

Flavobakteereita infektoivan ssDNA-bakteriofagi V155:n
karakterisointi



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Jenni Marjakangas
Pro gradu -tutkielma
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Solu- ja molekyylibiologia
16.9.2014

ALKUSANAT

Pro gradu -tutkielmani kokeellinen osuus tehtiin Jyväskylän yliopistossa, Bio- ja Ympäristötieteiden laitoksella, syksyllä 2013 ja talvella 2014. Iso kiitos professori Jaana Bamfordille mahdollisuudesta työskennellä johtamassasi tutkimusryhmässä, jossa tutkielman teko oli mielenkiintoista ja innostavaa.

Erityisesti haluan kiittää ohjaajiani Elina Laantoa ja Sari Mäntystä, jotka auttoivat minua kaikissa pro gradu -tutkielmani vaiheissa, niin laboratoriossa kuin kirjoitusprosessinkin aikana. Lisäksi haluan kiittää ohjaajaani Lotta-Riina Sundbergiä useista tutkielmaani liittyvistä neuvoista sekä avusta kokeiden sekä koko tutkielman sisällön suunnittelussa. Kiitokset myös Petri Papposelle hyödyllisistä neuvoista laboratoriossa ja erityisesti elektronimikroskoopin käytössä, sekä myös kaikille muille tutkimusryhmän jäsenille, jotka auttoivat minua jokapäiväisessä laboratoriotyöskentelyssä. Haluan myös kiittää Olvi-säätiötä heidän myöntämästään apurahasta pro gradu -tutkielmani tekoon.

Jyväskylässä 16.9.2014

Jenni Marjakangas

Tekijä:	Jenni Marjakangas
Tutkielman nimi:	Flavobakteereita infektioivan ssDNA bakteriofagi V155:n karakterisointi
English title:	Characterization of a new Flavobacteria infecting bacteriophage with ssDNA genome
Päivämäärä:	16.9.2014
Sivumäärä:	43 + 4
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Solu- ja Molekyylibiologia
Tutkielman ohjaaja(t):	Elina Laanto, Sari Mäntynen ja Lotta-Riina Sundberg

Tiivistelmä:

ssDNA-bakteriofageja esiintyy ympäristössä huomattavasti enemmän, kuin mitä on aiemmin oletettu. Viime aikoina kehittyneet virusten laskentametodit ovatkin aiheuttaneet ainoan tunnetun ssDNA-faagiperheen, *Microviridae*:n, nopean kasvun ja monipuolistumisen. Täysin uusia ssDNA-faagiperheitä ei ole kuitenkaan löydetty. Tässä tutkielmassa karakterisoitiin Jyväsjärvestä eristettyä uutta ssDNA-bakteriofagi-V155:sta. Tavoitteena oli tutkia kyseisen faagin erityispiirteitä, sekä selvittää, kuuluuko se *Microviridae*-perheeseen. Metagenomianalyysien ansiosta ssDNA-faageja tiedetään esiintyvän runsaasti sisävesissä, mutta tämä on ensimmäinen kerta, kun järvestä eristettyä ssDNA-faagia kasvatetaan laboratorio-olosuhteissa sen morfologian, isäntäkirjon sekä elinkierron karakterisoimiseksi. Bakteriofagin genomi todettiin ssDNA:ksi nukleaasikäsittelyillä, ja sen proteiiniprofiilia sekä mahdollisia lipidirakenteita analysoitiin SDS-PAGE:lla. V155:n ja sen isäntien morfologiaa sekä faagi-isäntä-vuorovaikutuksia tarkasteltiin TEM-kuvantamisen avulla. Lisäksi faagin isäntäkirjoa sekä elinkiertoa tutkittiin infektiokokeilla sekä plakkianalyysillä. Bakteriofagin kapsidin havaittiin olevan ikosahedraalinen tunnettujen *Microviridae*-faagien tapaan, mutta TEM:n mukaan sen koko eroaa huomattavasti muiden *Microviridae*-faagien kapsideista. Kloroformitestin ja lipidivärjäyksen perusteella V155:ssä näyttäisi olevan lipidejä, mutta tämä täytyy vielä vahvistaa myös muilla kokeilla. Kalvorakenteiden löytäminen tekisi tutkitusta faagista ainutlaatuisen tunnettujen ssDNA-faagien joukossa. Isäntäkirjotestissä faagi kykeni infektoimaan kolmea eri *Flavobacterium*-kantaa. Tämä on ensimmäinen kerta, kun ssDNA-faagin on havaittu infektioivan kyseistä bakteerisukua. Lisäksi V155:n muodostamat plakit sekä ongelmat nestekasvatuksessa viittaavat faagin kykyyn siirtyä tarvittaessa lysogeeniseen elinkiertoon, mikä on melko harvinaista ssDNA-faagien keskuudessa. V155 osoittaa siis selviä samankaltaisuuksia *Microviridae*-perheeseen, mutta löydetyt eroavaisuudet viittaavat kuitenkin siihen, että tutkittu bakteriofagi kuuluu mitä todennäköisimmin uuteen *Microviridae*-alaperheeseen, ellei jopa täysin uuteen virusperheeseen. V155:n rakenne- sekä sekvenssitutkimusta tarvitaan vielä lisää faagin fylogenian selvittämiseksi.

Author: Jenni Marjakangas
Title of thesis: Characterization of a new Flavobacteria infecting bacteriophage with ssDNA genome
Finnish title: Flavobakteereita infektioivan ssDNA bakteriofagi V155:n karakterisointi
Date: 16.9.2014
Pages: 43 + 4
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell and Molecular Biology
Supervisor(s): Elina Laanto, Sari Mäntynen ja Lotta-Riina Sundberg

Abstract:

Recently it has been revealed that the number of ssDNA-phages in the environment is much greater than previously expected. Improved viral counting methods have increased ssDNA-phage detections, resulting in the expansion of the only known ssDNA-phage family *Microviridae*. However, completely new ssDNA-phage families have not been found. In this study a new ssDNA-bacteriophage V155, previously isolated from the lake Jyväsjärvi, was characterized. The aim was to study the features of the phage and also find out if V155 belongs to the *Microviridae*-family. Numerous metagenomic analyses have revealed that ssDNA-phages are common in fresh waters. However, this is the first time that lake derived ssDNA-phage is cultivated in laboratory in order to characterize its morphology, host range and life cycle. The genome of the bacteriophage was confirmed to be ssDNA by various nuclease treatments, and its protein profile and the existence of lipid structures were analyzed in SDS-PAGE. The morphology of the phage and its hosts as well as the phage-host-interactions were researched using electron microscopy. In addition, the host range and the life cycle of the phage were studied using infection experiments and plaque analysis. It was revealed that the capsid of V155 is icosahedral in the same manner as in the other *Microviridae*. However, the capsid size greatly exceeds that of the known ssDNA-phages. According to the chloroform tests and lipid staining of the electrophoresis gel, the virion seems to contain lipids, yet further research is needed in order to confirm this. If membrane structures were found, it would make V155 unique within the known ssDNA-phages. In the host range experiments it was discovered that the phage is able to infect three different *Flavobacterium* strains. There are no other reports of *Flavobacterium* as a host species for *Microviridae*. Furthermore, the plaque morphology and the difficulties growing the phage in liquid culture indicate, that when needed, V155 is able to shift from lytic to lysogenic life cycle. This is relatively rare within the known ssDNA-phages. According to these results V155 has clear similarities to the *Microviridae*-family. Nevertheless, the differences revealed during the research make it plausible that this bacteriophage belongs to a new *Microviridae*-subfamily, or possibly even to a completely new viral family. More structure and sequence research is still needed in order to characterize the phylogeny of V155 comprehensively.

SISÄLLYSLUETTELO

ALKUSANAT	2
TIIVISTELMÄ.....	3
ENGLANNINKIELINEN TIIVISTELMÄ (ABSTRACT).....	4
SISÄLLYSLUETTELO	4
LYHENTEET	6
1 JOHDANTO	7
1.1 Bakteriofagit akvaattisessa ympäristössä.....	7
1.1.1 Bakteriofagien elinkierto	7
1.2 <i>Flavobacterium</i> -suku ja niiden bakteriofagit	8
1.3 Yksijuosteiset DNA-faagit	10
1.3.1 <i>Microviridae</i> -perheen mallivirus ϕ X174.....	10
1.3.2 <i>Microviridae</i> -alaperheet	12
2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	13
3 MATERIAALIT JA METODIT	14
3.1 Bakteerit ja virukset	14
3.2 Faagin tuotto ja puhdistus	14
3.3 V155:n ja sen isäntien elektronimikroskopointi	15
3.4 Proteiiniprofiilin määrittäminen SDS-PAGE:lla.....	16
3.5 Lipidianalyysi trisiini-SDS-PAGE:lla.....	16
3.6 Genomin eristys	17
3.7 Genomin analysointi	18
3.8 Genomin monistus dsDNA:ksi sekvensointia varten.....	18
3.8.1 ssDNA:n monistus PCR-reaktioilla.....	18
3.8.2 Virusgenomin RF-muodon eristys infektoiduista bakteereista	18
3.9 Isäntäkirjon määrittäminen.....	19
3.10 Isännän 16S rRNA-geenin sekvensointi	19
3.11 Adsorptiotesti	20
4 TULOKSET	21
4.1 Faagin tuotto ja puhdistus	21
4.2 Morfologian analysointi	22

4.3 Proteiiniprofiilin ja lipidirakenteiden kartoitus	22
4.4 Genomin karakterisointi.....	25
4.4.1 Genomin analysointi nukleasikäsittelyillä	25
4.4.2 Genomin kopioiminen dsDNA:ksi	25
4.5 Faagin isäntien tutkiminen	26
4.5.1 Isäntäkirjon kartoitus	26
4.5.2 Eristyskanta B330:n karakterisointi 16S rRNA-geenin sekvensoinnilla.....	29
4.5.3 V155:n kiinnittyminen eristysisäntään	29
5 TULOSTEN TARKASTELU.....	31
6 LÄHTEET	39
LIITTEET	44
Liite I. SDS-PAGE:n geelit ja puskurit.....	44
SDS-PAGE-puskurit:	44
SDS-PAGE-geelit:.....	46
Liite II. B330:n 16S rRNA-geenin PCR-monistus	47
Alukkeiden fD1 ja rDi sekvenssit (Weisburg, 1991)	47
16S rRNA -geenin monistusreaktio ja PCR-ohjelma.....	47
Sekvensointi-PCR.....	47

LYHENTEET

1X-puhdistus	ensimmäisen vaiheen viruspuhdistus
2X-puhdistus	toisen vaiheen viruspuhdistus
AGE	agaroosigeelielektroforeesi
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CFU	pesäkkeitä muodostava yksikkö (engl. colony forming unit)
dsDNA	kaksijuosteinen DNA (engl. double stranded DNA)
dH ₂ O	ionivaihdettu vesi
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo
TEM	transmissioelektronimikroskopia
EtOH	etanoli
<i>F. columnare</i>	Flavobacterium columnare
KPO ₄	kalium-fosfaattipuskuri
MOI	infektion moninkerta (engl. multiplicity of infection)
PFU	plakkeja muodostava yksikkö (engl. plaque forming unit)
PCR	polymeraasiketjureaktio (engl. polymerase chain reaction)
PTA	fosfovolframihappo (engl. phosphotungstic acid)
RF DNA	replikaatiomuotoinen (engl. replication form) DNA
rRNA	ribosomaalinen RNA
SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi
ssDNA	yksijuosteinen DNA (engl. single stranded DNA)
TAE	trisasetaatti-etyleenidiamiini-tetraetikkahappo -puskuri

1 JOHDANTO

1.1 Bakteriofagit akvaattisessa ympäristössä

Bakteriofagit, tai lyhyemmin faagit, ovat viruksia jotka infektoivat yksinomaan prokaryootteja. Faageja esiintyy kaikkialla missä on myös bakteereja, ja niiden määrät ovat yleensä moninkertaiset isäntien määriin nähden. Merissä faageja on noin viisinkertaisesti enemmän kuin bakteereja. Sisävesissä kyseinen suhde on keskimäärin 20-kertainen (Maranger ja Bird, 1995). Bakteriofagikonsentraatioiden on huomattu kasvavan ympäristön biomassan kasvun myötä, mikä johtuu todennäköisesti siitä, että isäntiä on silloin enemmän tarjolla. Suurimmillaan erittäin runsasravinteisissa järvissä faageja on havaittu olevan jopa 10^8 plakkia muodostavaa yksikkö (engl. plaque forming unit, PFU) millilitrassa (ks. yleiskatsaukset Wommack ja Colwell, 2000; Weinbauer, 2004). Faagien määrä vaihtelee myös ajallisesti vuodenajan mukaan niin, että viruskonsentraatiot ovat suurimmillaan yleensä kesällä ja syksyllä kasviplanktonin kukinnan jäljiltä (ks. yleiskatsaukset Wommack ja Colwell, 2000). Bakteriofagit vaikuttavat vahvasti vesien ekologiaan ollen muun muassa tärkeä osa akvaattisia ravintoverkkoja sekä pitämällä yllä prokaryoottien diversiteettiä (Weinbauer ja Rassoulzadegan, 2004).

1.1.1 Bakteriofagien elinkierto

Infektoidessaan bakteereja bakteriofagi tarttuu isäntänsä reseptoreihin ja siirtää perimäaineksensa solun sisälle. Tämän jälkeen se valitsee jonkin useista olemassa olevista elinkiertostrategioista, joista esitellään tässä kolme. Lyyttisessä elinkierrossa faagi hyödyntää välittömästi infektion jälkeen isäntäsolun proteiineja uusien viruspartikkeleiden muodostamiseen. Uusien virionien purkautuessa bakteerisolu hajoaa. Toiset faagit käyttävät lysogeenistä elinkiertoa, eli ne pystyvät infektion jälkeen liittämään perimänsä osaksi isännän genomia ja siten pysymään latentteina pitkiäkin aikoja (ks. yleiskatsaukset Wommack ja Colwell, 2000; Weinbauer, 2004). Isännän perimään kiinnittynyttä bakteriofagia kutsutaan profaagiksi, ja se jakautuu bakteerin solunjakautumisen mukana tytärsoluihin. Tarvitaan jokin indusoiva tekijä, kuten esimerkiksi säteily tai lämpötilan muutos, joka saa faagin siirtymään lyyttisen elinkiertoa (Jiang ja Paul, 1996). Profaagin irtautuessa isännän genomista sen mukana saattaa irrota myös pala bakteerin perimää, joka pakkautuu viruspartikkeliin ja kulkeutuu uudelle isännälle. Tämä on bakteriofagien

välityksellä tapahtuvaa horisontaalista geeninsiirtoa, jota kutsutaan transduktioksi (Jiang ja Paul, 1998).

Lysogeeniseen elinkiertoon kykenevälle bakteriofagille on edullista pysyä integroituneena isäntänsä genomiin, jos ympäristössä on pulaa ravinteista ja näin ollen myös bakteerisännistä. Onkin havaittu, että mitä oligotrofisempia vedet ovat, sitä enemmän bakteerit yleensä kantavat profaageja (Weinbauer ja Suttle, 1999; Williamson ym., 2002). Lyyttisiä faageja on taas keskimäärin enemmän eutrofisilla alueilla, joissa perustuotanto on korkea ja isäntiä esiintyy paljon (ks. yleiskatsaus Weinbauer, 2004). Toisaalta joskus profaagi saattaa siirtyä lyyttiseen vaiheeseen jos isäntä alkaa voida erittäin huonosti esimerkiksi juuri ravinteiden puutteen takia (Clarke, 1998). Tällöin on parempi jättää solu kuin kuolla sen mukana.

Pseudolysogenia on elinkiertostrategia, jossa faagi pysyy latenttina bakteerin sisällä, muttei kuitenkaan liity osaksi genomia, eikä siis jakaudu bakteerin jakautumisen yhteydessä (Cenens ym., 2013). Pseudolysogeniassa faagi ei siis ole täysin temperaatti, muttei lyyttinenkään. Näyttäisi siltä, että bakteriofagi päättyy pseudolysogeniaan silloin, kun ravinteita on tarjolla hyvin vähän. Tällöin virus ei pysty aloittamaan kunnolla kumpaakaan edellä mainituista elinkierroista, vaan jää odottamaan ravinteiden määrän kasvua (Ripp ja Miller, 1998). Olojen muuttuessa paremmiksi faagi voi tehdä päätöksen välittömän lisääntymisen ja lysogenian väliltä. Esimerkkejä pseudolysogeniasta on löydetty niin meristä kuin makeistakin vesistä (ks. yleiskatsaus Weinbauer, 2004).

