

VILNIAUS UNIVERSITETAS GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Monika Repšytė

Uhano uodų 6 viruso glikobaltymo gebėjimo inicijuoti infekciją tyrimas

Magistro baigiamasis darbas

Molekulinės biologijos programa

Darbo vadovas Dr. Milda Norkienė

Darbas atliktas GMC Biotechnologijos instituto Eukariotų geno inžinerijos skyriuje

Santrumpos	5
Įvadas	7
1. Literatūros apžvalga	9
1.1. Virusai	9
1.1.1. RNR virusai	10
1.2. Vabzdžių platinami virusai	11
1.3. Ortomiksovirusai	12
1.3.1. Gripo virusai	12
1.3.2. Isavirusas	13
1.3.3. Mykissvirusas ir sardinovirusas	13
1.3.4. Togotovirusai	14
1.3.5. Quaranjavirusai	15
1.4. Virusiniai baltymai	15
1.5. Tiriamajam darbui aktualūs ortomiksovirusai	18
1.5.1. Sinu virusas	18
1.5.1. Uhano 6 uodų virusas	18
1.6. Pseudovirusų technologija	19
1.6.1. Žmogaus imunodeficito virusas 1	19
1.6.2. Lentivirusų pakavimo sistemų kartos	21
1.6.3. Lentivirusų vektorių pritaikymas	22
2. Medžiagos ir metodai	24
2.1. Medžiagos	24
2.1.1. Rinkiniai	24
2.1.2. Fermentinės reakcijos	24
2.1.3. DNR fragmento gryninimas iš agarozinio gelio	25
2.1.4. Pradmenys ir zondai	25
2.1.5. DNR elektroforezės reagentai	25
2.1.6. Baltymų NDS-poliakrilamidinės gelelektroforezės denatūruojančiomis reagentai	s sąlygomis 26
2.1.7. Imunoblotingo reagentai	26
2.1.8. Antikūnai	26
2.1.9. Bakterijų kamienai	26
2.1.10. Bakterijų auginimo terpės	27
2.1.11. Ląstelės	27

Turinys

2.1.12. Ląstelių augimo terpės27	7
2.1.13. Ląstelių transfekcijos ir infekcijos reagentai27	7
2.1.14. Pseudovirusų koncentravimas28	3
2.1.15. Vektoriai	3
2.2. Metodai)
2.2.1. Žinduolinių raiškos vektorių su ortomiksovirusų gp64 genų sekomis konstravimas29)
2.2.2. DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio)
2.2.3. WuMV-6 glikobaltymo <i>gp64</i> geno sekos modifikavimas ir įsiuvimas į žinduolinį raiškos vektorių pCAGGS29	5
2.2.4. Plazmidžių padauginimas)
2.2.5. Ląstelių auginimas ir persėjimas30)
2.2.6. Virusinių glikobaltymų sintezė žinduolinėse HEK293T/17ląstelėse	L
2.2.7. Bradfordo analizė	L
2.2.8. Baltymų NDS-poliakrilamidinė gelelektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis32	2
2.2.9. Imunoblotingo analizė	2
2.2.10. Žinduolinių HEK293T ląstelių transfekcija ir pseudovirusų gamyba32	2
2.2.11. Pseudovirusų koncentravimas	3
2.2.12. Pseudovirusų supakuotos RNR skyrimas	3
2.2.13. Kopijinės DNR sintezė	3
2.2.14. TaqMan kokybinis PGR34	1
2.2.15. Ląstelių infekcija pseudovirusais34	1
2.2.16. Nanoliuciferazės aktyvumo tyrimas34	1
2.2.17. DNR sekoskaita	5
2.2.18. Duomenų analizė	5
3. Rezultatai	5
3.1. Žinduolinių raiškos vektorių su glikobaltymų genų sekomis konstravimas	5
3.2. Glikobaltymų sintezė HEK293T ląstelėse	7
3.3. Pseudotipuotų lentivirusų gamyba)
3.4. Pseudovirusų kiekio nustatymas40)
3.5. Pseudovirusų sandara	L
3.6. <i>Culex tarsalis</i> embrioninių ląstelių infekcija41	Ĺ
3.7. <i>G. g. domesticus</i> periferinio kraujo monobranduolinių ląstelių infekcija43	3
4. Rezultatų aptarimas44	1
Išvados48	3
Santrauka)

Abstract	50
Padėka	51
Šaltinių sąrašas	52
Priedas A	61
Priedas B	64
Priedas C	65

Santrumpos

AcMNPV – (angl. Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus)

BRBV – Burbono virusas (angl. Bourbon virus)

BSL – biosaugos lygis

CMV – citomegalo virusas (angl. Cytomegalovirus)

CxTr-R2 – Culex tarsalis embrionų ląsteles

DHOV – Dori virusas (angl. Dhori virus)

EGFP – patobulintas žaliai fluorescuojantis baltymas (angl. *enhanced green fluorescent protein*)

Env – ŽIV apvalkalėlio glikobaltymas (angl. envelope qlycoprotein)

F – susiliejimo baltymas (angl. *Fusion protein*)

G – glikobaltymas G (angl. G protein)

Gag – ŽIV struktūrinis polibaltymas

GagPol – sujungtas ŽIV struktūrinių baltymų ir virusinių fermentų polibaltymas

gp64 – glikobaltymas 64 (angl. glycoprotein 64)

HA – hemagliutininas

HE – hemagliutinino esterazė

HEF – hemagliutinino esterazės suliejimo baltymas (angl. *hemagglutinin-esterase-fusion protein*)

HEK293T – žmogaus embriono inkstų ląstelių linija (angl. human embryonic kidney cells)

HPR – labai polimorfiškas regionas (angl. *highly polymorphic region*)

HPR0 – HE seka su pilnu HPR regionu

 $HPR\Delta - HE$ seka su viso HPR regiono delecija

ICTV – Tarptautinės virusų taksonomijos komisija (angl. International Committee on Taxonomy of Viruses)

ISAV – lašišų infekcinės anemijos virusas (angl. Infectious salmon anemia virus)

LDL – žemo tankio lipobaltymas (angl. low-density lipoprotein)

LRT – ilgi terminaliniai pasikartojimai (angl. long terminal repeats)

LV – lentivirusinis vektorius

M – matrikso baltymas

ML – ilgasis matrikso baltymas (angl. *M-long protein*)

MxA – miksovirusui atsparumo baltymas a (angl. *myxovirus resistance protein a*)

NA – neuraminidazė

nLuc – nanoliuciferazė (angl. nanoluciferase)

NP – nukleobaltymas (angl. nucleoprotein)

PBMC – periferinio kraujo monobranduolinės ląstelės (angl. *peripheral blood mononuclear cells*)

QRFV – Quaranfil virusas (angl. *Quaranfil Quaranjavirus*)

RdRp – nuo RNR priklausoma RNR polimerazė (angl. RNA-dependent RNA polymerase)

RE – restrikcijos endonukleazė

RNP – ribonukleobaltymas (angl. *ribonucleoprotein*)

RRE – Rev atsako elementas (angl. Rev response element)

SINUV – sinu virusas (angl. Sinu virus)

THOV – Togoto virusas (angl. Thogoto virus)

U87-MG – žmogaus piktybinės gliomos ląstelių linija (angl. *Uppsala 87 malignant glioma*)

VSV – Indianos vezikulovirusas (angl. Indiana vesiculovirus)

WNV – Vakarų Nilo virusas (angl. West nile virus)

WuMV-6 – Uhano uodų 6 virusas (angl. *Wuhan mosquito virus 6*)

ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas

Įvadas

Dėl klimato kaitos žmonės dažniau susiduria su nepažįstamais patogenais, tad svarbu ištirti naujų ir senų patogenų zoonotinį potencialą – galimybę infekuoti naują šeimininką. Itin mažai suprasti yra segmentuotos RNR virusai. Anksčiau šie virusai buvo nustatomi ir klasifikuojami pagal konservatyviausius segmentus, susijusius su nuo RNR priklausomos RNR polimerazės (RdRp, angl. *RNA-dependent RNA polymerase*) kompleksu. Nors visi RNR virusai turi šio geno seką, šis segmentas įprastai neprisideda prie viruso infektyvumo ar tropizmo. Prieš keletą metų įvyko technologinis proveržis virusų paieškoje, kai buvo sukurtos bioinformatines programos, gebančios nustatyti homologiškai nepanašias virusines sekas, kurios kitu atveju liktų metagenomikos duomenų "viriomo juodoje materijoje" (angl. *viral dark matter*) (Batson et al., 2021). Tik viso genomo segmentų rinkinio analizė gali atskleisti tikrą segmentuotų RNR virusų virulentiškumo potencialą.

Orthomyxoviridae – turinčių apvalkalėlį segmentuotos linijinės neigiamos krypties viengrandinės RNR virusų šeima. Ši virusų šeima jau yra pagarsėjusi visuomenėje, agrokultūros ir akvakultūros industrijose dėl sezoninę epidemiją sukeliančių gripo virusų ir lašišų fermoms nuostolingo lašišų infekcinę anemiją sukeliančio viruso (ISAV, angl. *Infectious salmon anemia virus*). Šio magistro darbo tyrimų objektai yra *Orthomyxoviridae* šeimos *Thogotovirus* ir *Quaranjavirus* genčių atstovų paviršiaus glikobaltymai. Šioms gentims priklauso daugiausiai nariuotakojus infekuojantys virusai, tačiau yra užfiksuota atvejų, kai šie virusai gali sukelti patologijas stuburiniams, įskaitant ir žmogų (Kosoy et al., 2015). Iki dabar dar nedaug buvo žinoma apie *Thogotovirus* ir *Quaranjavirus* 0, kuris per 20 metų paplito po visą pasaulį (Dudas ir Batson, 2023), gebėjimas inicijuoti infekciją *in vitro* ląstelių kultūrose. Keliame hipotezę, kad WuMV-6 spartų paplitimą galimai lėmė stuburinis šeimininkas (-ai) (tikėtina paukščiai), galintys įveikti didelius atstumus (ypač sezoninės migracijos metu) ir kurių krauju maitinasi užsikrėtę *Culex* genties uodai.

Pagrindinis *Thogotovirus* ir *Quaranjavirus* genčių virusų tarprūšinį paplitimą lemiančių faktorių yra paviršiaus membraninis glikobaltymas gp64 (angl. *glycoprotein 64*). Pritaikant pseudovirusų, padengtų tiriamųjų virusų glikobaltymais, technologiją galima tirti pirmą infekcijos etapą – viruso patekimą į ląstelę, nes virusų, turinčių apvalkalėlį, esminis ir pirminis infekcijos iniciacijos faktorius yra būtent paviršiaus glikobaltymo sąveika su ląstelės taikinės receptoriumi (-iais). Be ortomiksovirusų glikobaltymais pseudotipuotų lentivirusų, bus gaminami ir pseudovirusai, padengti bakuloviruso AcMNPV (angl. *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*) gp64, nes tai yra beveik tas pats *Thogotovirus* ir *Quaranjavirus* gp64, tik evoliuciškai nutolęs

(Pearson ir Rohrmann, 2002), ir pasižymi tropizmu nariuotakojuose ir stuburiniuose, bei lentivirusai pseudotipuoti Indianos vezikulovirusas (VSV, angl. *Indiana vesiculovirus*) glikobaltymu G (angl. *G protein*), kurio platus tropizmas yra gerai žinomas.

Šio darbo tikslas buvo įvertinti WuMV-6 ir SINUV gp64 glikobaltymų gebėjimą inicijuoti patekimą į *Culex tarsalis* embrionų ląsteles (CxTr-R2) ir vištų (lot. *Gallus gallus domesticus*) periferinio kraujo monobranduolines ląsteles (PBMC, angl. *peripheral blood mononuclear cells*).

Uždaviniai:

1. Atlikti WuMV-6, SINUV, VSV, AcMNPV glikobaltymų sintezę HEK293T žinduolinėse ląstelėse;

2. Žinduolinėse HEK293T ląstelėse pagaminti ir sukoncentruoti WuMV-6, SINUV, VSV ir AcMNPV membraniniais glikobaltymais pseudotipuotus lentivirusus;

3. Pseudotipuotais lentivirusais infekuoti *Culex tarsalis* ir vištų PBMC ląsteles;

4. Įvertinti *gp64* geno sekų modifikacijų įtaką WuMV-6 infekcijai.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Virusai

Fosilijose aptikta seniausia gyvybės forma gyvavo prieš 3,7 mlrd. metų (Nutman et al., 2019). Bioinformatiniais metodais pagal vertikaliai paveldėtus genus (genai, perduoti palikuoniams) nustatyta, kad paskutinis universalus bendras protėvis (organizmų populiacija, iš kurių galiausiai išsivystė Archaea, Bacteria ir Eukarya domenai) galėjo gyvuoti prieš 4,2 mlrd. metų (Moody et al., 2024). Šie panašūs į prokariotus organizmai buvo platesnės ekosistemos dalis, tačiau kitų organizmų palikuonys išnyko (1.1. pav).



1.1. pav. Senovės ekosistemos filogenetinio medžio iliustracija, adaptuota pagal Moody et al (2024). Juodai pažymėtos dabartinio gyvybės medžio šakos, o pilkai – buvusių populiacijų organizmų šakos. Raudonos linijos žymi galimą genų judėjimą tarp skirtingų organizmų. LECA – paskutinis eukariotų bendras protėvis; LACA – paskutinis archėjų bendras protėvis; LBCA – paskutinis bakterijų bendras protėvis; LUCA – paskutinis universalus bendras protėvis.

Virusai ir judrieji genomo elementai aptinkami visuose organizmuose, tad buvo pabandyta atkurti senovinėje ekosistemoje vyravusį viriomą, kuris jau buvo sudėtingas ir daugiausiai apimantis įvairias dvigrandinių DNR virusų grupes, priklausančių Duplodnaviria ir Varidnaviria virusų sritims (Krupovic et al., 2020). Tokios senovės virusų įvairovės nustatymas remiasi virusų 15 rangų taksonomijos sistema (6 virusų sritys yra aukščiausias taksonomijos rangas), priimta Tarptautinės virusų taksonomijos komisijos (ICTV, angl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*). Ši sistema paremta filogenetiniais ryšiais metagenomikos ir proteomikos lygmenyje. Hierarchinė klasifikacija aukščiau šeimos lygmenio turi ne vieną trūkumą, tačiau kritinė problema – virusų evoliucijos atskyrimas nuo kitos gyvybės evoliucijos (Holmes ir Duchêne, 2019; Caetano-Anollés et al., 2023). Nuo senų laikų diskutuojamas virusų priskyrimas prie gyvybių formų tampa mažiau aktualus, nes "gyvybės" sąvoka nėra apibrėžta ir gali remtis tik dabartinėmis ribotomis žiniomis (Harris ir Hill, 2020). Negalima paneigti, kad virusai yra nuolat besikeičiantys biologiniai subjektai, sąveikaujantys su kitais organizmais nuo pat gyvybės susiformavimo laikų. Virusai atlieka aktyvią

horizontalią genų pernašą (genų judėjimas toje pačioje kartoje), kurios įtaka neatsižvelgiama vertikalia genų perneša paremtame evoliucijos modelyje. Dabartinis gyvybės medis neatspindi virusų ir šeimininkų koevoliucijos. Tikėtina, kad virusų įvairovė išsivystė ne dėl vieno įvykio, o dėl kelių nepriklausomų įvykių gyvybės evoliucijos eigoje.

1.1.1. RNR virusai

Virusai labiausiai paplitęs biologinis subjektas visoje Žemės biosferoje. Ne tik jie aptinkami visur, kur yra gyvybės, bet ir pasižymi gausia įvairove. Tarp visų virusų nėra nei vieno universalaus ir konservatyvaus geno, kuris būtų būdingas visoms rūšims. Tik tai RNR virusai dalinasi vienu bendru baltymu – RdRp. Vienas iš anksčiausių bandymų klasifikuoti virusus buvo Baltimoro klasės, į kurias virusai sugrupuoti pagal genetinės medžiagos nukleorūgščių tipą ir pagal iRNR ekspresijos mechanizmus (1.2. pav.) (Koonin et al., 2021). RNR virusai apėmė tris klases (klasės III, IV ir V) bei vėliau prisidėjo RNR virusai su tarpine DNR forma (klasės VI ir VII). Virusų teigiamos krypties viengrandinės RNR genomas yra funkcionali iRNR. Patekus viruso genetinei medžiagai į ląstelę iškart prasideda virusinių baltymų transliacija, susintetintas RdRp replikuoja virusinę iRNR. Išgryninti ar chemiškai susintetinti teigiamos krypties viengrandinės RNR genoma lieka infektyvūs. Patekus neigiamos krypties viengrandinės RNR arba dvigrandinės RNR virusams į ląstelė pirmiausiai įvyksta genomo transkripcija, kurią atlieka su virusiniu genomu atneštas RdRp kompleksas. Baltimoro sistema buvo sukurta dar prieš sekoskaitos atsiradimą, tad joje nebuvo atsižvelgiama evoliucinius ryšius. Ir šiais laikas Baltimoro klasės išliko naudojamu virusų grupavimu, susitelkusiu į funkciją.



1.2. pav. Baltimoro virusų klasių schema, adaptuota pagal Šimičić ir Židovec-Lepej (2022).

Kitas išskiriantis RNR virusų bruožas, kad dalis virusų šeimų turi segmentuotą genomą. Kiekvieno segmento kopija yra supakuojama į virioną, kitaip nei kelių dalių (angl. *multipartite*) genomų segmentai, kurie įpakuojami į atskiras virusines daleles. Iš pirmo žvilgsnio gali atrodyti, kad nesegmentuoti genomai turi pranašumą prieš segmentuotus genomus, nes pirmu atveju reikia užtikrinti tik vienos genomo molekulės supakavimą, o antru atveju reikia atrinkti kiekvieno segmento kopiją įpakavimui ir užtikrinti viso genomo rinkinys supakavimą. Įtariama, kad virusai su segmentuotais genomais ne kartą evoliucionavo iš virusų su nesegmentuotais genomais (Qin et al., 2014). Yra kelios hipotezės, kodėl genomo padalinimas į segmentus yra evoliuciškai palanki strategija. 1) Artimų genetinių linijų virusai gali pasikeisti segmentais koinfekcijos metu (angl. *reassortment*). Nors dalis maišytų rinkinių palikuonių praranda virulentiškumą, yra tikimybė, kad naujas segmentų rinkinys suteiks naujų bruožų, pvz.: geriau išvengs imuninio atsako (McDonald et al., 2016). 2) Trumpesnių segmentų replikacijos metu yra mažesnė žalingų mutacijų kaupimosi tikimybė (Holmes et al., 2003).

1.2. Vabzdžių platinami virusai

Vabzdžiai dažnai atlieka pernešėjo ar kitaip vektoriaus funkciją platinant vabzdžių arba kitų gyvūnų patogenus žmonių populiacijoje. Dažniausiai vektoriai būna uodai, erkės arba musės, mintantys gyvūnų krauju. Tokiu būdu platinami virusai vadinami arbovirusais (angl. *arthropod-borne viruses*). Dauguma arbovirusų priklauso *Bunyaviridae, Flaviviridae* ir *Togaviridae* šeimoms, tačiau neapsiriboja tik jomis (Beckham ir Tyler, 2015). Ne atsitiktinumas, kad didžioji dalis arbovirusų turi RNR genomus. RNR virusų dauginimuisi palankiau greitesnė genomų replikacija (RpRd be klaidų taisymo mechanizmo) nei genomo stabilumas (Elena ir Sanjuán, 2005). Dėl itin aukšto mutacijų dažnio per replikaciją RNR virusų populiacijoje susikaupia daug skirtingų genotipų. Dalis virusų žūna dėl žalingų mutacijų, bet su naudingomis genotipų mutacijomis virusai greitai prisitaiko prie besikeičiančių aplinkos sąlygų (Duffy, 2018).

Svarbus aspektas aptarinėjant arbovirusus yra vektoriaus kompetencija – fiziologinė nariuotakojo galimybė užsikrėsti arbovirusu (Kain et al., 2022). Dažniausiai arbovirusai aktyviai nesidaugina vektoriuje, tik naudojasi horizontalia (tiesioginis kontaktas su infekuotu šeimininku) arba vertikalia (vektoriaus palikuonys gimsta infekuoti) pernaša. Arbovirusų daroma žala vektoriui labai priklauso nuo nariuotakojo rūšies ir virusų šeimos, tačiau horizontaliai pernešami virusai dažniau kenkia vektoriams, o vertikaliai pernešami – mažiau (Lambrechts et al., 2009). Arboviruso rezervuaru gali būti šeimininkas, kuriame prisigamina pakankamas viruso titras kraujyje vektoriaus infekavimui. Šeimininkas, kuris infekuojamas vektoriaus, bet negali infekuoti kito sveiko vektoriaus, vadinamas baigtiniu šeimininku (angl. *dead-end host*) (Huang et al., 2019). Baigtiniai šeimininkai vis tiek gali patirti sunkias ir letalias patologijas, sukeltas arboviruso.

Vakarų Nilo virusas (WNV, angl. *West nile virus*) (*Flaviviridae* šeimos atstovas) yra vienas iš zoonotinių patogenų pavyzdžių, kuriuos platina uodai ir paukščiai. WNV replikacijos cikle uodai atlieka lokalaus viruso rezervuaro vaidmenį, o paukščiai (daugiausiai plėšrūs paukščiai) – globalaus rezervuaro. Šiame cikle infekuoti žinduoliai yra baigtiniai šeimininkai. 1937 m. Afrikos žemyne

pirmą kartą aptiktas WNV buvo priskiriamas prie nepatogeniškų arbovirusų, sukeliančiu švelnius gripo simptomus. Situacija drastiškai pasikeitė, kai 1999 m. genetinės WNV linijos L1 ir L2, kuriomis infekuotų žinduolių mirtingumas aukštesnis palyginus su kitomis genetinėmis linijomis, persikėlė į Šiaurės Ameriką ir pietų Europą (2019 m. WNV pasiekė Vokietijos teritoriją) (Koch et al., 2024). Philpott ir kolegų atliktame (2019) tyrime užfiksuota, kad vien tik Teksase nuo 2002 m. iki 2012 m. mirė 13 % žmonių, kuriems buvo nustatyta WNV infekcija. Dažnesni netikėti WNV protrūkiai, keliantys sunkias patologijas, privertė peržvelgti arbovirusų keliamą pavojų visuomenei.

1.3. Ortomiksovirusai

Ortomiksovirusai – *Orthomyxoviridae* šeimos atstovai, turintys apvalkalėlį ir segmentuotą viengrandinės atvirkštinės krypties RNR genomą. Pagal Dudas ir Batson (2023) tyrimus iki 2015 m. *Orthomyxoviridae* šeimoje buvo 14 virusų rūšių, daugiausiai susijusių su susirgimais, o nuo 2015 m. iki 2022 m. nustatyti 115 į ortomiksovirusus panašių virusų. Pagal ICTV sąrašus *Orthomyxoviridae* šeimai priklauso 9 gentys (1.1. lentelė) (Walker et al., 2022). Likę yra neklasifikuoti į ortomiksovirusus panašūs virusai, kurie dar nepriskirti konkrečiai genčiai.

Gentis	Rūšių skaičius
Alphainfluenzavirus	1
Betainfluenzavirus	1
Gammainfluenzavirus	1
Deltainfluenzavirus	1
Isavirus	1
Thogotovirus	8
Quaranjavirus	6
Mykissvirus	1
Sardinovirus	1

1.1. lentelė. Orthomyxoviridae šeimos gentys.

