

Proteiinivuorovaikutukset RNA-hiljennystä ylläpitävien proteiinien ja virusten RNA-hiljennyksenestäjien välillä

Janne Streng
Pro gradu tutkielma
Helsingin yliopisto
Maataloustieteiden laitos
Kasvivirologia
Maaliskuu 2013

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF
HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tdk.		Laitos — Institution — Department Maataloustieteiden laitos	
Tekijä — Författare — Author Janne Streng			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Proteiinivuorovaikutukset RNA-hiljennystä ylläpitävien proteiinien ja virusten RNA-hiljennyksenestäjien välillä			
Oppiaine — Läroämne — Subject Kasvintuotantotieteet, kasvivirologia			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterin tutkielma		Aika — Datum — Month and year Maaliskuu 2013	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 91
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>RNA-hiljennys on sekvenssispesifinen RNA:n hajotusmenetelmä, jota kasvit käyttävät geeniekspression säätelyyn ja puolustukseen virustartuntoja vastaan. Virukset ovat kehittäneet RNA-hiljennystä vastaan RNA-hiljennyksenestäjiä, jotka voivat estää ja häiritä hiljennysreaktion kulkua monin tavoin. Virusproteiinit voivat esimerkiksi sitoutua hiljennysreaktion keskeisiä vaiheita ylläpitäviin proteiineihin tai hiljennyksen signaloinnista vastaaviin molekyyliin. Tässä työssä tutkittiin crini- ja potyvirusen tunnettujen RNA-hiljennyksenestäjäproteiinien vuorovaikutuksia neljän RNA-hiljennystä ylläpitävän kasviproteiinin kanssa.</p> <p>Proteiinien vuorovaikutuksia testattiin hiivan kaksihybridi-menetelmällä (YTHS) ja kahden molekyylin välistä fluoresenssikomplementaatiota (BiFC) käyttäen. Jälkimmäisen menetelmän avulla voidaan tutkia proteiinivuorovaikutusta havainnoida solu ympäristössä. Hiivavektoreihin kloonattujen geenien proteiintuotto hiivasoluissa tarkastettiin western blot -menetelmällä. BiFC-menetelmässä keskityttiin pääosin hiivan kaksihybridi-menetelmällä havaittujen proteiinien välisten vuorovaikutusten tarkasteluun.</p> <p>Tutkimuksessa havaittiin kolme aikaisemmin tuntematonta proteiinien välistä vuorovaikutusta. Tämän lisäksi tutkittujen virusproteiinien todettiin ensimmäistä kertaa sitoutuvan hiljennystä ylläpitäviin kasviproteiineihin. Vastaavien kasviproteiinien on aikaisemmin todettu olevan muiden hiljennyksenestäjien kohteena.</p> <p>Koska kyseisten hiljennystä ylläpitävien proteiinien toiminnot tiedetään varsin tarkasti, voidaan kolmen havaitun proteiinivuorovaikutuksen ajatella häiritsevän RNA-hiljennystä kyseisten kasviproteiinien toimintaa estämällä.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords RNA-hiljennys, RNA-hiljennyksenestäjä, YTHS, BiFC, potyvirus, crinivirus			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Viikin tiedekirjasto ja Maataloustieteiden laitos			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Työn ohjaaja: Dosentti Minna Rajamäki			

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF
HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and forestry		Laitos — Institution — Department Department of Agricultural Sciences	
Tekijä — Författare — Author Janne Streng			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Protein interactions between RNA silencing maintaining proteins and viral silencing suppressors			
Oppiaine — Läroämne — Subject Plant Production Sciences, Plant Virology			
Työn laji — Arbetets art — Level Master's thesis		Aika — Datum — Month and year March 2013	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 91
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>RNA silencing is a sequence specific RNA degradation mechanism which is used by plants to regulate gene expression and to combat virus infections. However, viruses have developed so called silencing suppressors, which can prevent and interfere silencing reaction by many ways. For example, virus proteins can bind to maintaining proteins of the silencing reaction or to molecules which are responsible for signaling of the silencing reaction. This thesis focused on the study of protein-protein-interactions between known silencing suppressors of crini- and potyvirus and four maintaining plant proteins of RNA silencing.</p> <p>Protein-protein-interactions were studied using the yeast two-hybrid system (YTHS) and the bimolecular fluorescence complementation assay (BiFC). The latter method enables visualization of the studied protein interactions in plant cells. Protein expression of the cloned genes in yeast vectors were studied by using western blot. BiFC analysis was focused on protein interactions which were found by YTHS.</p> <p>This study detected three previously unknown protein interactions. Two virus proteins were found for the first time to bind directly to silencing maintaining proteins that are known to be targets of other silencing suppressors.</p> <p>Because the functions of these silencing maintaining proteins are known, it is possible that the three interactions described in this study interfere RNA silencing by impeding the functions of the plant proteins.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords RNA silencing, silencing suppressors, YTHS, BiFC, potyvirus, crinivirus			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Viikki Science Library and Department of Agricultural Sciences			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information The supervisor of the thesis: Docent Minna Rajamäki			

LYHENTEET	6
1 JOHDANTO	7
2 RNA-hiljennys, RNA-hiljennyksenestäjät sekä niiden tutkiminen	9
2.1 Crinivirukset	9
2.1.1 Bataatin kitukasvuvirus.....	9
2.2 Potyvirukset	10
2.2.1 Perunan A-virus.....	10
2.3 RNA-hiljennys geenisäätely- ja puolustusmekanismina	10
2.3.1 Primääristen siRNA-molekyylien tuotto	11
2.3.2 Yksijuosteista RNA:ta pilkkova proteiini- ja RISC-kompleksi (RISC).....	13
2.3.3 RNA-hiljennyksen voimistumisreaktio ja leviäminen signaalin välityksellä	14
2.3.4 SGS3-proteiini ja sen toiminta RNA-hiljennyksessä	15
2.4 Virusten RNA-hiljennyksenestäjien toiminta	16
2.4.1 siRNA-molekyyliin sitoutuminen	16
2.4.2 siRNA-molekyylien hajotus.....	17
2.4.3 AGO-proteiinien toiminnan estäminen.....	18
2.4.4 DCL- & DRB-proteiinien toiminnan estäminen	21
2.4.5 SGS3-proteiinin toiminnan estäminen	22
2.4.6 RNA-hiljennyksenestäjien keskittyminen tumaan	22
2.5 RNA-hiljennyksenestäjien tutkiminen	23
2.5.1 Hiivan kaksihybridi-menetelmä (YTHS, <i>yeast two-hybrid system</i>)	25
2.5.2 Kahden molekyylin välinen fluoresenssi komplementaatio (BiFC, <i>bimolecular fluorescence complementation</i>)	28
3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	30
4 AINEISTO JA MENETELMÄT	30
4.1 Geenien kloonauksen hiivavektoreihin	30
4.1.1 Kloonattavan geenin monistus polymeraasiketjureaktion (PCR) avulla.....	30
4.1.2 Ligaatio ja transformaatio	33
4.1.3 Pesäke PCR, tarkistusdigestio ja TENSprep.....	34
4.1.4 Plasmidien eristys ja sekvensointi	37
4.2 Geenien kloonauksen BiFC-kokeissa käytettyihin pLH-vektoreihin ..	37
4.3 Hiivan kaksihybridi-menetelmä	40
4.3.1 Kompetenttien hiivasolujen valmistus.....	40
4.3.2 Hiivan transformointi.....	41
4.3.3 Proteiinien välisten vuorovaikutusten testaus	42
4.4 BiFC-kokeet	43
4.4.1 Kompetenttien Agrobakteerien valmistus	43
4.4.2 Agrobakteerin transformointi	43
4.4.3 Agrobakteerikäsittelyt	44
4.4.4 Mikroskopiointi	44
4.5 YTHS:ssä käytettyjen pGAD- ja pGBK-vektoreiden ilmentymisen tarkistaminen western blot -menetelmällä	45
4.6 BiFC-menetelmässä käytettyjen pLH-vektoreiden ilmentymisen tarkistaminen western blot -menetelmällä	47

5 TULOKSET	48
5.1 Hiivan kaksihybridi-menetelmällä löydetty proteiinien väliset vuorovaikutukset	48
5.1.1 Hiivavektoreiden ilmentymisen tarkistaminen western blot -menetelmällä.....	51
5.2 BiFC-menetelmällä löydetty proteiinien väliset vuorovaikutukset	54
5.2.1 VPg- ja SGS3-proteiinien välinen vuorovaikutus.....	54
5.2.2 RNase3- ja SGS3-proteiinien välinen vuorovaikutus.....	56
5.2.3 RDR6-proteiinin väliset vuorovaikutukset SGS3-, RNase3-, ja VPg-proteiinien kanssa.....	57
5.2.4 BiFC-menetelmässä käytettyjen pLH-vektoreiden ilmentymisen tarkistaminen western blot -menetelmällä.....	59
6 TULOSTEN TARKASTELU	61
6.1 Havaitut proteiinien väliset vuorovaikutukset	61
6.1.1 PVA-VPg- ja SGS3-proteiinien välinen vuorovaikutus.....	61
6.1.2 SPCSV-RNase3- ja SGS3-proteiinien välinen vuorovaikutus.....	63
6.1.3 PVA-VPg- ja AGO1-proteiinien välinen vuorovaikutus.....	65
6.2 Proteiinit joiden välillä ei havaittu vuorovaikutusta	66
6.2.1 Hiivan kaksihybridi-menetelmä.....	66
6.2.2 BiFC-menetelmä.....	67
6.3 Jatkotutkimukset	68
7 JOHTOPÄÄTÖKSET	70
8 KIITOKSET	71
9 LÄHTEET	71

LYHENTEET

AD	Activation domain, GAL4-proteiinin karboksipäässä sijaitseva transkription aktivointialue
AGO	ARGONAUTE, yksijuosteista RNA:ta pilkkovaa endoribonukleaasi
BD	Binding domain, GAL4-proteiinin aminopään DNA:han sitoutuva alue
BiFC	Bimolecular fluorescence complementation, kahden molekyylinen välinen fluoresenssikomplementaatio
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i> , kurkun mosaiikkivirus
DCL	DICER-LIKE, kaksijuosteiseen RNA:han erikoistunut endonukleaasi
DRB	dsRNA binding proteins, kaksijuosteiseen RNA:han sitoutuvia proteiineja, jotka mahdollistavat DCL-proteiinien endonukleaasiaktiivisuuden
dsRNA	Double stranded RNA, kaksijuosteinen RNA
Ep	DNA:n emäspari
GAL4	Hiivan (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) transkriptioaktivaattori proteiini
GFP	Green fluorescent protein, vihreänä fluoresoiva proteiini
GUS	β -glukuronidaasi
HC-pro	Helper component proteinase, potyvirusten proteiini, joka osallistuu mm. virusten kirjavälitteiseen leviämiseen ja RNA-hiljennysreaktion estämiseen
HEN1	HUA ENHANCER 1, kasveilla RNA-hiljennystä ylläpitävä proteiini, joka stabiloi siRNA-molekyylejä metyloimalla niiden 3'pään
miRNA	MicroRNA, pikku-RNA-molekyyli, joka toimii geeniekspression säätelyssä
NLS	Nuclear and nucleolar localization signals, tuma- ja tumajyväslokalisatiota ohjaava sekvenssi
ORF	Open reading frame, avoin lukuraami
PVA	<i>Potato virus A</i> , perunan A-virus
PVY	<i>Potato virus Y</i> , perunan Y-virus

RDR	RNA-dependent RNA polymerases, RNA:ta templaattinaan käyttävä RNA-polymeraasi
RISC	RNA induced silencing complex; proteiinikompleksi, jolla hajotetaan kohde-RNA:ta siRNA- tai miRNA-molekyylien tunnistamana
RNAi	RNA interference, RNA-häirintä.
RNase3	SPCSV:n RNA-hiljennyksenestäjä, homologi <i>Escherichia coli</i> -bakteerin kolmostyyppin endoribonukleaasille
SGS3	Suppressor of gene silencing 3, kasveilla RNA-hiljennystä ylläpitävä proteiini
siRNA	Short interfering RNA, pikku-RNA-molekyyli
SPCSV	<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i> , bataatin kitukasvuvirus
SPFMV	<i>Sweet potato feathery mottle virus</i> , bataatin höyhenläikkävirus
SPMMV	<i>Sweet potato mild mottle virus</i> , bataatin lieväläikkävirus
SPVD	Sweet potato virus disease, bataatin virustauti
VPg	Viral protein genome linked, viruksen RNA-genomin 5'päähän kiinnittyvä proteiini
YFP	Yellow fluorescent protein, keltaisena fluoresoiva proteiini
YTHS	Yeast two-hybrid system, hiivan kaksihybridi-menetelmä proteiinien vuorovaikutusten tutkimiseksi

1 JOHDANTO

RNA-hiljennyksellä tarkoitetaan sekvenssiltään identtisten RNA-molekyylien hajotusta, jota voidaan käyttää joko eliön oman tai vierasperäisen RNA:n hajotukseen. Viimeisten kahden vuosikymmenen aikana RNA-hiljennysreaktion eri vaiheet ovat tulleet tunnetuiksi, ja esimerkiksi ilmiön toiminta kasveilla virustartuntojen torjunnassa tunnetaan melko tarkasti.

Potyvirusten HC-pro-teiini (*helper component proteinase*) on yksi ensimmäisistä tunnistetuista RNA-hiljennyksenestäjistä (Anandalakshmi ym. 1998, Brigneti ym.

1998, Kasschau ja Carrington 1998). Heti löytymisensä jälkeen näitä proteiineja on tutkittu laajasti, ja esimerkiksi Voinnet'in ym. (1999) tekemä tutkimus useista viruksista vakiinnutti käsitystä RNA-hiljennyksenestäjien keskeisestä roolista RNA-hiljennysreaktion estämisessä tai välttämässä. Nykyään RNA-hiljennyksenestäjiä tiedetään esiintyvän laajasti eri virusryhmissä, ja niitä löydetään koko ajan lisää. Kyseisten proteiinien toimintatavat ovat osoittautuneet hyvin erilaisiksi. Ne perustuvat esimerkiksi RNA:han sitoutumiseen, sen hajotukseen tai sitoutumiseen hiljennystä ylläpitäviin kasviproteiineihin.

RNA-hiljennyksenestäjien tuottaminen lehtisolukossa agrobakteerikäsittelyn avulla on yksi käytetyimmistä menetelmistä RNA-hiljennyksenestäjien tutkimisessa. Tällä menetelmällä suuri määrä lehtisoluja saadaan tuottamaan hiljennyksenestäjäproteiinia muutamassa päivässä (Voinnet ym. 1998, Johansen ja Carrington 2001). Sen avulla on pystytty osoittamaan monien virusproteiinien olevan RNA-hiljennyksenestäjiä, huolimatta kyseisten proteiinien monista erilaisista toimintatavoista. Esimerkiksi agrobakteerikäsittelyllä ja varttamismenetelmien avulla on tehokkaasti tutkittu virusproteiinien aiheuttamaa RNA-hiljennyksen ja sen leviämisen estymistä (Palauqui ym. 1997). Koska virusproteiinien on raportoitu sitoutuvan hiljennystä ylläpitäviin kasviproteiineihin, tarjoavat myös proteiinien välisiä vuorovaikutuksia tarkastelevat menetelmät oivan työkalun RNA-hiljennyksenestäjien tutkimiseen.

Tämän työn tarkoituksena oli määrittää proteiinien välisiä vuorovaikutuksia RNA-hiljennystä ylläpitävien kasviproteiinien sekä crini- ja potyvirusproteiinien välillä. Hiljennystä ylläpitävät kasviproteiinit valittiin tutkimuksiin niiden aikaisemmin julkaistujen virusproteiinien välisten vuorovaikutusten perusteella. Virusproteiinit valikoitiin tutkimuksiin sen perusteella, oliko niiden aikaisemmin todettu estävän RNA-hiljennysreaktiota. Tämän lisäksi muutamien kasvi- ja virusproteiinien mahdollisia proteiinivuorovaikutuksia testattiin, koska aikaisemmissa kokeissa ne oli paikannettu solun samoihin osiin. Vuorovaikutuksia tutkittiin käyttäen kahden molekyylin välistä fluoresenssikomplementaatiota (BiFC, *bimolecular fluorescence complementation*) sekä hiivan kaksihybridimenetelmää (YTHS, *yeast two-hybrid system*).

2 RNA-hiljennys, RNA-hiljennyksenestäjät sekä niiden tutkiminen

2.1 Crinivirukset

Crinivirukset kuuluvat heimoon *Closteroviridae*. Niiden genomi koostuu yleisesti kahdesta yksijuosteisesta RNA-molekyylistä, jotka voivat toimia suoraan lähetti-RNA:na (van Regenmortel ym. 2000). Esimerkiksi bataatin kitukasvuviruksella (SPCSV, *Sweet potato chlorotic stunt virus*) genomi jakautuu 9407 ja 8223 nukleotidia pitkiin molekyyleihin (Kreuze ym. 2002). Crinivirusten tyyppilaji on salaatin tarttuva keltavirus (LIYV, *Lettuce infectious yellows virus*), jonka koko genomi SPCSV:n ohella on julkaistu (Klaassen ym. 1995). Crinivirukset leviävät *Bemisia*- ja *Trialeuroides*-sukuihin kuuluvien jauhiaisten välityksellä (Hull 2004).

2.1.1 Bataatin kitukasvuvirus

Bataatti (*Ipomoea batatas* L.) on satoisa ja viljelyominaisuuksiltaan helppohoitoinen kasvi, joka on tärkeä ruokakasvi esimerkiksi Itä-Afrikassa (Karyeija ym. 1998). Bataatin virustauti (SPVD, *Sweet potato virus disease*) muodostaa kuitenkin huomattavan ongelman bataatin viljelylle ja voi käytännössä tuhota koko sadon (Gibson ym. 1998). Yksi haitallisimmista tautia aiheuttavista viruksista on bataatin kitukasvuvirus, jonka lisäksi myös potyvirusiin kuuluva bataatin höyhenläikkävirus (SPFMV, *Sweet potato feathery mottle virus*) ja ipomovirusiin kuuluva bataatin lieväläikkävirus (SPMMV, *Sweet potato mild mottle virus*) aiheuttavat oireita bataatilla (Tairo ym. 2005). Suurimman ongelman muodostaa kuitenkin SPCSV:n ja SPFMV:n yhteistartunta, joka aiheuttaa pahimmat taudinoireet (Gibson ym. 1998). Tämän lisäksi myös SPCSV:n ja SPMMV:n yhteistartunta aiheuttaa vakavia taudinoireita (Mukasa ym. 2006), joiden syyksi on esitetty SPCSV:n RNA-hiljennyksenestäjien toimintaa (Karyeija ym. 2000).

SPCSV:n genomien tiedetään sisältävän kaksitoista avointa lukukehystä (ORF, *open reading frame*) (Kreuze, ym. 2002), joista kahden tuottaman proteiinin on esitetty osallistuvan RNA-hiljennysreaktion estämiseen. Kreuze ym. (2002) totesivat SPCSV:n sisältävän kasveille homologisen geenin (RNase3), jolla on myöhemmin

todettu kyky estää RNA-hiljennystä (Kreuze ym. 2005, Cuellar ym. 2009). RNase3-proteiinin lisäksi myös SPCSV:n p22-proteiini toimii RNA-hiljennyksenestäjänä (Kreuze ym. 2005).

2.2 Potyvirukset

Potyvirus-suku on yksi taloudellisesti haitallisimmista kasvivirussuvuista (Hull 2004). Nämä virukset kuuluvat heimoon *Potyviridae*, ja niiden yksijuosteinen RNA-genomi voi suoraan toimia lähetti-RNA:na. Virus-RNA:sta muodostuu aluksi yksi suuri proteiini, jonka NIa-proteiini (*nuclear inclusion protein*) pääosin pilkkoo toimiviksi virusproteiineiksi (Carrington ja Dougherty 1987, Hellmann ym. 1988, Carrington ym. 1989, Garcia ym. 1989). Potyvirusten genomille on luonteenomaista 5'päähen kiinnittynyt VPg-proteiini (*viral protein genome linked*) ja 3'pään adeniini-emäksien toistojakso (polyA). Potyvirusten tyyppilaji on perunan Y-virus (PVY, *Potato virus Y*), joka esimerkiksi pavun keltamosaiikkiviruksen (BYMV, *Bean yellow mosaic virus*) ja luumun rokkoviruksen (PPV, *Plum pox virus*) kanssa aiheuttaa huomattavia ongelmia kasvintuotannolle maailmanlaajuisesti (Hull 2004). Potyvirus-suvun virukset leviävät pääasiassa kirvojen välityksellä (Hull 2004).

2.2.1 Perunan A-virus

Perunaa infektoivista viruksista PVY ja perunan A-virus (PVA, *Potato virus A*) muodostavat huomattavan ongelman perunantuotannolle. Esimerkiksi Suomessa PVY-tartuntojen määrä kaksinkertaistui tarkastetuista siemenperunaeristä vuosina 2005 ja 2006. Kuitenkaan PVA:n tartuntojen määrässä ei todettu vastaavaanlaista voimakasta nousua (Kortemaa 2007). PVA:n RNA-hiljennyksenestäjistä HC-pro:n on osoitettu estävän RNA-hiljennystä sitomalla pikku-RNA-molekyylejä (siRNA, *short interfering RNA*) (Lakatos ym. 2006). Rajamäki ja Valkonen (2009) osoittivat myös PVA:n VPg-proteiinilla olevan RNA-hiljennystä estävää vaikutusta (ks. 1.4.6).

2.3 RNA-hiljennys geenisäätely- ja puolustusmekanismina

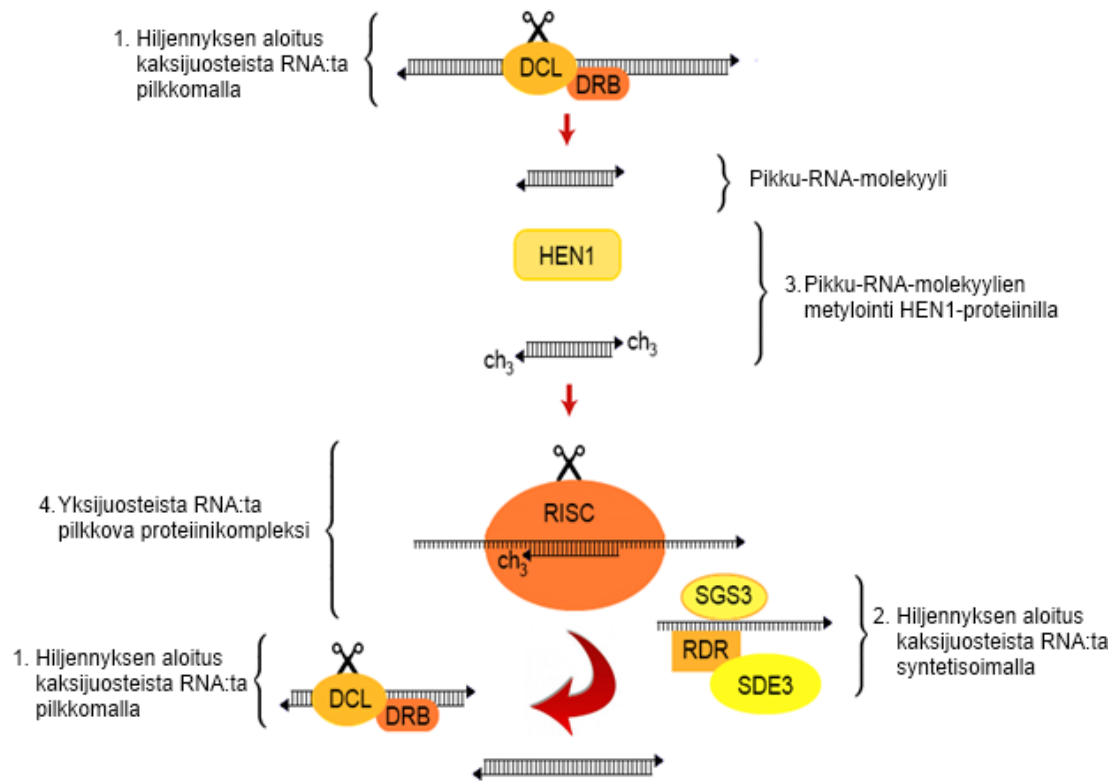
Kasvien RNA-hiljennyksen on todettu olevan tehokas keino suojautua virustartunnoilta. Ilmiö perustuu vierasperäisen RNA:n tunnistukseen ja hajotukseen

(Voinnet ja Baulcombe 1997, Baulcombe 2004). Kaikissa korkeammassa eukaryooteissa RNA-hiljennyksen tiedetään osallistuvan myös geeniekspression säätelyyn miRNA-molekyylien (microRNA) avulla (Bartel 2004), ja genomien suojelemiseen transposoneilta DNA- ja histonimetylaatioiden kautta (Zilberman ym. 2003). RNA-hiljennyksen voidaan katsoa jakautuvan kolmeen keskeiseen vaiheeseen: epätyypillisen kaksijuosteisen RNA:n (dsRNA, *double stranded RNA*) tunnistukseen ja hajotukseen DCL-proteiinien (DICER-LIKE) avulla, vierasperäisen RNA:n hajotukseen RISC-kompleksilla (*RNA induced silencing complex*), ja edelleen RNA-hiljennyksen voimistusreaktioon (Burgan ja Havelda 2011).

2.3.1 Primääristen siRNA-molekyylien tuotto

DCL-proteiinit vastaavat hiljennysreaktion ensimmäisestä vaiheesta (Kuva 1) pilkkomalla solulle epätyypillistä dsRNA:ta siRNA-molekyyleiksi (Bernstein ym. 2001, Voinnet 2001). DCL-proteiinit tunnistavat kaksijuosteiset RNA-molekyylit ja pilkkovat ne 21-24 nukleotidin pituisiksi kaksijuosteisiksi siRNA-molekyyleiksi jättäen 3'päihin kahden emäksen pituiset yksijuosteiset ”hännät” (Aliyari ja Ding 2009). Tunnistaminen perustuu kaksijuosteisen RNA:n harvinaisuuteen solu ympäristössä, missä sitä esiintyy normaalisti vain virusgenomien kahdentuessa. Esimerkiksi yksijuosteisten RNA-virusten genomi on ainakin osittain pariutuneena vastinjuosteensa kanssa perimäaineksen kahdentuessa (Hull 2004). Tämän lisäksi hiljennysreaktio voi kohdistua rakenteisiin, joissa saman RNA-molekyylin emäkset pariutuvat keskenään muodostaen kaksijuosteista RNA:ta (ns. hairpin-rakenne) (Waterhouse ym. 1998, Wang ja Waterhouse 1998).

dsRNA-molekyylejä voi muodostua myös kasvin omien RNA-templaattia käyttävien RNA-polymeraasien (RDR, *RNA-dependent RNA polymerases*) kopioidessa vierasperäistä RNA:ta kaksijuosteiseen muotoon (Bećlin ym. 2002, Baulcombe 2004). Tällöin pilkottavan RNA:n tunnistaminen perustuu lähetti-RNA:n (mRNA) CAP- ja polyA-rakenteisiin sitoutuviin proteiineihin, jotka normaalisti estävät esimerkiksi RDR-polymeraasien toimintaa. Jos RNA on solulle vieras, voi edellä mainittujen CAP- ja polyA-rakenteiden sitoutuminen olla puutteellista, tai ne voivat puuttua kokonaan (Herr ym. 2006).



Kuva 1. RNA-hiljennys voi alkaa suoraan DCL-proteiinien suorittamalla kaksijuosteisen RNA:n pilkkomisella, jota RNA:han sitoutuvat proteiinit (DRB) edesauttavat (1). Tämän lisäksi RNA-hiljennys voi alkaa RDR-polymeraasien kopioidessa yksijuosteista RNA:ta kaksijuosteiseen muotoon SGS3- ja SDE3-proteiinien avustamana, josta kehittynyt kaksijuosteinen RNA pilkotaan kuten edellä (2). Näistä reaktioista syntyneille pikku-RNA-molekyyleille siirretään metyyliiryhmä HEN1-proteiinin (HUA ENHANCER 1) toimesta (3), jonka jälkeen pikku-RNA-molekyylin toista juostetta käytetään yksijuosteista RNA:ta pilkkovalla proteiini-kompleksilla (RISC) kohde-RNA:n tunnistamiseen (4). Tunnistuksen tapahduttua RISC-kompleksin AGO-proteiinit pilkkovat kohde-RNA:n (Lähde: Alvarado & Scholthof 2009).