1.2 *Flavobacterium*-suku ja niiden bakteriofagit

Flavobacterium-suvun bakteerit kuuluvat pääjaksoon *Bacteroidetes* ja sen alla heimoon *Flavobacteriaceae* (Bernardet ym., 1996). Suvun kaikki kannat ovat gram-negatiivisia sauvoja, joilla ei ole piluksia tai flagelloja (ks. yleiskatsaus Bernardet ja Bowman, 2006). Flavobakteerit käyttävätkin liikkumiseensa liukumista (engl. gliding motility) ulkoisten rakenteiden sijasta, ja tämän voi havaita pesäkkeiden reunojen epätasaisuudesta ja haarautumisesta (Pérez-Pascual ym., 2010; Laanto ym., 2012). Toinen silmiinpistävä piirre kaikkien flavobakteereiden pesäkkeissä on niiden keltainen väri, joka aiheutuu karotenoideista tai flexirubiinipigmentistä (Nakagawa ja Yamasato, 1996). *Flavobacterium*-lajeja on löydetty ympäri maapalloa, mutta lähinnä kuitenkin kylmän ja lauhkean ilmaston alueilta järvistä, joista ja maaperästä. Lisäksi tietyt *Flavobacterium*-lajit

ovat taudinaiheuttajia sisävesien kaloissa. Suurin osa lajeista on kuitenkin harmittomia kemoheterotrofeja (ks. yleiskatsaus Bernardet ja Bowman, 2006).

Tunnetuin patogeeninen *Flavobacterium*-laji lienee *F. psychrophilum*, joka aiheuttaa lohikalojen kuolemia ympäri maailmaa (Nematollahi ym., 2003). Toinen merkittävä kalatautienaiheuttaja on *F. columnare*, josta koituu mittavia ongelmia erityisesti kalanviljelylaitoksille (Pulkkinen ym., 2010). Kalanviljelylaitoksilla on käytetty runsaasti antibiootteja infektioiden hoitoon, mutta valitettavasti antibioottiresistenttiys on muodostunut ongelmaksi *F. psychrophilum*-bakteerin kohdalla. Tämän lisäksi antibioottien käyttö näyttäisi suosivan erittäin virulenttien bakteerikantojen yleistymistä (Nematollahi ym., 2003; Pulkkinen ym., 2010). Siksi esimerkiksi faagiterapian käyttöä *F. psychrophilum* ja *F. columnare* -kantoja vastaan on alettu tutkia (Laanto ym., 2012; Madsen ym., 2013; Castillo ym., 2014).

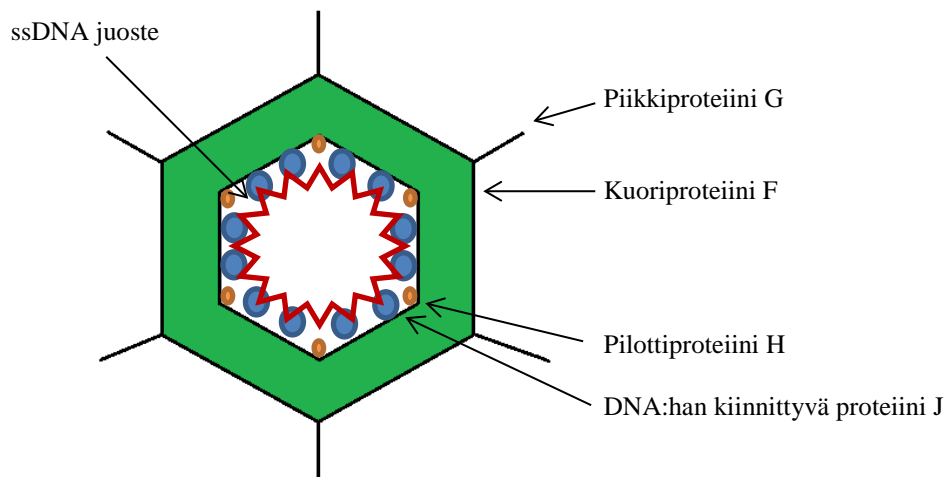
Tutkimukset ovat osoittaneet, että flavobakteereita infektoivien faagien joukosta löytyy niin lysogeenisiä kuin lyyttisiäkin elinkierron strategioita. Kaikki tähän mennessä löydetyt faagit ovat kuitenkin hännällisiä kaksijuosteisia DNA (dsDNA) faageja, jotka kuuluvat perheisiin *Myoviridae*, *Siphoviridae* ja *Podoviridae* (Borriss ym., 2003; Holmfeldt ym., 2007; Stenholm ym., 2008; Laanto ym., 2011). Bakteriofagit kiihdyttävät flavobakteerikantojen erilaistumista, sillä mahdollisimman nopea resistenttiyden kehittäminen faagi-infektiota vastaan on isännälle elintärkeää. Resistenssimekanismeja on useita ja ne voivat vaihdella jopa saman flavobakteerikannan sisällä (Middelboe ym., 2009). Lisäksi resistenssin seurauksena bakteerin aineenvaihdunta, virulenssi tai kyky liukua kasvualustalla voivat häiriintyä, sekä herkkyys muille faagi-infektioille voimistua (Middelboe ym., 2009; Laanto ym., 2012; Castillo ym., 2014). Profaagitkin ovat mukana flavobakteereiden evoluutiossa. Tästä esimerkkinä on maailmanlaajuisesti lähes kaikissa *F. psychrophilum* -kannoissa esiintyvä bakteriofagi 6H. Kyseisen profaagin geenit näyttäisivät voimistavan isäntäbakteerin resistenttiyttä muita faageja vastaan ja mahdollisesti heikentävän isännän virulenssia (Castillo ym., 2013; Castillo ym., 2014).

1.3 Yksijuosteiset DNA-faagit

1.3.1 *Microviridae*-perheen mallivirus ϕ X174

Yksijuosteisia DNA (ssDNA) -bakteriofageja on pidetty tähän saakka erittäin harvinaisina. Viime aikoina on kuitenkin havaittu, että perinteiset laskentamenetelmät aliarvioivan huomattavasti ssDNA-faagien määrää, ja nyt niitä tunnistetaan kokoajan lisää metagenomianalyysien sekä uusien värjäysmenetelmien avulla (Tucker ym., 2011; Holmfeldt ym., 2012; Roux ym., 2012a). Myös tässä tutkielmassa karakterisoidun faagin genomi vaikutti esikokeiden perusteella olevan ssDNA:ta (kokeet suorittanut Heidi Pirttinen).

Kaikki toistaiseksi identifioidut ssDNA-faagit kuuluvat *Microviridae*-perheeseen. Perheen faageista ϕ X174:n rakenne ja elinkierto tunnetaan parhaiten, ja sitä pidetäänkin *Microviridae*-perheen malliviruksena. ϕ X174:llä on ikosahedraalinen, T=1-symmetriaa noudattava kapsidi, joka on kooltaan 25 nm. Kapsidin jokaisessa kulmassa on piikkirakenne eikä virionissa ole lipideitä (ks. yleiskatsaukset Leclerc, 2002; Fane ym., 2005). Rakenneproteiinien (F) ja piikkiproteiinien (G) lisäksi kapsidin sisällä on 60 kopiota DNA:han kiinnittyvästä J-proteiinista sekä 12 kopiota DNA-pilottiproteiinista H (kuva 1) (McKenna ym., 1992). Faagin ssDNA-genomi on sirkulaarinen ja sen pituus on 5386 nukleotidia. (ks yleiskatsaukset Leclerc, 2002; Fane ym., 2005).



Kuva 1. ϕ X174:n rakenne. Kuvassa on esitetty kaikki ϕ X174:n rakenneproteiinit sekä sen ssDNA-genomi. Virionissa on 60 kopiota proteiineista G, F ja J ja 12 kopiota proteiinista H. Genomi on kiinnittyneenä kapsidin seinämiin J-proteiinin välityksellä. Kuva on muokattu sivuston http://viralzone.expasy.org/all_by_species/114.html pohjalta 29.4.2014.

ϕ X174 infektoi enterobakteereja ja sen elinkierto on lyyttinen (ks. yleiskatsaukset Leclerc, 2002; Fane ym., 2005). Faagi tunnistaa piikkiproteiineillaan isännän lipopolysakkaridien glukoosi- ja galaktoosimolekyylit, minkä jälkeen virioni liikkuu solun pinnalla etsien reseptoria, johon se voi kiinnittyä peruuttamattomasti (engl. irreversible) (Incardona ym., 1985; Kawaura ym., 2000). Tämän seurauksena genomi näyttäisi tunkeutuvan suoraan soluplasmaan H-proteiinin muodostaman putken kautta (Sun ym., 2014). Genomi on polariteetiltaan positiivinen, joten lähetti-RNA:ta koodaava negatiivinen juoste täytyy valmistaa ennen kuin faagin 11 geeniä voidaan transkriptoida (ks. yleiskatsaukset Leclerc, 2002; Fane ym., 2005).

ϕ X174:n genomien replikaatio jakautuu kolmeen vaiheeseen. Ensimmäisessä vaiheessa solulimassa oleva yksijuosteinen DNA kopioidaan kaksijuosteiseen sirkulaariseen replikaatiomuotoon (engl. replication form DNA, RF DNA) (Goulian ym., 1967). Toisessa vaiheessa RF DNA:ta replikoidaan lisää rolling circle -menetelmällä. Positiivinen juoste irtaantuu ja monistuu samoin kuin ensimmäisessä vaiheessa, kun taas negatiivinen juoste jatkaa rolling circle -replikaatiota (Dressler, 1970; Eisenberg ym., 1976). Kolmannessa vaiheessa DNA:n kopiointi hidastuu ja positiivisen juosteen rinnalle ei muodostetakaan enää uutta DNA-juostetta, vaan se pakataan faagin kapsidiin samanaikaisesti rolling circle -replikaation kanssa (Knippers ym., 1968; ks. yleiskatsaus Leclerc, 2002).

Prokapsidi kootaan aiemmin tuotetuista rakenneproteiineista sisäisen ja ulkoisen rakennustelineproteiinin avustuksella (engl. internal ja external scaffolding protein) (Mukai ym., 1979; Morais ym., 2004). Kun kapsidi on valmis, DNA voidaan pakata DNA:han kiinnittyvän J-proteiinin johdattamana (Bernal ym., 2004). Provirioni kypsyy virioniksi sisäisen ja ulkoisen rakennustelineproteiinien irrotessa ja kapsidin painuessa kokoon. Nämä muutokset aiheuttaa todennäköisesti DNA:han kiinnittyneen J-proteiinin vuorovaikutukset kapsidin sisäpuolen kuoriproteiinien kanssa (Hafenstein ja Fane, 2002). Kun virioneja on tarpeeksi, solu hajotetaan mekanismilla, joka eroaa merkittävästi dsDNA-bakteriofagien käyttämästä holiini-lysiini-hajotusmekanismista. ϕ X174 tuottaa hajotukseen antibiootinkaltaista E-proteiinia, joka inhiboi bakteerin MraY-translokaasientsyymiä. Tämä entsyymi katalysoi normaalisti bakteerin soluseinän synteysin ensimmäistä kalvolla tapahtuvaa vaihetta (Zheng ym., 2009).

1.3.2 *Microviridae*-alaperheet

Microviridae-perhe jaetaan nykyisin yhden homogeenisen ryhmän sijasta neljään alaperheeseen. *Microvirus*-alaperheeseen kuuluu tyyppivirus ϕ X174:n lisäksi kuusi muuta lajia, jotka infektoivat enterobakteereita (Roux ym., 2012b). *Gokushovirinae*-alaperheen akvaattisissa ympäristöissä esiintyvät faagit taas infektoivat bakteereja klamydia-, spiroplasma- ja bdellovibrio -suvuista. Tämän lisäksi niitä on eristetty myös ihmisen ja muiden eukaryoottien mikrobistosta (Brentlinger ym., 2002; Roux ym., 2012b). *Gokushovirinae*-virusten kapsidirakenne eroaa selvästi ϕ X174:n rakenteesta, eivätkä ne käytä kapsidin muodostuksessa ϕ X174:lle elintärkeitä ulkoisia rakennustelineproteiineja. DNA- ja proteiinisekvenssien perusteella *Microvirus* ja *Gokushovirinae* ovatkin melko kaukaista sukua toisilleen (Chipman ym., 1998; Brentlinger ym., 2002; Tucker ym., 2011). *Gokushovirinae* on selvästi laajin *Microviridae*-alaperhe, ja genomi- ja kuoriproteiini-analyysien perusteella se näyttäisi koostuvan edelleen pienemmistä evolutiivisista ryhmistä (Labonté ja Suttle, 2013; Hopkins ym., 2014).

Kaikki tunnetut *Microvirus*- ja *Gokushovirinae*-faagit ovat lyyttisiä, ja näin ollen koko *Microviridae*-perhettä pidettiin aiemmin kykenemättömänä lysogeenisen elinkierto. *Microviridae*-perheeseen kuuluvia profaageja löydettiin kuitenkin hiljattain ihmisen suusta ja suolistosta peräisin olevista *Bacteroidetes*-pääjakson bakteereista (Krupovic ja Forterre, 2011). Kuoriproteiinin aminohapposekvenssivertailujen ja genomien analysoinnin perusteella näiden temperaattien faagien havaittiin eroavan olemassa olevista *Microviridae*-alaperheistä niin merkittävästi, että niille muodostettiin uusi alaperhe, *Alpavirinae* (Krupovic ja Forterre, 2011; Roux ym., 2012b). Viimeisin omaksi alaperheeksi esitetty *Microviridae*-faagiryhmä on nimeltään *Pichovirinae*, joka näyttäisi geenien järjestyksen sekä kuoriproteiinien sekvenssien perusteella olevan lähimpänä *Gokushovirinae*-alaperhettä. (Roux ym., 2012a; Roux ym., 2012b).

2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkielmassa karakterisoiitiin Jyväsjärvestä aiemmin eristettyä V155 -bakteriofagia, jonka isäntä vaikutti pesäkemorfologiansa perusteella kuuluvan *Flavobacterium*-sukuun. Kyseinen bakteerisuku on suuri ja siten sitä infektoivien faagien tutkimus on tärkeää. Lisäksi V155:n genomi näytti esikokeiden perusteella olevan ssDNA:ta, ja siten se eroaa merkittävästi muista karakterisoiduista flavobakteereiden faageista. Tutkimuksen tavoitteena oli:

- Optimoida faagin tuotto ja puhdistus.
- Tarkastella faagin morfologiaa ja proteiiniprofiilia, sekä selvittää onko siinä lipidirakenteita.
- Karakterisoida faagin genomi.
- Identifioida V155:n eristysisäntä ja kartoittaa sen isäntäkirjo, sekä tutkia faagin elinkiertoa.

3 MATERIAALIT JA METODIT

3.1 Bakteerit ja virukset

Ulkoisten piirteiden perusteella *Flavobacterium*-sukuun kuuluva isäntäbakteerikanta B330 sekä sitä infektoiva faagi V155 oli eristetty kurssityönä Jyväskylän Jyväsjärvestä (N 62° 13' 48'', E 025° 44' 35'') vuonna 2010. Muut työssä käytetyt bakteerit olivat *Flavobacterium*-suvun kantoja, jotka on eristetty eri puolilta Suomea (Laanto ym., 2011). Kaikki bakteerit kasvatettiin huoneen lämmössä Shieh-kasvatusalustoilla (Shieh, 1980). Titrauksessa 100 µl faagilaimennosta ja 200 µl isäntäbakteeria lisättiin 3 ml:aan Shieh-pehmytagaria, jonka lämpötila oli 47 °C. Seos maljattiin Shieh-kasvatusalustalle ja maljoja inkuboitettiin huoneenlämmössä yön yli, jonka jälkeen määritettiin tiitteri eli plakkeja muodostavien yksiköiden (engl. plaque forming unit, PFU) määrä millilitrassa (PFU/ml).