1.3.1. Gripo virusai

Iš *Orthomyxoviridae* šeimą šiuo metu sudarančių 9 genčių, net keturioms priskiriami gripo A-D virusai. *Alphainfluenzavirus* ir *Betainfluenzavirus* genčių atstovai turi 8 segmentų genomus, o jų apvalkalėliai padengti glikobaltymais – hemagliutininu (HA) ir neuraminidaze (NA). HA funkcija yra receptoriaus atpažinimas bei viruso apvalkalėlio ir ląstelės membranos susiliejimo iniciacija, o NA funkcija – sialo rūgščių perkirpimas išlaisvinant virusą nuo ląstelės šeimininkės bei sialo rūgščių modifikavimas infekcijos metu. NA hidrolizuoja stipriai glikozilintus mucinus, imituojančius sialo rūgšties receptorius, kad virusas galėtų judėti iki tikslinės ląstelės per gleivėmis padengtus kvėpavimo takus (Cohen et al., 2013). Yra nustatyta, kad gripo viruso A pirminiai šeimininkai buvo vandens paukščiai, bet dabar atsiradę subtipų, galinčių infekuoti naminius paukščius, žinduolius, žmones (AbuBakar et al., 2023). Gripo virusas B infekuoja daugiausiai žmones, tačiau kartais yra nustatomas ruoniuose (Osterhaus et al., 2000). Gripo virusai A ir B sukelia sezoninę gripo epidemiją. Rimtesnes patologijas gali sukelti gripo virusas A, bet ir gripo virusu B užsikrėtę žmones gali patirti kvėpavimo takų bei neurologines komplikacijas (pvz.: encefalitas, ataksija) (Popescu et al., 2017). Gripo epidemijos dažnai kyla žiemos metu, nes infekcija plinta oro-lašeliniu būdu (žiemą didesnė absoliuti oro drėgmė) (Deyle et al., 2017). *Gammainfluenzavirus ir Deltainfluenzavirus* genčių virusai turi tik 7 RNR segmentus, kurie koduoja 9 virusinius baltymus. Šių virusų apvalkalėlyje yra hemagliutinino esterazės suliejimo baltymas (HEF, angl. *hemagglutinin-esterase-fusion protein*), kuris atlieka HA ir NA funkcijas. Gripo virusas D yra nustatytas karvių ir kiaulių mėginiuose. Gripo viruso C rezervuaru laikomas žmogus ir tik dėl atvirkštinės zoonozės yra dar aptiktas kai kuriuose gyvūnuose. Gripo viruso C infekcija dažniausiai nustatoma vaikams, bet šis virusas nesukelia epidemijų, tik nedidelius protrūkius (Sederdahl et al., 2020). Į gripo virusus panašių virusų amfibijų ir žuvų transkriptomikos duomenyse atradimas suteikia pagrindo bendros gripo virusų evoliucijos teorijai (Parry et al., 2020).

1.3.2. Isavirusas

Isavirus gentis turi tik vieną atstovą – ISAV, kuris infekuoja atlantinę lašišą (lot. *Salmo salar*) (Falk et., 1997). ISAV turi 8 segmentų genomą, kuriame užkoduota 10 virusinių baltymų (Markussen et al., 2008). Apvalkalėlyje yra hemagliutinino esterazė (HE, angl., *hemagglutinin-esterase*) ir susiliejimo (F, angl. *Fusion protein*) glikobaltymai. HE sąveikauja su ląstelės sialo rūgšties receptoriais, hidrolizuoja nesurištas sialo rūgšties liekanas, kad nauji virionai negalėtų prikibti prie tos pačios infekuotos ląstelės arba ISAV virusai neagreguotų, o F baltymas sulieja viruso ir ląstelės membranas (Fosse et al., 2023). Šeštajame šio viruso RNR segmente, koduojančiame HE, yra ortomiksovirusams nebūdingas labai polimorfiškas regionas (HPR, angl. *highly polymorphic region*), kuris siejamas su viruso infektyvumu. ISAV-HPR0 su pilnu HPR regionu gali infekuoti žuvis, kurioms nepasireiškia klinikiniai požymiai, tuo tarpu pats infektyviausias kamienas yra ISAV-HPRΔ (su viso HPR regiono delecija), sukeliantis infekcinę lašišų anemiją (Christiansen et al., 2017). Kitos mutacijos asocijuotos su aukštu virulentiškumu yra F baltymo Q₂₆₆L (kai kuriais atvejais H₂₆₆L) arba keliasdešimt ar. insercija prie R₂₆₇ (Markussen et al., 2008; Cárdenas et al., 2022). Įdomu, kad ISAV-HPRO veikia kaip ISAV-HRPΔ rezervuaras, kuris įvykus mutacijai tampa patogeniška viruso versija (Godoy et al., 2013).

1.3.3. Mykissvirusas ir sardinovirusas

Vaivorykštinio upėtakio 1 ortomiksovirusas (angl. *Rainbow trout orthomyxovirus-1*, dabar *Mykissvirus tructae*) yra naujas ortomiksovirusas, aptiktas vaivorykštinio upėtakio (lot. *Oncorhynchus mykiss*) vidaus organų homogenizatuose (Batts et al., 2017). Dar vienas naujas

sardinių ortomiksovirusas (angl. *Pilchard orthomyxovirus* dabar *Sardinovirus pilchardi*) pirmiausiai buvo aptiktas rytinės sardinės mėginiuose (lot. *Sardinops sagax*), o po iki ir fermose auginamų atlantinių lašišų mėginiuose (lot. *Salmo salar*). Sardinių ortomiksovirusas virusas sukelia ūmią lašišų nekrozę (angl. *salmon orthomyxoviral necrosis*) (Godwin et al., 2020). 2022 m. ICTV pripažino šiuos naujus virusus kaip pirmuosius *Mykissvirus* ir *Sardinovirus* genčių atstovus, tačiau yra diskutuojama, kad šie virusai tėra didesnio *Isavirus* klado dalis (Walker et al., 2022; Dudas ir Batson, 2023).

1.3.4. Togotovirusai

Thogotovirus genties virusai daugiausiai platinami erkių ir šiuo metu šiai genčiai priskiriami 8 atstovai. Togotovirusų genomą sudaro 6 viengrandinės neigiamos krypties RNR segmentai, kurių bendras ilgis yra ~10 kbp (Fuchs et al., 2022). Togotovirusų apvalkalėlis padengtas gp64 glikobaltymais, atsakingais už viruso prikibimą ir patekimą į ląstelę. *Thogotovirus* III klasės virusinis suliejimo baltymas, gp64, yra evoliuciškai susijęs su *Baculoviridae* (dvigrandinės DNR virusai) šeimos sujungimo baltymais gp64, nors dalinasi tik 28% sekų panašumu (Peng et al., 2017). Šioje gentyje pagal filogenetinę analizę yra du kladai – į Togoto virusus (THOV, angl. *Thogoto virus*, dabar *Thogotovirus thogotoense*) panašūs ir į Dori virusus (DHOV, angl. *Dhori virus*, dabar *Thogotovirus dhoriense*) panašūs virusai (Fuchs et al., 2022). Ne tik filogenetiniai ryšiai sieja kladų narius, bet ir bendri bruožai, nebūdingi kitam kladui. Vienas iš pavyzdžių yra sąveika su ląstelės antivirusiniu baltymu MxA (angl. *Myxovirus resistance protein a*). MxA sudaro agregatus su ortomiksovirusų nukleokapside, taip sustabdydamas virusų genetinės medžiagos patekimą į branduolį ir tolesnę replikaciją (Patzina et al., 2014). Į THOV panašūs virusai yra atsparūs MxA, o į DHOV panašūs virusai yra jautrūs MxA poveikiui, tačiau užtenka vienos ar. mutacijos (R₃₂₈V) nukleokapsidės baltymo sekoje, kad ir į THOV panašūs virusai išvengtų MxA infekcijos (Fuchs et al., 2020).

Thogotovirus genties atstovų pagrindiniai rezervuarai yra erkės, išimtys yra Sinu virusas (SINUV, angl. *Sinu virus*, dabar *Thogotovirus sinuense*) izoliuotas iš uodų, ir į togotovirusus panašus Dielmo ortomiksovirusas (angl. *Dielmo orthomyxovirus*) – atrastas *Culicoides* sp. muselių mėginiuose (Temmam et al., 2016; Contreras-Gutiérrez et al., 2017). Antikūnų prieš *Thogotovirus* virusus aptinkama naminiuose gyvūnuose, graužikuose ir t.t., kurių krauju minta infekuoti vabzdžiai. Itin dažnai antikūnų prieš THOV ir DHOV aptinkama žmonėse, kurie dirba su naminiais gyvūnais (Lledó et al., 2020). THOV ir DHOV siejami su karščiavimo ir encefalito simptomų sukėlimu žmonėms. *Thogotovirus* genties atstovai nustatyti erkėse iš Europos, Azijos ir Afrikos (Kuno et al., 2001). Pirmas 2014 m. Šiaurės Amerikoje aptiktas *Thogotovirus* buvo Burbono virusas (BRBV, angl. *Bourbon virus*, dabar *Thogotovirus bourbonense*). Per keturis metus JAV užfiksuotos trys žmonių mirtys nuo BRBV infekcijos ir du atvejai, kai žmonėms pavyko pasveikti (Kosoy et al., 2015; Schweon, 2016). Visi penki atvejai buvo asocijuoti su erkių įkandimais.

1.3.5. Quaranjavirusai

Quaranjavirus yra antroji Orthomyxoviridae šeimos gentis, infekuojanti vabzdžius. Quaranjavirus genties atstovų genomai sudaryti iš 6 iki 8 segmentų. Šie virusai yra padengti III klasės suliejimo baltymu gp64 kaip ir *Thogotovirus* genties virusai (Briese et al., 2014). Kartais literatūroje Quaranjavirus glikobaltymas vadinamas HA, nors Quaranjavirus ir Thogotovirus gp64 neturi sekų panašumo į gripo virusų HA. Pirmojo šios genties atstovo – Quaranfil viruso (QRFV, angl. Quaranfil quaranjavirus, dabar Quaranjavirus quaranfilense) membraninio glikobaltymo ar. sekos nuo 30 % iki 40 % sutapo su bakuloviruso paviršiaus baltymu ir tik dalinai su gripo viruso HA (Presti et al., 2009; Peng et al., 2017). QRFV buvo pirmiausiai identifikuotas 1953 m. erkėse, surinktose Egipte. Po iki nustatytas ir gripo simptomais besiskundžiančių Egipto vaikų mėginiuose (Mohammed et al., 1970). Šis atvejis paskatino tolimesnius quaranjavirusų epidemiologijos tyrimus ir jie buvo aptikti įvairiuose erkių, uodų rūšyse iš Karibų salų, Indijos, Šiaurės Amerikos, Australijos (Mourya et al., 2019; Sameroff et al., 2021). Plačiai paplitusių pasaulyje erkių (lot. *Rhipicephalus sanguineus*), kurių šeimininkai yra įvairūs žinduoliai, taip pat ir žmogus, mėginiuose aptiktas naujas į quaranjavirusus panašus Cataloi erkių quaranjavirusas (angl. Cataloi tick quaranjavirus) (Bratuleanu et al., 2022). Nuo 1998 m. iki 2013 m. Keip Kodo, JAV pakrantėse įvyko 12 masinių paprastųjų gagų (lot. Somateria mollissima) žūčių, susietų su Quaranjavirus Wellfleet įlankos virusu (angl. Wellfleet Bay virus, dabar Quaranjavirus wellfleetense) (Allison et al., 2015).

1.4. Virusiniai baltymai

Ortomiksovirusų virioną sudaro ribonukleobaltymų (RNP, angl. *ribonucleoprotein*) kompleksai, oligomerinis matrikso baltymų sluoksnis ir apvalkalėlis su virusiniais glikobaltymais. Virusams būdinga sferinė (nuo 80 nm iki 120 nm diametro) arba filamentinė morfologija. Iš audinių izoliuoti virusai dažniausiai yra filamentinės morfologijos, tačiau persėjant infekuotas ląsteles virusai pasikeičia į sferinę morfologiją.

Ribonukleobaltymų kompleksai sudaryti iš viengrandinių RNR segmentų, nuo RNR priklausančios RNR polimerazės, prisikabinusios prie 5' galo, bei oligomerinių nukleobaltymų (NP, angl. *nucleoprotein*). Skirtingų ortomiksovirusų NP sudaro dimerus, trimerus ar tetramerus (Dick et al., 2024). Būdama RNP sudėtyje RNR išlaiko antrinę struktūrą, o RNP įgyja plaukų segtuko struktūrą (Fournier et al., 2012). Šios struktūros svarbios RNR-RNR ir NP-NP sąveikoms tarp skirtingų segmentų RNP. Yra perteklinis RNP-RNP sąveikų kiekis, kuris leidžia palaikyti genomo struktūros plastiškumą viriono sudarymo metu. Įvairios RNP-RNP sąveikos sudaro galimybę persitvarkyti RNP (angl. *reassortment*) tarp skirtingų genetinių linijų koinfekcijos metu, kas gali lemti imuninio atsako išvengimą (Dadonaite et al., 2019).

Matrikso baltymas (M) yra labiausiai sintetinamas virusinis baltymas vėlyvoje infekcijos stadijoje, atliekantis įvairias funkcijas. Geriausiai ištyrinėtas gripo viruso A matricos baltymas 1 (M1, angl. *matrix protein 1*). Šis baltymas formuoja linijinius polimerus, kurie sudaro nuo 1 iki 6 paralelių grandinių spirales. Po apvalkalėliu M1 spiralės formuoja viriono endoskeletą (Peukes et al., 2020). Filamentiniai virionai pasižymi poliniu baltymų pasiskirstymu: RNP priekinėje dalyje, nuo kurios prasidėjo M1 polimerizacija, yra susitelkę HA, o kitame gale klasterizuojasi NA, kurie prisideda prie viriono atsipumpuravimo (Calder et al., 2010). M yra pagrindinis faktorius nulemiantis viriono formą

(1.3. pav.).



1.3. pav. Įvairių *Thogotovirus* atstovų sferinės (A) ir filamentinės (B) morfologijos virionų elektroninio mikroskopo nuotraukos, adaptuotos iš Fuchs et al (2022). Filamentiniai virionai dažnai turi apvalias struktūras viename gale (baltos rodyklės). Skalė 100 nm.

M1 pradeda kauptis prie plazminės membranos dėl elektrostatinių sąveikų, kadangi tokios sąveikos yra nespecifiškos M1 kaupiasi ir prie branduolio membranos. Tad būtinos papildomos M1 sąveikos su virusinių baltymų, inkorporuotų plazminėje membranoje, citoplazminiu regionu (Wang et al., 2010). Pasiekus kritinę M1 koncentraciją prie plazminės membranos prasideda struktūrinio baltymo polimerizacija ir viriono formavimasis (Hilsch et al., 2014). Isaviruso M1 pasižymi panašiomis savybėmis kaip ir gripo virusų (Zhang et al., 2017). THOV atveju yra vykdomas jo 6 segmento transkripto alternatyvusis splaisingas, kad būtų sintetinamas struktūrinė M forma (Kochs, et al., 2000). THOV 6 segmento pilno ilgio transkriptas koduoja baltymą ML (angl. *M-long protein*). Šis baltymas yra IFN (interferono) antagonistas, kurio pagrindinė funkcija slopinti IFN-β (interferono-β) indukciją, kuris yra svarbus ląstelės atsakas į virusinę infekciją. Vien tik ML

oligomerų neužtenka viriono karkaso susidarymui, tačiau ML gali būti inkorporuotas į matrikso sluoksnį (Hagmaier et al., 2004).

Ortomiksovirusų apvalkalėlis susidaro pumpuravimosi metu, kada M karkasas pasidengia ląstelės šeimininkės plazmine membrana su joje jau integruotais virusiniais glikobaltymais bei jonų kanalais. Nuo paviršiaus glikobaltymų priklauso ortomiksovirusų tropizmas, prisitvirtinimas ir patekimas į ląstelę bei pumpuravimosi iniciacija. Apvalkalėlio paviršiuje, esančių suliejimo baltymų amfipatiškas peptidas įsilieja į ląstelės plazminę membraną ir atlieka prisitvirtinimo funkciją. Orthomyxoviridae šeimos evoliucijoje įvyko bent du paviršiaus glikobaltymų pasikeitimai tarp I ir III suliejimo baltymų klasės (1.4. pav.) (Dudas ir Batson, 2023). I klasės suliejimo baltymų suliejimo peptidai yra suliejimo subvieneto N gale, III klasės baltymų suliejimo kilpos išdėstytos β-lakštų galuose (White et al., 2008).



1.4. pav. *Orthomyxoviridae* šeimos filogenetinio medžio schema pagal PB1 (angl. *RNA-directed RNA polymerase catalytic subunit*) sekas (Dudas G., nepublikuoti duomenys). Spalva žymi genčių paviršiaus glikobaltymų tipus: geltona – gp64, oranžinė – HA/HEF. Trikampių dydis atitinka panaudotų sekų kiekį sudarant filogenetinį medį.

Gripo virusų integruoto į plazminę membraną HA koncentracijos didėjimas lemia plazminės membranos išsilenkimą ir inicijuoja viriono pumpuravimosi pradžią (Chlanda et al., 2017). Kitų ortomiksovirusų pumpuravimosi veiksniai netyrinėti. Gripo virusų ir ISAV glikobaltymai yra I klasės suliejimo baltymai. Gripo virusų A ir B HA jungiasi prie $\alpha 2$ –3–, $\alpha 2$ –6– arba $\alpha 2$ –8– sialo rūgšties receptorių ir sulieja membranas patekus į endosomą (Böttcher-Friebertshäuser et al., 2014). Gripo virusų C ir D visas funkcijas atlieka vienas glikobaltymas HEF, atpažįstantis 9-O-acetilintą arba 7,9-O-acetilintą sialo rūgšties receptorių (Barnard et al., 2021). Isaviruso atveju glikobaltymas HE atpažįsta 4-O-acetilintą sialo rūgšties receptorių, o F atlieka membranų suliejimo funkciją (Fosse et al., 2023). Togotovirusų gp64 yra panašios struktūros į bakuloviruso AcMNPV gp64, kuris yra III klasės suliejimo baltymas ir lemia pH-indukuojamą membranų suliejimą (Guo et al., 2024). Į THOV virusą panašių virusų klado gp64 išliko struktūriškai artimesnis AcMNPV glikobaltymui nei Į DHOV virusą panašių virusų klado glikobaltymą, nors abi grupės atsiskyrė nuo bakulovirusų panašiu metu (Peng et al., 2017). Spėjama, kad togotovirusai kaip ir gripo virusai patenka į ląstelę endocitozės būdu: viruso apvalkalėlis susilieja su endosomos membrana įvykus pH pokyčiui, taip išlaisvinant

RNP į ląstelės citozolį (Kosoy et al., 2015; Bai et al., 2019). Iš *Orthomyxoviridae* šeimos *Thogotovirus* ir *Quaranjavirus* paviršiaus glikobaltymai yra struktūriškai artimiausi. *Thogotovirus* ir *Quaranjavirus* virusų gp64 taikiniai kol kas nėra žinomi, bet yra įrodymų, kad tai nėra sialo rūgšties receptoriai (Peng et al., 2017).

1.5. Tiriamajam darbui aktualūs ortomiksovirusai

1.5.1. Sinu virusas

SINUV izoliuotas iš uodų, sugautų 2013 m šiaurės vakarų Kolumbijoje, ląstelių kultūrų, (Contreras-Gutiérrez et al., 2017). SINUV genomą sudaro 10833 nukleotidai, kurie padalinti į 6 segmentus. Šis virusas priskirtas *Orthomyxoviridae* šeimai *Thogotovirus* genčiai. Pagal filogenetinę analizę SINUV anksčiau atsiskyrė nuo žinomų *Thogotovirus* atstovų. Pasinaudojus pseudovirusų technologijomis buvo nustatyta, kad SINUV gali infekuoti žmogaus (HEK293T ir U87-MG), šunų (MDCK), kiaulių (PK-15) ir šikšnosparnių (Tb1-Lu) ląstelių linijas (Thamamongood et al., 2024). Šiais atradimais remiantis SINUV turi didelį zoonotinį potencialą.

1.5.1. Uhano 6 uodų virusas

WuMV-6 pirmą kartą paminėtas 2015 m. Li ir kolegų. Įvairių uodų, surinktų Kinijoje, transkriptomikos duomenyse nustatytas į quaranjavirusus panašus WuMV-6, kuris turėjo didžiausią panašumą į Džonstono atolo virusą (angl. *Johnston Atoll virus*, dabar *Quaranjavirus johnstonense*), *Quaranjavirus* atstovą (Li et al., 2015). Li et al (2015) tyrime RNR virusų detekcija buvo paremta konservatyvių RdRp sekų aptikimu, tačiau visos segmentuotų genomų sekos nustatymui neužtenka remtis homologija, nes segmentai gali būti itin įvairūs. Shi et al (2017) identifikavo dar 5 WuMV-6 genomo segmentus. Batson ir kolegos (2021) likusius WuMV-6 segmentus nustatė metagenomikos duomenyse pagal pakartotinį neidentifikuotų sekų ir WuMV-6 RdRp sekų aptikimą pavienių uodų mėginių sekose. Surinktas WuMV-6 genomas sudarytas iš 8 segmentų. Daugiausiai WuMV-6 nustatyta *Culex* sp. transkriptomikos duomenyse (Shi et al., 2017; Pettersson et al., 2019; Batson et al., 2021).

1.5. pav. WuMV-6 PB1 seku didžiausiojo tikėtinumo medis, adaptuotas iš Dudas ir Batson (2023). Žemėlapyje pažymėtos vietos, kuriose buvo nustatytas pilnas arba dalinis WuMV-6 genomas. Punktyrinė linija žymi paskutiniu metu įvykusius genų judėjima tarp skirtingų genetinių WuMV-6 linijų.



Culex sp. uodai yra vieni iš arbovirusų (nariuotakojų pernešami virusai) vektoriai. Šie uodai plačiai paplitę pasaulyje, besimaitinantys žinduolių (ir žmogaus) bei paukščių krauju (Mackay et al., 2010). Per 20 m. 6 žemynuose paplitusios genetinės WuMV-6 linijos turi bendrą protėvį, tai mini globalią viruso migraciją, kurios paplitimo greitis nebūdingas tik uodus infekuojantiems virusams (Dudas ir Batson, 2023). Pagal genų pernešimo (angl. *gene flow*) analizę matosi nuoseklus genų persitvarkymas (angl. *reassortment pattern*) tarp skirtingų genetinių WuMV-6 linijų (1.5. pav.).

Antro galimo stuburinio šeimininko hipotezę paremia ir didžiausia sekų įvairove pasižymintis gp64 koduojantis segmentas, kuriame įvyko daugiausiai ar. pakeičiančių mutacijų per metus palyginus su kitais virusiniais segmentais. Stuburinių įgytos imuninės sistemos (ypač neutralizuojančių antikūnų) spaudimas skatina viruso paviršiaus glikobaltymo evoliuciją (Beretta et al., 2020). Neaišku, ar nariuotakojų imuninė sistema galėtų padaryti tokį patį efektą. Nariuotakojų imuninėje sistemoje yra stuburinių įgimtos imuninės sistemos homologų, bet ne įgytos (pvz.: T limfocitai ar B limfocitai, sekretuojantys antikūnus). Nariuotakojų specifinis imuninis atsakas yra mažai suprastas (Kloc et al., 2024). Įtariama, kad nariuotakojų imuninė sistema per lėtai keičiasi, kad galėtų sudaryti teigiamos atrankos spaudimą virusų paviršiaus glikobaltymams (Obbardi ir Dudas, 2014).

1.6. Pseudovirusų technologija

Vienas iš žmogaus sveikatai žalingų virusų tyrimų sunkumų yra aukšto biologinės saugos lygio (BSL) darbo aplinkos reikalavimai. Priklausomai nuo viruso patogeniškumo būtinos BSL 3 arba 4 laboratorijos yra retos, brangios bei reikalauja darbuotojų aukštesnių kompetencijų. Todėl pseudovirusai, kurie yra sukurti visiškai atkartojantys viruso paviršiaus struktūrą, geba infekuoti tikslines ląsteles, bet negeba replikuotis ir nėra patogeniški, yra puiki alternatyva virusų moksliniams ir klinikiniams tyrimams.