DCL-proteiinit ovat kaksijuosteiseen RNA:han erikoistuneita kolmostyyppin (Class III) endoribonukleaaseja (Bernstein ym. 2001). Lituruoholla tiedetään neljä erilaista DCL-proteiinia (Schauer ym. 2002), joiden toiminta RNA-hiljennyksessä on toisiaan täydentävää (Baulcombe 2004, Deleris ym. 2006). DCL1-proteiini osallistuu endogeenisen geeniekspression säätelyyn tuottamiensa kasviperäisten miRNA-molekyylien avulla (Park ym. 2002), kun taas DCL3 tuottamat siRNA-molekyylit

osallistuvat transposonien ja retroelementtien hiljennykseen (Xie ym. 2004). DCL2- ja 4-proteiinit osallistuvat vieraiden RNA-molekyylien hiljennykseen, jossa DCL4-proteiini toimii keskeisenä siRNA-molekyylien tuottajana (Deleris ym. 2006).

DCL-proteiinien toiminta on mahdollista kaksijuosteiseen RNA:han sitoutuvien proteiinien avulla (DRB, *dsRNA binding proteins*), joiden on osoitettu olevan suorassa vuorovaikutuksessa DCL-proteiinien kanssa (Hiraguri ym. 2005). Hiraguri ym. (2005) osoittivat vain tiettyjen DCL- ja DRB-proteiinien sitoutuvan toisiinsa (DRB4:DCL4 ja HYL1/DRB1:DCL1). Näiden proteiinien toimintatavat ovat myöhemmin tarkentuneet mutaatiotutkimusten avulla. Esimerkiksi DRB1-proteiinin on osoitettu toimivan miRNA-reitissä (Han ym. 2004) yhdenmukaisesti DCL1-proteiinin toimintatavan kanssa (Park ym. 2002), kun taas DRB4-proteiini osallistuu siRNA-molekyylien tuottoon yhdessä DCL4-proteiinin kanssa (Deleris ym. 2006, Curtin ym. 2008). Koska myös DCL-proteiineilla on kaksijuosteiseen RNA:han sitoutuva osa, on DRB-proteiinien toiminnan esitetty liittyvän siRNA-molekyylien siirtämiseen DCL-proteiinilta RISC-kompleksin AGO-proteiinille (Hiraguri ym. 2005). Esimerkiksi banaanikärpäsen (*Drosophila melanogaster* L.) R2D2-proteiini vastaa edellä kuvatusta toiminnasta RNA-häirinnässä (RNAi, *RNA interference*) (Liu ym. 2003), ja kyseisen proteiinin on osoitettu muistuttavan vahvasti kasvien DRB-proteiineja (Tabara ym. 2002, Liu ym. 2003).

siRNA-molekyylit stabiloidaan HUA ENHANCER 1-proteiinin (HEN1) avulla, joka metyloi siRNA-molekyylien 3'päähän. Tämä estää siRNA:den hajotuksen eksosomeilla ja mahdollistaa näin RISC-kompleksin muodostumisen (Li ym. 2005).

2.3.2 Yksijuosteista RNA:ta pilkkova proteiinikompleksi (RISC)

DCL-proteiinien tuottamia siRNA-molekyylejä käytetään tunnistamaan pikku-RNA:lle homologisia yksijuosteisia RNA-molekyylejä (Kuva 1). Tämä perustuu siRNA-molekyylien emäspariutumiseen yksijuosteisen kohde-RNA:n kanssa, jonka jälkeen AGO-entsyymi katkaisee kohde-RNA:n (Hammond 2005). Kaikkia RISC-kompleksin proteiineja ei tunneta, mutta sen keskeisiä osia ovat siRNA-molekyylin toinen juoste ja AGO-proteiini (Baulcombe 2004, Hammond 2005).

AGO-proteiinit katkaisevat kohde-RNA:n kaksijuosteisen RNA-rakenteen kohdalta, joka muodostuu siRNA-molekyylin pariutumisen kohde-RNA:han. AGO-proteiinit voidaan luokitella varsinaisiin AGO-proteiineihin sekä PIWI- ja ryhmä 3:n proteiineihin, joista kasveilla esiintyy vain varsinaisia AGO-proteiineja (Vaucheret 2008). AGO-proteiinit muistuttavat RNase-H-proteiineja. Osalta niistä kuitenkin puuttuu endoribonukleasiaktiivisuus (Vaucheret 2008). Lituruohon genomin tiedetään koodaavan 10:ntä erilaista AGO-proteiinia, joiden funktiot ovat osittain tuntemattomat (Vaucheret 2008). AGO1- ja AGO7-proteiinien on esitetty osallistuvan virusperäisen RNA:n hajotukseen. Morel ym. (2002) pystyivät osoittamaan tämän *ago1*- ja *ago7*-mutanteilla kasveilla, jotka olivat äärimmäisen alttiita virustartunnoille. AGO-proteiini sisältää PAZ-, MID- ja PIWI-alueet, joista PAZ-alue tunnistaa siRNA-molekyylin 3' pään, MID-alue vastaa siRNA:n 5'-fosfaattiin sitoutumisesta ja PIWI-alue varsinaisesta entsyymiaktiivisuudesta (Tolia ja Joshua-Tor 2007, Hutvagner ja Simard 2008).

2.3.3 RNA-hiljennyksen voimistusreaktio ja leviäminen signaalin välityksellä

Palauquin ym. (1997) koejärjestelyissä havaittiin ensimmäistä kertaa RNA-hiljennysreaktion leviäminen toisiin kasvinosiin. Kokeissa käytettiin tupakkaa (*Nicotiana tabacum* L.), jonka endogeeninen nitraattireduktaasigeeni (*Nla*) oli hiljennetty. Kun kasvi vartettiin ei-hiljennetyin tupakan kanssa, levisi *Nla*-geenin hiljennysreaktio myös vartettuun kasvinosaan.

Voinnet ym. (1998) osoittivat signaloinnin olevan sekvenssispesifistä ja muistuttavan virusten kulkeutumista kasvin solukossa. Kuitenkaan signaloinnin tarkkaa mekanismia ei tunnettu, kunnes Molnar ym. (2010) osoittivat signaloinnin välittyvän siRNA-molekyylien välityksellä. Edelleen Dunoyer ym. (2010) tarkensivat signaloinnin tapahtuvan kaksijuosteisten siRNA-molekyylien avulla. Tämä osoitettiin koejärjestelyssä, jossa RNA-hiljennyksenestäjät p19- ja p21-proteiinit sitoutuivat siRNA-molekyyleihin, estäen näin toimivan RISC:in muodostumisen.

Vaistij ym. (2002) osoittivat RNA-hiljennyksen voimistusreaktion ja signaloinnin liittyvän läheisesti toisiinsa. Molemmille ilmiöille ovat yhteistä siRNA-molekyylit, jotka toimivat sekä signaalintimolekyyleinä että alukkeina RNA-hiljennyksen

voimistusreaktiossa. Vaistij ym. (2002) mukaan voimistusreaktion ensimmäisessä vaiheessa RDR-polymeraasit kopioivat vieraan RNA:n kaksijuosteiseen muotoon. Tämä voi tapahtua joko siRNA-molekyylien toimiessa alukkeina, tai RDR-polymeraasien tunnistaessa vieraan RNA-rakenteen.

Muodostunut kaksijuosteinen RNA pilkotaan tämän jälkeen normaalisti DCL-proteiinien avulla siRNA-molekyyleiksi, jotka voivat toimia edelleen alukkeina dsRNA:n tuotannossa, tai vieraiden yksijuosteisten RNA-molekyylien tunnistamisessa. Tämän myötä koko vieras RNA-molekyyli tulee siRNA-molekyylien tunnistamaksi (Vaistij ym. 2002, Baulcombe 2007), mikä johtaa hiljennysreaktion ja sen signaloinnin voimistumiseen (Voinnet ym. 1998, Alvarado ja Scholthof 2009).

Nykyisin lituruohon genomien tiedetään sisältävän kuusi erilaista RDR-polymeraasia, joista RDR6-polymeraasilla on huomattava rooli RNA-hiljennyksessä (Wassenegger ja Krczal 2006). RDR1-, 2- ja 6-polymeraaseilla on tunnusomainen proteiinin karboksipäässä sijaitseva DLDGD-motiivi, jonka sisältäviä proteiiniortologeja on kasveilla yleisesti. Näistä poiketen RDR3-polymeraaseilla (a,b ja c) ei kyseistä motiivivia ole, eikä niiden tarkkaa toimintatapaa tiedetä (Wassenegger ja Krczal 2006).

2.3.4 SGS3-proteiini ja sen toiminta RNA-hiljennyksessä

Mourrain ym. (2000) osoittivat SGS3-proteiinin (*suppressor of gene silencing 3*) osallistuvan vieraan RNA:n hajotukseen, mutta sen tarkempaa toimintatapaa ei tuolloin tiedetty. Mourrain ym. (2000) ehdottivat SGS3:n osallistuvan kaksijuosteisen RNA:n tuottamiseen hiljennysreaktion alkuvaiheessa, minkä Yoshikawa ym. (2005) vahvistivat. Yoshikawa ym. (2005) osoittivat SGS3-proteiinin toiminnan olevan edellytyksenä RDR6-polymeraasin aktiivisuudelle, mitä tukevat Kumakuran ym. (2009) tulokset RDR6:n ja SGS3:n sijoittumisesta solussa samaan paikkaan ja vuorovaikutuksesta sytoplasmassa. Yoshikawa ym. (2005) ehdottivat SGS3-proteiinin toiminnan perustuvan sen sitoutumiseen yksijuosteisiin RNA-molekyyleihin. Yoshikawa ym. (2005) mukaan tämä vuorovaikutus estäisi yksijuosteisten RNA-molekyylien hajotuksen eksosomeilla, jolloin RDR-

polymeraasien toiminta pystyisi tuottamaan kaksijuosteista RNA:ta DCL-proteiinien pilkottavaksi.

SGS3-proteiinista tunnetaan kolme proteiinialuetta (Bateman 2002, Kumakura ym. 2009). ZF-alueen (*zinc finger*) tarkkaa merkitystä ei tiedetä (Bateman 2002), kun taas XS-alueen (*rice gene x* ja SGS3) on esitetty sitovan yksijuosteista RNA:ta (Zhang ja Trudeau 2008). Kolmas CC-alue (*coiled coil*) on α -kierrettä sisältävä rakenne, jonka Bateman (2002) ehdotti osallistuvan proteiinin mahdolliseen dimerisoitumiseen. Elmayan ym. (2009) vahvistivat myöhemmin SGS3-proteiinin dimerisoitumisen.

2.4 Virusten RNA-hiljennyksenestäjien toiminta

Viruksille on kehittynyt evoluution myötä useita keinoja estää ja häiritä RNA-hiljennysreaktiota. Tämä tapahtuu RNA-hiljennyksenestäjien avulla, joiden nykyisin tiedetään olevan yleisiä proteiineja viruksilla (Voinnet ym. 1999, Moissiard ja Voinnet 2004). Ensimmäiset havainnot RNA-hiljennyksenestäjistä tulivat Vancen (1991) virusten yhteistartuntoja tutkivista kokeista, jotka myöhemmin johtivat potyvirusen HC-pro:n tunnistamiseen RNA-hiljennyksenestäjänä (Anandalakshmi ym. 1998, Brigneti ym. 1998, Kasschau ja Carrington 1998).

RNA-hiljennyksen estokyky on kehittynyt useita kertoja evoluutiossa virusproteiineille, joilla on ollut jo muita toimintoja liittyen esimerkiksi viruksen leviämiseen vektoreiden avulla. Tämä on pääteltävissä esimerkiksi RNA-hiljennyksenestäjien rakenteiden ja toimintatapojen erilaisuudesta, sekä niiden esiintymisestä sekä DNA- että RNA-viruksilla (Moissiard ja Voinnet 2004). RNA:han sitoutumisen ohella RNA-hiljennyksenestäjien yleinen ominaisuus on sitoutua RNA-hiljennystä ylläpitäviin proteiineihin (Taulukko 1).

2.4.1 siRNA-molekyyleihin sitoutuminen

RNA-hiljennyksenestäjät voivat estää ja häiritä RNA-hiljennystä esimerkiksi sitoutumalla kaksijuosteiseen RNA:han. Tämä on yleinen tapa häiritä hiljennysreaktiota (Lakatos ym. 2006, Merai ym. 2006). Koska siRNA-molekyylit osallistuvat sekä RNA-hiljennyksen signalointiin että kohde-RNA:n tunnistukseen

RISC-kompleksilla, voi RNA-hiljennyksenestäjien sitoutuminen siRNA-molekyyleihin häiritä RNA-hiljennystä hyvinkin kokonaisvaltaisesti (Alvarado ja Scholthof 2009). Esimerkiksi tupakan juomuviruksen (TEV, *Tobacco etch virus*) HC-pro:n on osoitettu sitovan siRNA-molekyylejä, jolloin niiden metylaatio HEN1-proteiinilla häiriintyy (Lozsa ym. 2008, Jamous ym. 2011). Tämän lisäksi kesäkurpitsan keltamosaiikkiviruksen (ZYMV, *Zucchini yellow mosaic virus*) HC-pro:n on todettu estävän siRNA-molekyylien metylaatiota sitoutumalla suoraan HEN1-proteiiniin (Taulukko 1) (Jamous ym. 2011).

Tombusvirusten p19 on osoitettu sitoutuvan tehokkaasti 21-25 nukleotidin mittaisiin RNA-molekyyleihin, minkä myötä hiljennyksen signalointi ja RISC-kompleksien muodostuminen häiriintyy (Silhavy ym. 2002, Lakatos ym. 2004). Vargason ym. (2003) osoittivat p19-proteiinin sitoutuvan spesifisesti 21 nukleotidin mittaisiin siRNA-molekyyleihin. Vuorovaikutuksen havaittiin perustuvan pelkästään siRNA-molekyylien kokoon, eikä sekvenssillä ollut vaikutusta. Mekanismi perustuu p19-proteiinin aminopään tryptofaanien emäspinoutumiseen (*stacking interactions*) siRNA-molekyylien guaniini- ja sytosiiniemäsrenkaiden kanssa.

Kurkun mosaiikkiviruksen (CMV, *Cucumber mosaic virus*) 2b-proteiini on potyvirusten HC-pro:n ohella yksi tunnetuimmista RNA-hiljennyksenestäjistä (Anandalakshmi ym. 1998, Brigneti ym. 1998). Guo ja Ding (2002) osoittivat 2b-proteiinin estävän tehokkaasti hiljennyssignaalin kulkua. Tämä todettiin kokeissa, joissa signaali ei pystynyt leviämään uusiin kasvisolukoihin 2b-proteiinia ilmentävän vartteen läpi. 2b:n tarkan toimintatavan esitettiin liittyvän signaalimolekyylin sitoutumiseen, jonka oletettiin olevan RNA:ta. Myöhemmin Dunoyer ym. (2010) osoittivat signaloinnin tapahtuvan siRNA-molekyylien avulla, joiden vuorovaikutuksen 2b-proteiinin kanssa Hamera ym. (2012) pystyivät osoittamaan.

2.4.2 siRNA-molekyylien hajotus

RNA-hiljennyksenestäjät voivat estää hiljennysreaktiota myös hajottamalla siRNA-molekyylejä (Kreuze ym. 2005, Cuellar ym. 2009). Kreuze ym. (2005) totesivat SPCSV:n proteiinien p22:n ja RNase3:n estävän hiljennysreaktiota toisiaan täydentävästi. RNase3:n endoribonukleaasiaktiivisuuden todettiin olevan

välttämätön hiljennyksen estämiselle. RNase3:n huomattiin hajottavan synteettisiä 25 nukleotidin mittaisia dsRNA-molekyylejä, ja myöhemmin Cuellar ym. (2009) totesivat hajotuksen kohteena olevan myös muunpituisia siRNA-molekyylejä. Tämän lisäksi Cuellar ym. (2009) osoittivat RNase3:n voivan pilkkoa siRNA-molekyylejä, jotka oli eristetty SPFMV-tartutetusta bataatista.

Kreuze ym. (2005) osoittivat p22:n estävän hiljennysreaktiota myös yksin, mutta RNase3:n todettiin voimistavan sen aktiivisuutta. Vaikkakin sitruspuun suruviruksella (CTV, *Citrus tristeza virus*) on osoitettu olevan kolme RNA-hiljennyksenestäjää (Lu ym. 2004), Kreuze ym. (2005) pystyivät ensimmäisinä osoittamaan SPCSV:n kahden RNA-hiljennyksenestäjän toimivan ”yhteistyössä” RNA-hiljennyksen estämisessä. Kreuze ym. (2005) ehdottivat tämän toimintatavan perustuvan p22-proteiinin sitoutumiseen siRNA-molekyyleihin, joka mahdollistaisi RNase3:n suorittaman siRNA-molekyylien hajotuksen.

RNase3 on ykköstyypin endoribonukleaasi, jonka sekvenssi muistuttaa läheisesti kasveista löytyviä kolmostyypin endoribonukleaaseja (Kreuze ym. 2002), joilla on keskeinen osa RNA-hiljennyksen toiminnassa. Kreuze ym. (2005) osoittivat ensimmäistä kertaa samantyyppisten proteiinien osallistuvan sekä hiljennysreaktion ylläpitoon että sen estämiseen. Jo aikaisemmin on *Closteroviridae*-heimon viruksilla havaittu isäntäkasveista peräisin oleva *HSP70*-geeni (Alicai ym. 1999), joka vaikuttaa virulenssiin (Agranovsky ym. 1998, Karasev 2000). Kreuze ym. (2005) esittävätkin SPCSV:n RNase3:n olevan peräisin isäntäkasvista.

2.4.3 AGO-proteiinien toiminnan estäminen

Zhang ym. (2006) totesivat CMV:n 2b-proteiinin estävän RNA-hiljennystä sitoutumalla suoraan AGO1-proteiiniin (Taulukko 1). Tämä osoitettiin proteiinien sijoittumista ja vuorovaikusta tutkivien kokeiden lisäksi myös tarkastelemalla 2b-proteiinin vaikutusta *in vitro* rakennetun RISC-kompleksin toimintaan. Kyseinen proteiini-kompleksi sisälsi yksijuosteisen siRNA-molekyylin ja AGO1-proteiinin, joiden toiminta kohde-RNA:n hajotuksessa estyi 2b-proteiinin myötä. 2b-proteiinin tarkempi sitoutumiskohta AGO1-proteiinissa todettiin olevan PAZ- ja PIWI-alueilla (Zhang ym. 2006).

Taulukko 1. Tunnetut proteiinien väliset vuorovaikutukset RNA hiljennystä ylläpitävien kasviproteiinien ja virusperäisten RNA-hiljennyksenestäjien välillä.

Virus	Estäjäproteiini	Kohdeproteiini	Viite
BWYV, CABYV	P0	AGO1	Bortolamiol ym. 2007
SPMMV	P1	AGO1	Giner ym. 2010
TCV	p38	AGO1	Azevedo ym. 2010
CMV	2b	AGO1	Zhang ym. 2006
CMV	2b	AGO4	Gonzales ym. 2010
PVX	p25	AGO1-4	Chiu ym. 2010
CaMV	P6	DRB4	Haas ym. 2008
TYLCV	V2	SGS3	Glick ym. 2008
RSV	p2	SGS3	Du ym. 2011
ZYMV	HC-pro	HEN1	Jamous ym. 2011

BWYV: *Beet western yellows virus*, CABYV: *Cucurbit aphid-borne yellows virus*, SPMMV: *Sweet potato mild mottle virus*, TCV: *Turnip crinckle virus*, CMV: *Cucumber mosaic virus*, PVX: *Potato virus X*, CaMV: *Cauliflower mosaic virus*, TYLCV: *Tomato yellow leaf curl virus*, RSV: *Rice stripe virus*, ZYMV: *Zucchini yellow mosaic virus*.

CMV:n 2b-proteiinin on todettu sitoutuvan suoraan myös AGO4-proteiiniin (Gonzalez ym. 2010, Hamera ym. 2012). Gonzalez ym. (2010) osoittivat tämän vuorovaikutuksen BiFC-menetelmää käyttäen. Myöhemmin Hamera ym. (2012) osoittivat vuorovaikutuksen muistuttavan 2b-proteiinin sitoutumista AGO1-proteiinin PAZ- ja PIWI-alueille.

Myös lantun kurttuviruksen (TCV, *Turnip crinckle virus*) p38-proteiinin on todettu sitoutuvan AGO1-proteiiniin (Azevedo ym. 2010). RISC-kompleksin kehittyessä AGO-proteiinit sitoutuvat muiden proteiinien glysiinistä (G) tai tryptofaanista (W) koostuviin kohtiin (El-Shami ym. 2007, Till ym. 2007). Tällaisen vuorovaikutuksen on esitetty olevan vanhaa alkuperää ja esiintyvän laajasti eliökunnassa (El-Shami ym. 2007). Esimerkiksi hiivan RNAi-reaktioissa AGO-proteiineihin sitoutuvia proteiineja on pystytty tunnistamaan (Till ym. 2007), mutta kasveilla vastaavanlaisia vuorovaikutuksia ei ole todettu (Azevedo ym. 2010).

Azevedo ym. (2010) osoittivat p38-proteiinin sisältävän lukuisia GW-aminohappopareja sisältäviä alueita, joiden avulla sitoutuminen AGO1-proteiiniin oli mahdollinen. Mutaatiot näillä alueilla estivät kyseisen vuorovaikutuksen, jolloin

myös TCV:n taudinaiheuttamiskyky laski huomattavasti. Azevedo ym. (2010) mukaan p38-proteiini estää siRNA-molekyylien liittymistä RISC-kompleksille, sillä hiljennyksen estämistä ei tapahtunut jo aktiivisissa RISC-komplekseissa.

SPMMV:n P1-proteiini estää RISC-kompleksin toimintaa sitoutumalla AGO1-proteiiniin (Giner ym. 2010). Kuten p38-proteiinin tapauksessa, Giner ym. (2010) osoittivat myös P1-proteiinin sisältävän GW-aminohapporikkaita alueita. Azevedo ym. (2010) esittivätkin edellä kuvatun kasviproteiinien matkimisen GW-aminohapporikkaitten alueiden avulla olevan varsin yleinen ilmiö RNA-hiljennyksen estämisessä.

Polerovirusten P0-proteiini ja perunan X-viruksen (PVX, *Potato virus X*) p25-proteiini eroavat muista AGO1-proteiiniin vaikuttavista RNA-hiljennyksenestäjistä, sillä ne osallistuvat AGO1-proteiinin hajotukseen (Bortolamiol ym. 2007, Chiu ym. 2010). Pazhouhandeh ym. (2006) totesivat P0-proteiinin olevan vuorovaikutuksessa lituruohon SKP1-ortologin (*s-phase kinase-associated protein 1*) kanssa, toimien näin F-box-proteiinina SCF-kompleksissa (*skp1, cullin, f-box containing complex*). Tämä proteiinikompleksi osallistuu kohdeproteiinien proteosomivälitteiseen hajotukseen liittämällä niihin useita ubiquitiini-proteiineja. F-box-proteiinin tehtävänä on sitoutua sekä hajotuksen kohteena olevaan proteiiniin että SKP1-proteiiniin, jolloin muodostuu toimiva ubiquitiiniligaasi-kompleksi (Deshaies 1999).

Mutaatiot P0-proteiinin oletetussa F-Box-alueessa estivät vuorovaikutuksen SKP1-proteiinin kanssa, mikä johti virulenssin huomattavaan heikentymiseen. Pazhouhandeh ym. (2006) esittivät hajotuksen kohteena olevan RNA-hiljennykseen osallistuva proteiini, jonka Bortolamiol ym. (2007) pystyivät määrittämään. Bortolamiolin ym. (2007) kokeissa P0-proteiinilla ei havaittu olevan vaikutusta primääristen siRNA-molekyylien tuottoon, kun taas RISC-kompleksin toiminnan todettiin häiriintyvän. Kokeita jatkettiin käyttäen siirtogeenisiä P0- ja AGO1-proteiineja tuottavia kasveja, joissa tapahtui AGO1-proteiinin määrän voimakas lasku siitä huolimatta, että AGO1:n transkriptio jatkui voimakkaana. Tämän lisäksi Bortolamiol ym. (2007) osoittivat P0-proteiinin olevan vuorovaikutuksessa AGO1-proteiinin kanssa *in vitro* ja BiFC-menetelmää käyttäen. Näiden kokeiden ja

Pazhouhandeh ym. (2006) tulosten perusteella Bortolamiol ym. (2007) ehdottivat P0-proteiinin hajottavan AGO1-proteiinia toimimalla F-box-proteiinina SCF-kompleksissa.

PVX:n p25-proteiini estää RNA-hiljennystä mahdollisesti häiritsemällä AGO-proteiinien toimintaa (Bayne ym. 2005). Chiu ym. (2010) totesivat p25-proteiinin olevan vuorovaikutuksessa AGO1-proteiinin lisäksi myös kolmen muun AGO-proteiinin kanssa (AGO2-4). Agrobakteerikäsittelyjen avulla havaittiin AGO1-proteiinin määrän vähenevän, minkä perusteella Chiu ym. (2010) ehdottivat p25:n funktion olevan samankaltainen polerovirusten P0-proteiinin kanssa. Proteosomi-inhibiittori (MG132) esti AGO1:n hajotuksen, minkä lisäksi MG132-käsittely lisäsi kasvien PVX-kestävyyttä. Tämän perusteella Chiu ym. (2010) totesivat p25-proteiinin hajottavan AGO1-proteiinia proteosomi-välitteisesti Hershkön ja Ciechanoverin (1992) esittämän mallin mukaisesti.

2.4.4 DCL- & DRB-proteiinien toiminnan estäminen

Love ym. (2007) raportoivat ensimmäisinä kasveja infektioivien pararetrovirusten RNA-hiljennyksenestäjästä, kun kukkakaalin mosaiikkiviruksen (CaMV, *Cauliflower mosaic virus*) P6-proteiinin todettiin estävän sekä paikallista- että systeemistä hiljennysreaktiota. Kyseisen proteiinin tiedetään sijoittuvan solulimassa viroplasmehiin, mutta osittain myös tumaan (Haas ym. 2005). Proteiinin tarkkaa toimintatapaa tumassa ei tiedetty, kunnes Haas ym. (2008) osoittivat sen sitoutuvan DRB4-proteiiniin. DRB4 mahdollistaa DCL4:n endonukleasiaktiivisuuden sitoutumalla kaksijuosteiseen RNA:han (Kuva 1), jonka Haas ym. (2008) esittivät estyvän P6-DRB4-vuorovaikutuksen myötä. DCL4:n tuottamien siRNA-molekyylien määrä vähentyi P6-proteiinin estäessä hiljennysreaktiota, joka on verrattavissa tilanteeseen *drb4*-mutanteissa kasveissa.

Deleris ym. (2006) totesivat TCV:n p38-proteiinin estävän DCL4-proteiinin toimintaa, vaikkakaan suoraa vuorovaikutusta kyseisten proteiinien välillä ei tutkittu. Tämä osoitettiin kokeissa, joissa siRNA-analyysien avulla todettiin p38-proteiinin estävän DCL4-proteiinin toimintaa. Tämän lisäksi p38-proteiinin vaikutukset hiljennysreaktioon todettiin samankaltaisiksi *dcl4*-mutantin kanssa.

2.4.5 SGS3-proteiinin toiminnan estäminen

Glick ym. (2008) osoittivat tomaatin keltäkäppyrälehtiviruksen (TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus*) V2-proteiinin estävän RNA-hiljennysreaktiota sitoutumalla SGS3-proteiinin. Tämä osoitettiin kokeissa, joissa tutkittiin lituruohon SGS3-proteiinin homologia (SlSGS3) tomaatilla (*Solanum lycopersicum* L.). V2-proteiinin mutaatiot eivät pystyneet sitoutumaan SGS3-proteiinin, jolloin sen RNA-hiljennystä estävä vaikutus hävisi. Koska SGS3-proteiinin on todettu olevan välttämätön RDR-polymeraasien toiminnalle, Glick ym. (2008) ehdottivat V2-SGS3-vuorovaikutuksen estävän RDR6-välitteistä dsRNA-synteesiä.

Myös Du ym. (2011) raportoivat RNA-hiljennyksenestäjästä, jonka osoitettiin sitoutuvan lituruohon SGS3-proteiinin homologiaan riisillä (*Oryza sativa* L.). Riisin juovaviruksen (RSV, *Rice stripe virus*) p2-proteiinin todettiin olevan vuorovaikutuksessa SGS3-proteiinin kanssa, jonka lisäksi kyseisen RNA-hiljennyksenestäjän osoitettiin estävän PVX:ään kohdistuvaa hiljennysreaktiota. Kuten Glick ym. (2008) esittivät, myös Du ym. (2011) ehdottivat RNA-hiljennyksenestäjän ja SGS3-proteiinin vuorovaikutuksen estävän RNA-hiljennykseen osallistuvan RDR-polymeraasin toimintaa.

