

Virusten genomien evoluutio

Robert Kesälahti

750376A LuK-tutkielma

Kevät 2017

Avainsanat: mutaationopeus, influenssavirus, ebolavirus, infektiomekanismit

Sisällysluettelo

1. Johdanto	3
2. Virusten infektiomekanismit	5
2.1 Soluun tunkeutuminen ja sen tehokkuus.....	5
2.2 Virusten fuusioproteiinien rakenne ja toiminta	7
3. Virusten mutaatiomekanismit ja -nopeudet	8
3.1 Mutaationopeus	8
3.2 Virusten väliset erot mutaationopeuksissa	10
3.3 Mutaatiomekanismeja	11
4. Influenssavirus.....	14
4.1 Influenssa A	15
4.2 Evoluution nopeus.....	16
4.3 Influenssan kausiluontoisuus	17
5. Ebolavirus	17
5.1 Ebolavirusinfektion oireet ja tartuntamenetelmät	18
5.2 Länsi-Afrikan vuosien 2013-2016 EVD epidemia.....	19
5.3 Epidemian aikana kerätyn materiaalin pohjalta tehdyt havainnot	20
6. Yhteenveto	22
7. Lähteet.....	22

1. Johdanto

Virukset ovat pienikokoisia itsenäiseen lisääntymiseen kykenemättömiä parasiittejä. Alttiin solun löytäessään virus pystyy tunkeutumaan soluun ja käyttämään sen koneistoja tuottaakseen lisää viruksia (Lodish & W. H. Freeman 2000). Virionit eli viruspartikkelit rakentuvat proteiineista ja nukleiinihapoista, sekä sisältävät usein myös sokereita ja lipidejä (Heino & Vuento 2014). Viruksen genomi voi olla rakenteeltaan lineaarinen tai rengasmaisen ja koostua yksi- tai kaksijuosteisesta DNA:sta tai RNA:sta. Genomien koossa esiintyy suurta vaihtelua, mutta suurin osa virusten genomeista sijoittuu 3-200 kiloemäksen (kb) välille (Salkinoja-Salonen *et al.* 2002). Myös genomien koodaamien proteiinien määrät vaihtelevat runsaasti, neljästä useampaan sataan genomien koosta riippuen (Lodish & W. H. Freeman 2000). Proteiinimolekyyleistä muodostunut kapseli ympäröi nukleiinihappoja. Viruksen perimästä ja sitä suojaavasta kapselista käytetään yhteisnimitystä nukleokapsidi. Kapselin tehtävänä on suojata viruksen perimää ulkoisilta tekijöiltä, kuten niitä hajottavilta nukleaaseilta. Nukleokapsidit sisältävät yleensä suuren määrän kopioita viruksen tuottamista proteiineista. Monimutkaisemman rakenteen omaavilla viruksilla esiintyy vielä kapsidin ulkopuolella lipidivaippa. Lipidivaipassa on upotettuna kalvoproteiineja (Heino & Vuento 2014). Viruksen pinnalla olevien proteiinien tehtävänä on kiinnittyä isäntäsolun pinnassa oleviin reseptoreihin. Tämän jälkeen virus tunkeutuu soluun endosytoosin, fagosytoosin tai kalvofuusion avulla (Salkinoja-Salonen *et al.* 2002).

Niin sanotun Baltimoren luokitteluasteikon mukaan virukset jaetaan seitsemään ryhmään virioneiden sisältämän geneettisen materiaalin mukaan. Alkuperäisessä julkaisussaan *Expression of Animal Virus Genomes* David Baltimore luokitteli virukset kuuteen ryhmään: ryhmä I sisältää kaksijuosteiset DNA-virukset, ryhmä II sisältää yksijuosteiset DNA-virukset, ryhmä III sisältää kaksijuosteiset RNA-virukset, ryhmä IV sisältää yksijuosteiset RNA-virukset, joilla mRNA vastaa virionin RNA:ta (positiivissäikeiset), ryhmä V sisältää yksijuosteiset RNA-virukset, joilla RNA on komplementaarinen mRNA:lle (negatiivissäikeiset) ja ryhmä VI sisältää RNA-tuumorivirukset sekä muut yksijuosteiset RNA-virukset, jotka käyvät läpi DNA-välivaiheen kasvussaan (Baltimore 1971). RNA-tuumoriviruksista käytetään nykyään nimitystä retrovirukset, joihin tunnetuimpana jäsenenä kuuluu HIV (Human immunodeficiency virus). Myöhemmin Baltimoren luokitteluasteikkoon on lisätty vielä seitsemäs ryhmä. Siihen kuuluvat kaksijuosteiset DNA-virukset, jotka käyvät läpi RNA välivaiheen kasvussaan.

Halutessa selvittää infektoivien virusten määrä tulee viruksia sisältävää näytettä laimentaa, yleensä käytetään kymmenkertaisia laimennoksia. Laimennoksilla infektoidaan viruksille herkkiä eläin- tai bakteerisoluja. Viruksilla voidaan myös infektoida koe-eläimiä tai hedelmöitettyjä kananmunia. Virusten määrä alkuperäisessä näytteessä ilmoitetaan infektoivina yksiköinä tilavuusyksikköä kohden. Tarkempi virusmäärä saadaan selville, kun mitataan plakkeja muodostavien yksiköiden määrä. Siinä infektoidut soluviljelmät päällystetään ravintoaineita sisältävällä agarilla. Virukset eivät pääse kulkeutumaan naapurisoluihin kauemmaksi. Solujen infektioiden aiheuttamat kuolemat havaitaan yleensä solujen värjäytymisen muutoksena. Värjäyksen muutoksesta käytetään nimitystä plakki. Joidenkin virusten tapauksissa niiden määrä voidaan selvittää myös hemagglutinaation avulla, sillä ne sitoutuvat punasoluihin aiheuttaen agglutinaation eli punasolujen liimautumista yhteen. Virukset on helppo saada erottua isäntäsoluistaan niiden suuren kokoeron perusteella sentrifugoimalla. Muista pienistä solujen partikkeleista virukset saadaan eroteltua sokeri- tai tiheysgradienttisentrifugoinnin avulla. Tässä vaiheessa käytetään hyväksi kullekin virukselle tyypillistä suurta sedimentaationopeutta. Puhdistuksessa voidaan käyttää myös erilaisia uuttamis- ja saostusmenetelmiä (Salkinoja-Salonen *et al.* 2002).

Virioneissa ja soluissa olevan viruksen DNA:n tai RNA:n määrä on liian pieni käytettäväksi suorissa kemiallisissa tutkimuksissa. Aiemmin virusten tutkimuksessa on käytetty apuna leimattuja radioaktiivisia isotooppeja, joilla saatiin tietoa niiden nukleiinihappojen koosta, synteessin ajoituksesta ja sijainnista soluissa. Nykyään virusten tutkimuksessa käytetään hyväksi geeniteknologian mukanaan tuomia erilaisia sovelluksia, kuten kloonauksen ja RNA:n kääntäminen DNA:ksi käänteiskopioijaentsyymien avulla. Selville saatuja nukleotidi- ja aminohapposekvenssejä käytetään viruksen toiminnan ja rakenteen tutkimisessa sekä selvittämään sukulaisuussuhteita muihin viruksiin. Kaikkien tärkeinä pidettyjen virusten genomit ovat jo selvitetty. Virusten geenien muokkaaminen on myös mahdollista, joten tuotettujen mutaatioiden avulla voidaan ymmärtää paremmin niiden funktioita. Usein tavoitteena on myös onnistua kehittämään patogeenisuudeltaan heikompia kantoja, joita sitten voidaan käyttää rokotteina (Salkinoja-Salonen *et al.* 2002).

Tutkielman tavoitteena oli tutustua virusten infektiomekanismeihin sekä ymmärtää, mitkä tekijät vaikuttavat virusten mutaationopeuksiin. Influenssavirukset ovat hyvin laajasti tutkittuja, mutta silti kaikkia niiden ominaisuuksia vieläköän ei ymmärretä kunnolla. Sen takia halusinkin käyttää sitä

esimerkkiviruksena tutkielmassani. Toiseksi esimerkiksi valitsin ebolaviruksen, jonka aiheuttama äkillinen epidemia lietsoi paljon paniikkia maailmalla. Epidemian aikana onnistuttiin keräämään paljon tietoa viruksesta ja halusinkin nyt koostaa tätä kerättyä tietoa tässä tutkielmassa. Influenssan aiheuttamat oireet ovat yleisesti hyvin tunnettuja, mutta ebolaviruksen aiheuttamista oireista puolestaan tiedetään yleisesti melko vähän. Siksi halusinkin tuoda tutkielmassa esille ebolaviruksen aiheuttamat oireet ja sen, miten ne muuttuvat infektion edetessä sekä kertoa myös tarkemmin tartuntamenetelmistä.

2. Virusten infektiomekanismit

Infektion ensimmäinen vaihe on viruksen kiinnittyminen isäntäsoluun. Kiinnittymisvaihe ratkaisee mahdollisten isäntien kirjon (d'Hrelle & Smith 1926). Virukset jaotellaan kahteen kategoriaan: lipidikaksoiskalvon sisältäviin vaipallisiin ja vaipattomiin, jotka siis eivät sisällä lipidikaksoiskalvoa. Virussuvuista 24:n tiedetään aiheuttavan ihmiselle tauteja tai olevan assosioituneita niiden kanssa. Vaipalliset ja vaipattomat virukset käyttävät hyvin pitkälti samoja menetelmiä ja reittejä soluun tunkeutumisessa. Tunkeutuminen alkaa viruksen kiinnittymisellä isäntäsolun pinnalla oleviin reseptoreihin ja päättyy viruksen genomien siirtämiseen isäntäsolun solulimaan (Dimitrov 2004).

Yleinen virusten tunkeutumista edustava malli on kehitetty tutkimalla influenssaviruksen hemagglutiniinia (HA) ja HIV-1 viruksen kalvoproteiinia. Neljä rakenteeltaan parhaiten tunnettua virusten sukua ovat: *Orthomyxoviridae*, *Retroviridae*, *Paramyxoviridae* ja *Filoviridae*. Useimmat uudet tunnistetut rakenteet sisältävät samankaltaisen trimeerisen hiuspinnirakenteen, joka on kuvattu influenssalle ja HIV-1:lle. Rakenteen samankaltaisuuden perusteella voidaan myös fuusiomekanismien olettaa toimivan hyvin samankaltaisella tavalla. Vaipallisten virusten tiedetään aiheuttavan useita vaikeita sairauksia ihmisissä, esimerkiksi juuri *Filoviridae*-sukuun kuuluva ebolavirus aiheuttaa vakavan muodon verenvuotokuumeesta (Eckert & Kim 2001).