1.6.1. Žmogaus imunodeficito virusas 1

Žmogaus imunodeficito virusas (ŽIV) – turintis apvalkalėlį viengrandinės teigiamos krypties RNR retrovirusas, priklausantis *Lentivirus* genčiai. ŽIV ne tik pasitelkia ląstelės molekulines replikacijos ir baltymų sintezės sistemas infekcijos metu, bet ir integruoja genomo DNR kopiją į ląstelės genomą, taip ŽIV infekcija tampa ilgalaikė. ŽIV genomą sudaro dvi vienodos nuo 9200 nt iki 9600 nt viengrandės RNR kopijos. Genomo integracijai svarbios LRT (angl. *long terminal repeats*) sekos, kurios išsidėsčiusios genomo pradžioje ir pabaigoje. Taip pat, 5' LRT regionas funkcionuoja kaip silpnas transkripcijos promotorius. Nuo tos pačios iRNR susintetinama sulietas polibaltymas Gag-Pol (Pr160^{gag – pol}, gag (group-specific antigen) ir pol (polymerase) genų produktas) ir struktūrinių baltymų prekursorinis baltymas Gag (Pr55^{gag}, gag geno produktas) (santykiu 1:20) (Jacks et al., 1988). Pumpuravimosi metu virusinė dalelė formuojasi iš Gag, Gag-Pol polimerų ir plazminėje membranoje integruotų virusinių glikobaltymų (1.6. pav.).



1.6. pav. ŽIV viriono susidarymo ir pumpuravimosi schema, adaptuota iš Freed (2015). Vėlyvoje ŽIV infekcijos stadijoje sintetinami Gag ir GagPol polibaltymai. Gag sąveikauja su virusine kopijine RNR ir pradeda polimerizuotis prie plazminės membranos. Gag ir GagPol polimerizacijos metu pritraukiami Env transmembraniniai glikobaltymai ir išlenkiama plazminė membrana. Viruso atsipumpuravimui padeda ląstelės baltymai ESCRT-I (angl. *endosomal sorting complexes required for transport*), ESCRT-III ir ALIX (angl. *programmed cell death 6-interacting protein*). Plazmine membrana apgaubtas virionas subręsta, kai polibaltymai hidrolizuojami į atskirus baltymus, susidaro matrikso karkasas, kapsidė ir nukleokapsidė.

Atsipumpuravimo ir brendimo metu virusinės proteazės hidrolizuoja polibaltymą Gag į 4 struktūrinius baltymus ir 2 peptidus: matrikso (p17), kapsidės (p24), nukleokapsidės (p7) ir RNR stabilizuojantį (p6) baltymus bei SP1 ir SP2 tarpinius peptidus (angl. *spacer peptides*) (Mendonça et al., 2021), o Gag-Pol į struktūrinius baltymus bei Pol sudedamus baltymus: proteazę (p10), atvirkštinę transkriptazę (p51), ribonukleoazę H (p15) ir integrazę (p32) (Lin et al., 2022).

ŽIV *env* (envelope glycoprotein) genas koduoja paviršiaus glikobaltymą, sudarytą iš dviejų: gp120 (paviršiaus) ir gp41 (transmembraninės) dalių. Nuo Env glikobaltymo priklauso ŽIV tropizmas, infekcijos metu Env gali mutuoti ir sąveikauti su kitais ląstelės receptoriais ir koreceptoriais. Dažniausiai pasitaiko ŽIV Env R5 variantas, kuris atpažįsta CCR5 (angl. *C-C chemokine receptor type 5*) ir CD4 (angl. *cluster of differentiation 4*) receptorius, dengiančius aktyvuotus CD4+ T limfocitus. Kai kurie Env R5 variantai taip pat gali infekuoti ir makrofagus. ŽIV

Env 4X variantas naudoja T limfocitų CXCR4 (angl. *C-X-C motif chemokine receptor 4*) receptorius (Islam et al., 2013). ŽIV genome yra ir reguliacinių baltymų genai: *tat* (trans-activator of transcription), *rev* (regulator of expression of virion proteins). Tat pritraukia transkripcijos mašineriją prie 5' LTR, taip sustiprindamas virusinės RNR transkripciją, ir sukuria ląstelėje aplinką, paskatinančią virusinės RNR transkripciją lyginant su ląstelės genų transkripcija (Das et al., 2011). Rev turi importo ir eksporto iš branduolio signalus, tad keletas Rev baltymų sąveikaudami su RRE (angl. *Rev-responsive element*) seka transportuoja genominę neapdorotą RNR iš branduolio į citozolį prie polimerizuojančių Gag polibaltymų (Cook et al., 1991). ŽIV genome taip pat yra pagalbinių baltymų, kurie didina viruso infektyvumą, genų: *nef* (negative regulatory factor), *vif* (viral infectivity factor), *vpr* (viral protein r), *vpu* (viral protein u).

1.6.2. Lentivirusų pakavimo sistemų kartos

Lentivirusai gali supakuoti apie 9 kb ir infekuoti tiek besidalinančias, tiek nesidalinančias ląsteles, todėl yra puikūs rekombinantinių genų vektoriai. I-osios kartos platformoje ŽIV genomas buvo padalintas į 3 plazmides: 1) pakavimo vektorius su struktūrinių baltymų, virusinių fermentų, reguliacinių ir papildomų baltymų genais, 2) plazmidė su paviršiaus glikobaltymo genu ir 3) plazmidė su transgenu (1.7. pav. A) (Naldini et al., 1996). Tokioje sistemoje galima naudoti bet kurio apvalkalėlį turinčio viruso glikobaltymo geną, dažniausiai naudojamas VSV G baltymo genas, kad pseudovirusas įgytų platų tropizmą. Pakavimo ir apvalkalėlio plazmidėse LTR sekos pakeistos į žmogaus citomegaloviruso (CMV, angl. Human cytomegalovirus) promotorių, kad paviršiaus glikobaltymo sintezė vyktų efektyviai. Į infekuotos ląstelės genomą gali būti integruotas tik transgenas, įterptas tarp LTR sekų. Ψ pakavimo signalas paliktas tik transportavimo plazmidėje su transgenu, todėl tik šios plazmidės transkriptai gali būti supakuoti į lentivirusino vektoriaus (LV) vidu. Efektyviai transfekavus visas plazmides i ląstelę šeimininkę pagaminami lentivirusai, galintys infekuoti tikslinę ląstelę tik vieną kartą. Naudojant I-os kartos vektorius liko didelė replikuotis galinčių pseudovirusų susidarymo tikimybė dėl rekombinacijos. II-osios kartos sistemoje buvo išimti pagalbinių baltymų genai iš pakavimo plazmidės, tačiau reguliacinių baltymų genai palikti (1.7. pav. B). Buvo nustatyta, kad Gag ir GagPol polibaltymų užtenka virusinės RNR transportavimui į branduolį. Papildomų baltymų genų, kurie didina virulentiškumą, pašalinimas panaikino rekombinuotis gebančių ŽIV susidarymo pavojų (Zufferey et al., 1997). II-osios kartos sistemoje transportuojamos RNR transkripcija vis dar priklausė nuo Tat ir Rev baltymų, nes 5' LRT seka pasižymi silpnu baziniu promotoriniu aktyvumu. III-osios kartos sistemoje plazmidėje su transgenu nuo Tat priklausomą promotorių pakeitė rous sarkomos viruso (angl. Rous sarcoma virus) arba CMV promotoriai (1.7. pav. C). Tad pakavimo plazmidėje nebeliko tat sekos, o *rev* perkeltas į ketvirtąją

plazmidę (Dull et al., 1998). Plazmidė su *rev* seka dar sumažino rekombinacijos galimybę, dėl kurios susidarytų replikuotis galintys pseudovirusai (Cornetta et al., 2018).



1.7. pav. Lentivirusų vektorių schema, adaptuota iš Duvergé ir Negroni (2020). (**A**) I-osios kartos vektoriai; (**B**) II-osios kartos vektoriai; (**C**) III-osios kartos vektoriai.

1.6.3. Lentivirusų vektorių pritaikymas

Lentivirusų pakavimo sistemos leidžia keisti virusinės dalelės tropizmą pasirenkant apvalkalėlyje inkorporuotus virusinius glikobaltymus. Galima pritaikyti bet kurios paviršiaus glikobaltymus, turinčius transmembraninius segmentus. Dažnai naudojamas plataus tropizmo VSV glikobaltymas G, kuris pasižymi mažu ląstelės tipui specifiškumu, nes sąveikauja žemo tankio lipobaltymų (LDL, angl. low-density lipoprotein) receptorius. Tai yra pritaikoma stabilių rekombinantinių ląstelių kultūrų kūrime. VSV pseudotipuoti LV nėra universalūs ir turi savų trūkumų, aktualių genų terapijoje. VSV G pasižymi toksiškumu žmogaus ląstelių kultūroms, stabiliai sintetinančias LV, kas pasireiškia mažesniu virusiniu dalelių titru bėgant laikui (Humbert et al., 2016). Pagrindiniai genų terapijos taikinių – kamieninių ląstelių – plazminėje membranoje yra nedaug LDL receptorių, dėl ko stipriai sumažėja VSV-G pseudotipuotų LV transdukcijos efektyvumas (Girard-Gagnepain et al., 2014). Pavyzdžiui, Jargalsaikhan ir kolegų (2024) tyrimo metu buvo sukurti dvigubo pseudotipo LV, apvalkalėlyje eksponuojantys kartu VSV G ir Sendai viruso (angl. Sendai virus) HN (angl. hemagqlutinin-neuraminidase protein) glikobaltymus, pseudovirusai pasižymėjo platesniu tropizmu ir geresniu kamieninių ląstelių transdukcijos efektyvumu. Kitas glikobaltymų pasirinkimo aspektas – virusiniai glikobaltymai įtakoja pseudovirusų stabilumą ir pusinės eliminacijos laiką (Dautzenberg et al., 2021). Transdukavus LV ląstelių kultūroje lieka perteklinių pseudovirusų, kurie kelia pavojų biosaugumui. Reikia imtis papildomų priemonių, kad tokios ląstelės galėtų būti naudojamos genų terapijoje arba darbui BSL-1 sąlygomis. Dautzenberg et al (2021) tyrime pademonstruota, kad tripsinas inaktyvuoja daugumą pseudotipuotų LV, tačiau silpnai veikia pseudovirusus, eksponuojančius VSV G. Tad kita veiksminga darbo su pseudovirusais saugos priemonė yra žmogaus serumas, kuriame esantys komplemento baltymai gali inaktyvuoti VSV G pseudotipuotus LV (DePolo et a., 2000). LV sistema ne tik gali veikti kaip transgeno vektorius, bet ir atkartoti virusų turinčių apvalkalėlį infekcijas BSL-2 sąlygomis, nes šių virusų atvejų infekcija įvyksta tik tuomet, kai viruso glikobaltymas sąveikauja su infekuojamos ląstelės receptoriais. Tseng et al (2021) tyrime buvo sukurta SARS-CoV-2 (ūmiais respiraciniais sindromais susijusių 2 koronavirusas) spyglio baltymu pseudotipuotų LV metodika tirti SARS-CoV-2 infekciją *in vitro* ir *in vivo* pelių modeliuose.

Lentivirusai geba savo genomą integruoti į infekuotos ląstelės genomą. Šis biologinis mechanizmas itin patrauklus genomų redagavimo srityse, kaip genų terapija. ŽIV genomo integracija nėra atsitiktinė, dažnos integracijos vietos yra virusinės infekcijos aktyvuoti genų lokusai (Schröder et al., 2002). ŽIV genomo integracija funkcionuojančių genų sekose kelia vektoriaus sukelto onkogeniškumo riziką, tačiau tyrimai rodo, kad didžioji dalis integracijų nekelia klinikinių sutrikimų (Biffi et al., 2011). Išsiaktyvuojančių (angl. *self-inactivating*) LV technologija pasižymi mažesniu genotoksiškumu nei įprasti LV, bet visgi yra neaiškūs ilgalaikio poveikio šalutiniai efektai (Cesana et al., 2014). Schenkwein et al (2020) pavyko sumažinti LV genotoksiškumą nukreipiant integrazės ir endogeninės nukleazės sulietą baltymą į pasikartojančias ribosominės RNR koduojančias sekas. Kol kas dar lieka neišspręstas LV integracijos genotoksiškumo klausimas, tačiau net su minimalia rizika LV naudojami genų terapijos klinikiniuose tyrimuose, pvz.: cerebrinės adrenoleukodistrofija gydymui (Wang et al., 2024).

2. Medžiagos ir metodai 2.1. Medžiagos

2.1.1. Rinkiniai

Visi rinkiniai įsigyti iš "Thermo Fisher Scientific" įmonės:

- GeneJET Viral DNA/RNA Purification Kit (#K0821),
- GeneJET Plasmid Miniprep Kit (#K0502).

RNR skyrimo rinkinys Saliva/Swab RNA Purification Kit ("Norgen Biotek", #69100).

Liuciferazės analizės rinkinys Nano-Glo® Luciferase Assay System ("Promega", #N1110).

Ląstelių skaičiavimui Cedex[®] HiRes Reagent Kit ("Roche", #05650798001).

PBMC izoliavimo 15 ml centrifugavimo mėgintuvėliai SepMate[™]-15 (RUO) ("Stemcell technologies", # 86415).

2.1.2. Fermentinės reakcijos

Fermentinėse reakcijose naudoti "Thermo Fisher Scientific" pagaminti fermentai, buferiniai ir reagentų mišiniai:

- Polimerazės grandininės reakcijos atliktos su DreamTaq DNR polimeraze(#EP0705), komplementariu DreamTaq[™] Green buferiu (#B71) ir dNTP mišiniu (#R0192); arba su Phusion[™] High-Fidelity DNR polimeraze (#F530S) ir rekomenduojamu Phusion Green HF buferiu (#F538L), dNTP mišiniu (#R0192); arba su Platinum[™] SuperFi[™] (#12351010) ir rekomenduojamu buferiu, dNTP mišiniu (#R0192).
- DNR fragmentų susiuvimas atliktas su T4 DNR ligaze (#EL0011) ir T4 DNR ligazės buferiu (#B69).
- DNR restrikcijos reakcijos atliktos: su EcoRI (#ER1921), NotI (#ER0592) restrikcijos endonukleazėmis su O buferiu (#BO5); AarI restrikcijos endonukleaze su AarI buferiu ir oligonukleotidų mišiniu (#ER1581); BseDI restrikcijos endonukleaze (#ER1081) su Tango buferiu (#BY5).
- Išskirta RNR buvo veikiama su "DNaze I" fermentu, reakcija inaktyvuota su EDTA buferiu (#EN0525).
- Atvirkštinės transkripcijos reakcijos atliktos su "Maxima" atvirkštinės transkripcijos fermentu (#EP0741), atsitiktinės sekos heksameriniais pradmenimis (#N8080127) ir dNTP mišiniu (#R0192).
- Kokybinės polimerazės grandininės reakcijos atliktos naudojant "Luminaris Color Probe qPCR Master Mix" rinkinį (#0351).
- Fosforo liekanų pašalinimas nuo DNR fragmentų galų atliktas su karščiui jautriu "FastAP" šarminės fosfotazės fermentu ir rekomenduojamu buferiu (#EF0651).

2.1.3. DNR fragmento gryninimas iš agarozinio gelio

Fenolis pH=7,5-8 ("Roth");

Fenolio-chloroformo mišinys pH=7,5-8 ("Roth");

Amonio acetatas – 7,5 M NH₄OAc vandeninis tirpalas;

Etanolis – 100 % ir 70 % C₂H₅OH ("Sigma-Aldrich") vandeninis tirpalas.

2.1.4. Pradmenys ir zondai

2.1. lentelė. Darbe naudotų pradmenų poros ir TaqMan zondai.

Pavadinimas	5'-3' seka	Produkto ilgis
	Kokybinės polimerazės grandininė reakcija	
GAG-T	GGAGCTAGAACGATTCGCAG	
GAG-A	GATGGTTGTAGCTGTCCCAG	84 bp
GAG-Z	FAM-CCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGG-BHQ-1	
	Polimerazės grandininė reakcija	
nLuc-T	TTTAAGGTGGTGTACCCTGTG	114 -
nLuc-A	CATACGGCCGTCCGAAATA	114 DP
	WuMV-6 <i>gp64</i> sekos modifikavimas	
WMV6Dir	GCACACCTGCTGATCATGGTGGCGAATTC	2002 ha
2ndATGRev CGTCACCTGCTCATCATGGTCTTAACAAAAGGGAAAG		2002 nh
WMV6Dir	GCACACCTGCTGATCATGGTGGCGAATTC	2040 h-
SignalRev	CGTCACCTGCTCATCATGAAAGGCGACCCCGTG	3848 ор

2.1.5. DNR elektroforezės reagentai

TAE buferis (pH=8,3) – 0,04 M Tris acetato, 0,2 mM EDTA ("Thermo Fisher Scientific", #17892) vandeninis tirpalas;

0,8-2 % agarozės gelis – 2,4-6 g
 agarozės išlydoma 300 ml 1x TAE buferyje, įdedama 7,5 µl EtBr;

Etidžio bromidas – 10 mg/ml EtBr tirpalas;

DNR dažas – 6x DNA Gel Loading Dye ("Thermo Fisher Scientific", #R0611);

DNR fragmentų ilgio žymenys – "GeneRuler DNA Ladder Mix" ("Thermo Fisher Scientific",

#SM0331), "MassRuler Low Range DNA Ladder" ("Thermo Fisher Scientific", #SM0383).

2.1.6. Baltymų NDS-poliakrilamidinės gelelektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis reagentai

Koncentruojantis gelis – 3,2 % akrilamido-bisakrilamido tirpalo, 1,25 M Tris-HCl (pH = 6,8),

0,1 % NDS tirpalo, 0,1 % amonio peroksisulfato tirpalo ir 0,001 % TEMED ("Applichem");

Frakcionuojantis gelis – 12 % arba 13 % akrilamido-bisakrilamido tirpalo, 0,375 M Tris-HCl

(pH = 8,8), 1 % NDS tirpalo, 0,1 % amonio peroksisulfato tirpalo ir 0,001 % TEMED ("Applichem"); 2x baltymų mėginių dažas – 0,5 M Tris-HCl (pH = 6,8), 20 % glicerolis ("Thermo Fisher

Scientific"), 4 % NDS, 0,001 % bromfenolio mėlio ir 10 % merkaptoetanolio tirpalas;

Tris-glicino/NDS elektroforezės buferinis tirpalas –25 mM Tris, 2 mM glicino, 0,03 mM NDS, pH = 8,3;

Baltymų molekulinės masės standartas – "PageRuler™ Prestained Protein Ladder" ("Thermo Fisher Scientific", #26617).

2.1.7. Imunoblotingo reagentai

Pernešimo buferis – 25 mM Tris, 150 mM glicino, 10 % (v/v) etanolio vandeninis tirpalas;

Blokavimo buferis – 1 % pieno miltelių, 100 mM Tris-HCl (pH=7,5), 300 mM NaCl, 0,05 %

(v/v) Triton x100 vandeninis tirpalas;

TBS (pH=7,5) – 20 mM Tris, 0,5 M NaCl vandeninis tirpalas;

TTBS – 0,1 % Tween-20 tirpalas TBS buferyje;

Chemiliuminescencijos detekcijos reagentų rinkinys Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent ("Cytiva", #RPN2232);

Nitroceliuliozės membrana ("Cytiva", #10600004).

2.1.8. Antikūnai

Monokloniniai triušio anti hemagliutinino (YPYDVPDYA) žymės - antikūnai ("Cell Signaling Technology", #C29F4);

Monokloniniai pelės anti ŽIV Gag p24 antikūnai ("Biotechne", #MAB7360);

Monokloniniai pelės anti β-aktino antikūnai, ("Abcam" ab3280);

Polikloniniai ožkos anti-pelės IgG antriniai antikūnai, konjuguoti su krienų peroksidaze ("Biorad", #1706516);

Polikloniniai ožkos anti-triušio IgG antriniai antikūnai, konjuguoti su krienų peroksidaze (HRP) ("Biorad", #1721019).

2.1.9. Bakterijų kamienai

Escherichia coli DH5 α (EGIS kolekcija): F–, φ 80lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, recA1, endA1, hsdR17(rK–, mK+), phoA, supE44, λ –thi-1, gyrA96 relA1.

Escherichia coli StellarTM ("Takara"): F–, endA1, supE44, thi–1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ 80d lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF) U169, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Δ mcrA, λ –.

2.1.10. Bakterijų auginimo terpės

Skysta LB terpė – 20 g/l sausos LB "Lennox" terpės ("Thermo Fisher Scientific") vandeninis tirpalas, autoklavuotas;

Agarizuota LB terpė – 25 g/l sausos LB "Lennox" terpės ("Thermo Fisher Scientific") vandeninis tirpalas su 2 % agaro ("Thermo Fisher Scientific"), autoklavuotas;

Ampicilinas – 50 mg/ml ampicilino ("Roth") ir 50 % C_2H_5OH vandeninis tirpalas, nufiltruotas laikomas –20 °C.

2.1.11. Ląstelės

Žmogaus embriono inkstų ląstelės (HEK293T/17), įsigytos iš ATCC kompanijos;

Pirminės *Culex tarsalis* uodų embrioninės ląstelės (CxTr-R2), gautos iš Wiliam C. Wilson, USDA Argiculture Research Service (ARS), JAV;

G. g. domesticus PBMC, izoliuotos iš sveikų 39 dienų amžiaus vištų, Vilniaus apskrities paukštynas.

2.1.12. Ląstelių augimo terpės

HEK293T/17 augimo terpė DMEM: Gibco[™] Dulbecco modifikuota Eagle mitybinė terpė (DMEM) su GlutaMAX[™] ("Thermo Fisher Scientific", #11594446), papildyta 10 % Gibco[™] galvijų vaisiaus serumu, Gibco[™] 100 U/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino mišiniu, filtruota per 0,2 µm filtrą.

Culex tarsalis CxTr-R2 augimo terpė Culex: Gibco[™] Schneider's Drosophila Medium ("Thermo Fisher Scientific", #2172000), papildyta 5 mM natrio bikarbonatu, 0,4 mM L-glutaminu, 19,5 µM redukuotu glutationu, 0,23 mM L-asparginu ("Sigma-Aldrich"), 20 % Gibco[™] karščiu inaktyvuotu galvijų vaisiaus serumu tinkamu vabzdžių kultūroms, Gibco[™] 100 U/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino mišiniu, filtruota per 0,2 µm filtrą.

Vištų PBMC inkubavimo terpė RPMI: Gibco™ Rosvelo parko memorialinio instituto mitybinė terpė 1640 (RPMI) ("Thermo Fisher Scientific", #11875093), papildyta 10 % Gibco™ galvijų vaisiaus serumu, Gibco™ 100 U/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino mišiniu, filtruota per 0,2 µm filtrą.

PBS – Oxoid[™] Phosphate Buffered Saline tabletė ("Thermo Fisher Scientific", #10209252) ištirpinta vandenyje, autoklavuota.

Dimetilsulfoksidas (DMSO) ("Roth", #A994.1).