2.4.6 RNA-hiljennyksenestäjien keskittyminen tumaan

Osa virusproteiineista kertyy tumaan, mahdollisesti häiritäkseen solun normaalia toimintaa (Schaad ym. 1996, Hiscox 2007). Esimerkiksi herneen siemenlevintäisen mosaiikkiviruksen (PSbMV, *Pea seed-borne mosaic virus*) on todettu häiritsevän isäntäkasvinsa geeniekspressiota oman replikaationsa vauhdittamiseksi (Wang ja Maule 1995). Kim ym. (2007) esittivät tuma- ja tumajyvälokalisaation tärkeyden virustartunnoille liittyvän virusproteiinien vuorovaikutukseen solun tumajyväsissä esiintyvän fibrillaariproteiinin kanssa. Umbraviruksiin kuuluvan maapähkinän ruusukeviruksen (GRV, *Groundnut rosette virus*) ORF3-proteiini sitoutuu fibrillaariproteiiniin, mitä tarvitaan viruksen systeemiseen leviämiseen kasvilla.

Myös PVA:n NIa-proteiini (*nuclear inclusion protein a*) ohjautuu tumaan ja tumajyväsiin, jossa sen on todettu sitoutuvan fibrillaariproteiiniin (Rajamäki ja

Valkonen 2009). N1a-proteiini sijoittuu tumaan- ja tumajyväsiin kahden sekvenssialueen ohjaamana (Taulukko 2).

Taulukko 2. PVA:n VPg-proteiinin tumalokalisatiota ohjaavat sekvenssit ja niiden aminohappo muutokset (keltaisella) VPg(a)- ja VPg(b)-mutanteissa.

	A (ah 4-9)	B (ah 41-50)
VPg (vt)	KRQRQK	KKGKTKGKTH
VPg (a)	AAQAQA	KKGKTKGKTH
VPg (b)	KRQRQK	AAGATAGATH

Lähde: Rajamäki ja Valkonen 2009.

Aikaisemmin TEV:n N1a-proteiinilla on osoitettu olevan tumaan kuljetusta ohjaava sekvenssi, johon tehdyt mutaatiot estivät proteiinin tumaan sijoittumisen (Carrington ym. 1991, Schaad ym. 1996). Rajamäki ja Valkonen (2009) totesivat PVA:n N1a-proteiinilla olevan vastaavanlainen sekvenssi (NLSII), jonka lisäksi VPg-proteiinin aminopäästä paikannettiin toinen tumalokalisatiota ohjaava alue (NLSI).

Mutaatiot NLSI ja NLSII-alueilla johtivat PVA:n taudinaiheuttamiskyvyn voimakkaaseen heikentymiseen. Lisäksi mutaatiot NLS-alueilla estivät VPg:tä toimimasta RNA-hiljennyksenestäjänä, mikä viittaa tuma- ja/tai tumajyvälokalisatiota ohjaavan tarpeellisen VPg:n kyvyille estää RNA-hiljennystä. Fibrillaarigeenin hiljentämisen todettiin vähentävän PVA:n määrää infektioituneessa kasvissa, mutta vuorovaikutuksen yhteyttä hiljennyksen estämiseen ei tiedetä.

2.5 RNA-hiljennyksenestäjien tutkiminen

Voinnet ja Baulcombe (1997) tutkivat RNA-hiljennystä käyttäen UV-valossa fluoresoivaa GFP-proteiinia (*green fluorescent protein*) ilmentävää *Nicotiana benthamiana*-kasvia. Lehtien solukkuun ruiskutettiin liuosta, jonka sisältämät agrobakteerit (*Agrobacterium tumefaciens*) sisälsivät binäärivektorin T-DNA:ssa GFP:tä koodaavan alueen. Kasvisolussa agrobakteerit siirtävät T-DNA-alueen geeneineen tumaan, jossa proteiinit tuotetaan. Ajatuksena oli saada alkuun GFP:n hiljennysreaktio, jonka eteneminen olisi helposti seurattavissa UV-valon avulla. Tutkimus loi pohjan yhdelle käytetyimmälle RNA-hiljennyksen ja sen estäjien tutkimusmenetelmälle, jonka eri variaatioilla pystytään kätevästi tutkimaan esimerkiksi hiljennyksen signalointia (Palauqui ym. 1997).

Johansen ja Carrington (2001) käyttivät vastaavanlaista menetelmää, jossa hiljennys indusoitiin kaksijuosteisella RNA:lla, jonka todettiin olevan tehokas hiljennyksen aloittaja. Tämän lisäksi kasvisolukkaan ruiskutettiin liuosta, jonka sisältämät agrobakteerit oli transformoitu TEV:n HC-pro:ta tuottavilla plasmideilla. Koejärjestelyillä he havaitsivat HC-pro:n estävän fluoresoivan GFP:n hiljennystä. Tämä näkyi UV-valossa vihreänä värinä GFP:n fluoresenssin myötä. Kuten Voinnet'in ja Baulcomben (1997) koejärjestelyssä, GFP:n hiljennys näkyi UV-valossa punaisena klorofyllin fluoresenssista johtuen.

Edellä kuvattu koejärjestely yhdistettynä esimerkiksi reportterigeenin mRNA- ja siRNA-analyysiin on osoittautunut toimivaksi tavaksi tutkia RNA-hiljennyksenestäjiä. Hiljennysreaktio voidaan aloittaa myös *GFP*-geeniä sisältävällä viruksella (*VIGS*, *virus induced gene silencing*) (Voinnet ym. 2000). Tämän lisäksi agrobakteerikäsittelyt GFP:tä ilmentäviin siirtogeenisiin kasveihin voidaan yhdistää erilaisiin varttamismenetelmiin, joiden avulla voidaan tutkia hiljennysreaktion leviämistä ja sen estymistä (Palauqui ym. 1997, Guo ja Ding 2002).

Aina pelkkä agrobakteerikäsittely ei anna tarpeeksi tietoa RNA-hiljennyksenestäjien toimintatavoista. Lu ym. (2004) osoittivat yhdellä viruksella voivan olla useita RNA-hiljennyksenestäjiä, joista osa estää paikallista ja osa systeemistä hiljennystä. Kokeet suoritettiin risteyttämällä GUS-reportterigeenin sisältäviä siirtogeenisiä (β -glukuronidaasi) tupakoita virusgeenejä sisältäneiden siirtogeenisten tupakoiden kanssa. Tällöin myös tutkittavaa RNA-hiljennyksenestäjää transloituu huomattavasti tehokkaammin kuin agrobakteerikäsittelyssä. Tällä menetelmällä todettiin CTV:n p20- ja p23-proteiinien estävän paikallista hiljennysreaktiota, kun taas Guon ja Ding'in (2002) mukaisten varttamiskokeiden avulla todettiin p20- ja CP-proteiinien estävän systeemistä hiljennysreaktiota. CTV:n RNA-hiljennyksenestäjien erilaisten funktioiden on esitetty olevan syynä taudin vakaviin oireisiin (Lu ym. 2004).

2.5.1 Hiivan kaksihybridi-menetelmä (YTHS, *yeast two-hybrid system*)

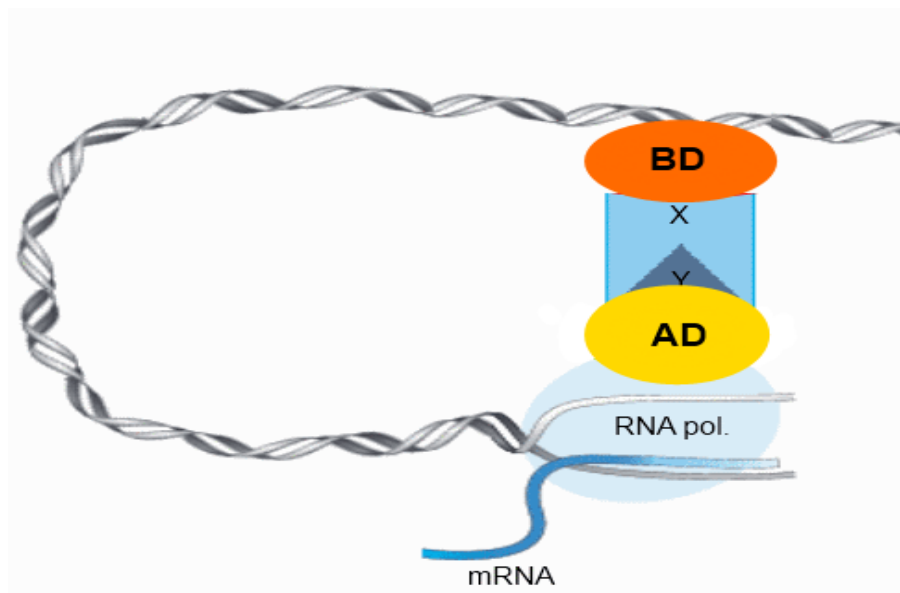
Proteiinien väliset vuorovaikutukset luovat perustan biologisten systeemien toiminnalle, esimerkiksi signalointireiteissä, energia-aineenvaihdunnassa ja puolustusvasteissa. Esimerkiksi RNA-hiljennyksenestäjien ja RNA-hiljennykseen osallistuvien proteiinien vuorovaikutusten tutkiminen on tärkeää hahmotettaessa virusproteiinien vaikutusta RNA-hiljennykseen.

Hiivan kaksihybridi-menetelmä (YTHS) on tehokas ja nopea tapa tutkia proteiinien välisiä vuorovaikutuksia. Alunperin Fieldsin ja Songin (1989) kehittämä menetelmä perustuu toimivan transkriptiotekijän muodostumiseen tutkittavien proteiinien sitoutuessa toisiinsa, mikä mahdollistaa reporterigeenin ilmentymisen (Kuva 2). YTHS on syrjäyttänyt aiemmin käytetyt biokemialliset menetelmät yksinkertaisuutensa ja herkkyytensä ansiosta (Li ja Fields 1993, Luban ja Goff 1995). YTHS:n soveltuvuutta biologian eri aloille kuvaa hyvin se, että tällä hetkellä suurin osa julkaistuista proteiinien välisistä vuorovaikutuksista on löydetty kyseisellä menetelmällä (Brueckner ym. 2009).

GAL4-proteiini on hiivan (*Saccharomyces cerevisiae*) transkriptioaktivaattori, joka aktivoi GAL1- ja GAL10-geenien transkription sitoutuessaan UASg-alueelle (*upstream activation site*). UASg-alue säätelee geenin transkriptiota, vaikka se sijaitsee promoottorialueen ulkopuolella. Sitoutuminen kyseiselle alueelle tunnetaan varsin tarkasti (Giniger ym. 1985), mutta itse transkription aktivoituminen on hämärän peitossa. Brent ja Ptashne (1985) osoittivat GAL4-proteiinin pystyvän myös aktivoimaan transkriptiota, vaikka sen DNA:han sitoutuva alue oli korvattu *E.coli*-bakteerista peräisin olevan transkriptiotekijän vastaavalla rakenteella. Tämän lisäksi Hope ja Struhl (1986) osoittivat DNA:han sitoutuvan alueen toimivan, vaikka transkriptiota aktivoiva alue oli poistettu. Tämän perusteella GAL4-proteiinin todettiin koostuvan kahdesta eri toiminnallisesta alueesta, aminopään DNA:han sitoutuvasta alueesta (BD) ja karboksipäässä sijaitsevasta transkription aktivointialueesta (AD) (Brent ja Ptashne 1985, Keegan ym. 1986).

Näiden tulosten perusteella Fields ja Song (1989) kokeilivat, voisiko GAL4-proteiinin avulla tutkia proteiinien välisiä vuorovaikutuksia. Ajatuksena oli fuusioida

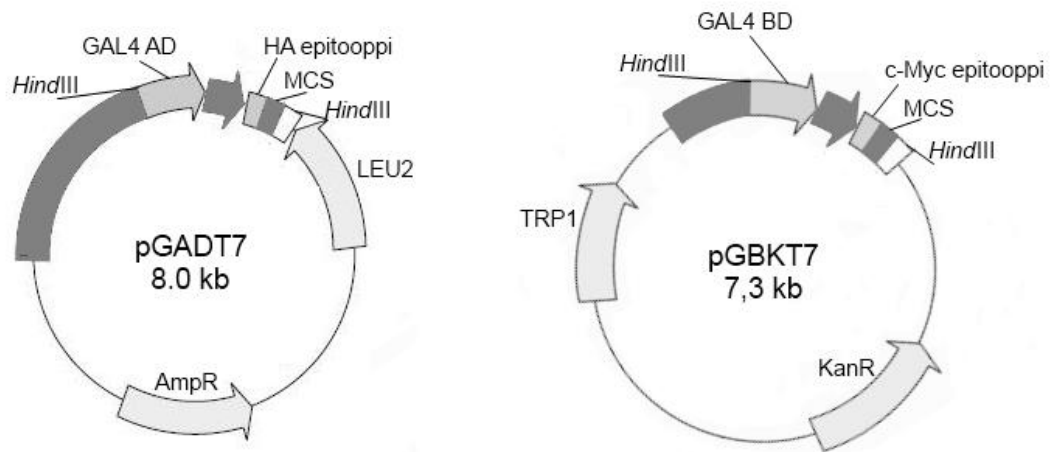
tutkimuksen kohteena olevat proteiinit (X ja Y) GAL4-proteiinin AD- ja BD-alueisiin, jolloin X:n ja Y:n sitoutuessa toisiinsa, muodostuisi toimiva GAL4-proteiini AD- ja BD-alueiden yhdistyessä (Kuva 2). Tällöin toimiva transkriptioaktivaattori aktivoisi reportterigeenin ilmentymisen, jonka perusteella X- ja Y-proteiinien välinen vuorovaikutus voitaisiin todeta. Fields ja Song (1989) osoittivat teoriansa paikkansapitävyyden SNF1- ja SNF4-proteiinien avulla, joiden tiedettiin aikaisemman tutkimuksen perusteella olevan vuorovaikutuksissa keskenään (Celenza ym. 1989). GAL4-proteiinin alueiden yhdistyminen mahdollistaa *lacZ*-reportterigeenin ilmentymisen, joka havaitaan sen entsyymiaktiivisuuden perusteella X-gal-maljoilla.



Kuva 2. GAL4-transkriptiotekijän eri alueet (BD & AD) ovat fuusioituna tutkittaviin proteiineihin (X & Y), joiden interaktio mahdollistaa reportterigeenin transkription aloittamisen (Lähteet: Luban & Goff (1995), sekä Clontech (2010)).

Nykyisin YTHS on vaivattomasti toteutettavissa kaupallisten vektoreiden ja hiivakantojen myötä. Tässä työssä käytettiin Clontech-yrityksen hiivavektoreita (Kuva 3), jotka ovat käyttövalmiita proteiinien välisten vuorovaikutusten testaamiseen heti tutkittavan geenin kloonauksen jälkeen. Tällöin ekspressoituvassa

konstruktissa tutkittavan proteiinin aminopää on fuusioituna GAL4-proteiinin AD- ja BD-alueiden karboksipäähän.



Kuva 3. Hiivan kaksihybridi-menetelmässä käytetyt pGAD- ja pGBK-vektorit. (Lähde: Clontech 2010)

Hiivakanta AH109 mahdollistaa usean eri reportterigeenin käytön, joiden detektio perustuu joko niiden tuottamaan värilliseen entsyymaattiseen reaktioon (*lacZ* ja *MEL1*) tai aminohappobiosynteesin mahdollistamiseen (*HIS3* ja *ADE2*). Tässä työssä käytettiin *HIS3*- ja *ADE2*-geenien ilmentymisen aktivoitumista proteiinien välisten vuorovaikutusten havainnointiin. Kyseiset proteiinituotteet osallistuvat histidiinin ja adeniinin biosynteesiin (Dorfman 1969, Struhl ja Davis 1977). Kun AD- ja BD-vektoreilla transformoituja hiivoja kasvatetaan ravintoalustalla, jolta puuttuu toinen tai molemmat edellä mainituista aminohapoista, kasvavat vain ne hiivakloonit, joiden reportterigeenit ilmentyivät GAL4-transkriptiotekijän säätelemänä. Tämä on mahdollista vain, kun tutkittavien proteiinien vuorovaikutuksen myötä muodostuu toimiva GAL4-transkriptiotekijä.

Vaikka YTHS on varsin herkkä menetelmä, ei sillä pystytä havaitsemaan kaikkia proteiinien välisiä vuorovaikutuksia. Tämä voi johtua tutkittavien proteiinien laskostumisen häiriintymisestä, kun ne tuotetaan liitettynä AD- ja BD-alueisiin. Tällöin tietyn proteiinin saatetaan havaita olevan vuorovaikutuksessa muiden tutkittavien proteiinien kanssa ainoastaan esimerkiksi AD-alueeseen liitettynä (Brueckner ym. 2009). Myös proteiinien sijoittuminen membraaneihin, translaation

jälkeisen modifikaation puuttuminen tai nk. steeriset esteet aiheuttavat vääriä negatiivisia tuloksia. Steeriset esteet johtuvat tutkittaviin proteiineihin liitetystä AD- ja BD-alueista, jotka saattavat estää tutkittavien proteiinien vuorovaikutuksen (Brueckner ym. 2009).

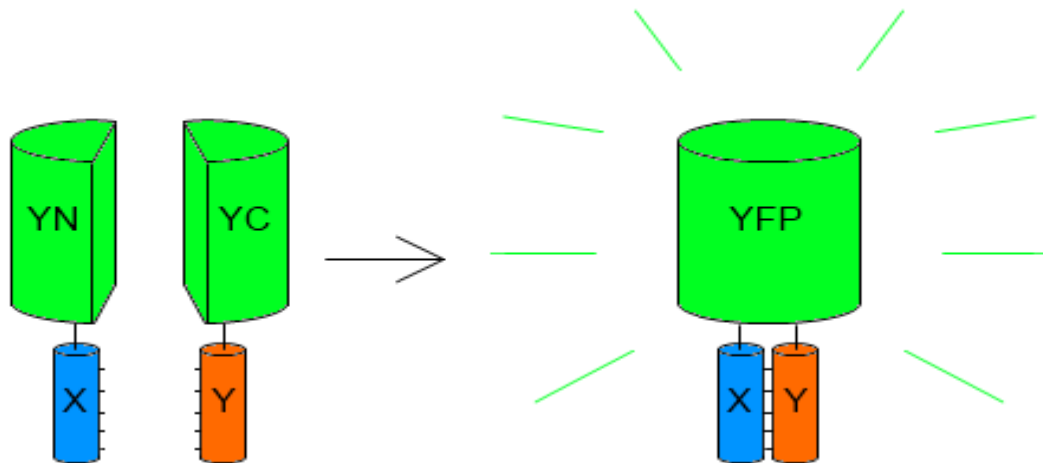
Väriiden negatiivisten tulosten ohella myös väärät positiiviset tulokset aiheuttavat ongelmia YTHS:ssä. Ne voivat johtua useista seikoista, liittyen esimerkiksi transkriptiotekijän eri alueiden toimintaan (Brueckner ym. 2009, Serebriiskii ym. 2000). Esimerkiksi AD-alueen sitoutuminen promoottorialueille saattaa johtaa transkription aktivoitumiseen (Luban ja Goff 1995). Tämän lisäksi joidenkin proteiinien voidaan havaita olevan vuorovaikutuksessa, vaikka sitä ei proteiinien normaaleissa olosuhteissa tapahtuisikaan. Tämä voi johtua proteiinien esiintymisestä eri solukoissa tai niiden erilaisesta ekspressoitumisajankohdasta, jolloin proteiinien välinen vuorovaikutus voidaan havaita vaikka sitä ei biologisissa systeemeissä tapahtuisikaan (Brueckner ym. 2009). Myös hiivan oman aineenvaihdunnan on osoitettu aiheuttavan vääriä positiivisia tuloksia lisäämällä reportterigeenien aktiivisuutta (Serebriiskii ym. 2000).

2.5.2 Kahden molekyylin välinen fluoresenssi komplementaatio (BiFC, *bimolecular fluorescence complementation*)

BiFC-menetelmä perustuu fluoresoivan proteiinin muodostumiseen tutkittavien proteiinien sitoutuessa toisiinsa (Kuva 4). Tämä entsyymikomplementaatioon perustuvan menetelmän kehitys sai alkunsa Richardsin (1958) havainnosta proteiinin funktion palautumisesta sen eri fragmenttien yhdistyessä. Johnsson ja Varshavsky (1994) yhdistivät ilmiön onnistuneesti proteiinien välisten vuorovaikutusten tutkimiseen, josta BiFC-menetelmä kehittyi fluoresoivien reportterigeenien käyttöönoton myötä (Nagai ym. 2001, Hu ym. 2002).

Tässä työssä käytettiin menetelmää joka perustuu YFP-proteiinin (*yellow fluorescent protein*) käyttöön reportterina (Hu ym. 2002, Hu ja Kerppola 2003). Tutkittavat geenit kloonataan fuusiona joko YFP-geenin 5'-päähän (YN) tai 3'-päähän (YC) kanssa. Plasmidit transformoidaan *A. tumefaciens*-soluihin, joita sisältävää kasvatusliuosta ruiskutetaan kasvin lehtiin. Ruiskutettava liuos valmistetaan yhdistämällä kaksi

agrobakteerisolukasvatusta, jotka sisältävät tutkittavan geeniparin omilla vektoreissaan. Käsittelyn jälkeen geenikonstruktit ilmentyivät kasvisolukossa binäärivektorin T-DNA:sta. Jos tutkittavat proteiinit ovat vuorovaikutuksessa, muodostuu YFP-proteiinin fluoresoimattomista fragmenteista UV-valossa fluoresoiva YFP-proteiini (Kuva 4).



Kuva 4. Tutkittavien proteiinien (X ja Y) muodostaessa vuorovaikutuksen muodostuu UV-valossa fluoresoiva YFP-proteiini sen kahdesta eri alueesta (YN ja YC). (Lähde: Kerppola 2006).

BiFC-menetelmän suurimpana etuna YTHS:ään nähden voidaan pitää sen toteuttamista kasvisolukossa, jolloin voidaan tutkia proteiinien välisiä vuorovaikutuksia niiden luonnollisessa ympäristössä. Menetelmä mahdollistaa vuorovaikutusten havainnoinnin kasvisolussa, jolloin saadaan tietoa myös vuorovaikutusten sijainnista soluissa (Hu ym. 2002). Taustafluoresenssin määrää voidaan tehokkaasti hallita käytettäessä tunnettua reportterigeeniä, jolloin proteiinivuorovaikutukset näkyvät selkeästi (Kerppola 2006, Kerppola 2008). Suoran havainnoinnin myötä voidaan välttää tehokkaasti vääriä positiivisia tuloksia, eikä esimerkiksi entsyymisubstraattien käyttö tai solujen kemiallinen käsittely haittaa tulosten tulkintaa (Kerppola 2008).

Myös BiFC-menetelmässä tutkittavien proteiinien vääränlainen laskostuminen sekä steeriset esteet aiheuttavat vääriä negatiivisia tuloksia. Myös vääriä positiivisia

tuloksia voidaan saada fluoresoivan proteiinin muodostuessa YN- ja YC-alueiden itsenäisen vuorovaikutuksen myötä, johon tutkittavilla proteiineilla ei ole vaikutusta (Kerppola 2006). Tämän lisäksi ongelmia aiheuttaa YN- ja YC-alueiden toisiinsa sitoutumisen pysyvyys. Tällöin proteiinivuorovaikutuksen myötä tutkittavat proteiinit on sidottu pysyvästi fluoresoivaan proteiiniin, mikä saattaa estää muiden proteiinivuorovaikutusten kehittymistä (Kerppola 2006).

3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tämän työn tarkoituksena oli määrittää proteiinien välisiä vuorovaikutuksia RNA-hiljennystä ylläpitävien kasviproteiinien sekä crini- ja potyvirusen RNA-hiljennyksenestäjien välillä. Potyvirusista työssä tutkittiin PVA:n ja PVY:n HC-pro ja VPg-proteiineja, ja criniviruksista SPCSV:n p22- ja RNase3-proteiineja. Kasviproteiineista tutkimukseen valittiin AGO1- ja AGO2-proteiinit, koska niiden ja RNA-hiljennyksenestäjien välillä on raportoitu useita proteiinivuorovaikutuksia. RDR6- ja SGS3-proteiinit valittiin tutkimuksiin, koska kyseiset proteiinit osallistuvat kaksijuosteisen RNA:n tuottamiseen, mikä vaikuttaa tärkeältä vaiheelta VPg- ja RNase3-proteiinien toiminnassa. Lisäksi tutkimusryhmän vielä julkaisemattomat tulokset osoittavat RNase3- ja RDR6-proteiinien sijoittuvan kasvisolussa samaan paikkaan. Vuorovaikutuksia tutkittiin BiFC-menetelmällä ja YTHS:llä.

4 AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 Geenien kloonaus hiivavektoreihin

Lituruohon (*Arabidopsis thaliana* L.) geenit *AGO1*, *AGO2*, *RDR6* ja *SGS3*, sekä perunan Y-viruksen VPg-proteiinia koodaava alue kloonattiin pGAD- ja pGBK-hiivavektoreihin (Kuva 4). Myös SPCSV:n RNase3-Ala-mutanttia koodaava alue kloonattiin molempiin hiivavektoreihin, sekä RNase3-proteiinia koodaava alue pGBK-hiivavektoriin. Muut YTHS:llä tutkitut geenit olivat valmiiksi kloonattuina.

4.1.1 Kloonattavan geenin monistus polymeraasiketjureaktion (PCR) avulla

Kunkin geenin kloonaukseen aloitettiin PCR:llä (Taulukko 3 ja 4), jolla geeniä monistettiin ligaatioreaktioita varten. PCR-reaktiot suoritettiin Mastercycler® -laitteella (Eppendorf, Hampuri, GER) käyttäen Phusion DNA-polymeraasia (Finnzymes) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Reaktioissa käytettyihin alukkeisiin (Taulukko 5) oli lisätty restriktioentsyymien tunnustuskohdat, jotka mahdollistivat PCR-tuotteen liittämisen hiivavektoreiden MCS-alueille (*multiple cloning site*).

Taulukko 3. PCR-reaktioissa käytetyt reagenssit ja niiden tilavuudet.

	Tilavuus (μl)
H ₂ O	35,5
5XPhusion buffer*	10
dNTPs (10mM)	1
F-aluke (20 pmol/μl)	1
R-aluke (20 pmol/μl)	1
Templaatti (50 ng)	1
Polymeraasi (2 u/μl)	0,5
	Yhteensä 50

*7,5mM MgCl₂ (loppukonsentraatio reaktioseoksessa 1,5mM)

Taulukko 4. PCR-reaktioissa käytetty ohjelma.

	Lämpötila (°C)	Aika
Alkudenaturaatio	98	30s
Denaturaatio	98	10s
Pariutuminen	*	15s
Ekstensio	72	**
Loppuekstensio	72	10 min
		Yhteensä 30 sykliä

*Alukkeiden pariutumislämpötilana käytettiin jokaisessa PCR:ssä käytetyn alukeparin alemmaa T_m-arvoa (alin lämpötila jossa aluke sitoutuu templaattiin) (Taulukossa 3).

**Ekstensioajaksi laskettiin 25s jokaista 1000 emäsparia kohden.

Alukkeet oli suunniteltu siten, että geenin oikea lukuraami säilyi vektoreissa.

Templaatteina käytettiin TAIR-Arabidopsis-keskuksesta tilattuja plasmideja, paitsi *RDR6*-geenin osalta, jonka sisältävä plasmidi saatiin Japanista (Kumakura ym. 2009). PCR:ien onnistuminen testattiin erottelemalla PCR-tuotteet niiden koon

perusteella geelissä sähkökentän avulla. Ajo suoritettiin 1%:ssa agarosigeelissä 1 x TAE-puskurissa (40 mM Tris-asetatti, 1 mM EDTA), joka sisälsi 0,4 µg/ml etidiumbromidia (EtBr). Etidiumbromidi sitoutuu DNA:han ja absorboi UV-valoa, jolloin DNA-fragmentit voidaan nähdä UV-valossa. Kaivoihin ladattiin 4 µl PCR-seosta, 6 µl MQ-vettä (filtterisuodatettu ja deionisoitu) ja 2 µl 6x latausväriä (6x latausväri sisältää tilavuudeltaan kuusinkertaisen määrän reagensseja valmiiseen näytteeseen verrattuna). Geelejä ajettiin 30 minuutin ajan (80 V), minkä jälkeen ne kuvattiin UV-valossa Gel Doc XR+-laitteella (Biorad, CA, USA). DNA-fragmentteja verrattiin kooltaan tunnettuja fragmentteja sisältävään Generuler DNA ladder mix-kontrolliin (Fermentas), jotta voitiin varmistaa reaktioiden sisältävän pelkästään halutun kokoista PCR-tuotetta. Tämän jälkeen monistettu DNA puhdistettiin käyttäen E.Z.N.A.® Gel extraction kit-reagenssien avulla (Omega Bio-Tek) valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Puhdistetut PCR-tuotteet digestoitiin entsyymeillä, joiden tunnistamia digestiokohtia vastaavat sekvenssit lisättiin PCR:issä käytettyihin alukkeisiin (Taulukko 5). Tämän lisäksi alukkeiden 5'-päihin lisättiin kahdesta kolmeen emästä pariutumisen tehostamiseksi. Hiivavektorit (pGAD & pGBK) digestoitiin samoilla entsyymeillä. Poikkeuksen muodostivat *SalI*-kohdan puuttuminen pGAD-vektorista ja *XhoI*-kohdan puuttuminen pGBK-vektorista. *SalI* ja *XhoI* tuottavat keskenään yhteensopivat leikkaustuotteet, jolloin *XhoI*:llä digestoitu tuote voidaan liittää *SalI*:llä digestoituun tuotteeseen. Esimerkiksi *SGS3*:n PCR-tuote digestoitiin *BamHI*- ja *SalI*-entsyymeillä, pGBK-vektori samoilla entsyymeillä, ja pGAD-vektori *BamHI*- ja *XhoI*-entsyymeillä.