3.2 Faagin tuotto ja puhdistus

Faagin puhdistusta ja infektiokokeita varten valmistettiin faagikantaliuos käyttämällä puoliksi syötyjä eli semikonfluentteja maljoja, jotka oli valmistettu ja kasvatettu kuten titrausmaljat. Shieh-pehmytagar kaavittiin talteen ja siihen lisättiin jokaista maljaa kohden 4 ml Shieh-liuosta. Liuosta inkuboitettiin ravistelijassa (120 rpm, 1h, RT), jonka jälkeen se sentrifugoitiin agarin ja bakteereiden erottamiseksi faageista (Sorvall SS-34-roottori, 12 000 x g, 10 min, 4 °C). Tämän lisäksi supernatantti suodatettiin (32 mm:n ruiskusuodatin, jossa 0,45 µm Supor© kalvo, PALL Life Sciences). Kantaliuoksen tiitteri selvitettiin ja se säilytettiin 4 °C:ssa.

Faagia täytyi tuottaa suurempia määriä ensimmäisen (1X) ja toisen vaiheen (2X) puhdistusta varten. Faagin tuottamista nesteviljelmästä yritettiin useissa eri olosuhteissa ja eri virus- ja bakteerimäärillä (osan kokeista on tehnyt Heidi Pirttinen). Bakteereiden solutiheydet kaikissa nestekasvatuskokeissa määritettiin vertaamalla Clormic-laitteella (P-Selecta) 550 nm:n aallonpituudella mitattua optista tiheyttä aiemmin tehtyyn B330 -bakteerikannan kasvukäyrään (kasvukäyrän on tehnyt Heidi Pirttinen). Tuottokokeissa bakteerit infektoitiin, kun kasvatuksien solutiheydet olivat saavuttaneet eri arvoja väliltä $1,75 \times 10^8$ – $1,4 \times 10^9$ pesäkettä muodostavaa yksikkö/ml (engl. colony forming unit/ml, CFU/ml). Tämä vastaa bakteerikannan B330 eksponentiaalisen kasvun vaihetta. V155-

faagia lisättiin kasvatuksiin infektion moninkerta -arvoilla (engl. multiplicity of infection, MOI), jotka olivat väliltä 2 - 25. Tämän jälkeen kasvatusta jatkettiin ravistelussa, jonka nopeus eri kokeissa vaihteli 60 rpm:stä 220 rpm:ään. Testatut kasvatuslämpötilat olivat väliltä 4 °C - 23 °C. Infektion jälkeen kasvatuksen optista tiheyttä mitattiin säännöllisesti bakteereiden hajoamisen tarkkailemiseksi.

Koska solut eivät hajonneet infektoidussa nestekasvatuksessa, faagipartikkelit puhdistettiin lopulta maljalysaatista. Tätä varten valmistettiin noin 100 semikonfluenttia maljaa (ks. kohta 4.1), joille kullekin lisättiin 5 ml Shieh-liuosta. Maljoja inkuboitiin ravistelijassa (120 rpm, 3 h, 4 °C.), jonka jälkeen lysaatti kerättiin talteen ja suodatettiin. Viruspartikkelien konsentroimiseksi lysaattiin liuotettiin polyetyleeniglykoli (PEG) 6000:ta (10 % w/v) ja natriumkloridia (0,5 M), jonka jälkeen PEG:iin kiinnittyneet faagipartikkelit sentrifugoitiin putken pohjaan (Sorvall SLA3000-roottori, 11 000 x g, 30 min, 4 °C). Syntynyt pelletti pestiin ja liuotettiin 20 mM kalium-fosfaattipuskuriin (KPO₄, pH 7,2).

1X-puhdistus tehtiin lineaarisella sakkaroosigradientilla. Näyte pipetoitiin 5 – 20 % sakkaroosigradientin pinnalle (20 mM KPO₄ -puskurissa, pH7,2) jonka jälkeen gradienttia sentrifugoitiin (Beckman Optima L-K90, SW28-roottori, 104 000 x g, 1 h, 15 °C). Gradientin keskellä sijaitseva paksu valoa siroava vyöhyke kerättiin talteen ja puhdistettiin edelleen 2X-vaiheen tasapainogradientissa. Tämä tehtiin 20 – 70 % sakkaroosigradientissa (20 mM KPO₄ -puskurissa, pH 7,2), joka sentrifugoitiin jälleen (Beckman Optima L-K90, SW41-roottori, 175 000 x g, 19 h, 5 °C). Gradientin kaksi valoa siroavaa vyöhykettä otettiin talteen ja pelletoitettiin (Beckman Optima L-K90, 70Ti-roottori, 112 000 x g, 3 h, 5 °C). Pelletti liuotettiin 20 mM KPO₄ -puskuriin (pH 7,2) ja säilytettiin -20 °C:ssa. Jokaisesta 1X- ja 2X -puhdistuksen vaiheesta otettiin titrausnäyte, jotta voitaisiin seurata infektoivien faagipartikkelien määrää puhdistuksen edetessä.

3.3 V155:n ja sen isäntien elektronimikroskopointi

Bakteriofagi V155:n transmissioelektronimikroskooppi (TEM) -näytteet valmistettiin konfluenteilta maljoilta saadusta maljalysaatista (ks. kohta 4.2, maljalysaatin valmistus), joka sentrifugoitiin faagien keräämiseksi (Beckman Optima L-K90, 70Ti-roottori, 59 000 x g, 1 h, 4 °C). Supernatantti kaadettiin pois ja faageista koostuva pelletti liuotettiin 0,1 M ammoniumasetaattiin. Tämän jälkeen näyte sentrifugoitiin jälleen (Beckman Optima L-

K90, 70Ti-roottori, 59 000 x g, 1 h, 4 °C). Ammoniumasetaattikäsittely tehtiin kahdesti ja lopulta pelletti liuotettiin 20 mM KPO₄-puskuriin (pH 7,2). Tästä otettiin näyte negatiivivärjäykseen. V155:n isäntäbakteerikantojen B330, B167 ja B114 TEM-kuvantamiseksi bakteereja kasvatettiin eksponentiaalisen kasvun vaiheeseen saakka ($9,7 \times 10^8$ CFU/ml), jolloin niistä otettiin näytteet negatiivivärjäykseen. V155:n ja sen isäntien näytteet pipetoitiin päällystetyille kuparihiloille ja värjättiin negatiivisesti 2 % fosfovolframihapolla (engl. phosphotungstic acid, PTA, pH 8,5) 1,5 min ajan. Kaikki TEM-kuvat otettiin JEOL JEM-1200EX läpivalaisuelektronimikroskoopilla 80 kV jännitteellä.

TEM-kuvantamisella tutkittiin myös V155:n kiinnittymistä isäntään. Kun V155:n isäntäkannan B330:n nestekasvatus oli saavuttanut eksponentiaalisen kasvun vaiheen ($9,7 \times 10^8$ CFU/ml), se infektoitiin MOI-arvolla 15. Kontrollinäyte otettiin ennen infektiota ja muut näytteet 1, 5 ja 10 minuuttia infektion jälkeen. Näytteet kiinnitettiin kuparihiloille. Ensin lisättiin näyte ja tämän jälkeen 3 % glutaraldehydi, jota inkuboitiin minuutin ajan. Näyte pestiin kolmesti ionivaihdetulla vedellä (dH₂O) ja värjättiin 1 % uranyliasetaatilla minuutin ajan. Valmiit TEM-näytteet kuvattiin kuten edellä.

3.4 Proteiiniprofiilin määrittäminen SDS-PAGE:lla

1X- ja 2X-puhdistettujen faaginäytteiden proteiinkonsentraatiot mitattiin käyttäen Bradford-menetelmää (Bradford, 1976) ja standardina naudan seerumin albumiinia.

V155-faagin proteiiniprofiilin määrittämiseksi 1X- ja 2X -puhdistetut näytteet eroteltiin 14 % natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE), jonka proteiineja konsentroiva ylägeeli oli 5 %. Ajoissa (80 V, 200 mA, 18,5 h) käytettiin mukana PageRuler Plus Prestained Protein Ladder -molekyylipainostandardia (Thermo Scientific). Värjäys tehtiin Coomassie Brilliant Blue -liuoksella ja värinpoisto 10 %:lla etikkahapolla. Värjäyksen jälkeen geeli kuvattiin Bio-Radin kuvantamislaitteella. SDS-PAGE-geelien ja -puskureiden valmistusohjeet ovat Liitteessä I.

3.5 Lipidianalyysi trisiini-SDS-PAGE:lla

Lipidianalyysi tehtiin V155:n 2X -puhdistetulle näytteelle. Kontrolleina käytettiin sisäisen lipidirakenteen omaavan PRD1:n 1X ja 2X -puhdistettuja näytteitä. Näytteet ajettiin 17 % trisiini-SDS-PAGE:lla, jonka ylägeeli oli 5 % (80 V, 200 mA 16 h ja tämän jälkeen 100 V,

200 mA, 2,5 h). Geeli värjättiin lipideihin kiinnittyvällä Sudan Black B:llä (Sigma-Aldrich) valmistajan ohjeen mukaisesti ja tämän jälkeen Coomassie Brilliant Blue -liuoksella proteiinien erottamiseksi. Lopulta geeli kuvattiin Bio-Radin kuvantamislaitteella. Trisiini-SDS-PAGE-geelien ja -puskureiden valmistusohjeet ovat Liitteessä I.

3.6 Genomin eristys

V155:n DNA:ta eristettiin 1X-puhdistetusta näytteestä. Näytteeseen lisättiin SDS:ää niin, että sen konsentraatioksi tuli 2 % ja proteiinit hajotettiin 1,2 mg:lla proteinaasi K:ta (45 min, 37 °C). Näytteeseen lisättiin yksi tilavuus fenolia, jota inkuboitiin 5 - 15 min. Tämän jälkeen näyte sentrifugoitiin (Eppendorf-pöytäseentrifuugi 5424, 18 000 x g, 5 min) ja yläfaasi otettiin talteen. Fenolointi tehtiin kolmesti, jonka jälkeen näyte eetteröitiin neljästi. Eetteröinnissä alafaasi otettiin talteen. DNA saostettiin 3 M natriumasetaatilla (pH 5,2) ja 96 % etanolilla (EtOH), jonka jälkeen näyte jäähdytettiin -20 °C:ssa ja sentrifugoitiin (Eppendorf-pöytäseentrifuugi 5424, 18 000 x g, 10 min). DNA-pelletti pestiin 75 % EtOH:lla. Lopulta pelletti suspensoitiin dH₂O:n ja osa siitä tarkastettiin 1 % agarosigeelielektroforeesilla (AGE) 1X trisasetaatityleenidiamiinitetraetikkahappopuskurissa (TAE) (100V, 120 mA, 1h). Geeliin oli lisätty etidiumbromidia (0,5 µg/ml) ja standardina käytettiin GeneRuler 1kb Plus DNA ladder -molekyylipainostandardia (Thermo Scientific).

V155:n DNA:ta eristettiin myös faagin kantaliuoksesta käyttäen sinkkikloridimenetelmää (Santos, 1991). Kaikki sentrifugoinnit tehtiin Eppendorfin pöytäseentrifuugilla 5424. Artikkelin Santos, 1991 protokollaa seurattiin poikkeuksetta kaliumasetatti-käsittelyyn saakka. Menetelmässä faagin kantaliuoksesta poistettiin kontaminaatiot RNAasilla ja DNAasilla, jonka jälkeen virukset konsentroidiin sinkkikloridilla. Konsentroidu faagipelletti liuotettiin TES-puskuriin ja partikkelit hajotettiin proteinaasi K:lla. Kaliumasetattikäsittelyn jälkeen artikkelin protokollasta poikettiin ja näytteeseen lisättiin yksi tilavuus fenoli/metyylikloridi/isoamyli-alkoholia (25:24:1) ja seosta sentrifugoitiin (5000 x g, 10 min). Yläfaasi otettiin talteen ja käsiteltiin vielä yhdellä tilavuudella metyylikloridi-isoamylialkoholia (24:1). Saostus tehtiin 10 M ammoniumasetaatilla ja kylmällä 96 % EtOH:lla -70 °C:ssa. Pelletti kerättiin sentrifugoimalla, pestiin viidesti EtOH:lla ja

liuotettiin dH₂O:n. Puhdistettu DNA-näyte tarkastettiin ajamalla osa siitä 1 % AGE:lla kuten aiemmin.

3.7 Genomin analysointi

1X-näytteestä eristettyä V155:n genomia analysoitiin pilkkomalla sitä erilaisilla nukleaaseilla. ϕ X174-faagin ssDNA genomia (Thermo Scientific) pilkottiin V155:n rinnalla kontrollina. Käytetyt nukleaasit olivat DNase I (Fermentas), RNase A (Sigma-Aldrich), RNase I (Thermo Scientific), S1 nukleaasi (Thermo Scientific), Mung bean nukleaasi (Promega) ja *Eco*RI-restriktionukelaasi (Fermentas). Kaikki käsittelyt tehtiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Käsittelyjen jälkeen näytteet ajettiin 0,8 % AGE:lla (80 V, 120 mA, 1,5 h) kuten aiemmin (ks. kohta 4.6). Lopulta geeli kuvattiin Bio-Radin geelin kuvantamislaitteella.

3.8 Genomin monistus dsDNA:ksi sekvensointia varten

3.8.1 ssDNA:n monistus PCR-reaktioilla

Sinkkikloridimetodilla puhdistetusta ssDNA:sta (ks. kohta 4.6 Genomin eristys) yritettiin saada dsDNA:ta polymeerasiketjureaktioilla (engl. polymerase chain reaction, PCR) käyttäen Dream Taq- (Thermo Scientific) ja Phusion HS II -polymeeraaseja (Fermentas) valmistajien ohjeiden mukaisesti. Alukkeina käytettiin sattumanvaraisia oligomeerejä (random hexamers, Thermo Scientific) ja ajot tehtiin T100 PCR -laitteella sekä CFX qPCR-laitteella (Bio-Rad). DNA-juosteen muodostamiseen käytettiin myös Genomiphi V2 DNA amplification -reagenssisarjaa (Cat No. 2566031, GE Healthcare) sekä Universal Riboclone cDNA System -reagenssisarjaa (Cat No. C4361, Promega). Kaikkien yllä mainittujen reaktioiden jälkeen näytteet puhdistettiin PCR Purification Kit -reagenssisarjalla (Cat No. 28106, Qiagen) valmistajan ohjeen mukaisesti ja konsentraatiot mitattiin NanoDropilla (Finnzymes).

3.8.2 Virusgenomin RF-muodon eristys infektoiduista bakteereista

V155:n RF DNA:n eristystä infektoiduista bakteereista yritettiin useita kertoja kokeen eri osia muunnellen. Kaikkia kolmea V155:n isäntäbakteerikantaa (B330, B167 ja B114) infektoitiin MOI-arvoilla 3, 5 ja 10, kun ne oli ensin kasvatettu eksponentiaalisen kasvun vaiheeseen ($9,7 \times 10^8$ CFU/ml). Kasvatusta jatkettiin ravistelussa (90 rpm, 30 min - 5 h, 23 °C), jonka jälkeen RF DNA:ta pyrittiin eristämään Plasmid Purification -reagenssisarjalla

(Cat No. 28106, Qiagen) valmistajan protokollan mukaisesti. Näytteiden konsentraatiot mitattiin Nanodropilla (Finnzymes) ja DNA:t analysoitiin 1 % AGE:lla kuten aiemmin (ks. kohta 4.6).

3.9 Isäntäkirjon määrittäminen

Faagin isäntäkirjon määrittämiseksi V155:lla infektoitiin 36:ta eri *Flavobacterium*-kantaa, joista neljä kuului lajiin *F. columnare*. Bakteereja kasvatettiin nesteessä yön yli, jonka jälkeen 200 µl kasvatusta lisättiin Shieh-pehmytagariin ja kaadettiin maljalle. Kun pehmytagar oli jähmettynyt, 10 µl:n tipat V155:n kantaliuosta ja sen laimennoksia pipetoitiin maljoille ja annettiin absorboitua (kantaliuoksen titteri oli $8,818 \times 10^{10}$ PFU/ml). Maljoja inkuboitiin huoneen lämmössä yön yli, jonka jälkeen tarkastettiin plakkien muodostuminen.