Tripsinas – 0,05 % Trypsin-EDTA su fenolio raudonuoju. ("CORNING", #25-052-CI)

2.1.13. Ląstelių transfekcijos ir infekcijos reagentai

PLL – 0,0002 % poli-L-lizino vandeninis tirpalas;

Transfekcijos reagentas Lipofectamine[™] 2000 Transfection Reagent ("Thermo Fisher Scientific", #11668019);

Gibco[™] Opti-MEM[™] terpė ("Thermo Fisher Scientific", #31985070);

Natrio butiratas – 100 µM spiritinis tirpalas;

Infekcijos reagentas: 8 µg/ml polibreno vandeninis tirpalas;

RIPA buferis – 150 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH=8), 50 mM Tris (pH=8), 1 % NP-40, 0,5 % natrio deoksicholato, 1 % NDS ir 1x proteazių inhibitorių mišinio vandeninis tirpalas;

Bradford reagentas ROTI®Quant ("Roth").

2.1.14. Pseudovirusų koncentravimas

Sacharozės "pagalvei"– 20 % sacharozės tirpalas PBS buferyje, filtruota per 0,2 μ m filtrą.

2.1.15. Vektoriai

pCAGGS – žinduolinis raiškos vektorius (Creative Biogene).

Virusų glikobaltymų genų sekos su hemagliutinino žyme 3' gale buvo susintetintos ir suklijuotos su pMA-RQ vektoriumi ("Thermo Fisher Scientific");

psPAX2 – lentivirusų II-osios kartos pakavimo plazmidė (Trono laboratorija, Šveicarija);

pCDH-CMV-nLuc – lentivirusų II-osios kartos pernešimo plazmidė su nanoliuciferazės genu (Trono laboratorija, Šveicarija);

pLV-CMV-EFGP – lentivirusų II-osios kartos pernešimo plazmidė su EGFP genu (Trono laboratorija, Šveicarija);

pCMV-VSV-G – raiškos vektorius su VSV G glikobaltymo genu (Baselio Universitetas, Šveicarija).

2.2. Metodai

2.2.1. Žinduolinių raiškos vektorių su ortomiksovirusų *gp64* genų sekomis konstravimas

Glikobaltymų genų sekų galuose buvo įterptos EcoRI ir NotI restrikcijos endonukleazių (RE) atpažinimo sekos. EcoRI ir NotI hidrolizė buvo atliekama O buferyje 37 °C 1 h. Iškirpti glikobaltymų genai buvo išgryninti iš 0,8 % agarozės gelio pasinaudojant "GeneJET Gel Extraction" rinkiniu. Raiškos vektorius pCAGGS ("Creative Biogene"), taip pat buvo hidrolizuotas EcoRI ir NotI RE ir paveiktas šarmine fosfataze. Paruoštas pCAGGS vektorius ir glikobaltymų genų fragmentų ligavimo mišinys buvo inkubuotas 1 h su T4 ligaze kambario temperatūroje ir transformuotas į kompetentines DH5 α *E. coli* bakterijas. Užaugusios bakterijų kolonijos ant agarizuotos LB su ampicilinu buvo užsėtos į 5 ml LB terpę su ampicilinu. Iš užaugusios biomasės plazmidės išskirtos su "GeneJET Plasmid Extraction" rinkiniu. Glikobaltymo geno įsistatymas buvo patikrintas atliekant hidrolizę su EcoRI ir NotI RE.

2.2.2. DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio

Transiliuminatoriuje būtina 0,8 % agarozės gelį laikyti ant švarios stiklinės plokštelės, siekiant apsaugoti DNR nuo UV sukeliamų pažaidų. Užsidėjus apsauginius akinius UV šviesoje pažymėtas gelyje reikiamo fragmento kontūras. Jei pjauti keli fragmentai, skalpelis praplautas distiliuotame vandeniu tarp skirtingų DNR fragmentų pjovimo. Gelio gabaliukas su DNR fragmentais susmulkintas, perkeltas į mėgintuvėlį su 1 tūriu fenolio. Laikytas mėgintuvėlis –20 °C per naktį. Tuomet centrifuguotas 11 min 16000 g. Viršutinė vandeninė fazė nusiurbta į kitą 1,5 ml mėgintuvėlį ir užpilta 1 tūris fenolio-chloroformo tirpalo. Gerai sumaišyta purtyklėje ir centrifuguota 3 min 16000 g greičiu. Viršutinė vandeninė fazė nusiurbta į kitą 1,5 ml mėgintuvėlį ir užpilta 0,5 tūrio 7,5 M NH₄OAc tirpalo ir 2,5 tūrio 100 % EtOH. Mišinys šaldytas 30 min –70 °C temperatūroje. Po iki centrifuguotas 15 min 16000 g. Supernatantas nupiltas, o nuosėdos praplautos 500 µl 70 % EtOH tirpalu, sumaišytas purtyklėje ir centrifuguotas 5 min 16000 g. Supernatantas pašalintas automatine pipete, nuosėdos paliktos išdžiūti. Nuosėdos ištirpintos 10 µl distiliuoto vandens.

2.2.3. WuMV-6 glikobaltymo *gp64* geno sekos modifikavimas ir įsiuvimas į žinduolinį raiškos vektorių pCAGGS

PGR atliktas su Platinum[™] SuperFi[™] DNR polimeraze, matrica naudota pMA-RQ-WMV6gp64 plazmidė, o modifikacijos įvestos su pradmenų poromis, turinčiomis AarI RE kirpimo sekomis (signalinės sekos pašalinimui – WMV6Dir ir SignalRev; nukleotidų iki antrojo ATG pašalinimui – WMV6Dir ir 2ndATGRev pradmenų pora). Su signalinės sekos pradmenimis atliktas PGR pakėlus temperatūrą pradmenų hibridizacijos žingsnyje iki 72 °C, o su antrojo ATG pradmenimis atliktas PGR pasinaudojus funkcija, kuri hibridizacijos etapo temperatūrą kiekvieną ciklą pakeldavo 0,5 °C. Padauginti fragmentai išgryninti iš 0,8 % agarozės gelio fenolio/chloroformo metodu. Išgryninti DNR fragmentai hidrolizuoti su AarI RE pagal gamintojo rekomendacijas. Fragmentai išgryninti iš 0,8 % agarozės gelio su rinkiniu "GeneJET Gel Extraction Kit". Linijinės DNR lipnūs galai susiūti su T4 ligaze ir ligavimo mišiniu transformuotos kompetentinės *E. coli* DH5α bakterijos. BseDI RE hidrolize atskirtos modifikuotos plazmidės nuo pMA-RQ-WMV6-gp64 matricos ir modifikacijos patvirtintos sekoskaita ("SeqVision"). Modifikuotos *gp64* genų sekos iškirptos iš pMA-RQ plazmidinės DNR su EcoRI ir NotI RE ir įterptos į žinduolinį raiškos vektorių pCAGGS naudojant T4 ligazę. Ligavimo mišiniais transformuotos kompetentinės *E. coli* DH5α bakterijos. Plazmidinės DNR išgrynintos iš bakterijų pasinaudojant "GeneJet Plasmid Miniprep" rinkiniu.

2.2.4. Plazmidžių padauginimas

Laminarinėje spintoje ant ledo sumaišyta 200 ng plazmidinės DNR su 50 µl kompetentinių bakterijų (pCAGGS plazmidės transformuotos į DH5α kompetentines *E. coli* bakterijas, o psPax2, pCDH-CMV-nLuc ir pLV-CMV-EGFP transformuotos į Stellar kompetentines *E. coli* bakterijas). Mišinys inkubuotas lede 30 min., po iki laikytas 2 min (DH5α) arba 40 s (Stellar) 42 °C vandens vonelėje ir vėl 5 min. lede. Laminarinėje spintoje transformuotos bakterijos buvo užsėtos ant agarizuotos LB lėkštelės su ampicilinu, glaistiklis sterilintas spiritu nudeginant. Lėkštutė laikoma 37 °C termostate per naktį. Steriliai į mėgintuvėlį su 5 ml LB terpės įpilta 50 µg/ml ampicilino, su steriliu pagaliuku bakterijų kolonija nuo agarizuotos LB lėkštelės užsėta į mėgintuvėlį su LB terpe ir palikta purtyklėje 37 °C per naktį. Naktinė kultūra centrifuguota 1744 g greičiu 10 min. Laminarinėje spintoje nupilta terpė ir plazmidės išskirtos iš bakterijų su "Thermo Scientific" GeneJET Plasmid Miniprep Kit pagal rinkinio protokolą. Pamatuota DNR koncentracija su "Thermo Scientific" NanoDrop™spektrofotometru.

2.2.5. Ląstelių auginimas ir persėjimas

Žinduolinių HEK293T/17

Augimo terpė DMEM pašildyta iki 37 °C vandens vonelėje. Ląstelių mėgintuvėlis ištrauktas iš diuaro su skystu azotu ir lėtai atšildytas. Ląstelės suspenduotos DMEM terpėje ir centrifuguotos 200 g 3 min. Laminarinėje spintoje pašalinta šaldymo terpė (10 % DMSO ir galvijų vaisiaus serumas) steriliu siurbtuku. Ląstelės resuspenduotos 8 ml DMEM terpėje ir augintos 75 cm² inde 37 °C su 5 % CO₂ inkubatoriuje.

Augimo terpė, tripsino tirpalas ir PBS pašildyti iki 37 °C vandens vonelėje. Ląstelėms uždengus 80 % 75 cm² indo paviršiaus ploto augimo terpė nusiurbta steriliu siurbtuku laminarinėje spintoje, ląstelės praplautos PBS ir paveiktos tripsinu, kad atšoktų nuo indo paviršiaus. Ląstelės su tripsinu resuspenduotos augimo terpėje ir centrifuguotos 200 g 3 min. Terpė su tripsinu nusiurbta steriliu siurbtuku ir ląstelės švelniai resuspenduotos DMEM augimo terpėje. Dešimtadalis ląstelių persėtas į naują indą toliau augti.

Culex tarsalis CxTr-R2

Culex augimo terpė pašildyta iki 27 °C vandens vonelėje. Ląstelių mėgintuvėlis ištrauktas iš diuaro su skystu azotu ir lėtai atšildytas. Ląstelės laminarinėje spintoje kartu su šaldymo terpe (5 % DMSO ir karščiu inaktyvuotas galvijų vaisiaus serumas) resuspenduotos 4 ml Culex augimo terpėje ir augintos 25 cm² inde (be filtrinio kamštelio) 27 °C inkubatoriuje.

Kai ląstelės užėmė 90 % paviršiaus ploto, ląstelės atkabintos pipetuojant. Dešimtadalis ląstelių persėtos į indą su 27 °C temperatūros Culex augimo terpe.

2.2.6. Virusinių glikobaltymų sintezė žinduolinėse HEK293T/17ląstelėse

Lastelių gyvybingumas ir kiekis pamatuotas su CEDEX 2.2 bioanalyzer (Roche) ("Roche") automatizuotu ląstelių skaičiavimo aparatu. Į kiekvieną 24 šulinėlių plokštelės šulinėlį įpilta po 1 ml auginimo terpės DMEM, užsėta po 20 tūkst. ląstelių ir auginta parą 37 °C 5 % CO₂ inkubatoriuje. Kitą dieną laminarinėje spintoje mėgintuvėlyje 50 µl pašildytos Opti-MEM terpės sumaišyta su raiškos vektoriumi su glikobaltymų genų sekomis ir pLV-CMV-EGFP plazmide. Kitame mėgintuvėlyje į Opti-MEM terpę įdėta LipofectamineTM 2000 (santykis 1,5 µl lipofektamino reagento 1 µg DNR). Mišinys inkubuotas 5 min kambario temperatūroje. Į kiekvieną mėgintuvėlį su DNR ipilta po 50 µl Opti-MEM terpės su lipofektamino reagentu, sumaišyta ir inkubuota 20 min kambario temperatūroje, kad susidarytų lipofektamino ir DNR kompleksai. Iš kiekvieno šulinėlio nusiurbta DMEM terpė ir užpilta 400 µl Opti-MEM terpės bei 100 µl paruoštos Opti-MEM terpės su DNR ir lipofektamino kompleksais. Plokštelė laikyta 37 °C 5 % CO₂ inkubatoriuje apie 18 h. Ryte pakeista Opti-MEM terpė į 1 ml DMEM terpės ir dar auginta 48 h. Prieš ląstelių lizavimą su fluorescencijos mikroskopu patikrinta, ar fluorescavo žaliai ląstelės dėl kartu transfekuotos pLV-CMV-EGFP plazmidės. Ląstelių lizavimas atliktas ant ledo. Iš vieno šulinėlio pašalinta terpė, praplauta 500 µl PBS ir užpilta 75 µl RIPA lizės buferio. Tada pakartoti žingsniai su kitu šulinėliu. Ląstelės su lizės buferiu inkubuotos plokštelėje 5 min ant ledo. Lizatas surinktas į mėgintuvėlius ir centrifuguotas 10 min 16000 g 4 °C. Paimta 75 µl supernatanto, Bradfordo metodu pamatuotas bendras baltymu kiekis. Ant lizato supernatanto užpilta 2x baltymų dažo su NDS, inkubuota 3 min 95 °C. Paruošti baltyminiai mėginiai laikyti -20 °C.

2.2.7. Bradfordo analizė

Kalibracinei kreivei buvo paruoštas 0,5 µg/µl BSA tirpalas. Į 96 šulinėlių plokštelę įpilta po 200 µl 1x Bradfordo reagento. Kalibracinei kreivei nubrėžti į 8 šulinėlius įdėta BSA tirpalo, kad susidarytų koncentracijų gradientas nuo 0 µg iki 10 µg. Į kiekvieną šulinėlį įleista po 1 µl analizuojamų ląstelių lizato, į paskutinį šulinėlį įdėta 1 µl naudoto vienkartinio lizės buferio. Visi šulinėliai gerai supipetuoti ir plokštelė skenuota su Infinite 200 mikroplokštelių skaitytuvu ("Tecan"). Analizuota OD 595 nm.

2.2.8. Baltymų NDS-poliakrilamidinė gelelektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis

Paruošti NDS-poliakrilamidiniai geliai: į paruoštą formą įpilta 5 ml frakcionuojančio gelio tirpalo, sustingus geliui užpilta koncentruojančio gelio tirpalo ir įstatytos šakutės. Sustingęs gelis įstatytas į vertikalų elektroforezės aparatą, sistema užpildyta buferiu. Į šulinėlius suleisti mėginiai suvienodinus baltymų kiekį, į atskirą šulinėlį suleista 5 µl baltymų molekulinės masės žymens. Baltymų NDS-poliakrilamidinė gelelektroforezė leista 100 mV įtampoje, kol baltyminis markeris pradėjo frakcionuotis, po iki padidinta iki 160 mV, kol dažas išėjo iš gelio į buferį.

2.2.9. Imunoblotingo analizė

NDS-poliakrilamidinis gelis įmerktas į pernešimo buferį. Imunoblotų aparate kloti sudrėkinti pernešimo buferyje vatmanas, nitroceliuliozės membrana, gelis ir antras vatmanas. Baltymų pernešimas atliktas 12 V įtampoje 55 min. Membrana perkelta į blokavimo buferį ir laikyta 1 h kambario temperatūroje purtyklėje. Membrana padalinta į dvi dalis pagal baltymų molekulinės masės žymenį ir per naktį laikyta purtyklėje 4 °C: viršutinė dalis, kurioje turėtų būti ~64kDa dydžio analizuojami glikobaltymai, pamerkta su anti-HA žymens monokloniniais triušio antikūnais, apatinė, kurioje turėtų būti 42 kDa β-aktinas arba 24 kDa Gag p24 baltymai, inkubuota su anti-β-aktino monokloniniais žiurkės antikūnais arba anti-p24 monokloniniais pelės antikūnais atiitinkamai. Ryte membranos tris kartus praplautos su TTBS buferiu. Membranos inkubuotos 1 h purtyklėjė su atitnkamais antriniais polikloniniais antikūnais, konjuguotais su HRP, pagal tai, kuriame organizme gaminti pirminiai antikūnai buvo naudoti. Nupylus antrinių antikūnų tirpalą membranos praplautos 3 kartus su TTBS ir vieną kartą su TBS buferiu. Membranos ryškinimui naudota chemiliuminescencinė Amersham ECL sistema ("Cytiva"). Membrana vizualizuota ChemiDoc MP Imaging System ("Bio-rad").

2.2.10. Žinduolinių HEK293T ląstelių transfekcija ir pseudovirusų gamyba

Adhezinėms ląstelėms skirti 75 cm² indai buvo padengti 0,0002 % PLL, siekiant maksimalaus prikibimo. Po 10 min inkubavimo PLL nusiurbtas ir 75 cm² indai praplauti su steriliu PBS buferiu. Į kiekvieną 75 cm² indą įpilta po 8 ml auginimo terpės DMEM, užsėta po 10 mln. ląstelių ir auginta parą 37 °C 5 % CO₂ inkubatoriuje. Laminarinėje spintoje 15 ml mėgintuvėlyje 1,5 ml Opti-MEM terpėje sumaišyti planuojamai transfekcijai reikiamų trijų plazmidinių DNR mišiniai, susidedantys iš: 1) pseudoviruso paviršiaus virusinių (SINUV, WuMV-6, VSV arba AcMNPV) glikobaltymų koduojančias sekas turinčių plazmidinių DNR pCAGGS, 2) plazmidžių su reporterinių baltymų genais pasirenkant pCDH-CMV-nLuc (su nanoliuciferazės genu) arba pCMV-EGFP (su fluorescuojančio EGFP baltymo genu, transfekcijos efektyvumui analizuoti fluorescenciniu mikroskopu), 3) psPAX2 plazmidinės DNR, turinčios trumpus lentiviruso genų sekų fragmentus būtinus pseudoviruso susirinkimui. Kitame mėgintuvėlyje sumaišyta pCAGGS-VSV-G, pCMV- EGFP, psPAX2 ir pCAGGS-nLuc plazmidės. Dar viename mėgintuvėlyje į Opti-MEM terpę įdėta LipofectamineTM 2000 reagento (santykis 1,5 µl lipofektamino reagento vienam µg DNR). Mišinys inkubuotas 5 min kambario temperatūroje. Į kiekvieną 15 ml mėgintuvėlį su DNR įpilta po 1,5 ml Opti-MEM terpės su lipofektamino reagentu, sumaišyta ir inkubuota 20 min. kambario temperatūroje, kad susidarytų lipofektamino ir DNR kompleksai. Kiekviename 75 cm² inde nusiurbus DMEM terpę užpilta 5 ml Opti-MEM terpės bei 3 ml paruoštos Opti-MEM terpės su DNR ir lipofektamino kompleksais. 75 cm² indai laikyti 37 °C 5 % CO₂ inkubatoriuje apie 18 h. Tolesni darbai atlikti darbui su pseudovirusais skirtoje laminarinėje spintoje, naudojant filtrinius antgalius ir neutralizuojant atliekas natrio hipochloritu (aktyvaus chloro 5%) bei nukenksminant autoklavuojant. Ryte pakeista Opti-MEM terpė į 10 ml DMEM terpę su 100 µM natrio butirato. Po 48 h. surinkta terpė su pseudovirusais ir ant ląstelių dar užpilta 10 ml DMEM terpės su 100 µM natrio butiratu. Po 24 h. vėl surinkta terpė su pseudovirusais.

2.2.11. Pseudovirusų koncentravimas

Terpė su pseudovirusais užpilta ant 1 ml 20 % sacharozės "pagalvėlės" ir sukta ultracentrifugoje 100 tūkst. g greičiu 4 h. Terpė pašalinta, neutralizuota, o nuosėdos ištirpintos 200 µl PBS. Išpilstyta po 20 µl ir laikyta -70 °C.

2.2.12. Pseudovirusų supakuotos RNR skyrimas

Darbo vieta išvalyta su RNaseAWAYTM priemone ("Thermo Fisher Scientific"). RNR skirta iš 10 µl sukoncentruotų pseudovirusų koncentrato, gamintų 75 cm² inde. Į 385 µl "Saliva/Swab RNA Purification Kit" rinkinio lizės buferį įdėta 3,85 µl β-mercaptoetanolio tirpalo, 10 µl pseudovirusų PBS tirpalo ir 200 µl etanolio. Mišinys sumaišytas 10 s purtyklėje. Toliau tęstas darbas pagal gamintojo rekomendacijas. RNR saugota -70 °C.

2.2.13. Kopijinės DNR sintezė

Paimta 12,5 µl išskirtos RNR, sumaišyta su 2 µl DNaze I fermentu ir rekomenduojamu buferiu. Mišinys inkubuotas 37 °C 30 min. Reakcija sustabdyta įdedant 5 mM EDTA ir inkubuojant 10 min. 65 °C. kDNR sintezei naudoti 8 µl DNase I paveikti RNR mišiniai (žr. 2.2.12). Įdėta 100 pmol atsitiktinių heksamerinių pradmenų ir 0,4 mM dNTP mišinių. Sumaišyta purtyklėje ir inkubuota 65 °C 5 min. Mišinys papildytas atvirkštinės transkriptazės buferiu, 200 U "Maxima" atvirkštinės transkriptazės fermentu ir vandens iki 25 µl tūrio. MiniAmpTM termocikleryje ("Thermo Fisher Scientific") įjungta atvirkštinės transkripcijos programa: 10 min 25 °C, 30 min 50 °C, 5 min 85 °C. 2 µl kDNR praskiesta 50 kartų vandenyje. kDNR kokybė patikrinta atliekant PGR su pradmenų poromis (GAG-T ir GAG-A, nLuc-T ir nLuc-A), naudojant DreamTaq polimerazę pagal gamintojo rekomendacijas. Gauti PGR produktai analizuoti su "MassRuler Low Range DNA Ladder" žymekliu 2 % agarozės gelyje.

2.2.14. TaqMan kokybinis PGR

TaqMan kPGR reakcija atlikta naudojant 5 µl 100x skiestos kDNR (žr. 2.2.13.), Luminaris Color Probe qPCR Master Mix, 0,25 µM pradmenų porą (GAG-T ir GAG-A) ir 0,9 µM kDNR komplementarų zondą GAG-Z, turintį 5'- gale FAM fluoroforą ir 3'- gale BHQ-1 gesiklį. Standartinei kreivei sudaryti matuoti pCDH-CMV-nLuc plazmidinės 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10² DNR molekulių /reakcijoje standartai (standartų koncentracija nustatyta Qubit 4 Fluorometru ("Thermo Fisher Scientific"). Atlikti kiekvieno mėginio ir standartų trys techniniai pakartojimai. Vykdyta 45 ciklų reakcija, realaus laiko PGR termocikleriu Rotor-Gene Q ("Qiagen"), detektuojant fluorescenciją ties 510 nm.

2.2.15. Ląstelių infekcija pseudovirusais

• Uodų C. tarsalis ląstelių infekcija

Į 24 šulinėlių plokštelę užsėta po 45 tūkst. *C. tarsalis* ląstelių 200 µl Culex augimo terpėje ir auginta 27 °C inkubatoriuje. Po 24 h į šulinėlius įpilta 8 µg/µl polibreno mišinio. Į šulinėlius įdėta po vienodą pseudovirusų kiekį, apskaičiuotą pagal kPGR reakcijos rezultatus, ir plokštelė inkubuota 27 °C. Buvo atlikti du biologiniai pakartojimai. Po 24 h buvo pašalinta terpė su pseudovirusais, ji neutralizuota, šulinėliai praplauti su steriliu PBS ir užpilta 200 µl Culex terpės. Plokštelė inkubuota 48 h 27 °C temperatūroje. Fluorescenciniu mikroskopu patikrinta, ar fluorescavo šulinėliuose ląstelės, kurios buvo apkrėstos pseudovirusais, supakavusiais EGFP žymę. Po iki ląstelės lizuotos ir matuotas nanoliuciferazės aktyvumas (žr. 2.2.16).