Vektoreiden digestiot (37°C, 2t) suoritettiin 20 µl:n lopputilavuudessa ja PCR-tuotteiden 50 µl:n lopputilavuudessa. Reaktioissa käytettiin New England Biolabs-entsyymeitä ja vastaavia puskureita valmistajan ohjeiden mukaisesti. Tämän jälkeen vektoridigestioille suoritettiin CIP-käsittely, eli DNA-molekyylien 5'-päiden defosforylointi. Tämä tehtiin pipetoimalla 1 µl Calf intestine alkaline-fosfataasia (Fermentas) digestioreaktioihin, minkä jälkeen reaktioita pidettiin 30 minuuttia 37°C:ssa. CIP-käsittelyllä voidaan ehkäistä vektorin päiden toisiinsa liittymistä, mikä lisää kloonattavan DNA-fragmentin todennäköisyyttä liittyä vektoriin. CIP-käsittelyn

jälkeen entsyymit inaktivoitiin (65°C, 15min), ja DNA puhdistettiin kuten PCR-reaktioista.

Taulukko 5. Hiiwan kaksihybridikloonauksien PCR-reaktioissa käytetyt alukkeet, joiden sisältämät restriktioentsyymien tunnistuskohdat alleviivattu sekvenssissä.

Geeni	Alukkeen nimi	Sekvenssi	Tm (°C)
AGO1 (3153 ep)	<i>Xma</i> I-F	5'-ggcccgggtATGGTGAGAAAGAGA-3'	69,5
	<i>Xho</i> I-R	5'-ggctcgagGCAGTAGAACATGACA-3'	69,5
AGO2 (1623 ep)	<i>Bam</i> HI-F	5'-aatggatccatATGGAATTCTGTGACT-3'	64
	<i>Sal</i> I-R	5'-attgctgactcaGACGAAGAACATAAC-3'	64,2
RDR6 (3591 ep)	<i>Eco</i> RI-F	5'-aatgaattcATGGGGTCAGAGGGA-3'	64
	<i>Xho</i> I-R	5'-ccctcgagGAGACGCTGAGCAAGA-3'	69,5
SGS3 (1878 ep)	<i>Bam</i> HI-F	5'-ttggatccatATGAGTTCTAGGGC-3'	66,7
	<i>Sal</i> I-R	5'-ttgctgactcaATCATCTTCATG-3'	60,1
PVY-VPg (564 ep)	<i>Bam</i> HI-F	5'-aatggatccatATGGGAAGAACAATCCAAAAG-3'	72,6
	<i>Sal</i> I-R	5'-attgctgacttatTCATGCTCCACTTCCTG-3'	68,4
RNase3 (693 bp)	<i>Bam</i> HI-F	5'-ttggatccTGATGGTTCCGATTTATTCCGACG-3'	68,2
	<i>Xho</i> I-R	5'-ccctcgagCTAACTCAGATTTAGAGCTTTCAAC-3'	75,4

4.1.2 Ligaatio ja transformaatio

Ligaatioita varten digestoitujen vektori- ja insertituotteiden konsentraatiot määritettiin Gene Quant 1300-spektrofotometrillä (GE Healthcare, SWE). Kuhunkin ligaatioreaktioon käytettiin 50 ng:aa vektoria. Insertin moolimäärä laskettiin kolminkertaiseksi vektoriin nähden seuraavan kaavan mukaisesti;

$$\text{insertin määrä} = \frac{3 \times 50 \text{ ng} \times \text{insertin koko (emäsparia)}}{\text{vektorin koko (emäsparia)}} \quad (1)$$

Ligaatioreaktiot (4°C, 18t) suoritettiin 10 µl:n lopputilavuudessa käyttäen T4 DNA-ligaasia (Promega). Ligaatiotuote transformoitiin kompetentteihin *Escherichia coli* DH5α-soluihin pipetoimalla 5 µl:aa ligaatiotuotetta 50 µl:aan kompetentteja bakteerisoluja, jonka jälkeen soluja pidettiin 30 minuuttia jäällä. Tämän jälkeen

soluille annettiin lämpöshokki (42°C, 1,5min), jonka jälkeen reaktiot siirrettiin jäälle. Lämpöshokki altistaa solut ottamaan DNA:ta soluseiniensä läpi.

Lopuksi näytteisiin lisättiin 600 µl:aa Luria broth (LB)-kasvatusliuosta, ja niitä kasvatettiin tunnin ajan 37 °C:ssa ravistelussa. Tämä tehtiin plasmidissa olevan antibioottiresistenssigeenin ilmentymiseksi ennen maljausta antibioottimaljoille. Kasvatuksen jälkeen näytteet sentrifugoitiin (2000g, 2 min) ja niistä poistettiin n. 350 µl:aa supernatanttia pipetoimalla. Solupelletti liuotettiin putkeen jääneeseen n. 300 µl:aan, joka käytettiin maljaukseen. Tämä tehtiin koska koko kasvatusliuoksen (n.650 µl) kuivuminen maljalla olisi kestänyt liian kauan.

pGAD-vektori transformaatiot maljattiin ampicilliinimaljoille (150 µg/ml), ja pGBK-vektori transformaatiot maljattiin kanamysiinimaljoille (25 µg/ml). Tämä perustui vektoreiden (Kuva 3) sisältämiin resistenssigeeneihin kyseisiä antibiootteja kohtaan, jolloin ainoastaan sellaiset kloonit kasvoivat maljoilla, jotka sisälsivät kyseisen plasmidin. Maljoja kasvatettiin yön yli 37°C:ssa.

4.1.3 Pesäke PCR, tarkistusdigestio ja TENSprep

Pesäke-PCR:n avulla voidaan löytää transformaatiomaljoilta sellaiset bakteerikloonit, jotka sisältävät insertin liittyneenä vektoriin. Näiden kloonien lisäksi maljat sisältävät usein nk. vektoritaustaa, joka voi johtua joko vektorin päiden ligoitumisesta takaisin huonon CIP-käsittelyn takia, tai vektorin epätäydellisestä linearisoitumisesta. Menetelmä perustuu bakteeripesäkkeiden käyttöön ”templaattina”, jotka poimitaan esim. hammastikulla yön yli kasvatetuilta transformaatiomaljoilta. Jotta löydetty positiivinen klooni olisi myöhemmin helposti jäljitettävissä, siirretään bakteerimassaa uudelle maljalle ennen kuin loput solumassasta liuotetaan PCR-reaktioon. Alukkeet suunnitellaan siten, että ne voivat monistaa koko insertin sen ollessa tarpeeksi lyhyt (esim. VPg), tai pitkien inserttien tapauksessa siitä monistetaan vain osa (esim. RDR6). Jos klooni sisältää insertin, monistuu alukkeiden rajaama DNA-jakso, jonka oikea koko on helppo todeta geeliajossa.

Pesäke-PCR:ssä (Taulukko 6 ja 7) käytettiin Dynazyme®-polymeraasia (Finnzymes) valmistajan ohjeiden mukaisesti. AGO2:n ja VPg:n kohdalla käytettiin samoja

alukkeita kuin PCR-reaktiossa ennen ligaatioita. Vastaavia reverse-alukkeita käytettiin myös AGO1:n, SGS3:n ja RDR6:n kohdalla, mutta johtuen inserttien suuresta koosta, valittiin forward-alukkeet (Taulukko 8), jotka pariutuivat keskenmälle inserttiä. Tämä tehtiin, koska pesäke-PCR:llä pyritään vain detektoimaan insertti, jolloin sitä ei tarvitse monistaa kokonaan. Tällöin on myös todennäköisempää, että itse PCR-reaktio toimii paremmin. PCR-ohjelman jälkeen reaktioputkiin lisättiin 5 µl:aa kuusinkertaista latausväriä, ja näytteet ajettiin geelissä ja kuvattiin kuten PCR-reaktiot ennen ligaatioita.

Vaihtoehtoisena menetelmänä insertillisten kloonien löytämiseen käytettiin TENS prep-plasmidien eristystä (Zhou ym. 1990) yhdistettynä tarkistusdigestioon. Käytännössä tämä tarkoittaa pesäke-PCR:n sivuuttamista, jolloin siirrytään suoraan eristämään plasmidit kasvatetuista soluista ja tekemään niille tarkistusdigestio. TENS prep on halvempi menetelmä verrattuna Genelute HP plasmid miniprep kit-pakkauksen käyttöön (Sigma Aldrich). Molemmat menetelmät perustuvat kerättyjen solujen alkaliseen hajotukseen, ja sitä seuraavaan neutralisointiin. Erona Genelute-

Taulukko 6. Pesäke-PCR:issa käytetyt reagenssit ja niiden tilavuudet.

	Tilavuus (µl)
H ₂ O	20,5
10X Buffer*	2,5
dNTPs (10mM)	0,5
F-aluke (20 pmol/µl)	0,5
R-aluke (20 pmol/µl)	0,5
Templaatti	-
DyNazyme	<u>0,5</u>
	Yhteensä 25

* Lopullinen reaktiokonsentraatio: 10mM Tris-HCl (pH 8.8, 25°C), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ ja 0,1 % Triton X-100

menetelmään TENS prep -menetelmässä ei käytetä pylväitä, vaan plasmidit saostetaan ja pestään etanolin avulla. Menetelmän etuna on sen luotettavuus verrattuna pesäke-PCR:ään.

Taulukko 7. Pesäke-PCR:issa käytetty ohjelma.

	Lämpötila (°C)	Aika
Alkudenaturaatio	94	5 min
Denaturaatio	94	30s
Pariutuminen	*	30s
Ekstensio	72	**
Loppuekstensio	72	5 min
Yhteensä 35 sykliä		

*Alukkeiden paritumislämpötilana käytettiin jokaisessa PCR:ssä käytetyn alukeparin alemmaa T_m-arvoa (alin lämpötila jossa aluke sitoutuu templaattiin) (Taulukossa 3).

**Ekstensioajaksi laskettiin 40s jokaista 1000 emäsparia kohden.

TENS prep-menetelmällä eristetyt plasmidit sisältävät erilaisia epäpuhtauksia, minkä vuoksi ne eivät sovellu sekvensointiin. Tämän vuoksi positiivisia tuloksia antaneita kloonereita pitää kasvattaa uudelleen ja eristää plasmidit kuten pesäke-PCR:n tapauksessa. TENS prep-menetelmän avulla pystyttiin toteamaan AGO2-insertin sisältävä pGAD-vektori, jota ei pystytty löytämään pesäke-PCR:n avulla useista kloonauksyrityksistä huolimatta.

Taulukko 8. Pesäke-PCR:issä ja sekvensoimisreaktioissa käytetyt alukkeet.

Alukkeen nimi	Sekvenssi	T _m (°C)
AGO1-F651	5'- GGAAGTTACATCAAGGGGTG-3'	57,3
AGO1-F1801	5'- GGTGGAACGGTGAATAATTG-3'	55,3
AGO2-F552	5'- TAGATGAAGCTTCTCGTAGG-3'	55,3
RDR6-F654	5'- GCAGCTGGCTTCTTCA-3'	51,8
RDR6-F1202	5'- CGGGATATTTCTCGACC-3'	54,7
RDR6-F1855	5'- GCAGGTTTCAAAGGGGTT-3'	53,7
NYFP-R	5'- CCATGATATAGACGTTGTGG-3'	55,3
CYFP-R	5'- CTTGTACAGCTCGTCCATGG-3'	59,4
CYFP-F	5'- ATGGGCGACAAGGAGAAGAA-3'	53,3
NYFP-F	5'- ATGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'	61,4

4.1.4 Plasmidien eristys ja sekvensointi

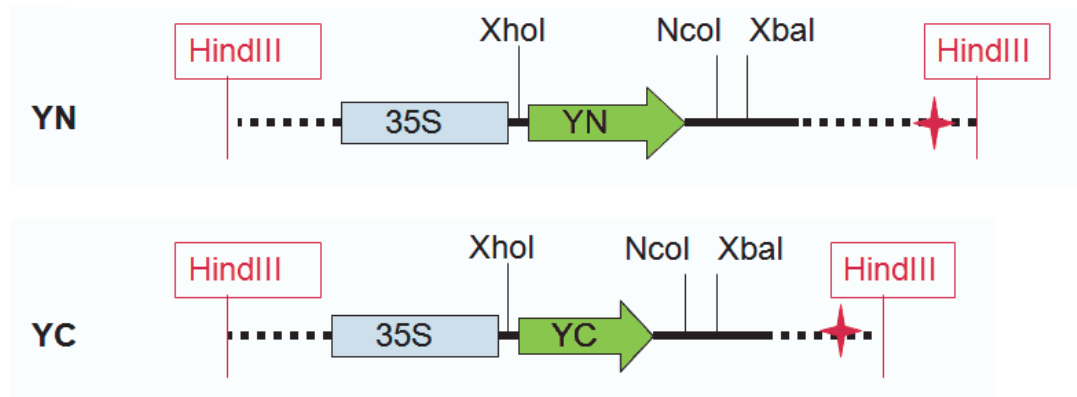
Positiivisia tuloksia antaneet kloonit kasvatettiin yön yli 5 ml:ssa Luria broth-liuosta, joka sisälsi selektoivana antibioottina joko ampicilliinia (150 µg/ml) tai kanamysiiniä (25 µg/ml) vektorin mukaisesti. Seuraavana päivänä solut kerättiin, hajotettiin ja plasmidit eristettiin Genelute HP plasmid miniprep kit-pakkauksen (Sigma Aldrich) ohjeiden mukaisesti.

Eristetyille plasmideille suoritettiin tarkistusdigestio, jonka avulla varmistettiin pesäke-PCR:stä saadut positiiviset tulokset. Tämä perustuu sellaisten restriktioentsyymien käyttöön, joiden tarkka tunnistuskohta insertissä tai vektorissa tiedetään. Tällöin digestoituvan fragmentin koko on laskettavissa, ja se pystytään detektoimaan UV-valon avulla agarosigeelilta. pGBK-vektoriin kloonatut VPg- ja AGO2-insertit digestoitettiin *Bam*HI- ja *Sal*I-entsyymeillä, ja kyseisten inserttien pGAD-kloonaukset tarkistettiin *Bam*HI- ja *Pst*I-entsyymidigestiolla. Molemmat SGS3-kloonaukset digestoitettiin käyttäen *Bam*HI- ja *Pst*I-entsyymeitä, ja vastaavasti molemmat AGO1-kloonaukset tarkistettiin *Xma*I- ja *Pst*I-entsyymeillä. RDR6:n pGAD-kloonaukset digestoitettiin käyttäen *Eco*RI- ja *Xho*I-entsyymeitä, ja pGBK-kloonaukset digestoitettiin *Eco*RI ja *Pst*I-entsyymeillä. Positiivisia tuloksia antaneet kloonit lähetettiin sekvensoitavaksi Haartman-instituuttiin (Helsinki, Suomi) kloonien oikeanlaisen lukuraamin ja sekvenssin varmistamiseksi. Sekvenssit linjattiin vertailusekvenssin kanssa Multalin-ohjelmalla (Corpet 1988).

4.2 Geenien kloonaukset BiFC-kokeissa käytettyihin pLH-vektoreihin

SGS3-, RDR6-, AGO1 ja RNase3-geenit kloonattiin BiFC-kokeita varten fuusiona YFP:n amino- (YN) ja karboksipään (YC) puolikkaan kanssa pLH-vektoreihin. Koska tutkittavat geenit voidaan kloonata YN:n ja YC:n amino- tai karboksipäähän, saadaan jokaisesta geenistä yhteensä neljä erilaista konstruktia. Tutkimalla kahden proteiinin vuorovaikutusta, saadaan siten yhteensä maksimissaan kahdeksan erilaista konstruktijohdistelmää. SGS3 ja AGO1 kloonattiin sekä YC- ja YN-sekvenssien 5' puoleiseen päähän (*Xho*I) ja 3' puoleiseen päähän (*Nco*I) (Kuva 5). RDR6 kloonattiin

ainoastaan YC- ja YN-sekvenssien 5' puoleiseen päähän, koska RDR6 sisältää *NcoI*-digestiokohdan, eikä kyseiselle entsyymille löytynyt analogisia päitä leikkaavaa entsyymiä, joka ei digestoisi RDR6:sta. RNase3 kloonattiin ainoastaan YC- ja YN-sekvenssien 3' puoleiseen päähän, koska kyseisen proteiinin tiedetään toimivan karboksipään fuusiona (Weinheimer, Haikonen, Rajamäki; Julkaisematon tieto).



Kuva 5. BiFC-koejärjestelyissä käytettyjen YN- ja YC-fragmenttien sisältävien ekspressiokasettien promoottorit ja digestiokohdat. Lähde: Tuuli Haikonen

BiFC-kloonaukset tehtiin samojen periaatteitten mukaisesti kuin YTHS-kloonaukset. Suurimpana erona oli käytettyjen plasmidien digestiokohdat, sillä hiivavektoreista löytyvän usean restriktioentsyymien tunnistavan MCS-alueen sijaan pLH-vektoreista löytyy ainoastaan kaksi digestiokohtaa, ennen (*XhoI*) ja jälkeen (*NcoI*) YC- ja YN-sekvenssien. Tämän mukaisesti PCR:ssä käytetyt alukkeet sisälsivät tunnistuskohdat kyseisille entsyymeille (Taulukko 9). Koska SGS3 sisältää tunnistuskohdan *NcoI*-entsyymille, käytettiin kyseisissä alukkeissa *PciI*-kohtaa, joka leikkaa analogiset päät *NcoI*-entsyymien kanssa. Koska inserttien molemmat päät olivat digestoitu samalla entsyymillä, pystyi insertti ligoitumaan vektoriin kummin päin tahansa.

PCR-reaktiot, digestiot ja näiden reaktioiden puhdistukset sekä ligaatiot ja transformaatio tehtiin samojen periaatteitten mukaisesti kuin YTHS-kloonauksissa. Koska kuitenkin pLH-vektori sisältää resistenssigeenin spektinomysiiniä kohtaan, maljattiin transformoidut solut kyseistä antibioottia sisältäville maljoille (100 µg/ml).

Pesäke-PCR:ssä reverse-alukkeeksi valittiin vektoriin eikä inserttiin sitoutuva aluke, jolloin ainoastaan klooneista, joiden insertti oli oikeassa orientaatiossa, monistui tuote.

Taulukko 9. pLH-vektoreihin kloonatut geenit ja kloonauksessa käytetyt alukesekvenssit.

Geeni	Alukkeen nimi*	Sekvenssi	T _m (°C)
RDR6 (3591 ep)	<i>Xho</i> I-F	5'- attctc <u>gag</u> ATGGGGTCAGAGGGA-3'	66,8
	<i>Xho</i> I-R	5'- attctc <u>gagtgc</u> GAGACGCTGAGC-3'	69,5
SGS3 (1878 ep)	<i>Xho</i> I-F	5'- aatctc <u>gag</u> ATGAGTTCTAGGGCT-3'	66,6
	<i>Xho</i> I-R	5'- attctc <u>gagtgc</u> ATCATCTTCATTTGTG-3'	65,5
SGS3 (1878 ep)	<i>Pci</i> I-F	5'- ttaac <u>atg</u> tgcATGAGTTCTAGGGCT-3'	66,9
	<i>Pci</i> I-R	5'- ttaac <u>atg</u> ttcaATCATCTTCATT-3'	57,4
AGO1 (3153ep)	<i>Xho</i> I-F	5'- ggctc <u>gaga</u> ATGGTGAGAAAGAGA-3'	65,5
	<i>Xho</i> I-R	5'- ggctg <u>gagg</u> GCAGTAGAACATGACA-3'	69,5
AGO1 (3153ep)	<i>Pci</i> I-F	5'- ggacat <u>gtg</u> caaATGGTGAGAAAGAGA-3'	68,5
	<i>Pci</i> I-R	5'- ggacat <u>gtt</u> caGCAGTAGAACATGACA-3'	65,5
RNase3 (693 ep)	<i>Nco</i> I-F	5'- ttaccat <u>ggc</u> aatgATCCTGATGGTT-3'	69,5
	<i>Nco</i> I-R	5'- ttaccat <u>ggc</u> CTAACTCAGATTTAGAGC-3'	67,1

* PCR-reaktioihin käytetyt alukkeet nimettiin sen mukaan, minkä restriktiokohdan ne sisälsivät (alleviivattu sekvenssissä).

TENS prep-menetelmää käytettiin yhdessä digestioreaktion kanssa detektoimaan vaikeasti kloonattavia konstruktia. Pesäke-PCR:llä ei pystytty havaitsemaan pLH-SGS3-YN-kloonin, joka detektoitiin vain TENS prep-menetelmällä.

Positiivisia tuloksia antaneita pesäkkeitä kasvatettiin yön yli 5 ml:ssa luria broth-liuosta, joka sisälsi selektoivana antibioottina spektinomysiiniä (100 µg/ml).

Plasmidit eristettiin Genelute HP plasmid miniprep kit-pakkauksen (Sigma Aldrich) ohjeiden mukaisesti. Kloonien tarkistusdigestioissa käytettiin *Hind*III:sta, joka irrottaa plasmideista insertin sijasta koko ekspressiokasetin (35S-insertti-YC/YN).

Positiivisia tuloksia antaneet kloonit tarkistettiin edelleen sekvensoimalla.

4.3 Hiivan kaksihybridi-menetelmä

YTHS suoritettiin kotransformoimalla pGAD- ja pGBK-vektorit samanaikaisesti hiivasoluihin. Jokainen tutkituista proteiinivuorovaikutuksista testattiin kaksi kertaa niin, että jokainen geeni testattiin sekä pGAD-, että pGBK-vektoreissa. Tämä tehtiin, koska transloituneessa proteiinikompleksissa saattaa ilmetä steerisiä esteitä, jolloin tietyn proteiinin havaitaan olevan vuorovaikutuksessa vain tietyistä hiivavektorista ilmentyneenä (Brueckner ym. 2009). Kuitenkin VPg-proteiineja koodaavia genejä testattiin ainoastaan pGAD-vektorissa, koska vuorovaikutusta on pystytty havaitsemaan aikaisemmin vain pGAD-VPg-konstruktia käyttämällä (Rajamäki & Valkonen). Tämän lisäksi jokainen tutkituista proteiinivuorovaikutuksista testattiin vähintään kaksi kertaa.

4.3.1 Kompetenttien hiivasolujen valmistus

YTHS:ää varten suoritettu kompetenttien solujen valmistaminen ja niiden transformaatio suoritettiin mukailien Clontech-yrityksen (2010) ohjetta litium-asettaatti-välitteisestä (LiAc) transformaatiosta, joka pohjautuu usean tutkimusryhmän työhön (Ito ym. 1983, Schiestl ja Gietz 1989, Hill ym. 1991, Gietz ym. 1992). Hiivoja kasvatettiin 30°C:ssa, ja liuoskasvatuksia 28°C:ssa ravistelussa (200 rpm).

YTHS aloitettiin valmistamalla kompetentteja *S. cerevisiae*-hiivan soluja. Tätä varten AH109-hiivakantaa sisältävältä maljalta otettiin yhden suuren hiivapesäkkeen verran kasvustoa, jota kasvatettiin 20 ml:ssa YPDA-liuosta (Taulukko 10) 16 tunnin ajan. Kasvatusliuoksesta pipetoitiin 2 ml:aa uuteen erlenmeyer-astiaan, joka sisälsi 300 ml:aa YPDA-liuosta. Liuosta kasvatettiin kuten edellä noin kolmen tunnin ajan, kunnes OD₆₀₀-arvo saavutti arvon 0,4. OD₆₀₀-arvo tarkoittaa näytteen optista tiheyttä mitattaessa 600 nanometrin aallonpituudella. Kun kyseinen arvo asettuu 0,4-0,6 välille, on kasvatusliuoksessa oleva hiiva logaritmisessa kasvuvaiheessa, jolloin transformaatiotehokkuus nousee. Solut kasvatettiin kahdessa vaiheessa, sillä jos maljalta otettua hiivamassaa olisi kasvatettu suoraan 300 ml:ssa YPDA-liuosta, olisi oikean OD₆₀₀-arvon saavuttaminen kestänyt kauan ja työn suunnittelu vaikeutunut.

Taulukko 10. YPDA-kasvatusliuos (1L) AH109-hiivakannalle*.

Hiiva erite	10g
Peptoni	20g
Glukoosi	20g
Adeniini hemisulfaatti	100mg
MQ	1000ml

Kun oikea OD₆₀₀-arvo oli saavutettu, hiivasolut kerättiin sentrifugoimalla (1000g, 5 min, 20 °C), ja solupelletti liuotettiin 50 ml:aan MQ-vettä. Tämän jälkeen solut sentrifugoitiin kuten edellä, ja solupelletti liuotettiin 1,7 ml:aan TE/LiAc-puskuriliuosta (Taulukko 11), jonka jälkeen solut olivat valmiita transformaatioita varten.

Taulukko 11. Hiivan kaksihybridi-menetelmässä kompetenttien solujen valmistukseen käytetyt liuokset ja yhdisteet.

	TE/LiAc (2ml)	PEG/LiAc (10ml)
10X TE*	0,2ml	1ml
10X LiAc**	0,2ml	1ml
50% PEG***	-	8ml
H ₂ O	1,6ml	-

*10X TE puskuuri: 0,1 M Tris-HCL, 10 mM EDTA, pH 7,5

**10X LiAc 1M litium asetaatti, pH 7,5

***50% Polyetyleni glykoli (PEG), mp: 3350

4.3.2 Hiivan transformointi

Transformaatiot aloitettiin pipetoimalla eppendorf-putkiin 1µl (0,1µg) pGAD- ja 2µl:aa (0,2µg) pGBK-vektoreihin kloonattuja geenejä. Sitoutuvaa aluetta sisältävää vektoria pipetoitiin kaksinkertainen määrä pGAD-vektoriin nähden Clontech:in transformaatio-ohjeen mukaisesti, koska tämä lisää transformaatiotehokkuutta. Putkiin lisättiin 100 µg:aa kantaja DNA:ta 5µl:n tilavuudessa, joka moninkertaistaa transformaatiotehokkuuden todennäköisimmin heikentämällä soluseinien rakennetta (Pham ym. 2011). Putkiin lisättiin 100 µl:aa kompetentteja soluja ja 0,6 ml:aa PEG/LiAc-liuosta (Taulukko 11), jonka jälkeen putket vorteksoitiin hyvin. Soluja kasvatettiin ravistelussa puolen tunnin ajan, jonka jälkeen putkiin lisättiin 70 µl:aa dimetyylisulfoksidia (DMSO) heikentämään soluseiniä (Hill ym. 1991). Putkia

sekoitettiin varovaisesti kääntelemällä ylösalaisin. DMSO:n lisäyksen jälkeen suoritettiin lämpöshokki (42°C, 15min), joka indusoi plasmidien transformaation soluihin. Tämän jälkeen putket siirrettiin jäälle, ja solut sentrifugoitiin 16000 g:ssä 5 sekunnin ajan. Solupelletti resuspensoitiin 0,25 ml:aan MQ-vettä, josta maljattiin 150 µl:aa SD-LW-maljoille. Kyseiset maljat eivät sisällä leusiini (L) tai tryptofaani (W) aminohappoja, jolloin ainoastaan sellaiset hiivakloonit kasvavat, jotka sisältävät molemmat vektorit. Tämä perustuu vektoreiden sisältämiin avoimiin lukuraameihin, joiden ekspressiotuotteet (pGAD:LEU2, pGBK:TRP1) osallistuvat kyseisten aminohappojen biosynteesiin. Transformaatioita sisältäviä maljoja kasvatettiin 3 vrk:n ajan.