3.10 Isännän 16S rRNA-geenin sekvensointi

Isäntäbakteerikannasta B330 tehtiin yön yli nestekasvatus, josta eristettiin genominen DNA käyttäen GeneJET Genomic DNA Purification -reagenssisarjaa (Cat No. K0722, Fermentas). Eristetystä DNA:sta monistettiin 16S ribosomaalinen RNA (rRNA) -geeni Phusion Flash High Fidelity PCR Master Mix -seosta (Cat No. F-548S, Thermo Scientific) ja alukkeita fD1 ja rD1 (Weisburg ym, 1991) käyttäen. PCR-ajo tehtiin Thermal Cycler Pico -laitteella (Finnzymes) polymeraasin ohjeen mukaisesti (ks. alukkeiden sekvenssit sekä PCR-ohjelma liitteestä II). Tuote puhdistettiin PCR Purification Kit -reagenssisarjalla (Cat No. 28106, Qiagen) valmistajan ohjeiden mukaisesti.

16S rRNA:n sekvensointi-PCR:ssä käytettiin samoja alukkeita kuin sen monistuksessa (fD1 ja rD1) sekä Big Dye Terminator v3.1 Cycle -reagenssisarjaa (Cat No. 4337455, Life Technologies) valmistajan ohjeiden mukaisesti (ks. Liite II). Reaktio ajettiin C1000 Thermal Cycler -laitteella (Bio-Rad). Sekvensointi-PCR-reaktiot saostettiin 125 mM etyleenidiamiinitetraetikkahapolla (EDTA), 3 M natriumasetaattilla ja 100 % EtOH:lla 15 minuutin ajan. Saostettu DNA pelletoitettiin ja pestiin 75 % EtOH:lla. Tämän jälkeen näytteeseen lisättiin formamidia ja inkuboitiin 10 minuuttia huoneen lämmössä. Näytteet sekvensoitiin ABI Prism 3100 Genetic Analyzer -laitteella (Life Technologies).

Sekvenssidata analysoitiin Sequencing Analysis -ohjelmalla. Tämän jälkeen käytettiin BLAST-ohjelmaa (Basic Local Alignment Search Tool, National Center for Biotechnology Information NCBI) sekvenssin vertailemiseksi nukleotidisekvenssitietokantoihin.

3.11 Adsorptiotesti

V155:n kiinnittymistä sen isäntäkanta-B330:een tutkittiin adsorptiotestillä. Ekspontiaalisen kasvun vaiheessa ($9,7 \times 10^8$ CFU/ml) oleva B330-kasvatus jaettiin 1 ml:n näytteisiin, jotka infektoitiin V155:lla siten, että faagia oli jokaisessa näytteessä 1×10^4 PFU:ta. Kussakin aikapisteessä (2, 4, 6, 8, 10, 15, 25 ja 40 minuuttia infektion jälkeen) kolme näyteputkea sentrifugoitiin (Eppendorf-pöytäsentrifuugi 5424, 9 000 x g, 3 min) bakteereiden ja niihin tarttuneiden faagien erottamiseksi vapaista viruksista. Tämän jälkeen näytteiden supernatantit titrattiin (ks. kohta 4.1) vapaana olevien faagipartikkelien määrän selvittämiseksi. Kontrollinäyte tehtiin lisäämällä faagikantaliuosta bakteerittomaan Shieh-liuokseen.

4 TULOKSET

4.1 Faagin tuotto ja puhdistus

Nestekasvatuksessa V155-faagilla infektoidujen B330-, B167- and B114-flavobakteerikantojen optiset tiheydet eivät lähteneet laskuun, eikä V155:n tiitteri noussut, vaikka kasvatuslämpötilaa, ravistelunopeutta, infektiiohetkeä, sekä viruksen määrää vaihdeltiin. Tästä syystä V155:n tuotto päätettiin tehdä semikonfluenteista maljoista.

Faagin tiitteri määritettiin maljalysaatista ja tätä seuranneista 1X- ja 2X-puhdistuksen eri vaiheista infektoidien viruspartikkeleiden määrän seuraamiseksi. PEG-näytteestä ei ollut epähuomiossa otettu titrausnäytettä, mutta muiden 1X-puhdistusvaiheiden tiitterit selvitettiin (Taulukko 1). 1X-puhdistuksessa sakkaroosigradiettiin syntyi yksi paksu valoa siroava vyöhyke, jonka virussaanto oli noin kolmasosa maljalysaatin saannosta. Pelletoinnissa faagin määrä pieneni myös noin kolmasosaan vyöhykkeen saannosta (Taulukko 1). 1X-pelletin spesifinen infektiviteetti, eli infektoidien faagipartikkelien määrä yhdessä milligrammassa proteiinia, oli $1,75 \times 10^{12}$ PFU/mg. Kun 1X-puhdistus tehtiin 100:sta semikonfluentista maljasta, pelletoinnin kokonaisproteiinimäärä oli 1,7 mg.

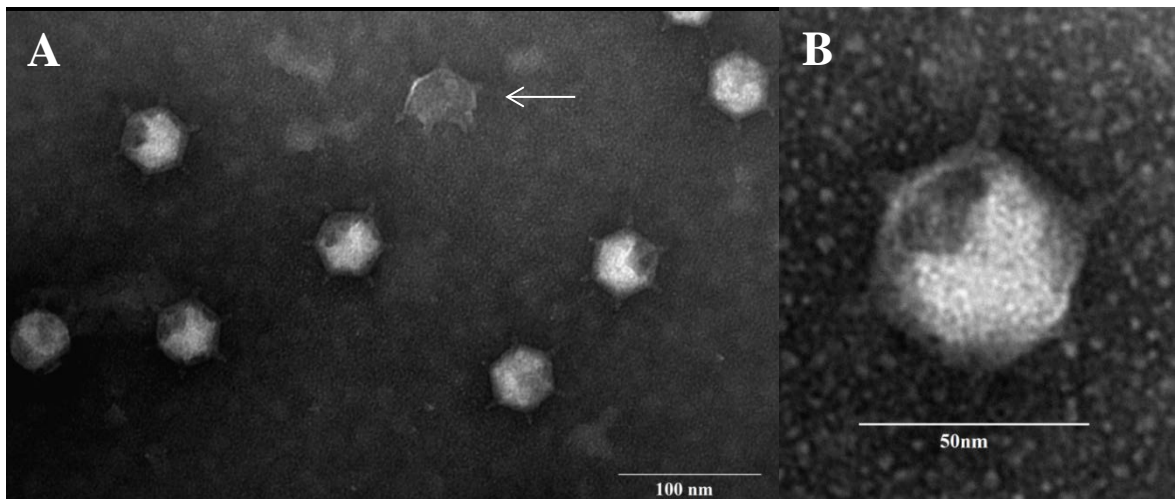
100:sta maljasta tehdyssä 2X-puhdistuksessa sakkaroosigradiettiin muodostui kaksi vyöhykettä, joista ylempi oli tilavuudeltaan 3,4 ml ja noin gradientin keskivaiheilla. Vahvempi vyöhyke asettui keskikohdan alapuolelle ja sen tilavuus oli 4,2 ml. Alavyöhykkeestä saatiin 216 µg proteiinia ja ylävyöhykkeen proteiinisaanto oli 78 µg. 2X-puhdistettujen näytteiden titraukset eivät onnistuneet, ja siksi niiden saantoprosentteja ja spesifisiä infektiviteettejä ei voitu määrittää.

Taulukko 1. 1X-puhdistuksen seuranta kun maljalysaatti valmistettiin 60:stä semikonfluentista maljasta. Taulukossa on esitetty puhdistuksen eri vaiheet, tilavuudet, virusmäärät sekä saadut saantoprosentit.

	Tilavuus	Tiitteri (PFU/ml)	Yhteensä PFU:ta	Saanto (PFU%)
Maljalysaatti	250 ml	$8,6 \times 10^{10}$	$2,15 \times 10^{13}$	100 %
1X vyöhyke	14,5 ml	$4,7 \times 10^{11}$	$6,82 \times 10^{12}$	31,7 %
1X pelletti	100 µl	$2,5 \times 10^{13}$	$2,5 \times 10^{12}$	13,0 %

4.2 Morfologian analysointi

V155:n morfologiaa tutkittiin TEM-kuvantamisella (Kuva 2). Kuvista nähtiin, että virus oli ikosahedraalinen, sillä ei ollut häntärakenteita ja sen jokaisessa kulmassa oli selkeä piikki. Viruspartikkelin koko oli noin 50 nm kapsidin kulmista mitattuna ja sillä ei TEM-kuvien perusteella ollut ulkoisia kalvorakenteita. Silmiinpistävää oli se, että kaikissa partikkeleissa kapsidin sisältö oli luhistunut yhdestä kulmasta. TEM-kuvantamisessa nähtiin myös tyhjiä viruspartikkeleita, joiden sisältö oli purkautunut ja ikosahedraalinen rakenne hajonnut (Kuva 2A).

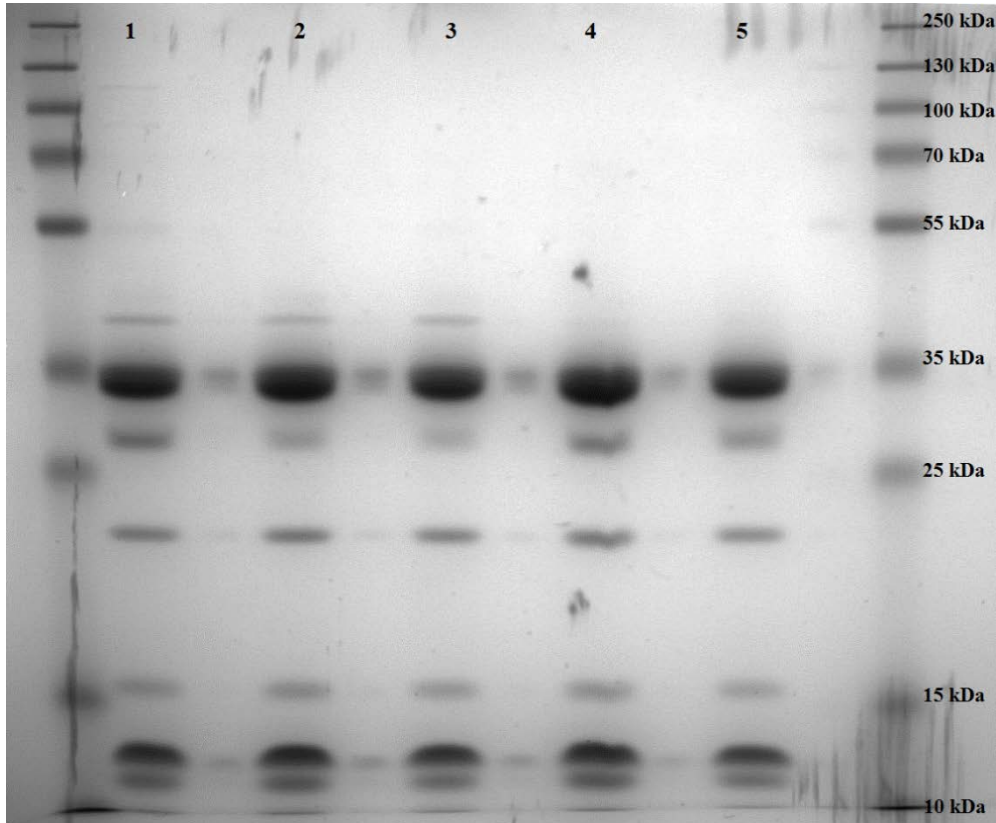


Kuva 2. Bakteriofagi-V155:n TEM-kuvau. Näytteet valmistettiin ammoniumasetaattikäsitellyistä viruspartikkeleista ja värjättiin negatiivisesti 2% PTA:lla (pH 8,5). Hajonnut faagipartikkeli on merkitty kuvaan A nuolella. Kuvassa A mittajana on 100 nm, kuvassa B 50 nm. Mikroskooppia ei oltu kalibroitu.

4.3 Proteiiniprofiilin ja lipidirakenteiden kartoitus

V155:n 1X ja 2X -puhdistetut näytteet ajettiin SDS-PAGE:lla ja proteiinit värjättiin faagin proteiiniprofiilin määrittämiseksi (Kuva 3). Geelillä nähtiin seitsemän proteiinivyöhykettä. Näiden lisäksi 1X-näytteessä geelin yläreunassa näkyi haaleasti joitakin suurikokoisia proteiinivyöhykkeitä, joita ei esiintynyt 2X-puhdistettujen näytteiden geelijaioissa. Paksuin vyöhyke oli ajautunut aivan 35 kDa:n standardivyöhykkeen alapuolelle. Pienin proteiinivyöhyke oli hieman yli 10 kDa:n kohdalla ja ylimmän vyöhykkeen muodosti 35 kDa:n standardivyöhykkeen yläpuolelle ajautunut proteiini. Kyseinen vyöhyke puuttui

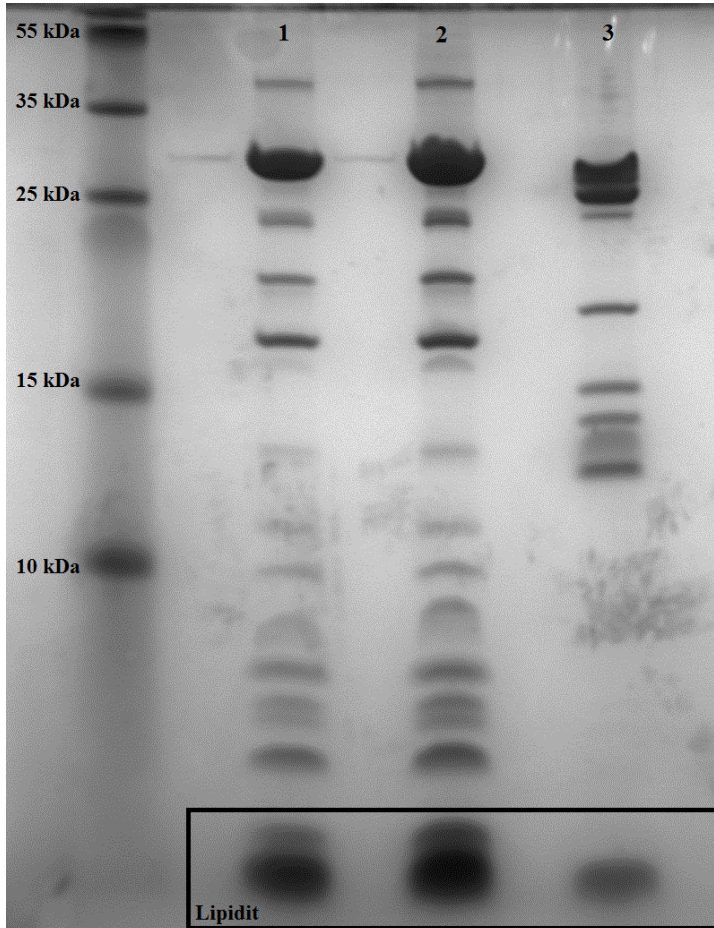
kokonaan faagipartikkeleista, jotka jäivät 2X-puhdistuksessa sakkaroosigradientin ylemmään vyöhykkeeseen (kuva 3, kaivot 4 ja 5).



Kuva 3. V155:n proteiiniprofiilin selvitys SDS-PAGE:lla. 1) 30 ng V155:n 1X -puhdistettua näytettä 2) 30 ng 2X-puhdistuksen alavyöhykkeen näytettä 3) 50 ng 2X-puhdistuksen alavyöhykkeen näytettä 4) 30 ng 2X-puhdistuksen ylävyöhykkeen näytettä 5) 50 ng 2X-puhdistuksen ylävyöhykkeen näytettä. Molekyylipainostandardina molemmissa reunoissa on PageRuler Plus Prestained Proteinladder (Thermo Scientific).

Eristysvaiheessa havaittiin, että V155 on sensitiivinen kloroformille, mikä viittaa mahdolliseen lipidirakenteeseen. Lipidirakenteen olemassaoloa testattiin ajamalla faagin 2X-puhdistettua alavyöhykkeen näytettä trisiini-SDS-PAGE:lla ja värjäämällä geeli Sudan Black B -lipidivärillä (Kuva 4). Lipidikalvollisen bakteriofagi PRD1:n näytteet ajettiin rinnalla kontrollina. V155-näytteestä värjäytyi lipidivärillä selkeä, joskin kontrollivyöhykkeitä haaleampi vyöhyke, joka oli ajautunut geelillä suunnilleen samaan kohtaan PRD1:n vyöhykkeiden kanssa.