2.1 Soluun tunkeutuminen ja sen tehokkuus

Vaipalliset virukset jakavat keskenään saman infektiomekanismin, jossa virusten vaippaan uppoutuneiden glykoproteiinien tehtävänä on toimia välittäjinä viruksen kalvon fuusiossa isäntäsolun solukalvon kanssa. Tämän jälkeen virioni pääsee vapauttamaan sisältönsä solun sisään (Eckert & Kim 2001). Soluun päästyään monet virukset kuljetetaan soluliman läpi nukleoproteiinikomplekseina. Näissä komplekseissa esiintyvät tuman paikantamissignaalit mahdollistavat viruksen perimän siirtymisen tumaan (Dimitrov 2004). Soluun tunkeutuminen

käynnistyy, kun viruksen vaipan glykoproteiini sitoutuu oikeanlaiseen reseptoriin isäntäsolun pinnalla. Tämän jälkeen osa vaipallisista viruksista fuusioituu suoraan solukalvon kanssa neutraalissa pH:ssa. Osa taas endosytoidaan klatriinilla päällystettyihin kuoppiin, jonka jälkeen ne fuusioituvat endosomaalisen kalvon kanssa pH:n laskiessa. Influenssavirukset käyttävät juuri tätä jälkimmäistä menetelmää (Eckert & Kim 2001). Jollain viruksilla on kyky indusoida endosytoosin toimintaa, esimerkiksi SV-40 virus tehostaa paikallisten aktiinien polymerisaatiota ja dynamiinien väräystä tunkeutumiskohtaan (Pelkmans *et al.* 2002). Soluun tunkeutumisen on myös mahdollista tapahtua suoralla solukalvon läpäisyllä neutraalissa pH:ssa. Vaipattomat virukset läpäisevät solukalvon suoraan tällä menetelmällä. Tämä solukalvon penetraation mekanismi ei ole vielä kuitenkaan tarkkaan tunnettu. Virioneiden täytyy kulkeutua isännän solukalvon läpi kokonaisina tai konformaatioiden muutosten seurauksena siirtää genominsa solukalvon läpi (Dimitrov 2004).

Joidenkin virusten, kuten HIV-1, soluun pääsyä voidaan tehostaa lipidilautoilla (Rawat *et al.* 2003). Esimerkiksi influenssavirukset voivat puolestaan käyttää lipidilauttoja alustana, jossa keskittää suuri määrä virusmolekyylejä virioneiksi. Näin saadaan tarpeeksi virioneita kasaan tehokkaaseen siirtymiseen solusta ulos ja seuraavaan soluun tunkeutumiseen (Takeda *et al.* 2003). Osa viruksista taas kykenee tunkeutumaan soluihin solujen välisten yhteyksien avulla. Ne käyttävät rakenteita, jotka ovat muodostuneet polarisoituneesta sytoskeletonista, adheesiomolekyyleistä ja virusproteiineista infektoituneeseen solujen liittymäkohtaan. Virusproteiineilla infektoitunutta solujen liitoskohtaa kutsutaan virologiseksi synapsiksi. Tämä soluihin tunkeutumistapa ymmärretään vielä kuitenkin varsin huonosti, eikä ole selvää vaatiiko menetelmä kalvojen fuusiota tai läpäisemistä vai suoraa viruksen siirtoa liitoskohtien kautta (Dimitrov 2004).

Virusten soluun tunkeutumisen tehokkuus ja kinetiikka vaihtelevat paljon eri virussukujen, saman suvun ja jopa saman lajin eri kantojen välillä. Soluun tunkeutumisen tehokkuus voi olla yli 50 %, eli vähintään joka toinen virus onnistuu pääsemään isäntäsolun sisälle. Jotkin virionit pystyvät läpäisemään isännän solukalvon alle sekunnissa. Puolestaan esimerkiksi HIV-1 -viruksella soluun tunkeutuminen voi kestää useita minuutteja ja onnistumisen todennäköisyys tähän on usein vain 0,1 %. Viruksen tunkeutumisen kinetiikan ja tehokkuuden arvellaan liittyvän viruksen rakenteeseen. Parhaimmat ominaisuudet tunkeutumisen kannalta havaitaan viruksilla, joilla on matala pH ja litteät rakenteet. Myös isäntäsolun solukalvon rakenne ja koostumus vaikuttavat tunkeutumiseen (Dimitrov 2004).

2.2 Virusten fuusioproteiinien rakenne ja toiminta

Virusten tunkeutumisproteiinit ovat yleensä rakenteeltaan glykolysoituja oligomeerejä. Monilla viruksilla tunkeutumisproteiinit muodostavat heterodimeereja toisten proteiinien kanssa ja näin muodostuu hila-rakenne. Kiinnittymiseen tarvittavat proteiinit eivät ole kuitenkaan vuorovaikutuksessa keskenään kaikilla viruksilla, esimerkiksi retroviruksilla. Monilla vaipattomilla viruksilla niiden koko kapsidi muodostuu keskenään vuorovaikutuksessa olevien proteiinien verkostosta, jotka ovat mukana isäntäsoluun tunkeutumisessa. Virusten tunkeutumisproteiinit ovat jaettu kahteen luokkaan, luokan I ja II tunkeutumisproteiineihin. Kyseinen jaottelu perustuu toimintamekanismiin, tunkeutumisproteiinin mahdolliseen pilkkomiseen ja siihen muodostavatko ne komplekseja muiden virusproteiinien kanssa. Tunkeutumisproteiinien aminohapposekvenssit vaihtelevat paljon, mutta monien selvitettyjen proteiinien kolmiulotteiset rakenteet muistuttavat paljon toisiaan (Dimitrov 2004).

Fuusiossa toimivat glykoproteiinit koostuvat neljästä tärkeästä osasta: 1. katkaistava aminoterminaalinen signaalisekvenssi, joka ohjaa proteiinin endoplasmakalvostolle, 2. laaja viruksen ulkopuolinen osa, 3. stop-transfer alue, joka muodostaa proteiinin virionin vaippaan kiinnittävän transmembraalisen helixin ja 4. sytoplasminen häntä, jonka pituus vaihtelee 20-150 aminohapon välillä riippuen virustyyppistä. Yleensä näistä proteiineista syntetisoidaan ensin esiaste, joka sitten pilkotaan kahteen alayksikköön. Alayksiköt pysyvät läheisesti assosioituneina toistensa kanssa. Vaipan glykoproteiinit pitävät sisällään myös kalvofuusiota ohjaavan, paljon glysiiniä ja hydrofobisia aminohappoja sisältävän fuusiopeptidin. Se on vuorovaikutuksessa isäntäsolun solukalvon kanssa kalvofuusion ensimmäisissä vaiheissa (Eckert & Kim 2001).

Toimiakseen välittäjänä fuusiossa isännän solukalvon kanssa on fuusioproteiinien käytävä läpi sarja konformaatioiden muutoksia. Glykoproteiinien esiasteen pilkkomisen seurauksena kompleksi jää metastabiiliin tilaan valmiina fuusioon, vaikka fuusiopeptidi ei olekaan vielä esillä. Konformaatioiden muutokset tapahtuvat vasteena isännän reseptoriin sitoutumiseen tai seurauksena matalalle pH:lle altistumiseen. Nämä muutokset johtavat fuusiopeptidin paljastumiseen ja mahdollistavat fuusioon johtavan viruksen ja isännän kalvojen vastakkainasettelun (Eckert & Kim 2001). Interaktioissa tapahtuvat konformaatioiden muutokset yhdellä reseptorilla voivat olla vaatimuksena toisen reseptorin sitoutumispaikan paljastamiseen. Virukset vaikuttavatkin laajasti hyödyntävän interaktioita useamman reseptorin kanssa soluun tunkeutuessaan. Joillain viruksilla on käytössään myös vaihtoehtoisia reseptoreita, mikäli niille

spesifinen reseptori puuttuu infektoitavasta solusta. Uusien reseptoreiden tunnistaminen onkin todella tärkeää haluttaessa ymmärtää viruksen patogeenisyyttä ja tunkeutumismekanismeja (Dimitrov 2004).

Virusten fuusion perusmekanismit sisältävät mahdollisesti samanlaisia lipidien uudelleenjärjestelyitä, joita on havaittu lipidikalvojen fuusiomalleissa. Konformaatioiden muutoksissa vapautuvan energian käyttäminen kalvofuusion energiamuurien ylityksessä on huonosti tunnettu prosessi (Dimitrov 2004). Fuusiohuokosten muodostumiseen lipidi-proteiini -komplekseista on esitetty monta erilaista mallia (Blumenthal *et al.* 2003; Chernomordik *et al.* 1997). Huokosten sisäpuolen pinnoitteen tulee olla hydrofiilinen, jotta virusten nukleoproteiinikompleksi saadaan kuljetettua siitä läpi. Fuusiohuokosten muodostamisessa tarvitaan noin 5-6 oligomeeristä viruksen tunkeutumisproteiinia, jotta saadaan muodostettua supramolekyylinen lipidi-proteiini -kompleksi. Tämä prosessi on hyvin dynaaminen ja pienet huokokset voivat avautua ja sulkeutua palautuvasti. Huokosten laajentuminen riittävän suureksi viruksen genomien siirtämiseen on vielä toistaiseksi tuntematon prosessi (Dimitrov 2004).

Useiden vuosikymmenien tutkimustyö on auttanut ymmärtämään influenssaviruksen HA-proteiinin ohjaaman monimutkaisen ja hienostuneen prosessin kalvofuusiassa. HA on ainoa influenssaviruksen kalvofuusion tarvitsema proteiini, joka syntetisoidaan fuusion kykenemättömänä esiasteena (HA0) (Eckert & Kim 2001). HA0:n arvellaan laskostuvan energeettisesti mahdollisimman vakaaseen tilaan jo yksiketjuissa muodossaan (Carr *et al.* 1997). Esiaste pilkotaan kahteen alayksikköön, joista toinen on vaipan pinnalla (HA1) ja toinen transmembraalisena osana (HA2). HA1 pysyy kovalenttisesti assosioituna HA2 kanssa disulfididoksen avulla. Fuusiopeptidi pysyy syvälle HA:n pohjan sisäisellä alueella haudattuna, paljastuen vasta konformaatioiden muutoksen seurauksena. Fuusiopeptidin vapauduttua se ponnahtaa jousimaisella liikkeellä sentraaliseen aminoterminukseen, jolloin se pääsee vuorovaikutukseen isännän solukalvon kanssa (Eckert & Kim 2001).

