

Bakteriofagi ϕ 143:n karakterisointi: uusi cystovirusten kaltainen kaksijuosteinen RNA-virus



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Annika Kohvakka

Pro gradu -tutkielma

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

Marraskuussa 2012

ALKUSANAT

Tämän Pro gradu -tutkielman kokeellinen osuus tehtiin Jyväskylän yliopiston Bio- ja ympäristötieteiden laitoksella Virustutkimuksen huippuyksikössä syksyn 2010 aikana.

Haluan kiittää professori Jaana Bamfordia mahdollisuudesta työskennellä osana tutkimusryhmää mitä mielenkiintoisimman aihepiirin parissa, sekä asiantuntevista ohjeista ja neuvoista tutkielmaani liittyen. Valtaisa kiitos kuuluu myös ohjaajilleni Sari Mäntyselle ja Elina Laannelle, joiden apu niin laboratoriossa kuin kirjoitusvaiheessa oli elintärkeää tutkielman kannalta. Erityisesti haluaisin kiittää Saria siitä, että potkit minut ulos laboratoriosta liian pitkien työpäivien jälkeen. Se oli elintärkeää mielenterveyteni kannalta.

Iso kiitos kuuluu totta kai myös kaikille tutkimusryhmän jäsenille, jotka olivat aina valmiita auttamaan, oli ongelma sitten mikä hyvänsä, ja joiden yhdessä luoma ilmapiiri antoi hyvän syyn palata töihin myös seuraavana päivänä. Erityisen iso kiitos kuuluu Petri Papposelle, jonka valtaisa laboratoriokokemus ja -tietämys auttoivat minua saamaan kokeistani laadukkaampia tuloksia, tai edes jonkinlaisia tuloksia, ja säilymään niiden seasta ehjänä. I also want to thank PhD Nadine Fornelos Martins for her valuable help in and outside the lab, and the interesting talks on everything imaginable. You showed me the truth behind the science.

Kiitos kuuluu myös kaikille muille, jotka olivat millään tavalla osallisena tai avuksi tutkielmani työstämisen aikana. Te tiedätte keitä te olette. Toivottavasti.

Pieksämäellä 1.7.2012

Annika Kohvakka

Tekijä:	Annika Kohvakka	
Tutkielman nimi:	Bakteriofagi ϕ 143:n karakterisointi: uusi cystovirusten kaltainen kaksijuosteinen RNA-virus	
English title:	Characterization of bacteriophage ϕ 143: a new double-stranded RNA virus resembling cystoviruses	
Päivämäärä:	07.11.2012	Sivumäärä: 53+5
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
Oppiaine:	Solu- ja molekyylibiologia	
Tutkielman ohjaaja(t):	Jaana Bamford, Sari Mäntynen ja Elina Laanto	

Tiivistelmä:

Cystoviridae-virusheimon jäsenet ovat lipidikalvollisia bakteriofageja, jotka infektoivat *Pseudomonas*-suvun bakteerikantoja. Cystovirusten tyyppiviruksena toimii ϕ 6, jota on tutkittu jo useita vuosia. Ominaista cystoviruksille on ulkoisen lipidikalvon lisäksi kolmesta genomisegmentistä koostuva kaksijuosteinen RNA-genomi (dsRNA), joka sijaitsee kahdesta proteiinkerroksesta muodostuvan nukleokapsidin sisällä. Samankaltainen rakenne on lisäksi eukaryoottisoluja infektoivilla reovirusilla, jotka myös kuuluvat dsRNA-virusiin; dsRNA-virusten katsotaankin olevan evolutiivisesti yhteistä alkuperää. Tässä työssä esitellään uusi vesistöistä eristetty bakteriofagi ϕ 143, joka muistuttaa läheisesti cystovirusia.

Bakteriofagi ϕ 143 eristettiin Vehkalammesta (Jyväskylä) otetusta vesinäytteestä yhdessä sen isännän, B314-bakteerin kanssa. B314:n havaittiin 16S rRNA-nukleotidisekvenssin perusteella kuuluvan *Pseudomonas*-suvun bakteereihin. Karakterisointia varten ϕ 143:a tuotettiin nestekasvatuksessa optimoiduissa olosuhteissa, minkä jälkeen viruspartikkelit puhdistettiin sakkaroosigradientissa tiheysgradienttisentrifugoinnilla. Vertailtaessa ϕ 143:a cystovirusiin, ϕ 143:lle suoritettujen kokeiden tehtiin myös ϕ 6:lle sen luonnollisessa isännässä. Rakenteeltaan ϕ 143:n havaittiin olevan ϕ 6:n kaltainen: ϕ 143:n kloroformisensitiivisyys viittasi lipidirakenteiden läsnäoloon, minkä lisäksi elektronimikroskooppikuviissa sillä nähtiin olevan ulkoinen lipidikalvo polyhedraalisten rakenteiden ympärillä. Polyakryylamidigeelielektroforeesi taas paljasti ϕ 143:n muodostuvan molekyyli-massoiltaan lähes samanlaisista proteiineista kuin ϕ 6, joskin erojakin oli havaittavissa. Lisäksi genomien analysointi agarosigeelielektroforeesissa paljasti ϕ 143:lla olevan kolmeen osaan segmentoitunut dsRNA-genomi, jonka koot olivat hyvin lähellä ϕ 6:n segmenttien kokoja. Suurin ero cystovirusiin havaittiin ϕ 143:n käyttämissä isännissä, sillä se ei kyennyt infektoimaan tavallisimpia cystovirusten käyttämiä *Pseudomonas*-kantoja. Tämä viittaisi ϕ 143:n käyttävän isäntäsolun tunnistamiseen eri reseptoria kuin tunnetut cystovirukset.

Bakteriofagi ϕ 143:lla on selvästi monia yhteneväisyyksiä cystovirusten kanssa, minkä vuoksi onkin erittäin todennäköistä, että se on uusi *Cystoviridae*-heimon jäsen. ϕ 143:ssa havaitut eroavaisuudet muihin cystovirusiin, erityisesti infekti ominaisuuksissa, voivat antaa uutta tietoa cystovirusista, mm. niiden evoluutiosta. Lisätutkimukset ovat kuitenkin tarpeen, jotta ϕ 143:n sukulaisuus cystovirusiin voitaisiin tarkemmin määrittää. Siksi ϕ 143:n genomien sekvenssi tullaankin selvittämään lähitulevaisuudessa.

Author: Annika Kohvakka
Title of thesis: Characterization of bacteriophage ϕ 143: a new double-stranded RNA virus resembling cystoviruses
Finnish title: Bakteriofagi ϕ 143:n karakterisointi: uusi cystovirusten kaltainen kaksijuosteinen RNA-virus
Date: 07.11.2012 **Pages:** 53+5
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell and Molecular Biology
Supervisor(s): Jaana Bamford, Sari Mäntynen, and Elina Laanto

Abstract:

Cystoviridae is a virus family whose identified members, including the type virus ϕ 6, infect *Pseudomonas* bacteria. Cystoviruses have a double-stranded RNA (dsRNA) genome divided into three segments. The genome is packed inside a polyhedral nucleocapsid surrounded by a lipid envelope, a feature more typical for many eukaryotic viruses. In addition, cystoviruses have structural and functional similarities to other dsRNA viruses, e.g. reoviruses. In this study a recently isolated freshwater bacteriophage ϕ 143 that shares several characteristics with known cystoviruses is presented.

Bacteriophage ϕ 143 was isolated along a bacterium named B314, whose 16S rRNA nucleotide sequence indicated it to belong to the *Pseudomonas* genus. The propagation conditions of ϕ 143 in a liquid culture were optimized, and the phage was purified in a sucrose gradient by density gradient centrifugation. Within the experiments, ϕ 143 was compared to ϕ 6 by using the following methods. Chloroform sensitivity of the phage indicated that ϕ 143 has lipid components in its virion. Furthermore, electron microscopy imaging of ϕ 143 showed membranous structures surrounding polyhedral particles similar to ϕ 6. The polyacrylamide gel electrophoresis analysis indicated that also the protein composition of ϕ 143 was similar to ϕ 6, but not identical. In addition, the genome of ϕ 143 was determined by agarose gel electrophoresis to be similar to cystoviruses by having three dsRNA segments, the sizes of which were close to those of ϕ 6. Interestingly, the host range of ϕ 143 differed from ϕ 6 and other cystoviruses, indicating that ϕ 143 uses a different receptor for host-cell attachment.

Bacteriophage ϕ 143 has evidently several features that are characteristic of the previously identified cystoviruses, thus implying it belongs to this virus group. However, due to the differences, especially in the host range, ϕ 143 gives interesting insights into the *Cystoviridae* family. To get more exact information about its relation to known cystoviruses, the genome of ϕ 143 will be sequenced in near future.

Keywords: bacteriophage, double-stranded RNA, cystovirus, ϕ 6

SISÄLLYS

LYHENTEET	7
1 JOHDANTO	8
1.1 <i>Cystoviridae</i>	9
1.1.1 Bakteriofagi $\phi 6$	9
1.1.2 Muut cystovirukset	16
1.1.3 Isännät	21
2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS	23
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	24
3.1 Bakteriofagit ja bakteerikannat	24
3.2 Faagin tuottaminen ja puhdistus	24
3.3 Säilyvyyskokeet	26
3.4 Infektiokokeet	26
3.5 Kloroformisensitiivisyyden testaus	27
3.6 Elektronimikroskopointi	27
3.7 Proteiinipitoisuuden ja -koostumuksen määrittäminen	27
3.8 Adsorptiotesti	28
3.9 Faagigenomin eristys ja analysointi	28
3.10 Kaksijuosteisen RNA:n muuttaminen DNA:ksi	28
3.11 Isännän 16S rRNA:n sekvensointi	29
4 TULOKSET	30
4.1 Infektio-ominaisuuksien ja perusrakenteen määrittäminen	30
4.2 Virustuotanto ja -puhdistus, sekä säilyvyyskokeet	32
4.3 Proteiinien karakterisointi	38
4.4 Genomin karakterisointi	39

4.5	ϕ 143:n isännän karakterisointi.....	39
5	Tulosten tarkastelu.....	41
	LÄHTEET	47
	LIITEET.....	54
	Liite I. Kasvatusaineet	54
	Liite II. SDS-PAGE:n geelit ja puskurit	55
	Liite III. Protokolla: kaksijuosteisen RNA:n muuttaminen DNA:ksi.....	57

LYHENTEET

AGE	agaroosigeelielektroforeesi
bp	emäspari
cDNA	komplementaarinen DNA
ds	kaksijuosteinen
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo
LB	Luria Bertani
LPS	lipopolysakkaridi
MOI	infektion moninkerta (<i>engl. multiplicity of infection</i>)
PAGE	polyakryyliamidigeelielektroforeesi
PEG	polyetyleeniglykoli
PCR	polymeraasiketjureaktio
SDS	natriumdodekyylisulfaatti
ss	yksijuosteinen

1 JOHDANTO

Virusia on kaikkialla. Maapallolla arvellaan olevan 10^{30} – 10^{32} virusta lähes kaikissa ekosysteemeissä. Ne eivät kykene täysin itsenäiseen aineenvaihduntaan vaan ovat riippuvaisia soluista, joiden aineenvaihduntakoneistoa ne käyttävät itsensä monistamiseen. Näyttäisi siltä, että jokaista eliölajia kohti on vähintään yksi virus tai viruksen kaltainen geneettinen elementti (van Regenmortel ym., 2000). Suurin osa viruksista on bakteerien viruksia, joita kutsutaan myös bakteriofageiksi, tai lyhyemmin faageiksi.

Virusten yksittäiset, infekioon kykenevät viruspartikkelit eli virionit koostuvat vähintään proteiiniukuoresta eli kapsidista ja sen sisällä olevasta perintöaineksesta, genomista. Virusten genomi on joko DNA:ta tai RNA:ta, yksijuosteista (*engl. single-stranded*, ss) tai kaksijuosteista (*engl. double-stranded*, ds), lineaarisessa tai sirkulaarisessa muodossa, ja muodostuu yhdestä tai useammasta segmentistä. Genomia suojaava kapsidi koostuu useista identtisistä proteiiniyksiköistä, jotka useimmilla viruksilla ovat järjestäytyneet ikosahedraaliseen tai helikaaliseen symmetriaan. Joillakin viruksilla selvää symmetriaa ei ole havaittavissa tai virusten kapsidit ovat rakenteeltaan hyvin erikoisia, kuten pisaran- tai pullonmuotoisia (Zillig ym., 1996; Häring ym., 2005). Suurin osa tunnetuista bakteriofageista koostuu sekä ikosahedraalisesta pää-osasta, että sen yhteen kulmaan kiinnittyneestä häntärakenteesta, jonka rakenne voi olla hyvinkin monimutkainen. Kapsidin ja genomien lisäksi viruksilla voi olla lipideistä koostuva kalvo kapsidin ulko- tai sisäpinnalla, sekä proteiineja, jotka eivät ole mukana rakenteessa, auttamassa viruksen sisäänmenossa tai monistuksessa.

Kaksijuosteista RNA (dsRNA) -genomia kantavat virukset ovat laaja virusryhmä, johon kuuluu niin eläimiä, kasveja, sieniä kuin bakteerejakin infektoivia viruksia (ks. yleiskatsaus Mertens, 2004). Ominaista dsRNA-viruksille on 1–12 osaan segmentoitunut genomi. Koska solut ovat kykenemättömiä monistamaan kaksijuosteista RNA:ta, dsRNA-virusten täytyy kuljettaa oma RNA:sta riippuvainen RNA-polymeraasi genomien mukana soluun. Genomin monistaminen tapahtuu useimmilla dsRNA-viruksilla kapsidin sisällä, jolloin genomi on suojassa isäntäsolun dsRNA:ta tuhoavilta puolustusmekanismeilta.

Kaksijuosteiset RNA-virukset voidaan jakaa International Committee on Taxonomy of Viruses -komitean vuonna 2009 julkaiseman tiedotteen mukaan seitsemään heimoon, joista

Reoviridae on suurin. Reovirusiin kuuluu muun muassa rotavirus, joka on ihmisillä lasten yleisin ripulitautien aiheuttaja, ja märehitjöitä infektoiva bluetongue-virus. Monilla reovirusilla kapsidi koostuu useasta proteiinerkerroksesta, joista jokaisella on oma tehtävänsä viruksen elinkierrossa. Samankaltainen rakenne löytyy myös bakteereita infektoivilta *Cystoviridae*-heimon jäseniltä. Yhteisten piirteiden vuoksi cystovirusten ja reovirusten oletetaan olevan samaa evolutiivista alkuperää (Bamford, 2003).

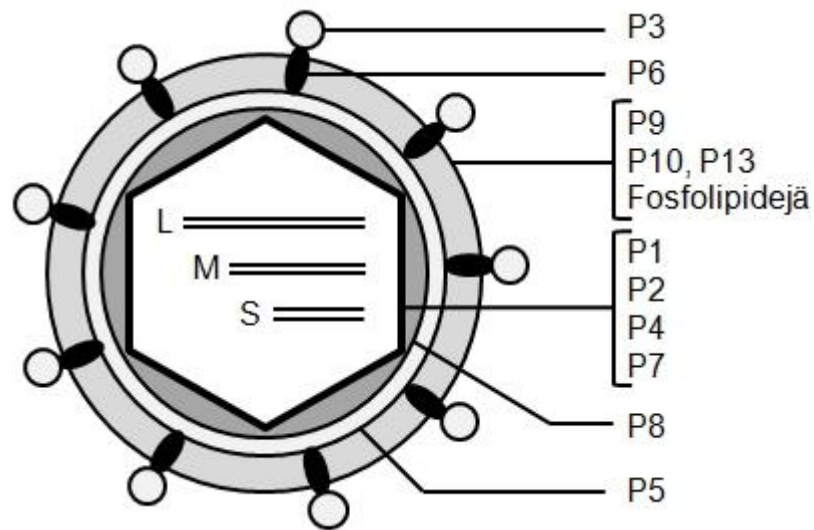
1.1 *Cystoviridae*

Ensimmäinen *Cystoviridae*-heimoon kuuluva virus, $\phi 6$, eristettiin *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola HB10Y-kannan bakteerista (Vidaver ym., 1973). Se oli aikanaan ensimmäinen tunnistettu kaksijuosteista RNA:ta sisältävä virus ja myös ensimmäisenä eristetty lipidikalvoinen bakteriofagi. Sittemmin uusia cystovirusia on löydetty lisää, ensin faagit $\phi 7$ – $\phi 14$ (Mindich ym., 1999) ja viimeisimpänä $\phi 2954$ (Qiao ym., 2010b). Näistä faagien $\phi 8$, $\phi 12$ ja $\phi 13$ katsotaan olevan kaukaista sukua $\phi 6$:lle ja myös toisilleen; $\phi 2954$ on läheisintä sukua $\phi 12$ -faagille. Yhteistä kaikille cystovirusille on kolmesta dsRNA-segmentistä koostuva genomi ja ulkoinen lipidikalvo, joka ympäröi ikosahedraalista kapsidia.

1.1.1 Bakteriofagi $\phi 6$

1.1.1.1 Virionin rakenne

Bakteriofagi $\phi 6$:n virioni on kolmesta kerroksesta koostuva, halkaisijaltaan 85 nm oleva pallomainen partikkeli (Kuva 1). Uloin kerroksista muodostuu viidestä proteiinista, P3, P6, P9, P10 ja P13 (Sinclair ym., 1975; Van Etten ym., 1976; Gottlieb ym., 1988), sekä fosfolipideistä, jotka ovat peräisin isännän solukalvolta (Van Etten ym., 1976; Laurinavicius ym., 2004). Tämä ulkoinen lipidikalvo ympäröi nukleokapsidia, joka muodostuu sisemmästä polymeraasikompleksista ja sitä peittävästä, pääasiassa P8-proteiinista koostuvasta pintakerroksesta (Van Etten ym., 1976; Bamford ja Mindich, 1980). Polymeraasikompleksi ja sen pintakerros ovat järjestäytyneet ikosahedraalisesti (Butcher ym., 1997), toisin kuin lipidikalvon proteiinit, joilla samanlaista järjestäytymistä ei ole havaittu (ks. yleiskatsaus Poranen ym., 2005b).



Kuva 1. Bakteriofagi $\phi 6$:n kaavamainen rakenne. Kuva on muokattu artikkelin Bamford (1994) pohjalta.

Isäntäsolun reseptorin tunnistaminen tapahtuu $\phi 6$ -virionissa olevien piikkimäisten P3-proteiinien avulla (Mindich ym., 1976; Romantschuk ja Bamford, 1985; Romantschuk ja Bamford, 1986). Proteiini P3 on kiinni lipidikalvossa vain kalvonsisäisen P6-proteiinin välityksellä (Van Etten ym., 1976; Stitt ja Mindich, 1983b). Tunnistuksen lisäksi lipidikalvo osallistuu nukleokapsidin pintakerroksen ja P5-proteiinin kanssa faagin sisäänmenoon. Proteiini P5 sijaitsee nukleokapsidin pintakerroksen ja lipidikalvon välissä, nukleokapsidiin heikosti kiinnittyneenä (Hantula ja Bamford, 1988). Sisin kerros eli polymeerasikompleksi muodostuu proteiineista P1, P2, P4 ja P7, ja sulkee sisäänsä dsRNA-genomin (Mindich ja Davidoff-Abelson, 1980; Bamford ja Mindich, 1980). Polymeerasikompleksi osallistuu dsRNA-genomin monistamiseen ja transkriptioon, sekä pakkaukseen.

Polymeerasikompleksin päärakenneproteiinina toimii P1, joka muodostaa monitahoisen tukirangan (Ktistakis ja Lang, 1987; Olkkonen ja Bamford, 1987). Polymeerasikompleksi koostuu P1-proteiinin 120 kopiosta, joiden muodostamat 60 dimeeriä ovat järjestäytyneet ikosahedraaliseen T=1 symmetriaan (Butcher ym., 1997; Huiskonen ym., 2006). Tällaisesta kapsidin järjestäytymistavasta käytetään myös nimitystä T2-rakenne, ja sitä esiintyy vain dsRNA-viruksilla (Lawton ym., 1997; Grimes ym., 1998; Reinisch ym., 2000; Naitow ym., 2002). Rakenteellisen roolinsa lisäksi P1 osallistuu genomien pakkaukseen tunnistamalla ja sitomalla yksijuosteisia RNA-segmenttejä (Qiao ym., 2003a, b).

