. *genome fragmentation*) suurendab viirusgenoomide geneetilise ümberkombineerumise tõenäosust ja muudab vastavad viirused väga kiiresti muteeruvateks ja evolutsioneeruvateks. A-tüüpi gripiviirustel on 8 erisugust RNA-molekuli ja 10 geeni poolt määratud valku, mida tähistatakse alljärgnevalt:

1) PB2 (polümeraasi aluseline alaüksus 1);
2) PB1 (polümeraasi aluseline alaüksus 2);
3) PA (polümeraasi happeline alaüksus);
4) HA (hemaglutiniin);
5) NP (nukleoproteiin);
6) NA (neuraminidaas);
7) M1- ja M2-maatriksivalgud;
8) NS1 ja NS2 mittestruktuursed regulaatorvalgud.

Hemaglutiniin (ingl. *haemagglutinin*) on antigeenne glükoproteiin gripiviiruste pinnal, mis moodustab naelakujulisi haakuvaid struktuure ning mille abil seondubki viirus infitseeritava rakuga. Seondumist saab takistada hemaglutiniiniga seonduvate antikehade e. hemaglutiniinivastaste antikehade abil. On ka geneetiline faktor, mille alusel saab gripiviiruseid eristada. Nimelt seondub linnugripiviirus α **2–3 siaalhappejääke** sisaldava retseptoriga, inimese gripiviirus aga **2–6 siaalhappejääke** sisaldava retseptoriga. Seagripiviirus seondub mõlemat tüüpi retseptoritega.

Neuraminidaas (ingl. *neuraminidase*) on gripiviiruse pinnal asetsev antigeenne glükoproteiinne ensüüm, mis soodustab retseptori eemaldamist nakatatud rakkude pinnalt ja selle kaudu moodustuvate viiruspartiklite järglaskonna vabanemist nakatatud rakkudest. Mõningad ravimid (*Tamiflu*, *Relenza*) inhibeerivad osa viirustüvede neuraminidaasi.

Gripiviiruse suure mutatsioonisageduse ja evolutsioneerumise tõttu on osutunud eksperimentaalselt võimalikuks nende levikut tõestada. H5N1 jaotub kaheks **antigeenseks klaadiks** (ingl. *antigenic clade*). Klaad 1 koosneb inimese ja lindude Kagu-Aasia isolaatidest, klaad 2 viirused isoleeriti algul küll samuti Kagu-Aasia maades lindudelt, kuid need viirused levisid WHO andmetel aastatel 2005–2006 Kesk-Aasiasse, Euroopasse ja Aafrikasse, olles seal põhiliseks inimese gripiviiruseks. Sellise levikuga oli aga teise klaadi kolmest alamklaadist vaid üks, nn. EMA alamklaad.

3.2.4. RNA-viiruste geneetiline stabiilsus

Retroviirused ja gripiviirused muteeruvad erakordselt kiiresti. Selle põhjuseks on üks eripära – nende replikatsioon kulgeb kas ainult RNA-molekulide või vähemalt RNA vahevormide kaudu. Gripiviirus ja teised RNA genoomiga viirused erinevad põhimõtteliselt DNA genoomsest maailmast ja mitmed põhitõed, mis kehtivad DNA korral, RNA-viiruste puhul ei kehti. Üheks selliseks põhitõeks on genoomi taastootmise (replikatsiooni) täpsus. Kõik bioloogilised objektid kontrollivad oma genoomi DNA sünteesi korrektsust – DNA polümeraasidel on eksonukleaasne aktiivsus, mis võimaldab ebakorrektselt DNAsse liidetud nukleotiidijääke eemaldada ehk tehtud vigu parandada. Enamik RNA