3. Virusten mutaatiomekanismit ja -nopeudet

3.1 Mutaationopeus

Organismin mutaationopeus määritellään todennäköisyytenä sille, että muutos geneettisessä informaatiossa siirtyy seuraavalle sukupolvelle. Viruksilla yhden sukupolven katsotaan koostuvan yhdestä infektiocyklisestä, jossa virus kiinnittyy ja tunkeutuu isäntäsoluun, ekspresoi geenejään,

replikoituu, uudelleenkapseloituu ja vapauttaa virionit infektoimaan muita soluja. Replikaatiovaiheessa tapahtuvien virheiden lisäksi mutaatioita syntyy myös geneettisen materiaalin editoinnissa ja nukleiinihappojen vahingoittuessa (Sanjun & Domingo-Calap 2016). Korkea mutaationopeus johtaa suurempaan geneettiseen monimuotoisuuteen. Kaikissa tapauksissa mutaationopeutta ei voi kuitenkaan päätellä suoraan mutaatioiden frekvensseistä (Sanjuan *et al.* 2010). Mutaationopeus toimii tärkeimpänä lähteenä geneettiselle variaatiolle (Duffy *et al.* 2008). Siihen liittyvien prosessien selvittäminen onkin tärkeää, jotta voidaan ymmärtää ja hallita virusten vastustuskykyä lääkille, immuunipuolustukselta pakenemista, patogeenisyyttä ja uusien tautien ilmentymistä (Sanjun & Domingo-Calap 2016).

HIV-1 on hyvin nopeasti mutatoituva RNA-virus, sillä se pystyy tuottamaan genomiinsa kaikki mahdolliset yhden emäksen substituutiot potilaassa joka päivä. Tämä tekee HIV:n vastaisten lääkkeiden kehittämisestä todella vaikeaa (Perelson 2002). Myös monet muut nopeasti mutatoituvat virukset aiheuttavat saman ongelman. Tällä hetkellä tehokkain hoitomuoto kroonisia virusten aiheuttamia tauteja vastaan on yhdistelmähoidot (Sanjun & Domingo-Calap 2016).

Nopean mutaationopeuden omaavat virukset onnistuvat välttelemään isännän immuunipuolustusta tehokkaimmin. Immuunipuolustukselta pakoilu tapahtuu akuuteilla viruksilla isäntien populaatioiden tasolla, ei isännän sisällä. Pakoilun etu on riippuvainen virusten kyvystä uudelleeninfektoida isäntiä, jotka ovat onnistuneet kehittämään suojaavan immunitetin tai tunnistavat samat antigeenit (Sanjun & Domingo-Calap 2016). Tunnetuimpana esimerkkinä toimii influenssavirus, jossa tapahtuu jatkuvasti antigeenisiiä muutoksia. Influenssavirusten vastaisten rokotteiden kehittäminen perustuukin tällä hetkellä viruksen konservoituneita, mutta myös samalla riittävän immunogeenisiä proteiini-domeeneja kohtaan (Schotsaert & Garca-Sastre 2014).

Polymeraasivirheet eivät ole ainut mutaationopeuteen vaikuttava tekijä. Viruksen kyky korjata DNA:n väärinpariutuneita nukleotideja oikoluennalla sekä replikaation jälkeinen korjaus vaikuttavat myös mutaationopeuteen. Mutaatioita voivat aiheuttaa myös isäntäsolun entsyymit ja nukleiinihappojen spontaani vahingoittuminen. Joidenkin virusten genomeista löytyy myös erityinen genominen elementti, jonka funktiona on tuottaa uusia mutaatioita. Mutaatioiden nopeutta säädellään myös muilla tekijöillä, kuten replikaatiossa polymeraasin lisäksi mukana olevien muiden proteiinien avulla, replikaation moodia säätämällä (kappale 3.3) sekä templaatin ja sen rakenteen avulla (Sanjun & Domingo-Calap 2016).

3.2 Virusten väliset erot mutaationopeuksissa

Eri virusryhmien välillä esiintyy kaikista biologisista systeemeistä laajimmat erot mutaationopeuksissa. Suurimmat erot löytyvät DNA ja RNA-virusten väliltä (Sanjuan *et al.* 2010). Virusten mutaationopeudet vaihtelevat välillä 10^{-8} ja 10^{-4} substituutiota per nukleotidi per solun infektointi. DNA-virukset sijoittuvat välille 10^{-8} ja 10^{-6} ja RNA-virukset välille 10^{-6} ja 10^{-4} . Näiden ryhmien väliset erot perustuvat useaan mekaaniseen seikkaan (Sanjun & Domingo-Calap 2016). Suurella osalla RNA-viruksista ei ole 3'-päässä eksonukleaasioikolukua, mikä johtaa suurempaan virheiden määrään replikaatiossa (Steinhauer *et al.* 1992). Joidenkin DNA virusten on kuitenkin havaittu mutatoituvan lähes RNA-viruksia vastaavilla nopeuksilla. Koiran parvovirus on kehittynyt kissaeläinten panleukopeniaviruksista. Näitä kahta virusta erottavalle haaralle on saatu mutaationopeudeksi arvioita välillä $7,1 \times 10^{-3}$ ja $0,7 \times 10^{-3}$ substituutiota per nukleotidi per vuosi. Se vastaa jopa HIV-1 viruksen mutaationopeutta (Shackelton *et al.* 2005). Myöskin monien DNA-virusten mutaationopeus on vielä tuntematon, joten ne voivat olla suurempia kuin on osattu olettaa (Sanjun & Domingo-Calap 2016).

Kaksoisjuosteisilla DNA-viruksilla on taipumus mutatoitua hitaammin kuin yksijuosteisilla DNA-viruksilla. Havaittu ero kuitenkin perustuu vain bakteriofageilla tehtyihin tutkimuksiin, sillä eukaryoottien yksijuosteisille DNA-viruksille ei ole onnistuttu arvioimaan mutaationopeutta (Sanjuan *et al.* 2010). RNA-virusten välillä ei ole havaittu merkittäviä eroja mutaationopeuksissa Baltimoren luokkien välillä. Yksijuosteisten virusten on havaittu olevan alttiimpia oksidatiiviselle deaminaatiolle ja muille kemiallisille vahingoille kuin kaksijuosteisten virusten. Tämän lisäksi eroa näiden ryhmien välillä voidaan myös selittää replikaation jälkeisen korjauksen saatavuudella. Reaktiivisten happilajien ja muiden solullisten metaboliittien lisääntyneet määrät virusinfektoiden aikana voivat indusoida mutaatioita viruksissa ja isäntäsoluissa (Sanjun & Domingo-Calap 2016).

Eukaryoottien viruksilla replikaation jälkeisten korjausten ja mutaationopeuden välinen suhde on vielä epäselvä. Virusten on kuitenkin monissa tutkimuksissa osoitettu olevan vuorovaikutuksessa isännän DDR (DNA damage repair) -väylien kanssa. DDR:ää provosoivia rakenteita viruksissa ovat lineaariset kaksijuosteiset (ds)DNA-molekyylit, kaksijuosteisen hiuspinniterminaalin sisältävät yksijuosteiset (ss)DNA-molekyylit, sirkulaariset dsDNA-molekyylit ja RNA-genomit jotka käänteiskopioidaan dsDNA:ksi. Virukset muuttavat lokalisaatiota ja edistävät DDR:n komponenttien rappeutumista. Jotkin virusproteiinit pystyvät ajamaan solun solusyklin S-vaiheeseen. (Luftig 2014; Weitzman *et al.* 2010). DDR:n aktivoituminen voi tapahtua myöskin

epäsuorana vasteena viruksen infektion aiheuttamalle stressille tai osana virusten vastaisia toimenpiteitä. DNA-virusten tiedetään edistävän genomista epävakautta isäntäsolussa. Ei ole kuitenkaan vielä onnistuttu osoittamaan, vaikuttaako DDR:n mekanismien lamauttaminen mutaationopeuksiin DNA-viruksilla (Sanjun & Domingo-Calap 2016).

Mutaationopeus on kääntäen verrannollinen genomien kokoon DNA-viruksilla. Genomikohtainen mutaationopeus pysyy melko vakiona noin 0,003 substituutiota per kopiointikierron (Drake 1991). Myös RNA-viruksilla on havaittu samantyyppistä käänteistä verrannollisuutta genomien koon ja mutaationopeuden välillä, tosin sen havaitseminen on vaikeaa johtuen RNA-virusten genomien kokojen välisestä pienemmästä vaihtelusta (Sanjun & Domingo-Calap 2016). Koronavirukset tukevat myös tätä korrelaatiota, sillä niillä on kaikista RNA-viruksista suurimmat genomit 30-33 kb ja niille on kehittynyt evoluution seurauksena oikolukuominaisuus. Oikolukuominaisuutta ei ole löydetty yhdeltäkään muulta RNA-virusten suvulta (Smith *et al.* 2014). Bakteriofagi QB:lla puolestaan on nopeimpia riboviruksille havaittuja mutaationopeuksia ja samalla sen genomi on yksi pienimmistä RNA-viruksilla. Eli sekin tukee väitettä korrelaatiosta genomien koon ja mutaationopeuden välillä (Bradwell *et al.* 2013). Syytä tälle negatiivisen korrelaation aiheuttavalle ilmiölle ei tiedetä. Eri RNA-virusten polymeraasien välillä ei ole havaittu olennaisia eroja replikaation tarkkuudessa. Korkeamman mutaationopeuden estimaatin omaavat DNA-virukset ovat myös yksijuosteisia. Tarvittaisiinkin arvioita pienistä kaksijuosteisista DNA-viruksista, jotta tiedettäisiin kumpi näistä ominaisuuksista todellisuudessa vaikuttaa enemmän mutaationopeuteen. DNA-virukset, jotka ovat monimuotoisimpia ja nopeiten evolvoituvia, ovat myös genomien kooltaan pieniä. Tämä tukee epäsuorasti väitettä genomien koon vaikutuksesta mutaationopeuteen (Sanjun 2012).