• Gallus gallus domesticus kraujo ląstelių infekcija

Į 24 šulinėlių plokštelę užsėta po 1 mln. izoliuotų PBMC iš vištų veninio kraujo į 200 µl RPMI augimo terpę su 8 µg/µl polibrenu. Ląstelės iškart infekuotos vienodu pseudovirusų kiekiu ir inkubuotos 37 °C 5 % CO₂ inkubatoriuje. Po 24 h ląstelės su terpe surinktos į 1,5 ml mėgintuvėlius ir centrifuguotos 10 min 500 g. Terpė su pseudovirusais pašalinta, o ląstelės švelniai resuspenduotos 200 µl šviežioje RPMI. Dar parą inkubuota 37 °C 5 % CO₂ inkubatoriuje. Ląstelės su terpe surinktos į 1,5 ml mėgintuvėlius ir centrifuguotos 10 min 500 g. Terpė pašalinta, o ląstelės praplautos su PBS. Vėl nucentrifugavus ląstelės lizuotos nanoliuciferazės aktyvumo matavimui (žr. 2.2.16).

2.2.16. Nanoliuciferazės aktyvumo tyrimas

Po infekcijos iš kiekvieno šulinėlio pašalinta terpė ir ląstelės praplautos PBS buferiu. Ant ląstelių užpilta 30 µl lizės buferio su liuciferazės substratu ("Promega" liuciferazės aktyvumo matavimo rinkinys Nano-Glo® Luciferase Assay System), inkubuota 3 min. Iš plokštelės ląstelių lizatas perkeltas į 1,5 ml mėgintuvėlius ir centrifuguotas 16000 g greičiu 3 min. Į 96 šulinėlių baltą plokštelę suleista po 10 µl supernatanto mišinio. Sugeneruota šviesa matuota su Varioskan[™] ("Thermo Fisher Scientific") plokštelių skaitytuvu.

2.2.17. DNR sekoskaita

Sekoskaita atlikta "SeqVision" MB.

2.2.18. Duomenų analizė

kPGR duomenys analizuoti Rotor-Gene Q programa.

CxTr-R2 infekcijos metu atlikti trys nepriklausomi biologiniai pakartojimai, apskaičiuoti vidurkiai ir SD. CxTr-R2 ir vištų PBMC ląstelių infekcijos duomenų statistinis reikšmingumas nustatytas vienfaktorine ANOVA su Tuckey post-hoc testu. p<0,05 buvo vertintas kaip statistiškai reikšmingu skirtumu. Vištų PBMC infekcijos metu atlikti trys (SINUV ir VSV(pCAGGS-nLuc)) ir keturi (WuMV-6 ir AcMNPV) nepriklausomi biologiniai pakartojimai, apskaičiuoti vidurkiai ir SD. Statistinė analizė atlikta "GraphPad Prism 8" programa.

Mikroskopinės nuotraukos apdorotos ImageJ programa.

3. Rezultatai

Manyta, kad *Quaranjavirus* ir *Thogotovirus* genčių ortomiksovirusai infekuoja tik nariuotakojus, tačiau vis daugėja atvejų, kai šių genčių atstovai aptinkami tiek nariuotakojuose, tiek stuburiniuose. Tad atsirado poreikis įvertinti kitų atstovų zoonotinį potencialą. Virusų, turinčių apvalkalėlį, audinių tropizmą nulemia paviršiaus glikobaltymo (-ų) sąveika su ląstelės taikinės receptoriumi (-iais). Mūsų keliama hipotezė, kad analizuojamo *Quaranjavirus* atstovo Uhano uodų 6 viruso paviršiaus glikobaltymas gp64 yra galimai atsakingas už gebėjimą inicijuoti patekimą į tikslines ląsteles. Šio darbo metu siekiama sukurti saugią pseudovirusų technologiją bioinformatiniais metodais nustatytų *Quaranjavirus* ir *Thogotovirus* paviršiaus glikobaltymų funkcionalumui tirti.

3.1. Žinduolinių raiškos vektorių su glikobaltymų genų sekomis konstravimas

3.1.1. Virusinių glikobaltymų genų sekų įterpimas į pCAGGS vektorių

Pasirinktų ortomiksovirusų ir bakuloviruso gp64 genų sekos buvo susintetintos ("Thermo Fisher Scientific") su 3'-gale HA žymės seka prieš stop kodoną (3.1. lentelė). Tikimąsi, kad susintetintam virusiniam glikobaltymui GGGGS jungtukas suteikia lankstumo ir HA žymė (YPYDVPDYA) neįtakoja jo funkcionalumo. Virusinių baltymų genų sekos buvo hidrolizuojamos EcoRI ir NotI RE (žr. 2.2.1, 2.2.2). Žinduolių ląstelėms skirtas pCAGGS vektorius, buvo hidrolizuotas EcoRI ir NotI RE bei gauti fragmentai paveikti šarminės fosfatazės fermentu. Tikslinio geno ir vektoriaus ligavimo mišinys transformuojamas į DH5α kompetentines bakterijas, kurios pasižymi aukštu transformacijos efektyvumu. Pseudovirusų psPax2, pCDH-CMV-nLuc ir pLV-CMV-EGFP plazmidėse yra pasikartojančių virusinių sekų, kurios aktyvuoja *E. coli* antivirusines sistemas, todėl minėtos plazmidės buvo dauginamos naudojant Stellar *E. coli* imliąsias bakterijas, kuriose yra išaktyvuota metilintos DNR hidrolizė (žr. 2.2.4).

			0	
Viruso pavadinimas	Viruso gentis	gp64 + HA geno sekos ilgis, nt	gp64 + HA baltymo sekos ilgis, ar.	gp64 + HA baltymo masė, kDa
AcMNPV	Alphabaculovirus	1581	526	60
SINUV virusas	Thogotovirus	1539	512	57,9
WuMV-6	Quaranjavirus	1488	495	56,2
WuMV-6 (geno seka nuo antrojoATG kodono)	Quaranjavirus	1458	485	55,1
WuMV-6 (pašalinta geno signalinė seka)	Quaranjavirus	1443	480	54,6

3.1. lentelė.	Tiriamų	virusų	gp64	baltymų	parametrų	palyginimas.
---------------	---------	--------	------	---------	-----------	--------------

Taip pat buvo sukonstruotas pCAGGS vektorius su už CAG promotoriaus įterpta *nluc* geno seka, kontroliniams pseudovirusams gaminti, kuriuose susirinkimo metu gali likti nLuc baltymo (žr. 2.2.1).

3.3.2. WuMV-6 gp64 geno sekos modifikavimas

Atlikus PGR su pradmenų poromis (WMV6Dir ir 2ndATGRev, WMV6Dir ir SignalRev (2.1. lentelė)), sukurtomis norimoms modifikacijoms produkte sukurti, be specifinio produkto aptikta ir daug nespecifinių įvairaus ilgio fragmentų (3.1. pav.). Siekiant optimizuoti PGR buvo modifikuota reakcijos programa: kiekviename cikle keliant pradmenų prijungimo temperatūrą (žr. 2.2.3). Taip buvo sėkmingai padaugintas trumpesnis WuMV-6 *gp64* geno produktas (kurio seka prasideda antruoju iniciacijos ATG tripletu). Kitas modifikuotas WMV6 *gp64* geno produktas buvo padaugintas pakėlus pradmenų hibridizacijos etapo temperatūrą iki 72 °C (žr. 2.2.3). Abu fragmentai buvo hidrolizuoti su AarI RE (AarI RE atpažinimo sekos taip pat buvo įvestos su minėtais pradmenimis), kuri kerpa DNR grandinę 4 nt už atpažinimo sekos. O po restrikcijos hidrolizuotus DNR galus susiuvus ligaze sekoje nebelieka spėjamos signalinės sekos 3' gale bei AarI atpažinimo sekų, o *gp64* geno atviro skaitymo rėmelis nepasikeičia. Sekoskaita buvo patvirtinta, kad vienu atveju *gp64* sutrumpėjęs 30 bp iki antrojo ATG tripleto, o kitu atveju *gp64* geno sekoje pašalinta 45 bp ilgio spėjama signalinė seka priešais pirmąjį iniciacijos tripletą, jį paliekant (žr. 2.2.17).



3.1. pav. WuMV-6 *gp64* geno modifikacijų įvedimo schema, nubraižyta internetinėje svetainėje "Biorender". *amp* – atsparumo ampicilinui geno seka, *gp64* – WuMV-6 gp64 glikobaltymą koduojančio geno seka. Mėlynai pažymėti pradmenys ir nuo jų vykdomos sintezės kryptis. Juodai pažymėtos EcoRI ir NotI RE hidrolizės vietos.

Modifikuotos *gp64* genų sekos buvo įterptos į žinduolinį raiškos vektorių pCAGGS už trigubo CAG žinduolinio promotoriaus, pasinaudojus NotI ir EcoRI RE ir T4 ligaze (žr. 2.2.3, 2.2.4).

3.2. Glikobaltymų sintezė HEK293T ląstelėse

Pseudovirusų gamybai pasirinktos žinduolinės HEK293T/17 ląstelės, kurios pasižymi aukštu transfekcijos lygiu, o dėl genome esančio SV40 didžiojo T antigeno sekos pseudovirusų sintezė vyksta efektyviau. Ląstelės buvo augintos DMEM 37 °C 5 % CO2 inkubatoriuje, kol uždengė 80 %

75 cm² indo paviršiaus ploto. Ląstelių atkabinimo reagentas buvo pasirinktas tripsinas, kad ląstelės nebūtų pažeistos mechaniškai (žr. 2.2.5). Ląstelės centrifuguojamos 200 g greičiu. Prieš sėjant ląstelių gyvybingumas siekė 99 %. Po 20 tūkst. ląstelių buvo užsėta į kiekvieną plokštelių šulinėlį (žr. 2.2.6). Po 24 h atlikus transfekciją pCAGGS-gp64 ir pLV-CMV-EGFP plazmidžių mišiniu. 18-22 h po transfekcijos Opti-MEM terpė pakeičiama į augimo terpę DMEM. Dar po paros fluorescenciniu mikroskopu buvo vizualiai patikrintas transfekcijos efektyvumas (3.2. pav).



3.2. pav. pLV-CMV-EFGP ir pCAGGS-gp64 plazmidžių mišiniu transfekuotų HEK293T/17 ląstelių perdengtos šviesaus lauko ir fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos (20x didinimas). Nuotraukų apdorojimas atliktas programa "ImageJ".

Po fluorescencijos patikrinimo HEK293T/17 ląstelių lizavimas buvo atliktas ant ledo naudojant RIPA lizės buferį su proteazių inhibitorių mišiniu (žr. 2.2.6). Lizatų baltyminiai mėginiai buvo denatūruoti su baltyminiu dažu 95 °C. Baltymų mėginių koncentracijos buvo suvienodintos pagal Bradfordo analizės duomenis ir atliktas imunoblotingas (žr. 2.2.8, 2.2.9). Virusinių gp64 baltymų detekcijai buvo naudoti pirminiai specifiniai HA žymės antikūnai, dėl C gale esančios HA žymės. Pastarųjų antikūnų veikimo kontrolei buvo naudotas patikrintas baltymas su HA žyme. Baltymų vizualizavimui buvo pasirinkta chemiliuminescencinė reakcija, kuri yra jautresnė už kolorimetrinę detekciją (Bass et al. 2017). Pagal vienodą β -aktino kiekį ląstelių lizatų mėginiuose, skirtingų gp64 sintezę galima įvertinti kiekybiškai (3.3. pav.).



3.3. pav. HEK293T/17 ląstelių, sintetinančių virusinius glikobaltymus, lizatų imunoblotingo chemiliuminescencinės reakcijos nuotrauka, padaryta su ChemiDoc MP Imaging System ("Bio-rad"). Vizualizuojamas β-aktinas (42 kDa) ir virusiniai glikobaltymai. (**A**) 1 – ląstelių be virusinių glikobaltymų lizatas; 2 – AcMNPV gp64; 3 – SINUV gp64; 4 – WuMV-6 gp64; 5 –teigiama baltymo su HA žyme kontrolė. (**B**) 1 – WuMV-6 gp64 be signalinės sekos; 2 – WuMV-6 gp64 sutrumpintas iki antrojo iniciacijos tripleto; 3 – WuMV-6 gp64; 4 – ląstelių be virusinių glikobaltymų lizatas.

Iš imunoblotingo rezultatų galime teigti, kad žinduolinėse ląstelėse virusinių glikobaltymų sintezė vyko, nors nebuvo vienodai efektyvi. Be iki glikobaltymai įgijo ne vienodas potransliacines modifikacijas, pavyzdžiui, 3.3. pav. A 3 takelyje galima matyti, kad SINUV sintetinamos dvi izoformos.

3.3. Pseudotipuotų lentivirusų gamyba

Darbas su pseudovirusais yra leidžiamas antrojo biosaugumo lygio (BSL-2) laboratorijoje tam skirtoje laminarinėje spintoje, visos atliekos turi būti neutralizuojamos natrio hipochloritu (aktyvaus chloro 5%) ir utilizuojamos pagal BSL-2 klasės reikalavimus.

Pseudotipuotų lentivirusų sintezei naudotos HEK293T/17 ląstelės, buvo sėtos į PLL padengtą 75 cm2 indą. Kitą dieną trijų plazmidžių mišiniai (santykiu 1,6:1:5, žr. 2.2.10) transfekuoti į ląsteles lipofektamino pūslelių metodu. Infektyvūs pseudovirusai pasigamina tik visoms trims plazmidėms patekus į vieną ląstelę. Tik pCDH-CMV-nLuc ir pLV-CMV-EFGP turi Ψ RNR pakavimo signalą, todėl šių plazmidžių transkriptai įpakuojami į virusinės dalelės vidų. Pseudovirusų infektyvumas priklauso ne tik nuo kokybiško susirinkimo bet ir nuo sėkmingos virusinių glikobaltymų integracijos į ląstelės producentės plazminę membraną, kuria pseudovirusas apsigaubia pumpuravimosi metu. Tokie pseudotipuoti lentivirusai gali infekuoti ląstelę tik vieną kartą, nes sėkmingos infekcijos atveju į ląstelę patenka du RNR transkriptai su reporterinio baltymo genu ir supakuoti virusiniai fermentai, būtini geno integracijai į genomą. Infekuotoje ląstelėje nėra naujų virusinių baltymų sintezei būtinos RNR matricos.

Ištirti galimą nLuc baltymo foną infekcijos metu, kuomet dėl labai stiprios šio baltymo sintezės jis supakuojamas į pseudoviruso struktūrą, buvo sukurti pseudovirusai, kuriuose nebuvo supakuota nLuc geno seka esanti pseudoviruso RNR, o pasirinktas EGFP pernešamas žymuo (žr. 2.2.10). Šių pseudovirusų sintezės metu su lentivirusinėmis plazmidėmis buvo transfekuotos pCAGGS-nLuc plazmidinės DNR. Pastarosios sintetina nLuc baltymą dėl stipraus CAG žinduolinio promotoriaus, bet jų transkriptai negali būti supakuoti į pseudovirusinę dalelę, nes neturi tam būtinųjų virusinių sekų.

Po transfekcijos praėjus 18-22 h pakeičiama Opti-MEM terpė į augimo terpę DMEM, papildyta 100 µM natrio butiratu (žinomas histonų deacetilazės inhibitorius, skatinantis genų transkripciją). Surenkama augimo terpė su pseudovirusais praėjus 48 h ir 72 h po terpės pakeitimo. Surinkta terpė pirmiausiai centrifuguojama 15 min 500 g greičiu, kad nusėstų ląstelių nuolaužos. Supernatantas užpilamas ant 20 % sacharozės pagalvės, kuri skirtapseudovirusus atskirti nuo plazmidžių taršos. Pseudovirusai koncentruoti ultracentrifuguojant 4 h 100 tūkst. g greičiu (žr. 2.2.11). Iš ultra mėgintuvėlių greitai pašalinamas supernatantas, o pseudovirusų nuosėdos ištirpinamos PBS (nes kai kurioms infekcijai ruošiamoms ląstelėms netinka DMEM terpė). Penkiasdešimt kartų sukoncentruoti pseudovirusai laikomi -70 °C.

3.4. Pseudovirusų kiekio nustatymas

Absoliutaus kiekio nustatymui pirmiausiai buvo išskirta RNR iš sukoncentruotų pseudovirusų su Saliva/Swab RNA Purification Kit (žr. 2.2.12). DNR priemaišos buvo pašalintos mėginius paveikus DNaze I fermentu. Kopijinė DNR susintetinta Maxima RT fermentu pasinaudojant atsitiktiniais heksameriniais pradmenimis (žr. 2.2.13). DNR pašalinimo iš RNR mėginio kokybė buvo patikrinta į kiekvieną RNR mėginio reakcijos mišinį neįdedant Maxima RT fermento. kDNR sintezė buvo patikrinta PGR metodu naudojant nLuc-T ir nLuc-A pradmenų porą (žr. 2.1. lentelė). PGR produktai (114 bp) analizuoti 2 % agaroziniame gelyje (3.4. pav.).



3.4. pav. PGR produktų, gautų nuo kDNR matricos su nLuc genui specifiniais pradmenimis, analizės agarozinėme gelyje nuotrauka. Naudota kDNR susintetinta nuo iš atitinkamų pseudovirusų išskirtos RNR mėginių1 – SINUV; 2 – WuMV-6; 3 – WuMV-6 (gp64 nuo antrojo ATG); 4 – AcMNPV; 5 – VSV; 6 – VSV (su pLV-CMV-EGFP ir pCAGGS-nLuc); 7 – atvirkštinės transkripcijos neigiama kontrolė, žuvies RNR; 8 – PGR neigiama kontrolė be DNR. Mėginiai po atvirkštinės transkripcijos reakcijos, kurioje buvo įdėta Maxima RT (+RT) ir kurioje nebuvo fermento (–RT). M – DNR fragmentų ilgio žymuo "MassRuler Low Range DNA Ladder".

Galime matyti, kad paveikus RNR mėginius 2 U DNazės I šiek tiek, bet ne visuose mėginiuose, liko plazmidinės DNR taršos.

Kiekybiniam kDNR įvertinimui pasirinktas TaqMan realaus laiko PGR metodas, kuriame naudojama ne tik matricai specifiniai pradmenys, bet ir trečiasis pradmuo - zondas su fluoroforu (FAM) ir gesikliu (BHQ-1) (žr. 2.2.14). Šis metodas yra tikslesnis nei Sybr Green realaus laiko PGR, nes fluorescencija generuojama tik Taq polimerazei suardžius zondą DNR dauginimo metu, tad galimi nespecifiniai pradmenų produktai nedidina fluorescencijos intensyvumo. Pagal pCDH-CMVnLuc standartų fluorescencijos intensyvumą buvo nubrėžta standartinė kreivė, pagal kurią buvo nustatytas kDNR molekulių skaičius kiekviename mėginyje. Pseudovirusų kiekis buvo skaičiuojamas dvigubai mažesnis už kDNR molekulių skaičių, nes lentivirusai supakuoja dvi vienodas genomines RNR. Absoliutus kiekis naudotas apskaičiuoti MOI (pseudovirusų ir infekuojamų ląstelių kiekio santykį), skirtingų pseudovirusų kiekio suvienodinimui. MOI yra tik sąlyginis, nes dalis virusinių dalelių gali būti neinfektyvios dėl nepakankamo glikobaltymų kiekio apvalkalėlyje.

3.5. Pseudovirusų sandara

Patikrinimui, ar sukoncentruoti pseudovirusai yra padengti virusiniais glikobaltymais, buvo pakartota HEK293T/17 ląstelių transfekcija pseudovirusų gamybai, bet po ultracentrifugavimo sukoncentruotos nuosėdos buvo tirpinamos RIPA lizės buferyje (žr. 2.2.10, 2.2.11). Iš lizato paruošti mėginiai buvo analizuojami imunoblotingo metodu naudojant pirminius monokloninius anti-HA žymės antikūnus ir pirminius monokloninius anti-ŽIV Gag p24 antikūnus (3.5. pav.) (žr. 2.2.9).



3.5. pav. Sukoncentruotų SINUV ir WuMV-6 pseudotipuotų lentivirusų lizatų imunoblotingo chemiliuminescencinės reakcijos nuotrauka, padaryta su ChemiDoc MP Imaging System ("Bio-rad"). Vizualizuojami p24 (24 kDa) ir virusiniai glikobaltymai 64. Takeliuose lizatų mėginiai gauti sulizavus: 1 – SINUV gp64; 2 – WuMV-6 gp64; 3 – WuMV-6 gp64 be signalinės sekos; 4 – WuMV-6 gp64 nuo antrojo iniciacijos tripleto pseudotipuotus lentivirusus.

SINUV ir WuMV-6 pseudotipuoti lentivirusai buvo padengti atitinkamais glikobaltymais. Labai skiriasi integruotų glikobaltymų ir dalelių kiekio santykis tarp SINUV ir WuMV-6 glikobaltymų variantų. Jei būtų suvienodintas p24 kiekis tarp mėginių, membranoje nebesimatytų WuMV-6 gp64 fragmentų.

3.6. Culex tarsalis embrioninių ląstelių infekcija

Pirminė uodų *Culex tarsalis* embrioninių ląstelių kultūra CxTr-R2 buvo išvesta Schirtzinger et al (2023). Šioje kultūroje dominuoja adhezinės dviejų morfologijų ląstelės: apvalios ir pailgos. CxTr-R2 buvo naudojamos kaip teigiama kontrolė WuMV-6 pseudotipuotams lentivirusams, nes *Culex* sp. uodų transkriptomikos mėginiuose dažnai ir gausiai buvo aptiktas WuMV-6 genomas (Batson et al., 2021).

Infekcija atliekama 48 šulinėlių plokštelėje. Į kiekvieną šulinėlį buvo užsėta 45 tūkst. CxTr-R2 ląstelių (šios ląstelės geriau auga tankiai užsėtos) ir 24 h leista ląstelėms prikibti prie dugno (žr. 2.2.15). Į kiekvieną šulinėlį įdėta 8 µg/ml polibreno. Šis teigiamai įkrautas polimeras sumažina neigiamai įkrauto lentiviruso ir neigiamai įkrautos ląstelės plazminės membranos atstūmimo jėgą, taip sudarant sąlygas pseudovirusui priartėti prie ląstelės (Seitz et al., 1998). Į kiekvieną šulinėlį įdėta MOI 100 pseudovirusų (4,5 mln. virusinių dalelių) ir inkubuojama 24 h. Po inkubacijos buvo pašalinta terpė ir ląstelės praplaunamos PBS, kad būtų sustabdyta aktyvi infekcija. Visos atliekos

neutralizuojamos natrio hipochloritu (aktyvaus chloro 5%). Ląstelės su šviežia Culex augimo terpe inkubuojamos 48 h siekiant atgaivinti ląsteles ir padidinti infekuotose ląstelėse susintetintos nanoliuciferazės kiekį. Chemiliuminescencijos analizė buvo atliekama su Nano-Glo® Luciferase Assay System pagal gamintojo protokolą, sugeneruota šviesa matuota Varioskan[™] ("Thermo Fisher Scientific") plokštelių skaitytuvu (žr. 2.2.16). Pamatuota ląstelių lizato baltymų koncentracija Bradfordo metodu ir sugeneruotos šviesos kiekis normalizuotas pagal gautą koncentraciją (3.6. pav.) (žr. 2.2.7).



3.6. pav. Sugeneruoto šviesos kiekio iš 1 μg CxTr-R2 ląstelių lizato, infekuotų pseudovirusais, grafikas. MOI 100. Mėlyni stulpeliai žymi transfekcijos Nr. 1 pseudovirusus, o raudoni – transfekcijos Nr. 2 metu gautus pseudovirusus. Pažymėti vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai buvo išvesti iš trijų biologinių pakartojimų. Atlikta vienfaktorinė ANOVA ir Tuckey post-hoc analizė (Priedas A). Statistinis reikšmingumas **** p<0,0001. Grafikas ir analizė atlikti su programa "GraphPad Prism 8".