genoomseid viirusi seda aga ei tee. Nad ei kontrolli genoomi paljunemise korrektsust sellepärast, et see on nende eksisteerimise fundamentaalne osa ja strateegia. RNA genoomid ei ole stabiilsed, mille tõttu vastavatel viirustel puudub fikseeritud genoomne järjestus. Seega, rõhuv enamus RNA-viiruse genoome on mutandid: viirus eksisteerib järjestuselt ja funktsioonidelt erinevate genoomide kogumina – **kvaasiliikidena** (ingl. *kvasispecies*). Isegi kui organismi nakatab üksainus virioon, milles on üksainus genoom, tekivad kvaasiliigid kohe uuesti (juba esimeses nakatatud rakus toimuva replikatsiooni tagajärjel). Keskkonnatingimused võivad küll protsesse veidi kiirendada, kuid ka ilma keskkonna mõjudeta on RNA-viiruste genoomse järjestuste muutumine pidev ja vältimatu protsess. Kuna muudatused viiruse genoomis on juhuslikud, on need enamasti neutraalsed (ei anna mingit kasulikku efekti) või lausa kahjulikud (mõjutavad viirust negatiivselt). See tagab viirusele mõnesuguse geneetilise stabiilsuse, täpsemalt tasakaaluoleku. Välisfaktorite (immuunvastus, ravim jne.) muutumisel tasakaal nihkub ja viirused kohanevad ülikiiresti uute tingimustega. See on üks põhjusi, miks RNA-viiruste-vastane teraapia on väheefektiivne ja miks gripiviirusesse on võimalik korduvalt haigestuda.

Meeldejätmiseks

- A-tüüpi gripiviiruste genoomis on fragmenteerunult 7–8 üksikahelalist ssRNA-molekuli ja 10 geeni, mis on suure mutatsioonilise ja evolutsioonilise võimega.
- Nüüdisajal levinumateks A-tüüpi gripiviiruste alamtüüpideks on inimese hooajalised gripiviirused H1N1, H3N2 ja H1N2, seagripiviiruse alamtüüp H1N1 ja linnugripiviiruse alamtüüp H5N1.
- Gripiviiruste alamtüüpe iseloomustavad antigeensed omadused – gripiviiruse pinnal asetsevate viiruste poolt määratavate hemaglutiniini ja neuraminidaasi tüübid.
- RNA-viiruste genoomid on ebastabiilsed, nad esinevad järjestuselt ja funktsioonilt erinevate genoomide kogumina – kvaasiliikidena.

3.3. Papilloomiviirused

Papilloomiviirused on kaksikahelalise DNA-genoomiga väikesed viirused. Nad on nii liigispetsiifilised, nakatades enamikku imetajaid, kui ka koespetsiifilised. **Inimese papilloomiviirused** (HPV, ingl. *human papillomavirus, HPV*) jaotatakse limaskesta ja naha papilloomiviirusteks. Madala riskiga papilloomiviirused (nt. **HPV-6**) põhjustavad nahal põhiliselt healoomuliste soolatüügaste ja papilloomide teket ning neid viiruseid peetakse inimese naha mikrofloora normaalseks osaks. Kõrge riskiga papilloomiviiruseid (nt. **HPV-16**) esinemist seostatakse vähieelse seisundiga ja pahaloomuliste kasvajate tekkega. Naistel esinevatest vähivormidest on oma sageduselt teisel kohal **emakakaelavähk** (ingl. *uterine cancer*), mille tekke oluliseks eeltingimuseks on nakatumine papilloomiviirusega, millega kaasneb viiruse normaalse elutsükli katkemine ning HPV genoomi muteerunud osa integreerumine peremeesraku kromosoomi.

3.3.1. Papilloomiviiruse genoom

Papilloomiviiruste täisgenoomid on *ca* 8 kb suurused, rõngasjad kaksikahelalised dsDNA-d. Genoom jaguneb kolmeks piirkonnaks (jn. 16.21):

1) **varane kodeeriv ala** (E);
2) **hiline kodeeriv ala** (L);
3) **mittekodeeriv ala** (URR).