4.3.3 Proteiinien välisten vuorovaikutusten testaus

Tutkittavat pesäkkeet maljattiin SD-LWHA- ja SD-LWH+3AT-maljoille, joilta puuttuvat leusiini- ja tryptofaani-aminohappojen lisäksi histidiini-aminohappo ja ensimmäiseltä maljalta lisäksi adeniini-aminohappo. Näiden kahden aminohapon puute selektoi proteiinien välistä vuorovaikutusta, koska niiden biosynteesin mahdollistavat proteiinit toimivat reportterigeeneinä. Jos tutkittavat proteiinit ovat vuorovaikutuksessa, kasvaa hiiva selektioalustoilla reportterigeenien proteiinituotteiden osallistuessa kyseisten aminohappojen biosynteesiin. Selektiomaljoilla kasvaneita klooneja maljattiin myös SD-LWHA+3AT-kasvualustalle, jotka molempien reportterigeenien ilmentymisen selektion lisäksi sisältävät 3-AT-inhibiittoria. 3AT estää *His3*-geenin ”vuotavaa” ilmentymistä, jolloin ainoastaan sellaiset hiivat pystyvät kasvamaan maljoilla, joissa proteiinivuorovaikutuksen myötä kyseinen reportterigeeni ilmentyy voimakkaasti. Maljoja pidettiin 30°C:ssa, ja hiivojen kasvua seurattiin silmämääräisesti 10 vrk:n ajan.

Kontrolleina käytettiin hiivatransformaatioita jotka sisälsivät Clontech-yrityksen Matchmaker GAL4-protokollan mukaiset vektorit. Positiiviset kontrollit sisälsivät pGBKT7-53- ja pGADT7-T-vektorit, joista ilmentyvien p53- ja T-vasta-aine-proteiinien tiedetään olevan vuorovaikutuksessa YTHS:llä tutkittaessa (Li ym. 1993, Iwabuchi ym. 1993). Vastaavasti negatiiviset kontrollit sisälsivät pGADT7-T- ja

pGBKT7-Lam-vektorit, joista ilmentyvät proteiinit eivät ole vuorovaikutuksessa (Bartel ym. 1993, Ye ja Worman 1995).

4.4 BiFC-kokeet

4.4.1 Kompetenttien Agrobakteerien valmistus

BiFC-kokeet aloitettiin valmistamalla kompetenteja agrobakteereja. Soluja kasvatettiin 28°C:ssa ja liuoskasvatuksia pidettiin ravistelussa (200 rpm). Agrobakteerikannasta (C58C1), joka sisälsi pGV2260 Ti-plasmidin, kasvatettiin yksi pesäke 5 ml:ssa LB-liuosta, joka sisälsi agrobakteereja selektoivina antibiootteina rifampisiinia (25 µg/ml) ja karbenisilliinia (100 µg/ml). Soluja kasvatettiin yön yli, jonka jälkeen kasvatusliuoksista inokuloitiin 1 ml 100 ml:aan vastaavia antibiootteja sisältävään LB-liuokseen. Soluja kasvatettiin 8 tunnin ajan samoissa olosuhteissa kuten edellä, kunnes OD₆₀₀-arvo oli 0,35. Pitkä kasvatusaika ja alhainen OD₆₀₀-arvo johtuivat ilmeisesti varsin pienien ja vanhojen pesäkkeiden käytössä yön yli kasvatusten inokulaatiossa. Yleisemmin lyhyempi kasvatusaika riittää, jolloin OD₆₀₀-arvon oletetaan nousevan yli 0,5. Solut päätettiin kuitenkin sentrifugoida (3000g, 5 min, 4°C), jonka jälkeen 100ml:sta saatu solupelletti resuspensoitiin 1ml:aan 20mM:sta CaCl₂-liuosta joka sisälsi 15% glyserolia. Jos OD₆₀₀-arvo olisi ollut ihanteellinen (n. 0,5-0,6), olisi 1ml:aan resuspensoitava solupelletti sentrifugoitu 50ml:sta kasvatusliuosta, mutta tilavuus päätettiin kaksinkertaistaa huonon kasvun takia. Resuspensoinnin jälkeen kompetentit solut olivat valmiita transformaatioita varten, jonka lisäksi ylijääneet solut pakastettiin jatkotarvetta varten.

4.4.2 Agrobakteerien transformaatio

Transformaatiot aloitettiin pipetoimalla 500 ng:aa (20µl) kutakin konstruktiota eppendorf-putkiin, joihin lisättiin 100µl:aa kompetenteja soluja. Solut jäädytettiin siirtämällä ne nestemäiseen tyypeen 5 minuutin ajaksi, jonka jälkeen ne sulatettiin pitämällä 5 minuutin ajan 37°C:ssa lämpöhauteessa. Putkiin lisättiin 1ml LB-liuosta ja soluja kasvatettiin 28°C:ssa tunnin ajan, jotta antibioottiresistenssigeenit olisivat ilmentyneet tarpeeksi ennen maljausta. Solut sentrifugoitiin (13000g, 30 s) ja resuspensoitiin 200 µl:aan LB-liuosta, jotka maljattiin rifampisiinia (25 µg/ml),

karbenisilliinia (100 µg/ml) ja spektinomysiiniä (100 µg/ml) sisältäville LB-agar-maljoille. Koska pLH-vektori sisältää resistenssigeenin spektinomysiiniä kohtaan, voidaan kyseisellä selektiolla varmistaa transformaation onnistuminen. Maljoja kasvatettiin n. 3 vrk:n ajan, kunnes jokaisesta transformaatiosta maljattiin kaksi pesäkettä vastaavanlaisille maljoille. Kyseisiä klooneja käytettiin agrobakteerikäsittelyissä, ja tämän vuoksi ne tarkastettiin PCR-reaktion avulla. Nämä reaktiot suoritettiin samalla tavalla kuten aikaisemmat BiFC-konstruktien pesäke-PCR-reaktiot, nyt kuitenkin templaatiksi pipetoitiin 2µl:aa bakteeriliuosta. Kyseinen liuos valmistettiin liuottamalla bakteerimassaa 100 µl:aan MQ-vettä, jota keitettiin 5 minuutin ajan agrobakteerien soluseinän hajottamiseksi.

4.4.3 Agrobakteerikäsittelyt

Oikeanlaiseksi varmistettuja klooneja käytettiin agrobakteerikäsittelyissä, jotka suoritettiin kunkin konstruktikombinaation osalta kaksi kertaa. Solut kasvatettiin yön yli 5ml:ssa LB-liuosta, joka sisälsi selektoivina antibiootteina rifampisiinia (25 µg/ml), karbenisilliinia (100 µg/ml) ja spektinomysiiniä (100 µg/ml). Solut kerättiin sentrifugoimalla (2683g, 10 min) ja supernatantti poistettiin huolellisesti, jotta varsinaiseen ruiskutettavaan liuokseen ei olisi jäänyt antibiootteja. Solupelletti resuspensoitiin induktioliemeen, jota lisättiin niin, että OD₆₀₀-arvo saavutti arvon 0,6. Induktioliemi sisälsi puskurina MgCl₂:a (10mM), ja tämän lisäksi asetosyryngonia (20µM), jonka tehtävänä on aktivoida Ti-plasmidin virulenssigeenien ilmentymistä (Stachel ym. 1985). Soluja pidettiin induktioliemessä 3 tunnin ajan. Ruiskutettavat liuokset valmistettiin pipetoimalla samoihin putkiin 1ml kahta eri induktioliuosta, jotka sisälsivät tutkittavien geenien YN- ja YC-fuusiokonstruktit. Liuokset ruiskutettiin noin 4 viikkoa vanhoihin villityypin *Nicotiana benthamiana*-kasvin lehtien alapuolelle ruiskulla niin, että liuos levisi kauttaaltaan koko lehteen.

4.4.4 Mikroskopiointi

Lehdistä leikattujen noin 1 cm² kokoisten palojen alapintojen epidermisolukkoa tarkasteltiin epifluoresenssimikroskoopilla (Leitz Laborlux 12D) käyttäen filterriä (Leica Nilomark Oy), joka suodatti emissioon 470/40- ja eksitaatiosta 525/50-nanometrin aallonpituudet. Kuvat otettiin 2- ja 3 päivää käsittelyn jälkeen käyttäen

25- ja 40-kertaa suurentavaa linssiä. Tämän lisäksi näytteitä, joissa ei havaittu fluoresenssia, tarkastettiin konfokaalimikroskoopilla (Leica TCS SP2 AOBS) käyttäen 63-kertaista vesi-immersio suurennusta (Biotekniikan instituutti, Helsingin yliopisto).

4.5 YTHS:ssä käytettyjen pGAD- ja pGBK-vektoreiden ilmentymisen tarkistaminen western blot -menetelmällä

Western blot -analyysit aloitettiin tutkittavien proteiinien eristyksellä mukailen Volland'in ym. (1994) ohjetta. Tarvittavan proteiinimäärän vuoksi hiivatransformaatioita sisältäviltä maljoilta poimittiin pesäkkeitä, joita kasvatettiin SD-LW-kasvatusliuoksessa yön yli (28°C, 200rpm). Solut sentrifugoitiin (5min, 1000 rpm) 15ml:n kasvatusputkissa ja jäädytettiin nestemäisessä työssä, jonka jälkeen solupellettien annettiin sulaa jäällä. Tämän jälkeen solut hajotettiin lisäämällä 100 µl:aa 1.85 M:sta NaOH-liuosta, joka sisälsi proteiineja denaturoivana yhdisteenä 7%:sta B-merkaptotetanolina. Hajotetut solut siirrettiin eppendorf-putkiin, joita pidettiin 10 min jäällä. Proteiinit saostettiin lisäämällä 100 µl:aa 50%:sta trikloorietikkahappoa (TCA), jonka jälkeen soluja pidettiin jäällä 5min ja sentrifugoitiin (13000g, 10 min). Proteiinipelletti neutralisoitiin resuspensoimalla se 400 µl:aan 1M:sta tris(hydroksimetyyli)aminometaanina (TRIS), jonka jälkeen proteiinit sentrifugoitiin (13000g, 1min) ja resuspensoitiin 2xLaemmli-puskuriin. Proteiinien denaturoimiseksi näytteitä keitettiin 5 minuutin ajan, jonka jälkeen näytteet sentrifugoitiin lyhyesti (8000g, 5s), jotta agregoituneet proteiinit olisivat painuneet putken pohjalle. Valmiin näytteen pinnasta ladattiin geelille 10 µl:aa, niin että AD- ja BD-alueita sisältävät konstruktit ladattiin omille geeleilleen tulevien vasta-ainekäsittelyjen vuoksi.

Geeli-elektroforeesissa käytettiin SDS-polyakryyliamidigeeliä, joka koostuu konsentrintigeelistä (5%) ja erotusgeelistä (12%). Konsentrintigeelin tehtävänä on koota proteiinit yhteen ennen erotusgeelissä tapahtuvaa proteiinien erottelua. Näytteitä ajettiin 25 milliampeerin sähkövirrassa puolen tunnin ajan, jonka jälkeen ampeerimäärä nostettiin 35:een. Ajoa jatkettiin kunnes bromifenolisininen-väriaine oli ajautunut geeliltä kokonaan pois. Kun proteiinit oli siirretty sähkökentässä

membraaneille, värjättiin geelit käyttäen Coomassie blue-väriainetta, jolloin geeliltä voidaan nähdä kaikki ajautuneet proteiinit silmämääräisesti ja varmistaa näin proteiinien ilmentyminen näytteissä.

Geeli-elektroforeesin jälkeen suoritettiin ”blottaus” siirtämällä proteiinit geeliltä polyvinyylideenifluoridi-kalvolle (Hybond-P, GE Healthcare) sähkökentässä (300 mA) tunnin ajan (Wet protein transfer, Biorad). Ennen vasta-ainekäsittelyä membraanit kyllästettiin maitoproteiiniliuoksessa (1xTBS, 5% maitojauhe + 0,1% Tween) yön yli (4°C, sekoitus) jolla estettiin ensimmäisen vasta-aineen epäspesifinen sitoutuminen membraanille. Tämä perustuu maitoproteiinien sitoutumiseen membraanin tyhjiin kohtiin, jolloin ensimmäinen vasta-aine sitoutuisi ainoastaan kohde-proteiineihin. Ensimmäisessä vasta-ainekäsittelyssä käytettiin HA- (pGAD) ja c-Myc-epitoppeihin (pGBK) sitoutuvia vasta-aineita (Clontech), jotka oli lisätty maitoproteiiniliuokseen (1xTBS 2,5% maitojauhe) 1:15000 laimennussuhteessa. Nämä vasta-aineet oli valmistettu hiiressä aikaansaadun vasta-ainereaktion myötä.

Membraaneja pidettiin vasta-aineliuoksissa tunnin ajan sekoituksessa huoneenlämmössä. Sitoutumattomat vasta-aineet pestiin pois pitämällä membraaneja 1xTBS 0,1% Tween-liuoksessa sekoituksessa 10 minuutin ajan, joka tehtiin yhteensä kolme kertaa. Puhdistuksen jälkeen suoritettiin sekundäärinen vasta-ainekäsittely pitämällä membraaneja (2 t huoneenlämmössä, sekoituksessa) maitoproteiiniliuoksessa (1xTBS 2.5% maitojauhe + 0,1% Tween), johon oli lisätty sekundäärinen vasta-aine (1:150000). Piparjuuriperoksidaasilla (HRP) leimattu sekundäärinen vasta-aine (Antimouse LG, GE Healthcare) tunnistaa hiiressä valmistetun vasta-aineen. Tämä mahdollisti sekundäärisen vasta-aineen spesifisen sitoutumisen primääriseen vasta-aineeseen, ja edelleen proteiinien visualisoimisen HRP-välitteisen entsyymaattisen reaktion myötä. Membraanit pestiin kuten aikaisemman vasta-ainekäsittelyn jälkeen, nyt pesu tehtiin kuitenkin neljä kertaa.

Proteiinien detektoimiseksi käytettiin SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate-tuotetta (Thermo Scientific), joka toimii substraattina sekundääriseen vasta-aineeseen liitetyle HRP:lle. Reaktio suoritettiin yhdistämällä substraattiliuoksia (0,5ml:aa ECL1:stä ja 0,5ml:aa ECL2:sta) eppendorf-putkeen,

joka sekoituksen jälkeen pipetoitiin yhden membraanin päälle viiden minuutin ajaksi. Membraanit käärittiin uuteen muovikelmuun, joita valotettiin filmin kanssa valotuskasetissa yhden minuutin ajan. Tämän jälkeen filmejä pidettiin kehitysliuoksessa, kunnes kuvan kehityttyä filmit kestävöitiin pitämällä niitä kiinniteliuoksessa n. viiden minuutin ajan.

4.6 BiFC-menetelmässä käytettyjen pLH-vektoreiden ilmentymisen tarkistaminen western blot -menetelmällä

Näytteet valmistettiin ottamalla infitroiduista lehdistä noin yhden neliösenttimetrin kokoinen lehtipala eppendorf-putkeen, jotka laitettiin välittömästi nestemäiseen tyypeen. Lehtinäytteen murskaamisen jälkeen putkiin lisättiin 200 µl:aa 2xLaemmli-puskuria, jonka jälkeen näytteitä keitettiin viiden minuutin ajan. Näytteet sentrifugoitiin lyhyesti (13000g, 1 min), jotta agregoituneet proteiinit olisivat painuneet putken pohjalle. Tämän jälkeen valmiin näytteen pinnasta ladattiin geelin kaivoihin 15 µl:aa kutakin näytettä.

Koska kasvinäytteistä tehdyissä western blot -kokeissa oli ongelmia havaita tutkittujen proteiinien ilmentymistä, päätettiin näytteitä valmistaa vaihtoehtoisella menetelmällä. Tämä tehtiin hienontamalla 0,3 grammaa lehtinäytettä morttelissa, johon oli lisätty 100 µl:aa homogenisointipuskuria (0,25M Tris-HCL, 5mM EDTA, 0,1% askorbiinihappo, 1mM fenyyylimetyylisulfonyylifluoridi). Mortteliin lisättiin 600 µl:aa homogenisointipuskuria, ja näytettä hienonnettiin uudelleen. Näytteet sentrifugoitiin (13000g, 10 min) ja supernatantti pipetoitiin uuteen eppendorf-putkeen, johon lisättiin 4xLaemmli-puskuria. Näytteitä keitettiin viiden minuutin ajan, jonka jälkeen niistä pipetoitiin 15 µl:aa geelille.

Western blot -kokeet suoritettiin samalla tavalla kuten tarkistettaessa hiivavektoreiden ilmentymistä. Nyt kuitenkin membraaneja kyllästettiin maitoproteiiniliuoksessa vain tunnin ajan huoneenlämmössä ennen ensimmäistä vasta-ainekäsittelyä. Primäärisenä vasta-aineena käytettiin YN- ja YC-alueisiin sitoutuvaa polyklonaalista vasta-ainetta (anti-GFP, Invitrogen), joka on valmistettu kanissa aikaansaadun vasta-ainereaktion myötä. Tätä vasta-ainetta käytettiin 1:2000

laimennussuhteessa ja käsittelyä jatkettiin yön yli. Primääriseen vasta-aineliuokseen oli lisätty myös 50 µl:aa kasvimehua murskatusta lehdestä. Tämän tarkoituksena oli vähentää primäärisen vasta-aineen epäspesifistä sitoutumista kasviproteiineihin, joka johtui vasta-aineen polyklonaalisuudesta.

Sekundäärisenä vasta-aineena käytettiin piparjuuriperoksidaasilla (HRP) leimattua vasta-ainetta (anti-Rabbit IgG, GE Healthcare), joka tunnistaa kanissa valmistetun primäärisen vasta-aineen. Kyseistä vasta-ainetta käytettiin 1:5000 laimennussuhteessa ja käsittelyä jatkettiin kolmen tunnin ajan.

Proteiinien detektoimiseksi käytettiin samaa HRP:n substraattia (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate) kuten hiivavektoreiden western blot -kokeissa. Koska kasvinäytteistä tehdyissä western blot -kokeissa oli ongelmia havaita tutkittujen proteiinien ilmentymistä, käytettiin vaihtoehtoisesti myös saman valmistajan herkempää HRP-substraattia (SuperSignal West Pico Maximum Sensitivity Substrate) yhdessä laimeampien vasta-ainekäsittelyjen kanssa (primäärinen 1:5000, sekundäärinen 1:100000).

5 TULOKSET

5.1 Hiivan kaksihybridi-menetelmällä löydetyt proteiinien väliset vuorovaikutukset

YTHS:llä tutkittiin perunan PVA:n ja PVY:n VPg- ja HC-pro-teiinien sekä bataatin SPCSV:n RNase3- ja p22-proteiinien mahdollisia vuorovaikutuksia neljän hiljennystä ylläpitävän kasviproteiinin kanssa (AGO1, AGO2, RDR6 ja SGS3).

Testatuista proteiineista PVA-VPg:llä ja SGS3:lla todettiin voimakas vuorovaikutus hiivan kasvunopeuden perusteella SD-LWHA selektiomaljalla (Taulukko 12). Näitä proteiineja ilmentävän hiivan kasvu oli voimakkaampaa kuin positiivisen kontrollin. Lisäksi havaittiin vuorovaikutusta PVA-VPg- ja AGO1-proteiinien välillä, joita tuottavan hiivan kasvu oli havaittavissa noin kolme päivää myöhemmin kuin positiivisen kontrollin (Taulukko 12).

Taulukko 12. Hiivan kaksihybridi-menetelmällä havaitut proteiini-interaktiot RNA-hiljennyksenestäjien ja hiljennystä ylläpitävien proteiinien välillä hiivan kasvunopeuden perusteella*.

	AGO1	AGO2	RDR6	SGS3	Itse-interaktio	Tyhjä
PVA-VPg	+	++	-	++	++	-
PVA-HC-pro	-	++	-	-	++	-
PVY-VPg	-	-	-	-	-	-
PVY-HC-pro	-	++	-	-	++	-
SPCSV-RNase3	-	++	-	-	++	-
RNase3-Ala	-	et	-	-	++	-
SPCSV-p22	-	++	-	-	++	-
Tyhjä	-	-	-	-	et	et

* Kasvunopeus: ++, kasvua 1-2p; +, kasvua 2-4p; +-, kasvua 4-8p; -, ei kasvua; et, ei testattu. Selektiomaljana SD-LWHA.

AGO2-proteiinin havaittiin olevan vuorovaikutuksessa kaikkien virusproteiinien kanssa lukuunottamatta PVY-VPg:tä (Taulukko 12). p22- ja PVA-VPg-proteiinien ja AGO2:n vuorovaikutus oli havaittavissa vain, kun kyseisiä virusproteiineja ilmennettiin AD-vektorista. PVA-HC-pro ja RNase3 olivat vuorovaikutuksessa AGO2:n kanssa sekä AD- että BD-vektoreihin kloonattuina. Johtuen AGO2-proteiinin lukuisista vuorovaikutuksista virusproteiinien kanssa, ei RNase3-alamutantti ja AGO2:n välistä mahdollista vuorovaikutusta tutkittu. Tämän lisäksi PVY-HC-pro:n ja AGO2:n välistä vuorovaikutusta testattiin vain hiivalla, joka ilmensi PVY-HC-pro:ta AD-vektorista ja AGO2:sta BD-vektorista.

Tutkittujen RNA-hiljennyksenestäjien tiedetään dimerisoituvan. Tällöin niiden itseinteraktioita tutkimalla voidaan tarkastella konstruktien ilmentymistä.

Itseinteraktiot todettiin kaikilla virusproteiineilla paitsi PVY-VPg:llä (Taulukko 12). Tämän lisäksi jokainen tutkimuksessa käytetty konstrukti testattiin ”tyhjää” vastaan, eli pelkkää AD- tai BD- aluetta vastaan. Tällä tavoin varmistuttiin, ettei pelkän AD- tai BD-alueen sitoutuminen tutkittavan proteiini-konstruktin AD- tai BD-alueeseen johda toimivan transkriptioaktivaattorin muodostumiseen. Tällaisia konstruktia ei kuitenkaan havaittu (Taulukko 12 ja 13, kuva 6).

VPg- ja SGS3-proteiinien välillä todettiin voimakas vuorovaikutus, päätettiin tarkastella myös muiden potyvirus VPg-proteiinien ja PVA-VPg:n mutanttien mahdollista vuorovaikutusta SGS3-proteiinin kanssa. Tämä toteutettiin

tarkastelemalla SGS3:n vuorovaikutusta PVA-VPg:n a- ja b-mutanttien, sekä perun tomaattiviruksen (PTV, *Peru tomato virus*), perunan V-viruksen (PVV, *Potato V virus*) ja villiperunan mosaiikkiviruksen (WPMV, *Wild potato mosaic virus*) VPg-proteiinien kanssa. PVA-VPg:n a- ja b-mutanttien tuma- ja tumajyväslokalisaatiota ohjaavia sekvenssejä on muutettu siten, että niiden tuma- ja/tai tumajyväslokalisaatio on estynyt (Taulukko 2; Rajamäki ja Valkonen 2009). Mutaatioita testaamalla pyrittiin selvittämään, voisivatko poikkeamat näillä alueilla häiritä myös vuorovaikutusta SGS3-proteiinin kanssa. PVA-VPg:n ja SGS3:n vuorovaikutusta koskevien tulosten perusteella VPg-proteiineja testattiin ainoastaan AD-vektoriin kloonattuna.

PVA-VPg:n mutanteilla oli havaittavissa vuorovaikutusta SGS3:n kanssa, jota ei kuitenkaan havaittu PTV-, PVV- ja WPMV-VPg-proteiinien osalta SD-LWHA selektiomaljalla (Taulukko 13). Näiden kolmen VPg-proteiinin kuitenkin havaittiin olevan vuorovaikutuksessa SGS3:n kanssa satunnaisesti 4-8 päivän kasvatuksen

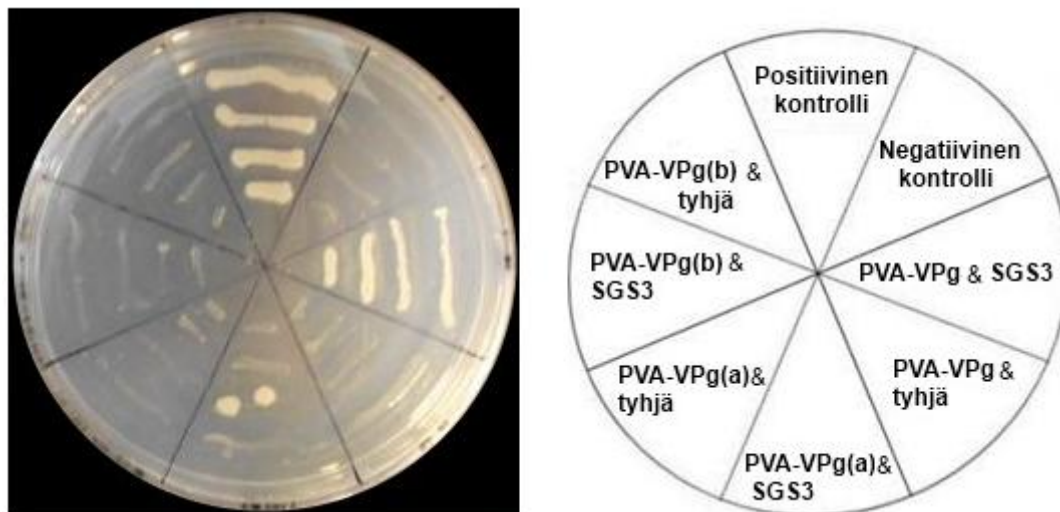
Taulukko 13. Hiivan kaksihybridi-menetelmällä havaitut proteiini-interaktiot potyvirusen VPg-proteiinien ja SGS3-proteiinin välillä hiivan kasvunopeuden perusteella*.

	SGS3	Itse- interaktio	Tyhjä
PVA-VPg	++	++	-
PVA-VPg (a)	+	++	-
PVA-VPg (b)	+	++	-
PTV-VPg	-	++	-
PVV-VPg	-	-	-
WPMV-VPg	-	+	-

* Kasvunopeus: ++, kasvua 1-2p; +, kasvua 2-4p; +-, kasvua 4-8p; -, ei kasvua; et, ei testattu. Selektiomaljana SD-LWHA.

jälkeen SD-LWHA-maljalla. Villityypin VPg:n vuorovaikutus SGS3:n kanssa havaittiin hieman voimakkaammaksi kuin VPg:n mutanteilla. Tämä ero oli kuitenkin hyvin pieni ja vaikeasti havaittavissa, jonka vuoksi kyseisiä vuorovaikutuksia päätettiin tarkastella 3-AT-inhibiittoria sisältävällä selektiomaljalla (SD-LWHA + 10mM 3-AT). 3-AT-inhibiittori estää *His3*-geenin ”vuotavaa” ilmentymistä, jolloin tutkittavien proteiinien vuorovaikutuksen voimakkuus näkyy hiivan kasvunopeudessa selkeämmin kuin pelkällä SD-LWHA-maljalla. Nyt ainoastaan

villityypin VPg osoitti vuorovaikutusta SGS3:n kanssa (Kuva 6). Itseinteraktiot todettiin kaikilla VPg-proteiineilla paitsi PVV-VPg:llä (Taulukko 13).

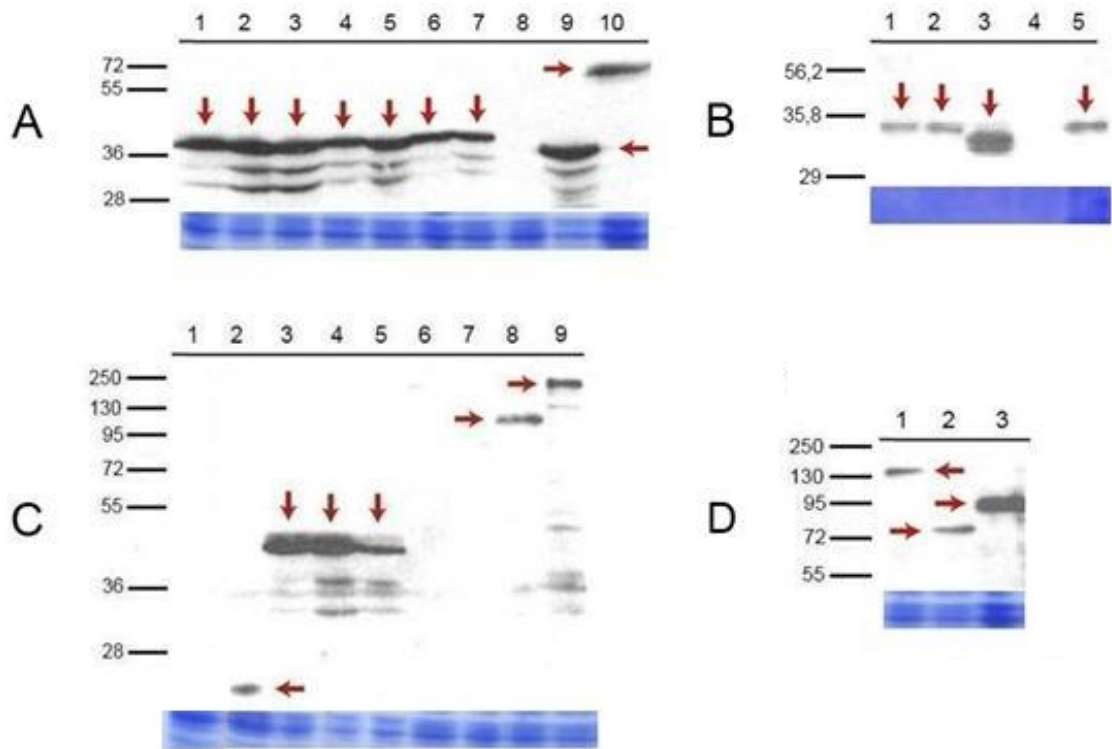


Kuva 6. PVA-VPg:n ja PVA-VPg-ala-mutanttien vuorovaikutukset SGS3-proteiinin kanssa 3 päivää maljauksesta SD-LWHA(10mM 3-AT)-ravintomaljalla.