Skirtingų infekcijų rezultatai įrodo, kad Nr.1 ir Nr.2 transfekcijų metu pagaminti pseudovirusai – nevienodos kokybės. Literatūros duomenimis SINUV pagrindinis pernešėjas yra uodai, tad buvo tikėtasi, kad SINUV pseudovirusai infekuos CxTr-R2 ląsteles. SINUV (Nr.1) infekavo CxTr-R2 ląsteles, o SINUV (Nr. 2) – ne, todėl po kiekvieno eksperimento reikia atlikti kokybės analizę.

Pseudovirusai, kurių apvalkalėlyje inkorporuotas WuMV-6 gp64, infekavo CxTr-R2 ląsteles, bet pseudovirusai su modifikuotais gp64 (nuo antrojo ATG arba su pašalinta signaline seka) buvo neinfektyvūs. Kiekviename matavime buvo nustatytas nLuc fonas, kuris ryškiai matosi kontrolinių VSV-G pseudotipuotų (pCAGGS-nLuc) lentivirusais infekuotų ląstelių analizės iliuminiscencijos rezultatuose. Svarbu suvienodinti pseudovirusų skaičių infekcijos metu, norint lyginti skirtingų pseudovirusų efektyvumą.

3.7. G. g. domesticus periferinio kraujo monobranduolinių ląstelių infekcija

Vištų PBMC, kurios prieš tai buvo išskirtos iš veninio vištų kraujo pasinaudojant SepMate[™] kolonėlėmis, gyvybingumas siekė 99,6 %. Į 48 šulinėlių plokštelę su RPMI terpe buvo įpilta po 1 mln. gyvybingų ląstelių (žr. 2.2.15). Infekcija buvo atliekama iškart, nes PBMC nesidalina ir bėgant laikui žūna. Infekcijai buvo pasirinktas MOI 0,25 (250 tūkst. pseudovirusų). Po 24 h ląstelės su terpe buvo surinktos ir centrifuguojamos 10 min 500 g greičiu. Terpė su pseudovirusais pašalinta, o ląstelės švelniai resuspenduotos šviežioje RPMI terpėje. Tuomet pamatuotas ląstelių gyvybingumas, kuris siekė 95,8 %. Ląstelės buvo lizuojamos praėjus 24 h po terpės pakeitimo. Ląstelių lizatų baltymų koncentracija pamatuota Bradfordo metodu ir apskaičiuotas sugeneruotos šviesos kiekis suvienodintas 1 µg ląstelių lizato (3.7 pav.) (žr. 2.2.7, 2.2.16).



3.7. pav. Sugeneruotos šviesos kiekis 1 µg vištų PBMC ląstelių lizate, infekuotų pseudovirusais (transfekcija Nr. 3), grafikas. MOI 0,25. Grafike yra pažymėti trijų (SINUV ir VSV (pCAGGS-nLuc) ir keturių (AcMNPV ir WuMV-6) biologinių pakartojimų vidurkiai ir SD. Atlikta vienfaktorinė ANOVA ir Tuckey post-hoc analizė (Priedas B). Statistinis reikšmingumas * p<0,05, ns p>0,05. Grafikas ir analizė atlikti programa "GraphPad Prism 8".

Vištų PBMC eksperimente tap pat nustatytas nLuc fonas, galime matyti jo intensyvumą 3.7. pav 4 stulpelis.

4. Rezultatų aptarimas

Orthomyxoviridae šeima sudaryta iš turinčių apvalkalėlį segmentuotos viengrandinės RNR virusų. Anksčiau manyta, kad *Thogotovirus* ir *Quaranjavirus* genčių virusai infekuoja tik nariuotakojus, tačiau vis daugėjant užregistruotų atvejų, kai šių genčių virusai aptinkami ir stuburiniuose, pvz.: žmonės susirgę po erkių įkandimo. Atpigus sekoskaitai naujai atrastų ortomiksovirusų sąrašas ilgėja, tad verta peržvelgti naujų atstovų zoonotinį potencialą. Šiame darbe tyrinėjamas biostatistiniais metodais nustatyto į quaranjavirusus panašaus Uhano uodų 6 viruso gp64 gebėjimas inicijuoti infekciją. Susintetinti WuMV-6 paviršiaus glikobaltymu pseudotipuoti lentivirusai, leido patikrinti šio viruso gebėjimą patekti į skirtingas ląsteles.

Pasitelkus metagenominius duomenis per paskutiniuosius 20 m. buvo nustatytas WuMV-6 plitimas pasaulyje per 6 žemynus, o šio viruso paviršiaus glikobaltymo gp64 kitimas laike lyginant su kitais virusiniais baltymais leido iškelti hipotezę, kad WuMV-6 gali turėti stuburinį šeimininką, kurio imuninė sistema skatino viruso evoliuciją (Beretta et al., 2020). Pirmiausia reikėjo patvirtinti, kad biostatistiniais metodais nustatyta gp64 seka koduoja funkcionalų membranoje inkorporuotą baltymą. Buvo išbandytos trys gp64 sekos variacijos: pirminė seka nuo pirmojo galimo ATG tripleto, seka nuo antro ATG tripleto ir seka nuo pirmojo ATG tripleto, bet su pašalinta spėjama signaline seka. Šalia WuMV-6 buvo charakterizuojamas naujas *Thoqotovirus* genties uodu virusas – SINUV, kurio platus tropizmas buvo irodytas paraleliai Thamamongood et al (2024) šio magistro darbo metu. Thogotovirus ir Quaranjavirus genčių glikobaltymai gp64 evoliuciškai artimi DNR virusų Baculoviridae šeimos glikobaltymui gp64, todėl pagal publikuotus tyrimus šiame tyrime buvo pasirinkta AcMNPV gp64, kaip teigiama kontrolė (Peng et al., 2017). Nariuotakojų virusas AcMNPV gali infekuoti ir žinduolines ląsteles dėl gp64 sąveikos su NPC1 (angl. *Niemann-pick C1*) receptoriumi (Huang et al., 2024). Papildomas kontrolinis VSV glikobaltymas G buvo parinktas dėl plataus tropizmo ir yra pasaulyje labai dažnai naudojamas kaip pseudovirusų paviršiaus baltymas. Visų virusų glikobaltymų genai turėjo pridėtą HA žymę 3' gale, kad būtų galima analizuoti baltymų sintezės efektyvumą imunoblotingo metodu. HA žymė tėra 9 ar. ilgio, tačiau ji vis tiek teoriškai gali pakeisti baltymo susilankstyma. Tuo tikslu prieš pseudovirusų gamybą buvo įsitikinta, kad virusiniai glikobaltymai efektyviai sintetinami ir inkorporuojami producenčių ląstelių plazminėje membranoje (Norkienė M., neskelbti duomenys).

Ląstelių producenčių, po virusinių glikobaltymų transfekcijos, lizės mėginių imunoblotingo analizė patvirtino, kad SINUV, WuMV-6 ir AcMNPV gp64 su HA žyme yra sintetinami, tačiau nevienodai efektyviai (3.3. pav.). Labai aiškiai išsiskyrė SINUV gp64 glikozilinimo lygis ir jo kiekis. Iš trijų tirtų WuMV-6 gp64 variantų pirminės sekos susintetinto glikobaltymo nustatyta daugiau nei kitų jo šiame darbe analizuotų variantų. Kadangi buvo naudojamas ląstelių lizatas, ši analizė neatskleidžia, ar glikobaltymai inkorporuojami į plazminę membraną, kuria apvilkti lentivirusai.

Pagal gp64 sintezės HEK293T/17 ląstelėse analizę ląstelės lizato mėginiuose WuMV-6 gp64 buvo susintetinta sąlyginai daugiau nei SINUV gp64 (3.3. pav. A 3 ir 4 takeliai), tačiau minėtų glikobaltymų kiekis koncentruotų pseudovirusų lizatų mėginiuose drastiškai skyrėsi (3.5. pav.). SINUV gp64 buvo daugiau mažesniame dalelių kiekyje (normalizavus pagal p24 virusinį baltymą) nei WuMV-6 gp64 didesniame dalelių kiekyje. Sėkmingai infekcijai būtina pseudoviruso paviršiuje eksponuojamo glikobaltymo, kuris suteikia kito viruso pseudotipą, sąveika su ląstelės membrana. O sėkmingai sąveikai reikia taisyklingos glikobaltymo struktūros ir pakankamo kiekio pseudoviruso apvalkalėlyje.

Jau anksčiau buvo nustatyta, kad retrovirusai be savos genominės RNR dar gali supakuoti ląstelės RNR ir tik dalis jų susijusi su virusine RNR (kaip pavyzdžiui tRNR, atliekančios RdRp pradmenų funkciją) (Rulli et al., 2007). Pagal Rulli et al (2007) tyrimą didžioji dalis ląstelės RNR supakuojama nespecifiškai t.y. atsitiktinai, bet jų duomenimis dominuoja nekoduojančios RNR rūšys. Galbūt iRNR su nluc seka supakavimo tikimybė yra didesnė dėl stipraus pCAGGS vektoriaus promotoriaus, kurio transkripcija vyksta itin efektyviai ir ląstelėje turėtų būti daug daugiau transkriptų, lyginant su virusiniais promotoriais

Šio darbo metu pagamintų pseudovirusų kiekio įvertinimui buvo pasirinktas kokybinio PGR tikslesnis TaqMan variantas naudojant GAG-A ir GAG-T pradmenų poras ir GAG-Z zondus, kurie yra komplementarūs sutrumpintos ŽIV gag sekos fragmentui, esančiame lentiviruo pakuojamos RNR sekoje. Pastaroji seka yra pakavimo plazmidės pilname gag gene, bet šios plazmidės transkriptai neturi Ψ pakavimo signalo ir neturėtų būti įpakuoti į viriono vidų. Išgryninus iš pseudovirusų RNR nustatėme, kad liko transfekcijai naudotų plazmidžių priemaišų (3.4. pav. 1, 3, 4 ir 5 takelių mėginiuose, kurių atvirkštinė transkripcija buvo atlikta be Maxima RT fermento), bet kPGR rezultatai atskleidė, kad minėtų mėginių amplifikacijos kreivės kampas nesiekė 10 %, tad galutinio kDNR molekulių skaičiaus nekeitė. Tokiu būdu apskaičiuotas pseudovirusų titras nėra ypatingai tikslus, nes įskaičiuojamos ir defektyvios viruso dalelės, pvz.: apvalkalėlyje neturinčios atitinkamo viruso glikobaltymų. Barczak ir jo kolegų pasiūlytas infekcijos įstatytą transgeną (Barczak et al., 2015). Šio metodo netaikėme, nes tyrimo pradžioje nebuvome įsitikinę, ar pseudovirusai yra funkcionalūs ir kokias ląsteles gali infekuoti.

C. tarsalis ląstelių infekcijai pasirinktas MOI 100 remiantis publikuotais duomenimis (McGinley et al., 2011). CxTr-R2 infekcija buvo pakartota su dviejų skirtingų transfekcijų metu pagamintais pseudovirusais. Šio magistrinio darbo duomenimis uodų ląstelių sėkminga infekcija vyko lentivirusų pseudotipuotų su SINUV ir WuMV-6 gp64 (3.6. pav.). Visgi, atliktos WuMV-6

gp64 geno sekos modifikacijos nepagerino glikobaltymo funkcionalumo, nes pseudovirusų su pirminės sekos gp64 ir pseudovirusų eksponuojančių modifikuotus gp64 infekcijos efektyvumų skirtumai buvo statistiškai reikšmingi (p<0,0001) (Priedas A). Nors transfekcijų metodika nesiskyrė, pseudovirusų kokybė buvo nevienoda. Akivaizdžiausiai skirtumas nustatytas palyginus SINUV Nr. 2 ir SINUV Nr. 1 pseudovirusų infekcijų rezultatų skirtumas, kuris yra statistiškai reikšmingas (p<0,0001). Abiejų lentivirusų, pseudotipuotų WuMV-6 gp64, gamybos procedūrų (Nr. 1 ir Nr. 2) pseudovirusai infekavo CxTr-R2 ląsteles, bet ne tokiu pačiu efektyvumu (skirtumas nėra statistiškai reikšmingas). Schirtzinger ir kolegų (2023) tyrime nustatyta, kad VSV neefektingai infekuoja CxTr-R2. Pagal mūsų tyrimo rezultatus negalima nustatyti, ar VSV silpnai infekuoja ląsteles ar neinfekuoja. AcMNPV infekcija sugeneravo silpną liuminiscencijos signalą.

Literatūroje aprašytą iš vištų kraujo izoliuotų PBMC sudėtį sudaro 66 % heterofilų (žmogaus neutrofilų atitikmuo), 27 % limfocitų, 4 % monocitų, 1 % eozofilų ir 2 % eritrocitų (Tantikositruj et al., 2021). Žmogaus PBMC sudėtis labai skiriasi nuo vištų: 60 % T limfocitų, 13 % B limfocitų, 15 % NK, 9 % monocitų, ~1 dendritinės ląstelių ir likutis eritrocitų (Autissier et al., 2010). Thamamongood ir kolegų (2024) SINUV tyrime buvo nustatytos 5 žinduolinių ląstelių linijos, kurias SINUV pseudovirusai infekavo *in vitro*. Mūsų tyrimo metu buvo gauti preliminarūs rezultatai, kad SINUV gp64 geba inicijuoti pseudoviruso patekimą į vištų PBMC, nes SINUV infekcijos sugeneruotos šviesos kiekio vidurkio ir AcMNPV ir WuMV-6 vidurkių skirtumai statistiškai reikšmingi (3.7. pav.) (Priedas B). WuMV-6 pseudovirusai neinfekavo vištų PBMC. AcMNPV pseudovirusų ir WuMV-6 pseudovirusai infekcijų sugeneruoto liuminescencijos signalo vidurkių skirtumai buvo statiškai nereikšmingi, tad greičiausiai AcMNPV neinfekuoja vištų PBMC.

Teoriškai šio darbo metu naudotais kontroliniais VSV G baltymą eksponuojančiais (pCAGGSnLuc) pseudovirusais infekuotose ląstelėse neturėtų būti nLuc signalo, nes šių pseudovirusų gamybos metu vietoj virusinės plazmidės su nluc genu buvo naudotas žinduolinis raiškos vektorius su nluc genu. Konkrečiau, nuo plazmidinio vektoriaus sėkmingai vyksta nLuc transkripcija, bet šie transkriptai neturi lentiviruso pakavimui svarbių sekų ir neturėtų būti supakuoti į pseudoviruso vidų. pCAGGS-nLuc nėra tinkamiausia nLuc fono kontrolė, nes CAG promotorius yra stipresnis už CMV promotorių, esantį lentiviruso supakuotose RNR sekose. Galime spėti, kad su virusų dalelėmis persineša RNR, turinti nLuc geno seką, o gal net 6 kDa dydžio nLuc baltymas, susintetintas HEK293T ląstelėse gamybos metu įpakuojamas į dalelę arba po plazmine membrana (3.6. pav. ir 3.7. pav. paskutinio stulpelio duomenys). Yra nustatyta, kad LV gali pernešti ląstelinius baltymus ir tik dalis komponentų asocijuojami su ŽIV (Wheeler et al, 2007). Jei nLuc fonas atsiranda dėl pseudoviruso įnešamų veiksnių, tai potencialiai kuo efektyvesnė pseudoviruso infekcija, tuo nLuc fonas yra stipresnis. Taip pat, yra tikimybė, kad centrifuguojant pseudovirusus lieka plazmidinės pCDH-CMV-nLuc DNR priemaišų, CMV promotrius veikia uodų ląstelėse, kitaip nei CAG promotorius.

Liuciferazės aktyvumo analizė leidžia kiekybiškai įvertinti pseudotipuotų LV infekcijos efektyvumą. Nanoliuciferazė yra žymiai stabilesnis, efektyvesnis ir labiau liuminescuojantis (apie 100 kartų ryškesnį signalą generuojantis) baltymas nei jo pirmtakai Renila ar jonvabalių liuciferazės. Todėl šio darbo metu susidūrėme su nLuc fonu, dėl kurio negalima vienareikšmiškai nubrėžti infekcijos buvimo ir nebuvimo ribos. Taip pat, virusai skirtingai efektyviai infekuoja ląstelių tipus, tam turi įtakos receptorių koncentracija ląstelės plazminėje membranoje, augimo terpė, jos pH ir t.t. Pseudovirusų infekcijos ištyrimas papildomu metodu sustiprintų šio darbo metu gautus rezultatus. Taip pat, buvo susidurta su CxTr-R2 ląstelių autofluorescencijos fenomenu, kai tame pačiame bangos ilgyje kaip naudojamas sužadinti GFP fluorescenciją, šios ląstelės šiek tiek švyti, todėl infekcijų pseudovirusais, supakavusiais EGFP reporterį, rezultatai nebuvo įtikinantys (Priedas C). Šiai problemai spręsti būtų galima išbandyti atsparumą antibiotikui suteikiantį geną kaip infekcijos reporterinį signalą.

Šio darbo metu buvo įrodyta, kad prieš tai tik transkriptomikos duomenyse nustatyto WuMV-6 genome esantis segmentas su transmembraninėmis sekomis koduoja funkcionalų paviršiaus glikobaltymą gp64, gebantį inicijuoti viruso patekimą į ląstelę. WuMV-6 paviršiaus glikobaltymu pseudotipuoti LV infekavo šeimininko, kuriame buvo atrastas (*Culex tarsalis*), ląsteles. Tolimesniuose darbuose reikėtų panagrinėti, kurias uodų organų sistemas infekuoja WuMV-6. Uodai gali platinti virusus per kraują tik tuo atveju, jei infekcija vyksta seilių liaukuose arba kiaušidžių audiniuose vertikaliai pernašai (Kenney et al., 2014).

Išvados

1. Žinduolinėse HEK293T ląstelėse vyksta ortomiksovirusų glikobaltymų sintezė.

2. Pagaminti pseudovirusai, kurių apvalkalėlyje eksponuojami WuMV-6, SINUV, AcMNPV ir VSV G glikobaltymai.

3. SINUV glikobaltymo gp64 integravimas į pseudoviruso apvalkalėlį yra efektyvesnis nei WuMV-6 gp64.

4. WuMV-6 gp64 (nuo pirmo ATG kodono) gali inicijuoti pseudoviruso patekimą į uodų *Cx. tarsalis* ląsteles, bet ne į vištų PBMC.

VILNIAUS UNIVERSITETAS GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Monika Repšytė

Magistro baigiamasis darbas

Uhano uodų 6 viruso glikobaltymo gebėjimo inicijuoti infekciją tyrimas SANTRAUKA

Dėl pažangos sekoskaitos ir bioinformatikos srityse atsirado galimybė analizuoti segmentuotos RNR virusų paplitimą įvairiuose organizmuose. Buvo aptikta, kad *Orthomyxoviridae* šeimos *Thogotovirus* ir *Quaranjavirus* genčių atstovai vis dažniau nustatomi ne tik nariuotakojuose, bet ir stuburiniuose. Tai paskatino naujų ortomiksovirusų zoonotinio potencialo sukelti naujas epidemijas tyrimus. Šio magistro darbo tyrimo objektas yra į quaranjavirusus panašus Uhano uodų 6 viruso (WuMV-6), aptinkamo uodų transkriptomikos duomenyse visame pasaulyje, paviršiaus baltymas.

Šio darbo tikslas buvo eksperimentiškai ištirti bioinformatiniais metodais nustatyto WuMV-6 paviršiaus glikobaltymo gp64 gebėjimą inicijuoti infekcijos pirmą etapą – viruso patekimą į ląstelę. Sėkminga WuMV-6 pseudotipuotų lentivirusų infekcija *in vitro* priklausė nuo apvalkalėlyje integruotų gp64 sąveikos su ląstelės receptoriumi (-iais). Lentivirusai buvo pseudotipuoti trimis WuMV-6 gp64 variantais bei SINUV gp64, bakuloviruso AcMNPV gp64 ir VSV G.

WuMV-6, SINUV, AcMNPV ir VSV glikobaltymai su C gale prijungta hemagliutinino žyme HEK293T žinduolinėse ląstelėse buvo sintetinami nevienodai efektyviai. HEK293T ląstelėse buvo susintetinti pseudovirusai, padengti anksčiau minėtais virusiniais glikobaltymais ir supakavę reporterinio baltymo, nanoliuciferazės (nLuc), geno transkriptus. Papildomai buvo pagaminti VSV pseudovirusai su EGFP geno transkriptais, kurie buvo sintetinti ląstelėse kartu su nLuc baltymu. Susintetinti SINUV ir WuMV-6 pseudovirusai buvo padengti atitinkamais glikobaltymais, bet SINUV gp64 buvo daugiau inkorporuotas į apvalkalėlį nei WuMV-6 gp64. TaqMan kPGR buvo pritaikytas apskaičiuoti absoliutų pseudovirusų kiekį. Šio darbo metu, *Culex tarsalis* (natūralaus WuMV-6 šeimininko) ir vištų monobranduolinės kraujo ląstelės buvo infekuotos pseudovirusais. Pagal ląstelėse sugeneruotos šviesos kiekį buvo įvertintas infekcijos efektyvumas. Pagal pirminius duomenis Cx. tarsalis ir vištų monobranduolines kraujo ląsteles infekavo SINUV. Deja, buvo pastebėta, kad skirtingų gamybos serijų pseudovirusų infekcijos efektyvumu varijavo, tad svarbu kiekvieną kartą įvertinti jų kokybę. Mūsų tyrimų duomenimis, WuMV-6 gp64 eksponavimas pseudovirusų paviršiuje buvo pakankamas *Cx. tarsalis* ląstelių infekcijai *in vitro*. Buvo nustatyta, kad po VSV G pseudotipuotų lentivirusų, kurie supakavę EGFP geno transkriptus, infekcijos ląstelių lizatai sugeneravo šviesą. Dėl šio nLuc fono, kuris gali iškreipti luminescencijos kiekį, reikėtų patvirtinti nLuc analizės rezultatus antru būdu, pvz.: pagaminti pseudovirusus, supakavusius atsparumo antibiotikui geno transkriptus.

VILNIUS UNIVERSITY LIFE SCIENCES CENTER

Monika Repšytė

Master's thesis

Exploring the Cell Entry Potential of Wuhan Mosquito Virus 6 Glycoprotein ABSTRACT

The prevalence of segmented RNA viruses in a variety of organisms became possible because of sequencing and bioinformatics breakthroughs. Consequently, viruses of Thogotovirus and Quaranjavirus, lesser-known genera of the *Orthomyxoviridae* family, were more frequently observed not only in invertebrates but also in vertebrates. These observations have sparked numerous studies focused on the zoonotic potential of new orthomyxoviruses iki cause an epidemic. Our research object is the surface glycoprotein of a quaranjavirus-like Wuhan mosquito virus 6 (WuMV-6), which is detectable in mosquito metagenomics data worldwide.

The goal of this study is iki experimentally test the membrane fusion capabilities of WuMV-6 glycoprotein gp64, the sequence of which was determined using bioinformatics tools. Frist viral infection's step - cell entry - can be tested by producing pseudotyped lentiviral vectors with WuMV-6 gp64 integrated into their envelope and infecting cells with them *in vitro*. Successful WuMV-6 infection can only occur if gp64 binds with cell surface receptors. We used pseudoviruses, each bearing one of three WuMV-6 gp64 sequence variants, SINUV gp64, AcMNPV gp64, or VSV G.