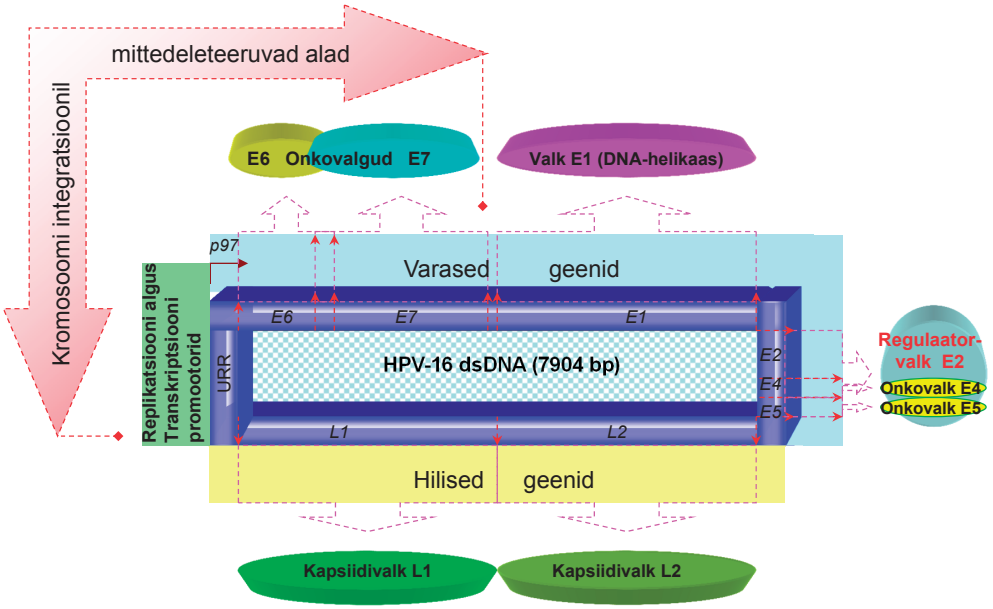
Varane kodeeriv ala moodustab poole (*ca* 50%) viiruse genoomist ja kodeerib kuut valku: E1, E2, E4, E5, E6, E7. Need valgud on vajalikud raku transformatsiooniks ja nad avalduvad viiruse replikatsiooni kõigis faasides. **Hiline kodeeriv ala** moodustab *ca* 40% viiruse genoomist ning sisaldab suurt (L1) ja väikest (L2) viiruse kapsiidivalku kodeerivat geeni. Need geenid avalduvad vaid replikatsioonitsükli lõpufaasis. **Mittekodeeriv ala** moodustab 10% viiruse genoomist. See on **ülesvoolu asuv regulatoorne ala** e. **URR** (ingl. *upstream regulatory region, URR*), mis sisaldab viiruse replikatsiooni alguspunkti ning transkriptsiooni regulatsiooniks vajalikke promootoreid ja ***cis*-toimelisi** regulatoorseid elemente.

Viiruse varastest valkudest on põhilised valgud **E1** (DNA helikaas ja replikatsiooni alguspunkti äratundev valk) ja **E2** (replikatsiooni initsiatsioonifaktor ja geeniekspressiooni regulaator), mis on hädavajalikud viiruse autonoomseks replikatsiooniks. Esmase nakatumise järel replitseerib viirus oma DNA-d kuni 200 koopiani nakatatud raku kohta. Sel juhul **hiliseid kapsiidivalke L1** ja **L2** ei toodeta ja **virioone** ei moodustata, sest hiliste kapsiidivalkude sünteesiks vajalikud hilised promootorid on inaktiivsed. Valgud **E5**, **E6** ja **E7** on **onkovalgud** (ingl. *oncoproteins*). Neist E5 suurendab epidermaalse kasvufaktori aktiivsust (**EGF**) ja E6 seob ning inaktiveerib rakulise kasvuregulaatorvalgu **p53**, soodustades seetõttu rakkude paljunemist ning transformatsiooni. E7 valgu sihtmärgiks on regulaatorvalk pRb ja temaga sarnased rakutsüklit blokeerivad valgud.