3.3 Mutaatiomekanismeja

DNA-viruksilla replikaation jälkeinen korjaus on tärkeässä roolissa mutaationopeuden kannalta. RNA-viruksilla siihen puolestaan vaikuttavat muut isännän koodaamat tekijät. APOBEC-entsyymit (Apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide-like) kuuluvat perhe sytidiinideaminaasien proteiiniperheeseen. Ne toimivat solujen luontaisena puolustusmenetelmänä retroviruksia vastaan. Näiden entsyymien perhe on laajentunut selkärankaisten evoluution myötä ja koostuu nykyään jopa 11 erilaisesta APOBEC:sta (Harris & Dudley 2015). APOBEC3G:n on havaittu muuttavan massiivisen määrän sytosiineja urasiileiksi HIV-1:n komplementaarisessa DNA:ssa käänteisen transkription aikana tai sen jälkeen (Harris *et al.* 2003). Virusten Vif-proteiini vastustaa

APOBEC-entsyymien toimintaa. Vif sitoutuu APOBEC-entsyymeihin ja edistää sen pilkkomista proteasomien toimesta (Desimmi *et al.* 2014). Ihmisen genomista on löydetty seitsemän APOBEC3-paralogia, joiden on todistettu muokkaavan retroelementtejä ja muita viruksia, kuten papilloomavirusta (Sanjun & Domingo-Calap 2016; Vartanian *et al.* 2008).

APOBEG3G:n DNA:n muokkauksen niin sanotut kuumat alueet on tunnistettu ja ne ovat riippuvaisia sekvenssin kontekstista ja DNA:n sekundaarisesta rakenteesta (Holtz *et al.* 2013). Komplementaarisen DNA-juosteen muokkaus HIV-1-viruksella tuottaa GG->AA ja GA->AA mutaatioita sen genomisessa RNA:ssa. Noin 98 prosenttia HIV-1:ssä tapahtuvista mutaatioista ovat APOBEC-entsyymien tuottamia ja se kohottaa HIV-1-viruksen mutaationopeuden 40-kertaa suuremmaksi kuin käänteiskopioijaentsyymien tekemien virheiden määrä. HIV-1 onkin tutkituista viruksista kaikkein nopeiten mutatoituva (Cuevas *et al.* 2015). Hypermutaatio johtaa kuitenkin monessa tapauksessa infektiokyvyn heikkenemiseen. APOBEC -entsyymien rooli virusten monimuotoisuudessa ja evoluutiossa, immuunipuolustukselta pakoilulta ja lääkkeidenvastustuskyvyssä on vielä osittain kyseenalainen. Niiden tiedetään kuitenkin pystyvän tuottamaan myös maltillisemmin mutatoituneita elinkelpoisia viruksia (Monajemi *et al.* 2014; Sadler *et al.* 2010; Fourati *et al.* 2012).

ADAR-entsyymit (Double-strand RNA-dependent adenosine deaminases) editoivat virusten genomeja deaminoimalla adenosineja ja samalla kääntäen ne inosiineiksi pitkissä kaksijuosteisissa RNA-ketjuissa. Inosiini emäspariutuu guanosiinin kanssa, josta seuraa A->G substituutioita (Tomaselli *et al.* 2013). ADAR-entsyymien aikaansaama hypermutaatio todistettiin ensimmäisenä tuhkarokkoviruksella (Cattaneo *et al.* 1988). Virusten mutaationopeuteen vaikuttavia solujen tuottamia proteiineja on muitakin. UNG-proteiinit (uracil DNA glycosylases) tunnistavat ja poistavat urasiilit DNA:sta, jotta voidaan välttää niiden mutatoivia vaikutuksia DNA:lle. HIV-1 viruksen Vpr -proteiini on vuorovaikutuksessa UNG:n kanssa ja toimii välittäjänä sen liittämässä HIV-1:n virioneihin. UNG:n epäonnistunut liittäminen virioneihin kasvattaa HIV-1:n mutaationopeuden nelinkertaiseksi aktiivisesti jakautuvissa soluissa ja 18-kertaiseksi makrofageissa (Chen *et al.* 2004; Mansky *et al.* 2000). Myöskin nukleotidien välinen tasapaino ja konsentraatiot eri solutyypin välillä voivat vaikuttaa virusten mutaationopeuksiin (Diamond *et al.* 2004).

Virukset voivat adaptoitua käyttämään monia erilaisia replikaatiomoodeja. Niin sanotussa "leimauslaite" -replikaatiomallissa käytetään yhtä mallijuostetta tuottamaan kaikki

jälkeläisjuosteet infektoituneissa soluissa. Tämän mallin mukaan on vain yksi kopiointikierrös per solu. Jokaista infektoivaa genomia käytetään siis syntetisoimaan yksi vastakkain-komplementaarinen välittäjä. Välittäjää käytetään mallina kaikkien jälkeläisgenomien syntetisoinnissa. Semi-konservatiivisessa replikaatiomallissa jokainen juoste kopioidaan kerran. Näin tuotettuja jälkeläismolekyylejä käytetään templaatteina seuraavalla kopiointikierröksellä. Juosteiden määrä kaksinkertaistuu jokaisessa syklistä (Sanjun & Domingo-Calap 2016).

Viruksen täytyy suorittaa useita replikaatiosyklejä, jotta se saa tuotettua tarpeeksi jälkeläisiä. Havaittujen mutaatioiden frekvenssi "leimauslaite"-mallissa vastaa suoraan mutaationopeutta. Semi-konservatiivisessa mallissa frekvenssi on riippuvainen myös syklien määrästä, koska mutanttien määrä kasvaa syklien myötä. Virusten polymeerasi tuottaakin enemmän mutaatioita jokaista solua kohden semi-konservatiivisella replikaatiolla. Leimauslaite ja semi-konservatiivinen replikaatio edustavat toistensa vastakohtia, eivätkä ole ainoita virusten käyttämiä replikaatiomoodeja. Yhden kopiointikierröksen aikana virukset voivat tuottaa useita jälkeläismolekyylejä. Jälkeläiset voivat suorittaa vielä toisen replikaatiosyklin solussa ja näin jälkeläismolekyylejä saadaan tuotettua useita satoja tai jopa tuhansia (Sanjun & Domingo-Calap 2016). Leimauslaite-mallin on ehdotettu olevan valinnan suosimaa RNA-viruksilla, koska se kompensoi niiden virheherkkien polymeerasien toimintaa (Sardany *et al.* 2009; Sardany & Elena 2011; Thébaud *et al.* 2010). Se pystyvätkö virukset muokkaamaan replikaatiomoodejaan vasteena valintapaineille mutaationopeuden suhteen, on vielä tuntematonta (Sanjun & Domingo-Calap 2016).

Myös infektoituneiden solujen hajoamisaikaa pidetään virusten mutaationopeutta säätelevänä tekijänä. Solujen hajoamisprosessia säädellään tarkasti. Virusten kelpoisuus maksimoituu, kun hajoamisaika pysyy sopivalla välillä (Heineman & Bull 2007). Liian aikainen hajoaminen johtaa pienempään määrään uusia virioneita. Hajoamisen tapahtuessa optimaalisen ajankohdan jälkeen kasvaa syntyvien virioneiden määrä niin suureksi, että solusta soluun tapahtuva siirtyminen viivästyy. Bakteriofagi X174 -virus replikoituu leimauslaitemallin mukaisesti. Jokaisen infektiotyklin tulisi siis koostua vain yhdestä kopiointikierröksestä riippumatta solun hajoamisajasta. Viivästyneen hajoamisajan omaavissa kannoissa populaation kasvu vaati pienemmän määrän kopiointikierröksiä kuin vastaavalla villityypillä. Eli mutaatioilla on vähemmän mahdollisuuksia kasaantua, tarkoittaen viivästyneen hajoamisen kasvattavan faagin kykyä sietää mutageneesiä (Sanjun & Domingo-Calap 2016).

4. Influenssavirus

Influenssa on merkittävin ihmisten infektio tauti, johon pelkästään Yhdysvalloissa kuolee yli 36 000 ihmistä vuosittain (Thompson *et al.* 2003). Satunnaiset maailmanlaajuiset pandemiat voivat infektoida 20-40 % maailman väestöstä vuoden aikana (Fanning 2001). Vuosien 1918-1919 aikana jyllännyt pandemia tappoi arviolta jopa 20-50 miljoonaa ihmistä (Johnson & Mueller 2002). Influenssavirusten aiheuttama uhka on hyvin tiedossa, joten niiden evolutiivisen dynamiikan ymmärtäminen on todella tärkeää (Nelson & Holmes 2007).

Muutamia kertoja vuosisadassa jokin uusi influenssavirus A kanta onnistuu levittäytymään reservi-isännistään ihmiseen. Näin muodostuu uusia dominoivia linjoja. Muodostuneet uudet epidemioita aiheuttavat kannat voivat kiertää vanhojen kantojen kanssa tai jopa korvata ne kokonaan. Eläimistä ihmisiin siirtyneet kannat ovat myös poikkeuksetta aina patogeenisempiä kuin kausittaiset kannat ilmaantuessaan. Kausittaisilla kannoilla tarkoitetaan tiettyyn vuodenaikaan keskittyvää infektiohuippua, joka on yleensä talvella. Pandemioita aiheuttavat uudet kannat adaptoituvat ajan myötä ja alkavat hitaasti muistuttamaan kausittaisia kantoja (McCullers 2016).

Influenssavirukset ovat negatiivissäikeisiä yksijuosteisia RNA-virusia ja ne kuuluvat kausittaisia epidemioita ihmisissä, muissa nisäkkäissä ja linnuissa aiheuttavien *Orthomyxoviridae* -suvun viruksiin. Influenssaviruksesta esiintyy kolme fylogeneettisesti ja antigeneettisesti toisistaan eroavaa kantaa: A, B ja C. Nämä kaikki kolme kantaa kiertelevät globaalisti ihmispopulaatioissa (Nelson & Holmes 2007). Influenssavirus B ja C ovat eronneet aikanaan evoluution myötä tyyppin A viruksista. Ne ovat vakaasti adaptoituneet elämään ihmisissä. Tyyppin A influenssavirukset ovat zoonoottisia ja niitä siirtyy jatkuvasti eläimistä ihmisiin. Yleensä ne kuitenkin aiheuttavat vain yksittäisiä infektioita ja joskus rajoittuneita epidemioita (Greenbaum *et al.* 2015). Kanta A on geneettisesti monimuotoisin, pystyy infektoimaan laajimman joukon erilaisia isäntälajeja ja aiheuttaa myös suurimman osan vakavista sairauksista ihmisillä (Nelson & Holmes 2007). Influenssa A pystyy kukoistamaan jopa populaatioissa, joissa rokotteet sitä vastaan ovat laajassa käytössä (Ghedini *et al.* 2005).