Synthesis of C terminal hemagglutinin-tagged viral glycoproteins in mammalian HEK293T/17 cells was confirmed, although the efficiency of each glycoprotein's synthesis differed. Pseudoviruses coated with previously mentioned glycoproteins and carrying RNA with reporter gene nanoluciferase (nLuc) were produced by HEK293T. Additionally, VSV pseudoviruses with EGFP gene transcripts were synthesized, during which the nLuc protein was also synthesized. SINUV and WuMV-6 pseudoviruses were coated with their respective gp64 but SINUV gp64 was incorporated more than WuMV-6 gp64. The quantification of pseudoviruses was determined with TaqMan qPCR. Culex tarsalis mosquito (natural WuMV-6 host) cells and chicken mononuclear blood cells were infected with pseudoviruses. Infection efficiency was evaluated by the strength of chemiluminescence from infected cells. According iki nLuc analysis, mosquito and chicken blood cells were infected with SINUV pseudoviruses. However, variation in the infection capability of pseudoviruses produced at separate times was noticed, highlighting the importance of quality checks. Nonetheless WuMV-6 gp64 successfully mediated pseudovirus entry into Cx. tarsalis cells in vitro. Cells infected with VSV pseudoviruses carrying EGFP RNA still generated a chemiluminescence signal. Due iki nLuc background, these results should be tested by another method, such as producing antibiotic resistance gene RNA transporting pseudoviruses.

Padėka

Didžiausias ačiū vadovei dr. Mildai Norkienei už kantrų ir nuoseklų vadovavimą. Tyrimo užduotys nebuvo lengvos, bet dėl mūsų darnaus bendradarbiavimo įveikiamos. Smagu, kad darbai niekada nesibaigia... Taip pat, noriu padėkoti dr. Danguolei Žiogienei ir dokt. Emilijai Vasiliūnaitei už dalijimąsi žiniomis, patirtimi ir kava su pienu bei dr. Gyčiui Dudui už jaukų priėmimą į ortomiksovirusų tyrimų grupę.

Šaltinių sąrašas

AbuBakar, U., Amrani, L., Kamarulzaman, F. A., Karsani, S. A., Hassandarvish, P., & Khairat, J. E. (2023). Avian influenza virus tropism in humans. *Viruses*, *15*(4), 833. https://doi.org/10.3390/v15040833

Allison, A. B., Ballard, J. R., Tesh, R. B., Brown, J. D., Ruder, M. G., Keel, M. K., Munk, B. A., Mickley, R. M., Gibbs, S. E. J., Travassos da Rosa, A. P. A., Ellis, J. C., Ip, H. S., Shearn-Bochsler, V. I., Rogers, M. B., Ghedin, E., Holmes, E. C., Parrish, C. R., & Dwyer, C. (2015). Cyclic avian mass mortality in the northeastern United States is associated with a novel orthomyxovirus. *Journal of Virology*, *8*9(2), 1389–1403. https://doi.org/10.1128/JVI.02019-14

Autissier, P., Soulas, C., Burdo, T. H., & Williams, K. C. (2010). Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry*. *Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *77A*(5), 410–419. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20859

Bai, C., Qi, J., Wu, Y., Wang, X., Gao, G. F., Peng, R., & Gao, F. (2019). Postfusion structure of human-infecting Bourbon virus envelope glycoprotein. *Journal of Structural Biology*, *208*(2), 99–106. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.08.005

Barczak, W., Suchorska, W., Rubiś, B., & Kulcenty, K. (2015). Universal real-time PCR-based assay for lentiviral titration. *Molecular Biotechnology*, *57*(2), 195–200. https://doi.org/10.1007/s12033-014-9815-4

Barnard, K. N., Wasik, B. R., LaClair, J. R., Buchholz, D. W., Weichert, W. S., Alford-Lawrence, B. K., Aguilar, H. C., & Parrish, C. R. (2019). Expression of 9-O- and 7,9-O-acetyl modified Sialic acid in cells and their effects on influenza viruses. *mBio*, *10*(6), e02490-19. https://doi.org/10.1128/mBio.02490-19

Batson, J., Dudas, G., Haas-Stapleton, E., Kistler, A. L., Li, L. M., Logan, P., Ratnasiri, K., & Retallack, H. (2021). Single mosquito metatranscriptomics identifies vectors, emerging pathogens and reservoirs in one assay. *eLife*, *10*, e68353. https://doi.org/10.7554/eLife.68353

Batts, W. N., LaPatra, S. E., Katona, R., Leis, E., Ng, T. F. F., Brieuc, M. S. O., Breyta, R. B., Purcell, M. K., Conway, C. M., Waltzek, T. B., Delwart, E., & Winton, J. R. (2017). Molecular characterization of a novel orthomyxovirus from rainbow and steelhead trout (Oncorhynchus mykiss). *Virus Research*, *230*, 38–49. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.005

Beckham, J. D., & Tyler, K. L. (2015). Arbovirus infections. *Continuum (Minneapolis, Minn.*), 21(6 Neuroinfectious Disease), 1599–1611. https://doi.org/10.1212/CON.0000000000240

Biffi, A., Bartolomae, C. C., Cesana, D., Cartier, N., Aubourg, P., Ranzani, M., Cesani, M., Benedicenti, F., Plati, T., Rubagotti, E., Merella, S., Capotondo, A., Sgualdino, J., Zanetti, G., von Kalle, C., Schmidt, M., Naldini, L., & Montini, E. (2011). Lentiviral vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign integration bias and not oncogenic selection. *Blood*, *117*(20), 5332–5339. https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-306761

Böttcher-Friebertshäuser, E., Garten, W., Matrosovich, M., & Klenk, H. D. (2014). The hemagglutinin: A determinant of pathogenicity. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 3–34). Springer International Publishing.

Bratuleanu, B. E., Temmam, S., Munier, S., Chrétien, D., Bigot, T., van der Werf, S., Savuta, G., & Eloit, M. (2022). Detection of Phenuiviridae, Chuviridae members, and a novel quaranjavirus in hard ticks from Danube delta. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*, 863814. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.863814

Briese, T., Chowdhary, R., Travassos da Rosa, A., Hutchison, S. K., Popov, V., Street, C., Tesh, R. B., & Lipkin, W. I. (2014). Upolu virus and Aransas Bay virus, two presumptive bunyaviruses, are novel members of the family Orthomyxoviridae. *Journal of Virology*, *88*(10), 5298–5309. https://doi.org/10.1128/jvi.03391-13

Caetano-Anollés, G., Claverie, J.-M., & Nasir, A. (2023). A critical analysis of the current state of virus taxonomy. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1240993. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1240993

Calder, L. J., Wasilewski, S., Berriman, J. A., & Rosenthal, P. B. (2010). Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(23), 10685–10690. https://doi.org/10.1073/pnas.1002123107

Cárdenas, M., Michelson, S., Pérez, D. R., Montoya, M., Toledo, J., Vásquez-Martínez, Y., & Cortez-San Martin, M. (2022). Infectious salmon anemia virus infectivity is determined by multiple segments with an important contribution from segment 5. *Viruses*, *14*(3), 631. https://doi.org/10.3390/v14030631

Cesana, D., Ranzani, M., Volpin, M., Bartholomae, C., Duros, C., Artus, A., Merella, S., Benedicenti, F., Sergi Sergi, L., Sanvito, F., Brombin, C., Nonis, A., Serio, C. D., Doglioni, C., von Kalle, C., Schmidt, M., Cohen-Haguenauer, O., Naldini, L., & Montini, E. (2014). Uncovering and dissecting the genotoxicity of self-inactivating lentiviral vectors in vivo. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *22*(4), 774–785. https://doi.org/10.1038/mt.2014.3

Christiansen, D. H., McBeath, A. J. A., Aamelfot, M., Matejusova, I., Fourrier, M., White, P., Petersen, P. E., & Falk, K. (2017). First field evidence of the evolution from a non-virulent HPR0 to a virulent HPR-deleted infectious salmon anaemia virus. *The Journal of General Virology*, *98*(4), 595–606. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000741

Cohen, M., Zhang, X.-Q., Senaati, H. P., Chen, H.-W., Varki, N. M., Schooley, R. T., & Gagneux, P. (2013). Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Virology Journal*, *10*(1). https://doi.org/10.1186/1743-422x-10-321

Contreras-Gutiérrez, M. A., Nunes, M. R. T., Guzman, H., Uribe, S., Suaza Vasco, J. D., Cardoso, J. F., Popov, V. L., Widen, S. G., Wood, T. G., Vasilakis, N., & Tesh, R. B. (2017). Sinu virus, a novel and divergent orthomyxovirus related to members of the genus Thogotovirus isolated from mosquitoes in Colombia. *Virology*, *501*, 166–175. https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.11.014

Cook, K. S., Fisk, G. J., Hauber, J., Usman, N., Daly, T. J., & Rusche, J. R. (1991). Characterization of HIV-1 REV protein: binding stoichiometry and minimal RNA substrate. *Nucleic Acids Research*, *19*(7), 1577–1583. https://doi.org/10.1093/nar/19.7.1577

Cornetta, K., Duffy, L., Turtle, C. J., Jensen, M., Forman, S., Binder-Scholl, G., Fry, T., Chew, A., Maloney, D. G., & June, C. H. (2018). Absence of replication-competent Lentivirus in the clinic: Analysis of infused T cell products. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *26*(1), 280–288. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.09.008

Da Silva, E. V. P., Da Rosa, A. P. A. T., Nunes, M. R. T., Diniz, J. A. P., Tesh, R. B., Cruz, A. C. R., Vieira, C. M. A., & Vasconcelos, P. F. C. (2005). Araguari virus, a new member of the family Orthomyxoviridae: serologic, ultrastructural, and molecular characterization. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *73*(6), 1050–1058. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.1050

Dadonaite, B., Gilbertson, B., Knight, M. L., Trifkovic, S., Rockman, S., Laederach, A., Brown, L. E., Fodor, E., & Bauer, D. L. V. (2019). The structure of the influenza A virus genome. *Nature Microbiology*, *4*(11), 1781–1789. https://doi.org/10.1038/s41564-019-0513-7

Das, A. T., Harwig, A., & Berkhout, B. (2011). The HIV-1 Tat protein has a versatile role in activating viral transcription. *Journal of Virology*, *85*(18), 9506–9516. https://doi.org/10.1128/jvi.00650-11

Dautzenberg, I. J. C., Rabelink, M. J. W. E., & Hoeben, R. C. (2021). The stability of envelopepseudotyped lentiviral vectors. *Gene Therapy*, *28*(1–2), 89–104. https://doi.org/10.1038/s41434-020-00193-y

DePolo, N. J., Reed, J. D., Sheridan, P. L., Townsend, K., Sauter, S. L., Jolly, D. J., & Dubensky, T. W., Jr. (2000). VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *2*(3), 218–222. https://doi.org/10.1006/mthe.2000.0116

Deyle, E. R., Maher, M. C., Hernandez, R. D., Basu, S., & Sugihara, G. (2016). Global environmental drivers of influenza. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(46), 13081–13086. https://doi.org/10.1073/pnas.1607747113

Dick, A., Mikirtumov, V., Fuchs, J., Krupp, F., Olal, D., Bendl, E., Sprink, T., Diebolder, C., Kudryashev, M., Kochs, G., Roske, Y., & Daumke, O. (2024). Structural characterization of Thogoto Virus nucleoprotein provides insights into viral RNA encapsidation and RNP assembly. *Structure (London, England: 1993)*, *32*(8), 1068-1078.e5. https://doi.org/10.1016/j.str.2024.04.016

Dudas, G., & Batson, J. (2023). Accumulated metagenomic studies reveal recent migration, whole genome evolution, and undiscovered diversity of orthomyxoviruses. *Journal of Virology*, *97*(10), e0105623. https://doi.org/10.1128/jvi.01056-23

Duffy, S. (2018). Why are RNA virus mutation rates so damn high? *PLoS Biology*, *16*(8), e3000003. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000003

Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., & Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of Virology*, *72*(11), 8463–8471. https://doi.org/10.1128/JVI.72.11.8463-8471.1998

Duvergé, A., & Negroni, M. (2020). Pseudotyping Lentiviral vectors: When the clothes make the virus. *Viruses*, *12*(11), 1311. https://doi.org/10.3390/v12111311

Elena, S. F., & Sanjuán, R. (2005). Adaptive value of high mutation rates of RNA viruses: separating causes from consequences. *Journal of Virology*, *79*(18), 11555–11558. https://doi.org/10.1128/JVI.79.18.11555-11558.2005

Falk, K., Namork, E., Rimstad, E., Mjaaland, S., & Dannevig, B. H. (1997). Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (Salmo salar L.). *Journal of Virology*, *71*(12), 9016–9023. https://doi.org/10.1128/JVI.71.12.9016-9023.1997

Fosse, J. H., Andresen, A. M. S., Ploss, F. B., Weli, S. C., Heffernan, I. A., Sapkota, S.,Lundgård, K., Kuiper, R. V., Solhaug, A., & Falk, K. (2023a). The infectious salmon anemia virusesterase prunes erythrocyte surfaces in infected Atlantic salmon and exposes terminal sialic acids tolectinrecognition. *Frontiers*inImmunology, 14,https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1158077

Fosse, J. H., Andresen, A. M. S., Ploss, F. B., Weli, S. C., Heffernan, I. A., Sapkota, S.,Lundgård, K., Kuiper, R. V., Solhaug, A., & Falk, K. (2023b). The infectious salmon anemia virusesterase prunes erythrocyte surfaces in infected Atlantic salmon and exposes terminal sialic acids tolectinrecognition. *Frontiers*inImmunology, 14,https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1158077

Fournier, E., Moules, V., Essere, B., Paillart, J.-C., Sirbat, J.-D., Isel, C., Cavalier, A., Rolland, J.-P., Thomas, D., Lina, B., & Marquet, R. (2012). A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments. *Nucleic Acids Research*, *40*(5), 2197–2209. https://doi.org/10.1093/nar/gkr985 Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews*. *Microbiology*, *13*(8), 484–496. https://doi.org/10.1038/nrmicro3490

Fuchs, J., Lamkiewicz, K., Kolesnikova, L., Hölzer, M., Marz, M., & Kochs, G. (2022). Comparative study of ten thogotovirus isolates and their distinct *in vivo* characteristics. *Journal of Virology*, 96(5). https://doi.org/10.1128/jvi.01556-21

Fuchs, J., Oschwald, A., Graf, L., & Kochs, G. (2020). Tick-transmitted thogotovirus gains high virulence by a single MxA escape mutation in the viral nucleoprotein. *PLoS Pathogens*, *16*(11), e1009038. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009038

Girard-Gagnepain, A., Amirache, F., Costa, C., Lévy, C., Frecha, C., Fusil, F., Nègre, D., Lavillette, D., Cosset, F.-L., & Verhoeyen, E. (2014). Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. *Blood*, *124*(8), 1221–1231. https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-558163

Godoy, M. G., Kibenge, M. J. T., Suarez, R., Lazo, E., Heisinger, A., Aguinaga, J., Bravo, D., Mendoza, J., Llegues, K. O., Avendaño-Herrera, R., Vera, C., Mardones, F., & Kibenge, F. S. B. (2013). Infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Chilean Atlantic salmon (Salmo salar) aquaculture: emergence of low pathogenic ISAV-HPR0 and re-emergence of virulent ISAV-HPRΔ: HPR3 and HPR14. *Virology Journal*, *10*(1), 344. https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-344

Godwin, S. E., Morrison, R. N., Knowles, G., Cornish, M. C., Hayes, D., & Carson, J. (2020). Pilchard orthomyxovirus (POMV). II. Causative agent of salmon orthomyxoviral necrosis, a new disease of farmed Atlantic salmon Salmo salar. *Diseases of Aquatic Organisms*, 139, 51–68. https://doi.org/10.3354/dao03469

Guo, J., Li, S., Bai, L., Zhao, H., Shang, W., Zhong, Z., Maimaiti, T., Gao, X., Ji, N., Chao, Y., Li, Z., & Du, D. (2024). Structural transition of GP64 triggered by a pH-sensitive multi-histidine switch. *Nature Communications*, *15*(1), 7668. https://doi.org/10.1038/s41467-024-51799-4

Hagmaier, K., Gelderblom, H. R., & Kochs, G. (2004). Functional comparison of the two gene products of Thogoto virus segment 6. *The Journal of General Virology*, *85*(Pt 12), 3699–3708. https://doi.org/10.1099/vir.0.80300-0

Harris, H. M. B., & Hill, C. (2020). A place for viruses on the Tree of life. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 604048. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.604048

Hilsch, M., Goldenbogen, B., Sieben, C., Höfer, C. T., Rabe, J. P., Klipp, E., Herrmann, A., & Chiantia, S. (2014). Influenza A matrix protein M1 multimerizes upon binding to lipid membranes. *Biophysical Journal*, *107*(4), 912–923. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.042

Holmes, E. C. (2003). Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution. *Trends in Microbiology*, *11*(12), 543–546. https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.10.006

Holmes, E. C., & Duchêne, S. (2019). Can sequence phylogenies safely infer the origin of the global virome? *mBio*, *10*(2). https://doi.org/10.1128/mbio.00289-19

Huang, Q. J., Song, K., Xu, C., Bolon, D. N. A., Wang, J. P., Finberg, R. W., Schiffer, C. A., & Somasundaran, M. (2022). Quantitative structural analysis of influenza virus by cryo-electron tomography and convolutional neural networks. *Structure (London, England: 1993)*, *30*(5), 777-786.e3. https://doi.org/10.1016/j.str.2022.02.014

Huang, Y., Mei, H., Deng, C., Wang, W., Yuan, C., Nie, Y., Li, J.-D., & Liu, J. (2024). EXTL3 and NPC1 are mammalian host factors for Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus infection. *Nature Communications*, *15*(1), 7711. https://doi.org/10.1038/s41467-024-52193-w

Huang, Y.-J. S., Higgs, S., & Vanlandingham, D. L. (2019). Arbovirus-mosquito vector-host interactions and the impact on transmission and disease pathogenesis of arboviruses. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 22. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00022

Humbert, O., Gisch, D. W., Wohlfahrt, M. E., Adams, A. B., Greenberg, P. D., Schmitt, T. M., Trobridge, G. D., & Kiem, H.-P. (2016). Development of third-generation cocal envelope producer cell lines for robust Lentiviral gene transfer into hematopoietic stem cells and T-cells. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 24(7), 1237–1246. https://doi.org/10.1038/mt.2016.70

Islam, S., Hoque, S. A., Adnan, N., Tanaka, A., Jinno-Oue, A., & Hoshino, H. (2013). X4tropic human immunodeficiency virus IIIB utilizes CXCR4 as coreceptor, as distinct from R5X4tropic viruses. *Microbiology and Immunology*, *57*(6), 437–444. https://doi.org/10.1111/1348-0421.12051

Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J., & Varmus, H. E. (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*, *331*(6153), 280–283. https://doi.org/10.1038/331280a0

Jargalsaikhan, B.-E., Muto, M., Been, Y., Matsumoto, S., Okamura, E., Takahashi, T., Narimichi, Y., Kurebayashi, Y., Takeuchi, H., Shinohara, T., Yamamoto, R., & Ema, M. (2024). The dual-pseudotyped Lentiviral vector with VSV-G and Sendai virus HN enhances infection efficiency through the synergistic effect of the envelope proteins. *Viruses*, *16*(6), 827. https://doi.org/10.3390/v16060827

Kain, M. P., Skinner, E. B., Athni, T. S., Ramirez, A. L., Mordecai, E. A., & van den Hurk, A. F. (2022). Not all mosquitoes are created equal: A synthesis of vector competence experiments reinforces virus associations of Australian mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *16*(10), e0010768. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010768

Kenney, J. L., & Brault, A. C. (2014). The role of environmental, virological and vector interactions in dictating biological transmission of arthropod-borne viruses by mosquitoes. *Advances in Virus Research*, *89*, 39–83. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800172-1.00002-1

Kloc, M., Halasa, M., Kubiak, J. Z., & Ghobrial, R. M. (2024). Invertebrate immunity, natural transplantation immunity, somatic and germ cell parasitism, and transposon defense. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(2), 1072. https://doi.org/10.3390/ijms25021072

Koch, R. T., Erazo, D., Folly, A. J., Johnson, N., Dellicour, S., Grubaugh, N. D., & Vogels, C. B. F. (2024). Genomic epidemiology of West Nile virus in Europe. *One Health (Amsterdam, Netherlands)*, *18*(100664), 100664. https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100664

Kochs, G., Weber, F., Gruber, S., Delvendahl, A., Leitz, C., & Haller, O. (2000). Thogoto virus matrix protein is encoded by a spliced mRNA. *Journal of Virology*, *74*(22), 10785–10789. https://doi.org/10.1128/jvi.74.22.10785-10789.2000

Koonin, E. V., Krupovic, M., & Agol, V. I. (2021). The Baltimore classification of viruses 50 years later: How does it stand in the light of virus evolution? *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *85*(3), e0005321. https://doi.org/10.1128/MMBR.00053-21

Kosoy, O. I., Lambert, A. J., Hawkinson, D. J., Pastula, D. M., Goldsmith, C. S., Hunt, D. C., & Staples, J. E. (2015). Novel thogotovirus associated with febrile illness and death, United States, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(5), 760–764. https://doi.org/10.3201/eid2105.150150

Krupovic, M., Dolja, V. V., & Koonin, E. V. (2020). The LUCA and its complex virome. *Nature Reviews. Microbiology*, *18*(11), 661–670. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0408-x

Kuno, G., Chang, G.-J., Tsuchiya, K. R., & Miller, B. R. (2001). *Virus Genes*, 23(2), 211–214. https://doi.org/10.1023/a:1011873028144 Li, C.-X., Shi, M., Tian, J.-H., Lin, X.-D., Kang, Y.-J., Chen, L.-J., Qin, X.-C., Xu, J., Holmes, E. C., & Zhang, Y.-Z. (2015). Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *eLife*, *4*, e05378. https://doi.org/10.7554/eLife.05378

Lin, Y.-R., Chu, S.-M., Yu, F.-H., Huang, K.-J., & Wang, C.-T. (2022). Effects of reduced gag cleavage efficiency on HIV-1 Gag-Pol package. *BMC Microbiology*, *22*(1). https://doi.org/10.1186/s12866-022-02503-3

Lledó, L., Giménez-Pardo, C., & Gegúndez, M. I. (2020). Epidemiological study of Thogoto and Dhori virus infection in people bitten by ticks, and in sheep, in an area of northern Spain. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(7), 2254. https://doi.org/10.3390/ijerph17072254

Ma, E. J., Hill, N. J., Zabilansky, J., Yuan, K., & Runstadler, J. A. (2016). Reticulate evolution is favored in influenza niche switching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(19), 5335–5339. https://doi.org/10.1073/pnas.1522921113

Mackay, A. J., Kramer, W. L., Meece, J. K., Brumfield, R. T., & Foil, L. D. (2010). Host feeding patterns of Culex mosquitoes (Diptera: Culicidae) in east Baton Rouge parish, Louisiana. *Journal of Medical Entomology*, *47*(2), 238–248. https://doi.org/10.1603/me09168

Markussen, T., Jonassen, C. M., Numanovic, S., Braaen, S., Hjortaas, M., Nilsen, H., & Mjaaland, S. (2008). Evolutionary mechanisms involved in the virulence of infectious salmon anaemia virus (ISAV), a piscine orthomyxovirus. *Virology*, *374*(2), 515–527. https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.01.019

McDonald, S. M., Nelson, M. I., Turner, P. E., & Patton, J. T. (2016). Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nature Reviews. Microbiology*, *14*(7), 448–460. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.46

McGinley, L., McMahon, J., Strappe, P., Barry, F., Murphy, M., O'Toole, D., & O'Brien, T. (2011). Lentiviral vector mediated modification of mesenchymal stem cells & enhanced survival in an in vitro model of ischaemia. *Stem Cell Research & Therapy*, *2*(2), 12. https://doi.org/10.1186/scrt53

Mendonça, L., Sun, D., Ning, J., Liu, J., Kotecha, A., Olek, M., Frosio, T., Fu, X., Himes, B. A., Kleinpeter, A. B., Freed, E. O., Zhou, J., Aiken, C., & Zhang, P. (2021). CryoET structures of immature HIV Gag reveal six-helix bundle. *Communications Biology*, *4*(1), 481. https://doi.org/10.1038/s42003-021-01999-1