YTHS:llä testattiin myös kasvin RDR6- ja SGS3-proteiinien välistä vuorovaikutusta, koska niiden tiedetään sitoutuvan toisiinsa (Kumakura ym. 2009). Tällä tavalla pyrittiin varmistamaan kyseisten konstruktien ekpressoitumista, kuten aikaisemmin tarkasteltujen itseinteraktioiden kohdalla. RDR6- ja SGS3-proteiinien välistä vuorovaikutusta ei kuitenkaan todettu selektiomaljoilta.

5.1.1 Hiivavektoreiden ilmentymisen tarkistaminen western blot -menetelmällä

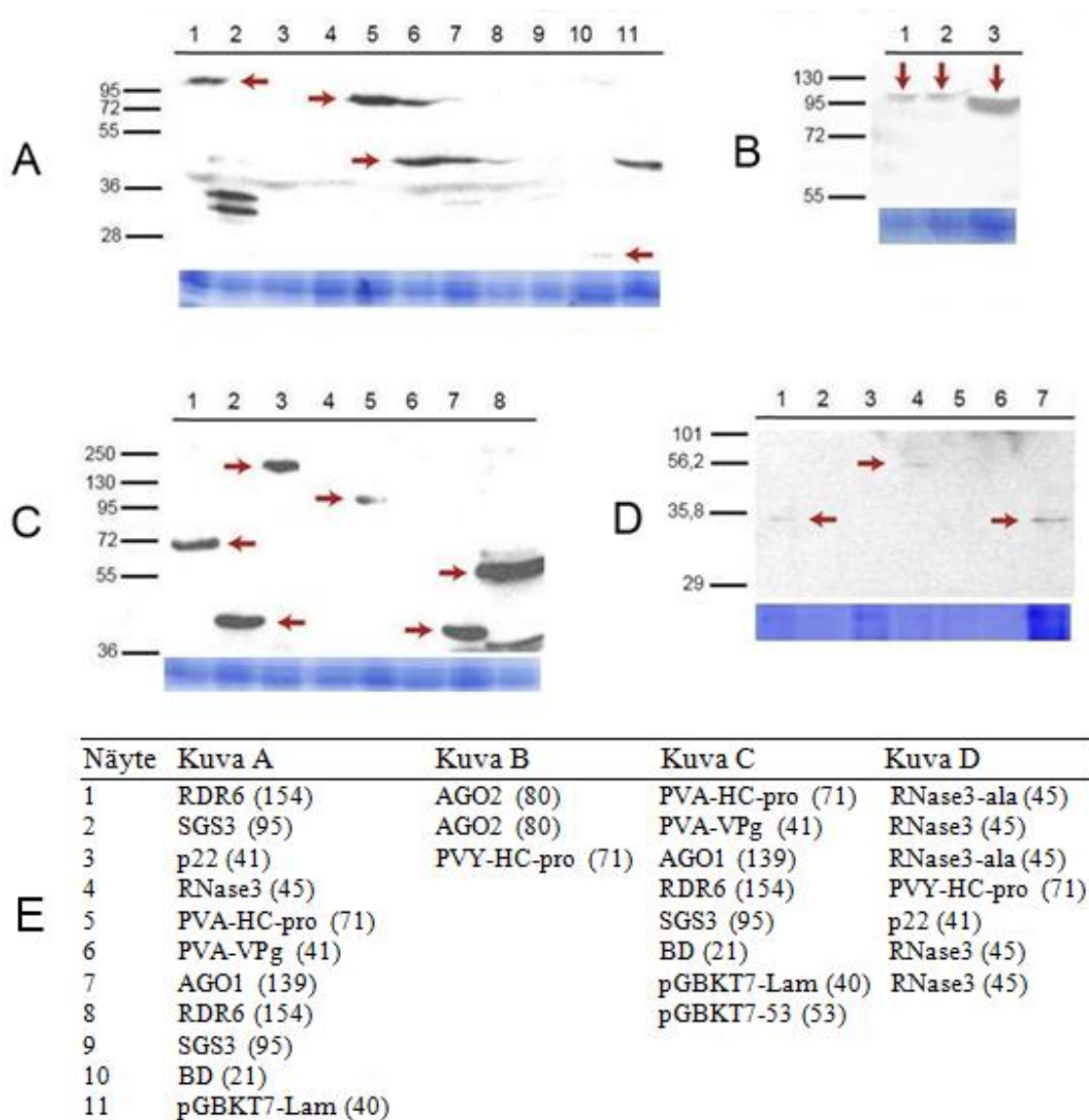
Western blot -menetelmällä testattiin YTHS:ssä käytettyjen vektoreiden ilmentymistä hiivasoluista. Näin haluttiin varmistaa, etteivät mahdolliset ongelmat vektoreiden ilmentymisessä haitanneet hiivojen kasvua selektiomaljoilla.



	Näyte	Kuva A	Kuva B	Kuva C	Kuva D
E	1	PVA-VPg (37)	RNase3-ala (41)	PVY-HC-pro (67)	AGO1 (135)
	2	PVA-VPg(a) (37)	RNase3 (41)	AD (17)	AGO2 (76)
	3	PVA-VPg(b) (37)	p22 (37)	PVA-VPg (37)	SGS3 (91)
	4	PVV-VPg (37)	RNase3 (41)	PVA-VPg(a) (37)	
	5	PTV-VPg (37)	RNase3-ala (41)	PVA-VPg(b) (37)	
	6	WPMV-VPg (37)		AGO1 (135)	
	7	PVY-VPg (37)		AGO2 (76)	
	8	RNase3 (41)		SGS3 (91)	
	9	p22 (37)		RDR6 (150)	
	10	PVA-HC-pro (67)			

Kuva 7. Fuusioproteiinien ilmentyminen hiivasoluissa western blot -menetelmällä tutkittuna. Nuolilla on merkitty proteiinit, jotka vastaavat ilmennetyn proteiinin ja AD-alueen yhteenlaskettua kokoa kilodaltonneina (A-D). Western blot-kokeissa käytetyt näytteet ja niissä ilmentyvät proteiinit, joiden perään sulkeisiin merkitty proteiinin ja AD-alueen yhteenlaskettu koko kilodaltonneina (E).

Kaikki tutkittavat kasviproteiinit (AGO1, AGO2, SGS3 ja RDR6) ilmentyivät käytetyistä AD- ja BD-konstrukteista (Kuva 7 ja 8). Myös kaikki tutkittavat virusproteiinit lukuun ottamatta AD-PVY-HC-pro ja BD-p22 fuusioproteiineja ilmentyivät AD- ja BD-fuusioproteiineina (Kuva 7 ja 8).



Kuva 8. Fuusioproteiinien ilmentyminen hiivasoluissa western blot -menetelmällä tutkittuna. Nuolilla on merkitty proteiinit, jotka vastaavat ilmennetyn proteiinin ja BD-alueen yhteenlaskettua kokoa kilodaltonneina (A-D). Western blot-kokeissa käytetyt näytteet ja niissä ilmentyvät proteiinit, joiden perään sulkeisiin merkitty proteiinin ja BD-alueen yhteenlaskettu koko kilodaltonneina (E).

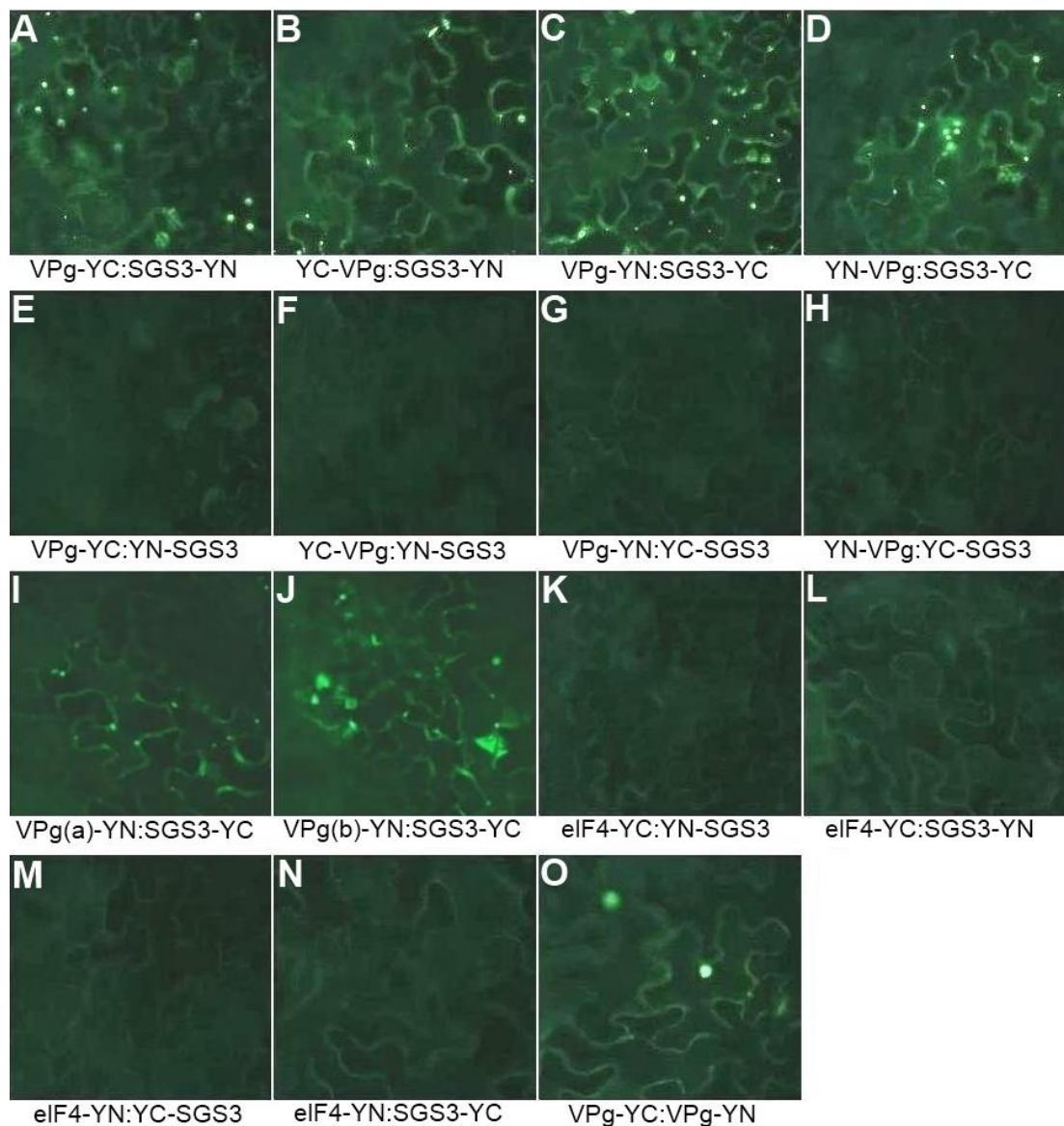
5.2 BiFC-menetelmällä löydetty proteiinien väliset vuorovaikutukset

5.2.1 VPg- ja SGS3-proteiinien välinen vuorovaikutus

Tutkittaessa PVA-VPg:n ja SGS3:n interaktiota BiFC-menetelmällä, todettiin proteiinien välinen vuorovaikutus runsaan fluoresoivan valon perusteella (Kuva 9 A-D). YFP:n tuottama valo oli havaittavissa pieninä pisteinä solulimassa 2 vrk agrobakteerikäsittelyn jälkeen, mutta jo 3 vrk:n jälkeen oli koko lehtinäyte kauttaaltaan vihreästi fluoresoivan valon vallitsema.

Pisteittäin fluoresoivaa valoa oli kuitenkin havaittavissa ainoastaan niissä lehdissä, jotka sisälsivät VPg:n YC- tai YN-fusion yhdessä SGS3:n karboksipäähän fuusoidun YN- tai YC-fragmentin kanssa (Kuva 9 A-D). Vastaavat SGS3:n aminopään fuusiot eivät tuottaneet valoa yhdessä VPg-konstruktien kanssa (Kuva 9 E-H). Myöskään negatiivisissa kontrolloissa ei ollut havaittavissa YFP:n tuottamaa valoa (Kuva 9 K-N). Positiivisena kontrollina käytettiin PVA-VPg:n itseinteraktiota, joka pystyttiin toteamaan YFP:n fluoresenssina tumassa ja tumajyväsessä (Kuva 9 O).

Myös PVA-VPg:n a- ja b-mutanttien todettiin olevan vuorovaikutuksessa SGS3:n kanssa (Kuva 9 I-J). Kyseisiä vuorovaikutuksia testattiin ainoastaan VPg-mutanteilla, joiden karboksipäähän oli fuusioitu YN-fragmentti. Kuten villityyppi-VPg:n kohdalla, fluoresenssi näkyi sytoplasmassa 2 vrk agrobakteerikäsittelyn jälkeen, mutta jo 3 vrk jälkeen selkeästi koko lehtinäytteen alalta. Fluoresoivan valon määrän perusteella VPg:n a- ja b-mutanttien vuorovaikutus SGS3-proteiinin kanssa oli voimakkaampi villityypin VPg:hen verrattuna.



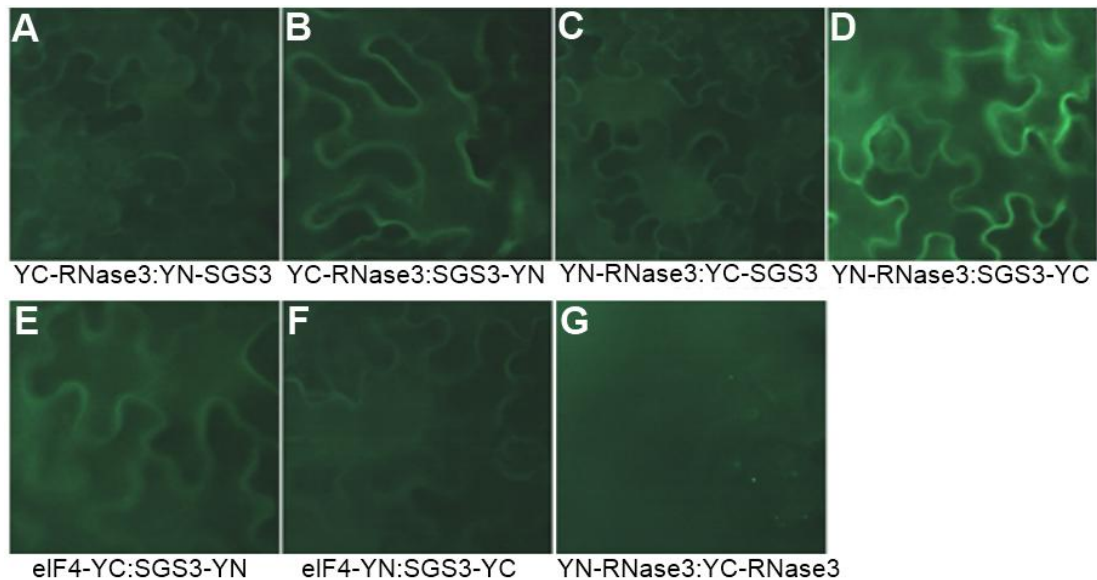
Kuva 9. PVA-VPg:n sekä sen a- ja b-mutanttien ja SGS3:n vuorovaikutusten tutkiminen BiFC-menetelmällä. Epifluoresenssimikroskoopilla otetut kuvat (25x suurennos) ovat *N. benthamiana*-kasvin lehdistä, joille suoritettiin VPg:n ja SGS3:n YN- ja YC-fuusiokonstrukteja sisältäviä agrobakteerikäsittelyjä. (A-D) VPg, jonka amino- tai karboksipäähän on liitetty YN- tai YC-fragmentti, ja SGS3, jonka karboksipäähän on liitetty YN- tai YC-fragmentti. (E-H) Vastaavia VPg-konstrukteja sisältävät agrobakteerikäsittelyt, joissa YC- tai YN-fragmentit ovat liitettyinä SGS3:n aminopäähän. (I-J) Agrobakteerikäsittelyt sisältäen VPg:n a- ja b-mutanttien YN- sekä SGS3:n YC-fuusiokonstruktit. (K-N) Negatiiviset kontrollit, joissa käytettiin neljän eri SGS3-konstruktin lisäksi eIF(iso)4EB-geenin karboksipäähän liitettyjä YC- tai YN-fragmentteja. (O) Positiivisena kontrollina VPg:n itseinteraktio. Kuvat on otettu 3 sekunnin valotusajalla 3 päivää agrobakteerikäsittelyn jälkeen.

5.2.2 RNase3- ja SGS3-proteiinien välinen vuorovaikutus

Myös SPCSV:n RNase3- ja SGS3-proteiinien välillä todettiin proteiinien välinen vuorovaikutus BiFC-menetelmällä (Kuva 10 D ja kuva 11).

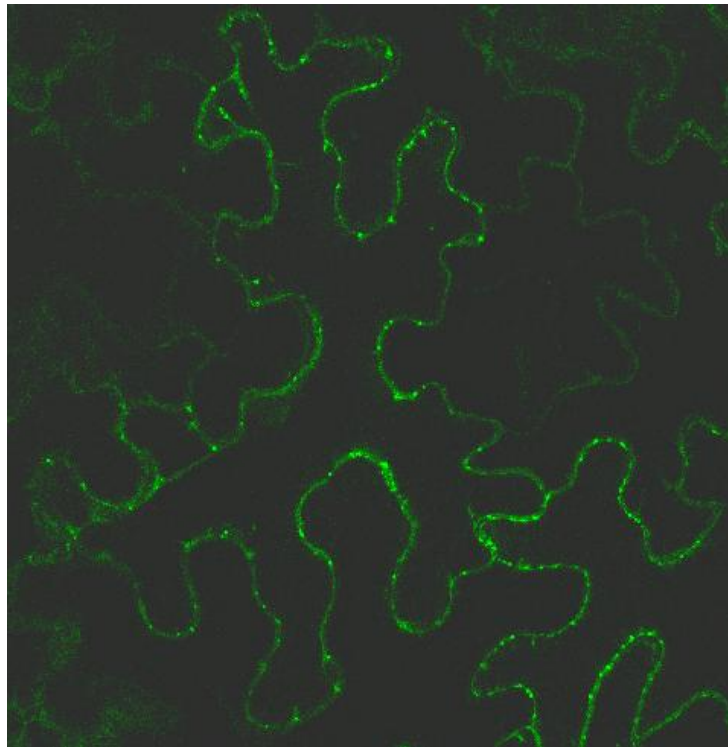
Epifluoresenssimikroskoopilla todettu vuorovaikutus oli havaittavissa tasaisena fluoresenssina sytoplasmassa (Kuva 10 D). Tämän lisäksi konfonkaalimikroskoopilla havaittiin YFP:n tuottamaa pisteittäistä valoa, joka oli hyvin pienikokoista ja vaikeasti havaittavissa (Kuva 11). SPCSV:n RNase3:n itseinteraktio oli havaittavissa samankaltaisten pienien pisteiden perusteella (Kuva 10 G). Itseinteraktio havaittiin kuitenkin vain toisessa tehdyistä RNase3:n BiFC-testauksista. Negatiivisissa kontroleissa ei ollut havaittavissa pisteittäin fluoresoivaa valoa (Kuva 10 E, F).

Negatiivisissa kontroleissa käytettiin vastaavia konstruktia kuin aikaisemmassa VPg:n ja SGS3:n vuorovaikutusta tutkivissa agrobakteerikäsittelyissä, mutta nyt ainoastaan sellaisia SGS3-konstruktia, joissa



Kuva 10. SPCSV-RNase3:sen ja SGS3:n vuorovaikutusten tutkiminen BiFC-menetelmällä. Epifluoresenssimikroskoopilla otetut kuvat (40x suurennos) ovat *N. benthamiana*-kasvin lehdistä, joille suoritettiin SGS3:n ja RNase3:n YN- ja YC-fuusiokonstruktia sisältäviä agrobakteerikäsittelyjä. (A-D) SGS3, jonka amino- tai karboksipäähän on liitetty YN- tai YC-fragmentti, ja RNase3, jonka aminopäähän on liitetty YN- tai YC-fragmentti. (E-F) Negatiiviset kontrollit, joissa käytettiin SGS3:n ja perunan eIF(iso)4EB-geenin C-päähän liitettyjä YC- tai YN-fragmentteja. (G) Positiivisena kontrollina RNase3:n itseinteraktio. Kuvat on otettu 3 sekunnin valotusajalla 3 päivää agrobakteerikäsittelyn jälkeen.

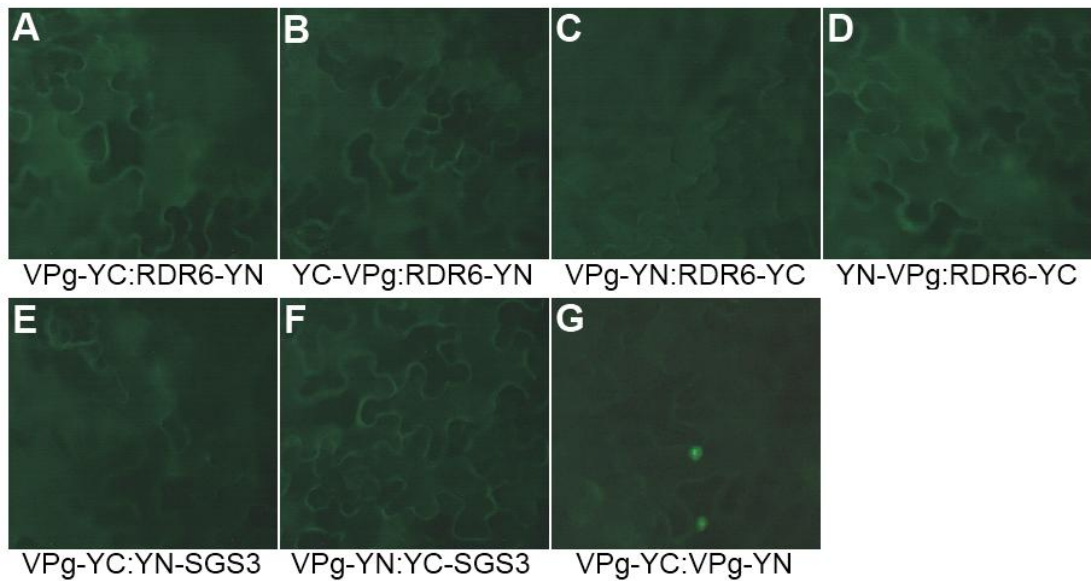
YC- tai YN ilmentyy SGS3:n C-pään fuusiona. Tämä tehtiin koska SGS3-konstruktien todettiin muodostavan toimivan YFP-proteiinin VPg-konstruktien kanssa ainoastaan kyseisessä orientaatiossa (Kuva 9 A-D)



Kuva 11. SPCSV:n RNase3:n ja SGS3:n vuorovaikutuksen tutkiminen BiFC-menetelmällä. Konfokaalimikroskoopilla (63x vesi-immersio) otettu kuva *N. benthamiana*-kasvin lehdestä, jolle tehty agrobakteerikäsittely sisälsi fuusiokonstrukteina YC-fragmentin liitettyä RNase3:n aminopäähän, ja YN-fragmentin liitettyä SGS3:n karboksipäähän. Kuva on otettu 2 päivää agrobakteerikäsittelyn jälkeen.

5.2.3 RDR6-proteiinin väliset vuorovaikutukset SGS3-, RNase3-, ja VPg-proteiinien kanssa

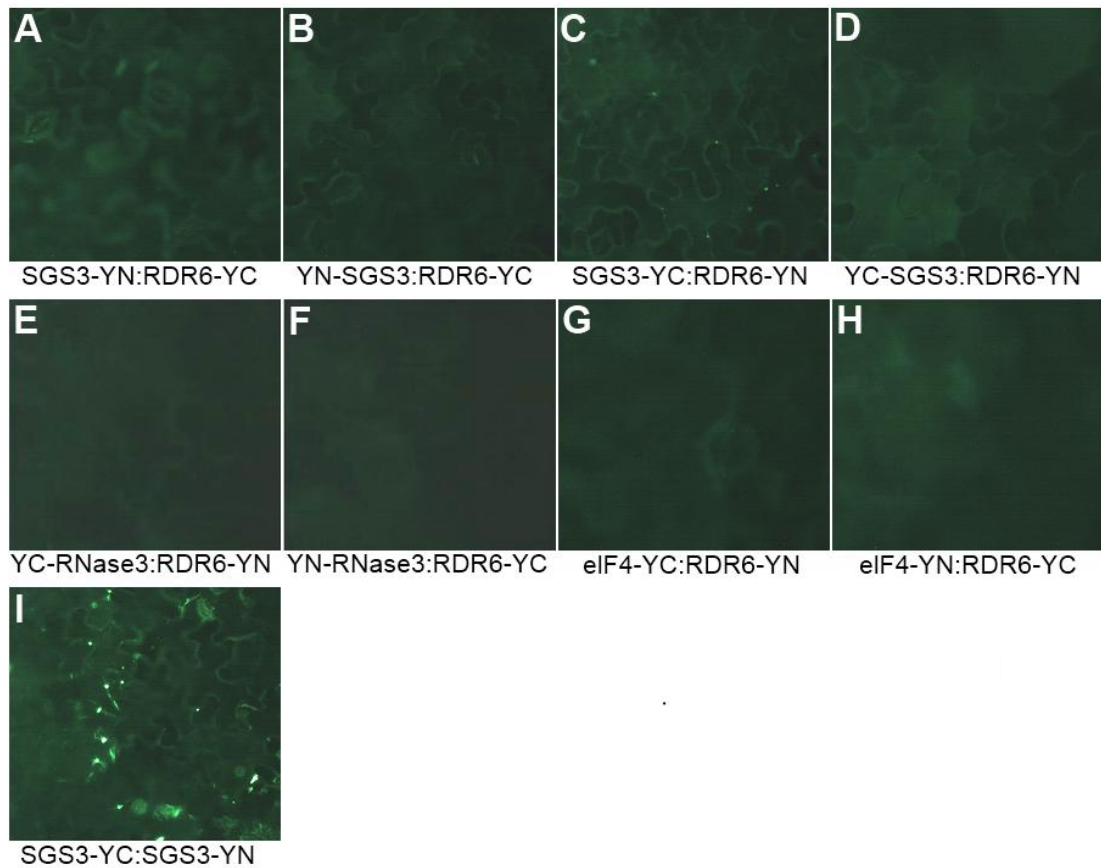
VPg- ja RDR6-konstrukteja sisältäneistä agrobakteerikäsitellyistä lehdistä ei ollut havaittavissa vihreää fluoresenssia (Kuva 12 A-D). Myöskään negatiivisissa kontroleissa ei ollut havaittavissa vihreää fluoresenssia (Kuva 12 E-F).



Kuva 12. PVA-VPg:n ja RDR6:n vuorovaikutusten tutkiminen BiFC-menetelmällä. Epifluoresenssimikroskoopilla otetut kuvat (25x suurennos) ovat *N. benthamiana*-kasvin lehdistä, joille suoritettiin VPg:n ja RDR6:n YN- ja YC- fuusiokonstrukteja sisältäviä agrobakteerikäsittelyjä. (A-D) VPg, jonka amino- tai karboksipäähän on liitetty YN- tai YC-fragmentti, ja RDR6, jonka karboksipäähän on liitetty YN- tai YC-fragmentti. (E-F) Negatiiviset kontrollit, jotka sisälsivät SGS3:n aminopäähän liitetyt YC- tai YN-fragmentit sekä VPg:n karboksipäähän liitetyt YC- tai YN-fragmentit. (G) Positiivisena kontrollina VPg:n itseinteraktio. Kuvat on otettu 3 sekunnin valotusajalla 3 päivää agrobakteerikäsittelyn jälkeen.