4.1 Influenssa A

Influenssavirus A:n genomi koostuu kahdeksasta segmentistä (yhteensä 13kb), joita voidaan vaihdella reassortatio-nimisen prosessin avulla (Webster *et al.* 1992). Reassortaatiossa muodostuu uusi viruksen alatyyppe, kun kahden eri viruskannan hemagglutiniini (HA) ja neuraminidaasi (NA) muodostavat uuden kombinaation. Segmenttien koko vaihtelee välillä 890-2341 nukleotidia (Nelson & Holmes 2007). Genomin kahdeksan segmenttiä voidaan jaotella fylogeneettisesti useaan eri sukulinjaan. Eri virusten välillä tapahtuvien segmenttien reassortatioiden avulla voidaan muodostaa todella laaja määrä uniikkeja kombinaatioita (McCullers 2016).

Segmentit koodaavat yleensä yhteensä 11 proteiinia (Ghedini *et al.* 2005). Näistä proteiineista kahdeksan on rakenteellisia ja kaksi ei-rakenteellista. Lisäksi voi esiintyä vaihteleva määrä apuproteiineja, jotka ovat erilaisissa vuorovaikutuksissa muiden proteiinien kanssa. Apuproteiineja voidaan koodata vaihtoehtoisten lukukehysten avulla sekä erilaisten lukukehysten säilyttävien aloituskodonien avulla. Joitain geenisegmenttejä voidaan terminoida myös normaalia aikaisemmin niiden syntetisoinnissa (McCullers 2016).

Tyyppin A viruksilla reservinä toimivat useat villit vesilintulajit. Ne toimivat ”turvapaikkana” usealle antigeneettisesti erilaiselle alatyypille, jotka kantavat kahta tärkeintä viruksen antigeeniä hemagglutiniinia (HA) ja neuraminidaasia (NA) (Webster *et al.* 1992) Influenssa A virukset jaotellaan alaryhmiin näiden kahden glykoproteiinin HA ja NA mukaan. Tähän asti on tunnistettu 18 erilaista HA proteiinin alatyyppeä ja 10 NA proteiinin alatyyppeä (McCullers 2016).

Hemagglutiniini on influenssavirus A:n primaarinen kiinnittymisproteiini, joka sitoutuu isäntäsolun pinnalla oleviin sialihappoa sisältäviin reseptoreihin. Tähän reseptoriin sitoutuminen mahdollistaa soluun pääsyn endosytoosilla. HA:n ohjaama vaipan kalvofuusio endosomiin käynnistyy, kun Matrix protein 2 (M2) muuttaa virionin sisäpuolen happamaksi. Näin viruksen RNA ja RNA-polymeraasikomplekseja muodostavat proteiinit pääsevät isäntäsolun sisäpuolelle (McCullers 2016). Neuraminidaasin tehtävänä on täydentää HA:n toimintaa. Se helpottaa kuroutumista katkaisemalla sialihappoja ja häiritsemällä sialihapon sitoutumista hemagglutiniiniin. Viruksen HA:n sitoutumisen affiniteetin ja NA:n aktiivisuuden välisen tasapainon tulee olla kunnossa, sillä liian korkea neuraminidaasin määrä vaikeuttaa viruksen sitoutumista ja solun infektointia. Liian vähäinen NA:n määrä puolestaan johtaa vaikeuksiin kuroutumisessa (Ward *et al.* 2013).

Influenssa A viruksen evoluution kannalta on tärkeää ymmärtää luonnonvalinnan, fylogenen ja epidemiologian välisiä monimutkaisia vuorovaikutuksia (Nelson & Holmes 2007). Luonnonvalinta suosii HA- ja NA-proteiinien aminohappovariantteja, jotka mahdollistavat viruksen kyvyn pakoilla immuunipuolustukselta, infektoida suuremman määrän isäntiä ja lisääntyä. Tämä johtuu siitä, ettei ihmisen immuunivaste virusinfektioita vastaan ole täysin ristiinsuojaava. Se ei siis tunnista enää virusta samaksi pienten muutosten jälkeen (Fitch *et al.* 1997). Antigeenien jatkuvaa rakenteellista muutosta ajan myötä kutsutaan antigeneettiseksi ajautumiseksi (Webster *et al.* 1982). Immuunipuolustuksen ajamaa luonnonvalintaa voi tapahtua sekä HA-että NA-proteiinien antigeenisissä paikoissa. HA-proteiinin HA1-domeeni sisältää suurimman konsentraation epitooppeja ja kokee myös voimakkaimman positiivisen valintapaineen (Fitch *et al.* 1997).

Äkillinen antigeneettinen muutos viruksen perimässä voi johtaa vakavaan influenssaepidemiaan. Reassortaatitapahtuman seurauksena muodostuu uusia HA- ja NA-proteiinien antigeenien kombinaatioita, joille populaatio on immunologisesti vastustuskyvytön. Influenssaviruksen segmentoitunut genomi tuottaa reassortatioita isolaattien välillä, jotka infektoivat samaa isäntäsolua yhtä aikaa. HA- ja NA-alatyypin välillä tapahtunut reassortatio oli keskeistä vuosien 1957 ja 1968 pandemioissa (Nelson & Holmes 2007). Reassortation evolutiivinen merkitys uusiutuvien epidemioiden kohdalla on epävarmaa. Näitä tapahtumia voidaan havaita fylogeneettisissä puissa samasta isolaatista olevien eri segmenttien sekvenssien hajanaisena levittäytymisenä (Nelson *et al.* 2006).

4.2 Evoluution nopeus

Erilaisten metodien takia kirjallisuudessa influenssavirukselle esitetyt evoluutionopeudet ovat toisistaan eroavia (Nelson & Holmes 2007). Suurin vaihtelua aiheuttava tekijä influenssaviruksen substituutionopeuksissa vaikuttaisi olevan isännän immuunipuolustuksesta aiheutuvan valintapaineen voimakkuus. RNA-viruksilla taustamutaatioiden määrät ovat hyvin identtisiä keskenään, noin yksi mutaatio jokaista genomien replikaatiota kohden (Drake & Holland 1999). Pidemmällä aikavälillä mutaationopeus pysyttelee välillä 10^{-3} ja 10^{-4} substituutiota per nukleotidi per genomi (Jenkins *et al.* 2002; Hanada *et al.* 2004). Niin sanotusti vanhemmat influenssavirus A kannat mutatoituvat hitaammin isäntälintulajeissaan, koska ne ovat adaptoituneet elämään niissä. Uudemmat viruskannat puolestaan mutatoituvat nopeammin ihmisissä ja siipikarjassa, jotta ne saavat pakoiltua isännän immuunipuolustusta ja saavuttaisivat nopeamman transmissioajan (Nelson & Holmes 2007).

4.3 Influenssan kausiluontoisuus

Influenssavirusten kausittainen talveen kohdistuva infektiokuippu on parhaita esimerkkejä infektioautien kausiluonteesta. Puolen vuoden välein tapahtuvan influenssaviruksen aiheuttaman infektiokuipun syyt eivät ole tiedossa. Puhkeaminen tapahtuu sekä pohjoisen että eteläisen pallonpuoliskon lauhkeilla alueilla samanaikaisesti (Nelson & Holmes 2007). Ilmiötä selittäviä teorioita on esitetty lukuisia, muun muassa transmissioiden määrän kasvu kouluvuoden alkaessa, isäntien kylmän seurauksena alentunut immuunipuolustus ja viruksen stabiilimpi rakenne kylmemmissä olosuhteissa (Dowell 2001).

Vielä nykyäänkin käytetään yli 50 vuotta vanhoja tutkimuksia todisteena influenssaviruksen olevan stabiilein kylmissä olosuhteissa (Hemmes *et al.* 1960). Kylmän ja viruksen stabiiliuden välistä korrelaatiota on kuitenkin horjutettu myöhemmässä tutkimuksessa, jossa hiiren herkkyyden havaittiin kasvavan talvella lämpötilan ja kosteuden pysyessä vakaana (Schulman & Kilbourne 1963). Tropiikissa viime aikoina tehdyissä tutkimuksissa on havaittu taudin olevan merkittävä taakka alueilla, jotka ovat ilmastoltaan hyvin kosteita ja lämpimiä (Chiu *et al.* 2002; Wong *et al.* 2006). Viruksen kausiluonteisuutta ei siis voida selittää viileämmällä lämpötilalla (Nelson & Holmes 2007). Muuttuvien transmissionopeuksien taustalla on esitetty olevan ihmisten käyttäytymisen muutokset talvella, sillä aikaa vietetään enemmän sisätiloissa ja kouluissa. Immuunipuolustuksen muutos ja isännän herkkyys ovat dokumentoituja muutoksia ilmaston kausittaiseen vaihteluun (Shephard & Shek 1998; Nelson *et al.* 2002).

5. Ebolavirus

Ebolavirus (*Zaire ebolavirus*) on negatiivissäikeinen yksijuosteinen RNA-virus, jonka genomin koko on 19 kb. Genomi sisältää seitsemän avointa lukukehystä, jotka koodaavat rakenteellisia proteiineja: vaipan glykoproteiini (GP), nukleoproteiini (NP), matriksiproteiinit VP40 ja VP24 ja ei-rakenteellisia proteiineja VP35 ja VP30 sekä viruksen omaa polymeeraasia (Sullivan *et al.* 2003). Virus kehittää nopeasti mutaatioita virhealttiin replikaation seurauksena, kuten on tyyppillistä muillekin RNA-viruksille. Ebolavirus kuulu ebolavirusten sukuun, jossa sen lisäksi Sudanin virus (SUDV), Taï Forest-virus (TAFV) ja Bundibugyo-virus (BDBV) aiheuttavat vakavan sairauden ihmisissä ja muissa kädellisissä. Kaikki ebolavirukset kuuluvat *Filoviridae*-heimoon, johon kuuluu myös muun muassa hengenvaarallista verenvuotokuumetta aiheuttava Marburgin virus (Holmes *et al.* 2016). Lepakoiden arvellaan olevan pääsääntöinen reservi ebolavirukselle (Leroy *et al.* 2005).

Ebolaviruksen aiheuttamia infektoita on havaittu kuitenkin melko pienellä määrällä nisäkäslajeja. Tiedossa ei ole pystyykö virus infektoimaan laajemminkin eri eläinlajeja. Mahdollista laajempaa isäntien määrää virukselle puoltaa kuitenkin se, että muita *Filoviridae*-heimoon kuuluvia viruksia on löydetty laajalti eri nisäkkäiden genomeista (Leroy *et al.* 2005; Taylor *et al.* 2014).