Geelille tehtiin lipidien värjäyksen jälkeen proteiinivärjäys (Kuva 4). Trisiini-SDS-PAGE -geelillä vyöhykkeet erottuivat paremmin kuin SDS-PAGE-ajossa (Kuva 3) ja tästä nähtiin, että näytteen paksuin vyöhyke koostuikin itse asiassa kahdesta erillisestä vyöhykkeestä.

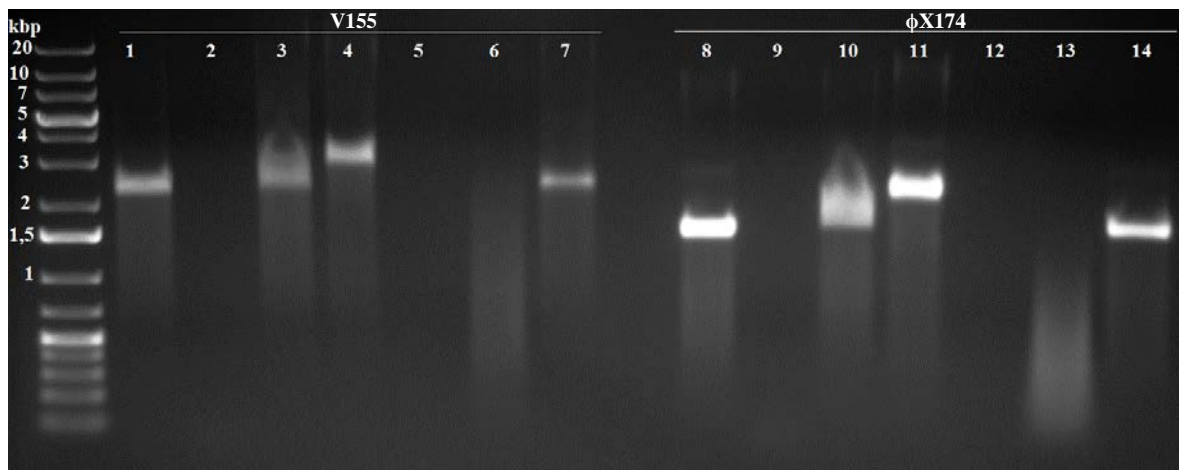


Kuva 4. V155:n lipidianalyysi Trisiini-SDS-PAGE:lla. Geeli värjättiin Coomassie Brilliant blue -proteiinivärin lisäksi lipideihin kiinnittyvällä Sudan Black B:llä. Ensimmäisessä kaivossa on molekyylipainostandardi PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). 1) PRD1:n 1X-puhdistettu kontrollinäyte 2) PRD1:n 2X-puhdistettu kontrollinäyte 3) V155:n 2X-puhdistettu alavyöhykkeen näyte. Kuvan alareunassa olevat lipidivärillä värjäytyneet vyöhykkeet on rajattu laatikkoon.

4.4 Genomin karakterisointi

4.4.1 Genomin analysointi nukleasikäsittelyillä

1X-puhdistetusta näytteestä fenoli-etteri -menetelmällä eristetyn V155-genomin koostumus selvitettiin nukleasikäsittelyillä, joissa V155:n genomi pilkkoutui DNAasilla, S1-nukleasilla ja Mung Bean nukleasilla (Kuva 5, kaivot 2, 5 ja 6). S1 ja Mung bean -nukleasit pilkkovat kummatkin yksijuosteista DNA:ta sekä RNA:ta, kun taas DNAasi hajottaa sekä ss-DNA:ta että dsDNA:ta. Näiden lisäksi genomi käsiteltiin myös RNAasi A:lla (kaivo 3), RNAasi I:llä (kaivo 4) ja *EcoRI*:llä (kaivo 7), jotka eivät kyenneet pilkkomaan V155:n genomia. ssDNA-faagi ϕ X174:n genomi pilkottiin V155:n rinnalla kontrollina, ja se käyttäytyi V-155:n genomin kanssa samalla tavalla kaikissa entsyymikäsittelyissä (kaivot 8-14). Samat käsittelyt tehtiin myös plasmidille pSU18, joka on dsDNA:ta ja pilkkoutui ainoastaan DNAasilla.



Kuva 5. V155-genomin nukleasikäsittelyiden AGE-analysointi. Ensimmäisenä V155:n genomin nukleasikäsittelyt näytteet: 1) digestoimaton 2) DNAasi 3) RNAasi A 4) RNAasi I 5) S1 6) Mung bean nukleasi 7) *EcoRI*. 8-14) edellä olevassa järjestyksessä ϕ X174:n genomin entsyymikäsittelyt näytteet. Ajossa käytettiin 0,8 % agarosigeeliä, joka värjättiin etidiumbromidilla. Molekyylipainostandardina ensimmäisessä kaivossa on Gene Ruler Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

4.4.2 Genomin kopioiminen dsDNA:ksi

V155:n ssDNA-genomista yritettiin saada kaksijuosteista, jotta se voitaisiin kloonata plasmidiin ja sekvensoida. Ensin tavoitteena oli eristää infektoiduista bakteereista faagin RF DNA:ta. Eristys ei kuitenkaan onnistunut useista yrityksistä huolimatta ja siksi faagin

yksijuosteisesta genomista pyrittiin tuottamaan dsDNA:ta PCR-reaktioilla sattumanvaraisia oligomeerejä käyttäen. Eri polymeraaseja ja reaktio-olosuhteita kokeiltiin, mutta NanoDropilla mitatut DNA-konsentraatiot eivät nousseet. Reagenssisarja cDNA:n valmistusta varten ei myöskään tuottanut dsDNA:ta. GE Healthcaren Genomiphi V2 DNA amplification -reagenssisarja monisti Nanodrop-mittauksen mukaan DNA:ta valtavasti. Samanlainen DNA-konsentraation nousu saatiin kuitenkin myös negatiivisesta kontrollista, johon ei ollut lisätty faagin genomia.

4.5 Faagin isäntien tutkiminen

4.5.1 Isäntäkirjon kartoitus

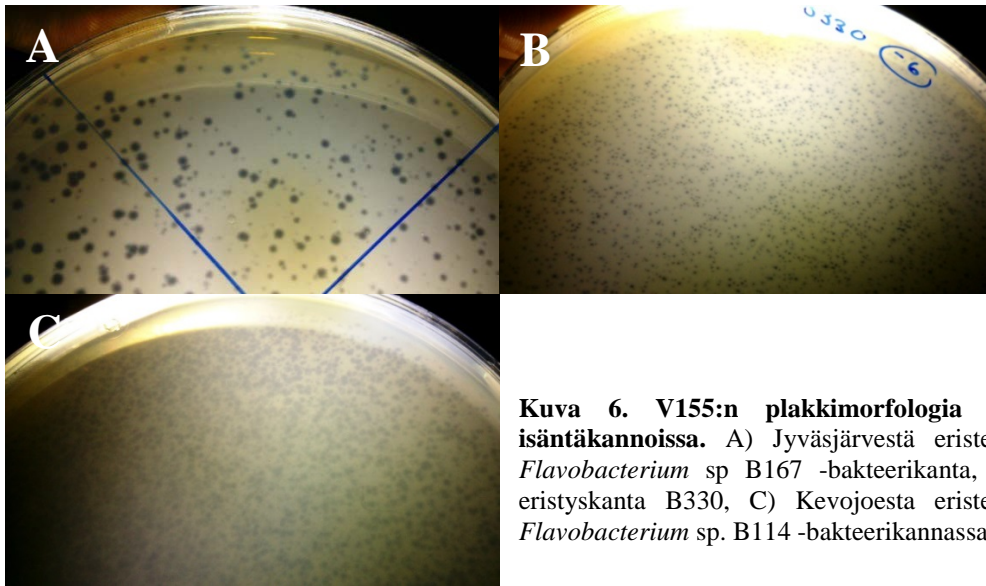
V155:n eristyskanta B330 muistutti flavobakteereita pesäkemorfologiansa perusteella. Tämän vuoksi 36 eri *Flavobacterium*-kantaa, joista neljä kuului lajiin *F. columnare*, infektoitiin V155:lla faagin isäntäkirjon selvittämiseksi (Taulukko 2). Lähes kaikilla maljoilla nähtiin bakteerikasvun inhibitiota silloin, kun faagin kantaliuosta oli laimennettu vain vähän tai ei ollenkaan. V155 kykeni kuitenkin tuottamaan plakkeja eristyskanta-B330:n lisäksi vain bakteerikantaan B114, joka on eristetty Kevojoesta, sekä B167-kantaan joka on peräisin Jyväsjärvestä. Plakkeja ei muodostunut yhteenkään testatuista *F. columnare* -kannoista.

Taulukko 2. V155:n isäntäkirjotestin tulokset *Flavobacterium* -kannoilla. Eri bakteerikannat on esitetty pystyriivillä ja faagilaimennokset vaakariivillä. Alimmaisena ovat neljä *F. columnare* -kantaa. Mahdollinen kasvun inhibitio on kuvattu tähdillä kolmen tähden tarkoittaessa voimakasta inhibitiota, jossa malja on kirkas. Plakkien esiintymiset on mainittu erikseen joko prosenttiosuuksina (100% = kirkkaaksi syöty malja) tai plakkien määränä.

<i>Flavobacterium</i> sp.	0	-1	-2	-4	-6	-8
B28	***					
B80	**	*				
B105						
B110						
B114	100 %	90 %	70 %	50 %	4 plakkia	
B121						
B127	**	*				
B130	***					

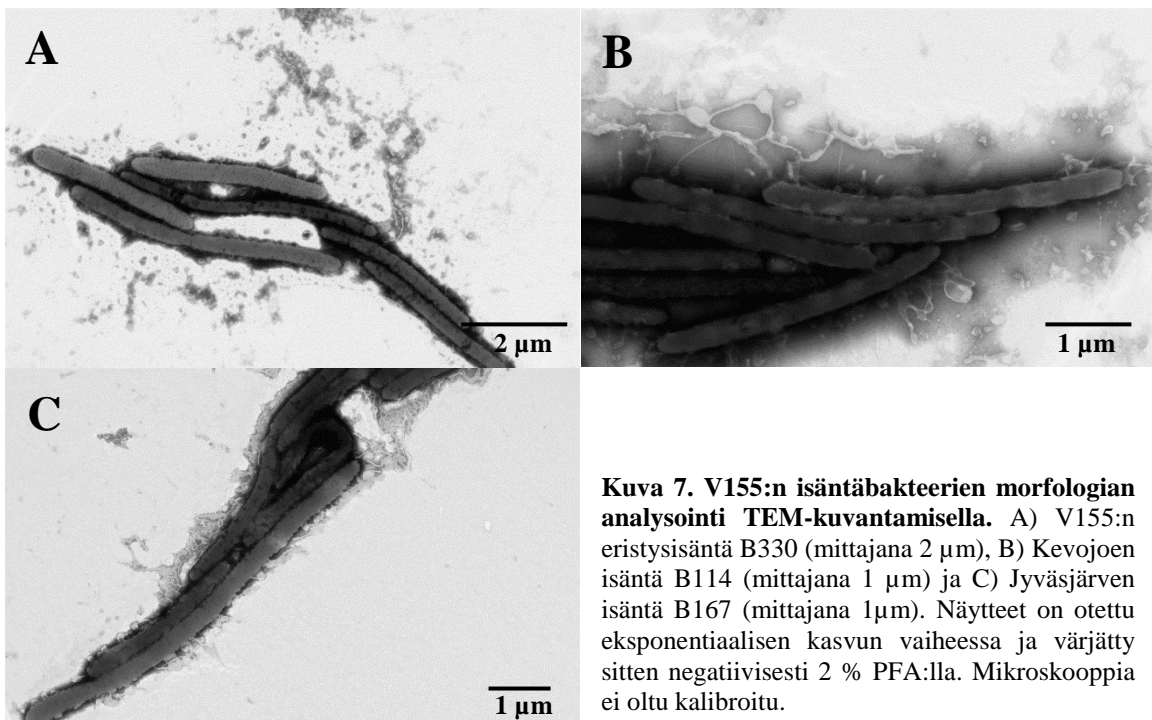
B167	100 %	100 %	100 %	100 %	70 %	50 plakkia
B169	**					
B171	**					
B174	*					
B176	**					
B178	***	*				
B180	**					
B183	**					
B187	**	*				
B207						
B209						
B214	**					
B218	**					
B222	**					
B223	**	*				
B224	*					
B225	**					
B226	**					
B241	**					
B243	**					
B257	*					
B260	*					
B262	**					
B330	100 %	100 %	100 %	90 %	80 %	50 %
<i>F.columnare</i>						
FCLau	*	*	*			
B185	*					
B405	*	*				
B067	*	*	*			

Plakkien morfologia oli todella erilainen kaikilla isännillä. Selvästi suurimmat plakit muodostuivat Jyväsjärvestä eristettyyn *Flavobacterium* sp. B167 -bakteerikantaan (Kuva 6A), kun taas V155:n eristyskantaan B330:een muodostuvat plakit olivat huomattavasti pienempiä (kuva 6B). B330-bakteerimattoon muodostuvat plakit pienevät entisestään, kun infektoitavaa bakteeria oli kasvatettu muutaman viikon ajan maljalla. Suoraan isäntäbakteerin pakkaskantaliuosta käytettäessä plakit olivat taas selvästi erottuvia. Molemmissa Jyväsjärven bakteerikannoissa plakit olivat kirkkaita. Kevojoesta eristettyyn *Flavobacterium* sp. B114 -bakteerikantaan muodostuvat plakit olivat sen sijaan sameita (kuva 6C).



Kuva 6. V155:n plakkimorfologia eri isäntäkannoissa. A) Jyväsjärvestä eristetty *Flavobacterium* sp B167 -bakteerikanta, B) eristyskanta B330, C) Kevojoesta eristetty *Flavobacterium* sp. B114 -bakteerikannassa.

V155:n eri isännistä otettiin myös TEM-kuvat bakteerien ulkoisen morfologian tutkimiseksi (Kuva 7). Kaikki bakteerit olivat muodoltaan sauvoja, joiden pituudet vaihtelivat 1,5 μm :stä 6 μm :iin. B114-kannan bakteerit olivat keskimäärin lyhyempiä kuin muut kannat. TEM-kuvantamisessa bakteerikannoilla ei nähty piluksia tai flagelloja. Silmiinpistävä piirre kaikissa isännissä oli hyvin epätasainen solun pinta, sekä runsas vesikkeleiden muodostus.



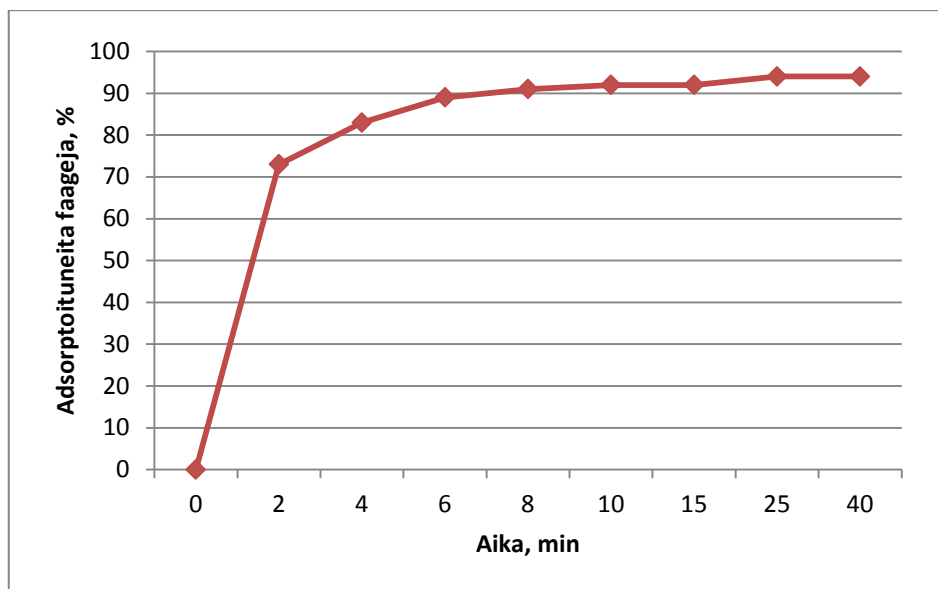
Kuva 7. V155:n isäntäbakteerien morfologian analysointi TEM-kuvantamisella. A) V155:n eristysisäntä B330 (mittajana 2 μm), B) Kevojoen isäntä B114 (mittajana 1 μm) ja C) Jyväsjärven isäntä B167 (mittajana 1 μm). Näytteet on otettu eksponentiaalisen kasvun vaiheessa ja värjätty sitten negatiivisesti 2 % PFA:lla. Mikroskooppia ei oltu kalibroitu.