SPCSV-RNase3:n ja RDR6:n välillä ei havaittu proteiinien välistä vuorovaikutusta (Kuva 13 E, F). Fluoresenssia ei ollut havaittavissa myöskään negatiivisista kontrolloista (Kuva 13 G, H). Sen sijaan SGS3- ja RDR6-proteiinien välinen vuorovaikutus (Kumakura ym. 2009) havaittiin BiFC-menetelmällä. Tämä vuorovaikutus todettiin (Kuva 13 C) yhdenlaisella fuusiokombinaatiolla (SGS3-YC:RDR6-YN), jonka lisäksi myös SGS3:n itseinteraktio näkyi selkeästi fluoresoivan valon perusteella (Kuva 13 I).

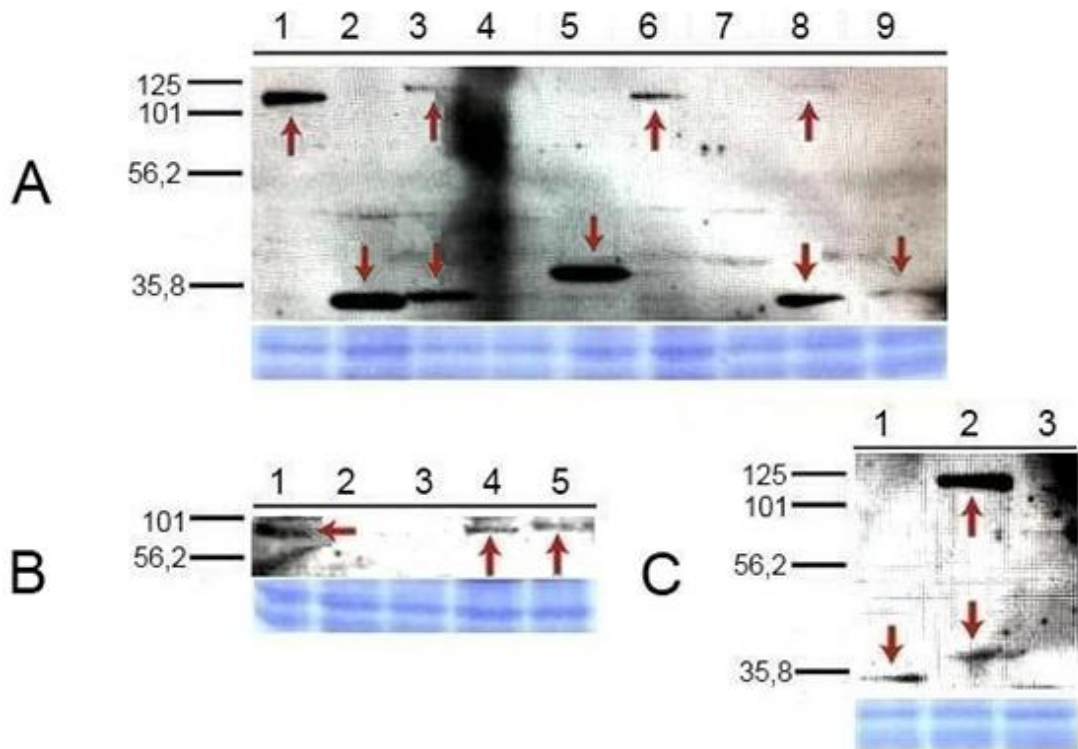
SGS3:n itseinteraktio oli havaittavissa selkeästi sytoplasmassa fluoresoivina pisteinä, joita oli havaittavissa tasaisesti koko mikroskopoidulta lehtialalta.



Kuva 13. SGS3- ja RNase3-proteiinien ja RDR6:n vuorovaikutusten tutkiminen BiFC-menetelmällä. Epifluoresenssimikroskoopilla otetut kuvat (25x suurennos) ovat *N. benthamiana*-kasvin lehdistä, joille suoritettiin SGS3n ja RDR6:n YN- ja YC- fuusiokonstrukteja sisältäviä agrobakteerikäsittelyjä. (A-D) SGS3, jonka aminotai karboksipäähän on liitetty YN- tai YC-fragmentti, ja RDR6, jonka karboksipäähän on liitetty YN- tai YC- fragmentti. (E-F) SPCSV-RNase3:n ja RDR6:n vuorovaikutusten tutkiminen agrobakteerikäsittelyillä, jotka sisälsivät RNase3:n karboksipäähän liitetyn YN- tai YC- fragmentin sekä RDR6:n aminopäähän liitetyn YN- tai YC- fragmentin. (G-H) Negatiiviset kontrollit, jotka sisälsivät RDR6:n ja perunan eIF(iso)4EB-geenin karboksipäähän liitetty YC- tai YN-fragmentit. (I) SGS3:n itseinteraktio. Kuvat on otettu 3 sekunnin valotusajalla 3 päivää agrobakteerikäsittelyn jälkeen.

5.2.4 BiFC-menetelmässä käytettyjen pLH-vektoreiden ilmentymisen tarkistaminen western blot -menetelmällä

Western blot -menetelmällä testattiin BiFC-menetelmässä käytettyjen vektoreiden ilmentymistä kasvisoluista varmistaen etteivät mahdolliset ongelmat vektoreiden ilmentymisessä haitanneet proteiinien välisten vuorovaikutusten havaitsemista.



D

Näyte	Kuva A	Kuva B	Kuva C
1	VPg-YN/SGS3-YC	VPg-YC/SGS3-YN	eIF4-YC/YN-SGS3
2	YC-VPg/YN-SGS3	YC-VPg/SGS3-YN	YN-VPg/SGS3-YC
3	VPg-YC/SGS3-YN	VPg-YN/YC-SGS3	YN-VPg/YC-SGS3
4	VPg-YN/YC-SGS3	YC-VPg/YN-SGS3	
5	eIF4-YC/YN-SGS3	YC-VPg/SGS3-YN	
6	eIF4-YN/SGS3-YC		
7	eIF4-YN/YC-SGS3		
8	YC-VPg/SGS3-YN		
9	VPg-YC/YN-SGS3		

* YN- ja SGS3-fuusioiden kokoa (114 kDa), YC- ja SGS3-fuusioiden kokoa (106 kDa), YN- ja VPg-fuusioiden kokoa (66 kDa), YC- ja VPg-fuusioiden kokoa (59 kDa), YN- ja eIF4-fuusioiden kokoa (68 kDa), YC- ja eIF4-fuusioiden kokoa (60 kDa).

Kuva 14. Fuusioproteiinien ilmentyminen kasvisoluissa western blot -menetelmällä tutkittuna. Nuolilla on merkitty proteiinit, jotka vastaavat ilmennettyn proteiinin sekä YN- tai YC-alueen yhteenlaskettua kokoa kilodaltonneina (A-C). Western blot-kokeissa käytetyt näytteet ja niissä ilmentyvät proteiinit, keltaisella fuusiokonstruktit joiden kokoa* vastaava proteiini näkyy nuolten osoittamana (D).

Tällä menetelmällä havaittiin kolmen SGS3-, kolmen VPg- ja eIF4-YC-fuusioproteiinien ilmentyminen. Havaitsematta jäivät kaikki AGO1-, RNase3-, ja RDR6- fuusioproteiinit. Tämän lisäksi YC-SGS3-, VPg-YN- sekä eIF4-YN-fuusioproteiinien ilmentymistä ei havaittu (Kuva 14, taulukko 14).

Taulukko 14. BiFC-menetelmässä käytettyjen fuusiokonstruktioiden ilmentyminen western blot -menetelmällä tutkittuna.

Proteiini	Fuusiokonstruktio	Ilmentyminen western blot-menetelmässä*
SGS3	SGS3-YN	+
	SGS3-YC	+
	YN-SGS3	+
	YC-SGS3	-
VPg	VPg-YN	-
	VPg-YC	+
	YN-VPg	+
	YC-VPg	+
AGO1	AGO1-YN	-
	AGO1-YC	-
	YN-AGO1	-
	YC-AGO1	-
RNase3	YN-RNase3	-
	YC-RNase3	-
RDR6	RDR6-YN	-
	RDR6-YC	-
eIF4	eIF4-YN	-
	eIF4-YC	+

* +, fuusiokonstruktion kokoa vastaava proteiinituote havaittiin; -, ei havaittu.

6 TULOSTEN TARKASTELU

6.1 Havaitut proteiinien väliset vuorovaikutukset

6.1.1 PVA-VPg- ja SGS3-proteiinien välinen vuorovaikutus

Perunan A-viruksen VPg-proteiinin ja lituruohon SGS3-proteiinin välistä vuorovaikutusta ei ole aikaisemmin raportoitu. Vaikka PVA-VPg:llä on aikaisemmin todettu kykyä estää RNA-hiljennystä, tässä työssä osoitettiin ensimmäistä kertaa VPg:n sitoutuvan suoraan RNA-hiljennystä ylläpitävään proteiiniin. Aikaisemmin on osoitettu kahden muun RNA-hiljennystä estävän virusproteiinin sitoutuvan SGS3-proteiiniin (Glick ym. 2008, Du ym. 2011).

Vuorovaikutus VPg:n ja SGS3:n välillä havaittiin luotettavasti käyttäen kahta eri menetelmää. Koska SGS3-proteiinin on esitetty mahdollistavan RDR-polymeraasien toiminnan kaksijuosteisen RNA:n tuotannossa (Mourrain ym. 2000), saattaa VPg-SGS3-vuorovaikutus häiritä joko RDR-välitteistä RNA-hiljennyksen aloitusta tai voimistusreaktiota. SGS3-proteiiniin sitoutuvista RNA-hiljennyksenestäjistä TYLCV:n V2-proteiini estää yksijuosteiseen DNA-virukseen kohdistuvaa RNA-hiljennystä (Glick ym. 2008). Vaikka *Geminiviridae*-heimon virukset eivät tuota kaksijuosteista RNA:ta replikoitumisen aikana, ne pystyvät silti saamaan aikaan hiljennysreaktion. Tämä tapahtuu todennäköisesti RDR-polymeraasien tuottaessa dsRNA:ta viruksen yksijuosteisista RNA-molekyyleistä (Dalmy ym. 2000), sillä SGS3-proteiinin toiminnan on todettu olevan edellytyksenä RDR-polymeraasin toiminnalle ja hiljennysreaktiolle *Geminiviridae*-heimon viruksia vastaan (Muangsan ym. 2004). Tämän perusteella on oletettavaa, että V2-proteiinin vuorovaikutus SGS3-proteiinin kanssa estää kaksijuosteisen RNA:n tuottamisen ja tätä kautta RNA-hiljennyksen aloituksen.

PVA:n VPg-proteiinin toimintamekanismi RNA-hiljennyksen estämisessä SGS3:een sitoutumalla saattaa olla samanlainen kuin V2-proteiinilla. PVA:n VPg-proteiini pystyy estämään RNA-hiljennystä joka on saatu aikaan yksijuosteisen RNA:n ylituotannon avulla. Kaksijuosteista RNA:ta tuottavan konstruktin aiheuttama hiljennyksen estäminen ei onnistu VPg:llä (Rajamäki & Valkonen 2009, Germundsson ym. 2007).

YTHS:llä tutkittaessa VPg:n a- ja b-mutanteilla todettiin heikentynyt kyky sitoutua SGS3-proteiiniin hiivojen kasvunopeuksien perusteella. Saman vuorovaikutuksen tarkastelu BiFC-menetelmällä kuitenkin osoitti VPg:n mutanttien voimakkaampaa vuorovaikutusta SGS3:n kanssa runsaamman fluoresenssin perusteella. Näiden havaintojen perusteella mutaatiot tumalokalisaatiota ohjaavissa sekvensseissä häiritsevät vuorovaikutusta SGS3-proteiinin kanssa, mutta eivät estä sitä kokonaan. Tällöin VPg:n tumaan viemisen häiriintyessä voidaan BiFC-menetelmällä todeta VPg-mutanttien voimakkaampi vuorovaikutus sytoplasmisen SGS3-proteiinin kanssa.

SGS3- ja VPg-proteiinien välinen vuorovaikutus pystyttiin havaitsemaan YTHS:llä vain silloin, kun VPg-proteiini oli fuusioituna aktivointialueen sisältävään vektoriin. Myös Rajamäki ja Valkonen (2009) totesivat tämän VPg-proteiinin osalta ja esittivät kyseisen proteiinin laskostuvan oikeaan tertiäärirakenteeseen vain AD-vektorista tuotettuna. BiFC-kokeiden osalta VPg:n ja SGS3:n välinen vuorovaikutus havaittiin vain, kun YFP-proteiinin amino tai karboksipään puolisko oli fuusioituna SGS3-proteiinin karboksipäähän. Tämä viittaisi SGS3-proteiinin oikeanlaiseen tertiääriseen laskostumiseen vain kyseisissä orientaatioissa, tai steeristen esteiden aiheuttamiin ongelmiin SGS3-proteiineissa, joiden aminopäähän oli fuusioitu vieras proteiini.

Tulosten luotettavuutta VPg- ja SGS3-proteiinien välisestä vuorovaikutuksesta lisäävät positiiviset tulokset molempien proteiinien ilmentymisestä. Tämän lisäksi todettiin kaikkien niiden (paitsi VPg-YN) BiFC-menetyksessä käytettyjen proteiinien ilmentyminen, joilla pystyttiin havaitsemaan proteiinien välinen vuorovaikutus. Tämän perusteella voidaan sulkea pois vaihtoehto, että konstruktioiden pelkkä YN- tai YC-alue olisi ilmentynyt ja aiheuttanut näennäisen proteiinien välisen vuorovaikutuksen.

6.1.2 SPCSV-RNase3- ja SGS3-proteiinien välinen vuorovaikutus

Bataatin kitukasvuviruksen RNase3-proteiinin ja lituruohon SGS3-proteiinin välistä vuorovaikutusta ei ole aikaisemmin raportoitu. RNase3-proteiinin on osoitettu sijoittuvan RDR6-polymeraasin kanssa samoihin kohtiin sytoplasmassa, joten sitoutuminen joko SGS3- tai RDR6-proteiiniin on katsottu mahdolliseksi (Weinheimer, Haikonen, Rajamäki; julkaisematon tieto). SPCSV-RNase3:n toiminta RNA-hiljennysreaktion estämisessä on aikaisemmin liitetty sen kykyyn hajottaa siRNA-molekyylejä (Kreuze ym. 2005, Cuellar ym. 2009). Tässä tutkielmassa todettiin BiFC-menetyksellä apuna käyttäen RNase3:n ja SGS3:n välinen vuorovaikutus, joka tuloksena ei ole täysin luotettava johtuen western blot -kokeiden tuloksista

RNase3-proteiinin on osoitettu estävän yksijuosteisella RNA:lla aloitettua hiljennysreaktiota (Cuellar ym. 2009). Vastaavaa hiljennyksen estämistä ei kuitenkaan ole havaittu aloitettaessa hiljennysreaktio kaksijuosteista RNA:ta muodostavalla konstruktilla (Kreuze ym. 2005). Tämän perusteella on oletettavaa että RNase3-proteiinin sitoutuminen SGS3-proteiiniin johtaisi RDR-polymeraasin toiminnan estymiseen RNA-hiljennysreaktion alkuvaiheessa, kuten edellä kuvatus VPg-SGS3-vuorovaikutuksen kohdalla.

Cuellar ym. (2009) osoittivat SPCSV-RNase3-proteiinin kyvyn estää RNA-hiljennysreaktiota olevan täysin riippuvainen sen endonukleasiaktiivisuudesta. Näissä kokeissa käytettiin endonukleasiaktiivisuuden menettänyttä RNase3-Ala-mutanttia, joka ei pystynyt estämään RNA-hiljennysreaktiota agrobakteerilla käsiteltyjen GFP-transgeenisten *N. benthamiana*-kasvien lehdissä. Tämän perusteella RNase3- ja SGS3-proteiinien välinen vuorovaikutus voisi olla edellytyksenä kyseisen RNA-hiljennyksenestäjän ohjautumiselle kasvisolussa, tai se voisi mahdollistaa SGS3-proteiinin jonkin vielä tuntemattoman toimintatavan häiritsemisen.

RNase3- ja SGS3-proteiinien välinen vuorovaikutus havaittiin BiFC-menetelmällä, mutta ei YTHS:llä. Koska molempien proteiinien tuotto hiivavektoreista pystyttiin toteamaan western blot -menetelmällä, saattoi vuorovaikutuksen havaitsematta jääminen johtua tutkittaviin proteiineihin fuusioitujen AD- ja BD-alueiden aiheuttamista steerisistä esteistä. Koska RNase3:n ilmentymistä kummankaan BiFC-menetelmässä käytetystä konstruktista ei pystytty havaitsemaan, eivät BiFC-menetelmän tulokset ole tältä osin täysin luotettavia. Tämän lisäksi YC- tai YN-alue oli fuusioituna RNase3:n aminopäähän, jolloin on mahdollista että vain YC- tai YN-alue olisi ilmentynyt ja fluoresenssi oli aiheutunut pelkän YC- tai YN-proteiinin vuorovaikutuksesta vastinparinsa kanssa. Ottaen huomioon kuitenkin YTHS:llä tutkittavien vuorovaikutusten tapahtuvan pelkästään tumassa, on RNase3- ja SGS3-proteiinien välinen vuorovaikutus täysin mahdollinen. Tämä perustuu kyseisen vuorovaikutuksen havaitsemiseen BiFC-menetelmällä lehtisolujen sytoplasmassa eikä tumassa, joka voisi selittää vuorovaikutuksen havaitsematta jäämisen YTHS:llä.

6.1.3 PVA-VPg- ja AGO1-proteiinien välinen vuorovaikutus

Tutkielmassa havaittu kolmas aikaisemmin tuntematon proteiinien välinen vuorovaikutus todettiin PVA:n VPg:n ja AGO1:n välillä. RNA-hiljennystä ylläpitävistä proteiineista AGO1:llä on eniten raportoituja proteiinien välisiä vuorovaikutuksia RNA-hiljennyksenestäjien kanssa (Zhang ym. 2006, Bortolamiol ym. 2007, Azevedo ym. 2010, Giner ym. 2010, Chiu ym. 2010).

AGO-proteiinien toiminnan perusteella RNA-hiljennyksessä (Morel ym. 2002, Vaucheret 2008) saattaisi VPg- ja AGO1-proteiinien välinen vuorovaikutus häiritä RISC-kompleksin toimintaa. Tämä voisi tapahtua joko estämällä RISC-kompleksin muodostumista, tai estämällä suoraan AGO1-proteiinin endonukleaasiaktiivisuutta. Esimerkiksi CMV:n 2b-proteiinin on osoitettu estävän RISC-komplekseilla olevien AGO1-proteiinien endonukleaasiaktiivisuutta (Zhang ym. 2006), kun taas poliovirusten P0-proteiinin on osoitettu sitoutuvan pääasiassa AGO1-proteiineihin, jotka eivät ole ladattuja siRNA-molekyyleillä (Csorba ym. 2009).

PVA-VPg:n ja AGO1:n välinen vuorovaikutus havaittiin YTHS:llä tutkittaessa, mutta ei BiFC-menetelmää käyttäen. Koska molempien hiivavektoreiden ilmentyminen pystyttiin toteamaan, ovat YTHS-tulokset tältä osin luotettavia. Yhdenkään BiFC-menetelmässä käytetyn AGO1-konstruktin ilmentymistä ei todettu, joka voi osaltaan selittää miksi tällä menetelmällä ei pystytty havaitsemaan proteiinien välistä vuorovaikutusta. Toisaalta on mahdollista että VPg- ja AGO1-proteiinien välistä vuorovaikutusta ei tapahdu normaalioloissa.

Kaikkien RNA-hiljennyksenestäjien havaittiin sitoutuvan AGO2-proteiiniin, minkä lisäksi kyseisen kasviproteiinin todettiin olevan vuorovaikutuksessa tutkimuksessa kontrollina käytetyn fibrillaariproteiinin kanssa. Tämän perusteella AGO2-proteiinin todettiin olevan niihin proteiineihin herkästi tarttuva, mikä tuottaa YTHS:llä tutkittaessa vääriä positiivisia tuloksia. Tämä voi johtua joko proteiinin luontaisesta kyvystä sitoutua useisiin proteiineihin, tai niiden alfa-helikaasien kierrakenteiden taipumuksesta sitoutua epäspesifisesti useanlaisiin proteiineihin (Serebriiskii ym. 2000). Tämän perusteella YTHS:llä saadut tulokset AGO2-proteiinin vuorovaikutuksista eivät ole luotettavia.

6.2 Proteiinit joiden välillä ei havaittu vuorovaikutusta

6.2.1 Hiivan kaksihybridimenetelmä

YTHS:n perusteella lukuisten kasvi- ja virusproteiinien välillä ei ollut vuorovaikutusta. Tulos on sinänsä odotettu, sillä kyseisiä vuorovaikutuksia on raportoitu vain kymmenkunta. Koska edellä mainitut havainnot saattoivat johtua myös proteiinien ilmentymisen estymisestä hiivasoluissa, tutkittiin tätä western blot -menetelmän avulla ja tarkastelemalla RNA-hiljennyksenestäjien itseinteraktioita. Koska tutkielmassa tarkasteltujen RNA-hiljennyksenestäjien tiedetään dimerisoituvan (Robertson ym. 1968, Dunn 1976, Thornby ym. 1985, Guo ym. 2001, Oruetxebarria ym. 2001, Grzela ym. 2008, Cuellar ja Valkonen julkaisematon tieto), käytettiin tietoa RNA-hiljennyksenestäjien itseinteraktioista tulkitsemaan hiivakonstruktioiden odotetunlaista ilmentymistä.

Ainoastaan PVY- ja PVV-VPg-proteiinien itseinteraktiota ei pystytty toteamaan. Kuitenkin kyseisten VPg-proteiinien AD-konstruktioiden todettiin ilmentyvän, kun proteiineja tutkittiin western blot -menetelmän avulla. Koska PVA-VPg-proteiinin vuorovaikutuksen on aikaisemmin todettu AD-vektoriin kloonattuna (Rajamäki ja Valkonen 2009), on oletettavaa että myös muiden potyvirusien VPg-proteiinit voivat olla vuorovaikutuksessa muiden proteiinien kanssa AD-fuusiona tuotettuna. Koska PVY- ja PVV-VPg-proteiinien vuorovaikutuksia tarkasteltiin vain AD-vektorista tuotettuna, lienevät tulokset tältä osin varsin luotettavia. Itseinteraktioiden havaitsematta jääminen saattoi johtua joko ongelmista BD-konstruktioiden ilmentymisessä, tai siitä syystä että tutkitut proteiinit eivät todellisuudessa ole vuorovaikutuksessa keskenään. Tämän vuoksi PVY- ja PVV-VPg-proteiinien mahdollista itseinteraktiota tulisi tutkia käyttäen esimerkiksi BiFC-menetelmää. Tämän lisäksi tässä tutkimuksessa käytettyjen BD-konstruktioiden ilmentyminen tulisi tarkastaa western blot -menetelmän avulla.

Muista YTHS:ssä käytetyistä konstrukteista PVY-HC-pro:n AD- ja SPCSV-p22:n BD-konstruktioiden ilmentymistä ei voitu osoittaa western blot -menetelmän avulla, mutta hiivan kasvu viittasi siihen, että proteiinit ilmentyivät ja että niillä oli kyky dimerisoitua. Tulosten ristiriitaisuus saattoi johtua käytettyjen vasta-aineiden

epäspesifisestä sitoutumisesta proteiineihin, sillä membraaneista otetuista kuvista oli havaittavissa useita erikokoisia proteiineja. Tämän vuoksi odotetun kokoisien proteiinien erottaminen useista muista proteiineista oli mahdotonta. Nämä western blot -kokeet toistettiin moneen kertaan käyttäen uusia näytteitä ja vasta-aineliuoksia. Tästä huolimatta näiden muutaman edellä mainitun proteiinin ilmentymistä ei pystytty havaitsemaan. Sekvensoinnin perusteella kyseiset konstruktit olivat kuitenkin oikeanlaisia.

Lituruohon RDR6-geenin YTHS-kloonauksia sekvensoitaessa huomattiin ko. templaattissa kaksi emäsmuutosta verrattuna lituruohon julkaistuun genomiin; emäs nro. 1242 oli vaihtunut adeniinista tyymiiniin, sekä emäs nro. 1908 oli vaihtunut guaniinista adeniiniksi. Mutaatiot eivät kuitenkaan muuttaneet aminohappoja.

6.2.2 BiFC-menetelmä

Western blot -menetelmällä pystyttiin havaitsemaan vain muutaman BiFC-kokeissa käytetyn pLH-vektorin ilmentyminen. Kolme näistä konstrakteista olivat VPg- ja kolme SGS3-geenin sisältäviä vektoreita, joten tulokset ainoastaan VPg- ja SGS3-proteiinien välisestä vuorovaikutuksesta olivat luotettavia (Taulukko 15). Koska minkään RDR6-, RNase3- tai AGO1-konstruktin ilmentymistä ei todettu, eivät tulokset kyseisiä vektoreita sisältäneistä vuorovaikutustutkimuksista ole luotettavia.

Taulukko 15. BiFC-menetelmällä tutkitut proteiinien väliset vuorovaikutukset.

	SGS3	RDR6	AGO1	Itseinteraktio
VPg	+	-*	-*	+
RNase3	+*	-*	et	+*

* Ongelmia yhden tai useamman tutkimuksessa käytetyn vektorin ilmentymisen kanssa. Et, ei tutkittu

Testaamalla tunnettuja proteiinien välisiä vuorovaikutuksia ja itseinteraktioita saatiin viitteellistä tietoa RDR6-YN-konstruktin, kaikkien VPg- ja SPCSV-RNase3-konstruktien sekä SGS3-proteiinin karboksipään YC- ja YN-fuusiokonstruktien toimivuudesta. Esimerkiksi VPg-proteiinin itseinteraktion myötä pystyttiin toteamaan konstruktien ilmentymisen lisäksi myös kyseisen proteiinin aikaisemmin raportoitu tuma- ja tumajyvälokalisaatio (Rajamäki ja Valkonen 2009). Myös

SPCSV-RNase3-proteiinin itseinteraktion havaitsemisen viittasi molempien RNase3-konstruktien toimivuuteen. Näissä konstrukteissa YN- tai YC-alue oli kuitenkin liitetty RNase3-proteiinin aminopäähän, joka lisää mahdollisuutta pelkän YN- tai YC-alueen aiheuttamasta näennäisestä vuorovaikutuksesta.

BiFC-menetelmällä tutkituista kahdesta RNA-hiljennystä ylläpitävästä proteiinista havaittiin Elmayan ym. (2009) raportoima SGS3-proteiinin itseinteraktio. Tämän lisäksi havaittiin Kumakuran ym. (2009) raportoima SGS3- ja RDR6-proteiinien välinen vuorovaikutus, joka on olennainen todiste SGS3-proteiinin toiminnasta RNA-hiljennyksessä kaksijuosteisen RNA:n prosessoinnissa. Tämän vuorovaikutuksen myötä osoitettiin samalla RDR6-YN-konstruktin toimivuus. YN- tai YC-alueet oli liitettyä tutkittujen proteiinien karboksipäähän, lisäten tulosten luotettavuutta konstruktien ilmentymisestä.

6.3 Jatkotutkimukset

Ensimmäisenä jatkotutkimuksena tulisi osoittaa tutkielmassa havaittujen kolmen proteiinien välisen vuorovaikutuksen vaikutus RNA-hiljennysreaktioon ja sen estämiseen. Tämä voitaisiin toteuttaa Voinnet'in ja Baulcomben (1997) kuvailemalla agrobakteerikäsittelyllä GFP-transgeenisen *N. benthamiana*-kasviin. RNA-hiljennyksenestäjistä tulisi käyttää mutaatioita, joiden sitoutuminen SGS3-proteiiniin olisi estynyt. Tällaisia mutaatioita olisi mahdollista valmistaa kartoittamalla aluksi proteiinin sitoutumiseen osallistuvia alueita esim suurehkojen deletiomutaatioiden avulla, joiden häiriintynyt sitoutuminen SGS3-proteiiniin varmistettaisiin esim. YTHS:n avulla. Kun vuorovaikutukseen osallistuva alue proteiinista tiedettäisiin, pystyttäisiin suunnittelemaan samalla periaatteella tarkempia mutaatioita kyseiseen alueeseen. Tämän jälkeen pystyttäisiin vertaamaan RNA-hiljennyksenestäjän ja sen mutaatioiden vaikutusten eroja RNA-hiljennysreaktion estämisessä.