P4-proteiini on rengasmaisesta heksameeristä koostuva NTPaasi (Paatero ym., 1995; Juuti ym., 1998), joka kykenee hyödyntämään kaikkia nukleosiditriposfaatteja (NTP, deoksi-NTP ja dideoksi-NTP) (Gottlieb ym., 1990; Frilander ja Bamford, 1995). Heksameerit muodostavat polymeerasikompleksin ikosahedraalisen kuoren viisinkertaisten symmetria-akselien kulmiin tornimaisia ulokkeita, joiden kautta RNA-segmentit pääsevät kulkemaan polymeerasikompleksin sisälle ja sieltä ulos (Butcher ym., 1997; de Haas ym., 1999; Pirttimaa ym., 2002). Yksi polymeerasikompleksin kulmista on erilainen, ja sen sitoma P4 kykenee genomien pakkaukseen normaalisti, vaikka muut P4-molekyylit poistettaisiin polymeerasikompleksista (Pirttimaa ym., 2002). P4 osallistuu genomien pakkauksen lisäksi polymeerasikompleksin kokoamiseen ja transkriptioon (Poranen ym., 2001; Pirttimaa ym., 2002).

Polymeerasikompleksissa on kiinni myös monomeerinen P2-proteiini, joka sijaitsee polymeerasikompleksin sisällä viisinkertaisen symmetrian omaavan kulman alla (Ikonen ym., 2003). P2 on RNA:sta riippuvainen RNA-polymeraasi (Koonin ym., 1989; Makeyev ja Bamford, 2000a), joka vastaa genomien monistuksesta ja transkriptiosta (Juuti ja Bamford, 1995). P2 kykenee tuottamaan komplementaarista RNA:ta yksijuosteiselle RNA-templaatile (ssRNA) ilman alukkeita (Makeyev ja Bamford, 2000a).

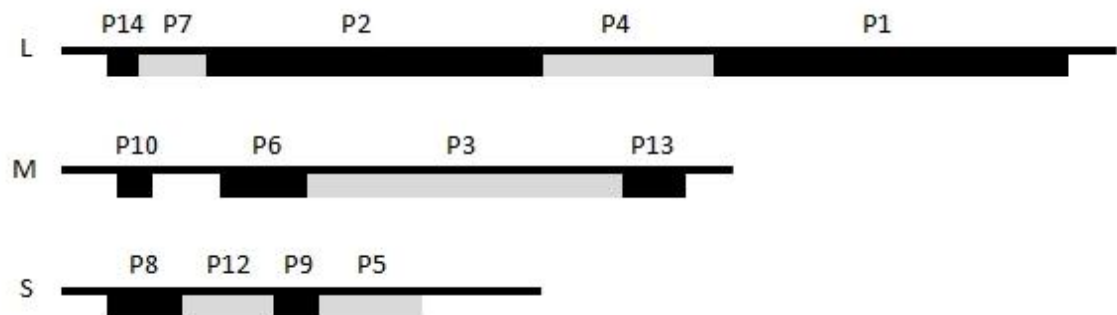
Polymeerasikompleksin pienin proteiini on P7. Aiemmin P7:n arveltiin sijaitsevan kaksinkertaisten symmetria-akselien lähellä (Poranen ym., 2001), mutta uudemmat tutkimukset viittaavat sen dimeerien ulottuvan viisinkertaisilta akseleilta kaksin- tai kolminkertaisille akseleille (Poranen ym., 2008b). P7:n on havaittu tehostavan genomien pakkausta ja transkriptiota, sekä edistävän polymeerasikompleksin kokoamista (Juuti ja Bamford, 1997; Poranen ym., 2001). Erilaiset roolit viittaavat siihen, että P7 toimii partikkeleita vakauttavana proteiinina, eli ns. liimaproteiinina, helpottaen P1-kuoressa tapahtuvia rakennemuutoksia (ks. yleiskatsaus Poranen ym., 2008a).

Nukleokapsidin pintakerros ympäröi polymeerasikompleksia. Se koostuu P8-proteiineista (Van Etten ym., 1976; Bamford ja Mindich, 1980), jotka ovat järjestäytyneet T=13 symmetriaan lukuun ottamatta viisinkertaisia symmetria-akseleita, joista P4-proteiinin tornimaiset heksameerit työntyvät läpi (Butcher ym., 1997; Huiskonen ym., 2006). Nukleokapsidin pintakerros on apuna virionien tunkeutumisessa isäntäsoluun, mitä avustaa

myös lyyttinen entsyymi P5 (ks. kohta 1.1.1.3), joka on kiinnittynyt löyhästi nukleokapsidin pintaan (Hantula ja Bamford, 1988).

1.1.1.2 Genomi

Bakteriofagi $\phi 6$:n genomi koostuu kolmesta dsRNA-segmentistä L, M ja S (yksijuosteisena l, m ja s). Kooltaan L-segmentti on 6374 emäsparia (bp), M-segmentti 4063 bp ja S-segmentti 2948 bp (McGraw ym., 1986; Gottlieb ym., 1988; Mindich ym., 1988; Kuva 2). Genomi pakataan polymeraasikompleksiin siten, että sen sisälle tulee yksi kopio kutakin segmenttiä (Day ja Mindich, 1980; Mindich ja Davidoff-Abelson, 1980). Kunkin segmentin koodaamat proteiinit osallistuvat usein samoihin toimintoihin tai ovat osa samoja rakenteita (McGraw ym., 1986; Gottlieb ym., 1988; Mindich ym., 1988). L-segmentin koodaamat proteiinit P1, P2, P4 ja P7 ovat osa polymeraasikompleksia; M-segmentin P3, P6, P10 ja P13 ovat kiinni virionin ulkokalvossa; S-segmentin P5 ja P11 osallistuvat isäntäsolun hajottamiseen, P8 on nukleokapsidin pintakerros ja P9 on ulkokalvon runsain proteiini. Proteiineista, jotka eivät osallistu rakenteen muodostamiseen, P12 sijaitsee S-segmentissä ja P14 L-segmentissä (McGraw ym., 1986; Casini ja Revel, 1994).



Kuva 2. Bakteriofagi $\phi 6$:n genomien järjestäytyminen. Genomi koostuu kolmesta dsRNA-segmentistä L (6374 bp), M (4063 bp) ja S (2948 bp), jotka koodaavat viruksen proteiineja P1–P10 ja P12–14. Muokattu artikkelin Mindich (1995) pohjalta.

Genomin kaikilla segmenteillä on koodaavan juosteen ((+)-säie; l^+ , m^+ ja s^+) 5'- ja 3'-päissä koodaamattomia alueita. Noin 50 nukleotidin päässä 5'-pään alusta sijaitsee 200 nukleotidia pitkä sekvenssi, ns. *pac*-alue (Gottlieb ym., 1994; Pirttimaa ja Bamford, 2000). Se signaloi (+)-säikeen pakkausta yhdessä 18 nukleotidia pitkän konsensussekvenssin kanssa (Gottlieb ym., 1994). Konsensussekvenssi sijaitsee aivan 5'-pään alussa ja on identtinen kaikilla segmenteillä, lukuun ottamatta l^+ -segmentin toista nukleotidia, joka on

m^+ - ja s^+ -segmentin G-nukleotidista poiketen U. Tästä yhden nukleotidin erosta johtuen l^+ -segmentin transkriptiotehokkuus on m^+ - ja s^+ -segmenttejä heikompi (van Dijk ym., 1995; Makeyev ja Bamford, 2000b). Pakkauksesta vastaavien *pac*-alueiden on havaittu muodostavan hiuspinni-rakenteita, joiden muoto on erilainen kullakin segmentillä (Pirttimaa ja Bamford, 2000). Jokaisella segmentillä on kuitenkin ensimmäisen 100 nukleotidin joukossa 10–12 nukleotidia pitkä samankaltainen hiuspinni-rakenne. Hiuspinni sisältää erittäin vakaan neljän nukleotidin silmukan (UAGC), jonka arvellaan olevan $\phi 6$ -spesifinen signaali (Pirttimaa ja Bamford, 2000).

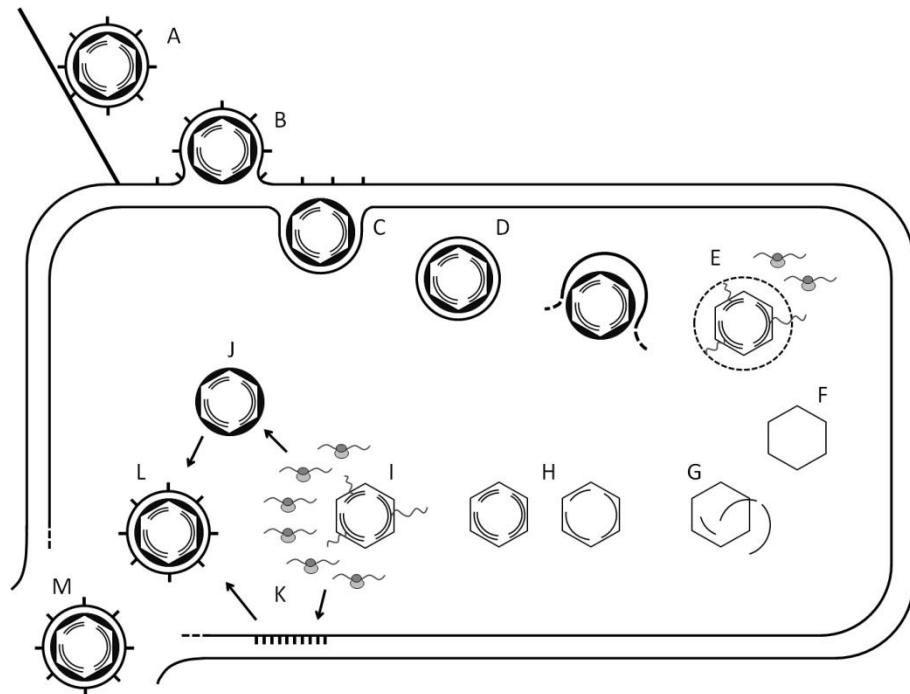
Koodaavien juosteiden 3'-päiden 75 ensimmäistä nukleotidia muodostavat siirtäjä-RNA:n kaltaisia hiuspinni-rakenteita, joiden rakenteet ovat erittäin konservoituneita segmenttien kesken (Mindich ym., 1992). Hiuspinnit osallistuvat replikaation aloitukseen (Frilander ym., 1992; Makeyev ja Bamford, 2000a), minkä lisäksi niiden arvellaan suojaavan RNA:ta isäntäsolun nukleaaseja vastaan (Mindich ym., 1994).

1.1.1.3 Elinkierto

Jokaisella $\phi 6$ -virionin kerroksella on oma tehtävänsä faagin elinkierrossa (Kuva 3). Virionin kalvo vastaa faagin kiinnittymisestä ja sisäänmenosta isäntäsoluun. Sisäänmenoon $\phi 6$ hyödyntää isännän tyyppin IV pilusta, johon se tarttuu piikkimäisen P3-proteiininsa avulla (Mindich ym., 1976; Romantschuk ja Bamford, 1985; Romantschuk ja Bamford, 1986; Roine ym., 1998). Piluksen vetäydyttyä sisäänpäin $\phi 6$ -virioni pääsee kosketukseen isäntäsolun ulkokalvon kanssa (Romantschuk ja Bamford, 1985), mitä seuraa virionin kalvon fuusioituminen isännän ulkokalvoon (Bamford ym., 1976; Bamford ja Lounatmaa, 1978). Fuusiosta vastaa P6-proteiini (Bamford ym., 1987).

Bakteriofagi $\phi 6$:n infektoimat bakteerit ovat Gram-negatiivisia, joten virionien on läpäistävä kolme kerrosta: lipopolysakkarideja (LPS) sisältävä ulkokalvo, keskimäinen peptidoglykaaniverkosto ja sisimmäinen solukalvo. Virionien kalvon fosfolipidit sekoittuvat fuusiossa bakteerin ulkokalvon lipideihin, jolloin nukleokapsidi vapautuu periplasmiseen tilaan (Bamford ym., 1976; Bamford ja Lounatmaa, 1978). Vastassa oleva peptidoglykaanikerros on jäykkä ja tiheä, ja sitä hajottamaan tarvitaan tavallisesti lyyttisiä entsyymejä. $\phi 6$ -faagilla peptidoglykaanin hajottamisesta on vastuussa fuusiossa vapautunut endopeptidaasi P5, joka sijaitsee virionin kalvon ja nukleokapsidin välissä (Mindich ja

Lehman, 1979; Kakitani ym., 1980; Hantula ja Bamford, 1988). Nukleokapsidi läpäisee solukalvon muodostamalla kalvorakkulan, mikä muistuttaa jossain määrin joidenkin eläinvirusten käyttämiä endosytoottisia reittejä (Romantschuk ym., 1988). Solukalvon läpäisystä on vastuussa nukleokapsidin pintakerroksen proteiini P8 (Ojala ym., 1990; Olkkonen ym., 1991; Poranen ym., 1999; Cvirkaite-Krupovic ym., 2010). Se osallistuu myös nukleokapsidin ympärille muodostuneen kalvon hajotukseen, mutta tapahtuman yksityiskohtia ei vielä tunneta (Poranen ym., 1999). P8-proteiinin irtoaminen nukleokapsidista tapahtuu ilmeisimmin pH:n alenemisen seurauksena (Poranen ym., 1999; Cvirkaite-Krupovic ym., 2010).



Kuva 3. Bakteriofagi $\phi 6$:n elinkierto. (A) $\phi 6$ kiinnittyy isäntäsolun pilukseen. (B) Faagin kalvo fuusioituu isännän ulkokalvon kanssa faagiproteiinien toimesta. (C) $\phi 6$:n nukleokapsidi läpäisee isännän peptidoglykaanikerroksen faagin oman lyyttisen entsyymien avulla ja tunkeutuu solukalvon lävitse. (D, E) Nukleokapsidi vapautuu solukalvon lipideistä, nukleokapsidin pintakerros hajoaa ja aikainen transkriptio alkaa nukleokapsidin sisällä (F) Polymeraasikompleksi kootaan sytoplasmassa rakentuneista proteiineista. (G) Faagigenomin ssRNA-säikeet pakataan tyhjiin polymeraasikomplekseihin. (H) ssRNA-säikeet kopioidaan dsRNA:ksi polymeraasikompleksin sisällä. (I) Myöhäinen transkriptio ja translaatio alkavat. (J) Nukleokapsidin pintakerros kootaan tuotetuista proteiineista. (K, L) Faagin kalvoproteiinit kuljetetaan isännän solukalvolle, josta ne viedään kalvokuljetuksena nukleokapsidin pinnalle. (M) Kypsät $\phi 6$ -virionit vapautuvat solujen hajotessa (ns. bakteriolyysi). Kuva on muokattu väitöskirjan Olkkonen (1991) pohjalta.

Nukleokapsidin pintakerroksesta vapautunut polymeraasikompleksi aktivoituu sytoplasmassa. Sen P2-proteiini alkaa kopioida dsRNA-genomista (+)-säikeitä (1^+ , m^+ ja

s⁺) monien muiden dsRNA-virusten kaltaisesti polymeraasikompleksin sisällä, josta säikeet kuljetetaan sytoplasmaan (Kakitani ym., 1980). Siellä (+)-säikeet toimivat lähetti-RNA-templaatteina proteiinisynteesissä. Segmentin I⁺ koodaamat uudet proteiinit (P1, P2, P4 ja P7) muodostavat tyhjiä polymeraasikomplekseja (Mindich ja Davidoff-Abelson, 1980; Bamford ja Mindich, 1980), joiden sisälle aiemmin kopioituiden (+)-säikeet pakataan. Polymeraasikompleksin kokoamisen aloittaa P1–P4-kompleksin muodostuminen; P7 vakauttaa muodostuneita välituotteita ja kiihdyttää kokoamisprosessia (Poranen ym., 2001, 2008b). Genomin pakkauksesta on vastuussa P4-proteiini NTPaasi-aktiivisuutensa avulla (Gottlieb ym., 1991; Frilander ja Bamford, 1995; Pirttimaa ym., 2002). Pakkausta avustaa P7-proteiini (Juuti ja Bamford, 1995, 1997). Ennen pakkausta (+)-säikeet sitoutuvat P1:een, joka tunnistaa genomisegmentit 5'-päiden pakkaussignaaleista (ks. kohta 1.1.1.2; Qiao ym., 2003a, b). Segmentit sitoutuvat polymeraasikompleksiin eri affiniteeteilla: s⁺-segmentti sitoutuu ennen m⁺-segmenttiä, I⁺-segmentin kiinnittyessä viimeisenä (Juuti ja Bamford, 1995; Mindich, 1999). Segmenttien pakkaus tapahtuu samassa järjestyksessä (Frilander ja Bamford 1995; Qiao ym., 1995). Vielä ei ole tiedossa, miten segmenttien peräkkäinen pakkaaminen tarkalleen ottaen tapahtuu. On kuitenkin esitetty, että pakatun segmentin aiheuttamat (Qiao ym., 1995, 1997; Frilander ym., 1995) tai spontaanisti tapahtuvat konformaatiomuutokset polymeraasikompleksissa (ks. yleiskatsaus Poranen ym., 2005a) paljastavat seuraavan segmentin sitoutumispaikan polymeraasikompleksin pinnassa.

Kun I⁺-segmentin pakkaus polymeraasikompleksiin alkaa, P2-proteiini aloittaa (-)-säikeiden muodostamisen käyttämällä (+)-säikeitä templaatteina (Ewen ja Revel, 1988; Gottlieb ym., 1990; Frilander ja Bamford, 1995; Frilander ym., 1995; Poranen ja Bamford, 1999). Valmiit dsRNA:ta sisältävät polymeraasikompleksit aloittavat uuden transkriptiokierroksen. Toisin kuin aikaisessa transkriptiossa, jossa kaikkia segmenttejä tuotetaan suhteessa yhtä paljon, myöhäisen transkription aikana s⁺- ja m⁺-segmenttejä tuotetaan enemmän kuin I⁺-segmenttejä (Coplin ym., 1975; Sinclair ja Mindich, 1976; Rimon and Haselkorn, 1978; Usala ym., 1980; Van Etten ym., 1980; Emori ym., 1983; Pagratis ja Revel, 1990; Ojala ja Bamford, 1995). I⁺-segmentin alhaisempaa tuottoa selittää sen 5'-päiden alun konsensussekvenssi, joka on erilainen s⁺- ja m⁺-segmenttien sekvensseihin verrattuna (ks. kohta 1.1.1.2). Aikaisessa transkriptiossa kaikkia segmenttejä

tuotetaan yhtä paljon johtuen isännän tuottamasta YajQ-proteiinista (Qiao ym., 2008, 2010c).

Myöhäistä transkriptiota seuraa s⁺- ja m⁺-segmenttien koodaamien proteiinien synteesi. Tuotetut P8-proteiinit muodostavat nukleokapsidin pintakerroksen polymeraasikompleksin ympärille (Bamford ja Mindich, 1980; Olkkonen ym., 1991), kun taas faagin ulkokalvon proteiinit P6, P9, P10 ja P13 kuljetetaan isännän solukalvolle (Bamford ym., 1976; Stitt ja Mindich, 1983b; Laurinavicius ym., 2004). Oleelliset tekijät faagin ulkokalvon kokoamisessa ovat proteiinit P9 ja P12 (Stitt ja Mindich, 1983a; Mindich ja Lehman, 1983; Johnson ja Mindich, 1994a). $\phi 6$ ei saa ulkokalvoaan monien kalvollisten eläinvirusten tapaan silmukoitumisen (*engl. budding*) yhteydessä, vaan bakteerin solukalvolta muodostuu sytoplasmaan rakkuloita, jotka ympäröivät faagin nukleokapsidin (Stitt ja Mindich, 1983b). P3-proteiiniin kiinnittyminen ulkokalvon P6-proteiiniin tapahtuu viimeisenä (Mindich ym., 1979; Stitt ja Mindich, 1983b). Kypsät $\phi 6$ -virionit vapautetaan solusta bakteriolyysissä P5- ja P10-proteiinien avulla (Mindich ja Lehman, 1979; Caldentey ja Bamford, 1992; Johnson ja Mindich, 1994b).