3.3.2. Emakakaelavähk

Invasiivse emakakaelavähi teke on mitmeastmeline protsess, mis on aga obligatoorselt seotud kõrge riskiga papilloomiviiruste (nt. HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-45) DNA integratsiooniga peremeesraku kromosoomidesse. Integratsiooniprotsess leiab aset mittehomoloogse rekombinatsiooni teel ning võib seetõttu toimuda nii erinevatesse kromosoomidesse kui ka sama kromosoomi erinevatesse piirkondadesse. Papilloomiviiruse integratsioonil kromosoomi põhjustatakse enamjaolt viiruselise regulaatorgeeni *E2* deletsioon (jn. 16.21). Igal juhul on deletsioonid aga väljaspool *E6*- ja *E7*-geene ning URR-i, sest onkovalke E6/E7 on vaja raku transformeerunud oleku säilimiseks. Papilloomiviiruse episoomsel säilimisel on viiruslike onkogeenide *E6* ja *E7* avaldumine valgu E2 poolt tugevalt maha surutud. Rakkudesse integreerunud viiruse genoom põhjustab mutatsioone ka peremeesraku DNA integratsioonikoha kõrval asetsevates piirkondades ning suurendab sellega genoomset ebastabiilsust.

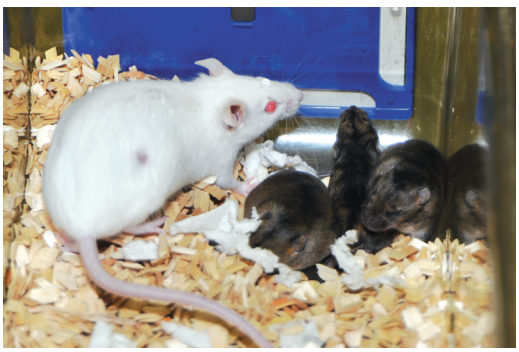
Arvatakse, et integreeruva papiloomiviiruse deletsioonid tekivad viiruse replikatsiooni eripära tõttu. Nimelt võib viiruse autonoomses olekus toimuda viiruse DNA üleamplifikatsioon, kus moodustuvad ka ilma *E2*-geeni piirkonnata papilloomiviiruse DNA fragmendid, mis integreeruvadki peremeesraku kromosoomi. Kui integreerunud genoomis pole geeni *E2*, siis valgu E2 kontsentratsiooni vähenemisega suureneb onkovalkude E6 ja E7 ekspressioon. Lõpptulemuseks on papiloomiviiruse episoomse oleku kadumine. E6- ja E7-valkude kaasabil toimub raku kontrollimatu vohamine, suureneb geneetiline ebastabiilsus ja rakku on võimalik suunata surematuse teele (immortaliseerida). See kõik viibki pahaloomuliste kasvajate tekkele.



Joonis 16.21. Inimese papilloomiviiruse HPV-16 genoomi organisatsioon. Episoomne HPL-16 kromosoom on rõngasjas kaksikahelaline dsDNA pikkusega 7904 bp. Viiruse varased geenid: DNA helikaasi geen *E1*, regulaatorgeen *E2*, onkogeenid *E5*, *E6* ja *E7*. Viiruse hilised geenid: kapsiidivalgu geenid *L1* ja *L2*. Viiruse integratsioonil peremeesraku kromosoomi ei deleteerita URR-piirkonda ja onkogeene *E6* ja *E7*.

Meeldejätmiseks

- Papilloomiviirused on kaksikahelalise DNA-ga väikesed viirused, mis on imetajatel tavaliselt naha normaalsete rakkude kaaslasteks (põhjustavad soolatüügaste ja nahanäsade teket).
- Emakakaelavähki tekitavad kõrge riskiga papilloomiviiruse tüved juhul, kui deletsioonilised viirusgenoomid integreeruvad peremeesraku kromosoomi.
- Papilloomiviiruse onkogeenid E6 ja E7 avalduvad rakus juhul, kui viiruse varase valgu E2 (geeniekspressiooni regulaatorvalk) tase on rakus madal, näiteks seoses vastava geeni deletsiooniga integreerunud viiruse DNA-s.



Võõrasema (liin Balb/C) ja kimäärsete hiirte pesakond. Foto: Sulev Kuuse.