4.5.2 Eristyskanta B330:n karakterisointi 16S rRNA-geenin sekvensoinnilla

B330:n karakterisoimiseksi sen 16S rRNA-geenistä sekvensoitiin 1422 nukleotidia. Tätä sekvenssiä verrattiin BLAST-työkalulla NCBI:n nukleotiditietokantoihin ja kolme lähintä sekvenssiä olivat *Flavobacterium sp.* R-32568 99 % identtisyydellä, *Flavobacterium sp.* 10B 99 % identtisyydellä ja *Flavobacterium banpakuense* kanta 15F3 99 % identtisyydellä. B330:n 16S rRNA-geenisekvenssiä verrattiin myös muiden V155:n isäntäbakteerien vastaaviin sekvensseihin. Identtisyys sen ja Jyväskylän eristetyn B167:n 16S rRNA-geenisekvenssin välillä oli 96 %. Kevojoen B114-bakteerin 16S rRNA-geeni oli vastaavasti 94 % identtinen.

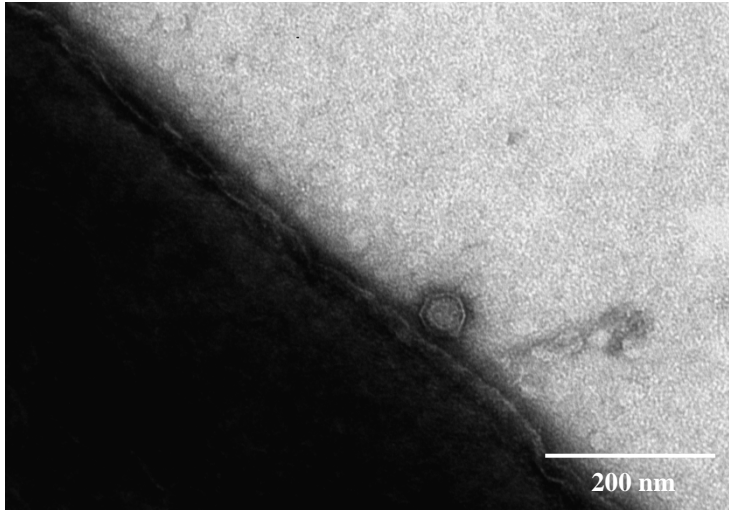
4.5.3 V155:n kiinnittyminen eristysisäntään

V155:n kiinnittymistä sen eristyskantaan B330:een tutkittiin adsorptiotestillä (Kuva 8). Adsorptiokäyrän mukaan suurin osa kiinnittymisestä tapahtui ensimmäisen kahden minuutin aikana viruksen lisäämisestä ja adsorptioituminen jatkui noin kahdeksaan minuuttiin saakka. Alle 10 % faageista jäi kokonaan kiinnittymättä bakteerisoluun.



Kuva 8. V155:n tyypillinen kiinnittyminen isäntään B330. Adsorptioituneiden faagien prosentiosuudesta on piirretty käyrä ajan funktiona.

Viruksen kiinnittymistä isäntäsoluun tutkittiin myös TEM-kuvantamisen avulla. Näytteissä nähtiin vain muutamia faagipartikkeleita, joista kaikki olivat kiinnittyneinä eri puolille bakteerin seinämää, lukuun ottamatta isännän päitä, joissa ei nähty yhtään faagia. Kuvassa 9 on V155-viruspartikkeli kiinnittyneenä eristysisäntäänsä B330:een.



Kuva 9. TEM-kuva V155-faagin kiinnittymisestä B330-bakteeri-isäntään. Eksponentiaalisen kasvun vaiheessa oleva B330-bakteerikanta infektoitiin V155-faagilla. Minuutin kuluttua infektiosta otettiin näyte, joka värjättiin negatiivisesti 1 % uranyliasetaatilla ja kuvattiin TEM:llä. Mittajana on 200 nm (ei kalibroitu).

5 TULOSTEN TARKASTELU

Maapallon eliölajeista tunnetaan vain murto-osa. Tämä pätee erityisesti bakteereihin ja viruksiin niiden valtavan määrän ja laajan diversiteetin seurauksena. Esimerkiksi ssDNA-faagien lajikirjo on edelleen melko tuntematon, sillä menetelmät näiden virusten havaitsemiseksi ovat kehittyneet vasta hiljattain. Uusien menetelmien ansiosta toistaiseksi ainoa tunnettu ssDNA-bakteriofagiperhe *Microviridae* on kasvanut ja monipuolistunut nopeasti lyhyen ajan sisällä, ja jatkaa varmasti kasvuaan, kun uusia ssDNA-faageja karakterisoidaan. Myös täysin uusien ssDNA-faagiperheiden löytyminen on hyvinkin mahdollista. Tässä tutkielmassa karakterisoitiin Jyväsjärvestä eristettyä V155-bakteriofagia, jonka genomi paljastui ssDNA:ksi. Jyväsjärvi on kohtalaisen eutrofinen järvi, joka on palautumassa 1900-luvun lopun jätevesipäästöjen aiheuttamasta rehevöitymisestä (Meriläinen ym., 2003; Syväranta ym., 2008). Järven perustuotanto on siis korkea ja oletettavasti myös bakteereja ja niiden faageja esiintyy paljon.

Vastoin aiempia odotuksia ssDNA-virusia on viime aikoina löydetty lähes kaikista ympäristöistä, mistä niitä on etsittykin, ja useissa tapauksissa *Microviridae* on ollut yleisin virusryhmä (Angly ym., 2006; Lopez-Bueno ym., 2009; Roux ym., 2012a; Smith ym., 2013; Yoshida ym., 2013). *Microviridae*-alaperheistä *Gokushovirinae*-faagit ovat selvästi yleisimpiä ja järvienkin ssDNA-faageista suurin osa näyttäisi kuuluvan tähän alaperheeseen (Roux ym., 2012a; Roux ym., 2012b; Smith ym., 2013; Hopkins ym., 2014). Uusia ssDNA-faageja on siis löydetty paljon, mutta lähes kaikki näistä löydöistä ovat olleet metagenomianalyysien tulosta. Tämä tarkoittaa sitä, että ainoastaan faagien geenisekvenssejä on tutkittu, ja näin ollen uusien ssDNA-faagien ulkoinen morfologia, elinkierto ja isäntä-virus-vuorovaikutukset ovat suurelta osin tuntemattomia (Rosario ja Breitbart, 2011). Tämä onkin ensimmäinen kerta, kun järvestä eristettyä ssDNA-faagia kasvatetaan laboratoriossa sen morfologian ja elinkierron karakterisoimiseksi.

Faagin puhdistusta varten V155:ttä pyrittiin kasvattamaan nesteviljelmässä. Tämä kuitenkin epäonnistui, sillä V155-infektio ei käynnistynyt nesteympäristössä. V155 kykenee kuitenkin infektoimaan maljalla kasvavaa bakteeria, kun isäntä kasvaa bakteerimattona eli biofilminä. Nestekasvatuksessa bakteeri ei kykene muodostamaan biofilmiä, mikä voi olla syynä infektiokyvyn laskuun. Joko faagi ei pääse ollenkaan irrallaan kasvavan bakteerin sisälle, DNA:n monistuminen ei käynnisty tai virus ei saa

hajotettua bakterisolua uusien virionien valmistuttua. On myös mahdollista, että V155 siirtyy lysogeeniseen elinkiertoon, ja kiinnittyy isännän genomiin soluun tunkeutumisen jälkeen. Koska nestekasvatus ei toiminut, faagit puhdistettiin maljalysaatista. Tämä menetelmä on hitaampi, eikä siinä saada yhtä suurta määrää samassa elinkierron vaiheessa olevia faageja kuin nestekasvatuksesta. Faageja pystyttiin kuitenkin tuottamaan tarpeeksi 1X- ja 2X-puhdistusta varten.

PEG6000-käsittelyssä tarkoituksena oli konsentroida maljalysaatissa olevaa faagia, jotta sitä voitaisiin edelleen puhdistaa sakkaroosigradientissa. Aiemmissa puhdistuksissa oli huomattu, että vaikka V155 konsentroituu PEG-käsittelyssä, sitä näyttäisi kuitenkin häviävän odotettua enemmän (saanto noin 5 % - 10 %). Nyt tehdyssä puhdistuksessa faagisaanto oli kuitenkin vielä 1X-vyöhykkeessäkin noin 30 %. Aiempien havaintojen perusteella suurin osa faagin hävikistä on todennäköisesti tapahtunut PEG-käsittelyn aikana. 1X-puhdistuksen jälkeen tehdyssä 2X-puhdistuksessa käytetty tasapainogradientti oli 1X-gradienttia tiheämpi. Kun faageja sentrifugoidaan tällaisessa tiheässä gradientissa tarpeeksi kauan, ne asettuvat putkessa kohtaan, joka vastaa virionin tiheyttä. Näin epäpuhtaudet saadaan erottumaan paremmin, aivan kuten SDS-PAGE-analyysistä nähdään. V155:stä muodostui tässä 2X-gradientissa kaksi erillistä vyöhykettä, joista ylemmässä ovat kevyemmät ja alemmassa painavammat partikkelit. 1X-puhdistuksesta saadusta faagipelletistä laskettiin viruksen spesifinen infektiiviteetti, joka oli $1,75 \times 10^{12}$ pfu/mg. Tämä on kymmenesosa samalla metodilla puhdistetun PRD1:n $1,1 \times 10^{13}$ pfu/mg:n spesifisestä infektiiviteetistä (Bamford ja Bamford, 1991). V155:n 1X-näytteen SDS-PAGE-analyysissä nähtiin kuitenkin todennäköisesti isännästä peräisin olevia proteiineja, joista päästiin eroon 2X-sakkaroosigradientissa. Tämän johdosta spesifinen infektiiviteetti on oletettavasti todellista arvoa pienempi.

V155:n genomin nukleasikäsittelyiden perusteella kyseessä on ssDNA-faagi, sillä DNA:ta sekä yksijuosteisia nukleotiketjuja pilkkovat entsyymit hajottivat viruksen genomin. RNAasi-käsittelyistä geelille muodostuva vyöhyke jäi hieman ylemmäs kuin digestoimaton vyöhyke. Tämä johtuu siitä, että RNAasi kiinnittyy RNA:n lisäksi myös DNA-juosteeseen vaikuttaen sen liikkumiseen geelillä. RNAasi ei kuitenkaan hajota DNA:ta, joten geelille muodostuu vyöhyke. ssDNA-faagi ϕ X174:n genomi sekä plasmidi pSU18 pilkottiin V155:n rinnalla kontrollina. Faagien genomit pilkkoutuivat samalla lailla kaikissa

käsittelyissä, kun taas pSU18 ei hajonnut yksijuosteisia nukleotidiketjuja pilkkovilla entsyymeillä. Tämä vahvistaa entsyymien spesifisyyden ja V155:n perimän olevan ssDNA:ta. V155:n genomien kokoa ei voida määrittää suoraan agarosigeeliltä, sillä molekyylipainostandardi on lineaarista dsDNA:ta ja kulkeutuu geelillä hitaammin kuin V155:n ja ϕ X174:n nukleotidijuosteet. V155:n DNA-juoste jää kuitenkin geelillä ylemmäs kuin ϕ X174:n 5386 nukleotidin pituinen genomi (Fane ym., 2005), ja on siten todennäköisesti pidempi kuin ϕ X174:n perimä. *Gokushovirinae*-alaperheen faagien genomit ovat vielä ϕ X174:kin lyhyempiä, keskimäärin 4,4 - 4,8 kb (Brentlinger ym., 2002; Labonté ja Suttle, 2013). V155:n DNA-juosteesta muodostuu geelille vain yksi vyöhyke, mikä viittaa siihen, että virionissa on genomista vain yhtä muotoa. Perimän jakautuminen segmentteihin tai erilaiset sekundäärirakenteet tuottaisivat geelille useampia vyöhykkeitä.

V155:n genomien koon selvittämiseksi sekä faagin fylogenenian analysoimiseksi sen DNA tulee sekvensoida. DNA:sta pyrittiin saamaan kaksijuosteista, jotta se voitaisiin kloonata plasmidiin ja tämän jälkeen sekvensoida. dsDNA:ta yritettiin ensin tuottaa infektoimalla bakteereja V155:lla ja antamalla faagin luonnollisen infektiomekanismin replikoida ssDNA:sta RF DNA:ta. Kaksijuosteista V155-genomia ei kuitenkaan saatu eristettyä, sillä kuten jo aiemmin faagin tuotossakin havaittiin, V155 ei näyttäisi replikoituvan nesteviljelmässä. Voi myös olla, että eristysmetodi ei ollut tarpeeksi tehokas RF DNA:n eristämiseen. Tulevaisuudessa dsDNA:n eristämistä voitaisiin kokeilla hyödyntämällä lysogeenisten virusten RF DNA:n eristämiseen tarkoitettuja metodeja. Genomia yritettiin monistaa myös PCR:llä, mutta tämäkään ei tuottanut tulosta. Eräät polymeeraasit, kuten ϕ 29-DNA-polymeeraasi, hajottavat käsittelemättömiä sattumanvaraisia oligomeerejä (Dean ym., 2001). Tämä on voinut olla osasyynä joidenkin monistusreaktioiden epäonnistumiseen. Valmiita reagenssisarjoja käytettäessä oligomeerien ja polymeeraasien pitäisi kuitenkin sopia yhteen. Ongelma voi piillä juosteen sekundäärirakenteissa, sillä ssDNA-virusgenomien sekundäärirakenteiden on havaittu säätelevän DNA:n replikaatiota (Muhire ym., 2014). Ehkä V155:n genomi on laskostunut niin vakaisiin sekundäärirakenteisiin, ettei PCR:ssä tapahtuva alkudenaturaatio ole saanut niitä hajoamaan pysyvästi. Voi myös olla, että faagin DNA on modifioitunut kemiallisesti niin, etteivät tavalliset polymeeraasit pääse kiinnittymään ja monistamaan juostetta. Erilaisia polymeeraaseja voitaisiin siis edelleen kokeilla DNA-juosteen monistamiseen. DNA-

juostetta voitaisiin myös pilkkoa nukleaaseilla pienempiin osiin mahdollisten sekundäärirakenteiden hajottamiseksi.

TEM:n perusteella V155:n ulkoinen rakenne vastaa *Microviridae*-faagien morfologiaa. Kaikki karakterisoidut *Microviridae*-faagit ovat ikosahedraalisia ja niiden kulmissa on piikkirakenteet. Ainut eroavaisuus on V155:n kapsidin koko (50 nm), joka näyttäisi olevan huomattavasti *Microviridae*-faagien 25 - 30 nm:n kokoisia kapsideita suurempi (Brentlinger ym., 2002; Labonté ja Suttle, 2013). Tanskan ja Ruotsin väliseltä merialueelta on hiljattain eristetty vielä V155:kin suurempia, yli 70 nm:n kokoisia *Cellulophaga*-bakteeria infektoivia ssDNA-faageja. Nämä bakteriofagit eivät sekvensointien mukaan kuulu *Microviridae*-perheeseen. Tämän lisäksi samalta alueelta eristettiin yli 30 nm:n kokoisia ssDNA-bakteriofageja, jotka näyttäisivät kuuluvan *Microviridae*-perheeseen, mutta jotka eivät kuitenkaan sovi yhteenkään jo olemassa olevista alaperheistä. (Holmfeldt ym., 2012; Holmfeldt ym., 2013). V155:n selvästi erikokoinen kapsidi voi siis olla merkki uudesta virusryhmästä.