1.1.2 Muut cystovirukset

Virionin perusrakenne, genomin koko (Taulukko 1) ja geenien järjestys on kaikilla tunnetuilla cystoviruksilla samankaltainen, mutta sekvensseiltään ne voivat poiketa toisistaan hyvinkin merkittävästi. Cystovirukset voidaan jakaa $\phi 6$:lle läheistä sukua oleviin ja $\phi 6$:lle kaukaista sukua oleviin bakteriofageihin niiden isäntien ja nukleotidisekvenssien perusteella (Mindich ym., 1999). Läheisten sukulaisten ($\phi 7$, $\phi 9$, $\phi 10$ ja $\phi 11$) nukleotidisekvenssit poikkeavat $\phi 6$:n genomista 15–20 % (Mindich ym., 1999), kun kaukaisimmilla sukulaisilla ($\phi 8$, $\phi 12$, $\phi 13$ ja $\phi 2954$) sekvenssin samankaltaisuutta $\phi 6$:n kanssa ei ole juurikaan havaittavissa (Hoogstraten ym., 2000; Qiao ym., 2000; Gottlieb ym., 2002a, b; Qiao ym., 2010b). Aminohapposekvenssien samankaltaisuutta ei myöskään ole kaukaisten sukulaisten ja $\phi 6$:n välillä, lukuun ottamatta muutamien proteiinien, erityisesti P2-proteiinien (RNA:sta riippuvainen RNA-polymeraasi) ja P4-proteiinien (NTPaasi), sekvenssejä (Hoogstraten ym., 2000; Qiao ym., 2000; Gottlieb ym., 2002a; Qiao ym., 2010b). Bakteriofagit $\phi 8$, $\phi 12$ ja $\phi 13$ ovat kaukaista sukua $\phi 6$:n lisäksi myös toisilleen, kun taas $\phi 2954$ näyttäisi nukleotidi- ja aminohapposekvenssivertailujen perusteella olevan lähintä sukua $\phi 12$ -faagille.

Taulukko 1. Cystovirusten genomisegmenttien koot.

Faagi	Koot (bp)		
	L	M	S
$\phi 6^a$	6374	4063	2948
$\phi 7^b$	~ 6400	~ 4200	~ 2900
$\phi 9^b$	~ 6600	~ 4400	~ 3000
$\phi 10^b$	~ 6800	~ 4200	~ 3000
$\phi 11^b$	~ 6800	~ 4200	~ 3000
$\phi 14^b$	~ 6600	~ 4400	~ 3000
$\phi 8^c$	7051	4742	3192
$\phi 12^d$	6751	4100	2322
$\phi 13^e$	6458	4213	2981
$\phi 2954^f$	6501	3606	2577

^a McGraw ym. (1986); Gottlieb ym. (1988); Mindich ym. (1988)

^b Mindich ym. (1999)

^c Hoogstraten ym. (2000)

^d Gottlieb ym. (2002a, b)

^e Qiao ym. (2000)

^f Qiao ym. (2010)

Bakteriofagi $\phi 6$:n lisäksi myös muilla cystovirusilla on havaittu koodaamattomia alueita genomisegmenttien molemmissa päissä. Segmenttien pakkaukseen tarvittava *pac*-sekvenssi on $\phi 6$:n lähisukulaisten kesken 90 % identtinen (Mindich ym., 1999). $\phi 6$:n kaukaisilla sukulaisilla *pac*-alueiden on havaittu muodostavan $\phi 6$:n kaltaisia hiuspinnirakenteita, vaikkakin niiden nukleotidisekvenssit poikkeavat täysin $\phi 6$:n ja toistensa *pac*-sekvensseistä (Hoogstraten ym., 2000; Qiao ym., 2000; Gottlieb ym., 2002a, b; Qiao ym., 2010b). Myös niiden 5'-pään alun konsensussekvenssit ovat erilaiset. Kuitenkin $\phi 6$:n tavoin faagien $\phi 12$, $\phi 13$ ja $\phi 2954$ L-segmentin alku poikkeaa M- ja S-segmenttien alun identtisistä sekvensseistä. Bakteriofagi $\phi 8$:lla taas konsensussekvenssi on samanlainen kaikilla kolmella segmentillä. Lisäksi $\phi 6$:n kaukaisilla sukulaisilla (+)-säikeiden 3'-päiden sekvenssit muodostavat samankaltaisia hiuspinnirakenteita kuin $\phi 6$:lla, vaikka niiden nukleotidisekvenssit eroavat $\phi 6$:n vastaavista sekvensseistä (Hoogstraten ym., 2000; Qiao ym., 2000; Gottlieb ym., 2002a, b; Qiao ym., 2010b). Poikkeuksena tähän on $\phi 13$, jonka M-segmentin 3'-pää on lähes identtinen $\phi 6$:n M-segmentin 3'-pään kanssa; muissa $\phi 13$:n segmenteissä samanlaista yhteneväisyyttä ei ole havaittavissa. Miltei kaikilla

cystoviruksilla 3'-pään sekvenssit ovat lähes identtiset S-, M-, ja L-segmenttien välillä, lukuun ottamatta $\phi 12$ -faagia, jonka 3'-pään sekvenssit eroavat suuresti toisistaan.

Bakteriofagi $\phi 6$:lla genomisegmenttien transkription säätelyyn osallistuu 5'-pään sekvenssien lisäksi isännän YajQ-proteiini (Qiao ym., 2008, 2010c). YajQ:n sitoutuminen polymeraasikompleksiin aktivoi L-segmentin transkription, joka ilman aktivointia olisi M- ja S-segmentteihin verrattuna selvästi vähäisempää. Ainakin $\phi 8$ - ja $\phi 2954$ -faageilla on myös havaittu transkription säätelyä, tosin eri proteiinien toimesta. Koska $\phi 8$:lla 5'-pään konsensussekvenssi on identtinen kaikilla kolmella segmentillä, L-segmenttiä tuotetaan saman verran muiden sekvenssien kanssa (Hoogstraten ym., 2000). Myöhäisessä transkriptiossa $\phi 8$:n L-segmentin osuus muihin segmentteihin verrattuna on kuitenkin pienempi johtuen sen hajotuksen säätelystä (Qiao ym., 2009). L-segmentin hajotuksen säätelystä vastaa $\phi 8$:n oman *Hb*-geenin koodaama tuote yhdessä isännän ribonukleaasi R:n ja mahdollisten muiden isännän proteiinien kanssa. $\phi 2954$:lla taas isännän glutaredoksiini 3 toimii aikaisessa transkriptiossa L-segmentin määrän säätelyssä M- ja S-segmenttien tasolle (Qiao ym., 2010a).

Virionien proteiinikoostumus on kaikilla cystoviruksilla samankaltainen, mutta suuriakin eroja löytyy (Taulukko 2; Mindich ym., 1999; Hoogstraten ym., 2000; Qiao ym., 2000; Gottlieb ym., 2002a, b; Qiao ym., 2010b). Bakteriofagi $\phi 6$:n proteiineja P1–P12 vastaavat proteiinit löytyvät muiltakin cystoviruksilta, minkä lisäksi P14 puuttuu vain $\phi 13$:lta. $\phi 6$:n kaukaisilta sukulaisilta on löydetty avoimia lukukehyksiä (*engl. open reading frame*), joita $\phi 6$:lla ei ole. Bakteriofagi $\phi 8$:lla näitä lukukehyksiä on löydetty kuusi (*F–J*; *H* on kaksiosainen) (Hoogstraten ym., 2000; Sun ym., 2003; Qiao ym., 2009). Osa kaukaisten sukulaisten proteiineista koostuu useammasta polypeptidistä (Hoogstraten ym., 2000; Qiao ym., 2000; Gottlieb ym., 2002a, b; Qiao ym., 2010b). Yksi tällainen on P3, joka $\phi 8$:lla muodostuu kahdesta, ja $\phi 12$:lla ja $\phi 13$:lla mahdollisesti kolmesta polypeptidistä ($\phi 12$:n ja $\phi 13$:n P3b:n ilmentymisestä ei ole varmuutta). Faagien $\phi 8$, $\phi 12$ ja $\phi 13$ poikkeava P3-proteiini (vastuussa isännän tunnistuksesta $\phi 6$:lla) on huomion arvoinen myös siksi, että samaiset faagit käyttävät sisäänmenoon isäntänsä karkeaa lipopolysakkaridia $\phi 6$:n käyttämän tyypin IV piluksen sijasta (Mindich ym., 1999). Bakteriofagi $\phi 8$ poikkeaa muista cystoviruksista myös proteiinin P8 osalta: sen P8-proteiini ei muodosta yhtenäistä kerrosta polymeraasikompleksin pinnalle vaan on osa virionin ulkokalvoa, irrotten siten

ulkokalvon mukana viruksen tunkeutuessa isäntäsoluun (Hoogstraten ym., 2000; Sun ym., 2003). P8-proteiinin tuotto on myös muihin cystovirusiin verrattuna vähäisempää. Lisäksi $\phi 6$ -faagin P8-proteiinin toiminnalliset tehtävät solukalvon läpäisyssä ja vuorovaikutuksessa virionin ulkokalvon kanssa näyttäisi $\phi 8$ -faagissa hoitavan polymeerasikompleksin P1-rakenneproteiini (Sun ym., 2003). Myös $\phi 12$ -faagin P8-proteiinin muodostaman kuoren rakenne poikkeaa $\phi 6$:n vastaavasta, muttei yhtä paljon kuin $\phi 8$ -faagilla (Wei ym., 2009).

Tarkempia rakennetutkimuksia cystovirusista on tehty $\phi 6$:sta ja sen kaukaisista sukulaisista $\phi 8$, $\phi 12$ ja $\phi 13$. Erityisesti $\phi 8$ -faagilla on havaittu olevan suuria eroja virionin rakenteessa ja sen kokoamisessa $\phi 6$ -faagiin verrattaessa. Erilaisten P8- ja P3-proteiinien lisäksi $\phi 8$:n P1-proteiini eroaa $\phi 6$:n vastaavasta: $\phi 8$:n P1 muodostaa vakaita tetrameerejä (Kainov ym., 2003), kun $\phi 6$:lla P1 toimii monomeerinä (Poranen ym., 2001). Lisäksi $\phi 8$:n polymeerasikompleksin kokoamisen aloittamiseen tarvitaan P1-proteiinien ohella P2-proteiinia, eikä niinkään P4-proteiinia, joka on tarpeellinen $\phi 6$:lle (Kainov ym., 2003). P4-proteiinilla on kuitenkin olennainen osa $\phi 8$:n polymeerasikompleksin muodostuksessa mm. välituotteiden vakauttajana. P7-proteiinilla taas on vain pieni vaikutus $\phi 8$:n polymeerasikompleksin kokoamisnopeuteen (Kainov ym., 2003).

Taulukko 2. Cystovirusten proteiinien koot ja tehtävät.

ORF	Segmentti	Molekyyli massa (kDa)					Tehtävät ($\phi 6$) ^f
		$\phi 6$ ^a	$\phi 8$ ^b	$\phi 12$ ^c	$\phi 13$ ^d	$\phi 2954$ ^e	
P1	L	84,99	86,9	79,0	86,6	78,20	Polymeraasikompleksin päärakenneproteiini ja tukiranka
P2	L	74,79	71,6	75,4	79,7	74,06	RNA:sta riippuvainen RNA- polymeraasi
P3 a	M	69,18	59,4	41,3	40,1	69,50	Kiinnittyminen isäntäsoluun
b	M		41,2	9,6	9,9		
c	M			39,5	38,7		
P4	L	35,03	34,2	35,1	37,7	33,65	Pakkaava NTPaasi; yksijuosteisen RNA:n siirto
P5 a	S	24,02	18,9	26,6	27,1	24,29	Lyyttinen entsyymi
b	S				10,5		
P6	M	17,23	14,5	25,5	24,1	12,28	Kalvofuusio; P3-ankkuri
P7	L	17,17	19,2 ^g	18,5	16,6	19,77	Edistää kokoamista, pakkausta ja transkriptiota; vakauttaa polymeraasikompleksia
P8	S	15,87	39,2	20,5	16,3	22,33	Nukleokapsidin pintakerros
P9	S	9,48	6,2	8,1	7,6	8,30	Lipidikalvon pääproteiini
P10	M	4,27	17,6	4,4	4,0	4,37	Osallistuu bakteerin hajottamiseen
P12	S	20,29	19,4	8,8	17,3	12,38	Tarpeellinen lipidikalvon muodostuksessa
P13	M	7,65					Kalvoproteiini
P14	L	6,81	9,2	11,5		5,72	?
P15	L			11,1		13,69	
P16	M					8,73	
PF	M		12,3				
PG	M		11,2				
PH a	L		8,4 ^g				
b	L		16,7 ^g				
PI	S		9,0 ^g				
PJ	S		8,8 ^g				

^a McGraw ym. (1986), Gottlieb ym. (1988), Mindich ym. (1988), Casini ja Revel (1994)^b Hoogstraten ym. (2000)^c Gottlieb ym. (2002a, b)^d Qiao ym. (2000)^e Qiao ym. (2010b), molekyyli painot arvioitu nukleotidisekvenssistä ExPASy:n Compute pI/Mw -työkalulla^f yleiskatsaus Poranen ym., 2005b^g molekyyli paino arvioitu nukleotidisekvenssistä ExPASy:n Compute pI/Mw -työkalulla

1.1.3 Isännät

Tähän mennessä löydettyt cystovirukset on eristetty kasvien lehdistä (Vidaver ym., 1973; Mindich ym., 1999; Qiao ym., 2010b). Ne infektoivat Gram-negatiivisia bakteereita, pääasiassa *Pseudomonas*-suvun lajeja (Taulukko 3).

Taulukko 3. Cystovirusten isäntiä.

Kanta ^h	Viruksen kyky infektoida kantaa ^h										Bakteerin reseptori ^h	
	lähisukua φ6:lle						kaukaista sukua φ6:lle				tyypin IV pilus	karkea LPS
	φ6	φ7	φ9	φ10	φ11	φ14	φ8	φ12	φ13	φ2954 ⁱ		
HB10Y ^a	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
LM2333 ^b	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
LM2489 ^c	+						+	+	+	+	+	+
LM2509 ^d	-						+		+		-	+
MR ^e	+		+	+			-	-	-		+	-
ERA ^f	-	-	-				+					+
S4M ^g	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+		+

^a *P. syringae* pv. phaseolicola -kanta

^b HB10Y-mutantti, joka on resistentti useille DNA-faageille

^c LM2333-johdannainen

^d LM2489-johdannainen, jolta puuttuu tyypin IV pilus

^e *P. aeruginosa* -johdannainen

^f *P. pseudoalcaligenes* -kanta

^g S4-johdannainen; S4 on ERA-johdannainen, jolla on nonsense-suppressorimutaatio

^h Mindich ym. (1999)

ⁱ Qiao ym. (2010b)

Bakteriofagi φ6 eristettiin alun perin *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola HB10Y -bakteereista (Vidaver ym., 1973). HB10Y on kasvipatogeeni, joka aiheuttaa laikkutautia (*engl. halo blight*) papukasveilla. φ6 kykenee käyttämään isäntään myös muita *P. syringae* lajeja, sekä *P. pseudoalcaligenes* bakteereja (Mindich ym., 1976; Cuppels ym., 1981). φ6, sen lähisukulaiset ja φ2954 kiinnittyvät isäntäsolun tyypin IV pilukseen, jota isäntä itse käyttää kiinnittymiseen kasvissolun pinnalle (Bamford ym., 1976; Romantschuk ja Bamford, 1985; Romantschuk ja Bamford, 1986; Mindich ym., 1999; Qiao ym., 2010b). φ6:n kaukaisista sukulaisista φ8, φ12 ja φ13 eivät käytä isäntäsolun tunnistukseen piluksia, vaan ne kiinnittyvät suoraan isännän karkeaan, lyhyistä O-ketjuista koostuvaan LPS-kerrokseen (Mindich ym., 1999). HB10Y-kannan LPS:t sisältävät pitkiä O-ketjuja, minkä vuoksi kyseiset faagit eivät kykene infektoimaan tätä kantaa. HB10Y:stä on kuitenkin johdettu kantoja (LM2333, LM2489 ja LM2509), joiden LPS on karkeaa, ja joita faagit φ8,

ϕ 12 ja ϕ 13 käyttävät isäntinään (Mindich ym., 1999). Bakteriofagi ϕ 8 kykenee infektoimaan myös joitakin *Salmonella typhimurium* -kantoja, minkä lisäksi se pystyy tunkeutumaan *Escherichia coli* -soluihin ja lisääntymään niissä, kykenemättä kuitenkaan hajottamaan soluja (ns. kantajatila, *engl. carrier state*) (Mindich ym., 1999). Vastaavasti ϕ 13-faagi kykenee tunkeutumaan *S. typhimurium* ja *E. coli* -soluihin hajottamatta niitä.

2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Bakteriofagi ϕ 143 on eristetty solu- ja molekyylibiologian työkurssilla otetusta vesinäytteestä yhdessä sen isännän B314:n kanssa. Alustavien tutkimusten perusteella faagin oli todettu olevan dsRNA-virus, joka muistuttaa *Cystoviridae*-heimon jäseniä.

Tämän työn tarkoituksena oli

1. selvittää optimaaliset tuotto- ja puhdistusolosuhteet ϕ 143:lle
2. tutkia ϕ 143:n perusrakennetta ja infekti ominaisuuksia
3. tutkia ϕ 143:n genomia ja proteiinikoostumusta
4. karakterisoida ϕ 143:n isäntäbakteeri B314.

Vertailun vuoksi ϕ 143:lle suoritettut kokeet tehtiin myös bakteriofagi ϕ 6:lle, joka on *Cystoviridae*-heimon tyyppivirus.

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Bakteriofagit ja bakteerikannat

Bakteerikanta B314 ja sitä infektoiva bakteriofagi ϕ 143 eristettiin Jyväskylästä, Vehkalammesta (62° 14' 42", 25° 42' 54") otetusta vesinäytteestä SMBS504-kurssilla elokuussa 2009. B314:n oli alustavissa tutkimuksissa havaittu kuuluvan 16S rRNA-sekvenssin perusteella *Pseudomonas*-sukuun. ϕ 143:sta vertailtiin *Cystovirus*-suvun bakteriofagi ϕ 6:een, jonka isäntänä käytettiin *P. syringae* pv. phaseolicola HB10Y -kantaa, joka on myös ϕ 6:n luonnollinen isäntä (Vidaver ym., 1973). B314- ja HB10Y-kantojen kasvukäyrät määritettiin nestekasvatuksessa (26 °C, 220–230 rpm) mittaamalla optinen tiheys 550 nm:ssä (OD₅₅₀) Clormic-kolorimetrillä ja laskemalla yhdessä millilitrassa oleva solumäärä (cfu/ml) eri aikapisteissä. Solumäärän arviointi tapahtui laskemalla eri aikapisteistä otettujen rinnakkaisten näytteiden kasvatusmaljoille muodostamat pesäkkeet.

Infektiokokeisiin käytettiin *P. syringae* -kantoja LM2333 ja LM2509 (saatu Dennis Bamfordin tutkimusryhmältä, Helsingin yliopistosta). LM2333 on HB10Y:stä mutatoitu kanta (Mindich ym., 1999), joka on sensitiivinen ϕ 6:lle ja useille muille cystoviruksille (Taulukko 3). LM2509 on mutatoitu LM2489-kannasta, joka puolestaan on LM2333-mutantti (Mindich ym., 1999). LM2509-kannalla ei ole tyyppin IV pilusta, minkä seurauksena se ei kykene toimimaan isäntänä ϕ 6:lle.

Kaikkia bakteerikantoja kasvatettiin Luria Bertani (LB) -liemessä (Sambrook ja Russell, 2001; Liite I). LB-kasvatusmaljojen ja pehmytagarin valmistusohjeet löytyvät Liitteestä I.

Faagiliuosten tiitterit, eli kuinka monta plakkia muodostavaa yksikköä (pfu) on yhdessä millilitrassa liuosta, määritettiin titrausmaljoilta: 100 μ l faagiliuoksen laimennosta ja 200 μ l yön yli kasvanutta bakteeriviljelmää lisättiin 3 ml pehmytagariin (lämpötila n. 47 °C). Seosta sekoitettiin voimakkaasti, minkä jälkeen se levitettiin LB-kasvatusmaljan päälle. Maljojen annettiin seistä yön yli huoneenlämmössä ennen tiitterien määrittystä.

3.2 Faagin tuottaminen ja puhdistus

Faagikantaliuosten valmistukseen käytettiin semikonfluentteja eli ”puoliksi syötyjä” maljoja, jotka valmistettiin titrausmaljojen tapaan (ks. kohta 3.1). Maljojen pehmytagar

kaavittiin kasvatuspulloihin, joihin lisättiin 4 ml LB-lientä yhtä maljaa kohti; viljelmän annettiin olla ravistelussa 3–4 h huoneenlämmössä. Pehmytagar ja solut poistettiin sentrifugoimalla (Sorvall SS-34-roottorilla 10 000 rpm, 10 min, 4 °C). Faagin tuotannon optimoimiseksi tehtiin useita kasvatuskokeita 40–60 ml LB-liemessä. Kokeissa käytettiin eri solutiheyksiä eli infektiiohetkiä, infektion moninkertoja (*engl. multiplicity of infection, MOI*), kasvulämpötiloja ja ravistelunopeuksia. Kasvatuksen etenemistä seurattiin mittaamalla OD₅₅₀ Clormic-kolorimetrillä, minkä lisäksi viljelmän tiitteri selvitettiin lyysin loppuvaiheessa.