Esimerkiksi Glick ym. (2008) käyttivät tällaista koesarjaa V2-proteiinin vaikutusten tutkimiseksi, ja pystyivät osoittamaan V2-SGS3-vuorovaikutuksen vaikuttavan RNA-hiljennysreaktionestämiseen. Kuten Glick ym (2008), tulisi näissä kokeissa käyttää hiljennysreaktion indusorina GFP:n yksijuosteista mRNA:ta muodostavaa

konstruktia, koska sekä PVA-VPg- että SPCSV-RNase3-proteiinien ei ole todettu estävän kaksijuosteisella RNA:lla aloitettua hiljennysreaktiota.

RNase3-Ala-mutantın sitoutumista SGS3-proteiiniin kanssa tulisi tutkia esim. BiFC-menetelmää käyttäen. Cuellar ym. (2009) pystyivät osoittamaan endonukleaasiaktiivisuuden olevan edellytyksenä hiljennysreaktion estämiselle, mutta näissä tutkimuksissa ei tarkasteltu kyseisen mutantin ja SGS3-proteiinin välistä vuorovaikutusta. Näiden tutkimusten perusteella ei voida tietää häiriintyikö mutaation myötä myös RNase3- ja SGS3-proteiinien välinen vuorovaikutus, jolla voisi olla vaikutusta esim. RNase3-proteiinin ohjautumiseen solukossa. Tämän lisäksi BiFC-menetelmällä tulisi tutkia uudestaan RDR6-proteiinin mahdolliset vuorovaikutukset konstrukteilla, joissa YN- ja YC-alue olisivat liitettyinä proteiinin aminopäähän. Tämä tulisi tehdä myös RNase3-proteiinin osalta konstrukteilla, joissa vastaavat alueet olisivat liitettyinä tutkittavan proteiinin karboksipäähän. Tämän lisäksi BiFC-tutkimuksissa käytettyjen RDR6- ja RNase3-konstruktien ilmentyminen tulisi osoittaa western blot -kokeiden avulla.

Jos tutkielmassa havaittujen proteiinien välisten vuorovaikutusten todettaisiin vaikuttavan RNA-hiljennysreaktion estämiseen, tulisi RNA-hiljennyksenestäjien sitoutumiskohta SGS3- ja AGO1-proteiineissa tutkia tarkemmin. Esimerkiksi Zhang ym (2006) tutkivat CMV:n 2b-proteiinin tarkempaa sitoutumista AGO1-proteiiniin käyttämällä *AGO1*-mutantteja, jotka sisälsivät eri alueilla olevia deleetioita. Samalla menetelmällä pystyttäisiin määrittämään PVA-VPg-proteiinin tarkempi sitoutumiskohta AGO1-proteiinissa, sekä SPCSV-RNase3- ja PVA-VPg-proteiinien sitoutumiskohdat SGS3-proteiinissa.

Sitoutuminen proteiiniin eri alueille antaisi viitteitä vuorovaikutuksen tarkasta toimintatavasta. Esimerkiksi estääkö PVA-VPg-proteiinin sitoutuminen AGO1-proteiiniin RISC-kompleksin muodostumista vai AGO1-proteiinin endonriboukleaasiaktiivisuutta? Edellä mainitun vuorovaikutuksen osalta tarkempaa funktiota pystyttäisiin tutkimaan myös esimerkiksi RISC-kompleksin rekonstruktioilla (Zhang ym 2006), tai etsimällä PVA-VPg:stä glysiini- ja tryptofaani-rikkaita (GW) alueita, joiden kautta sitoutuminen AGO1-proteiiniin estää sen sitoutumista muihin oletettuihin RISC-kompleksiin osallistuviin proteiineihin

(Azevedo ym. 2010). Vastaavasti SGS3-proteiinin tunnettujen toimintojen ja proteiinialueiden perusteella saattaisi RNA-hiljennyksenestäjien sitoutuminen estää joko kyseisen proteiinin dimerisaatiota, RDR6-interaktiota tai vuorovaikutuksia RNA-molekyylien kanssa. Vaikutuksia näihin funktioihin voitaisiin tutkia tarkastelemalla RNA-hiljennyksenestäjien ja RDR6-proteiinin sitoutumiskohtia SGS3-proteiinissa, joiden ”päällekkäisyys” voisi kieliä esimerkiksi SGS3-RDR6-vuorovaikutuksen häiriintymisestä RNA-hiljennyksenestäjien vaikutuksesta.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän tutkielman tarkoituksena oli määrittää proteiinien välisiä vuorovaikutuksia RNA-hiljennystä ylläpitävien kasviproteiinien sekä crini- ja potyvirusen proteiinien välillä. Kasviproteiinit valittiin niiden aikaisemmin raportoitujen virusproteiini-vuorovaikutusten perusteella, kun taas virusproteiinit valikoituivat tutkimuksiin niiden aikaisemmin todettujen RNA-hiljennyksenestäjä-aktiivisuuksien perusteella. Tämän lisäksi sekä kasvi- että virusproteiineja valittiin tutkimuksiin aikaisemmin suoritettujen proteiinien soluun sijoittumista tutkivien kokeiden perusteella. Vuorovaikutuksia tutkittiin käyttäen BiFC-menetelmää ja YTHS:ää.

Tutkimuksissa löydettiin kolme aikaisemmin tuntematonta proteiinien välistä vuorovaikutusta. Perunan A-viruksen VPg-proteiinin osoitettiin sitoutuvan suoraan RNA-hiljennystä ylläpitäviin SGS3- ja AGO1-proteiineihin. Tämän lisäksi bataatin kitukasvuviruksen RNase3-proteiinin todettiin sitoutuvan SGS3-proteiiniin, joka on myös ensimmäinen havainto kyseisen RNA-hiljennyksenestäjän sitoutumisesta RNA-hiljennystä ylläpitävään kasviproteiiniin. Näiden tulosten ohella havaittiin, että monien RNA-hiljennyksenestäjien ja RNA-hiljennystä ylläpitävien proteiinien välillä ei ollut vuorovaikutusta. Näiden tulosten luotettavuutta tukevat tulokset western blot-kokeista sekä havainnot tutkittujen proteiinien tiedetyistä vuorovaikutuksista sekä itseinteraktioista.

Jos PVA-VPg- ja AGO1-proteiinien välinen vuorovaikutus pystytään varmistamaan esim. BiFC-menetelmällä, voidaan kyseisen vuorovaikutuksen myötä olettaa RISC-kompleksin muodostumisen tai AGO1-proteiinin endoribonukleaasiaktiivisuuden

häiriintyvän. Vastaavasti PVA-VPg- ja SPCSV-RNase3-proteiinien sitoutuminen SGS3-proteiiniin saattaa estää RNA-hiljennysreaktion aloitusta estämällä RDR6-polymeraasin toimintaa kaksijuosteisen RNA:n tuottamisessa. Tutkimalla tarkemmin näiden RNA-hiljennyksenestäjien sitoutumiskohtia kasviproteiineissa, pystyttäisiin ehkä pitkällä aikavälillä tarjoamaan jalostukseen alleeleja joihin kyseiset RNA-hiljennyksenestäjät eivät sitoudu.

8 KIITOKSET

Ensinnäkin haluaisin kiittää ohjaajaani Minna Rajamäkeä neuvoista ja ohjauksesta sekä kokeiden toteutuksessa että varsinaisessa kirjoitusprosessissa. Tämän lisäksi haluaisin kiittää myös muita kasvivirologian ryhmän tutkijoita ja opiskelijoita kannustuksesta sekä loistavan työilmapiirin luomisesta. Suurkiitokset myös perheelle ja ystäville saamastani tuesta koko tämän pitkän prosessin ajalta.

9 LÄHTEET

Agranovsky, A., Folimonov, A., Folimonova, S., Morozov, S., Schiemann, J.,

Lesemann, D. & Atabekov, J. 1998. Beet yellows closterovirus HSP70-like protein mediates the cell to cell movement of a potexvirus transport deficient mutant and a hordeivirus based chimeric virus. *Journal of General Virology* 79: 889-895.

Alicai, T., Fenby, N., Gibson, R., Adipala, E., Vetten, H., Foster, G. & Seal, S. 1999.

Occurrence of two serotypes of sweet potato chlorotic stunt virus in East Africa and their associated differences in coat protein and HSP70 homologue gene sequences. *Plant Pathology* 48: 718-726.

Aliyari, R. & Ding, S. 2009. RNA based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. *Immunological Reviews* 227: 176-188.

- Alvarado, V. & Scholthof, H.B. 2009. Plant responses against invasive nucleic acids: RNA silencing and its suppression by plant viral pathogens. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20: 1032-1040.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H. & Vance, V.B. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 13079-13084.
- Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., Garcia, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M.A., Lagrange, T. & Voinnet, O. 2010. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen encoded GW repeat protein. *Genes & Development* 24: 904-915.
- Bartel, D. 2004. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297.
- Bartel, P., Chien, C.T., Sternglantz, R. & Fields, S. 1993. Elimination of false positives that arise in using the 2-hybrid system. *BioTechniques* 14: 920-924.
- Bateman, A. 2002. The SGS3 protein involved in PTGS finds a family. *BMC Bioinformatics* 3: 21-24.
- Baulcombe, D. 2007. Amplified silencing. *Science* 315: 199-200.
- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363.

- Bayne, E., Rakitina, D., Morozov, S. & Baulcombe, D. 2005. Cell to cell movement of Potato potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant Journal* 44: 471-482.
- Be'clin, C., Boutet, S., Waterhouse, P. & Vaucheret, H. 2002. A branched pathway for transgene induced RNA silencing in plants. *Current Biology* 12: 684-688.
- Bernstein, E., Caudy, A., Hammond, S. & Hannon, G. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P. & Ziegler-Graff, V. 2007. The polerovirus F box protein PO targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Current Biology* 17: 1615-1621.
- Brent, R. & Ptashne, M. 1985. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 43: 729-736.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W. & Baulcombe, D.C. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Embo Journal* 17: 6739-6746.
- Brueckner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. & Schlattner, U. 2009. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 2763-2788.
- Burgyan, J. & Havelda, Z. 2011. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science* 16: 265-272.

- Carrington, J., Cary, S., Parks, T. & Dougherty, W. 1989. A 2nd proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *Embo Journal* 8: 365-370.
- Carrington, J. & Dougherty, W. 1987. Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *Journal of Virology* 61: 2540-2548.
- Carrington, J., Freed, D. & Leinicke, A. 1991. Bipartite signal sequence mediates nuclear translocation of the plant potyviral NIa protein. *Plant Cell* 3: 953-962.
- Celenza, J., Eng, F. & Carlson, M. 1989. Molecular analysis of the Snf4 gene of *Saccharomyces Cerevisiae* -Evidence for physical association of the Snf4 protein with the Snf1 protein-kinase. *Molecular and Cellular Biology* 9: 5045-5054.
- Chiu, M., Chen, I., Baulcombe, D.C. & Tsai, C. 2010. The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Molecular Plant Pathology* 11: 641-649.
- Clontech. 2010. Matchmaker gold yeast two-hybrid system user manual. www.clontech.com/xxclt_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17597&minisite=10023&secItmId=16105. Viitattu 12.12.2012.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16: 10881-10890.
- Csorba, T., Pantaleo, V. & Burgyan, J. 2009. RNA silencing: An antiviral mechanism. *Advances in Virus Research* 75: 35-71.

- Cuellar, W.J., Kreuze, J.F., Rajamäki, M.L., Cruzado, K.R., Untiveros, M. & Valkonen, J.P.T. 2009. Elimination of antiviral defense by viral RNase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 10354-10358.
- Curtin, S.J., Watson, J.M., Smith, N.A., Eamens, A.L., Blanchard, C.L. & Waterhouse, P.M. 2008. The roles of plant dsRNA binding proteins in RNAi-like pathways. *FEBS letters* 582: 2753-2760.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. & Baulcombe, D.C. 2000. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101:543-553.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. & Voinnet, O. 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313: 68-71.
- Deshaies, R. 1999. SCF and cullin/RING H2-based ubiquitin ligases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15: 435-467.
- Dorfman, B. 1969. Isolation of adenylosuccinate synthetase mutants in yeast by selection for constitutive behavior in pigmented strains. *Genetics* 61: 377-389.
- Du, Z., Xiao, D., Wu, J., Jia, D., Yuan, Z., Liu, Y., Hu, L., Han, Z., Wei, T., Lin, Q., Wu, Z. & Xie, L. 2011. p2 of Rice stripe virus (RSV) interacts with OsSGS3 and is a silencing suppressor. *Molecular Plant Pathology* 12: 808-814.

- Dunn, J.J. 1976. Rnase-Iii cleavage of single-stranded RNA - Effect of ioni strength on fidelity of cleavage. *Journal of Biological Chemistry* 251: 3807-3814.
- Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J.C. & Voinnet, O. 2010. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science* 328: 912-916.
- Elmayan, T., Adenot, X., Gissot, L., Laressergues, D., Gy, I. & Vaucheret, H. 2009. A neomorphic sgs3 allele stabilizing miRNA cleavage products reveals that SGS3 acts as a homodimer. *Febs Journal* 276: 835-844.
- El-Shami, M., Pontier, D., Lahmy, S., Braun, L., Picart, C., Vega, D., Hakimi, M., Jacobsen, S.E., Cooke, R. & Lagrange, T. 2007. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes & Development* 21: 2539-2544.
- Fields, S. & Song, O. 1989. A novel genetic system to detect protein protein interactions. *Nature* 340: 245-246.
- Garcia, J., Riechmann, J. & Lain, S. 1989. Proteolytic activity of the plum pox potyvirus-Nia-like protein in *Escherichia Coli*. *Virology* 170: 362-369.
- Germundsson, A., Savenkov, E.I., Ala-Poikela, M. & Valkonen, J.P.T. 2007. VPg of Potato virus A alone does not suppress RNA silencing but affects virulence of a heterologous virus. *Virus Genes* 34: 387-399.

- Gibson, R., Mpembe, I., Alicai, T., Carey, E., Mwanga, R., Seal, S. & Vetten, H. 1998. Symptoms, aetiology and serological analysis of sweet potato virus disease in Uganda. *Plant Pathology* 47: 95-102.
- Gietz, D., Stjean, A., Woods, R. & Schiestl, R. 1992. Improved method for high-efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research* 20: 1425-1425.
- Giner, A., Lakatos, L., Garcia-Chapa, M., Jose Lopez-Moya, J. & Burgyan, J. 2010. Viral protein inhibits RISC activity by Argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *Plos Pathogens* 6: e1000996.
- Giniger, E., Varnum, S. & Ptashne, M. 1985. Specific DNA-binding of Gal4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40: 767-774.
- Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., Gidoni, D., Belausov, E., Citovsky, V. & Gafni, Y. 2008. Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 157-161.
- Gonzalez, I., Martinez, L., Rakitina, D.V., Lewsey, M.G., Atencio, F.A., Llave, C., Kalinina, N.O., Carr, J.P., Palukaitis, P. & Canto, T. 2010. Cucumber mosaic virus 2b protein subcellular targets and interactions: Their significance to RNA silencing suppressor activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 294-303.

- Grzela, R., Szolajska, E., Ebel, C., Madern, D., Favier, A., Wojtal, I., Zagorski, W. & Chroboczek, J. 2008. Virulence factor of potato virus Y, genome attached terminal protein VPg, is a highly disordered protein. *Journal of Biological Chemistry* 283: 213-221.
- Guo, D.Y., Rajamäki, M.L, Saarma, M., Valkonen, J.P.T. 2001. Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *Journal of General Virology* 82: 935-939.
- Guo, H.S. & Ding, S.W. 2002. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *Embo Journal* 21: 398-407.
- Haas, G., Azevedo, J., Moissiard, G., Geldreich, A., Himber, C., Bureau, M., Fukuhara, T., Keller, M. & Voinnet, O. 2008. Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *Embo Journal* 27: 2102-2112.
- Haas, M., Geldreich, A., Bureau, M., Dupuis, L., Leh, W., Vetter, G., Kobayashi, K., Hohn, T., Ryabova, L., Yot, P. & Keller, M. 2005. The open reading frame VI product of Cauliflower mosaic virus is a nucleocytoplasmic protein: Its N terminus mediates its nuclear export and formation of electron dense viroplasms. *Plant Cell* 17: 927-943.
- Hamera, S., Song, X., Su, L., Chen, X. & Fang, R. 2012. Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4 related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant Journal* 69: 104-115.

- Hammond, S.M. 2005. Dicing and slicing - The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS letters* 579: 5822-5829.
- Han, M., Goud, S., Song, L. & Fedoroff, N. 2004. The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 1093-1098.
- Hellmann, G., Shaw, J. & Rhoads, R. 1988. In vitro analysis of tobacco vein mottling virus Nia cistron -evidence for a virus-encoded protease. *Virology* 163: 554-562.
- Herr, A.J., Molnar, A., Jones, A. & Baulcombe, D.C. 2006. Defective RNA processing enhances RNA silencing and influences flowering of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 14994-15001.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. 1992. The ubiquitin system for protein-degradation. *Annual Review of Biochemistry* 61: 761-807.
- Hill, J., Donald, K. & Griffiths, D. 1991. DMSO enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Research* 19: 5791-5791.
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K. & Fukuhara, T. 2005. Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* 57: 173-188.

- Hiscox, J.A. 2007. RNA viruses: Hijacking the dynamic nucleolus. *Nature Reviews Microbiology* 5: 119-127.
- Hope, I. & Struhl, K. 1986. Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, Gcn4 of yeast. *Cell* 46: 885-894.
- Hu, C., Chinenov, Y. & Kerppola, T. 2002. Visualization of interactions among bZip and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell* 9: 789-798.
- Hu, C. & Kerppola, T. 2003. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature Biotechnology* 21: 539-545.
- Hutvagner, G. & Simard, M.J. 2008. Argonaute proteins: Key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 22-32.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology* 153: 163-168.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. & Fields, S. 1993. Use of the 2-hybrid system to identify the domain of P53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8: 1693-1696.
- Jamous, R. M., Boonrod, K., Fuellgrabe, M. W., Ali-Shtayeh, M. S., Krczal G. & Wassenegger, M. 2011. The helper component-proteinase of the Zucchini yellow mosaic virus inhibits the Hua Enhancer 1 methyltransferase activity in vitro. *Journal of General Virology* 92: 2222–2226.

- Johansen, L.K. & Carrington, J.C. 2001. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium mediated transient expression system. *Plant Physiology* 126: 930-938.
- Johnsson, N. & Varshavsky, A. 1994. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 10340-10344.
- Karasev, A. 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annual Review of Phytopathology* 38: 293-324.
- Karyeija, R., Gibson, R. & Valkonen, J. 1998. The significance of Sweet potato feathery mottle virus in subsistence sweet potato production in Africa. *Plant Disease* 82: 4-15.
- Karyeija, R., Kreuze, J., Gibson, R. & Valkonen, J. 2000. Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem-limited crinivirus in sweet potato plants. *Virology* 269: 26-36.
- Kasschau, K. & Carrington, J. 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95: 461-470.
- Keegan, L., Gill, G. & Ptashne, M. 1986. Separation of DNA binding from the transcription activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231: 699-704.
- Kerppola, T. 2006. Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 449-456.

- Kerppola, T.K. 2008. Biomolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annual Review of Biophysics* 37: 465-487.
- Kim, S.H., MacFarlane, S., Kalinina, N.O., Rakitina, D.V., Ryabov, E.V., Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J.W.S. & Taliany, M. 2007. Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 11115-11120.
- Klaassen, V. A., Boeshore, M. L., Koonin, E. V., Tian, T., & Falk B. W. 1995. Genome structure and phylogenetic analysis of lettuce infectious yellows virus, a whitefly-transmitted, bipartite closterovirus. *Virology* 208: 99-110.
- Kortemaa, H. 2007. Virustaudit kiusaavat siemenperunaa. *Koetoiminta ja käytäntö* 64: 7.
- Kreuze, J.F., Savenkov, E.I., Cuellar, W., Li, X.D. & Valkonen, J.P.T. 2005. Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *Journal of Virology* 79: 7227-7238.
- Kreuze, J., Savenkov, E. & Valkonen, J. 2002. Complete genome sequence and analyses of the subgenomic RNAs of Sweet potato chlorotic stunt virus reveal several new features for the genus Crinivirus. *Journal of Virology* 76: 9260-9270.

- Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R. & Watanabe, Y. 2009. SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS letters* 583: 1261-1266.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D. & Burgyan, J. 2004. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *Embo Journal* 23: 876-884.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, J.C., Liu, Y., Dolja, V.V., Calvino, L.F., Lopez-Moya, J.J. & Burgyan, J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *Embo Journal* 25: 2768-2780.
- Li, B. & Fields, S. 1993. Identification of mutations in P53 that affect its binding to Sv40 large T-Antigen by using the yeast 2-hybrid system. *Faseb Journal* 7: 957-963.
- Li, J.J., Yang, Z.Y., Yu, B., Liu, J. & Chen, X.M. 2005. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Current Biology* 15: 1501-1507.
- Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.E., Smith, D.P. & Wang X. 2003. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. *Science* 301: 1921-1925.
- Love, A.J., Laird, J., Holt, J., Hamilton, A.J., Sadanandom, A. & Milner, J.J. 2007. Cauliflower mosaic virus protein P6 is a suppressor of RNA silencing. *Journal of General Virology* 88: 3439-3444.

- Lozsa, R., Csorba, T., Lakatos, L. & Burgyan, J. 2008. Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing suppressor proteins. *Nucleic Acids Research* 36: 4099-4107.
- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W.X., Falk, B.W., Dawson, W.O. & Ding, S.W. 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 15742-15747.
- Luban, J. & Goff, S.P. 1995. The yeast two-hybrid system for studying protein—protein interactions. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 59-64.
- Merai, Z., Kerényi, Z., Kertész, S., Magna, M., Lakatos, L. & Silhavy, D. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology* 80: 5747-5756.
- Moissiard, G. & Voinnet, O. 2004. Viral suppression of RNA silencing in plants. *Molecular Plant Pathology* 5: 71-82.
- Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R. & Baulcombe, D.C. 2010. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328: 872-875.
- Morel, J., Godon, C., Mourrain, P., Beclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F. & Vaucheret, H. 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* 14: 629-639.

- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J., Jouette, D., Lacombe, A., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T. & Vaucheret, H. 2000. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101: 533-542.
- Muangsan, N., Beclin, C., Vaucheret, H. & Robertson, D. 2004. Geminivirus VIGS of endogenous genes requires SGS2/SDE1 and SGS3 and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants. *Plant Journal* 38: 1004-1014.
- Mukasa, S., Rubaihayo, P. & Valkonen, J. 2006. Interactions between a crinivirus, an ipomovirus and a potyvirus in coinfecting sweetpotato plants. *Plant Pathology* 55: 458-467.
- Nagai, T., Sawano, A., Park, E. & Miyawaki, A. 2001. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 3197-3202.
- Oruetxebarria, I., Guo, D., Merits, A., Makinen, K., Saarma, M. & Valkonen, J. 2001. Identification of the genome-linked protein in virions of Potato virus A, with comparison to other members in genus Potyvirus. *Virus Research* 73: 103-112.
- Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M. & Vaucheret, H. 1997. Systemic acquired silencing: Transgene specific post transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non silenced scions. *Embo Journal* 16: 4738-4745.

- Park, W., Li, J.J., Song, R.T., Messing, J. & Chen, X.M. 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 12: 1484-1495.
- Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Brault, V., Hemmer, O., Kretsch, T., Richards, K., Genschik, P. & Ziegler-Graff, V. 2006. F-box-like domain in the poliovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 1994-1999.
- Pham, T.A., Kawai, S. & Murata, K. 2011. Visualization of the synergistic effect of lithium acetate and single stranded carrier DNA on *Saccharomyces cerevisiae* transformation. *Current Genetics* 57: 233-239.
- Rajamäki, M. & Valkonen, J.P.T. 2009. Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like Potato virus A in *Nicotiana* species. *Plant Cell* 21: 2485-2502.
- Richards, F. 1958. On the enzymic activity of subtilisin modified ribonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 44: 162-166.
- Robertson, H.D., Webster, R.E., & Zinder, N.D. 1968. Purification and properties of ribonuclease 3 from *Escherichia Coli*. *Journal of Biological Chemistry* 243: 82-91.
- Roger Hull. 2004. Matthews' Plant Virology. 4th Edition. San Diego, Calif: Academic Press. 1001 pp.

- Schaad, M., HaldemanCahill, R., Cronin, S. & Carrington, J. 1996. Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: Effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *Journal of Virology* 70: 7039-7048.
- Schauer, S.E., Jacobsen, S.E., Meinke, D.W. & Ray, A. 2002. DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends in Plant Science* 7: 487-491.
- Schiestl, R. & Gietz, R. 1989. High-efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics* 16: 339-346.
- Serebriiskii, I., Estojak, J., Berman, M. & Golemis, E. 2000. Approaches to detecting false positives in yeast two-hybrid systems. *BioTechniques* 28: 328-336.
- Silhavy, D., Molnar, A., Luciola, A., Szitty, G., Hornyik, C., Tavazza, M. & Burgyan, J. 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21-to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *Embo Journal* 21: 3070-3080.
- Stachel, S., Messens, E., Vanmontagu, M. & Zambryski, P. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-Dna transfer in *Agrobacterium Tumefaciens*. *Nature* 318: 624-629.
- Struhl, K. & Davis, R. 1977. Production of a functional eukaryotic enzyme in *Escherichia Coli* cloning and expression of yeast structural gene for imidazoleglycerolphosphate dehydratase (His3). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5255-5259.

- Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H. & Mello, C.C. 2002. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* 109: 199-211.
- Tairo, F., Mukasa, S., Jones, R., Kullaya, A., Rubaihayo, P. & Valkonen, J. 2005. Unravelling the genetic diversity of the three main viruses involved in Sweet Potato Virus Disease (SPVD), and its practical implications. *Molecular Plant Pathology* 6: 199-211.
- Thornby, D., Hellmann, G., Rhoads, R. & Pirone, T. 1985. Purification and characterization of Potyvirus helper component. *Virology* 144: 260-267.
- Till, S., Lejeune, E., Thermann, R., Bortfeld, M., Hothorn, M., Enderle, D., Heinrich, C., Hentze, M.W. & Ladurner, A.G. 2007. A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nature Structural & Molecular Biology* 14: 897-903.
- Tolia, N.H. & Joshua-Tor, L. 2007. Slicer and the Argonautes. *Nature Chemical Biology* 3: 36-43.
- Vaistij, F.E., Jones, L. & Baulcombe, D.C. 2002. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* 14: 857-867.
- van Regenmortel, M. H., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, 2000, *Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses: The seventh report of the international committee on taxonomy of viruses*. 1st edition. San Diego, Calif: Academic Press. 1162 pp.

- Vance, V. 1991. Replication of Potato virus-X RNA is altered in coinfections with Potato virus-Y. *Virology* 182: 486-494.
- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyan, J. & Hall, T.M.T. 2003. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115: 799-811.
- Vaucheret, H. 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science* 13: 350-358.
- Voinnet, O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics* 17: 449-459.
- Voinnet, O. & Baulcombe, D.C. 1997. Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389: 553-553.
- Voinnet, O., Lederer, C. & Baulcombe, D.C. 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103: 157-167.
- Voinnet, O., Pinto, Y. & Baulcombe, D. 1999. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 14147-14152.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. & Baulcombe, D.C. 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95: 177-187.

- Volland, C., Urbangrimal, D., Geraud, G. & Haguenuertsapis, R. 1994. Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *Journal of Biological Chemistry* 269: 9833-9841.
- Wang, D.W. & Maule, A.J. 1995. Inhibition of host gene expression associated with plant virus replication. *Science* 267: 229-231.
- Wang, M. B. & Waterhouse, P.M. 2000. High efficiency silencing of a *b* glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but independent of DNA methylation. *Plant Molecular Biology* 43: 67-82.
- Wassenegger, M. & Krczal, G. 2006. Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends in Plant Science* 11: 142-151.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W. & Wang, M. B. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 13959-13964.
- Xie, Z.X., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. & Carrington, J.C. 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *Plos Biology* 2: 642-652.
- Ye, Q.A. & Worman, H.J. 1995. Protein-Protein Interactions between Human Nuclear Lamins Expressed in Yeast. *Experimental Cell Research* 219: 292-298.

- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M. & Poethig, R. 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & Development* 19: 2164-2175.
- Zhang, D. & Trudeau, V.L. 2008. The XS domain of a plant specific SGS3 protein adopts a unique RNA recognition motif (RRM) fold. *Cell Cycle* 7: 2268-2270.
- Zhang, X., Yuan, Y., Pei, Y., Lin, S., Tuschl, T., Patel, D.J. & Chua, N. 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & Development* 20: 3255-3268.
- Zhou, C., Yang, Y. & Jong, A. 1990. Mini-Prep in 10 Minutes. *BioTechniques* 8: 172-173.
- Zilberman, D., Cao, X. & Jacobsen, S. 2003. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299: 716-719.