V155:n proteiiniprofiilia tutkittiin SDS-PAGE-analysoinnilla ja sen perusteella faagin proteiinit ovat melko pieniä. Yleensä kaikista paksuin proteiinivyöhyke koostuu viruksen kuoriproteiinista. V155:n geelikuvissa tämä proteiini näyttäisi olevan kooltaan alle 35 kDa. ϕ X174:n kuoriproteiini F on huomattavasti V155:n proteiineja suurempi, 48 kDa, mutta TEM:n perusteella sen kapsidi vaikuttaisi kuitenkin olevan selvästi pienempi kuin V155:n kapsidi (Burgess, 1969). Jos nämä tulokset ovat paikkansa pitäviä, V155 ei voi noudattaa T=1 symmetriaa, jossa kapsidi koostuu ϕ X174:n sekä muiden karakterisoitujen *Microviridae*-faagien tapaan 60:stä kuoriproteiinin kopiosta (Caspar ja Klug, 1962; Bennett ym., 2008). Trisiini-SDS-PAGE-ajon yhteydessä tehdystä proteiinivärjäyksestä selvisi, että V155:n paksuin proteiinivyöhyke koostuukin kahdesta eri proteiinista yhden sijaan. Molemmat näistä vyöhykkeistä ovat vahvoja, joten on mahdollista, että V155:lla onkin kaksi pientä kuoriproteiinia. Tämän lisäksi V155:lla täytyy olla rakenneproteiineja, joista sen piikit koostuvat. Proteiini-analyysissä näkyikin ϕ X174:n 19 kDa:n kokoisen piikkiproteiinin kanssa samaa kokoluokkaa olevia proteiinivyöhykkeitä (Burgess, 1969).

Kuten jo aiemmin faagin puhdistuksen yhteydessä mainittiin, V155:stä muodostui kaksi vyöhykettä 2X-puhdistuksen sakkaroosigradiettiin. Proteiini-analyysistä nähtiin, että virionin kaikkein suurin proteiini puuttuu kokonaan gradientin kevyemmistä

faagipartikkeleista. Kahden faagivyöhykkeen muodostuminen sakkaroosigradiettiin johtuu usein genomien purkautumisesta osasta kapsideja. Onkin mahdollista, että kyseinen proteiini sijaitsee kuoren sisällä, ja kapsidin vahingoittuminen puhdistuksen yhteydessä on vapauttanut niin genomien kuin tämän suuren proteiininkin. Kevyiden sekä painavampien faagipartikkelien spesifinen infektiiviteetti tulisi määrittää, jotta kyseisen proteiinin tärkeys infektion etenemisessä selviäisi.

V155:n lipidirakenteiden olemassaoloa tutkittiin, sillä aiemmin suoritettu kloroformitesti oli osoittautunut positiiviseksi. Kloroformi hajottaa virusten lipidikalvot estäen niiden toiminnan ja siten kloroformia voidaan käyttää kalvorakenteita tarvitsevien virusten havaitsemiseksi (Bradley ja Rutherford, 1975). Kloroformi voi kuitenkin inhiboida myös lipidittömiä faageja, eikä sillä tehty testi siis riitä todisteeksi lipidien olemassaolosta. Sisäkalvojen olemassaoloa tutkittiin lisää Sudan Black B -lipidianalyysillä, joka osoittautui positiiviseksi. Geeli käsiteltiin ennen proteiinien värjäämistä lipidivärillä, joka ei tarttunut proteiinivyöhykkeisiin, ja muodosti vain yhden selkeän vyöhykkeen geelin alareunaan samalle tasolle PRD1:n lipidivyöhykkeiden kanssa. Näin ollen on hyvin epätodennäköistä, että väri kiinnittyisi epäspesifisesti muihin kuin lipidimolekyyleihin. Vaikka näyte oli 2X-puhdistettu, on silti edelleen mahdollista, että isännän lipidit tai jokin lipidikontaminaatio aiheuttivat lipidivyöhykkeen. Sisäkalvon olemassaoloa voitaisiin tutkia lisää TEM-kuvantamisella. V155:n kapsidi voidaan hajottaa kemiallisesti, jolloin TEM-kuvissa pitäisi näkyä irrallisia kalvorakenteita. Lipidejä voitaisiin tutkia vielä tarkemmin tekemällä erikseen puhdistetulle faagille sekä sen isännälle lipidikromatografiat, joista selviäisi kummankin näytteen tarkka lipidikoostumus. Vaikka isännän lipidejä löytyisikin faaginäytteestä, tuloksia vertailemalla olisi mahdollista nähdä, eroavatko lipikoostumukset toisistaan. Lisäksi faagin genomien sekvensointi saattaisi paljastaa joitakin lipideihin liittyviä sekvenssejä, kuten esimerkiksi hyvin hydrofobisia proteiineja.

V155:n eristysisännän B330:n 16S rRNA-geeni sekvensoitiin sen lajin määrittämiseksi. Sekvensoinnista selvisi, että B330 kuuluu *Flavobacterium*-sukuun. Tarkkaa lajia ei kuitenkaan saatu selvitettyä, sillä sekvenssi oli hyvin samankaltainen useiden toistaiseksi tuntemattomien *Flavobacterium*-kantojen kanssa. Tämä on ensimmäinen kerta, kun ssDNA-viruksen on havaittu infektoivat *Flavobacterium*-suvun bakteeria. *Flavobacteriaceae*-heimoa infektoivia ssDNA-faageja on kuitenkin löydetty jo aiemmin.

Kyseessä ovat aiemmin mainitut *Cellulophaga*-sukua infektoivat suurikokoiset faagit (Holmfeldt ym., 2012; Holmfeldt ym., 2013). Näiden faagien lisäksi *Bacteroidetes*-pääjaksoon kuuluvista bakteereista, joihin flavobakteeritkin lukeutuvat, on löydetty muutamia *Microviridae*-perheeseen kuuluvia profaagisekvenssejä. Itse viruksia ei kuitenkaan ole eristetty (Krupovic ja Forterre, 2011). Muitakin *Flavobacterium*-kantoja infektoitiin V155:llä faagin isäntäkirjon selvittämiseksi. Vaikka käytetty kantaliuos oli sentrifugoitu ja suodatettu, V155:n isäntäbakteerin B330:n toksiineista ei silti päästä kokonaan eroon. Maljoilla nähty laimentamattomista näytteistä aiheutuva inhibitio voi siis olla näistä toksiineista johtuvaa. Tämän vuoksi suuremmista laimennospisteistä haluttiin löytää selkeitä faagien muodostamia plakkeja. V155 pystyi muodostamaan plakkeja kahteen testatuista *Flavobacterium*-kannoista alkuperäisen isäntänsä lisäksi. Se on siten melko isäntäspesifinen verrattuna muihin tutkittuihin *Flavobacterium* sp. -faageihin tai meristä eristettyihin syanofaageihin (McDaniel ym., 2006; Laanto ym., 2011). Kaikkien kolmen V155-isäntäbakteerikannan 16S rRNA-geenisekvenssejä vertailtiin toisiinsa, mutta niistä ei kuitenkaan löytynyt merkittävää samankaltaisuutta. Isäntäbakteerien TEM-kuvista nähdään niiden ulkoisen morfologian olevan samanlainen kuin muilla flavobakteereilla.

Kolmessa eri isäntäbakteerikannassa esiintyvää V155-plakkien morfologiaa tarkasteltaessa huomattiin niiden eroavan toisistaan hyvin paljon. Kevojoesta eristetyssä B114-bakteerimatossa plakit muistuttavat lysogeenisten faagien tekemiä plakkeja. Lysogeeninen faagi ei tapa bakteereja, vaan ennemminkin inhiboi niiden kasvua muodostaen sameita plakkeja (Hong ym., 1971). Jyväsjärven B167-bakteerimatossa taas on hyvin suuret ja kirkkaat, lyyttisen elinkierron aiheuttamat plakit. B167-bakteerista vapautuvien faagien määrä näyttäisi olevan melko suuri, sillä plakit ovat hyvin isoja. Isot plakit ovat myös yleensä seurausta pitkästä adsorptio-ajasta. Tällöin faagit ehtivät diffusoitua kohti plakin reunoja ennen uutta infektiota, ja plakin koko kasvaa (Abedon ym., 2003). Alkuperäisen isännän B330:n tapauksessa plakit ovat aluksi selkeitä ja niitä on paljon suurissakin laimennoksissa. Faagi vaikuttaisi niiden perusteella olevan luonteeltaan lyyttinen. Pieni plakkikoko verrattuna B167-isäntään johtuu ehkä adsorptio-ajan lyhyydestä ja siitä, että faageja vapautuu vähemmän infektoiduista bakteereista. Nopeampi adsorptoituminen B330:een selittäisi myös alkuperäisestä isännästä saadun suuremman tiiterin. Adsorptionopeutta tutkittiin infektoimalla V155:n alkuperäistä isäntää B330:tä. V155 kiinnittyi isäntäänsä nopeasti ja lähestulkoon 100 %:sti, kuten plakkien analysoinnissa

ennakoitiin. Adsorptiotestit tehtiin nesteessä, joten ongelmat nestekasvatuksessa eivät todennäköisesti johdu faagin heikosta adsorptoitumisesta. Lisäksi faagin kiinnittymiskohtaa tutkittiin TEM-kuvantamisella, mutta näytteistä ei kuitenkaan löydetty tarpeeksi faageja, jotta kiinnittymisestä voitaisiin sanoa mitään varmaa. Näyttäisi kuitenkin siltä, että faagi kiinnittyy bakteerin seinämään aivan kuten ϕ X174:kin (Kawaura ym., 2000).

Kun maljalla kasvaneesta isäntäbakteerista tehtyä nestekasvatusta käytettiin faagin titraamiseen, bakteerimattoon syntyvät plakit olivat huomattavasti pienempiä ja sameampia kuin suoraan isännän pakkaskantaliuksesta tehtyä nestekasvatusta käytettäessä. Tämä viittaa siihen, että V155 kykenee siirtymään lysogeeniseen elinkiertoon. Kun bakteerin siirtämisestä pakkaskantaliuksesta maljalle on kulunut aikaa, sen kasvu ehkä rajoittuu, ja tämän vuoksi V155 päätyy kiinnittymään isäntänsä genomiin. V155:n kykyä lysogenisoitua tukee myös ongelmat sen nestekasvatuksessa. Lisäksi V155 ei näyttäisi replikoivan genomiaan nesteviljelmässä, sillä RF-muotoista DNA:ta ei pystytty eristämään. Temperaatteja ssDNA-faageja ei ole löydetty monia. *Bacteroidetes*-pääjaksoa infektoivat *Microviridae*-perheen *Alpavirinae*-profaagit kuuluvat näihin harvoihin lysogeenisiin ssDNA-faageihin. V155:n kanssa tällä alaperheellä on yhteistä isäntäbakteerien pääjakso, sillä mikään muu *Microviridae*-laji ei infektoi *Bacteroidetes*-pääjakson bakteereita. Kaikki *Alpavirinae*-faagit on kuitenkin eristetty ihmisen mikrobistosta, toisinkuin V155, joka on peräisin järvestä (Krupovic ja Forterre, 2011). *Alpavirinae*-profaageja ei ole indusoitu isännistään, joten niiden ulkoisesta morfologiasta, tai muusta elinkierrosta ei ole vielä tietoa. *Alpavirinae*-alaperheen lisäksi aiemminkin mainitut Tanskan ja Ruotsin väliseltä merialueelta eristetyt hyvin suuret *Cellulophaga*-ssDNA-faagit vaikuttavat geenisekvenssien ja plakkimorfologian perusteella lysogeenisiltä (Holmfeldt ym, 2012; Holmfeldt ym, 2013). Myös Meksikon rannikolta eristetyistä *Synechococcus*-bakteereista on indusoitu suurikokoisia ssDNA-profaageja, jotka muistuttavat *Cellulophaga*-faageja. *Synechococcus*-profaageja ei kuitenkaan ole sekvensoitu, joten sukulaisuutta ei ole voitu määrittää (McDaniel ym., 2006). Näiden meristä eristettyjen lysogeenisten ssDNA-faagien tapaan myös V155 eroaa kokonsa puolesta huomattavasti *Microviridae*-perheen faageista, mikä edelleen vahvistaa lysogenia-hypoteesia. Lisäksi V155:n isäntänsuku *Flavobacterium* kuuluu *Cellulophaga*-bakteereiden kanssa samaan bakteeriperheeseen. V155:n lysogeniaa

voitaisiin tutkia lisää etsimällä sen isännän genomista faagisekvenssejä tai yrittämällä indusoida isännästä profaageja.

Tutkimuksessa selvitettiin monia uusia piirteitä V155-bakteriofagista. Faagin tuotto ja puhdistus onnistuttiin tekemään maljalysaattimenetelmällä, PEG-saostuksella, sekä 1X- ja 2X-gradienttipuhdistuksella. V155:n genomi osoittautui todellakin ssDNA:ksi, ja sen kapsidilla havaittiin olevan samanlainen morfologia kuin *Microviridae*-faagien kapsideilla. Virionin koko tosin eroaa huomattavasti tunnetuista *Microviridae*-faageista. Proteiiniprofiili määritettiin SDS-PAGE-analysoinnilla, jonka perusteella V155:n proteiinit ovat melko pieniä. Lisäksi V155:stä etsittiin lipidirakenteita ja saatujen tulosten perusteella kalvorakenteiden olemassaolo on hyvinkin mahdollista, vaikkei vielä täysin todistettua. Lipidirakenteiden löytyminen tästä ssDNA-bakteriofagista tekisi siitä aivan omalaatuisen viruksen. V155:n flavobakteeri-isäntä kuuluu ssDNA-faageille uuteen isäntäbakteerisukuun ja lisäksi V155 näyttäisi kykenevän tarvittaessa lysogeeniseen elinkiertoon, mikä on hyvin harvinaista ssDNA-faagien keskuudessa. Edelleen lisää sekvenssi- sekä rakenneanalyysyjä tarvitaan faagin perusteelliseksi karakterisoinniseksi. Tässä tutkimuksessa esiin tulleet eroavaisuudet V155:n ja tunnettujen *Microviridae*-faagien välillä viittaavat kuitenkin jo siihen, että V155 kuuluu hyvin todennäköisesti uuteen *Microviridae* alaperheeseen, ellei jopa kokonaan uuteen, toistaiseksi tuntemattomaan virusperheeseen.

6 LÄHTEET

- Abedon, S.T., P. Hyman ja C. Thomas. 2003. Experimental examination of bacteriophage latent-period evolution as a response to bacterial availability. *Appl.Environ.Microbiol.* 69:7499-7506.
- Angly, F.E., B. Felts, M. Breitbart, P. Salamon, R.A. Edwards, C. Carlson, A.M. Chan, M. Haynes, S. Kelley ja H. Liu. 2006. The marine viromes of four oceanic regions. *PLoS Biology.* 4:e368.
- Bamford, J.K. ja D.H. Bamford. 1991. Large-scale purification of membrane-containing bacteriophage PRD1 and its subviral particles and its subviral particles. *Virology.* 181:348-352.
- Bennett, A., R. McKenna ja M. Agbandje-McKenna. 2008. A comparative analysis of the structural architecture of ssDNA viruses. *Computational and Mathematical Methods in Medicine.* 9:183-196.
- Bernal, R.A., S. Hafenstein, R. Esmeralda, B.A. Fane ja M.G. Rossmann. 2004. The Φ X174 protein J mediates DNA packaging and viral attachment to host cells. *J.Mol.Biol.* 337:1109-1122.
- Bernardet, J., and J.P. Bowman. 2006. The genus *Flavobacterium*. In *The Prokaryotes*. Springer. 481-531.
- Bernardet, J., P. Segers, M. Vancanneyt, F. Berthe, K. Kersters ja P. Vandamme. 1996. Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov.(basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *Int.J.Syst.Bacteriol.* 46:128-148.
- Borriss, M., E. Helmke, R. Hanschke ja T. Schweder. 2003. Isolation and characterization of marine psychrophilic phage-host systems from Arctic sea ice. *Extremophiles.* 7:377-384.
- 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.
- Bradley, D.E. ja E.L. Rutherford. 1975. Basic characterization of a lipid-containing bacteriophage specific for plasmids of the P, N, and W compatibility groups. *Can.J.Microbiol.* 21:152-163.
- Brentlinger, K.L., S. Hafenstein, C.R. Novak, B.A. Fane, R. Borgon, R. McKenna ja M. Agbandje-McKenna. 2002. Microviridae, a family divided: isolation, characterization, and genome sequence of phiMH2K, a bacteriophage of the obligate intracellular parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J.Bacteriol.* 184:1089-1094.
- Burgess, A.B. 1969. Studies on the proteins of phi X174. II. The protein composition of the phi X coat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 64:613-617.
- Caspar, D.L. ja A. Klug. 1962. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 27:1-24.
- Castillo, D., R. Espejo ja M. Middelboe. 2013. Genomic structure of bacteriophage 6H and its distribution as prophage in *Flavobacterium psychrophilum* strains. *FEMS Microbiol.Lett.*
- Castillo, D., R.H. Christiansen, R. Espejo ja M. Middelboe. 2014. Diversity and Geographical Distribution of *Flavobacterium psychrophilum* Isolates and Their Phages: Patterns of Susceptibility to Phage Infection and Phage Host Range. *Microb.Ecol.*
- Cenens, W., A. Makumi, M.T. Mebrhatu, R. Lavigne ja A. Aertsen. 2013. Phage–host interactions during pseudolysogeny. *PLoS Genet.* 9:23483857.