Faagin puhdistusta varten isäntää kasvatettiin LB-liemessä (330–440 ml per pullo; 26 °C 220 rpm), kunnes solutiheys oli saavuttanut optimaalisen tason. ϕ 143:sta lisättiin B314:n joukkoon MOI-arvolla 2 ja ϕ 6:sta HB10Y:n joukkoon MOI-arvolla 5–15; ravistelunopeus laskettiin 110 rpm:ään ja kasvatusta jatkettiin, kunnes solut olivat hajonneet. Optisen tiheyden laskettua viljelmään lisättiin DNAasi I:stä (5 μ g/ml, Sigma-Aldrich) poistamaan isännän DNA:ta. Soluriekaleet poistettiin sentrifugoimalla (Sorvall F9S-4x1000y-roottori, 8000 rpm, 15 min, 4 °C), minkä jälkeen faagipartikkelit konsentroidiin lisäämällä lyaattiin polyetyleeniglykoli 6000:tta (PEG6000; 10 % (w/v)) ja natriumkloridia (0,5 M), joiden annettiin liueta kylmähuoneessa n. 30 min sekoituksella. Faagipartikkelit sentrifugoitiin pohjaan (Sorvall F9S-4x1000y-roottori, 8000 rpm, 20 min, 4 °C) ja muodostunut sakka liuotettiin 20 mM kaliumfosfaattipuskuriin (pH 7,2) 4 °C:ssa yön yli. Aggregaatit erotettiin suspensiosta sentrifugoimalla (Sorvall SS-34-roottori, 9000 rpm, 15 min, 4 °C).

Faagisuspension ensimmäisen vaiheen puhdistus (1X) tapahtui sentrifugoimalla SW28-roottorilla (Beckman) 24 000 rpm, 40 min, 15 °C, 5–20 % sakkaroosigradientissa 20 mM KPO₄-puskurissa (pH 7,2). Gradientin paksuin valoa siroava vyöhyke eristettiin talteen. Tätä 1X-eristettyä virusta puhdistettiin toisessa vaiheessa (2X) SW41-roottorilla (Beckman) 32 000 rpm, 18–19 h, 5 °C, 20–70 % sakkaroosigradientissa 20 mM KPO₄-puskurissa (pH 7,2). 2X-gradientin paksuin valoa siroava vyöhyke eristettiin talteen. Osa ϕ 143:n 1X- ja 2X-graduateista purettiin faagipartikkelipitoisuuden vaihtelun analysointia varten: 1X-gradientti jaettiin 1 ml:n ja 2X-gradientti 0,5 ml:n fraktioihin, joiden tiitterit määritettiin. Graduateista eristetyt 1X- ja 2X-vyöhykkeiden faagipartikkelit sentrifugoitiin pohjaan 70 Ti-roottorilla (Beckman) 33 000 rpm, 3 h, 5 °C 20 mM KPO₄-puskurissa (pH 7,2). Muodostuneet sakat liuotettiin 20 mM KPO₄-puskuriin (pH 7,2) ja säilöttiin –80

°C:een. Faagipartikkeleiden määrän vaihtelua puhdistuksen aikana seurattiin määrittämällä näytteiden tiitterit eri puhdistusvaiheissa.

3.3 Säilyvyyskokeet

Säilyvyyskokeisiin käytettiin 2X-puhdistettuja faagiliuoksia, joista tehtiin 1:10 000 -laimennokset kuhunkin tutkittavaan puskuriin (Taulukko 4). Näytteiden tiitterit määritettiin eri aikapisteiden kohdalla, yhteensä n. 2 kuukauden ajalta. Tiitterit selvitettiin kuten edellä (ks. kohta 3.1), paitsi että näytteet lisättiin maljojen pinnalle vasta pehmytagarin jäähmettymisen jälkeen 10 µl:n tippoina.

Taulukko 4. Säilyvyystestien puskurit ja olosuhteet.

Puskuri	pH	Lisätty	Lämpötila
Kaliumfosfaatti	7,2		4 °C
Kaliumfosfaatti	7,2		RT
Kaliumfosfaatti	7,2		- 20 °C
Kaliumfosfaatti	7,2	50 mM CaCl ₂	4 °C
Kaliumfosfaatti	7,2	150 mM CaCl ₂	4 °C
Kaliumfosfaatti	7,2	50 mM MgSO ₄	4 °C
Kaliumfosfaatti	7,2	150 mM MgSO ₄	4 °C
Kaliumfosfaatti	6,8		4 °C
Kaliumfosfaatti	8		4 °C
Tris-HCl	7,2		4 °C
Tris-HCl	7,2	50 mM CaCl ₂	4 °C
Tris-HCl	7,2	50 mM MgSO ₄	4 °C
Tris-HCl	7,5		4 °C
Tris-HCl	8		4 °C
MES	6,3		4 °C

3.4 Infektiokokeet

Infektiokokeissa tutkittiin faagien ϕ 143 ja ϕ 6 kykyä infektoida bakteerikantoja B314, HB10Y, LM2333 ja LM2509. Määrittystä varten kasvatusmaljojen pinnalle levitettiin pehmytagarkerros, joka sisälsi yhtä neljästä bakteerikannasta. Kunkin maljan päälle lisättiin tipat kummankin faagin kantaliuosta eri laimennoksina. Maljojen annettiin olla huoneen lämmössä yön yli, minkä jälkeen maljat tarkastettiin.

3.5 Kloroformisensitiivisyyden testaus

φ143-kantaliuoksen päälle lisättiin tippa kloroformia ja seosta sekoitettiin voimakkaasti. Faasien annettiin erottua, minkä jälkeen yläfaasi kerättiin talteen testausta varten. Tippa kloroformikäsiteltyä näytettä ja käsittelemätöntä kantaliuosta lisättiin LB-maljoille, joiden päälle oli kaadettu faagin isäntää sisältävää pehmytagaria. Maljojen annettiin olla yön yli huoneenlämmössä ennen tulosten analysointia.

3.6 Elektronimikroskopointi

Puhdistettuja faagiliuoksia värjättiin negatiivisesti 1 % fosfovolframihapolla, pH 6,5: hila pidettiin faagiliuoksessa 1–3 min ja värissä 1 min; hila kuivattiin suodatinpaperilla ennen ja jälkeen värjäyksen. Näytteet kuvattiin JEOL JEM-1200EX -läpivalaisuelektronimikroskoopilla.

3.7 Proteiinipitoisuuden ja -koostumuksen määrittäminen

Puhdistettujen faagiliuosten proteiinikonsentraatiot määritettiin Coomassie brilliant blue -menetelmällä käyttäen naudan seerumin albumiinia standardina (Bradford, 1975).

Faagien proteiinkoostumukset analysoitiin natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesissa (SDS-PAGE). Näytteiden konsentroidi tapahtui 5 % ylägeelissä ja proteiinien erottelu 15 % ajogeelissä. Proteiininäytteet liuotettiin SDS-PAGE:a varten kolminkertaiseen näytekupuriin ja denaturoitiin keittämällä 5 min. SDS-PAGE:n ajolaite valmisteltiin ja täytettiin RB-ajopuskurilla. Näytteet, molekyylipainostandardit (Precision Plus Protein Standard, Bio-Rad; PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas) ja φ6-markkeri lisättiin ylägeelin kaivoihin. SDS-PAGE-ajo suoritettiin 100–200 V ja 15 mA noin 20 h. Ajon jälkeen geeliä värjättiin Coomassie brilliant blue -liuoksessa 2 h, minkä jälkeen ylimääräinen väri poistettiin 10 % (v/v) etikkahapolla ja geeli kuvattiin. SDS-PAGE:n puskurien ja geelien valmistusohjeet löytyvät Liitteestä II.

3.8 Adsorptiotesti

Adsorptiotestejä varten B314- ja HB10Y-kantoja kasvatettiin aluksi 28 °C 220 rpm ja myöhemmin 23 °C 110 rpm, kunnes solutiheys oli B314:lla n. $1,6 \times 10^9$ cfu/ml ja HB10Y:llä n. $1,2 \times 10^9$ cfu/ml. Solut nostettiin huoneenlämpöön, jaettiin eppendorf-putkiin ja infektoitiin faagilla (lisäys 2×10^3 pfu). Näytteet sentrifugoitiin (13 000 rpm, 3 min, Eppendorf-pöytäsentrifuugi) kunkin aikapisteen kohdalla (2, 4, 6, 8, 10, 15, 25 tai 40 min infektion jälkeen), minkä jälkeen supernatanttien tiitterit määritettiin.

3.9 Faagigenomin eristys ja analysointi

Faagien dsRNA eristettiin 1X- tai 2X-puhdistetuista faagiliuoksista TRI Reagent[®] RT-liuoksella (Molecular Research Center) ja kloroformilla. TRI Reagenttia lisättiin 1:1 ja kloroformia 1:5 faaginäytteen sekaan ja seosta sekoitettiin voimakkaasti. Faasien annettiin erottua n. 2 min huoneenlämmössä ennen sentrifugointia (11 200 rpm, 15 min, 4 °C). Yläfaasi kerättiin talteen ja sille toistettiin edellinen kaksi kertaa, minkä jälkeen viimeisimpänä kerätty yläfaasi sentrifugoitiin (11 200 rpm, 10 min, 4 °C) ja sen yläfaasi kerättiin talteen. RNA saostettiin liuoksesta isopropanolilla ja kerättiin putken pohjaan sentrifugoimalla (11 200 rpm, 10 min 4 °C). RNA-sakka pestiin 70 % etanolilla 3–4 kertaa ja liuotettiin steriiliin veteen. Analysointia varten RNA käsiteltiin DNAasi I:llä (Fermentas) valmistajan ohjeiden mukaisesti. RNA analysoitiin agarosigeelielektroforeesilla (AGE). Tätä varten valmistettiin 0,8 % agarosigeeli 1X Tris-asetatti-etyleenidiamiini-tetraetikkahappopuskuriin (TAE-puskuri), johon oli lisätty etidiumbromidia (0,5 µg/ml).

3.10 Kaksijuosteisen RNA:n muuttaminen DNA:ksi

φ143-faagin dsRNA-genomin kääntämiseksi komplementaariseen DNA-muotoon (cDNA) käytettiin menetelmää, jossa dsRNA:n 3'-päihin kiinnitettiin silmukan muodostavat alukkeet (*engl. full-length amplification of cDNA*; Maan ym., 2007; Potgieter ym., 2009; Darissa ym., 2010). Reaktiot tehtiin artikkelin Darissa ym. (2010) ohjeita mukailien (Liite III). cDNA-saanto tarkistettiin 1 % AGE:ssa (1X TAE-puskurissa, 0,5 µg/ml etidiumbromidissa) PCR-monistuksen jälkeen. Menetelmällä ei saatu tuotettua cDNA:ta.

3.11 Isännän 16S rRNA:n sekvensointi

B314-kannan genomi eristettiin GeneJET Genomic DNA Purification Kit -reagenssisarjalla (Fermentas) yön yli kasvaneesta nestekasvatuksesta. B314:n 16S rRNA-sekvenssistä monistettiin n. 900 bp:n alue Com2-Ph- (Schwieger ja Tebbe, 1998) ja fD1-alukkeilla (Weisburg ym., 1991) DreamTaq™ Green DNA-polymeraasilla (Fermentas) T3 Thermocyclerissa (Biometra). PCR suoritettiin polymeraasin valmistajan ohjeiden mukaisesti. PCR-tuotteet puhdistettiin QIAquick PCR Purification Kit -reagenssisarjalla (Qiagen) ja analysoitiin 1 % AGE-geelillä, josta PCR-tuote eristettiin QIAquick Gel Extraction Kit -reagenssisarjalla (Qiagen). Sekvensointi tapahtui BigDye® Terminator v.3.1 Kit -reagenssisarjalla (Applied Biosystems) ABI Prism 3100 Gene Analyser -laitteella käyttämällä Com2-Ph- ja fD1-alukkeita. Saatua sekvenssiä vertailtiin BLAST-työkalulla (National Center for Biotechnology Information, NCBI) nukleotidisekvenssietokantoihin käyttäen megablast-algoritmia.

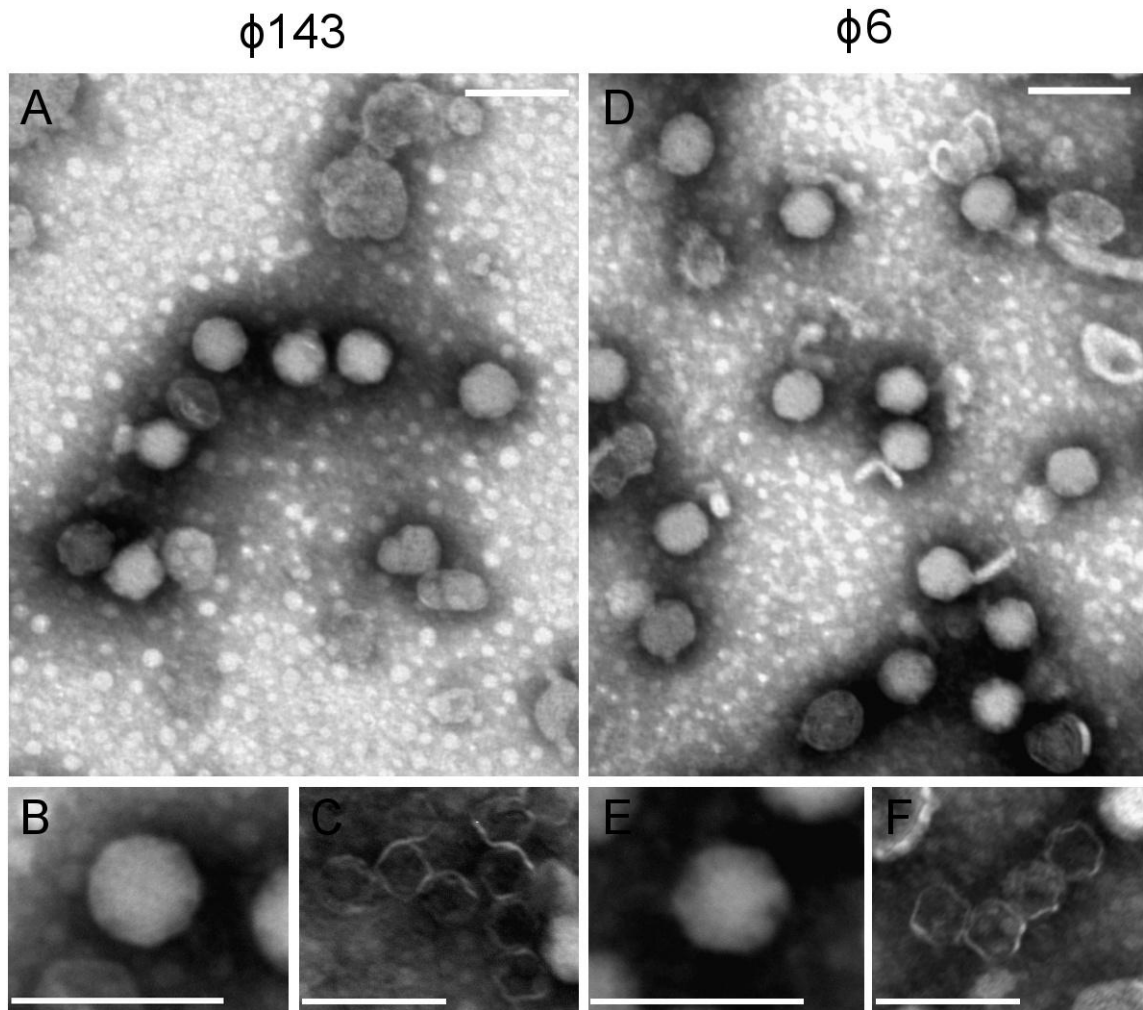
4 TULOKSET

4.1 Infektio-ominaisuuksien ja perusrakenteen määrittäminen

Bakteriofagi ϕ 143:n havaittiin olevan sensitiivinen kloroformille, mikä viittaa lipidikalvon olemassaoloon. Viitteitä ulkoisesta lipidikalvosta saatiin myös EM-kuvista (Kuva 4), joissa ϕ 143:n rakenne (Kuva 4A ja 4B) vastasi ϕ 6-faagin pallomaista rakennetta (Kuva 4D ja 4E). ϕ 143-näytteissä nähtiin lisäksi tyhjiä polyhedraalisia partikkeleja (Kuva 4C), joita oli myös ϕ 6-näytteissä (Kuva 4F). EM-kuvia vertailemalla faagien virionien ja polyhedraalisten partikkeleiden voitiin havaita olevan lähes samankokoisia, mutta koska mikroskooppia ei ollut kalibroitu, tarkkaa kokoa niille ei voitu mitata.

Bakteriofagin ϕ 143:n kykyä infektoida ϕ 6-faagin isäntäbakteereja HB10Y ja LM2333, sekä ϕ 6:lle kaukaisempaa sukua olevien cystovirusien isäntää LM2509, ja ϕ 6:n kykyä infektoida ϕ 143:n isäntää B314 testattiin infektiokokeilla. Kokeista kävi ilmi, ettei ϕ 143 kyennyt infektomaan muita kuin omaa isäntäänsä, ja ettei ϕ 6 pystynyt infektomaan B314-soluihin (Taulukko 5). Lisäksi ϕ 143:n plakit poikkesivat morfologialtaan ϕ 6:n plakeista ollen muodoltaan selvästi halomaisempia, eli kirkkaita keskeltä ja sameita keskuksen ympäriltä, kun taas ϕ 6:n plakit olivat lähes kirkkaita, puhki syötyjä täpliä (Kuva 5).

Adsorptiotesteistä voitiin päätellä, ettei ϕ 143-faagi kyennyt adsorboitumaan HB10Y-soluihin eikä ϕ 6-faagi B314-soluihin. Tuloksista nähtiin myös ϕ 143:n adsorption B314-soluihin olevan heikompi verrattuna ϕ 6:n adsorptioon HB10Y-soluihin. Virusmäärien vaihtelu joidenkin aikapisteiden välillä oli kuitenkin liian suurta, jotta tarkkoja adsorptiokäyriä olisi pystytty piirtämään. Täten myös tarkkoja adsorptiokertoimia ei kyetty laskemaan.

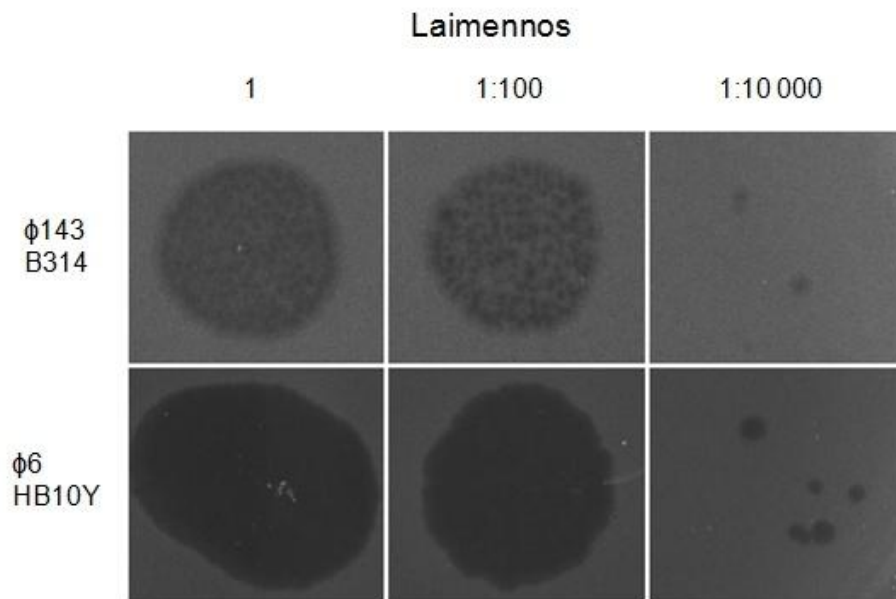


Kuva 4. Bakteriofagien $\phi 143$ ja $\phi 6$ elektronimikroskopiointi. Näytteet valmistettiin värjäämällä 1X- tai 2X-puhdistettua virusta negatiivisesti 1 % PTA:lla (pH 6,5). $\phi 143$:n rakenne (A, B) vastasi $\phi 6$:n pallomaista rakennetta (D, E). Lisäksi $\phi 143$ -näytteistä löydettiin tyhjiä polyhedraalisia rakenteita (C), joita havaittiin myös $\phi 6$ -näytteissä (F). Mittajana 100 nm (ei kalibroitu).

Taulukko 5. Infektiokoe.