Mohammed, Y. S., Gresiková, M., Adamyová, K., & Ragib AH el-Dawala, K. (1970). Studies on arboviruses in Egypt. II. Contribution of arboviruses to the aetiology of undiagnosed fever among children. *The Journal of Hygiene*, *68*(3), 491–495. https://doi.org/10.1017/s002217240004239x

Moody, E. R. R., Álvarez-Carretero, S., Mahendrarajah, T. A., Clark, J. W., Betts, H. C., Dombrowski, N., Szánthó, L. L., Boyle, R. A., Daines, S., Chen, X., Lane, N., Yang, Z., Shields, G. A., Szöllősi, G. J., Spang, A., Pisani, D., Williams, T. A., Lenton, T. M., & Donoghue, P. C. J. (2024). The nature of the last universal common ancestor and its impact on the early Earth system. *Nature Ecology & Evolution*, *8*(9), 1654–1666. https://doi.org/10.1038/s41559-024-02461-1

Mourya, D. T., Yadav, P. D., Nyayanit, D. A., Majumdar, T. D., Jain, S., Sarkale, P., & Shete, A. (2019). Characterization of a strain of quaranfil virus isolated from soft ticks in India. Is quaranfil virus an unrecognized cause of disease in human and animals?". *Heliyon*, *5*(3), e01368. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01368

Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., & Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science (New York, N.Y.)*, *272*(5259), 263–267. https://doi.org/10.1126/science.272.5259.263

Nutman, A. P., Bennett, V. C., Friend, C. R. L., Van Kranendonk, M. J., Rothacker, L., & Chivas, A. R. (2019). Cross-examining Earth's oldest stromatolites: Seeing through the effects of heterogeneous deformation, metamorphism and metasomatism affecting Isua (Greenland) ~3700 Ma sedimentary rocks. *Precambrian Research*, *331*(105347), 105347. https://doi.org/10.1016/j.precamres.2019.105347

Obbard, D. J., & Dudas, G. (2014). The genetics of host-virus coevolution in invertebrates. *Current Opinion in Virology*, *8*, 73–78. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.07.002

Osterhaus, A. D., Rimmelzwaan, G. F., Martina, B. E., Bestebroer, T. M., & Fouchier, R. A. (2000). Influenza B virus in seals. *Science (New York, N.Y.)*, *288*(5468), 1051–1053. https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1051

Papanikolaou, E., Kontostathi, G., Drakopoulou, E., Georgomanoli, M., Stamateris, E., Vougas, K., Vlahou, A., Maloy, A., Ware, M., & Anagnou, N. P. (2013). Characterization and comparative performance of lentiviral vector preparations concentrated by either one-step ultrafiltration or ultracentrifugation. *Virus Research*, *175*(1), 1–11. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.03.015

Parry, R., Wille, M., Turnbull, O. M. H., Geoghegan, J. L., & Holmes, E. C. (2020). Divergent influenza-like viruses of amphibians and fish support an ancient evolutionary association. *Viruses*, *12*(9), 1042. https://doi.org/10.3390/v12091042

Patzina, C., Haller, O., & Kochs, G. (2014). Structural requirements for the antiviral activity of the human MxA protein against Thogoto and influenza A virus. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(9), 6020–6027. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.543892

Pearson, M. N., & Rohrmann, G. F. (2002). Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the *baculoviridae*, *orthomyxoviridae*, and *metaviridae* (insect retrovirus) families. *Journal of Virology*, *76*(11), 5301–5304. https://doi.org/10.1128/jvi.76.11.5301-5304.2002

Peng, R., Zhang, S., Cui, Y., Shi, Y., Gao, G. F., & Qi, J. (2017). Structures of human-infecting Thogotovirus fusogens support a common ancestor with insect baculovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(42), E8905–E8912. https://doi.org/10.1073/pnas.1706125114

Pettersson, J. H.-O., Shi, M., Eden, J.-S., Holmes, E. C., & Hesson, J. C. (2019). Meta-Transcriptomic Comparison of the RNA Viromes of the Mosquito Vectors Culex pipiens and Culex torrentium in Northern Europe. *Viruses*, *11*(11), 1033. https://doi.org/10.3390/v11111033

Peukes, J., Xiong, X., Erlendsson, S., Qu, K., Wan, W., Calder, L. J., Schraidt, O., Kummer, S., Freund, S. M. V., Kräusslich, H.-G., & Briggs, J. A. G. (2020). The native structure of the assembled matrix protein 1 of influenza A virus. *Nature*, *587*(7834), 495–498. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2696-8

Philpott, D. C. E., Nolan, M. S., Evert, N., Mayes, B., Hesalroad, D., Fonken, E., & Murray, K. O. (2019). Acute and delayed deaths after West Nile virus infection, Texas, USA, 2002-2012. *Emerging Infectious Diseases*, *25*(2), 256. https://doi.org/10.3201/eid2502.181250

Popescu, C. P., Florescu, S. A., Lupulescu, E., Zaharia, M., Tardei, G., Lazar, M., Ceausu, E., & Ruta, S. M. (2017). Neurologic complications of influenza B virus infection in adults, Romania. *Emerging Infectious Diseases*, *23*(4), 574–581. https://doi.org/10.3201/eid2304.161317

Presti, R. M., Zhao, G., Beatty, W. L., Mihindukulasuriya, K. A., da Rosa, A. P. A. T., Popov, V. L., Tesh, R. B., Virgin, H. W., & Wang, D. (2009). Quaranfil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family Orthomyxoviridae. *Journal of Virology*, *83*(22), 11599–11606. https://doi.org/10.1128/JVI.00677-09

Qin, X.-C., Shi, M., Tian, J.-H., Lin, X.-D., Gao, D.-Y., He, J.-R., Wang, J.-B., Li, C.-X., Kang, Y.-J., Yu, B., Zhou, D.-J., Xu, J., Plyusnin, A., Holmes, E. C., & Zhang, Y.-Z. (2014). A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(18), 6744–6749. https://doi.org/10.1073/pnas.1324194111

Rulli, S. J., Jr, Hibbert, C. S., Mirro, J., Pederson, T., Biswal, S., & Rein, A. (2007). Selective and nonselective packaging of cellular RNAs in retrovirus particles. *Journal of Virology*, *81*(12), 6623–6631. https://doi.org/10.1128/jvi.02833-06

Sameroff, S., Tokarz, R., Jain, K., Oleynik, A., Carrington, C. V. F., Lipkin, W. I., & Oura, C. A. L. (2021). Novel quaranjavirus and other viral sequences identified from ticks parasitizing hunted wildlife in Trinidad and Tobago. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *12*(4), 101730. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101730

Schenkwein, D., Afzal, S., Nousiainen, A., Schmidt, M., & Ylä-Herttuala, S. (2020). Efficient nuclease-directed integration of Lentivirus vectors into the human ribosomal DNA locus. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *28*(8), 1858–1875. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.05.019

Schirtzinger, E. E., Jasperson, D. C., Swanson, D. A., Mitzel, D., Drolet, B. S., Richt, J. A., & Wilson, W. C. (2023). Establishment of a Culex tarsalis (Diptera: Culicidae) Cell Line and its Permissiveness to Arbovirus Infection. *Journal of Medical Entomology*, *60*(1), 239–244. https://doi.org/10.1093/jme/tjac155

Schröder, A. R. W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., & Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, *110*(4), 521–529. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00864-4

Schweon, S. J. (2016). Bourbon virus: A novel pathogen. *Nursing*, *46*(4), 65. https://doi.org/10.1097/01.NURSE.0000481418.81092.98

Sederdahl, B. K., & Williams, J. V. (2020). Epidemiology and clinical characteristics of influenza C virus. *Viruses*, *12*(1), 89. https://doi.org/10.3390/v12010089

Seitz, B., Baktanian, E., Gordon, E. M., Anderson, W. F., LaBree, L., & McDonnell, P. J. (1998). Retroviral vector-mediated gene transfer into keratocytes: in vitro effects of polybrene and protamine sulfate. *Graefe s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 236(8), 602–612. https://doi.org/10.1007/s004170050129

Shi, M., Neville, P., Nicholson, J., Eden, J.-S., Imrie, A., & Holmes, E. C. (2017). High-resolution metatranscriptomics reveals the ecological dynamics of mosquito-associated RNA viruses in Western Australia. *Journal of Virology*, *91*(17), e00680-17. https://doi.org/10.1128/JVI.00680-17

Šimičić, P., & Židovec-Lepej, S. (2022). A glimpse on the evolution of RNA viruses: Implications and lessons from SARS-CoV-2. *Viruses*, *15*(1), 1. https://doi.org/10.3390/v15010001

Tantikositruj, C., Buadkhunthod, A., Rattanasrisomporn, J., Kitpipit, W., & Boonkaewwan, C. (2021). Assessment of chicken peripheral blood mononuclear cells isolated from freshly drawn blood versus 24 h refrigerated blood. *Veterinary World*, 14(9), 2549–2553. https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2549-2553

Temmam, S., Monteil-Bouchard, S., Robert, C., Baudoin, J.-P., Sambou, M., Aubadie-Ladrix, M., Labas, N., Raoult, D., Mediannikov, O., & Desnues, C. (2016). Characterization of viral communities of biting midges and identification of novel Thogotovirus species and Rhabdovirus genus. *Viruses*, *8*(3), 77. https://doi.org/10.3390/v8030077

Thamamongood, T., Jengarn, J., Muangsanit, P., Petpiroon, N., Srisutthisamphan, K., Attasombat, K., Wongwanakul, R., Aueviriyavit, S., Laohathai, S., Jongkaewwattana, A., &

Teeravechyan, S. (2024). Pseudotyped zoonotic thogotoviruses exhibit broad entry range in mammalian cells. *Virology*, *589*(109914), 109914. https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.109914

Tseng, S.-H., Lam, B., Kung, Y. J., Lin, J., Liu, L., Tsai, Y. C., Ferrall, L., Roden, R. B. S., Wu, T. C., & Hung, C.-F. (2021). A novel pseudovirus-based mouse model of SARS-CoV-2 infection to test COVID-19 interventions. *Journal of Biomedical Science*, *28*(1), 34. https://doi.org/10.1186/s12929-021-00729-3

Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adriaenssens, E. M., Alfenas-Zerbini, P., Dempsey, D. M., Dutilh, B. E., García, M. L., Curtis Hendrickson, R., Junglen, S., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lambert, A. J., Łobocka, M., Oksanen, H. M., Orton, R. J., Robertson, D. L., Rubino, L., ... Zerbini, F. M. (2022). Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). *Archives of Virology*, *167*(11), 2429–2440. https://doi.org/10.1007/s00705-022-05516-5

Wang, D., Harmon, A., Jin, J., Francis, D. H., Christopher-Hennings, J., Nelson, E., Montelaro, R. C., & Li, F. (2010). The lack of an inherent membrane targeting signal is responsible for the failure of the matrix (M1) protein of influenza A virus to bud into virus-like particles. *Journal of Virology*, *84*(9), 4673–4681. https://doi.org/10.1128/JVI.02306-09

Wang, Q.-H., Wang, J., Ling, Z.-P., Cui, Z.-Q., Gong, J., Zhang, R., Li, S.-J., Wang, Y.-Y., Yang, R., Huang, D.-H., He, W., Gao, J., Feng, C., Hu, P.-L., Liu, L.-Y., Chang, L.-J., & Zou, L.-P. (2024). Phase I clinical trial of intracerebral injection of lentiviral-ABCD1 for the treatment of adrenoleukodystrophy. *Science Bulletin*, *69*(16), 2596–2603. https://doi.org/10.1016/j.scib.2024.04.072

Wheeler, J. X., Jones, C., Thorpe, R., & Zhao, Y. (2007). Proteomics analysis of cellular components in lentiviral vector production using Gel-LC-MS/MS. *Proteomics. Clinical Applications*, *1*(2), 224–230. https://doi.org/10.1002/prca.200600522

White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M., & Schornberg, K. (2008). Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *43*(3), 189–219. https://doi.org/10.1080/10409230802058320

Xue, L., Chang, T., Li, Z., Wang, C., Zhao, H., Li, M., Tang, P., Wen, X., Yu, M., Wu, J., Bao, X., Wang, X., Gong, P., He, J., Chen, X., & Xiong, X. (2024). Cryo-EM structures of Thogoto virus polymerase reveal unique RNA transcription and replication mechanisms among orthomyxoviruses. *Nature Communications*, *15*(1), 4620. https://doi.org/10.1038/s41467-024-48848-3

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L., & Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nature Biotechnology*, *15*(9), 871–875. https://doi.org/10.1038/nbt0997-871

Priedas A.

A 1 lentelė. CxTr-R2 infekcijos chemiliuminescencijos duomenų vienfaktorinės ANOVA Tuckey post-hoc testo rezultatai.

Tukey kelių palyginimų testas	Vidurkių skirtumas	95,00% skirtumo PI	Statistiškai	Koreguota
SINUV Nr 1 vs. WuMV-6 Nr 1	_2172	Nuo -3071		<0.0001
	-21/2	iki -1273	Taip	<0,0001
SINUV Nr.1 vs. WuMV-6 (II ATG) Nr.1	528,2	Nuo -370,8 iki 1427	Ne	0,5888
SINUV Nr.1 vs. AcMNPV Nr.1	39,9	Nuo -859,1 iki 938,9	Ne	>0,9999
SINUV Nr.1 vs. VSV Nr.1	-19,59	Nuo -918,6 iki 879,4	Ne	>0,9999
SINUV Nr.1 vs. VSV (pCAGGS-nLuc) Nr.1	-542,4	Nuo -1441 iki 356,6	Ne	0,5536
SINUV Nr.1 vs. SINUV Nr.2	-3800	Nuo -4699 iki -2901	Taip	<0,0001
SINUV Nr.1 vs. WuMV-6 Nr.2	-3959	Nuo -4858 iki -3060	Taip	<0,0001
SINUV Nr.1 vs. WuMV-6 (be signalinės sekos) Nr.2	-74,37	Nuo -973,4 iki 824,6	Ne	>0,9999
SINUV Nr.1 vs. WuMV-6 (II ATG) Nr.2	-68,13	Nuo -967,1 iki 830,9	Ne	>0,9999
SINUV Nr.1 vs. VSV (pCAGGS-nLuc) Nr.2	-735,6	Nuo -1635 iki 163,4	Ne	0,1779
WuMV-6 Nr.1 vs. WuMV-6 (II ATG) Nr.1	2700	Nuo 1801 iki 3599	Taip	<0,0001
WuMV-6 Nr.1 vs. AcMNPV Nr.1	2211	Nuo 1312 iki 3110	Taip	<0,0001
WuMV-6 Nr.1 vs. VSV Nr.1	2152	Nuo 1253 iki 3051	Taip	<0,0001
WuMV-6 Nr.1 vs. VSV (pCAGGS- nLuc) Nr.1	1629	Nuo 730,2 iki 2528	Taip	<0,0001
WuMV-6 Nr.1 vs. SINUV Nr.2	-1629	Nuo -2528 iki -729,9	Taip	<0,0001
WuMV-6 Nr.1 vs. WuMV-6 Nr.2	-1788	Nuo -2687 iki -888,7	Taip	<0,0001
WuMV-6 Nr.1 vs. WuMV-6 (be signalinės sekos) Nr.2	2097	Nuo 1198 iki 2996	Taip	<0,0001
WuMV-6 Nr.1 vs. WuMV-6 (II ATG) Nr.2	2103	Nuo 1204 iki 3002	Taip	<0,0001
WuMV-6 Nr.1 vs. VSV (pCAGGS- nLuc) Nr.2	1436	Nuo 537,0 iki 2335	Taip	0,0004
WuMV-6 (II ATG) Nr.1 vs. AcMNPV Nr.1	-488,3	Nuo -1387 iki 410,7	Ne	0,6865
WuMV-6 (II ATG) Nr.1 vs. VSV Nr.1	-547,8	Nuo -1447 iki 351,2	Ne	0,5405

Analizė atlikta "GraphPad Prism 8" programa. PI – pasikliovimo intervalai.

A 1 lentelė. Tęsinys.

Tukov koliu palvojnimu tostas	Vidurkių	95,00%	Statistiškai	Koreguota
i ukey kenų parygininų testas	skirtumas	skirtumo PI	reikšminga?	p reikšmė
WuMV-6 (II ATG) Nr.1 vs. VSV	-1071	Nuo -1970	Tain	0.0113
(pCAGGS-nLuc) Nr.1	-10/1	iki -171,6	Taip	0,0115
WuMV-6 (II ATG) Nr 1 vs SINI IV Nr 2	-4329	Nuo -5228	Tain	<0.0001
	iki -3430		Taip	<0,0001
WuMV-6 (II ATG) Nr.1 vs. WuMV-6		Nuo -5386	Tain	<0.0001
Nr.2	-4487	iki -3588	Taip	<0,0001
WuMV-6 (II ATG) Nr.1 vs. WuMV-6		Nuo -1502	No	0 4114
(be signalinės sekos) Nr.2	-602,5	iki 296,5	ne	0,4114
WuMV-6 (II ATG) Nr.1 vs. WuMV-6 (II		Nuo -1495	No	0.4254
ATG) Nr.2	-596,3	iki 302,7	INE	0,4234
WuMV-6 (II ATG) Nr.1 vs. VSV		Nuo -2163	Thin	0.0010
(pCAGGS-nLuc) Nr.2	-1264	iki -364,7	Taip	0,0019
A MNDV Nr 1 vc. VSV Nr 1		Nuo -958,5	No	>0.000
ACIVITY VITILI VS. V SV INLI	-59,5	iki 839,5	INE	~0,9999
AcMNPV Nr.1 vs. VSV (pCAGGS-		Nuo -1481	No	0.4576
nLuc) Nr.1	-582,3	iki 316,7	INE	0,4570
		Nuo -4739	т ·	<0.0001
ACMINPV Nr.1 vs. SINUV Nr.2	-3840	iki -2941	Taip	<0,0001
		Nuo -4898	н ·	10,0001
ACMNPV Nr.1 vs. WuMV-6 Nr.2	-3999	iki -3100	Тар	<0,0001
AcMNPV Nr.1 vs. WuMV-6 (be		Nuo -1013		
signalinės sekos) Nr.2	-114.3	iki 784.7	Ne	>0,9999
AcMNPV Nr.1 vs. WuMV-6 (II ATG)		Nuo -1007		
Nr.2	-108	iki 791.0	Ne	>0,9999
AcMNPV Nr.1 vs. VSV (pCAGGS-		Nuo -1674		
nLuc) Nr.2	-775,5	iki 123,5	Ne	0,1331
VSV Nr.1 vs. VSV (pCAGGS-nLuc)		Nuo -1422		0.000
Nr.1	-522,8	iki 376,2	Ne	0,602
		Nuo -4680		
VSV Nr.1 vs. SINUV Nr.2	-3781	iki -2882	Тар	<0,0001
		Nuo -4839	н ·	10,0001
VSV Nr.1 vs. WuMV-6 Nr.2	-3940	iki -3041	Тар	<0,0001
VSV Nr.1 vs. WuMV-6 (be signalinės		Nuo -953,8	D.T.	
sekos) Nr.2	-54,77	iki 844,2	Ne	>0,9999
		Nuo -947,5	.	
VSV Nr.1 vs. WuMV-6 (II AIG) Nr.2	-48,53	iki 850,5	Ne	>0,9999
VSV Nr.1 vs. VSV (pCAGGS-nLuc)		Nuo -1615	NT.	0.204
Nr.2	-716	iki 183,0	INE	0,204
VSV (pCAGGS-nLuc) Nr.1 vs. SINUV		Nuo -4157	н.	(0.0001
Nr.2	-3258	iki -2359	Taip	<0,0001
VSV (pCAGGS-nLuc) Nr.1 vs. WuMV-6		Nuo -4316	т ·	<0.0001
Nr.2	-3417	iki -2518	Taip	<0,0001
VSV (pCAGGS-nLuc) Nr.1 vs. WuMV-6		Nuo -431,0	NT	0.7000
(be signalinės sekos) Nr.2	468	iki 1367	INE	0,7339
VSV (pCAGGS-nLuc) Nr.1 vs. WuMV-6		Nuo -424,7	N 7	0.7105
(II ATG) Nr.2	474,3	iki 1373	INE	0,/195

A 1 lentelė. Tęsinys.

Tukey kelių palyginimų testas	Vidurkių skirtumas	95,00% skirtumo PI	Statistiškai reikšminga?	Koreguota p reikšmė
VSV (pCAGGS-nLuc) Nr.1 vs. VSV (pCAGGS-nLuc) Nr.2	-193,2	Nuo -1092 iki 705,8	Ne	0,9992
SINUV Nr.2 vs. WuMV-6 Nr.2	-158,8	Nuo -1058 iki 740,2	Ne	0,9999
SINUV Nr.2 vs. WuMV-6 (be signalinės sekos) Nr.2	3726	Nuo 2827 iki 4625	Taip	<0,0001
SINUV Nr.2 vs. WuMV-6 (II ATG) Nr.2	3732	Nuo 2833 iki 4631	Taip	<0,0001
SINUV Nr.2 vs. VSV (pCAGGS-nLuc) Nr.2	3065	2166 iki 3964	Taip	<0,0001
WuMV-6 Nr.2 vs. WuMV-6 (be signalinės sekos) Nr.2	3885	Nuo 2986 iki 4784	Taip	<0,0001
WuMV-6 Nr.2 vs. WuMV-6 (II ATG) Nr.2	3891	Nuo 2992 iki 4790	Taip	<0,0001
WuMV-6 Nr.2 vs. VSV (pCAGGS-nLuc) Nr.2	3224	Nuo 2325 iki 4123	Taip	<0,0001
WuMV-6 (be signalinės sekos) Nr.2 vs. WuMV-6 (II ATG) Nr.2	6,24	Nuo - 892,8 iki 905,2	Ne	>0,9999
WuMV-6 (be signalinės sekos) Nr.2 vs. VSV (pCAGGS-nLuc) Nr.2	-661,2	Nuo -1560 iki 237,8	Ne	0,2922
WuMV-6 (II ATG) Nr.2 vs. VSV (pCAGGS-nLuc) Nr.2	-667,4	Nuo -1566 iki 231,6	Ne	0,281

Priedas B.

B 1 lentelė. Vištų PBMC infekcijos chemiliuminescencijos duomenų vienfaktorinės ANOVA Tuckey post-hoc testo rezultatai.

Tukov koliu polyginimu tostos	Vidurkių	95,00%	Statistiškai	Koreguota p
i ukey kenų parygininių testas	skirtumas	skirtumo PI	reikšminga?	reikšmė
SINUV Nr. 3 vs. WuMV-6 Nr. 3	473163	Nuo 106763 iki 839563	Taip	0,0122
SINUV Nr. 3 vs. AcMNPV Nr. 3	412237	Nuo 45838 iki 778637	Taip	0,0272
SINUV Nr. 3 vs. VSV (pCAGGS-nLuc) Nr. 3	384713	Nuo -6984 iki 776411	Ne	0,0545
WuMV-6 Nr. 3 vs. AcMNPV Nr. 3	-60926	Nuo -400146 iki 278294	Ne	0,9446
WuMV-6 Nr. 3 vs. VSV (pCAGGS- nLuc) Nr. 3	-88450	Nuo -454850 iki 277950	Ne	0,8794
AcMNPV Nr. 3 vs. VSV (pCAGGS- nLuc) Nr. 3	-27524	Nuo -393924 iki 338875	Ne	0,9954

Analizė atlikta "GraphPad Prism 8" programa. PI – pasikliovimo intervalai.



C 1 pav. *Cx. tarsalis* ląstelių perdengtos šviesaus lauko ir fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos (20x didinimas). **(A)** Neinfekuotos ląstelės. **(B)** EGFP geno transkriptus nešančiais VSV pseudovirusais infekuotos ląstelės. Nuotraukų apdorojimas atliktas programa "ImageJ".