Ensimmäisen kerran ebolavirus on havaittu ihmisessä Zairessa (nykyään Kongon demokraattinen tasavalta) vuonna 1976. Kahden kuukauden aikana havaittiin 318 tapausta, joista noin 88 % johti kuolemaan (Report of a WHO/International Study Team 1978). Yhtään EVD:n (Ebola virus disease) puhkeamista ei havaittu vuosien 1979-1994 välisenä aikana. Vuoden 1994 jälkeen kuitenkin havaittiin useita puhkeamisia, joka johtivat kahden uuden lajin löytämiseen: BDBV ja TAFV (Muyembe-Tamfum *et al.* 2012). Puhkeamisten määrän äkilliselle kasvulle on esitetty lukuisia eri syitä, mutta todennäköisimpinä syinä pidetään ihmisten siirtymistä uusille vaikeapääsuisille alueille ja villieläimistä saadun lihan syömistä (Feldmann & Geisbert 2011; Muyembe-Tamfum *et al.* 2012). Puhkeamisissa esiintynyt CRF (case fatality rate) on vaihdellut välillä 45-90 % (Prescott *et al.* 2017).

5.1 Ebolavirusinfektion oireet ja tartuntamenetelmät

EVD:n oireet ilmaantuvat yleensä 4-10 päivän inkubaatioajan jälkeen, mutta se voi olla lyhyimmillään vain kaksi päivää tai pisimmillään jopa 21 päivää (Kortepeter *et al.* 2011; Jeffs 2006). Ensimmäisinä oireina ilmaantuu flunssaa muistuttavia oireita: kylmän tunnen, kuumeilu ja lihaskipu sekä myös oksentelua ja ripulointia. Tauti voi edetä nopeasti vaiheeseen, jossa potilaan tila alkaa heiketä äkillisesti. Tälle vaiheelle tyypillistä on verenvuodon aiheuttamat komplikaatiot ja usean elimen toiminnan pysähtyminen (Kortepeter *et al.* 2011; Hartman *et al.* 2010). Potilailla voi esiintyä myös ruuansulatuskanavaan liittyviä ongelmia (oksentelu, ripuli ja vatsakipu), neurologisia oireita (päänsärky, kooma) sekä hengitystiehen liittyviä oireita (yskä, hengenahdistus ja tukkoisuus). Verenkiertoelimistön pettäessä esiintyy myös shokkia ja ödeemaa, josta yleensä seuraa potilaan kuolema (Feldmann & Geisbert 2011; Jeffs 2006; Hartman *et al.* 2010). EVD:hen ei ole olemassa tunnettua hoitokeinoa, eikä shokkiin johtavista mekanismeista ole paljoakaan tietoa. Epidemiat ovat myös tapahtuneet maailmaan köyhimpiin kuuluvissa maissa, joissa terveydenhuollon resurssit ovat hyvin rajalliset. Lisäksi tilannetta vaikeuttaa se, että kaikki virukseen liittyvät testit tulee suorittaa tason neljä bioturvallisuuden omaavissa laboratorioissa (Murray 2015).

Virus tunkeutuu elimistöön limakalvojen, hankaumien ja haavojen kautta. Myöskään infektiota ehjän ihon kautta ei voida täysin poissulkea. Virus voi siirtyä myös äidiltä sikiölle istukan

välityksellä (Goeijenbier *et al.* 2014). EVD:n onkin havaittu aiheuttavan korkean kuolleisuuden sekä äidille että sikiölle. Useimmissa tapauksissa raskaus päättyy ennenaikaiseen keskenmenoon tai sikiön kohtukuolemaan (Caluwaerts *et al.* 2015; Mupapa *et al.* 1999). Tunkeutumisreitit on havaittu myös vaikuttavan taudin lopputulemaan, sillä 1976 epidemiassa injektioista seurannut kuolleisuus oli 100 % ja kontaktista seurannut kuolleisuus 80 % (Feldmann & Geisbert 2011). Tämä on onnistuttu todistamaan myös muilla kädellisillä tehtyjen kokeiden avulla, jossa injektion saaneilla eläimillä tauti eteni nopeammin kuin niillä, jotka saivat viruksen aerosolivälitteisesti (Geisbert *et al.* 2008). EVD:n patogeneisuutta on tutkittu melko laajasti viimeisen 15 vuoden aikana, johtuen sen suuresta CFR:stä ja mahdollisuudesta toimia biologisena aseena (Leroy *et al.* 2011). Ebolaviruksen genomista dataa tutkittaessa on pitävästi todistettu, että sukupuoliyhteyden seurauksena tapahtuva viruksen leviäminen on paljon merkittävämmässä roolissa kuin aiemmin on osattu arvioida. Ebolaviruksen RNA:ta on löydetty toipuvien potilaiden vaginallisista eritteistä jopa 33 vuorokautta sairastumisen jälkeen ja siemennesteestä jopa 101 vuorokautta sairastumisen jälkeen (Mate *et al.* 2015). Tämän leviämistavan vaikutukset epidemiaan ja viruksen evoluutioon pidemmällä aikavälillä ovat vielä hyvin epäselviä (Holmes *et al.* 2016).

5.2 Länsi-Afrikan vuosien 2013-2016 EVD epidemia

Länsi-Afrikassa vuosina 2013-2016 jyllännyt Ebola virus disease (EVD) epidemia näyttää saaneen alkuunsa eläimen (todennäköisesti lepakko) ja ihmisen välisestä kontaktista joulukuussa 2013 Meliandoun kylässä Guineassa. Taudin puhkeamista ei havaittu moneen kuukauteen ja se onnistui leviämään tehokkaasti ihmisestä ihmiseen. Muista eläimistä ihmiseen tapahtuneista siirtymistä ei ole löydetty todisteita. Ebolaviruksen varmistuttua taudin aiheuttajaksi maaliskuussa 2014, oli se ehtinyt jo levitä useaan kylään ja kaupunkiin (Baize *et al.* 2014). Maailman terveysjärjestö julisti EVD:n kansainväliseksi uhaksi julkiselle terveydelle elokuussa 2014 (WHO 2014). Tähän mennessä virus oli kuitenkin ehtinyt jo levitä Guineasta Sierra Leoneen, Nigeriaan ja Liberiaan ja tapauksia oli tiedossa jo yli tuhat. Seuranneessa epidemiassa oli yhteensä 28 646 varmistettua ja epäiltyä tapausta, joista 11 323 johti kuolemaan (WHO 2016). 2013-2016 epidemia oli ensimmäinen kerta, kun ebolavirus puhkesi Länsi-Afrikassa ja levittäytyi Afrikan ulkopuolelle (Holmes *et al.* 2016). Tästä ebolakannasta on alettu käyttää nimitystä Makona ja se vaikuttaisi käyttäytyvän samalla tavalla kuin aikaisemmin puhjenneet ebolaviruskannat (Schieffelin *et al.* 2014).

Kehittyneet uuden sukupolven sekvensointimenetelmät mahdollistivat nopean ja syvällisen viruksen genomien tarkkailun 2013-2016 EVD-epidemiassa (Holmes *et al.* 2016). Viruksen

genomista saatiin kerättyä NGS-menetelmillä (Oxford Nanopore MinION ja Thermo Fisher Ion Torrent) dataa suoraan potilaista otettujen näytteiden avulla, jopa tuntien tai päivien kuluttua näytteenotosta (Arias *et al.* 2016; Quick *et al.* 2016). Näiden menetelmien ansiosta on mahdollista kerätä laaja aineisto sekvenssidataa, joka puolestaan mahdollistaa viruksen siirtymäketjujen tarkemman selvittämisen ja parempien vastatoimenpiteiden käyttämisen vasteena puhkeamiselle (Woolhouse *et al.* 2015). Yli 1500 kokonaista ebola-Makonon genomia saatiin sekvensoitua, mikä vastaa noin 5 % kaikista sairastuneista (Holmes *et al.* 2016).

5.3 Epidemian aikana kerätyn materiaalin pohjalta tehdyt havainnot

Edellisten EVD puhkeamisten lyhyen keston ja pienen tartuntojen määrän takia niistä hankittujen näytteiden määrä on jäänyt todella suppeaksi. Näistä aiemmista tapauksista hankittu data koostuu lähinnä yksittäisistä sukulinjoista. Kerätyn tiedon perusteella ebolavirusten genomien oletettiin pysyvän melko vakaana puhkeamisen aikana (Holmes *et al.* 2016). Vuosien 2013-2016 aikana jyllänneen ebola-Makonon laajempi levinneisyys ja epidemian pidempi kesto johtivat useamman virussukujuuren ilmaantumiseen ja leviämiseen yhdessä. Kolmesta pahiten epidemiasta kärsineestä maasta kerätyistä näytteistä selvitettyjen ebola-Makonon genomien perusteella, näyttäisi virus klusteroituvan fylogeneettisissä puissa maantieteellisen alkuperän mukaan (Carroll *et al.* 2015). 2013-2016 EVD epidemia koostui kolmesta dominoivasta sukujuuresta: A, SL2 ja SL3. Suurin osa näistä sukujuurista kiersi paikallisesti ja tapahtui vain satunnaisia rajanylityksiä maiden välillä. A-kantaa esiintyi Guineassa, SL3-kantaa esiintyi puolestaan Sierra Leonessa. SL2 oli kaikkein laajimmalle levinnyt sukujuuri alueella. SL3-sukujuuren oletetaan muodostuneen siitä Sierra Leonessa parin muun alakannan kanssa. SL2 kulkeutui Liberiaan ainakin kahdesti, levisi koko Sierra Leonen läpi ja aikaansai useita tartuntaketjuja Guineassa (Holmes *et al.* 2016). Vielä ei tiedetä, sisältääkö jokin näistä sukujuurista epidemian potentiaaliin vaikuttavia mutaatioita (Łuksza *et al.* 2014).

2013-2016 EVD epidemian alkuperää ja leviämistä pidetään ratkaistuna. Muut ebolaviruksen evoluutioon liittyvät tekijät epidemian aikana ovat kuitenkin hyvin kiistanalaisia. Isoin erimielisyyttä aiheuttava tekijä on se, että mutatoituiko virus epätavallisen nopeasti puhkeamisen aikana (Holmes *et al.* 2016). Gire *et al.* tutkimuksessa Makonon evolutiiviseksi nopeudeksi havaittiin noin $1,9 \times 10^{-3}$ substituutiota per nukleotidi per vuosi. Tämä saatu arvo oli noin kaksi kertaa suurempi kuin muista ebolaviruksen puhkeamisista laskettu keskiarvo, joka oli $0,9 \times 10^{-3}$ substituutiota per nukleotidi per vuosi (Gire *et al.* 2014). Näitä muita virusvariantteja ovat

ebolavirus Yambuku vuodelta 1976, Kikwit vuodelta 1995 ja Lomela vuodelta 2014. Puhkeamisten välinen evolutiivinen nopeus heijastaa kaikista ebolaviruksen varianteista saatuja keskiarvoja. Myöhemmissä tutkimuksissa ebola-Makonon evolutiiviseksi nopeudeksi saatiin toistuvasti pienempiä arvoja kuin Gire et al. -tutkimuksessa. Koko epidemian aikana kerätyn datan pohjalta laskettu keskiarvo evolutiiviselle nopeudelle on noin $1,2 \times 10^{-3}$ (Holmes et al. 2016).