Kanta ^a	$\phi 143$	$\phi 6$
B314	+	-
HB10Y	-	+
LM2333	-	+
LM2509	-	-

^a Bakterikannat on kuvailtu Materiaalit ja Menetelmät -osiossa

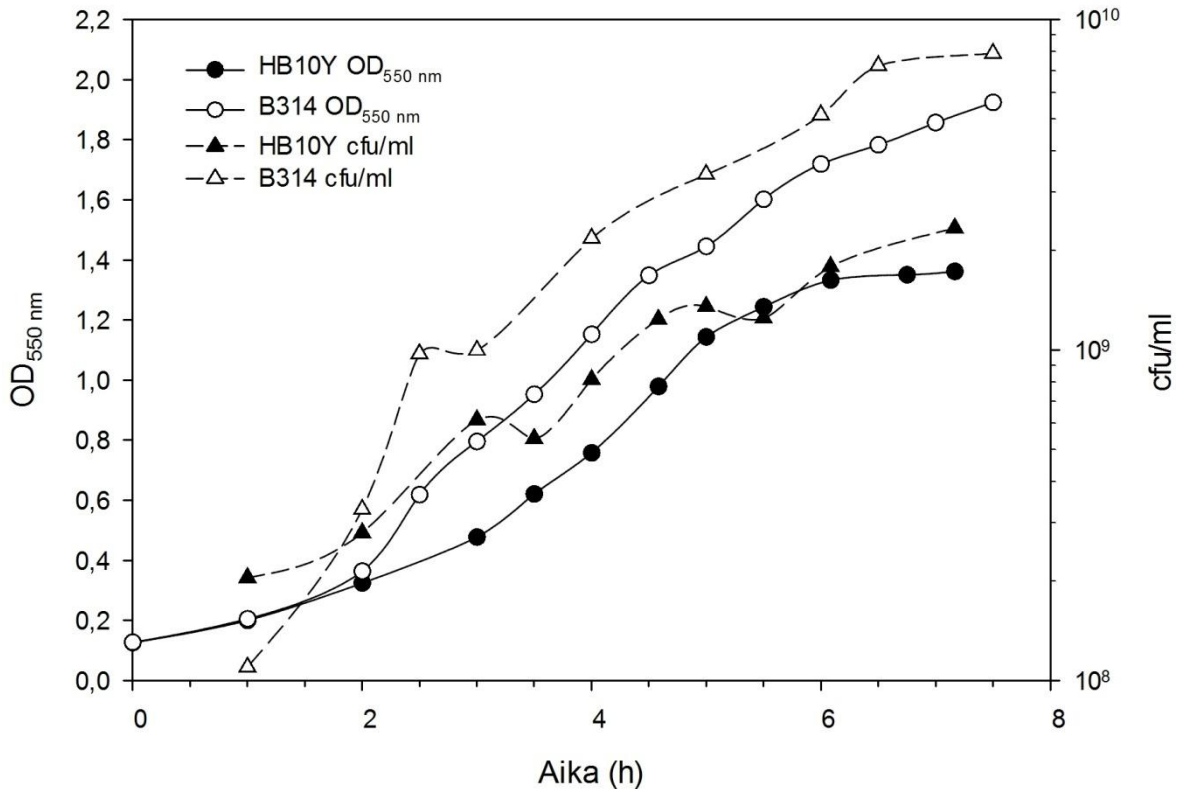


Kuva 5. ϕ 143:n ja ϕ 6:n plakkimorfologia luonnollisessa isännässä.

4.2 Virustuotanto ja -puhdistus, sekä säilyvyyskokeet

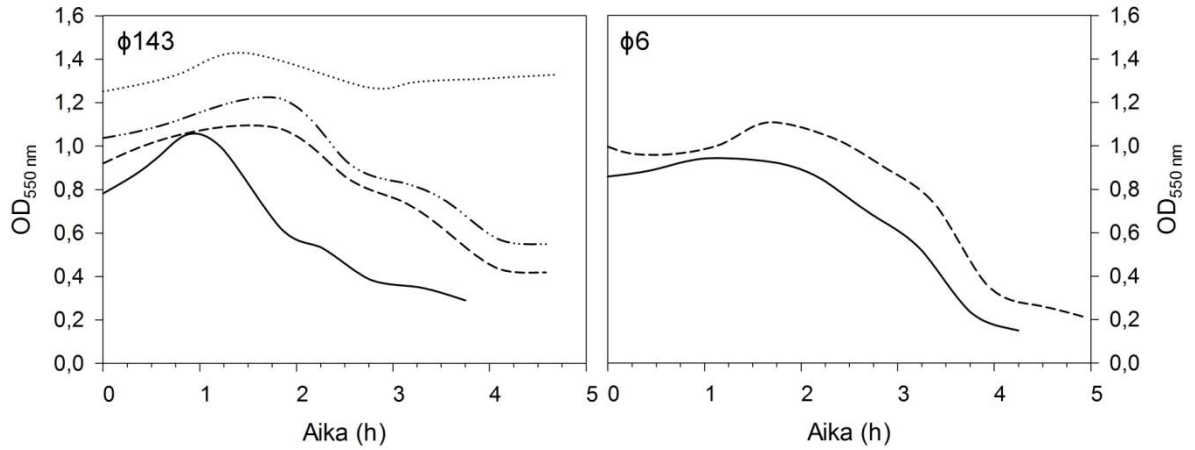
Bakteriofagien tuottamista varten ϕ 143:n isännän B314:n ja ϕ 6:n isännän HB10Y:n kasvukäyrät määritettiin (Kuva 6). B314-kannan eksponentiaalisen kasvun vaihe sijoittautui 3×10^8 cfu/ml:n ja 7×10^9 cfu/ml:n välille, kun HB10Y-kannalla vaihe oli lyhyempi, 3×10^8 – 2×10^9 cfu/ml.

Optimaalisen infektiotietken selvittämiseksi B314 infektoitiin ϕ 143-faagilla eri solutiheyksissä (Kuva 7), jotka valittiin eksponentiaalisen kasvun vaiheen alueelta. Infektio solutiheyden ollessa $1,5 \pm 0,2 \times 10^9$ cfu/ml antoi parhaimmat tiitterit. Myös lämpötilan vaikutusta ϕ 143:n infektiioon testattiin eri kasvatuslämpötiloissa (Kuva 8). Korkeammassa lämpötiloissa (28–30 °C) saadut tiitterit olivat huonompia kuin lämpötiloissa 24–26 °C. ϕ 6:n tuotannossa (Kuva 8) tiitterit olivat lähes yhtä suuria 24 °C:n ja 28 °C:n välillä. ϕ 143:n vertaileminen ϕ 6:een oli tässä tapauksessa vaikeaa, sillä faageilla käytettiin eri infektiomoninkertoja (ϕ 143: MOI 2, ϕ 6: MOI 5).

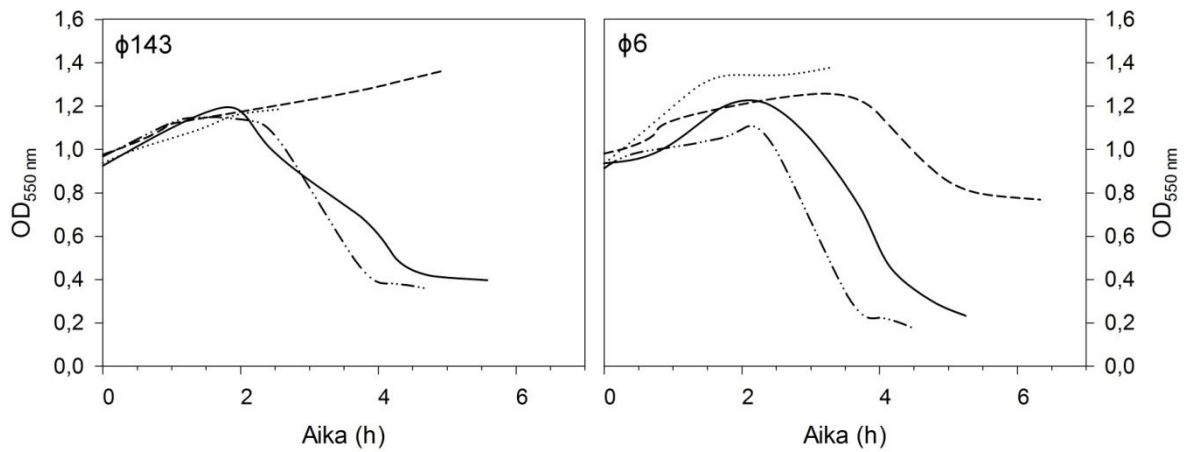


Kuva 6. B314:n ja HB10Y:n kasvukäyrät. Soluja kasvatettiin LB:ssa 26 °C, 220–230 rpm. Kasvatusta seurattiin mittaamalla OD_{550nm} eri aikapisteissä ja mittaamalla eri aikapisteistä otettujen näytteiden virustiitteri (cfu/ml).

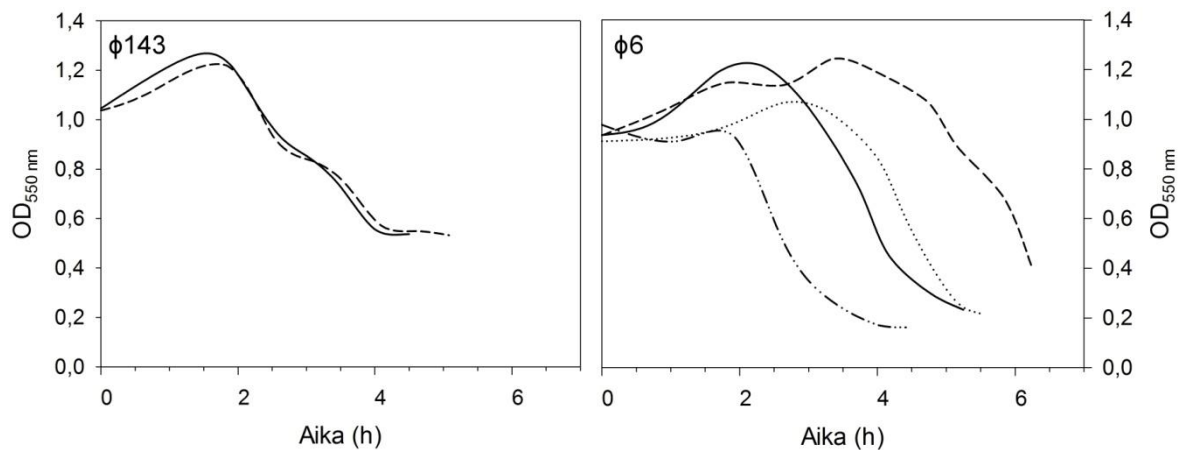
Lisäksi tutkittiin eri infektiomoninkertojen vaikutusta faagisaantoon (Kuva 9). $\phi 143$ -faagilla kokeiltaviksi MOI-arvoiksi valittiin 2 ja 5. Korkeampia MOI-arvoja ei kokeiltu, koska faagikantaliuosten tiittereitä ei saatu tarpeeksi suuriksi, jotta infektiio olisi ollut mahdollista toteuttaa muuttamatta kasvatustilavuutta merkittävästi. $\phi 143$:n faagikantaliuosten tiitterit olivat parhaimmillaan $\sim 3 \times 10^{11}$ pfu/ml, mutta useimmiten tiitterit jäivät $\sim 1 \times 10^{11}$ pfu/ml tai alle; $\phi 6$ -faagilla tiitterit olivat tavallisesti $\sim 1 \times 10^{12}$ pfu/ml tai hieman alle. $\phi 143$:n MOI-arvolla 2 saadut tiitterit olivat kuitenkin lähes yhtä suuria MOI-arvoilla 5 saatujen tiittereiden kanssa. $\phi 6$:lla tarvittiin suurempia MOI-arvoja (Kuva 9): paras saanto saatiin MOI-arvolla 15, mutta ero MOI-arvoon 5 ja 10 ei ollut suuri.



Kuva 7. Faagituotannon infektiotietken optimointi. B314-solut infektoitiin $\phi 143$ -faagilla MOI-arvolla 2 ja HB10Y-solut $\phi 6$ -faagilla MOI-arvolla 5. Infektiotietkellä käytetyt solutiheydet: — $1,0 \times 10^9$ cfu/ml; --- $1,3 \times 10^9$ cfu/ml; -·-·- $1,7 \times 10^9$ cfu/ml; ····· $2,5 \times 10^9$ cfu/ml. Faagi lisättiin aikapisteessä 0.



Kuva 8. Faagituotannon lämpötilaoptimointi. B314-solut infektoitiin $\phi 143$ -faagin tapauksessa MOI-arvolla 2 ja HB10Y-solut $\phi 6$ -faagin tapauksessa MOI-arvolla 5. Kasvatustempötilat: -·-·- 24 °C; — 26 °C; --- 28 °C; ····· 30 °C. Faagi lisättiin aikapisteessä 0.



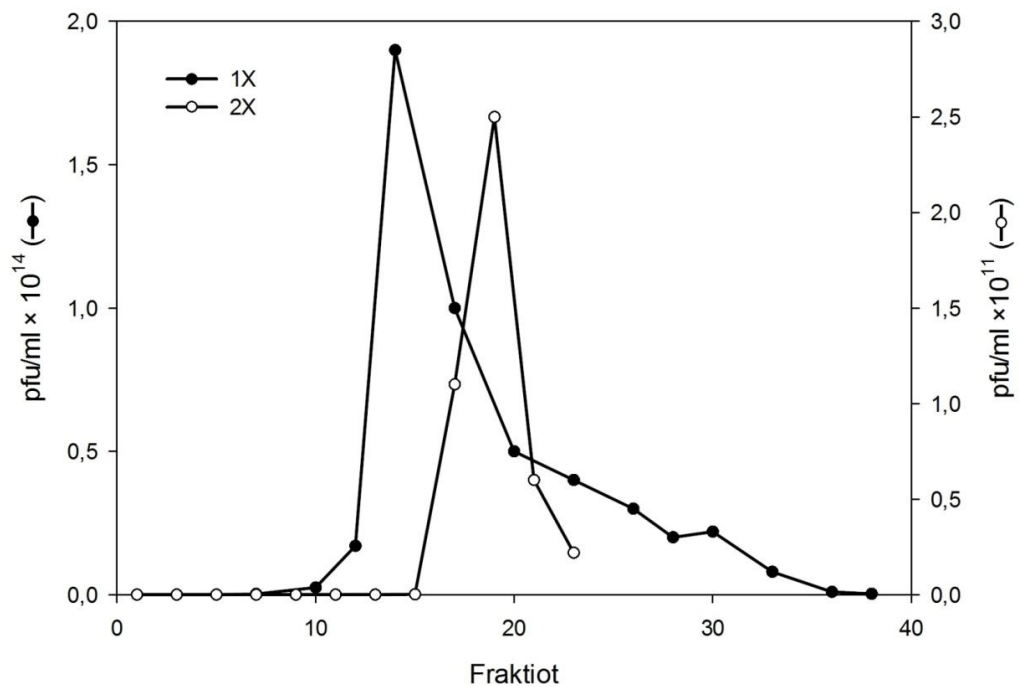
Kuva 9. Faagituotanto MOI:n optimointi. $\phi 143$ -faagin isäntänä käytettiin B314:sta ja $\phi 6$ -faagin isäntänä HB10Y:tä. Käytetyt MOI-arvot: --- 2; — 5; ····· 10; -·-·- 15. Faagi lisättiin aikapisteessä 0.

Ravistelun vaikutusta faagin tuotantoon tutkittiin sekä kasvatuskokeissa että isommissa tilavuuksissa tehdyissä kasvatuksissa. Kasvatuskokeissa testattiin eri ravistelunopeuksien vaikutusta faagin saantoon. Osaa viljelmistä ravisteltiin koko ajan 220 rpm:ssä tai 110 rpm:ssä, ja osaa aluksi 220 rpm:ssä ja infektion jälkeen 110 rpm:ssä. Tulos oli ϕ 143- ja ϕ 6-faageilla sama: infektion jälkeinen ravistelu 220 rpm:ssä pienensi virustiitteriä. Isoissa nestekasvatuksissa osassa tapauksista viljelmät olivat Erlenmayer-pulloissa, joiden pohja oli kapeampi kuin toisten pullojen. Näissä pulloissa solut hajosivat hitaammin tai eivät ollenkaan. Kun viljelmät siirrettiin kesken kasvatuksen leveämpipohjaisiin pulloihin, osassa viljelmistä solut alkoivat hajoamaan samaan tapaan kuin leveämpipohjaisten pullojen viljelmät.

Seuraamalla eri puhdistusvaiheista saatuja virustiittereitä voitiin selvittää, kuinka paljon infektiivisiä viruspartikkeleita menetettiin kussakin puhdistusvaiheessa (Taulukko 6). Määrittämällä lisäksi puhdistettujen faagiliuosten proteiinipitoisuudet voitiin laskea faagien spesifiset infektiviteetit. ϕ 143-faagin spesifiseksi infektiviteetiksi saatiin 1X-puhdistetuille faageille 4×10^9 pfu/ μ g proteiinia ja 2X-puhdistetuille 6×10^9 pfu/ μ g proteiinia. ϕ 6-faagin spesifiseksi infektiviteetiksi saatiin 1X- ja 2X-näyteistä 3×10^9 pfu/ μ g proteiinia, mikä on lähellä kirjallisuudessa esitettyä 1X-näytteen arvoa 4×10^9 pfu/ μ g proteiinia (Bamford ym., 1995). Faagimäärien vaihtelut ϕ 143:n puhdistusgradien-teissa on nähtävissä Kuvassa 10.

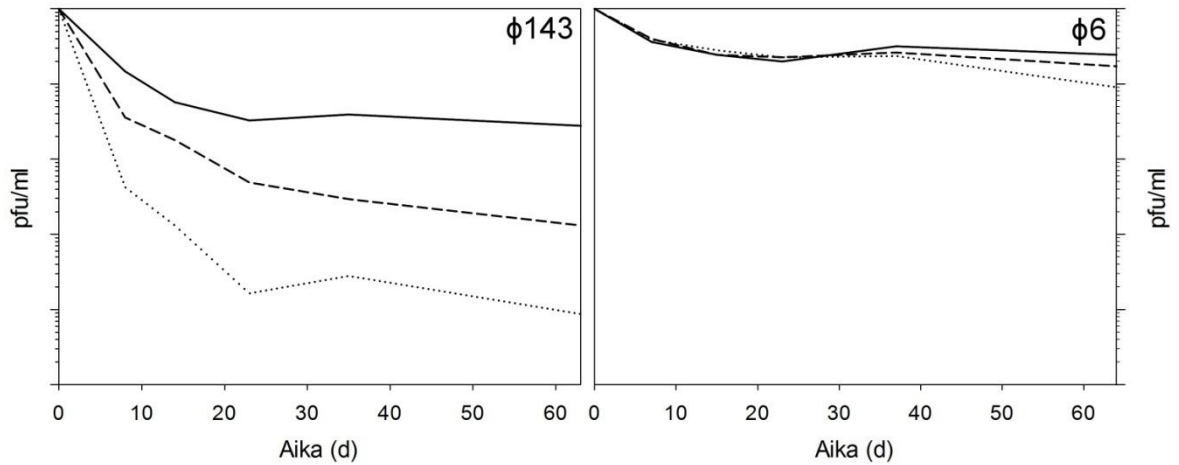
Taulukko 6. Faagin saanto eri puhdistusvaiheissa.

Näyte	ϕ 143				ϕ 6			
	Tilavuus (ml)	Tiitteri (pfu/ml)	Yhteensä (pfu:ta)	Saanto-%	Tilavuus (ml)	Tiitteri (pfu/ml)	Yhteensä (pfu:ta)	Saanto-%
Lysaatti	1760	$9,5 \times 10^{11}$	$1,7 \times 10^{15}$	100	1700	$5,3 \times 10^{12}$	$9,0 \times 10^{15}$	100
PEG-sakka	16	$1,5 \times 10^{13}$	$2,4 \times 10^{14}$	14	12	$1,6 \times 10^{14}$	$1,9 \times 10^{15}$	21
1X-puhdistus	0,2	$7,3 \times 10^{13}$	$1,5 \times 10^{13}$	0,9	0,3	$1,0 \times 10^{14}$	$3,0 \times 10^{13}$	0,3
2X-puhdistus	0,05	$6,1 \times 10^{13}$	$3,1 \times 10^{12}$	0,2	0,13	$9,6 \times 10^{12}$	$1,2 \times 10^{12}$	0,01

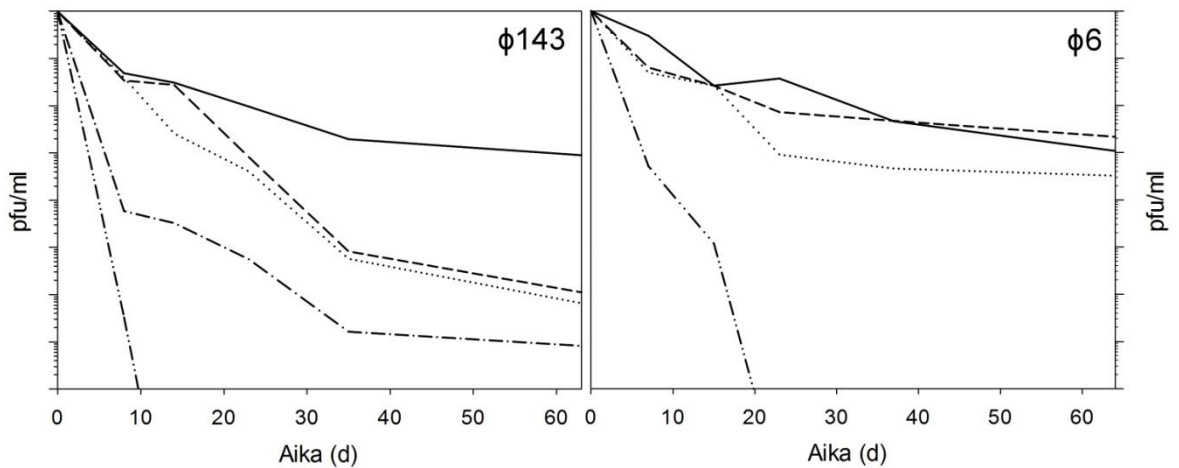


Kuva 10. ϕ 143-faagin puhdistusgradienttien fraktiointi. 1X-puhdistus suoritettiin vyöhykesentrifugoinnilla 5–20% sakkaroosigradientissa ja 2X-puhdistus isopyknisellä sentrifugoinnilla 20–70% sakkaroosigradientissa KPO_4 -puskurissa (pH 7,2). 1X-fraktioiden tilavuus oli 1 ml ja 2X-fraktioiden 0,5 ml.