- Chipman, P.R., M. Agbandje-McKenna, J. Renaudin, T.S. Baker ja R. McKenna. 1998. Structural analysis of the spiroplasma virus, SpV4: implications for evolutionary variation to obtain host diversity among the Microviridae. *Structure*. 6:135-145.
- Clarke, K.J. 1998. Virus particle production in lysogenic bacteria exposed to protozoan grazing. *FEMS Microbiology Letters*. 166:177-180.
- Dean, F.B., J.R. Nelson, T.L. Giesler ja R.S. Lasken. 2001. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res*. 11:1095-1099.
- Dressler, D. 1970. The rolling circle for phiX DNA replication. II. Synthesis of single-stranded circles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 67:1934-1942.
- Eisenberg, S., J.F. Scott ja A. Kornberg. 1976. Enzymatic replication of viral and complementary strands of duplex DNA of phage phiX174 proceeds by separate mechanisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 73:3151-3155.
- Fane, B.A., K.R. Brentlinger, A.D. Burch, M. Chen, S. Hafenstein, E. Moore, C.R. Novak, and A. Uchiyama. 2005. PhiX174 *et al.*, the Microviridae. In *The Bacteriophages*. R.L. Calendar, editor. Oxford University Press, Inc, New York. 129-145.
- Goulian, M., A. Kornberg ja R.L. Sinsheimer. 1967. Enzymatic synthesis of DNA, XXIV. Synthesis of infectious phage phi-X174 DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 58:2321-2328.
- Hafenstein, S. ja B.A. Fane. 2002. phi X174 genome-capsid interactions influence the biophysical properties of the virion: evidence for a scaffolding-like function for the genome during the final stages of morphogenesis. *J.Virol.* 76:5350-5356.
- Holmfeldt, K., M. Middelboe, O. Nybroe ja L. Riemann. 2007. Large variabilities in host strain susceptibility and phage host range govern interactions between lytic marine phages and their Flavobacterium hosts. *Appl.Environ.Microbiol.* 73:6730-6739.
- Holmfeldt, K., D. Odic, M.B. Sullivan, M. Middelboe ja L. Riemann. 2012. Cultivated single-stranded DNA phages that infect marine Bacteroidetes prove difficult to detect with DNA-binding stains. *Appl.Environ.Microbiol.* 78:892-894.
- Holmfeldt, K., N. Solonenko, M. Shah, K. Corrier, L. Riemann, N.C. Verberkmoes ja M.B. Sullivan. 2013. Twelve previously unknown phage genera are ubiquitous in global oceans. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 110:12798-12803.
- Hong, J.S., G.R. Smith ja B.N. Ames. 1971. Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate concentration in the bacterial host regulates the viral decision between lysogeny and lysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 68:2258-2262.
- Hopkins, M., S. Kailasan, A. Cohen, S. Roux, K.P. Tucker, A. Shevenell, M. Agbandje-McKenna ja M. Breitbart. 2014. Diversity of environmental single-stranded DNA phages revealed by PCR amplification of the partial major capsid protein. *The ISME Journal*.
- Incardona, N.L., J.K. Tuech ja G. Murti. 1985. Irreversible binding of phage. vphi. X174 to cell-bound lipopolysaccharide receptors and release of virus-receptor complexes. *Biochemistry (N.Y.)*. 24:6439-6446.
- Jiang, S.C. ja J.H. Paul. 1996. Occurrence of lysogenic bacteria in marine microbial communities as determined by prophage induction. *Marine Ecology-Progress Series*. 142:27.
- Jiang, S.C. ja J.H. Paul. 1998. Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl.Environ.Microbiol.* 64:2780-2787.

- Kawaura, T., M. Inagaki, S. Karita, M. Kato, S. Nishikawa ja N. Kashimura. 2000. Recognition of receptor lipopolysaccharides by spike G protein of bacteriophage fX174. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 64:1993-1997.
- Knippers, R., T. Komano ja R.L. Sinsheimer. 1968. The process of infection with bacteriophage phi-X174. XXI. Replication and fate of the replicative form. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 59:577-581.
- Krupovic, M. ja P. Forterre. 2011. Microviridae goes temperate: microvirus-related proviruses reside in the genomes of Bacteroidetes. *PLoS One.* 6:e19893.
- Laanto, E., J.K. Bamford, J. Laakso ja L.R. Sundberg. 2012. Phage-driven loss of virulence in a fish pathogenic bacterium. *PLoS One.* 7:e53157.
- Laanto, E., L.R. Sundberg ja J.K. Bamford. 2011. Phage specificity of the freshwater fish pathogen *Flavobacterium columnare*. *Appl.Environ.Microbiol.* 77:7868-7872.
- Labonté, J.M. ja C.A. Suttle. 2013. Metagenomic and whole-genome analysis reveals new lineages of gokushoviruses and biogeographic separation in the sea. *Frontiers in Microbiology.* 4.
- Leclerc, J.E. 2002. Single-Stranded DNA Phages. In *Modern Microbial Genetics*. U.N. Streips and R.E. Yasbin, editors. John Wiley and Sons inc, New York, USA. 145-175.
- Lopez-Bueno, A., J. Tamames, D. Velazquez, A. Moya, A. Quesada ja A. Alcami. 2009. High diversity of the viral community from an Antarctic lake. *Science.* 326:858-861.
- Madsen, L., S.K. Bertelsen, I. Dalsgaard ja M. Middelboe. 2013. Dispersal and survival of *Flavobacterium psychrophilum* phages in vivo in rainbow trout and in vitro under laboratory conditions: implications for their use in phage therapy. *Appl.Environ.Microbiol.* 79:4853-4861.
- Maranger, R. ja D.F. Bird. 1995. Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters. *Marine Ecology Progress Series.* 121:217-226.
- McDaniel, L.D., M. delarosa ja J.H. Paul. 2006. Temperate and lytic cyanophages from the Gulf of Mexico. *J.Mar.Biol.Assoc.U.K.* 86:517-527.
- McKenna, R., D. Xia, P. Willingmann, L.L. Hag, S. Krishnaswamy, M.G. Rossmann, N.H. Olson, T.S. Baker ja N.L. Incardona. 1992. Atomic structure of single-stranded DNA bacteriophage Φ X174 and its functional implications. *Nature.* 355:137.
- Meriläinen, J.J., J. Hynynen, A. Palomäki, K. Mäntykoski ja A. Witick. 2003. Environmental history of an urban lake: a palaeolimnological study of Lake Jyväsjärvi, Finland. *J.Paleolimnol.* 30:387-406.
- Middelboe, M., K. Holmfeldt, L. Riemann, O. Nybroe ja J. Haaber. 2009. Bacteriophages drive strain diversification in a marine *Flavobacterium*: implications for phage resistance and physiological properties. *Environ.Microbiol.* 11:1971-1982.
- Morais, M.C., M. Fisher, S. Kanamaru, L. Przybyla, J. Burgner, B.A. Fane ja M.G. Rossmann. 2004. Conformational switching by the scaffolding protein D directs the assembly of bacteriophage ϕ X174. *Mol.Cell.* 15:991-997.
- Muhire, B.M., M. Golden, B. Murrell, P. Lefeuvre, J.M. Lett, A. Gray, A.Y. Poon, N.K. Ngandu, Y. Semegni, E.P. Tanov, A.L. Monjane, G.W. Harkins, A. Varsani, D.N. Shepherd ja D.P. Martin. 2014. Evidence of pervasive biologically functional secondary structures within the genomes of eukaryotic single-stranded DNA viruses. *J.Virol.* 88:1972-1989.

- Mukai, R., R.K. Hamatake ja M. Hayashi. 1979. Isolation and identification of bacteriophage phi X174 prohead. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76:4877-4881.
- Nakagawa, Y. ja K. Yamasato. 1996. Emendation of the genus *Cytophaga* and transfer of *Cytophaga agarovorans* and *Cytophaga salmonicolor* to *Marinilabilia* gen. nov.: phylogenetic analysis of the *Flavobacterium-Cytophaga* complex. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 46:599-603.
- Nematollahi, A., A. Decostere, F. Pasmans ja F. Haesebrouck. 2003. *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *J.Fish Dis.* 26:563-574.
- Pérez-Pascual, D., A. Menéndez, L. Fernández, J. Méndez, P. Reimundo, R. Navais ja J.A. Guijarro. 2010. Spreading versus biomass production by colonies of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*: role of the nutrient concentration. *International Microbiology.* 12:207-214.
- Pulkkinen, K., L.R. Suomalainen, A.F. Read, D. Ebert, P. Rintamaki ja E.T. Valtonen. 2010. Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: the case of columnaris disease in Finland. *Proc.Biol.Sci.* 277:593-600.
- Ripp, S. ja R.V. Miller. 1998. Dynamics of the pseudolysogenic response in slowly growing cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 144 (Pt 8):2225-2232.
- Rosario, K. ja M. Breitbart. 2011. Exploring the viral world through metagenomics. *Current Opinion in Virology.* 1:289-297.
- Roux, S., F. Enault, A. Robin, V. Ravet, S. Personnic, S. Theil, J. Colombet, T. Sime-Ngando ja D. Debroas. 2012a. Assessing the diversity and specificity of two freshwater viral communities through metagenomics. *PloS One.* 7:e33641.
- Roux, S., M. Krupovic, A. Poulet, D. Debroas ja F. Enault. 2012b. Evolution and diversity of the Microviridae viral family through a collection of 81 new complete genomes assembled from virome reads. *PloS One.* 7:e40418.
- Santos, M.A. 1991. An improved method for the small scale preparation of bacteriophage DNA based on phage precipitation by zinc chloride. *Nucleic Acids Res.* 19:5442.
- Shieh, H. 1980. Studies on the nutrition of a fish pathogen, *Flexibacter columnaris*. *Microbios Letters.* 13:129-133.
- Smith, R.J., T.C. Jeffries, B. Roudnew, J.R. Seymour, A.J. Fitch, K.L. Simons, P.G. Speck, K. Newton, M.H. Brown ja J.G. Mitchell. 2013. Confined aquifers as viral reservoirs. *Environmental Microbiology Reports.* 5:725-730.
- Stenholm, A.R., I. Dalsgaard ja M. Middelboe. 2008. Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl.Environ.Microbiol.* 74:4070-4078.
- Sun, L., L.N. Young, X. Zhang, S.P. Boudko, A. Fokine, E. Zbornik, A.P. Roznowski, I.J. Molineux, M.G. Rossmann ja B.A. Fane. 2014. Icosahedral bacteriophage [Phi] X174 forms a tail for DNA transport during infection. *Nature.* 505:432-435.
- Syväranta, J., M. Tirola ja R.I. Jones. 2008. Seasonality in lake pelagic $\delta^{15}\text{N}$ values: patterns, possible explanations, and implications for food web baselines. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv Für Hydrobiologie.* 172:255-262.
- Tucker, K.P., R. Parsons, E.M. Symonds ja M. Breitbart. 2011. Diversity and distribution of single-stranded DNA phages in the North Atlantic Ocean. *The ISME Journal.* 5:822-830.

- Weinbauer, M. ja C. Suttle. 1999. Lysogeny and prophage induction in coastal and offshore bacterial communities. *Aquat.Microb.Ecol.* 18:217-225.
- Weinbauer, M.G. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol.Rev.* 28:127-181.
- Weinbauer, M.G. ja F. Rassoulzadegan. 2004. Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environ.Microbiol.* 6:1-11.
- 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.
- Williamson, S.J., L.A. Houchin, L. McDaniel ja J.H. Paul. 2002. Seasonal variation in lysogeny as depicted by prophage induction in Tampa Bay, Florida. *Appl.Environ.Microbiol.* 68:4307-4314.
- Wommack, K.E. ja R.R. Colwell. 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 64:69-114.
- Yoshida, M., Y. Takaki, M. Eitoku, T. Nunoura ja K. Takai. 2013. Metagenomic Analysis of Viral Communities in (Hado) Pelagic Sediments. *PloS One.* 8:e57271.
- Zheng, Y., D.K. Struck ja R. Young. 2009. Purification and functional characterization of phiX174 lysis protein E. *Biochemistry.* 48:4999-5006.

LIITTEET

Liite I. SDS-PAGE:n geelit ja puskurit

SDS-PAGE-puskurit:

Puskuri IIa (ylägeeli):

363 g Trizma emäs (Sigma)

→ pH 8,6:ksi 37 % HCl:lla

→ täytä 1000 ml:aan vedellä

Puskuri IIb (ajogeeli):

30 g Trizma emäs (Sigma)

3034 ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

→ pH 7,8:ksi 37 % HCl:lla

→ täytä 500 ml:aan vedellä

3 x näytepuskuri

10 ml puskuri IIa

10 ml 10 % SDS

0,4 ml 0,5 M EDTA

1 ml 2-merkaptotaetanol

10 ml 87 % glyseroli

10 mg bromifenolisininen

1:4-puskuri

100 ml puskuri IIb

4 ml 10% SDS

100 ml H_2O

→ pH 8,55-8,6:ksi

MR-Spacer-puskuri

31,23 ml 40 % akryyliamidi (Bio-Rad)

31,3 ml puskuri IIa

2,3 ml 10 % SDS
→ täytä 250 ml:aan vedellä

Geelipuskuri (Trisiini-SDS-PAGE)

3 M Tris emäs
0,3 % SDS
→ pH 8,45:ksi

AB (Trisiini-SDS-PAGE):

30 % Akryyliamidi
0,8 % Bis-akryyliamidi

Anodipuskuri (Trisiini-SDS-PAGE):

0,2 M Tris emäs
→ pH 8,9:ksi

Katodipuskuri (Trisiini-SDS-PAGE):

0,1 M Tris emäs
0,1 M Trisiini
0,1 % SDS
→ pH 8,25:ksi

SDS-PAGE-geelit:SDS-PAGE ylägeeli (5 %):

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

SDS-PAGE ajogeeli (14 %):

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

Trisiini-SDS-PAGE ylägeeli (5 %):

1,7 ml	30 % AB
2,5 ml	geelipuskuri
5,8 ml	H ₂ O
10 µl	TEMED
100 µl	10 % APS

Trisiini-SDS-PAGE ajogeeli:

19,8 ml	30 % AB
4,6 g	87 % glyseroli
11,6 ml	geelipuskuri
1 ml	H ₂ O
12 µl	TEMED
117 µl	10% APS

Liite II. B330:n 16S rRNA-geenin PCR-monistus

Alukkeiden fD1 ja rDi sekvenssit (Weisburg, 1991)

fD1	CCGAATTCGTTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
rDi	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC

16S rRNA -geenin monistusreaktio ja PCR-ohjelma

Phusion Flash High Fidelity Master mix 25 µl

fD1 1 µl

rDi 1 µl

templaatti 1 µl

H₂O 22 µl

Alkudenaturaatio	98 °C	10 s	} x30
Denaturaatio	98 °C	1 s	
Kiinnittyminen	55 °C	5 s	
Pidennys	72 °C	15 s	
Loppupidennys	72 °C	1 min	

Sekvensointi-PCR

Big Dye Terminator

25 X Sequencing Premix 0,5 µl

5 X puskuri 3,75 µl

3,5 µM aluke (fD1 tai rDi) 1 µl

Templaatti 3 µl

H₂O 11,75 µl

Alkudenaturaatio	96 °C	1 min	} x25
Denaturaatio	96 °C	10 s	
Kiinnittyminen	50 °C	5 s	
Pidennys	60 °C	4 min	