Väittely ebolaviruksen evolutiivisesta dynamiikasta painottuu virusten evoluution keskeisiin ongelmiin. Evolutiivisen nopeuden oletetaan yleisesti olevan korkeampi puhkeamisten aikana kuin niiden välillä. Tämä johtuu yleisesti lyhyestä aikavälistä, jolloin sekvenssejä kerätään. Kaikki mutaatiot eivät välttämättä ehdi hävitä tai fiksoitua näin lyhyessä ajassa luonnonvalinnan tai geneettisen ajautumisen seurauksena. Tämän takia epidemian alussa kerätyt genomiset sekvenssit sisältävät ylimäärin hieman haitallisia variantteja, jotka puhdistava valinta tulee ajan myötä hävittämään. Evolutiivisen nopeuden arviot paisuvat tämän seurauksena (Holmes et al. 2016). Ajallisen riippuvuuden lisäksi voi puhdistava valinta "rentoutua" ebolaviruksessa ihmisen toimiessa sen isäntälajina. Rentoutuminen voi olla seurausta lajista toiseen tapahtuvasta siirtymisestä, esimerkiksi juuri lepakosta ihmiseen. Viruksen suorittamien replikaatioiden määrä ihmisessä aikayksikköä kohden voi olla myös suurempi kuin reservi-isännissä. Reservi-isännissä viruksia voidaan ylläpitää myös pelkästään viruksella infektoituneiden solujen jakautumisella, ilman viruksen omaa aktiiviista replikaatiota (Moya et al. 2004; Gire et al. 2014).

Minkään havaitun mutaation ei toistaiseksi tiedetä aiheuttaneen muutoksia 2013-2016 välillä jyllänneen ebolaviruksen fenotyypissä. Fenotyypin kannalta tärkeitä ominaisuuksia ovat virulenssi, antigeenisuus ja tarttuvuus. Tällä kertaa EVD epidemia oli laajempi kuin koskaan aiemmin. Ebola-Makona onkin siis saattanut kantaa mutaatioita, jotka ovat parantaneet sen tarttumista ihmisestä toiseen. Asiaa voidaan myös selittää viruksen erilaisella epideemisellä kontekstilla, kun verrattaessa sitä aiempiin epidemioihin. Kaikilla aiemmilla kannoilla on siis todennäköisesti ollut samanlainen kyky aiheuttaa laajan skaalan epidemioita. Näin ei ole kuitenkaan päässyt tapahtumaan, koska eläimestä ihmiseen -siirtymät ovat tapahtuneet hyvin syrjäisillä alueilla (Holmes et al. 2016).

Ebolaviruksen evoluutiossa vuosien 2013-2016 aikana havaittiin runsaasti muutoksia aminohappo- ja nukleotidisekvenseissä, mitkä voivat aiheuttaa adaptaatiota kohti tehokkaampaa leviämistä ihmisestä toiseen. Paljon huomiota on kohdistettu ebolaviruksen glykoproteiiniin, sillä suurimmat muutokset aminohappojen diversiteetissä epidemian aikana havaittiin juuri siinä.

Glykoproteiineissa on havaittu 104 aminohappomuutosta, jotka ainakin kaksi sukujuurta jakavat keskenään (Holmes *et al.* 2016). Glykoproteiinigeenin (GP) tuottama ”spike glykoproteiini” (GP_{1,2}) on suoraan vuorovaikutuksessa isännän immuunijärjestelmän kanssa. Tämän takia kyseinen geeni on hyvä kandidaatti, kun halutaan ymmärtää ebolaviruksen evolutiivisia vuorovaikutussuhteita isännän kanssa (Brown *et al.* 2016). EVD:stä parantumassa olevien potilaiden seerumissa esiintyy paljon GP_{1,2} spesifisiä vasta-aineita (Becquart *et al.* 2014). Myöskin ebolavirukseen kehitteillä olevat rokotteet kohdistuvat GP_{1,2}:seen (Henao-Restrepo *et al.* 2015; Qiu *et al.* 2014). Epidemian alussa muodostui SL2-sukujuuressa eräs tärkeä glykoproteiinin variantti, jossa aminohappo 82 muuttui alaniinista valiiniksi. Kyseinen substituuutio oli ensimmäinen, joka pystyisi potentiaalisesti vaikuttamaan viruksen interaktioon GP:n reseptorin NPC1 kanssa (Holmes *et al.* 2016).

6. Yhteenveto

Ihmisten määrä jatkaa nopeaa kasvuaan ja kasvavissa yhteisöissä virusten leviäminen on entistä helpompaa. Siksi virusten solujen infektointimekanismien ymmärtäminen on tärkeää. Se on myös edellytyksenä taistelussa viruksia vastaan, sillä sen tiedon pohjalta on mahdollista kehittää toimia lääkkeitä ja rokotteita niitä vastaan. Virusten äärimmäisen nopea evoluutio vaikeuttaa tätä prosessia huomattavasti, sillä niiden genomeihin syntyy mutaatioita yleensä noin yksi mutaatio jokaista replikaatiota kohden. Influenssaviruksia on tutkittu jo monia kymmeniä vuosia ja niiden infektiomekanismit ovat jo varsin hyvin tiedossa. Silti influenssaviruksissa kuitenkin tapahtuu aina aika ajoin yllättäviä reassortatioita, joiden seurauksena syntyy uusia kantoja. Reassortatioiden seurauksena vanhoja kantoja vastaan valmistetuista rokotteista voi hyvin nopeasti tulla hyödyttömiä, sillä uudet kannat voivat levitä nopeasti ympäri maailmaa. Ebolavirus toimii pelottavana esimerkkinä siitä, kuinka nopeasti tappava virus voi ilmaantua ja levitä laajalle alueelle. Onkin nopeasti saatava selville viruksen leviämistavat, jotta sen leviäminen saadaan pidettyä kurissa. Myös kansainvälinen yhteistyö on tärkeässä roolissa, sillä kehitysmailla ei ole valmiuksia kyetä yksin estämään virusten leviämistä ja kehittää hoitokeinoja niitä vastaan.

7. Lähteet

Arias A, Watson SJ, Asogun D, et al (2016) Rapid outbreak sequencing of Ebola virus in Sierra Leone identifies transmission chains linked to sporadic cases. *Virus Evolution*, **2**, vew016.

Baize S, Pannetier D, Oestereich L, et al (2014) Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *New England Journal of Medicine*, **371**, 1418-1425.

Baltimore D (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, **35**, 235.

Becquart P, Mahlakiv T, Nkoghe D, Leroy EM (2014) Identification of continuous human B-cell epitopes in the VP35, VP40, nucleoprotein and glycoprotein of Ebola virus. *PloS one*, **9**, e96360.

Blumenthal R, Clague MJ, Durell SR, Epanand RM (2003) Membrane fusion. *Chemical reviews*, **103**, 53-70.

Bradwell K, Combe M, Domingo-Calap P, Sanjuán R (2013) Correlation between mutation rate and genome size in riboviruses: mutation rate of bacteriophage Q β . *Genetics*, **195**, 243-251.

Brown CJ, Quates CJ, Mirabzadeh CA, et al (2016) New Perspectives on Ebola Virus Evolution. *PloS one*, **11**, e0160410.

Caluwaerts S, Fautsch T, Lagrou D, et al (2015) Dilemmas in managing pregnant women with Ebola: 2 case reports. *Clinical Infectious Diseases*, , civ1024.

Carr CM, Chaudhry C, Kim PS (1997) Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 14306-14313.

Carroll MW, Matthews DA, Hiscox JA, et al (2015) Temporal and spatial analysis of the 2014-2015 Ebola virus outbreak in West Africa. *Nature*, **524**, 97-101.

Cattaneo R, Schmid A, Eschle D, Baczko K, ter Meulen V, Billeter MA (1988) Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections. *Cell*, **55**, 255-265.

Chen R, Le Rouzic E, Kearney JA, Mansky LM, Benichou S (2004) Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 28419-28425.

Chernomordik LV, Leikina E, Frolov V, Bronk P, Zimmerberg J (1997) An early stage of membrane fusion mediated by the low pH conformation of influenza hemagglutinin depends upon membrane lipids. *The Journal of cell biology*, **136**, 81-93.

Chiu SS, Lau YL, Chan KH, Wong WHS, Peiris JM (2002) Influenza-related hospitalizations among children in Hong Kong. *New England Journal of Medicine*, **347**, 2097-2103.

Cuevas JM, Geller R, Garijo R, Lopez-Aldeguer J, Sanjun R (2015) Extremely high mutation rate of HIV-1 in vivo. *PLoS Biol*, **13**, e1002251.

Desimie BA, Delviks-Frankenberry KA, Burdick RC, Qi D, Izumi T, Pathak VK (2014) Multiple APOBEC3 restriction factors for HIV-1 and one Vif to rule them all. *Journal of Molecular Biology*, **426**, 1220-1245.

d'Hrelle F, Smith GH (1926) *The bacteriophage and its behavior* Am Assoc Immunol.

Diamond TL, Roshal M, Jamburuthugoda VK, et al (2004) Macrophage tropism of HIV-1 depends on efficient cellular dNTP utilization by reverse transcriptase. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 51545-51553.

Dimitrov DS (2004) Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology*, **2**, 109-122.

Dowell SF (2001) Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases. *Emerging infectious diseases*, **7**, 369.

Drake JW (1991) A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**, 7160-7164.

Drake JW, Holland JJ (1999) Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 13910-13913.

Duffy S, Shackelton LA, Holmes EC (2008) Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics*, **9**, 267-276.

Eckert DM, Kim PS (2001) Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annual Review of Biochemistry*, **70**, 777-810.

Fanning TG (2001) Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Phil.Trans.R.Soc.Lond.B*, **356**.

Feldmann H, Geisbert TW (2011) Ebola haemorrhagic fever. *The Lancet*, **377**, 849-862.

Fitch WM, Bush RM, Bender CA, Cox NJ (1997) Long term trends in the evolution of H (3) HA1 human influenza type A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 7712-7718.

Fourati S, Malet I, Lambert S, et al (2012) E138K and M184I mutations in HIV-1 reverse transcriptase coemerge as a result of APOBEC3 editing in the absence of drug exposure. *Aids*, **26**, 1619-1624.

Geisbert TW, Daddario-DiCaprio KM, Geisbert JB, et al (2008) Vesicular stomatitis virus-based vaccines protect nonhuman primates against aerosol challenge with Ebola and Marburg viruses. *Vaccine*, **26**, 6894-6900.

Ghedin E, Sengamalay NA, Shumway M, et al (2005) Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature*, **437**, 1162-1166.

Gire SK, Goba A, Andersen KG, et al (2014) Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science*, **345**, 1369-1372.

Goeijenbier M, Van Kampen JJ, Reusken CB, Koopmans MP, Van Gorp EC (2014) Ebola virus disease: a review on epidemiology, symptoms, treatment and pathogenesis. *Neth J Med*, **72**, 442-448.

Greenbaum A, Quinn C, Bailer J, et al (2015) Investigation of an outbreak of variant influenza A (H3N2) virus associated with an agricultural fair—Ohio, August 2012. *Journal of Infectious Diseases*, , jiv269.

Hanada K, Suzuki Y, Gojobori T (2004) A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Molecular biology and evolution*, **21**, 1074-1080.

Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, et al (2003) DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell*, **113**, 803-809.

Harris RS, Dudley JP (2015) APOBECs and virus restriction. *Virology*, **479**, 131-145.

Hartman AL, Towner JS, Nichol ST (2010) Ebola and marburg hemorrhagic fever. *Clinics in laboratory medicine*, **30**, 161-177.

Heineman RH, Bull JJ (2007) Testing optimality with experimental evolution: lysis time in a bacteriophage. *Evolution*, **61**, 1695-1709.

Heino J, Vuento M (2014) *Biokemian ja solubiologian perusteet*, 3. uud. p. edn. SanomaPro, Helsinki.

Hemmes JH, Winkler K, Kool SM (1960) Virus survival as a seasonal factor in influenza and poliomyelitis. *Nature*, **188**, 430-431.

Henao-Restrepo AM, Longini IM, Egger M, et al (2015) Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial. *The Lancet*, **386**, 857-866.

Holmes EC, Dudas G, Rambaut A, Andersen KG (2016) The evolution of Ebola virus: Insights from the 2013–2016 epidemic. *Nature*, **538**, 193-200.

Holtz CM, Sadler HA, Mansky LM (2013) APOBEC3G cytosine deamination hotspots are defined by both sequence context and single-stranded DNA secondary structure. *Nucleic acids research*, , gkt246.

Jefferies B (2006) A clinical guide to viral haemorrhagic fevers: Ebola, Marburg and Lassa. *Tropical doctor*, **36**, 1-4.

Jenkins GM, Rambaut A, Pybus OG, Holmes EC (2002) Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Evolution*, **54**, 156-165.

Johnson NP, Mueller J (2002) Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bulletin of the history of medicine*, **76**, 105-115.

Kortepeter MG, Bausch DG, Bray M (2011) Basic clinical and laboratory features of filoviral hemorrhagic fever. *Journal of Infectious Diseases*, **204**, S816.

Leroy EM, Gonzalez J, Baize S (2011) Ebola and Marburg haemorrhagic fever viruses: major scientific advances, but a relatively minor public health threat for Africa. *Clinical Microbiology and Infection*, **17**, 964-976.

Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, et al (2005) Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*, **438**, 575-576.

Lodish H, W. H. Freeman (2000) *Molecular cell biology*, 4th ed edn. W. H. Freeman, New York (NY).

Luftig MA (2014) Viruses and the DNA Damage Response: Activation and Antagonism. *Annual review of virology*, **1**, 605-625.

Łuksza M, Bedford T, Lässig M (2014) Epidemiological and evolutionary analysis of the 2014 Ebola virus outbreak. *arXiv preprint arXiv:1411.1722*, .

Mansky LM, Preveral S, Selig L, Benarous R, Benichou S (2000) The interaction of vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 In vivo mutation rate. *Journal of virology*, **74**, 7039-7047.

Mate SE, Kugelman JR, Nyenswah TG, et al (2015) Molecular evidence of sexual transmission of Ebola virus. *New England Journal of Medicine*, **373**, 2448-2454.

McCullers JA (2016) The Role of Punctuated Evolution in the Pathogenicity of Influenza Viruses. *Microbiology spectrum*, **4**.

Monajemi M, Woodworth CF, Zipperlen K, Gallant M, Grant MD, Larijani M (2014) Positioning of APOBEC3G/F mutational hotspots in the human immunodeficiency virus genome favors reduced recognition by CD8 T cells. *PLoS One*, **9**, e93428.

Moya A, Holmes EC, González-Candelas F (2004) The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*, **2**, 279-288.

Mupapa K, Mukundu W, Bwaka MA, et al (1999) Ebola hemorrhagic fever and pregnancy. *Journal of infectious diseases*, **179**, S12.

Murray MJ (2015) Ebola virus disease: a review of its past and present. *Anesthesia & Analgesia*, **121**, 798-809.

Muyembe-Tamfum J, Mulangu S, Masumu J, Kayembe JM, Kemp A, Paweska JT (2012) Ebola virus outbreaks in Africa: past and present. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **79**, 6.

Nelson MI, Holmes EC (2007) The evolution of epidemic influenza. *Nature reviews genetics*, **8**, 196-205.

Nelson MI, Simonsen L, Viboud C, et al (2006) Stochastic processes are key determinants of short-term evolution in influenza A virus. *PLoS Pathog*, **2**, e125.

Nelson RJ, Demas GE, Klein SL, Kriegsfeld LJ (2002) *Seasonal patterns of stress, immune function, and disease* Cambridge University Press.

Pelkmans L, Pntener D, Helenius A (2002) Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*, **296**, 535-539.

Perelson AS (2002) Modelling viral and immune system dynamics. *Nature Reviews Immunology*, **2**, 28-36.

Prescott JB, Marzi A, Safronetz D, Robertson SJ, Feldmann H, Best SM (2017) Immunobiology of Ebola and Lassa virus infections. *Nature Reviews Immunology*, **17**, 195-207.

Qiu X, Wong G, Audet J, et al (2014) Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature*, .

Quick J, Loman NJ, Duraffour S, et al (2016) Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature*, **530**, 228-232.

Rawat SS, Viard M, Gallo SA, Rein A, Blumenthal R, Puri A (2003) Modulation of entry of enveloped viruses by cholesterol and sphingolipids (Review). *Molecular membrane biology*, **20**, 243-254.

Report of a WHO/International Study Team (1978) Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. *Bulletin of the World Health Organization*, **56**, 247.

Sadler HA, Stenglein MD, Harris RS, Mansky LM (2010) APOBEC3G contributes to HIV-1 variation through sublethal mutagenesis. *Journal of virology*, **84**, 7396-7404.

Salkinoja-Salonen M, Salkinoja-Salonen M, Aalto J (2002) *Mikrobiologian perusteita* Helsingin yliopisto, Helsinki.

Sanjuan R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R (2010) Viral mutation rates. *Journal of virology*, **84**, 9733-9748.

- Sanjun R (2012) From molecular genetics to phylodynamics: evolutionary relevance of mutation rates across viruses. *PLoS Pathog*, **8**, e1002685.
- Sanjun R, Domingo-Calap P (2016) Mechanisms of viral mutation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **73**, 4433-4448.
- Sardany J, Elena SF (2011) Quasispecies spatial models for RNA viruses with different replication modes and infection strategies. *PLoS One*, **6**, e24884.
- Sardany J, Sol RV, Elena SF (2009) Replication mode and landscape topology differentially affect RNA virus mutational load and robustness. *Journal of virology*, **83**, 12579-12589.
- Schieffelin JS, Shaffer JG, Goba A, et al (2014) Clinical illness and outcomes in patients with Ebola in Sierra Leone. *New england journal of medicine*, **371**, 2092-2100.
- Schotsaert M, Garca-Sastre A (2014) Influenza vaccines: a moving interdisciplinary field. *Viruses*, **6**, 3809-3826.
- Schulman JL, Kilbourne ED (1963) Experimental transmission of influenza virus infection in mice: II. Some factors affecting the incidence of transmitted infection. *The Journal of experimental medicine*, **118**, 267.
- Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC (2005) High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 379-384.
- Shephard RJ, Shek PN (1998) Cold exposure and immune function. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, **76**, 828-836.
- Smith EC, Sexton NR, Denison MR (2014) Thinking outside the triangle: replication fidelity of the largest RNA viruses. *Annual review of virology*, **1**, 111-132.

Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ (1992) Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, **122**, 281-288.

Sullivan N, Yang Z, Nabel GJ (2003) Ebola virus pathogenesis: implications for vaccines and therapies. *Journal of virology*, **77**, 9733-9737.

Takeda M, Leser GP, Russell CJ, Lamb RA (2003) Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 14610-14617.

Taylor DJ, Ballinger MJ, Zhan JJ, Hanzly LE, Bruenn JA (2014) Evidence that ebolaviruses and cuevaviruses have been diverging from marburgviruses since the Miocene. *PeerJ*, **2**, e556.

Thébaud G, Chadœuf J, Morelli MJ, McCauley JW, Haydon DT (2010) The relationship between mutation frequency and replication strategy in positive-sense single-stranded RNA viruses. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **277**, 809-817.

Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al (2003) Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *Jama*, **289**, 179-186.

Tomaselli S, Galeano F, Locatelli F, Gallo A (2013) ADARs and the balance game between virus infection and innate immune cell response. *RNA Editing: Current Research and Future Trends*, , 207.

Vartanian J, Gutard D, Henry M, Wain-Hobson S (2008) Evidence for editing of human papillomavirus DNA by APOBEC3 in benign and precancerous lesions. *Science*, **320**, 230-233.

Ward MJ, Lycett SJ, Avila D, Bollback JP, Brown AJL (2013) Evolutionary interactions between haemagglutinin and neuraminidase in avian influenza. *BMC evolutionary biology*, **13**, 222.

Webster RG, Laver WG, Air GM, Schild GC (1982) Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature*, **296**, 115-121.

Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological reviews*, **56**, 152-179.

Weitzman MD, Lilley CE, Chaurushiya MS (2010) Genomes in conflict: maintaining genome integrity during virus infection. *Annual Review of Microbiology*, **64**, 61-81.

WHO (2014) WHO | Statement on the 1st meeting of the IHR Emergency Committee on the 2014 Ebola outbreak in West Africa. **2017**.

Wong CM, Yang L, Chan KP, et al (2006) Influenza-associated hospitalization in a subtropical city. *PLoS med*, **3**, e121.

Woolhouse ME, Rambaut A, Kellam P (2015) Lessons from Ebola: Improving infectious disease surveillance to inform outbreak management. *Science translational medicine*, **7**, 307rv5.