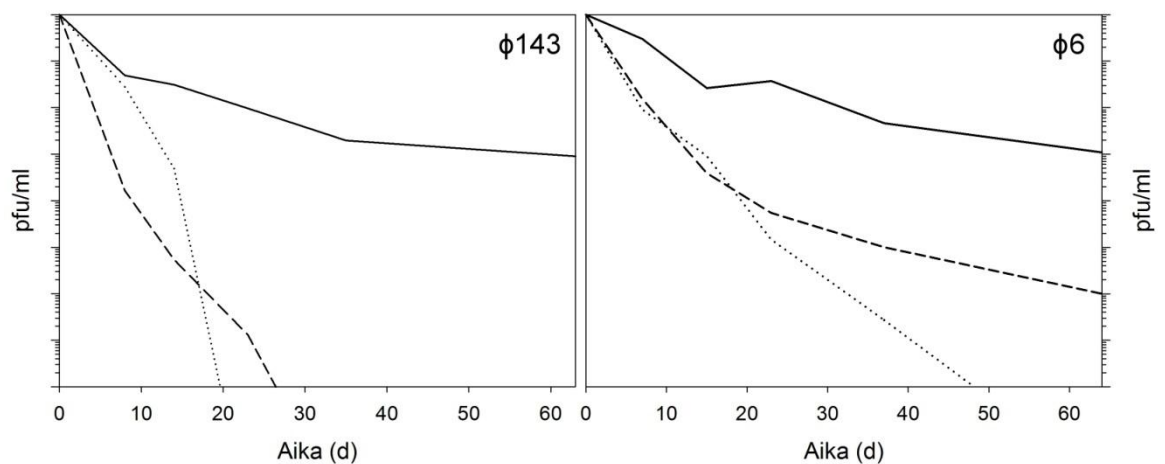
Puhdistettujen ϕ 143- ja ϕ 6-virionien säilyvyyttä testattiin 1–2 viikon välein n. 2 kk ajan erilaisissa puskuureissa (Taulukko 4). Testatuista puskuureista 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) laski vähiten infektiivisten viruspartikkeleiden määrää molemmilla faageilla (Kuva 11), tosin erot ϕ 143-näytteissä olivat huomattavasti suuremmat. Lisäksi magnesium- ja kalsiumioneiden lisääminen oli haitallista ϕ 143:lle sekä Tris-HCl-puskurissa että kaliumfosfaattipuskurissa (Kuva 12). Fosfaattipuskurissa kalsiumkloridin lisäys sai toisaalta aikaan kalsiumin sakkautumista, millä saattoi olla vaikutusta tuloksiin. ϕ 6:n kohdalla magnesiumsulfaatin lisääminen fosfaattipuskuriin ei näyttänyt juurikaan vaikuttavan säilyvyyteen, kun Tris-HCl-puskurissa sama lisäys vähensi infektiivisten virusten määrää merkittävästi. Tris-HCl-puskuriin lisätyt kalsiumionit vähensivät ϕ 143- ja ϕ 6-virionien määrää lähes saman verran kuin magnesium. Suurimman vaikutuksen faagien säilyvyyteen sai aikaan säilytyslämpötila (Kuva 13). Infektiivisten ϕ 143-partikkeleiden määrä laski vähiten 4 °C:ssa, kun huoneenlämmössä infektiivisiä viruspartikkeleita ei havaittu enää kuukauden jälkeen ja –20 °C:ssa kolmen sulatuskerran jälkeen. ϕ 6:n säilyvyys oli ϕ 143:sta pidempi huoneenlämmössä, ja infektiivisiä ϕ 6-virioneja ei havaittu enää viidennen sulatuskerran jälkeen. pH:lla (6,3–8,0) ei havaittu olevan selvää vaikutusta ϕ 143:n ja ϕ 6:n virionien säilymiselle.



Kuva 11. Puskurin vaikutus $\phi 143$ - ja $\phi 6$ -virionien määrään. — Tris-HCl (pH 8); ---- MES (pH 6,3); KPO_4 (pH 8). Puskureiden pitoisuus oli 20 mM; säilytys tapahtui 4 °C:ssa.



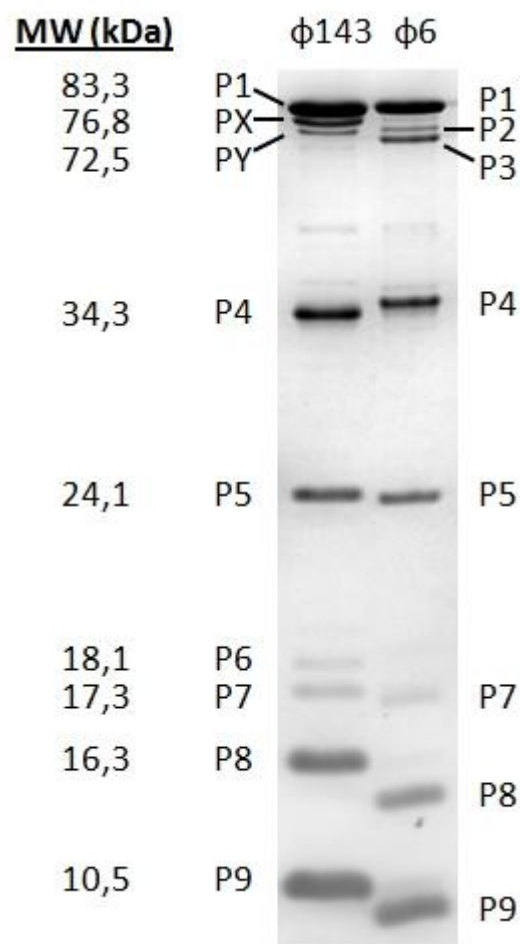
Kuva 12. Magnesium- ja kalsiumpitoisuuksien vaikutus $\phi 143$ - ja $\phi 6$ -virionien määrään. — kontrolli; ---- 50 mM Mg^{2+} ; 150 mM Mg^{2+} ; -.-.- 50 mM Ca^{2+} ; - - - - 150 mM Ca^{2+} . Näytteet olivat 20 mM KPO_4 -puskurissa (pH 7,2), 4 °C:ssa.



Kuva 13. Lämpötilan vaikutus $\phi 143$ - ja $\phi 6$ -virionien määrään. — 4 °C; ---- huoneenlämpö; -20 °C. Näytteet olivat 20 mM KPO_4 -puskurissa (pH 7,2), 4 °C:ssa.

4.3 Proteiinien karakterisointi

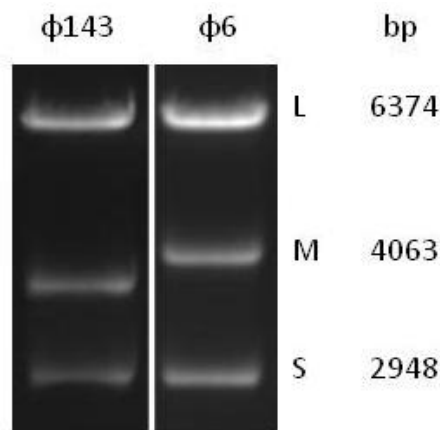
Bakteriofagi $\phi 143$:n proteiineja vertailtiin $\phi 6$ -faagin proteiineihin analysoimalla puhdistetut näytteet SDS-PAGE-geelissä (Kuva 14). $\phi 6$:n proteiineilla P1, P4, P5, P6, P7, P8 ja P9 havaittiin olevan lähes samankokoiset vastineet $\phi 143$ -näytteissä, minkä vuoksi kyseiset $\phi 143$ -faagin proteiinit nimettiin vastaavien $\phi 6$ -faagin proteiinien mukaisesti. $\phi 6$:n P2 ja P3 proteiineja vastaavien $\phi 143$:n proteiinien (PX ja PY) keskinäistä järjestystä ei pystytty määrittämään geelistä.



Kuva 14. Bakteriofagien $\phi 143$ ja $\phi 6$ proteiini-analyysi. Bakteriofagit puhdistettiin sakkaroosigradientissa ja analysoitiin 15 % SDS-PAGE:ssa. Geeli värjättiin Coomassie brilliant blue:lla. $\phi 6$:n P6-proteiinin vyöhyke ei ole näkyvissä. $\phi 143$:n proteiinien molekyylipainot (vasen laita) on arvioitu geeliltä käyttämällä hyväksi $\phi 6$:n proteiinien tunnettuja molekyylimassoja (Taulukko 2).

4.4 Genomin karakterisointi

Bakteriofaagien $\phi 143$ ja $\phi 6$ genomit eristettiin TRI Reagent/kloroformi-käsittelyllä ja käsiteltiin DNAasi I:llä mahdollisen DNA:n poistamiseksi ennen analysointia agarosigeelielektroforeesilla (Kuva 15). $\phi 143$ -faagilla todettiin olevan kolme dsRNA-segmenttiä, jotka nimettiin koon mukaan L-, M- ja S-segmenteiksi, L-segmentin ollessa suurin. Segmenttien koot arvioitiin agarosigeeliltä vertaamalla niitä $\phi 6$ -faagin segmentteihin, joiden koot tunnettiin etukäteen (Taulukko 1): $\phi 143$:n L-segmentin kooksi saatiin 6,3 kbp, M-segmentin 3,8 kbp ja S-segmentin 2,9 kbp. Verrattaessa $\phi 143$:n ja $\phi 6$:n segmenttejä toisiinsa, erityisesti M-segmentti oli $\phi 143$ -faagilla pienempi.



Kuva 15. $\phi 143$ - ja $\phi 6$ -faagien dsRNA-genomien AGE-analyysi. Faagien genomit eristettiin TRI Reagent/kloroformi-käsittelyllä ja käsiteltiin DNAasi I:llä ennen ajoa. Geeli värjättiin etidiumbromidilla. Kuvan vasempaan reunaan on merkitty $\phi 6$:n L-, M- ja S-segmenttien koot (McGraw ym., 1986; Gottlieb ym., 1988; Mindich ym., 1988).

Bakteriofaagi $\phi 143$:n dsRNA-genomin muuttamista cDNA:ksi kokeiltiin käyttämällä Maan ym. (2007) kehittämää menetelmää, jossa dsRNA-segmenttien 3'-päihin kiinnitetään T4 RNA-ligaasilla silmukan muodostavat oligonukleotidit, jotka toimivat alukkeina cDNA synteesissä. Menetelmällä ei saatu tuotettua cDNA:ta, mikä havaittiin PCR-monistusten jälkeisissä AGE-analyyseissä, joissa ei näkynyt cDNA:n PCR-tuotteita.

4.5 $\phi 143$:n isännän karakterisointi

B314-kannan karakterisoinniksi 900 bp sen genomien 16S rRNA-geenistä sekvensointiin. Vertailtaessa sekvenssiä NCBI:n GeneBank-nukleotiditietokannassa oleviin sekvensseihin, B314:n havaittiin olevan lähimpänä ryhmien *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*, *P.*

migulae, *P. corrugata* ja *P. tolaasii*) ja *Pseudomonas syringae* (*P. syringae* ja *P. viridiflava*) lajeja 99 % identtisyydellä. Lähimmäksi sukulaiseksi osoittautui *Pseudomonas* sp. LPPA 221 -kanta. Myöhemmissä kokeissa B314:n koko 16S rRNA-geeni sekvensoitiin (suorittanut Sari Mäntynen), millä ei kuitenkaan ollut vaikutusta aiempiin tuloksiin.

5 TULOSTEN TARKASTELU

Cystovirukset ovat poikkeuksellisia virusmaailmassa usealla tavalla. Ensinnäkin, vain harvoilla bakteriofageilla on lipidejä, saati sitten ulkoinen lipidikalvo. Toiseksi, cystovirukset ovat ainoita tunnettuja faageja, joilla on dsRNA-genomi. Cystoviruksilla on myös yhteisiä rakenteellisia ja toiminnallisia ominaisuuksia muiden dsRNA-virusten, kuten ihmisiäkin infektoivien reovirusten kanssa. Yhteiset ominaisuudet viittaavat myös yhteiseen esi-isään (ks. yleiskatsaukset Bamford ym., 2002; Mertens, 2004; Bamford ym., 2005). Erityisesti dsRNA:n prosessointiin vaadittava RNA-polymeraasi on kaikilla dsRNA-viruksilla samankaltainen. Tämä RNA:sta riippuvainen RNA-polymeraasi on mielenkiintoinen myös siitä kehitettyjen sovellusten vuoksi. Bakteriofagi $\phi 6$:n RNA-polymeraasia voidaan käyttää mm. minkä tahansa RNA:n *in vitro* -synteesiin (Makeyev ja Bamford, 2000a, b; Laurila ym., 2002) ja RNA:n sekvensointiin ilman alukkeita (Makeyev ja Bamford, 2001).

Tässä tutkimuksessa karakterisoitiin uutta bakteriofagia $\phi 143$, joka osoitti selviä yhteneväisyyksiä cystoviruksiin. Tunnetuista cystoviruksista poiketen $\phi 143$ -faagia ei eristetty kasveista vaan lammesta otetusta vesinäytteestä yhdessä isäntänsä B314:n kanssa. On kuitenkin mahdotonta sulkea pois sitä mahdollisuutta, että faagi ja sen isäntä olisivat tulleet näytteeseen kasviaineksen mukana.

Perusrakenteeltaan $\phi 143$ näyttäisi olevan tunnettujen cystovirusten kaltainen. Sen kloroformisensitiivisyys viittasi siihen, että sillä on lipidirakenteita, jotka elektronimikroskooppikuvissa näyttivät muodostavan $\phi 6$ -faagin tapaan säkkimäisen kalvon viruksen ulkopinnalle. Myös virionin koko vastasi $\phi 6$:lla havaittua. $\phi 143$ -näytteistä löydettiin lisäksi tyhjiä polyhedraalisia partikkeleita, joiden kaltaisia rakenteita nähtiin myös $\phi 6$:lla. Kooltaan nämä partikkelit olivat lähes yhtäsuuria faagien kesken. Samankaltaisia partikkeleita on havaittu $\phi 6$:n nukleokapsideille tehdyissä kokeissa, joissa niiden on todettu olevan P1:stä muodostuvia häkkimäisiä rakenteita (Steely ja Lang, 1984; Yang ja Lang, 1984; Olkkonen ja Bamford, 1987; Ktistakis ja Lang, 1987). Tämä viittaisi siihen, että myös $\phi 143$ -faagilla on nukleokapsidin kaltaisia rakenteita lipidikuorensa alla.

Myös $\phi 143$ -faagin isännän havaittiin olevan läheistä sukua cystovirusten isännille. B314-kannan 16S rRNA:n sekvensoinnin perusteella se kuului *Pseudomonas*-sukuun (lähimmät

sukulaiset *P. fluorescens* ja *P. syringae* -ryhmien kantoja), jonka lajeja myös cystovirukset käyttävät isäntinään. ϕ 143-faagin infektiokyky poikkesi kuitenkin cystoviruksista. Kun tunnetut cystovirukset käyttävät pääasiallisena isäntään *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola HB10Y-kantaa tai sen johdannaisia (mm. LM2333 ja LM2509), ϕ 143 pystyi infektoimaan vain omaa isäntäänsä, B314:sta. Myöskään ϕ 6-faagi ei kyennyt infektoimaan ϕ 143:n isäntää. Alustavien adsorptiotestien tulosten perusteella näyttäisi myös siltä, että ϕ 143 ja ϕ 6 eivät kykene kiinnittymään toistensa isäntiin. On siis hyvin todennäköistä, että tarttuakseen isäntäsoluunsa ϕ 143 hyödyntää sellaista pintareseptoria, jota ei aiemmin ole yhdistetty cystovirusten sisäänmenoprosesseihin. Tarkempia testejä kuitenkin vaaditaan esim. TEM-kuvantamisella, jotta ϕ 143-faagin käyttämä reseptori ja tarkempi sisäänmenomekanismi saataisiin selvitettyä.

Kasvuominaisuuksiltaan, kuten pesäkemorfologialtaan ja kasvulämpötilaltaan, B314-kannan havaittiin muistuttavan HB10Y-kantaa suuresti – ainoastaan kasvunopeudessa oli selviä eroja. B314-kannan nopeampi kasvu aikaisti myös ϕ 143-faagin infektiotietoa. Infektion ajoituksessa oli oltava tarkkana, ettei solutiheys noussut liian korkeaksi, sillä suurissa solutiheyksissä (yli $1,7 \times 10^9$ cfu/ml) ϕ 143:n saanto huononi. Toisaalta taas liian pienillä solutiheyksillä (alle 1×10^9 cfu/ml) solut hajosivat nopeasti, jolloin ϕ 143-tiitterit jäivät vähäisiksi. Infektiota voidaan optimoida myös lisätyn viruksen määrällä, mikä kyettiin toteamaan ϕ 6-faagin tapauksessa. Infektio MOI-arvolla 2 antoi melko alhaisen tiitterin ja solujen hajoaminen oli heikkoa, kun taas MOI-arvolla 15 solut hajosivat erittäin nopeasti. ϕ 143-faagilla samaa ei kyetty havaitsemaan, sillä kantaliuosten tiitterit eivät olleet tarpeeksi korkeita, jotta suuria MOI-arvoja olisi voitu kokeilla. MOI-arvot 2–5 näyttivät kuitenkin antavan tarpeeksi suuret tiitterit, jotta ϕ 143-virionien puhdistus oli kannattavaa. Lämpötilan vaikutus ϕ 143-faagin infektiioon oli taas huomattava. Solujen hajoaminen 28 °C:ssa ja sitä korkeammassa lämpötiloissa oli tuskin olematon, kun jo pari astetta alhaisimmissa lämpötiloissa solut hajosivat tehokkaasti ja ϕ 143:n saanto oli hyvä. Sama oli havaittavissa myös ϕ 6-faagilla, joskaan ero ei ollut yhtä suuri. Lämpötilan vaikutus infektiioon johtunee ainakin osittain bakteerien kasvun kiihtymisestä korkeammassa lämpötiloissa, jolloin solujen jakaantuessa nopeammin infektiolle optimaalinen solutiheys tuli vastaan aikaisemmin. Siten onkin mahdollista, että infektiotietoa aikaistamalla, ja todennäköisesti myös MOI-arvoja nostamalla, faagin tuottaminen saattaisi olla tehokkaampaa myös korkeammassa lämpötiloissa.

Lämpötilan, MOI:n ja solutiheyden lisäksi myös ravistelunopeudella voitiin vaikuttaa ϕ 143- ja ϕ 6-faagien saantoon: hitaammalla sekoituksella (110 rpm) solut hajosivat paremmin kuin korkeissa nopeuksissa (220 rpm), joissa myös saanto oli huonompi. Suurempaan kasvatustilavuuteen siirryttäessä havaittiin ilmastuksen tärkeys ϕ 143-virionien tuotossa. Kun kasvatusliemi ei päässyt sekoittumaan riittävän hyvin liian suuren nestetilavuuden seurauksena, bakteerien kasvu häiriintyi, mikä vaikutti myös faagien tuotantoon. Viljelmissä tämä näkyi bakteerien hidastuneena kasvuna ja faagien myöhästyneenä lyysi-vaiheena. Ilmastusta parantamalla, tässä tapauksessa siirtämällä viljelmä leveämpipohjaisempiin pulloihin, solujen hajoaminen saatiin alkamaan.

ϕ 143-faagin tuotto-olosuhteet saatiin optimoitua riittävän hyvin, jotta niillä voitiin tuottaa tarpeeksi faageja puhdistukseen. Puhdistus tehtiin sakkaroosissa, jota on yleisesti käytetty cystovirusten puhdistukseen (Vidaver ym., 1973; Hoogstraten ym., 2000; Qiao ym., 2000; Qiao ym., 2010b). Puhdistuksen tuloksena saatujen viruskantaliuosten ϕ 143-virionien pitoisuus oli tarpeeksi suuri jatkotutkimuksia varten.

Puhtaita faagipartikkeleita käytettiin ϕ 143-faagin säilyvyystutkimuksiin. Tutkimuksissa havaittiin ϕ 143-virionien säilyvän infektiokykyisinä pisimpään Tris-HCl-puskurissa. Kalsium- tai magnesiumsuolojen lisäyksellä näytti taas olevan haitallisia vaikutuksia virionien säilyvyyteen. Fosfaattipuskurissa kalsiumin sakkautuminen saattoi tosin osaltaan vaikuttaa virionien infektiiviteetin nopeaan laskuun, mutta myös Tris-HCl-puskureissa, joissa sakkautumista ei havaittu, kalsiumin havaittiin vaikuttavan virionien säilyvyyteen negatiivisesti. Pisimpään virionien infektiokyky säilyi jääkaappilämmössä (4 °C), joskin kerran sulatettujen faagien infektio oli lähes yhtä hyvä; kolmannen sulatuskerran jälkeen ϕ 143 oli menettänyt infektiokykynsä kokonaan. Yleisesti oli myös havaittavissa, että ϕ 6 säilyi testatuissa puskureissa infektiokykyisenä pidempään kuin ϕ 143.

ϕ 143-virionien adsorptio isäntäsoluun vaikuttaisi olevan heikompi kuin ϕ 6-faagilla. Faagien tuottovaiheessa huomattiin, ettei ϕ 143 hajottanut isäntäbakteerejaan yhtä hyvin kuin ϕ 6. Kasvatusmaljoilla taas ϕ 143:n muodostamat plakit eivät läpäisseet isännän muodostamaa mattoa kuten ϕ 6, vaan plakit jäivät sameiksi. Adsorptiotesteissä ϕ 143:lta vei kauemmin aikaa kiinnittyä isäntäänsä kuin ϕ 6:lta. Tarkkaa adsorptionopeutta ei kuitenkaan pystytty laskemaan, koska mitatut virusmäärät vaihtelivat joidenkin aikapisteiden välillä liian suuresti. Adsorptiokokeissa oli myös havaittavissa, ettei ϕ 143 kyennyt kiinnittymään

$\phi 6$:n isäntään, ja päinvastoin. Tämä myös on omiaan tukemaan infektiotestejä, joissa faagien ei havaittu infektoivan toistensa isäntiä. Adsorptiotestien tulosten epätarkkuuden vuoksi testit toistetaan myöhemmin uudestaan.

$\phi 143$ -faagin dsRNA-genomin todettiin koostuvan kolmesta segmentistä (L, M ja S), joista L- ja S-segmentit olivat lähes samankokoisia $\phi 6$ -faagin segmenttien kanssa, mutta M-segmentti oli selvästi $\phi 6$:n M-segmenttiä pienempi. Muilla cystovirusilla (Taulukko 1) M-segmentti on monesti suurempi kuin $\phi 6$ -faagilla, tai niiden L- ja S-segmenttien koot poikkeavat selvästi $\phi 6$:n segmenteistä. $\phi 143$ -faagin segmenttien kooista saatiin arvio AGE-analyysin perusteella. Tarkempaa analyysia varten genomisegmentit tullaan sekvensoimaan lähitulevaisuudessa.

SDS-PAGE-analyysin tulosten perusteella voitiin todeta, että eräiden $\phi 143$ -faagin proteiinien koot olivat niin lähellä $\phi 6$ -faagin proteiinien P1 ja P4–P9 kokoja, että niiden voitiin olettaa vastaavan toisiaan. P2- ja P3-proteiineja vastaavien $\phi 143$:n proteiinien järjestystä geelillä sen sijaan ei kyetty varmistamaan. Järjestys voitaisiin selvittää käsittelemällä virionit butyloydilla hydroksitolueenilla (*engl. butylated hydroxytoluene*), joka irrottaa P3-proteiinit virionin pinnasta (Bamford ym., 1995). Vaihtoehtoisesti $\phi 143$ -virionit voidaan käsitellä Triton X-100:lla, joka poistaa virionin ulkokerroksen kokonaan (Bamford ja Palva, 1980). Tällöin P3:sta, muttei P2:sta vastaavan proteiinin pitäisi irrota kalvon mukana. Kokeella saataisiin myös enemmän tietoa $\phi 143$ -virionin rakenteesta: mitkä proteiinit ovat osa ulkokalvoa ja mitkä eivät. Proteiinien tarkat koot saadaan selville vasta genomien sekvensoinnin jälkeen, mutta alustavasti $\phi 143$ -faagin proteiinikokoja voitiin todeta olevan lähempänä $\phi 6$ -faagin proteiineja kuin $\phi 6$:n kaukaisten sukulaisten proteiineja (Taulukko 2). Bakteriofagien $\phi 8$, $\phi 12$ ja $\phi 13$ P3-proteiini koostuu useasta peptidistä, $\phi 13$:lla myös P5, minkä lisäksi erityisesti P8-proteiinin koossa on suurta vaihtelua virusten kesken. Samaa ei ollut nähtävissä $\phi 143$ -faagilla, vaan kaikki havaitut proteiinit näyttivät olevan yksiosaisia ja lähellä $\phi 6$ -faagin proteiinien kokoja. Tämän perusteella $\phi 143$:n voisi olettaa olevan läheisintä sukua $\phi 6$:lle.

Sekvensointia varten $\phi 143$ -faagin dsRNA-genomi on käännettävä cDNA-muotoon, mikä on kuitenkin haastavaa, koska sekvenssiä ei tunneta. Tällöin myös alukkeiden suunnittelu on hyvin vaikeaa. Läheistä sukua $\phi 6$:lle olevilla cystovirusilla sekvenssi on 75–80 % identtistä, mutta kaukaisemmillä sukulaisilla yhteinen sekvenssin identtisyys on paljon

pienempi (Mindich ym., 1999). Siksi kaukaisten sukulaisten sekvensointiin on käytetty menetelmiä, joissa alukkeet ovat olleet universaaleja (Hoogstraten ym., 2000; Gottlieb ym., 2002a, b; Qiao ym., 2000; Qiao ym., 2010b). Tässä työssä ϕ 143-faagin dsRNA-genomin muuttamista cDNA:si kokeiltiin menetelmällä, jossa dsRNA:n 3'-päihin liitetyt, silmukan muodostavat oligonukleotidit toimivat alukkeina cDNA-synteesissä (Maan ym., 2007; Potgieter ym., 2009). Menetelmällä ei kuitenkaan onnistuttu tuottamaan cDNA:ta. Epäonnistuminen saattoi johtua eristetyn dsRNA:n tai valmistettujen puskureiden epäpuhtaudesta. Varsinkin geeliltä eristettyjen yksittäisten dsRNA-segmenttien puhtausarvot olivat huonoja. Lisäksi osaa reagensseista ei ollut liuotettu RNAasi-vapaaseen veteen, jolloin on mahdollista, että dsRNA tuhoutui RNAasien vaikutuksesta. Tähän oli hyvä mahdollisuus erityisesti pitkien reaktioiden aikana (esim. alukkeiden kiinnittäminen kesti vähintään 6 h). Menetelmä oli myös monivaiheinen ja sitä ei ollut mahdollista kontrolloida synteesin aikana. Tulevaisuudessa on tarkoitus kokeilla muita menetelmiä ϕ 143:n genomien muuttamiseksi cDNA:ksi, etenkin ϕ 8:n, ϕ 12:n, ϕ 13:n ja ϕ 2954:n genomien kääntöön käytettyä metodologiaa, jossa segmenttien 3'-päähän lisätty poly(A)-häntä toimii komplementaarisenä vastinjuosteena universaaleille oligo-d(T)-alukkeille (Hoogstraten ym., 2000; Gottlieb ym., 2002a, b; Qiao ym., 2000; Qiao ym., 2010b).

Yhteenvedon voidaan todeta, että ϕ 143-faagi muistuttaa virionin perusrakenteelta, proteiinikoostumukselta ja genomisegmenttien koolta hyvin paljon aiemmin tunnistettuja cystovirusia. Siten onkin erittäin todennäköistä, että ϕ 143 kuuluu samaan virusryhmään näiden virusten kanssa. Eroja tunnettuihin cystovirusiin myös havaittiin, joten mikään aiemmin tunnistettu cystovirus se ei voi olla. Suurin ero nähtiin infektiokokeissa, joissa ϕ 143 ei kyennyt infektoimaan aikaisempien cystovirusten isäntiä. Siten onkin mahdollista, että ϕ 143 käyttää infektiioon eri reseptoria kuin tunnetut cystovirukset. Tarkempia tutkimuksia kuitenkin tarvitaan, jotta ϕ 143-faagin käyttämä reseptori ja sukulaisuus cystovirusiin voitaisiin varmistaa. Lähitulevaisuudessa onkin tavoitteena saada ϕ 143:n dsRNA-genomi käännettyä cDNA:ksi, jotta sekvensointi voitaisiin toteuttaa. Koska ϕ 143 poikkeaa muista cystovirusista, erityisesti eristyspaikkansa ja käyttämiensä isäntien takia, lisätutkimukset virukselle voivat antaa lisää valaistusta myös cystovirusten evoluutioon. ϕ 143:n käyttämän reseptorin paikallistaminen voi taas paljastaa aivan uudenlaisen kiinnittymismenetelmän isännän ulkokalvoon, jollaista cystovirusilla ei ole aiemmin havaittu. Lisäksi ϕ 143:n RNA-riippuvaisella RNA-polymeraasilla voi kenties olla uusia

biokemiallisia ominaisuuksia aiemmin tutkittuihin RNA-polymeraaseihin verrattuna, mikä takaisi kaupallisen kiinnostavuuden.

LÄHTEET

- Bamford, D.H. 2003. Do viruses form lineages across different domains of life? *Res.Microbiol.* 154:231–236.
- Bamford, D.H., E.T. Palva ja K. Lounatmaa. 1976. Ultrastructure and life cycle of the lipid-containing bacteriophage phi 6. *J.Gen.Virol.* 32:249–259.
- Bamford, D.H. ja K. Lounatmaa. 1978. Freeze-fracturing of *Pseudomonas phaseolicola* infected by the lipid-containing bacteriophage phi6. *J Gen Virol.* 39:161–170. Bamford, D.H., R.M. Burnett ja D.I. Stuart. 2002. Evolution of viral structure. *Theor.Popul.Biol.* 61:461–470.
- Bamford, D.H. ja L. Mindich. 1980. Electron microscopy of cells infected with nonsense mutants of bacteriophage phi 6. *Virology.* 107:222–228.
- Bamford, D.H. ja E.T. Palva. 1980. Structure of the lipid-containing bacteriophage phi 6. Disruption by Triton X-100 treatment. *Biochim.Biophys.Acta.* 601:245–259.
- Bamford, D.H., M. Romantschuk ja P.J. Somerharju. 1987. Membrane fusion in prokaryotes: bacteriophage phi 6 membrane fuses with the *Pseudomonas syringae* outer membrane. *EMBO J.* 6:1467–1473.
- Bamford, D.H., P.M. Ojala, M. Frilander, L. Walin ja J.K.H. Bamford. 1995. Isolation, purification and function of the assembly intermediates and subviral particles of bacteriophages PRD1 and phi6. *Methods in Molecular Genetics.* K.W. Adolph, editori. 6: 455-474.
- Bamford, D.H., J.M. Grimes ja D.I. Stuart. 2005. What does structure tell us about virus evolution? *Curr.Opin.Struct.Biol.* 15:655–663.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Butcher, S.J., T. Dokland, P.M. Ojala, D.H. Bamford ja S.D. Fuller. 1997. Intermediates in the assembly pathway of the double-stranded RNA virus phi6. *EMBO J.* 16:4477–4487.
- Caldentey, J. ja D.H. Bamford. 1992. The lytic enzyme of the *Pseudomonas* phage phi 6. Purification and biochemical characterization. *Biochim.Biophys.Acta.* 1159:44–50.
- Casini, G. ja H.R. Revel. 1994. A new small low-abundant nonstructural protein encoded by the L segment of the dsRNA bacteriophage phi 6. *Virology.* 203:221–228.
- Coplin, D.L., J.L. Van Etten, R.K. Koski ja A.K. Vidaver. 1975. Intermediates in the biosynthesis of double-stranded ribonucleic acids of bacteriophage phi 6. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 72:849–853.
- Cuppels, D.A., J.L. Van Etten, P. Lambrecht ja A.K. Vidaver. 1981. Survey of phytopathogenic pseudomonads for a restriction and modification system active on the double-stranded ribonucleic acid phage phi6. *Curr. Microbiol.* 5:247–249.
- Cvirkaite-Krupovic, V., M.M. Poranen ja D.H. Bamford. 2010. Phospholipids act as secondary receptor during the entry of the enveloped, double-stranded RNA bacteriophage phi6. *J.Gen.Virol.* 91:2116–2120.
- Darissa, O., P. Willingmann ja G. Adam. 2010. Optimized approaches for the sequence determination of double-stranded RNA templates. *J.Virol.Methods.* 169:397–403.
- Day, L.A. ja L. Mindich. 1980. The molecular weight of bacteriophage phi 6 and its nucleocapsid. *Virology.* 103:376–385.
- de Haas, F., A.O. Paatero, L. Mindich, D.H. Bamford ja S.D. Fuller. 1999. A symmetry mismatch at the site of RNA packaging in the polymerase complex of dsRNA bacteriophage phi6. *J.Mol.Biol.* 294:357–372.

- Emori, Y., H. Iba ja Y. Okada. 1983. Transcriptional regulation of three double-stranded RNA segments of bacteriophage phi 6 in vitro. *J.Virol.* 46:196–203.
- Ewen, M.E. ja H.R. Revel. 1988. In vitro replication and transcription of the segmented double-stranded RNA bacteriophage phi 6. *Virology.* 165:489–498.
- Frilander, M., P. Gottlieb, J. Strassman, D.H. Bamford ja L. Mindich. 1992. Dependence of minus-strand synthesis on complete genomic packaging in the double-stranded RNA bacteriophage phi 6. *J.Virol.* 66:5013–5017.
- Frilander, M. ja D.H. Bamford. 1995. In vitro packaging of the single-stranded RNA genomic precursors of the segmented double-stranded RNA bacteriophage phi 6: the three segments modulate each other's packaging efficiency. *J.Mol.Biol.* 246:418–428.
- Frilander, M., M. Poranen ja D.H. Bamford. 1995. The large genome segment of dsRNA bacteriophage phi6 is the key regulator in the in vitro minus and plus strand synthesis. *RNA.* 1:510–518.
- Gottlieb, P., S. Metzger, M. Romantschuk, J. Carton, J. Strassman, D.H. Bamford, N. Kalkkinen ja L. Mindich. 1988. Nucleotide sequence of the middle dsRNA segment of bacteriophage phi 6: placement of the genes of membrane-associated proteins. *Virology.* 163:183–190.
- Gottlieb, P., J. Strassman, X.Y. Qiao, A. Frucht ja L. Mindich. 1990. In vitro replication, packaging, and transcription of the segmented double-stranded RNA genome of bacteriophage phi 6: studies with procapsids assembled from plasmid-encoded proteins. *J.Bacteriol.* 172:5774–5782.
- Gottlieb, P., J. Strassman, A. Frucht, X.Y. Qiao ja L. Mindich. 1991. In vitro packaging of the bacteriophage phi 6 ssRNA genomic precursors. *Virology.* 181:589–594.
- Gottlieb, P., X. Qiao, J. Strassman, M. Frilander ja L. Mindich. 1994. Identification of the packaging regions within the genomic RNA segments of bacteriophage phi 6. *Virology.* 200:42–47.
- Gottlieb, P., C. Potgieter, H. Wei ja I. Toporovsky. 2002a. Characterization of phi12, a bacteriophage related to phi6: nucleotide sequence of the large double-stranded RNA. *Virology.* 295:266–271.
- Gottlieb, P., H. Wei, C. Potgieter ja I. Toporovsky. 2002b. Characterization of phi 12, a bacteriophage related to phi 6: nucleotide sequence of the small and middle double-stranded RNA. *Virology.* 293:118–124.
- Grimes, J.M., J.N. Burroughs, P. Gouet, J.M. Diprose, R. Malby, S. Zientara, P.P. Mertens ja D.I. Stuart. 1998. The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature.* 395:470–478.
- Hantula, J. ja D.H. Bamford. 1988. Chemical crosslinking of bacteriophage phi 6 nucleocapsid proteins. *Virology.* 165:482–488.
- Hoogstraten, D., X. Qiao, Y. Sun, A. Hu, S. Onodera ja L. Mindich. 2000. Characterization of phi8, a bacteriophage containing three double-stranded RNA genomic segments and distantly related to Phi6. *Virology.* 272:218–224.
- Huiskonen, J.T., F. de Haas, D. Bubeck, D.H. Bamford, S.D. Fuller ja S.J. Butcher. 2006. Structure of the bacteriophage phi6 nucleocapsid suggests a mechanism for sequential RNA packaging. *Structure.* 14:1039–1048.
- Häring, M., R. Rachel, X. Peng, R.A. Garrett ja D. Prangishvili. 2005. Viral diversity in hot springs of Pozzuoli, Italy, and characterization of a unique archaeal virus, Acidianus bottle-shaped virus, from a new family, the Ampullaviridae. *J.Virol.* 79:9904–9911.
- Ikonen, T., D.E. Kainov, P. Timmins, R. Serimaa ja R. Tuma. 2003. Locating the minor components of double-stranded RNA bacteriophage phi6 by neutron scattering. *J Appl Cryst.* 36:525–529.
- Johnson, M.D., 3rd ja L. Mindich. 1994a. Plasmid-directed assembly of the lipid-containing membrane of bacteriophage phi 6. *J.Bacteriol.* 176:4124–4132.

- Johnson, M.D., 3rd ja L. Mindich. 1994b. Isolation and characterization of nonsense mutations in gene 10 of bacteriophage phi 6. *J.Virol.* 68:2331–2338.
- Juuti, J.T. ja D.H. Bamford. 1995. RNA binding, packaging and polymerase activities of the different incomplete polymerase complex particles of dsRNA bacteriophage phi 6. *J.Mol.Biol.* 249:545–554.
- Juuti, J.T. ja D.H. Bamford. 1997. Protein P7 of phage phi6 RNA polymerase complex, acquiring of RNA packaging activity by in vitro assembly of the purified protein onto deficient particles. *J.Mol.Biol.* 266:891–900.
- Juuti, J.T., D.H. Bamford, R. Tuma ja G.J. Thomas Jr. 1998. Structure and NTPase activity of the RNA-translocating protein (P4) of bacteriophage phi 6. *J.Mol.Biol.* 279:347–359.
- Kainov, D.E., S.J. Butcher, D.H. Bamford ja R. Tuma. 2003. Conserved intermediates on the assembly pathway of double-stranded RNA bacteriophages. *J.Mol.Biol.* 328:791–804.
- Kakitani, H., H. Iba ja Y. Okada. 1980. Penetration and partial uncoating of bacteriophage phi 6 particle. *Virology.* 101:475–483.
- Koonin, E.V., A.E. Gorbalenya ja K.M. Chumakov. 1989. Tentative identification of RNA-dependent RNA polymerases of dsRNA viruses and their relationship to positive strand RNA viral polymerases. *FEBS Lett.* 252:42–46.
- Ktistakis, N.T. ja D. Lang. 1987. The dodecahedral framework of the bacteriophage phi 6 nucleocapsid is composed of protein P1. *J.Virol.* 61:2621–2623.
- Laurila, M.R., E.V. Makeyev ja D.H. Bamford. 2002. Bacteriophage phi 6 RNA-dependent RNA polymerase: molecular details of initiating nucleic acid synthesis without primer. *J.Biol.Chem.* 277:17117–17124.
- Laurinavicius, S., R. Kakela, D.H. Bamford ja P. Somerharju. 2004. The origin of phospholipids of the enveloped bacteriophage phi6. *Virology.* 326:182–190.
- Lawton, J.A., M.K. Estes ja B.V. Prasad. 1997. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat.Struct.Biol.* 4:118–121.
- Maan, S., S. Rao, N.S. Maan, S.J. Anthony, H. Attoui, A.R. Samuel ja P.P. Mertens. 2007. Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses. *J.Virol.Methods.* 143:132–139.
- Makeyev, E.V. ja D.H. Bamford. 2000a. Replicase activity of purified recombinant protein P2 of double-stranded RNA bacteriophage phi6. *EMBO J.* 19:124–133.
- Makeyev, E.V. ja D.H. Bamford. 2000b. The polymerase subunit of a dsRNA virus plays a central role in the regulation of viral RNA metabolism. *EMBO J.* 19:6275–6284.
- Makeyev, E.V. ja D.H. Bamford. 2001. Primer-independent RNA sequencing with bacteriophage phi6 RNA polymerase and chain terminators. *RNA.* 7:774–781.
- Mancini, E.J., D.E. Kainov, J.M. Grimes, R. Tuma, D.H. Bamford ja D.I. Stuart. 2004. Atomic snapshots of an RNA packaging motor reveal conformational changes linking ATP hydrolysis to RNA translocation. *Cell.* 118:743–755.
- McGraw, T., L. Mindich ja B. Frangione. 1986. Nucleotide sequence of the small double-stranded RNA segment of bacteriophage phi 6: novel mechanism of natural translational control. *J.Virol.* 58:142–151.
- Mertens, P. 2004. The dsRNA viruses. *Virus Res.* 101:3–13.
- Mindich, L. 1999. Precise packaging of the three genomic segments of the double-stranded-RNA bacteriophage phi6. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 63:149–160.

- Mindich, L., J.F. Sinclair ja J. Cohen. 1976. The morphogenesis of bacteriophage phi6: particles formed by nonsense mutants. *Virology*. 75:224–231.
- Mindich, L. ja J. Lehman. 1979. Cell wall lysin as a component of the bacteriophage phi 6 virion. *J.Virol.* 30:489–496.
- Mindich, L., J. Lehman ja R. Huang. 1979. Temperature-dependent compositional changes in the envelope of phi 6. *Virology*. 97:171–176.
- Mindich, L. ja R. Davidoff-Abelson. 1980. The characterization of a 120 S particle formed during phi 6 infection. *Virology*. 103:386–391.
- Mindich, L. ja J. Lehman. 1983. Characterization of phi 6 mutants that are temperature sensitive in the morphogenetic protein P12. *Virology*. 127:438–445.
- Mindich, L., I. Nemhauser, P. Gottlieb, M. Romantschuk, J. Carton, S. Frucht, J. Strassman, D.H. Bamford ja N. Kalkkinen. 1988. Nucleotide sequence of the large double-stranded RNA segment of bacteriophage phi 6: genes specifying the viral replicase and transcriptase. *J.Virol.* 62:1180–1185.
- Mindich, L., X. Qiao, S. Onodera, P. Gottlieb ja J. Strassman. 1992. Heterologous recombination in the double-stranded RNA bacteriophage phi 6. *J.Virol.* 66:2605–2610.
- Mindich, L., X. Qiao, S. Onodera, P. Gottlieb ja M. Frilander. 1994. RNA structural requirements for stability and minus-strand synthesis in the dsRNA bacteriophage phi 6. *Virology*. 202:258–263.
- Mindich, L., X. Qiao, J. Qiao, S. Onodera, M. Romantschuk ja D. Hoogstraten. 1999. Isolation of additional bacteriophages with genomes of segmented double-stranded RNA. *J.Bacteriol.* 181:4505–4508.
- Naitow, H., J. Tang, M. Canady, R.B. Wickner ja J.E. Johnson. 2002. L-A virus at 3.4 Å resolution reveals particle architecture and mRNA decapping mechanism. *Nat.Struct.Biol.* 9:725–728.
- Ojala, P.M., M. Romantschuk ja D.H. Bamford. 1990. Purified phi 6 nucleocapsids are capable of productive infection of host cells with partially disrupted outer membranes. *Virology*. 178:364–372.
- Ojala, P.M. ja D.H. Bamford. 1995. In vitro transcription of the double-stranded RNA bacteriophage phi 6 is influenced by purine NTPs and calcium. *Virology*. 207:400–408.
- Olkkonen, V. 1991. Structure-function relationships in the nucleocapsid of the double-stranded RNA bacteriophage phi6. Doctoral Thesis. Department of Genetics, University of Helsinki.
- Olkkonen, V.M. ja D.H. Bamford. 1987. The nucleocapsid of the lipid-containing double-stranded RNA bacteriophage phi 6 contains a protein skeleton consisting of a single polypeptide species. *J.Virol.* 61:2362–2367.
- Olkkonen, V.M., P.M. Ojala ja D.H. Bamford. 1991. Generation of infectious nucleocapsids by in vitro assembly of the shell protein on to the polymerase complex of the dsRNA bacteriophage phi 6. *J.Mol.Biol.* 218:569–581.
- Paatero, A.O., J.E. Syvaaja ja D.H. Bamford. 1995. Double-stranded RNA bacteriophage phi 6 protein P4 is an unspecific nucleoside triphosphatase activated by calcium ions. *J.Virol.* 69:6729–6734.
- Pagratís, N. ja H.R. Revel. 1990. Minus-strand RNA synthesis by the segmented double-stranded RNA bacteriophage phi 6 requires continuous protein synthesis. *Virology*. 177:281–288.
- Pirttimaa, M.J. ja D.H. Bamford. 2000. RNA secondary structures of the bacteriophage phi6 packaging regions. *RNA*. 6:880–889.
- Poranen, M.M. ja D.H. Bamford. 1999. Packaging and replication regulation revealed by chimeric genome segments of double-stranded RNA bacteriophage phi6. *RNA*. 5:446–454.

- Poranen, M.M., R. Daugelavicius, P.M. Ojala, M.W. Hess ja D.H. Bamford. 1999. A novel virus-host cell membrane interaction. Membrane voltage-dependent endocytic-like entry of bacteriophage straight phi6 nucleocapsid. *J.Cell Biol.* 147:671–682.
- Poranen, M.M., A.O. Paatero, R. Tuma ja D.H. Bamford. 2001. Self-assembly of a viral molecular machine from purified protein and RNA constituents. *Mol.Cell.* 7:845–854.
- Pirttimaa, M.J., A.O. Paatero, M.J. Frilander ja D.H. Bamford. 2002. Nonspecific nucleoside triphosphatase P4 of double-stranded RNA bacteriophage phi6 is required for single-stranded RNA packaging and transcription. *J.Virol.* 76:10122–10127.
- Poranen, M.M., M.J. Pirttimaa ja D.H. Bamford. 2005a. Encapsulation of the segmented double-stranded RNA genome of bacteriophage phi6. *Viral Genome Packaging Machines: Genetics, Structure and Mechanisms*. C. Catalano, editori. 117–130.
- Poranen, M.M., R. Tuma ja D.H. Bamford. 2005b. Assembly of double-stranded RNA bacteriophages. *Adv.Virus Res.* 64:15–43.
- Poranen, M.M. ja D.H. Bamford. 2008. Entry of a segmented dsRNA virus into the bacterial cell. *Segmented Double-Stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology*. J.T. Patton, editori. 215–226.
- Poranen, M.M., R. Tuma ja D.H. Bamford. 2008a. Dissecting the assembly pathway of bacterial dsRNA viruses: Infectious nucleocapsids produced by self-assembly. *Segmented Double-Stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology*. 115–132.
- Poranen, M.M., S.J. Butcher, V.M. Simonov, P. Laurinmaki ja D.H. Bamford. 2008b. Roles of the minor capsid protein P7 in the assembly and replication of double-stranded RNA bacteriophage phi6. *J.Mol.Biol.* 383:529–538.
- Potgieter, A.C., N.A. Page, J. Liebenberg, I.M. Wright, O. Landt ja A.A. van Dijk. 2009. Improved strategies for sequence-independent amplification and sequencing of viral double-stranded RNA genomes. *J.Gen.Virol.* 90:1423–1432.
- Qiao, X., G. Casini, J. Qiao ja L. Mindich. 1995. In vitro packaging of individual genomic segments of bacteriophage phi 6 RNA: serial dependence relationships. *J.Virol.* 69:2926–2931.
- Qiao, X., J. Qiao ja L. Mindich. 1997. Stoichiometric packaging of the three genomic segments of double-stranded RNA bacteriophage phi6. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:4074–4079.
- Qiao, X., J. Qiao, S. Onodera ja L. Mindich. 2000. Characterization of phi 13, a bacteriophage related to phi 6 and containing three dsRNA genomic segments. *Virology.* 275:218–224.
- Qiao, J., X. Qiao, Y. Sun ja L. Mindich. 2003a. Isolation and analysis of mutants of double-stranded-RNA bacteriophage phi6 with altered packaging specificity. *J.Bacteriol.* 185:4572–4577.
- Qiao, X., J. Qiao ja L. Mindich. 2003b. Analysis of specific binding involved in genomic packaging of the double-stranded-RNA bacteriophage phi6. *J.Bacteriol.* 185:6409–6414.
- Qiao, X., Y. Sun, J. Qiao ja L. Mindich. 2008. The role of host protein YajQ in the temporal control of transcription in bacteriophage Phi6. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105:15956–15960.
- Qiao, X., Y. Sun, J. Qiao ja L. Mindich. 2009. Temporal control of message stability in the life cycle of double-stranded RNA bacteriophage phi8. *J.Virol.* 83:633–639.
- Qiao, J., X. Qiao, Y. Sun ja L. Mindich. 2010a. Role of host protein glutaredoxin 3 in the control of transcription during bacteriophage Phi2954 infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 107:6000–6004.
- Qiao, X., Y. Sun, J. Qiao, F. Di Sanzo ja L. Mindich. 2010b. Characterization of Phi2954, a newly isolated bacteriophage containing three dsRNA genomic segments. *BMC Microbiol.* 10:55.

- Qiao, X., Y. Sun, J. Qiao ja L. Mindich. 2010c. Interaction of a host protein with core complexes of bacteriophage phi6 to control transcription. *J.Virol.* 84:4821-4825.
- Reinisch, K.M., M.L. Nibert ja S.C. Harrison. 2000. Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution. *Nature.* 404:960-967.
- Rimon, A. ja R. Haselkorn. 1978. Transcription and replication of bacteriophage phi6 RNA. *Virology.* 89:206-217.
- Roine, E., D.M. Raineri, M. Romantschuk, M. Wilson ja D.N. Nunn. 1998. Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol.Plant Microbe Interact.* 11:1048-1056.
- Romantschuk, M. ja D.H. Bamford. 1985. Function of pili in bacteriophage phi 6 penetration. *J.Gen.Virol.* 66 (Pt 11):2461-2469.
- Romantschuk, M. ja D.H. Bamford. 1986. The causal agent of halo blight in bean, *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, attaches to stomata via its pili. *Microb.Pathog.* 1:139-148.
- Romantschuk, M., V.M. Olkkonen ja D.H. Bamford. 1988. The nucleocapsid of bacteriophage phi 6 penetrates the host cytoplasmic membrane. *EMBO J.* 7:1821-1829.
- Sambrook, J. ja D.W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schwieger, F. ja C.C. Tebbe. 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl.Environ.Microbiol.* 64:4870-4876.
- Sinclair, J.F., A. Tzagoloff, D. Levine ja L. Mindich. 1975. Proteins of bacteriophage phi6. *J.Virol.* 16:685-695.
- Sinclair, J.F. ja L. Mindich. 1976. RNA synthesis during infection with bacteriophage phi6. *Virology.* 75:209-217.
- Steely, H.T., Jr ja D. Lang. 1984. Electron microscopy of bacteriophage phi 6 nucleocapsid: two-dimensional image analysis. *J.Virol.* 51:479-483.
- Stitt, B.L. ja L. Mindich. 1983a. Morphogenesis of bacteriophage phi 6: a presumptive viral membrane precursor. *Virology.* 127:446-458.
- Stitt, B.L. ja L. Mindich. 1983b. The structure of bacteriophage phi 6: protease digestion of phi 6 virions. *Virology.* 127:459-462.
- Sun, Y., X. Qiao, J. Qiao, S. Onodera ja L. Mindich. 2003. Unique properties of the inner core of bacteriophage phi8, a virus with a segmented dsRNA genome. *Virology.* 308:354-361.
- Usala, S.J., B.H. Brownstein ja R. Haselkorn. 1980. Displacement of parental RNA strands during in vitro transcription by bacteriophage phi 6 nucleocapsids. *Cell.* 19:855-862.
- van Dijk, A.A., M. Frilander ja D.H. Bamford. 1995. Differentiation between minus- and plus-strand synthesis: polymerase activity of dsRNA bacteriophage phi 6 in an in vitro packaging and replication system. *Virology.* 211:320-323.
- Van Etten, J.V., L. Lane, C. Gonzalez, J. Partridge ja A. Vidaver. 1976. Comparative properties of bacteriophage phi6 and phi6 nucleocapsid. *J.Virol.* 18:652-658.
- Van Etten, J.L., D.E. Burbank, D.A. Cuppels, L.C. Lane ja A.K. Vidaver. 1980. Semiconservative synthesis of single-stranded RNA by bacteriophage phi 6 RNA polymerase. *J.Virol.* 33:769-773.

Van Regenmortel, M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle ja R.B. Wickner. 2000. 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego

Vidaver, A.K., R.K. Koski ja J.L. Van Etten. 1973. Bacteriophage phi6: a Lipid-Containing Virus of *Pseudomonas phaseolicola*. *J.Virol.* 11:799–805.

Wei, H., R.H. Cheng, J. Berriman, W.J. Rice, D.L. Stokes, A. Katz, D.G. Morgan ja P. Gottlieb. 2009. Three-dimensional structure of the enveloped bacteriophage phi12: an incomplete T = 13 lattice is superposed on an enclosed T = 1 shell. *PLoS One.* 4:e6850.

Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier ja D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J.Bacteriol.* 173:697–703.

Yang, Y. ja D. Lang. 1984. Electron microscopy of bacteriophage phi 6 nucleocapsid: three-dimensional image analysis. *J.Virol.* 51:484-488.

Zillig, W., D. Prangishvilli, C. Schleper, M. Elferink, I. Holz, S. Albers, D. Janekovic ja D. Gotz. 1996. Viruses, plasmids and other genetic elements of thermophilic and hyperthermophilic Archaea. *FEMS Microbiol.Rev.* 18:225–236.

LIITEET

Liite I. Kasvatusaineet

LB-liemi

10 g	Bacto™ tryptoni (Difco)
5 g	Bacto™ hiivauute (Difco)
5 g	NaCl

Täyttö 1000 ml:aan ionivaihdetulla vedellä.

LB-kasvatusmaljat

10 g	Agar
1000 ml	LB-liemi

LB-pehmytagar

7 g	Agar
1000 ml	LB-liemi

Liite II. SDS-PAGE:n geelit ja puskurit

Puskurit:

Puskuri I: Ylägeelin puskuri

- 363 g Trizma emäs (Sigma)
- ⇒ pH 8,6, säädä 37 % HCl:lla
- ⇒ Täytä 1000 ml:aan vedellä

Puskuri II: Ajogeelin puskuri

- 30 g Trizma emäs (Sigma)
- 30,34 ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- ⇒ pH 7,8, säädä 37 % HCl:lla
- ⇒ Täytä 500 ml:aan vedellä

3 x Näytepuskuri

- 10 ml puskuri I (ylägeelin puskuri)
- 10 ml 10 % SDS (BDH, liuotettu veteen 1:10)
- 0,4 ml 0,5 M EDTA
- 1 ml 2-merkaptetaanoli
- 10 ml 87 % glyseroli
- 10 mg bromifenolisinistä
- ⇒ Sekoita ja säilö - 20 °C

RB: Ajopuskuri

- 7,71 g Trizma emäs (Sigma)
- 36,99 g glysiini
- 30 ml 10 % SDS (BDH, liuotettu veteen 1:10)
- ⇒ Täytä 3 l:aan vedellä
- ⇒ Säädä pH 8,5

1:4-puskuri

- 100 ml puskuri II (ajogeelin puskuri)
- 4 ml 10 % SDS (BDH, liuotettu veteen 1:10)
- ⇒ 100 ml vettä
- ⇒ Säädä pH 8.55–8.6.

MR-Spacer-puskuri

- 31,23 ml 40 % akryyliamidi (Bio-Rad)
- 31,3 ml puskuri I (ylägeelin puskuri)
- 2,3 ml 10 % SDS (BDH, liuotettu veteen 1:10)
- ⇒ Täytä 250 ml:aan vedellä

SDS-PAGE-geelit:Ylägeeli (5 %):

10 ml	MR Spacer
10 µl	TEMED
100 µl	10 % APS

Ajogeeli (15 %):

11,25 ml	40 % akryyliamidi (Bio-Rad)
7,5 ml	1:4-puskuri
12 ml	H ₂ O
30 µl	TEMED
300 µl	10 % APS

Liite III. Protokolla: kaksijuosteisen RNA:n muuttaminen DNA:ksi

P3-T7 loop -aluke (5'-p-GGATCCCGGGAATTCGGTAATACGACTCACTATATT TTTATAGTGAGTCGTATTA-OH-3') kiinnitettiin puhdistetun dsRNA:n (n. 80 ng M-segmenttiä (eristetty Qiagenin QIAquick Gel Extraction Kitillä) tai 780–1560 ng koko genomia) 3'-päähän reaktioseoksessa, joka sisälsi 250 ng PC3-T7 loop -aluketta, 50 mM HEPES/NaOH (pH 8,0), 20 mM MgCl₂, 0,01 % BSA (Promega/Fermentas), 1 mM ATP (Fermentas), 10 % (v/v) DMSO (Finnzymes), 3 mM DTT, 20 % (w/v) PEG6000, 20 U Ribolock RNAasi inhibiittoria (Fermentas), 30 U T4 RNA ligaasia (Fermentas) lopputilavuuden ollessa 30 µl. Osassa kokeista HEPES/NaOH ja DTT korvattiin T4 RNA ligaasin omalla reaktiopuskurilla (1X Reaction Buffer, Fermentas). Ligaasin annettiin vaikuttaa 6 h tai 16 h 37 °C, tai ensin 6 h 37 °C, minkä jälkeen lämpötila laskettiin aluksi 18 °C:een ja tämän jälkeen asteittain 12 °C:een, jossa reaktio seiso i yön yli. Ligoitu dsRNA puhdistettiin ylimääräisistä alukkeista MinElute Reaction Cleanup Kitillä (Qiagen) tai QIAquick PCR Purification Kitillä (Qiagen).

Ligoitu ja puhdistettu dsRNA denaturoitiin 95 °C:ssa 2 min 15 % DMSO:ssa (Finnzymes), minkä jälkeen se jäähdytettiin nopeasti jäävedessä. cDNA synteesi tapahtui reaktioseoksessa, jossa oli 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ ja 10 mM DTT, jotka osassa kokeista oli korvattu käänteiskopioijaentsyymien omalla puskurilla (1X RT Buffer, Fermentas), ja lisäksi 1 mM dNTP:eja, 20 U Ribolock RNAasi inhibiittoria (Fermentas) ja 400 U Revert Aid™ Premium Reverse Transcriptasea (Fermentas). Seoksen annettiin reagoida ensin 1 h 50 °C:ssa ja sitten 15 min 55 °C:ssa. RNA hajotettiin NaOH:lla (loppukonsentraatio 0,1 M) 70 °C:ssa 20 min tai 65 °C 30 min, minkä jälkeen reaktio neutralisoi tiin lisäämällä 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5) ja HCl:ia (loppukonsentraatio 0,1 M), ja pitämällä seosta ensin 68 °C:ssa 1 h ja sitten 65 °C:ssa 1–2 h, tai 65 °C:ssa 1 h.

cDNA:n monistamiseen käytettiin PC2-aluketta (5'-CCGAATTCCTCGGGATCC-3'), joka on komplementaarinen P3-T7 loop -alukkeen kanssa. Reaktioseos sisälsi 5 µl cDNA:ta, 1,25 mM PC2-aluketta, 0,2 mM dNTP:eja, 1X Phusion HF -puskuria (Finnzymes) ja 2 U Phusion Hot Start DNA-polymeraasia (Finnzymes) tilavuudessa 25 µl. Monistamista kokeiltiin myös AmpliTaq Gold® DNA-polymeraasilla (Applied Biosystems) ja Herculase II Fusion DNA-polymeraasilla (Agilent Technologies) valmistajien 1X pusku reissa ja valmistajien antamia ohjeita noudattaen lopputilavuuden ollessa 50 µl. Monistus tapahtui

Biometra T3 Thermocyclerissa: 3'-päiden täyttö 72 °C:ssa 2 min; alkudenaturaatio 95 tai 98 °C:ssa 2 min; 30–35 kierrosta 95/98 °C:ssa 25 s, 65 °C:ssa 30 s ja 72 °C:ssa 5 min; loppupidennys 72 °C:ssa 10 min.

Menetelmän perusteet:

