

**Keraheina laiguviiruse viraalse genoomiseoselise valgu ning  
kõrreliste translatsiooni initsiatsioonifaktori iso4G interaktsiooni  
uuringud**

Magistritöö

Üliõpilane: Mihkel Jaan Balodis, BSc

Peajuhendaja: Cecilia Sarmiento, PhD,

Keemia ja biotehnoloogia instituut, vanemteadur

Kaasjuhendaja: Merike Sõmera, PhD,

Keemia ja biotehnoloogia instituut, vanemteadur

Õppekava: Rakenduskeemia ja biotehnoloogia

## Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Mihkel Jaan Balodis

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle/magistritööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Cecilia Sarmiento

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees:

[allkiri ja kuupäev]

**Studies on the interaction between the cocksfoot mottle virus  
genome-linked viral protein and the translation initiation factor  
iso4G of grasses**

Master of Science Thesis

Student: Mihkel Jaan Balodis, BSc

Supervisor: Cecilia Sarmiento, PhD,

Department of chemistry and biotechnology, Senior Researcher

Co-supervisor: Merike Sõmera, PhD,

Department of chemistry and biotechnology, Senior Researcher

Study programme: Applied Chemistry and Biotechnology

# Sisukord

## Sisukord

Sisukord .....	4
1. Lühendid .....	6
2. Sissejuhatus .....	8
3. Kirjanduse ülevaade .....	9
3.1 Sobemoviirused .....	9
3.1.2 Keraheina laiguviirus .....	10
3.2 Eukarüootne translatsiooni initsiatsioon .....	11
3.2.1 43S pre-initsiatsioonikompleksi moodustumine ja selle sidumine metionuül- initsiaator-tRNA-ga .....	11
3.2.2 43S pre-initsiatsioonikompleksi sidumine mRNA-ga ning 48S preinitsiatsioonikompleksi moodustumine .....	12
3.2.3 Ribosomaalne skanneering .....	12
3.2.4 80S kompleksi moodustumine .....	12
3.3 Translatsiooni initsiatsioonifaktorite häiring viiruste poolt .....	13
3.4 5'UTR positsioonis asuvad enhanserid: IRES elemendid, 5'CITE elemendid, VPg valgud ja Ω- järjestus .....	13
3.4.1 IRES elemendid .....	13
3.4.2 5'CITE elemendid .....	14
3.4.3 VPg valgud .....	14
3.4.4 Ω-järjestus .....	15
3.5 3' UTR regioonis paiknevad enhanserid .....	15
3.5.1 tRNA sarnased struktuurid (TLS) .....	15
3.5.2 5'cap-sõltumatud translatsiooni enhanser-elemendid 3'UTR regioonis .....	15
3.6 Viiruste RNA replikatsiooni reguleerimine translatsioonifaktorite poolt .....	16
3.7 Valk-valk interaktsioonide uurimine .....	17
3.7.1 Eksperimentaalsed valk-valk interaktsioonide uurimise meetodid .....	17
3.7.1 Bimolekulaarne fluorestsentsi komplementatsioon (BiFC) .....	17
3.7.2 Pärimi kaksikhübridi meetod (Y2H) .....	18
3.7.3 Afiinsuse puhastus- massispektromeetria (AP-MS) .....	18
3.7.4 Bioinformaatilised meetodid .....	18
3. Töö eesmärgid: .....	20
4. Materjalid ja meetodid .....	21
4.1 Materjalid .....	21

4.2 Taimse materjali kasvatamine.....	21
4.3 Bimolekulaarne fluorestsentsi komplementatsioon (BiFC) .....	21
4.3.1 Antibiootikumid.....	21
4.3.2 Agrobakteri kompetentsete rakkude valmistamine .....	21
4.3.3 Plasmiidse DNA eraldamine .....	22
4.3.4 Agrobakterite säilitamine glütseroolilahuses.....	22
4.3.5 Agrotransformatsioon .....	22
4.3.6 Agroinfiltratsioon .....	23
4.3.7 Mikroskopeerimine .....	23
4.4 PCR .....	23
4.5 Geelelektroforees ja pilditöötlus.....	24
4.6 Valkude modelleerimine .....	24
5. Tulemused.....	25
5.1 BiFC katsed .....	25
5.2 In silico modelleerimine kasutades <i>AlphaFold 2</i> ja <i>Swiss PDB Viewer</i> .....	35
6. Arutelu.....	38
7. Kokkuvõte.....	40
8. Abstract .....	41
9. Kasutatud kirjandus.....	42
12. Lisad.....	45

## 1. Lühendid

BiFC– bimolekulaarne fluorestsentsi komplementatsioon

bp – aluspaar (i.k. base pair)

CfMV – keraheina laiguviirus (i.k. Cocksfoot mottle virus)

CP – kattevalk (i.k. coat protein)

DEST – sihtmärkvektor (i.k. destination)

DNA – desoksüribonukleinhape

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

eIF – eukarüootne translatsiooni initsiatsioonifaktor

HEAT- *Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A, target of rapamycin*

ICTV – i.k. International Committee on Taxonomy of Viruses

kDa – kilodalton

LB – vedelsööde (i.k. *lysogeny broth*)

MES – 2-[N-morfolino]etaansulfoonhape

NCBI – i.k. National Center for Biotechnology Information

OD<sub>600</sub> – optiline tihedus 600 nm lainepikkusel

ORF – avatud lugemisraam (i.k. open reading frame)

PABP– Polü(A)siduv valk

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (i.k. polymerase chain reaction)

RdRp – RNA-sõltuv RNA polümeraas

RGMoV– *Ryegrass Mosaic virus*

RNA – ribonukleinhape; mRNA – matriits-RNA

RNAas – ribonukleaas (i.k. RNase)

rpm – pööret minutis (i.k. revolutions per minute)

RYMV – riisi kollalaiksusviirus (i.k. Rice yellow mottle virus)

SBMV– *Southern bean mosaic virus*

SeMV– *Sesbania mosaic virus*

TAE – Tris-atsetaat-EDTA

TRov– *Turnip rosette virus*

UTR – mittetransleeritav regioon (i.k. untranslated region)

VPg – viiraalne genoomiseoseline valk (i.k. viral genome-linked protein)

VPgM– VPg Ser71ala mutantne vorm

## 2. Sissejuhatus

Keraheina laiguviirus (cocksfoot otle virus- CfMV) on sobemoviiruste perekonda kuuluv taimeviirus. CfMV nakatab peamiselt söödataimena kasvatatavat harilikku keraheina (*Dactylis glomerata*), kuid on võimeline nakatama ka majanduslikult tähtsamaid, söögiks kasvatatavaid kultuurtaimi nagu nisu, kaer ja oder (Sõmera, et al. 2015).

Sobemoviirustele omaselt, sisaldab CfMV genoomne ja subgenoomne RNA 5' otsale kovalentselt seondunud viraalset genoomiseoselist valku (VPg), mis arvataval interaktsioonil eFiso4G valguga viib läbi translatsiooni initsiatsiooni protsessi viraalsete valkude ekspresseerimiseks viiruse genoomselt ja subgenoomselt RNA-lt ning läbi selle võimaldab infektsiooni. Selles magistritöös käsitleti CfMV nii VPg, kui ka selle muteeritud versiooni VPgM (VPg valk, kus 71. positsioonis seriin, mis infektsioonil fosforüleeritakse, on asendatudalaniiniga; (Olsper *et al.*, 2011).

Magistritöös uuriti potentsiaalseid interaktsioone kahe kaerasordi "Jaak" ja "Veli" ning nesusordi "Zebra" eFiso4G HEAT1/HEAT2 domäänide ja CfMV VPg/VPgM vahel. Interaktsioonikatsed viidi läbi bimolekulaarse fluorestsentsi komplementatsiooni meetodiga (BiFC) mudeltaimes *Nicotiana benthamiana*. Lisaks modelleeriti CfMV VPg ja selle muteeritud versiooni VPgM ning eFiso4G HEAT1 ja HEAT2 domäänide võimalikku interaktsiooni AlphaFold2 ja Swiss PDB Viewer programmidega. In silico modelleerimise eesmärk oli aru saada, kuidas paiknevad interaktsioonil CfMV VPg/VPgM ning eFiso4G domäänid teineteise suhtes.

Töö tulemuseks saadi, et interaktsioonid on võimalikud nii CfMV VPg kui selle mutandi VPgM ning kõigi uuritud eFiso4G HEAT1 ja HEAT2 domäänide vahel. Samuti nähti, et CfMV VPg ja VPgM ei oma omavahelist erinevust interaktsioonides HEAT1 ja HEAT2 domäänidega.



## 3. Kirjanduse ülevaade

### 3.1 Sobemoviirused

Sobemoviiruse perekonda kuuluvad taimi nakatavad positiivse ahelaga üheaahelised polütsistroomsed RNA viirused. Hetkeseisuga kuulub sobemoviiruste perekonda 28 ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) poolt tunnustatud viiruseliiki (Sõmera et al, 2021). Sobemoviirused on globaalse levikualaga ning põhjustavad nakatunud taimedel sümptomeid nagu kloroos, kasvu kängumine või steriilsus. Haigus võib mööduda taimel kas sümptomiteta, sümptomitega või letaalselt. Sobemoviiruste virioonid on umbes 26-31nm läbimõõduga ning omavad 180 alaühikust koosnevat kapsiidi, mis on T=3 ikosaheedrilise sümmeetriaga. Sobemoviiruste genoom on 4.0-4.5 kb suurune ning osadel sobemoviirustel on lisaks 220-390 nukleotiidi pikkune viroidi-sarnane satelliit RNA (Andrew et al. 2012).

Sobemoviirustele on iseloomulik 5' otsas paiknev VPg (viraalne genoomiseoseline valk) ning 3' otsast puuduv polüA saba. Lisaks on sobemoviirustele iseloomulik *cap*-struktuuri puudumine 5' otsas, mis tähendab, et 5' ja 3' mitte-transleeritavad regioonid (UTR) peavad kompenseerima nende funktsioone (Sõmera & Sarmiento & Truve, 2015). Viiruste aedoa mosaiikviirus (SBMV), raiheina laiguviirus (RGMoV), keraheina laiguviirus (CfMV) ja riisi kollalaiguviirus (RYMV) pealt läbi viidud uuringute põhjal on teada, et sobemoviiruste VPg on seotud viraalse RNA-ga, moodustades fosfodietersidemed RNA 5' fosfaatrühma ja aminohappejäägi hüdroksüülrühma vahel VPg N-terminuses. Liigispetsiifiliselt on selleks aminohappejäägiks kas seriin, türosiin või treoniin (Olspert et al 2011). RYMV 5'UTR koos VPg-ga osaleb ribosoomi värbamisel translatsiooniks, interakteerudes eukarüootse translatsiooni initsiatsioonifaktori eIFiso4G-ga (Hébrard et al 2006). Samuti võib 5'UTR iseseisvalt käituda kui translatsiooni enhanser näiteks CfMV  $\epsilon$ , mille puhul on eksperimentaalselt näidatud, et see on efektiivne reporter geenide ekspresseerija kaera suspensioonrakkudes (Mäkeläinen, 2006).

Sobemoviiruste genoom koosneb viiest avatud lugemisraamist: ORF1, ORFx, ORF2a, ORF2b ja ORF3, millest ORFid 1, x ja 2a ja 2b (2b transleeritakse tänu ribosomaalsele raaminihkele ORF2a raamist ORF2b raami) on transleeritud läbi „lekkiva skanneeringu“ mehhanismi viiruse genoomsest RNA-st ning ORF3 on transleeritud subgenoomselt RNA-lt (Ling, et al. 2013). Sobemoviiruste ORF1, mis paikneb genoomi 5' otsas, kodeerib valku P1, mille põhiliseks funktsiooniks on RNA-vaigistamine ning RYMV P1 osaleb ka translatsiooni järgse geenivaigistamise pärssimises. Samuti osaleb P1 valk viiruse süsteemes liikumises taimes (Meier et al. 2006). Valku Px kodeeriv ORFx paikneb samuti genoomi 5' pool, kattudes osaliselt ORF1 ja samuti ORF2a-ga. Naeri rosettviiruse (TRoV) ORFx *knockout* mutantidega tehtud uuringute põhjal on välja selgitatud, et ORFx kodeeritud Px omab rolli taime süsteemsel nakatumisel. Mutandid, millel oli puudulik Px ekspressioon, polnud suutelised süstemaatiliselt nakatama TRoV peremeestaime müürlooka (*A. thaliana*). ORFx-ile on iseloomulik AUG-startkoodoni puudumine kõikides sekveneeritud sobemoviiruste genoomides, seega sõltub selle translatsiooni initsiatsioon AUG-koodonile alternatiivsest startkoodonist (näiteks, TRoV puhul koodonid AUU, GUG, AUC, AUU ja UUG) (Ling, et al. 2013).

Osaliselt kattuvad regioonid ORF2a ja ORF2b ekspresseerivad polüproteiine P2a (ORF2a-lt) ja P2ab (ORF2a-lt ja ORF2b-lt), millel on identne N-terminaalne osa, kuid erinev C-terminaalne osa. Polüproteiinide P2a ja P2ab N-terminaalne osa koosneb membraani ankurdavast domäänist ning seriinproteaaasi ja VPg domäänidest. Polüproteiin P2a C-terminaalne ots pole sobemoviiruste vahel konserveerunud. SeMV ja RYMV P2a C-terminaalne ots sisaldab ATPaasi aktiivsusega domääni P10 ning nukleiinhapet siduvat domääni P8 (Sömera & Sarmiento & Truve, 2015; Nair & Savithri, 2010). ORF2ab-lt transleeritakse polüproteiin P2ab, mille C-terminaalne ORF2b raamilt transleeritud osa kujutab endast RNA sõltuvat RNA polümeraasi (RdRp). Selle tootmiseks on vaja -1 programmeeritud ribosomaalset raaminihet, mis algab kui enamuse P2a valgust on transleeritud. Raaminihke signaal koosneb kahest elemendist: sobemoviirustes konserveerunud „libedat“ järjestust (*slippery sequence*) UUUAAAC, kus saab toimuda raaminihe ning tüvi-silmus struktuurist, mis reguleerib raaminihke efektiivsust (Sömera & Sarmiento & Truve, 2015).

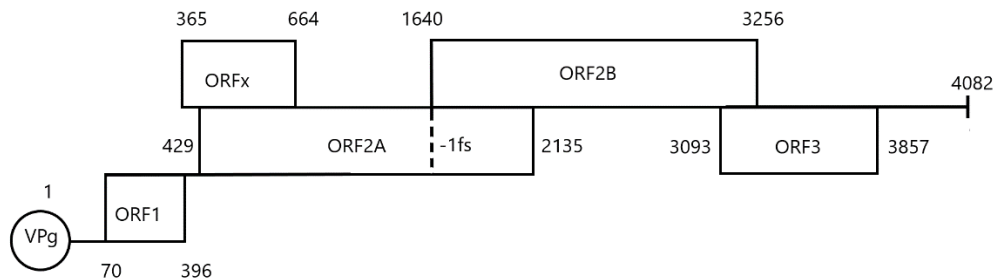
Sobemoviiruste polüproteiinide P2a ja P2ab proteolüüsi viib läbi viiruse seriinproteaaas. Nagu eelnevalt mainitud - P2a ja P2ab N-terminaalne ots sisaldab membraani ankurdatavat domääni läbi mille seondub polüproteiin rakumembraanide külge, kus saab alguse seriinproteaaasi ja VPg-d sisaldava domääni auto-proteolüüsi. Seriinproteaaasi ja VPg kompleks on vajalik, et tagada proteaaasi *cis*- ja *trans* katalüütiline aktiivsus - seriinproteaaas üksi on konformatsiooniga, milles see pole võimeline läbi viima proteolüüsi (Satheshkumar, 2004; Nair & Savithri, 2010). Seriinproteaaasi ja VPg kompleks viib läbi edasise P2a ja P2ab proteolüütilise töötuse, katalüüsides peptiidsidemete hüdrolüüsi spetsiifilistes polüproteiini lõikesaitides. (Satheshkumar, 2005).

Viiruse kattevalk on kodeeritud genoomi 3' otsas asuva ORF3 poolt. Kattevalk osaleb viiruse süsteemses liikumises taimes, interakteerub RNA-vaigistust pärssiva valguga P1-ga ning täidab struktuurset rolli, kaitstes viraalset pärilikusainet. CfMV puhul, lisaks valgule P1, omab kattevalk ise ka RNA-vaigistust pärssivat funktsiooni (Tamm & Truve, 2000; Meier et al, 2008). Polüproteiinist lahtilõigatud VPg on seondunud genoomi 5' otsaga ning osaleb translatsiooni initsiatsioonil, asendades puuduvat *cap*-struktuuri. RYMV VPg interakteerub translatsiooni initsiatsioonifaktoriga eIF(iso)4G, selle tsentraaldomääni MIF4G kaudu, millele järgneb translatsiooni initsiatsioon läbi ribosoomide värbamise (Hébrard et al. 2010).

### 3.1.2 Keraheina laiguviirus

Keraheina laiguviirus (CfMV) on sobemoviiruste perekonda kuuluv taimeviirus, mis nakatab kõrrelisi (*Poaceae*). CfMV nakatab peamiselt harilikku keraheina (*Dactylis glomerata*), kuid on suuteline nakatama ka erinevaid majanduslikult tähtsaid kultuurtaimi nagu nisu (*Triticum aestivum*), kaera (*Avena sativa*), rukist (*Secale cereale*) ja otra (*Hordeum vulgare*) (Hodge & Stewart, 2020). CfMV siseneb taime läbi putukvektori või läbi mehaanilise vigastuse. (Campbell & Guy 2001). Lehtede lokaalse nakatumise korral, paiknesid viiruseosakesed valdavalt lehe mesofüllis, kuid peale kimbutupe rakkude läbimist võis neid leida ka floemi parenhüümis. Taime süsteemse nakatumise korral, paiknevad CfMV virionid nakatunud lehe või varre või juure juhtkimbu rakkudes, hilisemates nakkusstaadiumites levib viirus lehtedes, peamiselt floemi kaudu, juhtkimpu ümbritsevasse mesofüllis (Otsus et al 2012). CfMV genoom on positiivse ahelaga ssRNA, mis koosneb 4082 nukleotiidist, mis koosneb sobemoviirustele omaselt viiest avatud lugemisraamist (ORF1, ORFx, ORF2a, ORF2b ja ORF3), 69 nukleotiidi pikkusest 5'UTR-ist ja 225

nukleotiidi pikkusest 3'UTR-ist (Mäkinen et al, 1995). Keraheina laiguviiruse genoomne organisatsioon on kujutatud joonisel 1.



**Joonis 1. CfMV genoomi organisatsioon.** Näidatud on lugemisraamid ja algus- ning lõpupositsioonid. Genoomi 5' otsas, ringi sees, on näidatud VPg

## 3.2 Eukarüootne translatsiooni initsiatsioon

### 3.2.1 43S pre-initsiatsioonikompleksi moodustumine ja selle sidumine metionüül-initsiaator-tRNA-ga

Translatsiooni initsiatsiooniks on vajalikud 40S ja 60S ribosoomi alaühikud ning erinevad initsiatsioonifaktorid. Ribosoomi alaühikud 40S ja 60S on kas värskest sünteesitud komponentidest (rRNA-dest ja ribosoomvalkudest) moodustunud või on need pärit translatsiooni terminatsiooni järgsest ribosoomi 80S kompleksist, mis võib olla veel seotud tRNA<sub>i</sub>, mRNA ja valguliste vabastusfaktoritega. Initsiatsioonifaktorite eIF1, eIF1A, eIF2 ja eIF3 poolt vahendatud 80S kompleksi ümbertöötlemise tulemusel tekivad vaba mRNA, tRNA<sub>i</sub>-ga seotud 40S alaühikud ning 60S alaühikud. Initsiatsioonifaktorite eIF1, eIF1A ning eIF3 abil moodustub 43S pre-initsiatsiooni kompleks, sidudes ribosoomi 40S alamühiku P-saiti kompleksi, mis koosneb GTP-st (guaniinrifosfaat), GTP-aktiivsusega valgust eIF2 ning Met-tRNA<sub>i</sub>-st. 43S pre-initsiatsioonikompleksiga on seondunud ka initsiatsioonifaktorid eIF5A ja eIF5B. (Dutt et al. 2015).

### 3.2.2 43S pre-initsiatsioonikompleksi sidumine mRNA-ga ning 48S preinitsiatsioonikompleksi moodustumine

43S preinitsiatsioonikompleksi sidumisel mRNA-ga, peab esmalt mRNA läbima struktuursed muudatused, mis saavad alguse *cap*-struktuuriga seonduva kompleksi liitumisel mRNA *cap*-struktuuriga ning polüA-seonduva valgu (PABP) ühinemisel mRNA polüA sabaga. *Cap*-struktuuriga seonduvaks kompleksiks on initsiatsioonifaktor eIF4F, mis koosneb initsiatsioonifaktoritest eIF4A, eIF4G ja *cap*-struktuuriga seonduvast eIF4E-st (Dutt et al. 2015; Merchante & Alonso, 2017). *DEAD-box* helikaas eIF4A vastutab mRNA sekundaarse struktuuri lahtiharutamise eest, mida toetab helikaasi aktiivsust stimuleeriv eIF4B. Initsiatsioonifaktorite eIF4A ja eIF4E funktsiooni toetab struktuurset funktsiooni omav valk eIF4G, mis on võimeline siduma ka PABP-d ja eIF3-e. Initsiatsioonifaktorite toimet võtab lahtiharutatud mRNA suletud-*loop* struktuuri ning ühineb läbi 5'UTR 43S pre-initsiatsioonikompleksiga, moodustades 48S preinitsiatsioonikompleksi. Lisaks eIF4B ja eIF4F-le osaleb mRNA seonduv eIF3, luues 40S ribosoomi alaühikule mRNA sisenemis- ja väljumisava, tekitades mRNA-ga seonduva kanali. Initsiatsioonifaktor eIF3 on lisaks võimeline interakteeruma mRNA-ga, stabiliseerides 43S seonduvat mRNA-ga ning reguleerides ribosomaalset skanneeringut. (Dutt et al. 2015; Hinnebusch & Lorsch, 2012).

### 3.2.3 Ribosomaalne skanneering

Initsiatsioonifaktorid eIF1 ja eIF1A tagavad, et 48S preinitsiatsioonikompleks oleks avatud konformatsioonis, võimaldades mRNA skanneeringu, mis algab preinitsiatsioonikompleksi 43S ja mRNA ühinemisel. Lisaks omab eIF1 rolli startkoodoni tuvastamisel, võimaldades 48S kompleksil eristada mitte-AUG koodoneid AUG koodonitest ning AUG koodoneid, mis ei ole sobilikud translatsiooni initsiatsiooniks (Jackson et al. 2010). Preinitsiatsioonikompleksi P-saiti seonduv Met-tRNA<sub>i</sub> kasutab komplementaarset antikoodonit, et skaneerida mRNA 5'UTR regiooni, suunal 5'→3', kuni startkoodonini. Kõige efektiivsemaks translatsiooni initsiatsioonikoodoniks on üldjuhul AUG start-koodon, mis paikneb Kozak'i konsensusjärjestuses. Kui startkoodon on ribosoomi poolt tuvastatud, toimub eIF1 ümberpaiknemine ribosoomi P-saidi juurest, mis viib 48S kompleksi suletud konformatsiooni, lukustades sellega Met-tRNA<sub>i</sub> ja mRNA 48S kompleksi külge. Lisaks, pärast ümberpaiknemist, osaleb eIF1 eIF2-ga seotud GTP hüdrolüüsis, läbi mille tekib eIF2-GDP kompleks, millel on nõrgem afiinsus Met-tRNA<sub>i</sub>-ga (Hinnebusch & Lorsch, 2012; Jackson et al. 2010).

### 3.2.4 80S kompleksi moodustumine

Kui startkoodon on tuvastatud läbi ribosomaalse skanneeringu algab 40S ja 60S ribosoomi alaühikute ühinemise protsess, mille tulemuseks on 80S initsiatsioonikompleks. Alaühikute ühinemise eelduseks on initsiatsioonifaktorite eIF1, eIF1A, eIF3, eIF4G ja eIF2-GDP eemaldumine 48S kompleksist, milles osaleb eIF5B. Alamühikute ühinemise protsess algab eIF2-GDP-Met-tRNA<sub>i</sub>

kompleksi lagunemisest, kus eIF2–GDP kompleks eraldub Met-tRNA<sub>i</sub>-st ning sellega liitub eIF5B-GTP, mis kiirendab 40S ja 60S alamühikute liitumist. 60S alamühiku külge seotud eIF6, mis omab rolli 48S preinitsiatsioonikompleksi ja 60S alamühikute enneaegsel seondumise takistamisel, fosforüleerub ning läbi selle eraldub 60S küljest, võimaldades 40S ja 60S alamühikute ühinemist (Jackson et al. 2010 Merchante & Alonso, 2017). Kui 60S on ühinenud 40S alamühikuga, hüdrolyüsib eIF5B oma sidet GTP-ga, vähendades oma afiinsust Met-tRNA<sub>i</sub>-ga, mille tulemusel vabaneb see koos eIF1A-ga, olles viimased ribosoomiga seondunud initsiatsioonifaktorid, ribosoomist ning 80S kompleks saab alustada translatsiooni elongatsiooni protsessi (Hinnebusch & Lorsch, 2012).

### 3.3 Translatsiooni initsiatsioonifaktorite häiring viiruste poolt

Kuna viirused ei kodeeri translatsiooniaparaati on neil vaja kaaperdada peremeesraku ribosoomid, et toota viirusvalke (Bushell & Sarnow, 2002). Üks peamisi takistusi viirustele on kanoonilise eukarüootse translatsiooni sõltuvus mRNA 5' otsast (cap-struktuurist ja selle interaktsioonist mRNA polüA sabaga PABP-vahendusel). See sõltuvus võimaldab toota ühte valku mRNA kohta. Selle vältimiseks viirused ekspresseerivad mitmeid ensüüme ja struktuurvalke ning on evolutsiooni kaudu töötanud välja erinevaid strateegiaid, et oleks võimalik toota rohkem kui ühte valku. Firth & Brierley, 2012). Järgnevalt on välja toodud mõningad strateegiad, kuidas viirused sekkuvad translatsiooni initsiatsiooni.

### 3.4 5'UTR positsioonis asuvad enhanserid: IRES elemendid, 5'CITE elemendid, VPg valgud ja Ω-järjestus

#### 3.4.1 IRES elemendid

IRES ( *internal ribosome entry site*, ingl.k) on RNA struktuur mRNA-s, mis võimaldab *cap*-ist sõltumatut translatsiooni initsiatsiooni (Martinez-Salas et al. 2018). Viirused kasutavad IRES-eid, et transleerida mitut geeni ühest mRNA-st (Wong et al. 2008). Samuti võimaldavad IRES-id viiruse mRNA-d transleerida kui peremeesraku translatsioon on inhibeeritud. IRES-te abil on võimalik ka ligi pääseda sisemistele ORF-idele mis tavajuhul oleksid mitte ligipääsetavad. Viiruste IRES-ed varieeruvad nii järjestuselt kui struktuurilt – seega erinedes selle poolest, kui sõltuvad need on initsiatsioonifaktorite suhtes ning täpsuse suhtes, millist initsiatsioonisaiti nad valivad (Firth & Brierley, 2012).

IRES elemendid avastati loomi nakatavast *Picornavirus* perekonda kuuluvast polioviiruse RNA-st, mis kasutasid IRES-t, et võimaldada 5'UTR-ist sõltumatut translatsiooni initsiatsiooni (Pelletier & Sonenberg, 1988). IRES elemendid on avastatud ka taimeviirustest näiteks *Tobacco etch virus*, TEV (eestikeelne ametlik liiginimetus nimetus puudub) RNA-st. Taimeviiruste IRES elementide aktiivsus sõltub RNA järjestustest, mis sisaldavad peamiselt üksikahelalisi regioone. IRES elemendid võivad käituda ka kui enhanserid genoomisisestes regioonides. Näiteks tubaka mosaiikviiruse ristöieliste tüve viirustel on kaks IRES elementi, mis stimuleerivad kattevalgu ja liikumisvalgu sünteesi (Miras et al. 2017; Martinez-Salas et al. 2018)

### 3.4.2 5'CITE elemendid

*CITE* (*cap*-sõltumatu translatsiooni enhanser) on viiruse mRNA struktuur, mis käitub sisemistes mRNA regioonides nagu IRES, kuid erinevalt IRES elementidest (mis paiknevad üldjuhul alati 5' regioonis start-koodonist *upstream*) võivad CITE elemendid paikneda nii 5' kui ka 3' regioonis. (Shatsky et al. 2018; Paudel & Sanfaçon, 2021)

Näiteks TEV omab 5'UTR-is kahte CITE järjestust positsioonides 28-85 ning 66-118, mis kannavad nime TEV CITE-1 ja TEV CITE-2. PolüA saba poolt soodustatud TEV CITE-1 ja CITE-2 koostöös stimuleerivad need elemendid *cap*-sõltumatut translatsiooni kümme korda efektiivsemalt võrreldes translatsiooni *capped* RNA kontrolliga. TEV CITE elemendid on võimelised läbi viima *cap*-sõltumatut translatsiooni ka eraldiseisvalt, kuid väiksema efektiivsusega (Niepel & Gallie, 1999).

### 3.4.3 VPg valgud

Osades taimi nakatavates plussahelalistel RNA viirustel, sealhulgas sobemoviirustel, on VPg (viraalne genoomiseoseline valk) kovalentselt ühendatud viraalse RNA 5' otsaga. Struktuurilt on VPg korrapärase valk, mis võimaldab sellel interakteeruda mitmete erinevate valkudega. Näiteks *Potyvirus* perekonna viiruste VPg interakteerub peremeesraku translatsiooni initsiatsiooni faktori eIF4E või eIF(iso)4E-ga, sõltuvalt taimeliigist. VPg ja eelnevalt mainitud initsiatsioonifaktorite vahelisest interaktsioonist sõltub viiruse nakatamisvõime. Potyviiruste VPg-l esineb kaks prekursori versiooni: VPg-Pro ning hüdroobse valgu 6K<sub>2</sub>-ga seondunud prekursor 6K<sub>2</sub>-VPg-Pro. VPg-Pro esineb peremeesraku tsütoplasmas ning rakutuumas, kus see interakteerub eIF4E/eIF(iso)4E, PABP (polüA seonduv valk) ning fibrillariiniga. 6K<sub>2</sub>-VPg-Pro on seondunud endoplasmaatilise retiikulumist pärit vesikulaarsete struktuuridega, transformeerides need viiruse replikatsiooni vabrikuteks (Jiang & Laliberté, 2011).

Mutatsioonid eIF4E/eIF(iso)4E faktorites, mis takistavad interaktsioone VPg-ga, takistavad viirusvalkude translatsiooni ja seegaraku nakatumist viirusesse üleüldiselt. Aminohappe asendused Gly107Arg (pvr1 lookuses) ning Val67Glu (pvr2<sup>4</sup> lookuses ) pipra eIF4E-s takistavad TEV ja PVY VPg ühinemist eIF4E-ga. Selleks, et VPg saaks resistentsust tagavate initsiatsioonifaktoritega seostuda, peab VPg omandama mutatsioonid. Näiteks resistentsusvastaste mutatsioonidega PVY isolaadid on võimelised seonduma resistentse *pvr2* alleeliga. Resistentsusvastased mutatsioonid säilitavad VPg võimet ühineda originaalse eIF4E vormiga (Jiang & Laliberté, 2011).

### 3.4.4 $\Omega$ -järjestus

Oomega järjestus ehk  $\Omega$ -järjestus on tubaka mosaiikviiruse (TMV) mRNA 5'UTR piirkonnas asuv 68 aluspaari pikkune järjestus, millel on translatsiooni võimendav omadus nii eukarüootides ja prokarüootides (Gallie & Kado, 1989).  $\Omega$ -järjestuse tunneb ära kuumašoki valg 101, läbi mille seondub  $\Omega$ -järjestus eIF4F faktoriga ning vahendab translatsiooni aktiivsust (Miras *et al.* 2017).

## 3.5 3' UTR regioonis paiknevad enhanserid

### 3.5.1 tRNA sarnased struktuurid (TLS)

Paljudes taimi nakatavate viiruste mRNA-s asendab TLS polüA saba. TLS struktuurid on tavaliselt aminoatsüülitud, mis võimaldab viraalsel mRNA-l seostuda ribosoomiga või initsiatsioonifaktoritega TLS vahendusel. Näiteks perekondadesse *Tymovirus*, *Bromovirus* ning *Tobamovirus* kuuluvad viirused omavad TLS struktuuri, mis on aminoatsüülitud kas valiini, türosiini või histidiiniga ning selle omaduse tõttu nende 3' otsa piirkond sarnaneb kanooniliste tRNA-dega ning on võimelised interakteeruma eIF4A ja ribosoomidega. TLS struktuuri vahendatud translatsiooni võimendus sõltub viiruse liigist (Sanfaçon, 2015).

Polüadenüleerimata lutserni mosaiikviiruse (AMV) RNA vajab efektiivseks translatsiooniks ja nakkavuseks viraalset kattevalku (CP). AMV 3'UTR mängib olulist rolli translatsioonis, omades CP siduvat struktuuri, mille läbi on see võimeline siduma CP-d. Kattevalgu sidumine AMV 3'UTR-is jäljendab mRNA polüA saba, mis võimaldab vältida miinusahela promotori aktiivsust ning võimendab translatsiooni aktiivsust. *Pull-down* testide tulemusel selgus, et AMV CP seob eIF4F/eIF(iso)4F komponente, mille põhjal võib järeldada, et viiruse kattevalk saab käituda ka kui polüA-siduva valguna. AMV RNA 3' ots omab ka pseudosõlme struktuuri, mis meenutab tRNA sarnast struktuuri (TLS) ning seda piirkonda on võimelised ära tundma tRNA-spetsiifiline ensüüm ning viraalne replikaas, mis tähendab, et TLS struktuur käitub kui miinusahela promootor. Kattevalgu lisandumine 3' otsa inhibeerib nende ensüümide äratundmist ning sellest saab järeldada, et CP interaktsioon 3'UTR-ga ja pseudosõlme stabiilsus reguleerivad translatsiooni ja replikatsiooni vaheldumist. (Miras *et al.* 2017)

### 3.5.2 5'cap-sõltumatud translatsiooni enhanser-elementid 3'UTR regioonis

Enamikul taimi nakatavatel positiivse ahelaga RNA viirustel pole *cap* struktuuri 5' otsas, mistõttu efektiivse translatsiooni jaoks peavad nad peremeesraku eIF4F või ribosoomi mittekanooniliste meetmetega. Mõned viirused näiteks *Potyviridae*, *Secoviridae* ning sobemoviirused sisaldavad 5'

otsas VPg valku või vaba 5' fosfaatrühma, kuid kõikidel taimeviirustel, millel puudub *cap* ning polüA saba, sisaldavad translatsiooni võimendavaid *enhanser*-järjestusi (CITE) 3'UTR regioonis. CITE elemendid 3' regioonis on võimelised asendama 5' *cap*-struktuuri kõrge efektiivusega ning võimaldavad viraalsel mRNA-l seostuda eIF4F faktoriga (eIF4E või eIF4G vahendusel) või ribosoomiga ja ribosoomi alaühikutega (Simon& Miller, 2013).

Kõige paremini kirjeldatud 3'CITE element on odra kollase kääbusviiruse sarnane element (*Barley yellow dwarf virus-like element*- BTE). BTE esineb kõikides viirustes, mis kuuluvad perekondadesse *Luteovirus*, *Dianthovirus* ning *Necrovirus*. BTE-le on iseloomulik 17 nukleotiidi pikkune konserveerunud järjestus: GGAUCCUGGgAaACAGG, kus allajoonitud nukleotiidid moodustavad tüve silmuse, mis võib käituda eIF4G ja eIF4E siduva saidina. BTE seob eIF4G-d kõrge afiinsusega, mis võimaldab läbi viia translatsiooni ka ilma eIF4E faktorita. BTE tüvesilmuse külge seondunud faktorid eIF4G ja eIF4E omavad ka kaitsefunktsiooni, kaitstes tüvesilmust rakuliste faktorite eest (Simon& Miller, 2013)

BTE vahendatud translatsioon algab eIF4F seostumisega (läbi eIF4G alaühiku kaudu) BTE tüvesilmuse külge. Kui eIF4F on seondunud viiruse mRNA-s oleva BTE-ga, seonduvad sellega ka eIF4A helikaas, eIF4B ja ATP, et värvata 43S preinitsiatsioonikompleksi otse BTE külge. Kaugtoimelise RNA-RNA interaktsiooni toimel toimetatakse 43S preinitsiatsioonikompleks koos BTE-ga viraalse RNA 5' regiooni, kus see alustab skaneerimist kuni esimese initsiaatorkoodonini . Kaugtoimelise RNA-RNA interaktsiooni eelduseks on *kissing*-tüvesilmuse interaktsioon BTE tüvesilmuse ja 5'UTR regiooni vahel. Ribosoomi puudumisel eIF4A, eIF4B ja ATP funktsioneerivad kui BTE ja eIF4G vahelise sidumisafiinsuse võimendajad. BTE ja eIF4G vaheline kõrge afiinsus võimaldab efektiivselt värvata 40S alaühikut ka ilma kaugtoimelise RNA-RNA interaktsioonita (Miras *et al.* 2017).

### 3.6 Viiruste RNA replikatsiooni reguleerimine translatsioonifaktorite poolt

Paljudes viirustes on translatsioon ja replikatsioon tihedalt seotud ning viraalsed RNA-d või valgud transporditakse viraalsetesse replikatsiooni kompleksidesse (VRC-desse) koos translatsioonifaktoritega. Sellisel juhul on translatsioonifaktorite värbamiseks VRC-desse on vaja viraalset RNA-sõltuvat RNA polümeraasi või VPg-d ning *cis*- asendis järjestusi viiruse RNA-s (Sanfaçon, 2015).

*Potyvirus*, *Tobamovirus* ja *Tombusvirus* perekondade viirused värbavad oma VRC külge eEF1A. eEF1A interakteerub tomati kääbusviiruse (TBSV) RdRp-ga ning seondub selle RNA-s oleva *cis*-asendis järjestusega 3'UTR regioonis, mille tulemusel värvatakse viiruse RNA translatsiooni initsiatsioonikompleksi. Samuti omab eEF1A stabiliseerivat funktsiooni TBSV p33 lisavalgule ning võimendab RNA miinusahela sünteesi (Sanfaçon, 2015; Li *et al.* 2009). TBSV VRC-ga on seotud ka eEF1B kompleksi kuuluv elongatsioonifaktor eEF1B $\gamma$ . eEF1B $\gamma$  interakteerub TBSV RNA 3' UTR regioonis oleva tüvesilmuse struktuuriga. See interaktsioon lõdvestab struktuuri ning stimuleerib miinusahelalise RNA sünteesi koos eEF1A-ga. *Tobamovirus* perekonna viiruste (nt. tubaka mosaikviirus- TMV), puhul eEF1A interakteerub nii RdRp kui ka *cis*- asendis järjestusega viraalsel RNA-l. *N. benthamiana*-s on eEF1A kodeeritud kuue geeni poolt, mis jagunevad kahte gruppi



sarnaste järjestuste poolest. Kui vaigistati ühte eEF1A geenigruppi, siis tulemuseks oli osaline resistentsus TMV suhtes, mille juures taime kasv oli mõõdukalt pärsitud. Kõikide eEF1A tootvate geenide vaigistamine tõi kaasa suurenenud resistentsuse ning samuti ka suuremad defektid taime kasvus. Resistentsus põhines pärsitud viiruse replikatsioonil ja/või viiruse rakust raku liikumisel. Interaktsioonid eEF1A ja raku tsütoskeleti vahel võivad osaleda VRC-de kokkupanekus või nende komplekside intratsellulaarses ja rakkudevahelises transpordis (Sanfaçon, 2015).

### 3.7 Valk-valk interaktsioonide uurimine

Valgud mängivad olulist rolli nii eukarüootides, prokarüootides ja viirustes, täites erinevaid eluks vajalike funktsioone. Viiruste suhteliselt väikese genoomi tõttu pole nad võimelised ekspresseerima ise kõiki oma nakkustsükliks vajalike valke, mille tõttu peavad viirused oma paljunemistsükli läbiviimisega moodustama peremeesorganismiga keerukaid valgukomplekse. Viirus-peremeesorganismi valgukomplekside uurimine annab palju informatsiooni viiruse nakkustsükli kohta: alates sisenemisest raku kuni viirusgenoomi replikatsioonini, selle pakkimiseni viiruspartiklits ning väljumiseni rakust. Saadud informatsiooniga on võimalik arendada uusi ravimeid, millega saab ennetada nakkuspuhanguid ja viirusest tingitud surmasid. Valk-valk interaktsioone on võimalik uurida kahel viisil: eksperimentaalselt või *in silico* (Gillen & Nita-Lazar, 2019).

#### 3.7.1 Eksperimentaalsed valk-valk interaktsioonide uurimise meetodid

Tänaseks päevaks eksisteerib arvukalt valk-valk interaktsioonide eksperimentaalseid meetodeid ning igal meetodil on oma eelised ja miinused. Eksperimentaalsete meetodite alla kuuluvad binaarsed meetodid ( nt. Y2H, BiFC) , mis uuritava valgupaari otsesel füüsilisel interaktsioonil ning *co-complex* meetodid (nt. TAP-MS), mis mõõdavad valkude grupis toimuvaid füüsilisi interaktsioone (Titeca et al. 2019).

#### 3.7.1 Bimolekulaarne fluorestsentsi komplementatsioon (BiFC)

BiFC võimaldab valk-valk interaktsioone visualiseerida elusates rakkudes. BiFC meetodi põhimõte seisneb kahe valgu liitumisel fluorestsentsseks kompleksiks. Valkudele, mille interaktsiooni uuritakse, lisatakse fluorestseeruva valgu (nt. GFP- *green fluorescent protein*) N-terminaalsed ja C-terminaalsed fragmendid, mis tavaolekus üksi ei fluorestseeru. Uuritavate valkude interakteerumise korral, satuvad fluorestseeruva valgu N- ja C-terminaalsed fragmendid lähedistiku ja põimuvad omavahel, tekitades fluorestsentsi, mida on võimalik mõõta fluorestsentsmikroskoobi või tsütomeetriga. BiFC üheks eeliseks teiste valkude komplementatsiooni testide ees on tugev fluorestsents, mis võimaldab detekteerida ning visualiseerida valkude interaktsiooni elusates rakkudes ilma väliste lisaaineteta. Samuti on võimalik uurida raku mitme erineva valgupaari interaktsioone, kasutades sama-aegselt erinevaid fluorestseeruvaid valke. BiFC meetodi puudusteks on aeg, mis kulub valkudel interakteerumiseks ning fluorestsentsse kompleksi

loomiseks, mis tähendab, et valkude interaktsiooni pole võimalik hästi jälgida reaalses. Lisaks moodustub fluorestsentsse valgukompleks pöördumatu reaktsiooni tagajärjena ehk katset pole võimalik korrata samas rakus (Kerppola, 2008).

### 3.7.2 Pärimi kaksikhübridi meetod (Y2H)

Y2H meetod võimaldab uurida valkude interaktsioone elusas geneetiliselt muundatud pärmirakus. Klassikalisel Y2H meetodil on lihtne tööpõhimõte: kaks huvipakkuvat valku taastavad pärmirakus funktsionaalse transkriptsioonifaktori. DNA-siduvasse domääni (DBD) on seotud huvipakkuv valk, mis käitub söödana potentsiaalsele interakteeruvale valgule, mis omakorda on seotud aktivatsiooni domääniga. DBD-uuritava valgu kompleks on seotud promootorist ülesvoolu aktivaator-järjestusele ning interaktsiooni toimumisel uuritava valgu ning potentsiaalselt interakteeruva valgu vahel, värbab aktivatsiooni domään RNA polümeraas II ning sellele järgneb reportergeeni transkriptsioon. (Brückner et al. 2009; Titeca et al. 2019). Y2H meetodi peamiseks puuduseks on mõningate valkude suutmatus interakteeruda rakutuumas (Koegl & Uetz, 2007).

### 3.7.3 Afiinsuse puhastus- massispektromeetria (AP-MS)

AP-MS on võimalik kasutada valk-valk interaktsioonide uurimiseks nii elusates kui ka surnud rakkudes. AP-MS tööpõhimõte seisneb kahes etapis: valkude puhastamine ja massispektromeetria. Alguses märgistatakse ära huvipakkuvad valgud epitoobiga, mis seovad endaga interaktsioonipartneri. Uuritavad valgud eraldatakse rakkude lüsaadist ning vajaduse korral eraldatakse need läbi SDS-PAGE. Valkudel teostatakse proteolüüs ning seejärel analüüsitakse saadud peptiide kasutades pööratud-faasi vedelikchromatograafiat. Esmalt mõõdetakse tervikliku peptiidi massi/laengu suhet ning seejärel valitakse välja kõige arvukamalt esinevad peptiidid ning nendele teostatakse fragmentatsioon, mille tulemusel saadakse tandemne massispektromeetria graafik. Saadud tulemustele tehakse kvalideedikontroll ning statistiline analüüs (Gingras et al. 2007). AP-MS põhiprobleemiks on valepositiivsed tulemused, mis tulenevad epitoobi lisamisest uuritava valgu külge, muutes selle konformatsiooni ja tavapärasest talitlust (Brito & Pinney, 2017).

### 3.7.4 Bioinformaatilised meetodid

Bioinformaatika valdkonnas toimunud arengud võimaldavad uurida valkude interaktsioone *in silico*, et hoida kokku aega ning ressursse, mis muidu kuluks eksperimentaalsete meetodite peale. Bioinformaatilised meetodeid valk-valk interaktsioonide ennustamiseks saab üldisemalt jagada kuute gruppi (Ding, Z., & Kihara, D.) järgi:

Valgu järjestuse analüüsil baseeruvad meetodid - põhineb valkude sekveneeritud aminohappejärjestuste analüüsil (homoloogsed järjestused, motiivid/domäänid, koodonikasutus).

Võrdleval genoomikal baseeruvad meetodid - põhineb erinevate liikide genoomijärjestuse võrdlemisel. Võimaldab konserveerunud genoomijärjestuste kaudu leida funktsionaalselt sarnaseid valke.

Geenide koekspressioonil baseeruvad meetodid - eeldades, et interakteeruvad valgud on sarnaste ekspressiooni tasemetega. Interaktsioonide ennustamiseks kasutatakse RNA sekveneerimisest ja biokiipide pealt saadud andmeid.

Valgu tertsiaarstruktuuril baseeruvad meetodid - põhineb valkude tertsiaarstruktuuride *in silico* modelleerimisel ja nende analüüsil. Valk-valk interaktsioonide uurimiseks, viiakse spetsiifiliste programmidega läbi modelleeritud valkude tertsiaarstruktuuride superimpositsioon, et näha, kas tekib loogiline valgukompleksi struktuur. Samuti on võimalik interaktsioone uurida, võrreldes valgukomplekside sarnasust.

Valgu funktsioonil baseeruvad meetodid - interakteeruvad valgud üldjuhul asuvad samas signaalirajas ning jagavad sarnast funktsiooni. Valk-valk interaktsioonide ennustamiseks kasutatakse *Gene Ontology* (GO) sarnasus-skoori, mis kasutab valkude annotatsioonide andmebaasidesse (nt. Uniprot) salvestatud informatsiooni.

Valk-valk interaktsiooni võrgustiku topoloogial baseeruvad meetodid - olemasoleva kindla organismi valk-valk interaktsioonide võrgustiku põhjal ennustatakse uusi valkudevahelisi interaktsioone, hinnates uuritavate valkude paiknemist võrgustikus.

### 3. Töö eesmärgid:

Käesoleva magistritöö peamiseks eesmärgiks oli uurida ning võrrelda BiFC meetodiga CfMV viirusvalgu VPg ja selle mutandi VPgM (Ser71Ala) interaktsioone kahe kaerasordi „Veli“ ja „Jaak“ ning nisusordi „Zebra“ eIFiso4G HEAT1 ja HEAT2 domäänidega. Katsed teostati eesmärgiga, et kinnitada või tuua uut informatsiooni interaktsioonikatsete tulemustele, mis on saadud eelnevates katsetes, samade konstruktidega (Kivistik, 2017; Akkerman, 2018).

Teiseks eesmärgiks oli bioinformaatilisi meetodeid kasutades modelleerida CfMV VPg ja selle mutantse versiooni VPgM interaktsiooni eelnevalt mainitud kaera- ja nisusortide HEAT1 ja HEAT2 domäänidega ning uurida, kuidas need interaktsioonid ruumiliselt võiksid paikneda teineteise suhtes.

## 4. Materjalid ja meetodid

### 4.1 Materjalid

Kõik ensüümid, mis on antud töös kasutatud, on toodetud firma *ThermoScientific* poolt. Töös kasutatud reagentide koostis on toodud välja lisa 1.

### 4.2 Taimse materjali kasvatamine

Agroinfiltratsiooniks kasvatati viie nädala jooksul TalTech'i Loodusteaduste maja taimetoas *N. benthamiana* taimi 25 °C juures, 60% niiskuse tasemega ja pikapäeva režiimil (16 h valgust päevas).

### 4.3 Bimolekulaarne fluorestsentsi komplementatsioon (BiFC)

Bimolekulaarne fluorestsentsi komplementatsiooni (BiFC) katsed viidi läbi viis korda. Selleks kasutati C58C1 või GV3101 *Agrobacterium tumefaciens*'i tüvesse viidud kahest plasmiidist koosnevat süsteemi. Interkatsioonipartneriteks olid uuritavad valgud, millele oli liidetud Venus valgu osad. Katses kasutati agrobakterisse transformeeritud sihtmärkvektoreid G2, mis ekspresseeris Venus valgu N-terminust (VN) kombinatsioonis ühe uuritava valguga, ning G4, mis ekspresseeris Venus valgu C-terminust (VC) kombinatsioonis teise uuritava valguga. Töös testitavad plasmiidid (vt. lisa 2) olid kloneeritud Anna Akkerman'i (Akkerman, 2018) ja Agnes Kivistik'u poolt (Kivistik, 2017).

#### 4.3.1 Antibiootikumid

*A. tumefaciens*'i tüvede C58C1 ja GV3101 kasvatamiseks LB-selektiivsöötmes (nii vedel- kui tardsöötme puhul), kasutati järgmisi antibiootikume: C58C1: kanamütsiin (lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml) ja tetratsükliin (lõppkontsentratsiooniga 5 µg/ml); GV3101: kanamütsiin (lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml) ja gentamütsiin (lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml).

#### 4.3.2 Agrobakteri kompetentsete rakkude valmistamine

*A. tumefaciens* tüved C58C1 ja GV3101 pandi eraldi kasvama LB-vedelsöötmesse, mis sisaldasid antibiootikume vastavalt tüvele (näidatud punktis 2.3.1). Agrobakterikultuure kasvatati bakteriloksutil 28°C juures, kiirusel 180 rpm, kuniks bakterisuspensiooni optiline tihedus mõõdetuna OD<sub>600</sub> juures oli vahemikus 0,5 kuni 1. Agrobakteri kultuurid kanti üle tsentrifuugituubi ning hoiti 10 minutit jääl ning seejärel tsentrifuugiti proove 4°C juures viie minuti

jooksul, kiirusega 4500 rpm. Proovidest eemaldati supernatant ning sadenenud bakterirakud suspendeeriti jääkülmas 100 mM CaCl<sub>2</sub>-s. Suspensiooni hoiti jääl 30 minutit ning seejärel tsentrifugeeriti 4°C juures viie minuti jooksul, kiirusega 2500 rpm. Supernatant eemaldati ning proovidele lisati 100 mM CaCl<sub>2</sub>, kuhu oli lisatud 7% DMSO-d. Rakud alikvooditi 100 µl kaupa 2 ml tuubidesse ning külmutati vedelas lämmastikus enne -80°C sügavkülma asetamist.

### 4.3.3 Plasmiidse DNA eraldamine

Üleöö (16 h, 28°C, 180 rpm) loksutil LB-vedelsöötmes, vastavate antibiootikumitega, kasvanud C58C1/GV3101 tüvede agrobakterid valati tsentrifugeerituubidesse ning tsentrifugeeriti 4°C juures kahe minuti jooksul, kiirusega 13200 rpm. Seejärel eemaldati supernatant. DNA eraldamiseks valkudest ning muudest rakulistest komponentidest resuspendeeriti eppendorfis olevaid baktereid esmalt E1 (vt. lisa 1) lahusega, seejärel E2 (vt. lisa 1) lahusega ning viimaks 3M kaaliumatsetaadiga (pH 5.5) rakkude aluseliseks lüüsimiseks ning seejärel reaktsiooni neutraliseerimiseks. Proove inkubeeriti jääl 5 minutit või kuni sademe tekkimiseni. Seejärel tsentrifugeeriti proove 10 min, kiirusega 13200 rpm 4°C juures ning klaar supernatant tõsteti ümber puhtasse 1.5 ml tuubi. Proovidele lisati 0,7% isopropanooli, proove segati, hoiti viis minutit toatemperatuuril ning seejärel tsentrifugeeriti 10 minutit, kiirusega 13200 rpm 4°C juures. Proovidelt eemaldati supernatant ning seejärel pesti sadet 70% etanooliga. Proove tsentrifugeeriti viis minutit, kiirusega 13200 rpm 4°C juures. Proovidelt eemaldati supernatant (alkohol) ning DNA sade kuivatati, suspendeeriti 50µl milliQ-vees ning mõõdeti nende DNA kontsentratsioonid *Thermoscientific NanoDrop 2000c* spektrofotomeetriga.

### 4.3.4 Agrobakterite säilitamine glütseroolilahuses

Pika-ajaliseks säilitamiseks valati esmalt autoklaavitud steriilne glütserool 2 ml säilitustuubidesse ning seejärel lisati võrdne maht üleöö (16h, 28°C, 180 rpm) loksutil LB-vedelsöötmes kasvanud C58C1/GV3101 tüvede agrobaktereid (või nende modifitseeritud variandid, mis olid transformeeritud testitavate plasmiididega). Säilitustuube segati nii, et glütserool ja bakterikultuur ühtlustuksid ning seejärel asetati need säilitamiseks -80°C sügavkülma.

### 4.3.5 Agrotransformatsioon

Eppendorf tuubides olevad agrobakterite C58C1 ja GV3101 tüved kompetentsed rakud võeti -80°C sügavkülmast välja jää peale sulama. Sulanud rakkudele lisati 2 µg plasmiidset DNA-d 100 µl bakterikultuuri kohta. Proove hoiti 30 minutit jääl ning seejärel asetati termostaati 37°C juurde kolmeks minutiks kuumašoki teostamiseks. Seejärel jäeti rakud kolmeks minutiks toatemperatuurile, mille järel lisati igasse tuubi LB-vedelsöödet. Tuubid asetati bakterilokutisse

kaheks tunniks loksutama, kiirusel 180 rpm ning temperatuuril 28°C. Pärast kahte tundi loksutis olemist tsentrifuugiti tuubid toatemperatuuril, kiirusega 7000 rpm kahe minuti jooksul. Tuubidest olev sade resuspendeeriti ning bakterikultuurid külvati LB-selektiivsöödet sisaldavatele plaatidele, mis sisaldasid agrobakteri tüve- ning plasmidiispetsiifilisi antibiootikume. Külvatud tassid hoiti inkubaatoris 28°C juures 2-3 päeva kuni tekkisid bakterikolooniad.

#### 4.3.6 Agroinfiltratsioon

Igale konstruktile vastavalt tassilt võeti bakterikülvinõelaga üks bakterikoloonia ning külvati katseklaasi, mis sisaldas 3 ml LB-vedelsöödet ja tüvespetsiifilisi antibiootikume. Katseklaasid jäeti bakteriloksutisse 16 tunniks, kiirusel 180 rpm ning temperatuuril 28°C. Järgmisel päeval pipeteeriti igast katseklaasist 1 ml bakterikultuuri koonilisse kolbi, mahuga 250 ml, mis sisaldas 9 ml LB-vedelsöödet koos antibiootikumidega, 1 M MES (pH 6.3) ning 25 mM atsetosürigooni. Kolvid jäeti 16 tunniks loksutisse 28°C juurde, kiirusel 180 rpm. Järgmisel päeval valati kolbidest kogu sisu tsentrifuugi topsidesse ning tsentrifuugiti toatemperatuuril 5 minutit, kiirusega 3000 rpm. Seejärel eemaldati supernatant ning proovid resuspendeeriti milliQ-vees ning tsentrifuugiti uuesti samadel tingimustel. Proovidelt valati ära supernatant ning lisati süstimise puhverlahust (vt. lisa 1). Igast proovist tehti 1:10 lahendus nii, et proovist võeti 100 µl ning süstimise puhverlahust 900 µl ning mõõdeti lahenduste OD<sub>600</sub>. Mõõdetud OD<sub>600</sub> põhjal lahendati süstimiseks kasutatavaid proove nii, et OD<sub>600</sub> oleks võrdne 0,5-ga. Osade katsete puhul oli OD<sub>600</sub> võrdne 0,3-ga põhjusega, kuna proovid kasvasid väga aeglaselt. Lahendatud proove inkubeeriti 3 tundi *Heidolph UNIMAX 2010* loksutil, kiirusel 14 rpm. Seejärel segati interaktsioonitestiks kokku uuritavad konstruktid kahe või kolme ml kaupa ning süstiti sõltuvalt katsest, ühte või kolme *N. benthamiana* taime, kolme kõige noorema lehe alumisse poolde.

#### 4.3.7 Mikroskopeerimine

Süstitud kohta lehes mikroskopeeriti kolm päeva pärast süstimist, kasutades Zeiss LSM 510 META DUO (esimene kuni kolmas katse) ning Zeiss LSM 900 (neljas ja viies katse) konfokaale ning kasutati ARGON/2 laserit, lainepikkusel 488 nm. Proove vaadeldi ning pildistati Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 objektiiviga. .

### 4.4 PCR

DNA süntees viidi läbi lähtudes ThermoScientific poolt soovitatud protokollist. PCR reaktsioonisegus (vt. lisa 1) kasutati DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), ülesvoolu praimerit attB1, allavoolu praimerit attB2 (vt. lisa 3) ning nukleasivaba vett. PCR programm cDNA sünteesiks oli järgnev: üks tsükkel- esmane denaturatsioon (95°C, kaks minutit); 35 tsüklit-

denaturatsioon (95°C, 30 sekundit), praimerite seondumine (50°C, 30 sekundit), DNA ahela süntees (72°C, üks minut); üks tsükkel- viimane DNA ahela süntees (72°C, 10 minutit).

## 4.5 Geelelektroforees ja pilditöötlus

Geelelektroforeesiks kasutati 1% TAE geeli. Geel segati kokku agarosist (*Bioatlas Atlas Agarose Ultra Pure*) ja 1X TAE puhvrist ning segu kuumutati mikrolaineahjus kuni agarooosi lahustumiseni. Geelisegu jahutati ning enne väljavalamist lisati tõmbekapi all etiidiumbromiidi kontsentratsiooniga 10 mg/ml (lõppkontsentratsiooniga 0,04 µl/ml) geeli värvimiseks. Tahke geel asetati foreesivanni, milles oli puhvrina 1X TAE. Geelile kanti PCR produktid ja GeneRuler 1kb (ThermoScientific) marker ning teostati geelelektroforees kestvusega 35 minutit 180 V juures. Geelipildid tehti *IQuant Capture 400* aparaadiga. Pilte töödeldi Adobe Photoshop CS5 programmiga.

## 4.6 Valkude modelleerimine

Keraheina laiguviiruse VPg ja VPg mutandi, kaerasortide „Veli“ ja „Jaak“ ning nisusordi „Zebra“ eIFiso4G valgu HEAT1 ja HEAT2 domäänide modelleerimiseks kasutati AlphaFold2\_advanced tarkvara vabavaralist versiooni. Järgnevalt on väljatoodud modelleerimisel muudetud parameetrid:

- järjestused olid sisestatud *homooligomer* kujul ning olid eraldatud kooloniga (1:1) valk-valk hetero-komplekside modelleerimiseks;
- geneetilistest andmebaasidest järjestuse otsimiseks kasutati *msa\_method: mmseqs2*, kõige kiirema tulemuse eesmärgil;
- *alphafold* programmi jooksutati parameetritega *rank\_by: pTMScore*, *num\_models:3*, *num\_samples:2* ja *max\_recycles: 6*.

CfMV VPg ja VPgM valke modelleeriti koos kaerasortide „Jaak“ ja „Veli“ ja nisusordi „Zebra“ eIFiso4G HEAT1 ja HEAT2 domäänidega, neid omavahel kombineerides. Modelleerimise tulemuseks saadi kolmemõõtmeline struktuur valgukompleksist, mis sisaldas kas CfMV VPg-d või VPgM ja HEAT1 või HEAT2 domääni, kas kaerast „Jaak“, kaerast „Veli“ või nisust „Zebra“. Iga kombinatsiooni kohta saadi kolm mudelit. Mudeleid visualiseeriti programmis *Swiss PDB Viewer v 4.1.10*.

Kaera „VELI“ ja „JAAK“ ning nisu „Zebra“ eIFiso4G HEAT1 ja HEAT2 domäänid on transleeritud meie labori sekveneerimistulemuste põhjal. Nisu sekvents on 100% identsed GenBank andmebaasis oleva M95747 järjestuse identifitseeritud H1 ja H2 domäänidega. CfMV VPg on transleeritud CfMV-Norra isolaadi genomist: DQ680848. Järjestused, mida kasutati modelleerimisel on ära toodud lisa 4.



## 5. Tulemused

### 5.1 BiFC katsed

BiFC katses uuriti kaerasortide “Jaak” ja “Veli” ning nesusordi “Zebra” eIFiso4G HEAT1 ja HEAT2 domäänide interaktsiooni CfMV VPg ja VPgM (VPg mutantne vorm, kus 71. positsioonis olev seriin on muteeritudalaniiniks) valkude vahel. Uuringud olid läbi viidud kahes *Agrobacterium tumefaciens* tüves: C58C1 ja GV3101. Uuritavaid valke kodeerivad järjestused olid sisestatud konstruktidesse, mis sisaldasid Venus valgu N-terminust (VN) või C-terminust (VC). Interkatsioonteste CfMV VPg/VPgM ning kõrreliste eIFiso4G HEAT1 (H1) ja HEAT2 (H2) domäänide vahel viidi läbi kahes kombinatsioonis, ehk nii VN kui ka VC orientatsioonis.

Positiivseks kontrolliks valiti VYNE-Cn-X6 ja VYCE-Cn-X6 kombinatsioon. CnX6 on müürlooga valk, mis homodimeriseerub spontaanselt (Gehl et al., 2009). Negatiivseks kontrolliks kasutati vektorid, kuhu polnud kloneeritud uuritavate valkude järjestusi (pDEST-VYNE ja pDEST-VYCE).

Tabel 1 näitab mitu korda õnnestus testida võimalikku interaktsiooni erinevate valgukombinatsioonide osas mõlema agrobakteri tüve puhul. Mõndade konstruktide puhul oli raske kasvatada transformeeritud agrobakterit ja sellepärast ei olnud võimalik testida kõiki võimalikke kombinatsioone. C58C1 agrobakterisse transformeeritud VN-H2Z ekspresseeriv konstrukti ei kasvanud vedelas söötmes ning raskesti kasvas ka VC-VPgM ekspresseeriv konstrukti. GV3101 agrobakterisse transformeeritud VN-Cn-X6 ei kasvanud vedelas söötmes.

**Tabel 1.** Katseid kokku iga interaktsiooni suhtes testitava valgupaari kohta kohta.

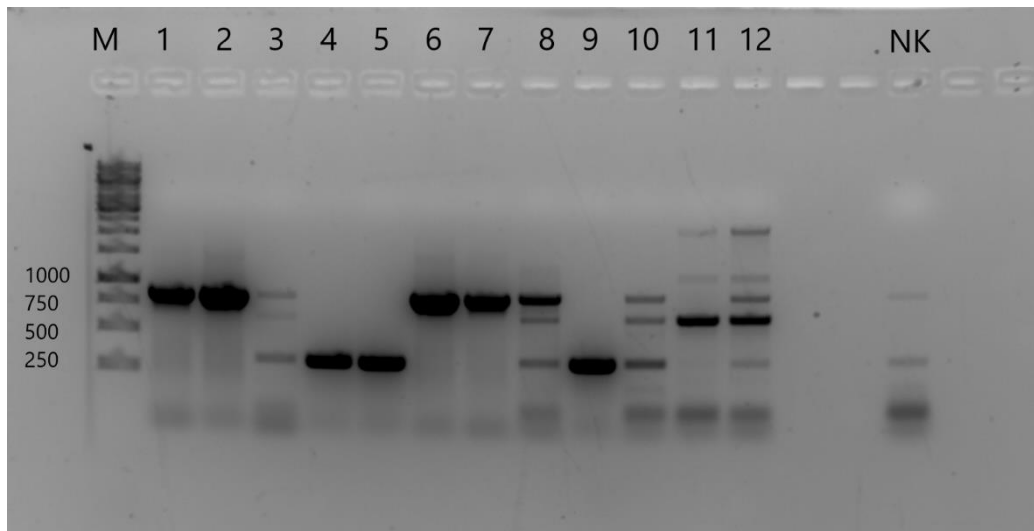
Testitav interaktsioon	Katsekorduste arv	
	C58C1	GV3101
VN-VPg + VC-H1J	4	4
VN-VPg + VC-H1V	4	4
VN-VPg + VC-H1Z	2	4
VN-VPg + VC-H2J	3	2
VN-VPg + VC-H2V	3	2
VN-VPg + VC-H2Z	1	2
VN-VPgM + VC-H1J	4	4
VN-VPgM + VC-H1V	4	4
VN-VPgM + VC-H1Z	2	4
VN-VPgM + VC-H2J	3	2
VN-VPgM + VC-H2V	3	2
VN-VPgM + VC-H2Z	1	2
pDest-VYNE + pDEST-VYCE	2	2
VC-VPg + VN-H1J	3	4
VC-VPg + VN-H1V	3	4
VC-VPg + VN-H1Z	2	4
VC-VPg + VN-H2J	1	2
VC-VPg + VN-H2V	1	2
VC-VPg + VN-H2Z	0	1
VC-VPgM + VN-H1V	2	4
VC-VPgM + VN-H1Z	2	4
VC-VPgM + VN-H2J	0	3
VC-VPgM + VN-H2V	0	3
VC-VPgM + VN-H2Z	0	2
VN-CnX6 +VC-CnX6	2	1

Et kontrollida, kas uuritav järjestus õnnestus agrobakterisse transformeerida, teostati *A. tumefaciens* tüvede C58C1 ja GV3101 tüvedest eraldatud DNA'le PCR kontroll inserdi sisalduse suhtes ning PCR'i tulemusi kontrolliti läbi geelektroforeesi (Joonised 2 kuni 7). CfMV valke VPg ja VPgM kodeeriva DNA lõigu suurus oli 234 bp ning HEAT1 ja HEAT2 suurused on vastavalt 827 bp ja 584 bp.

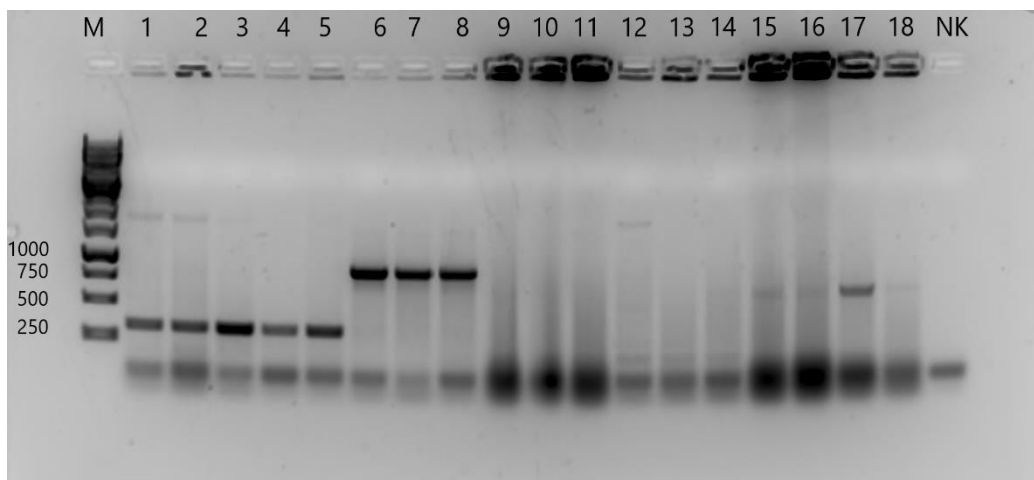
Joonisel 2 on näha, et C58C1 tüves kasvanud konstruktide VN-H1J, VN-H1V, VN-H1Z, VN-VPg, VN-VPgM, VC-H1J, VC-H1V, VC-H1Z, VC-VPg, VC-VPgM, pDEST-VYNE, pDEST-VYCE transformatsioon oli õnnestunud. Konstruktide VN-H1Z ja VC-VPgM puhul jäi kahtlus, kas transformatsioon ikkagi oli edukas. Seetõttu transformeeriti neid konstrukte veelkord ning testiti mitut paralleelset kolooniat (Joonised 3 ja 4). Testide põhjal otsustati, et C58C1 transformatsioon õnnestus.

Joonisel 5 on näha, et GV3101 kasvanud VN-H1J, VN-H1V, VN-H1Z, VN-VPg, VN-VPgM, VC-H1J, VC-H1V, VC-H1Z, VC-VPg, VC-VPgM, pDEST-VYNE, pDEST-VYCE transformatsioon oli õnnestunud.

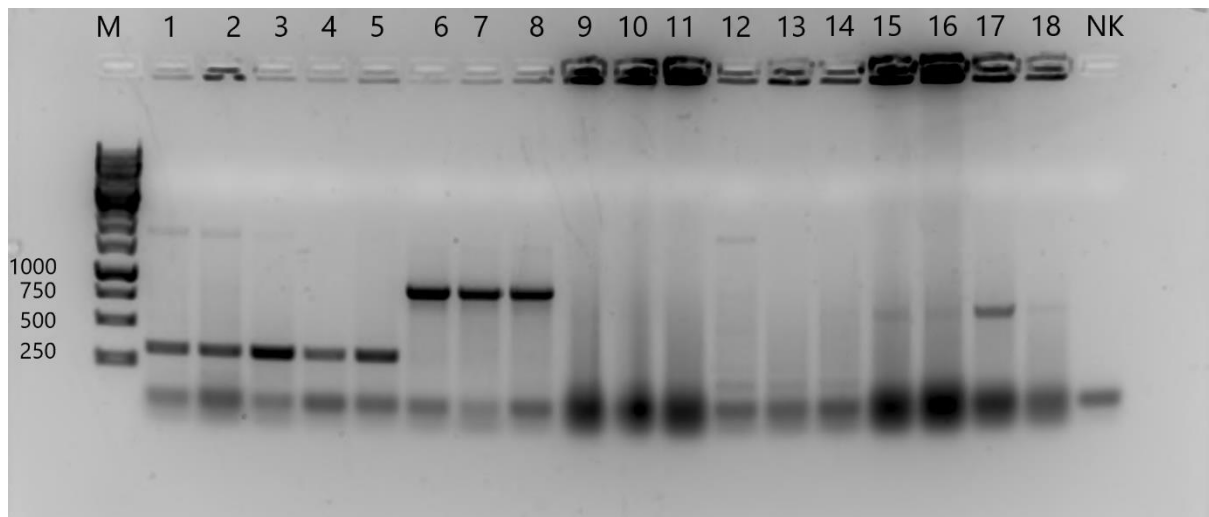
Konstrukti VC-H1Z puhul tekkis kahtlus ning seda konstrukti transformeeriti uuesti ning testiti mitut paralleelset kolooniat (Joonis 6). Testide põhjal otsustati, et GV3101 transformatsioon oli õnnestunud. Joonisel 7 on näha, et ka H2-järjestust sisaldavate konstruktide transformatsioon õnnestus, kuigi mõnedest agrobakteri kultuuridest PCR-il saadud signaal oli nõrk (Joonis 7, rajad 12-14) ja vajas pildi kuvamiseks võimendamist.



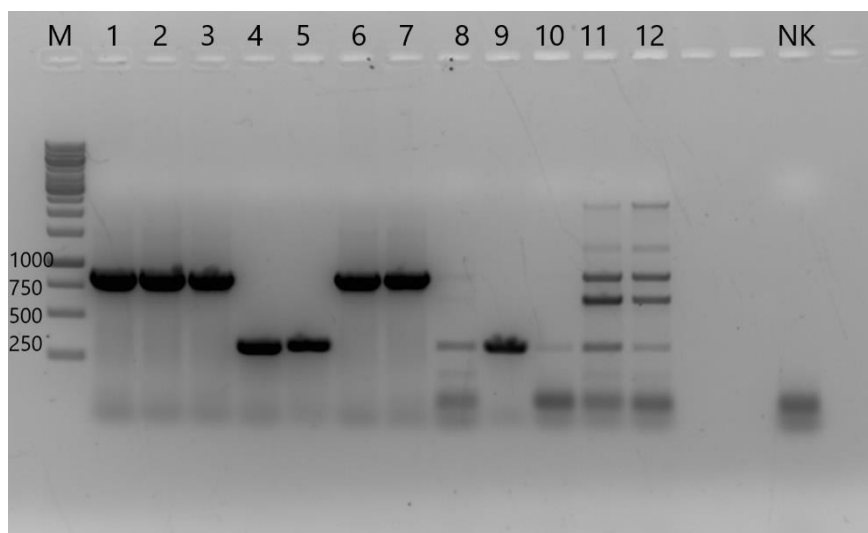
**Joonis 2. Tüvesse C58C1 transformeeritud HEAT1, VPg ja VPgM konstruktide kontroll.** PCR viidi läbi attB1 ja attB2 praimeripaariga. Geelipildi rajad on tähistatud järgnevalt: M- *ThermoScientific Generuler 1kb ladder*, 1. VN-H1J, 2. VN-H1V, 3. VN-H1Z, 4. VN-VPg, 5. VN-VPgM, 6. VC-H1J, 7. VC-H1V, 8. VC-H1Z, 9. VC-VPg, 10. VC-VPgM, 11. pDEST-VYNE, 12. pDEST-VYCE, NK. Negatiivne kontroll, kus DNA asemel kasutati nukleaasivaba vett.



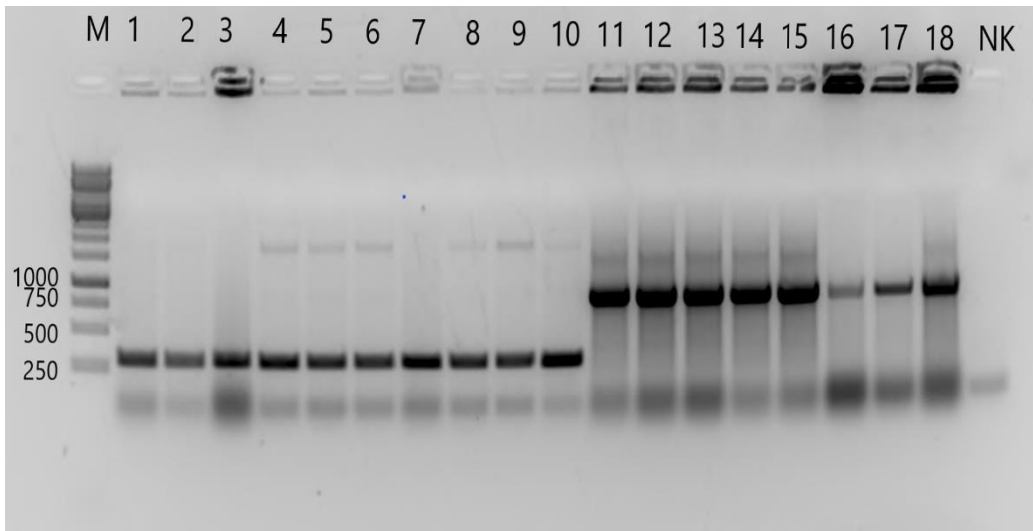
**Joonis 3. Tüvesse C58C1 transformeeritud HEAT1 ja VPgM konstruktide kontroll ning tüvesse GV3101 transformeeritud pDEST-VYNE ja pDEST-VYCE kontroll.** PCR viidi läbi attB1 ja attB2 praimeripaariga. Geelipildi rajad on tähistatud järgnevalt: M- *ThermoScientific Generuler 1kb ladder*, 1-5. VC-VPgM, 6-8. VN-H1Z, 10-14. pDEST-VYNE (GV3101), 15-18. pDEST-VYCE (GV3101), NK. Negatiivne kontroll, kus DNA asemel kasutati nukleaasivaba vett.



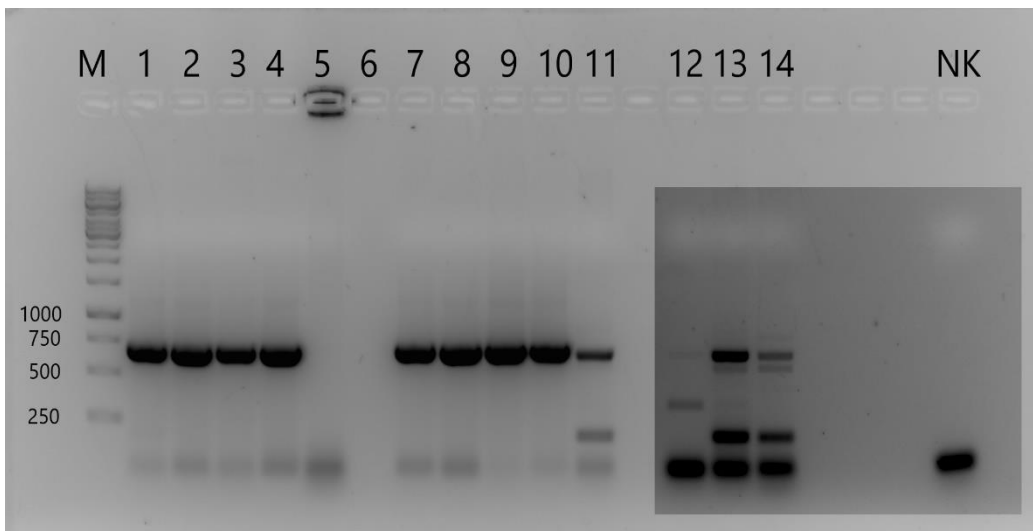
**Joonis 4. Tüvesse C58C1 transformeeritud HEAT1 ja VPgM konstruktide kontroll.** PCR viidi läbi attB1 ja attB2 praimeripaariga. Geelipildi rajad on tähistatud järgnevalt: M- *ThermoScientific Generuler 1kb ladder*, rajad 1-6;14-15. VC-VPgM, rajad 7-13;17-19. VC-H1Z, NK. Negatiivne kontroll, kus DNA asemel kasutati nukleasivaba vett.



**Joonis 5. Tüvesse GV3101 transformeeritud HEAT1, VPg ja VPgM konstruktide kontroll.** PCR viidi läbi attB1 ja attB2 praimeripaariga. Geelipildi rajad on tähistatud järgnevalt: M- *ThermoScientific Generuler 1kb ladder*, 1. VN-H1J, 2. VN-H1V, 3. VN-H1Z, 4. VN-VPg, 5. VN-VPgM, 6. VC-H1J, 7. VC-H1V, 8. VC-H1Z, 9. VC-VPg, 10. VC-VPgM, 11. pDEST-VYNE, 12. pDEST-VYCE, NK. Negatiivne kontroll, kus DNA asemel kasutati nukleasivaba vett.



**Joonis 6 Tüvesse GV3101 transformeeritud HEAT1 ja VPgM konstruktide kontroll** PCR viidi läbi attB1 ja attB2 praimeripaariga. Geelipildi rajad on tähistatud järgnevalt: M- *ThermoScientific Generuler 1kb ladder*, rajad 1-10. VN-VPgM, rajad 11-15. VN-H1J, rajad 16-18 VC-H1Z, NK. Negatiivne kontroll, kus DNA asemel kasutati nukleaasivaba vett.



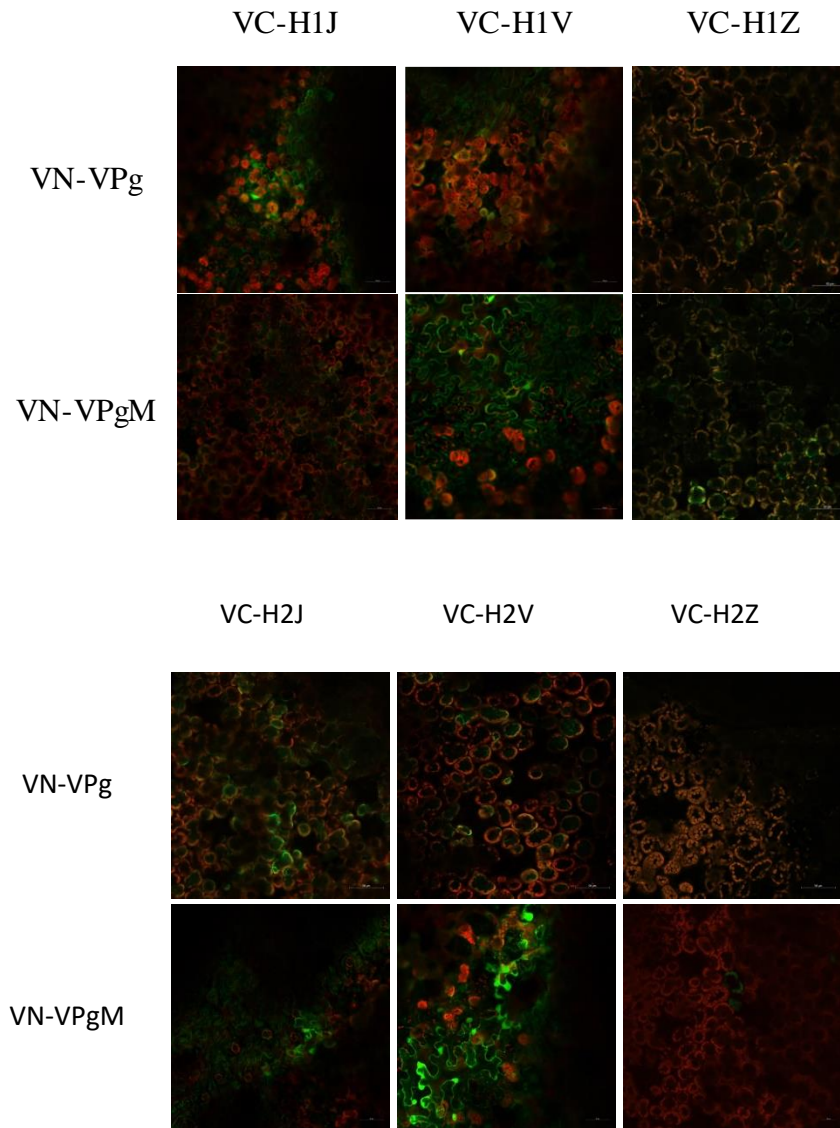
**Joonis 7. Tüvedesse C58C1 ja GV3101 transformeeritud HEAT2 konstruktide kontroll** PCR viidi läbi attB1 ja attB2 praimeripaariga. Geelipildi rajad on tähistatud järgnevalt: M- *ThermoScientific Generuler 1kb ladder*, 1. VN-H2J (C58C1), 2. VN-H2V (C58C1), 3. VC-H2J (C58C1), 4. VC-H2V (C58C1), 5. VC-H2Z (C58C1), 7. VN-H2J (GV3101), 8. VN-H2V (GV3101), 9. VC-H2J (GV3101), 10. VC-H2V (GV3101), 11. VC-H2Z (GV3101), rajad 12-14. VN-H2Z (GV3101), NK. Negatiivne kontroll, kus DNA asemel kasutati nukleaasivaba vett. Nõrk signaal radadel 12, 13, 14 ja NK on ülevõimendatud, et seda selgemini arusaadavaks muuta.

Interaktsioonide uurimiseks infiltreeriti agrobakteri suspensioonid *N.benthamiana* lehtedesse, nagu on seletatud meetoodika osas.

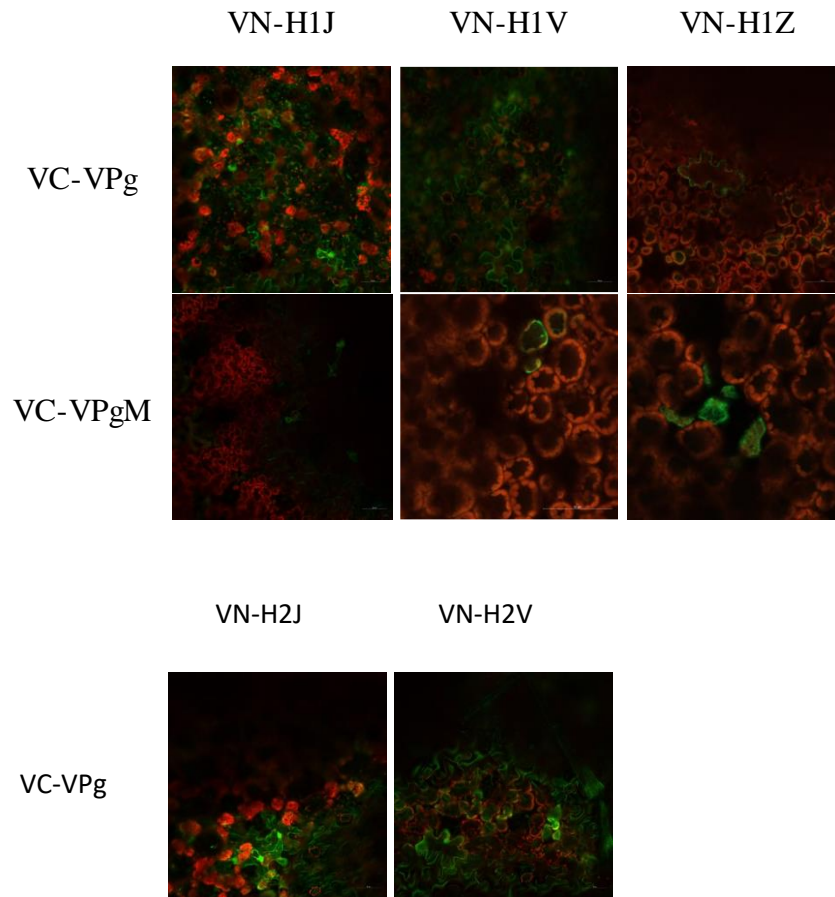
C58C1 tüves olid testitavate valkude interaktsioonid vähem selgemad võrreldes GV3101 tüvega. Erinevused seisnesid põhiliselt HEAT1 ja HEAT2 domäänide interaktsioonidel VPg ja VPgM valkudega. Nähti, et VN orientatsioonisolid interaktsioonid selgemad VPgM ja HEAT1 või HEAT2 domäänide vahel ning VC orientatsioonis olid interaktsioonid selgemad VPg ja HEAT1 või HEAT2 domäänide vahel. Kõige selgemaid signaale nähti kaerasort "Veli" HEAT1/HEAT2 domäänide interaktsioonil CfMV VPgM-ga (Joonised 8 ja 9). Konstruktide VC-VPgM ja VN-H2Z kasvatamisega oli raskuseid C58C1 tüves ning sellest tulenevalt on puudu pildid kombinatsioonidest VC-VPg + VN-H2Z, VC-VPgM + VN-H2J, VC-VPgM + VN-H2V, VC-VPgM + VN-H2Z (Joonis 9).

GV3101 tüves olevate konstruktidega infiltreeritud taimede mikroskopeerimisel nähti VC orientatsioonis olevate HEAT1 ja HEAT2 valkude interaktsiooni CfMV valkudega VN-VPg ja VN-VPgM. Kaerasortide "Jaak" ja "Veli" ning nisu "Zebra" HEAT 2 domäänid andsid selgemad signaalid, kui nende HEAT1 domäänid. Erandiks oli "Veli" VC-H1V, mis andis selgemalt nähtava interaktsiooni VN-VPg-ga kui VC-H2V. VN orientatsioonis olevate kaerasortide "Jaak" ja "Veli" ning nisu "Zebra" HEAT1 ja HEAT2 domäänidel interaktsioonidel VC orientatsioonis olevate VPg ja VPgM-ga polnud selget erinevust (Joonised 10 ja 11).

Positiivse kontrolli interaktsioonitest C58C1 tüves andis selge signaali, näidates et interaktsioonid toimuvad. Nagu varem seletatud, ei saanud aga positiivset kontrolli testida GV3101 tüves. Negatiivsed kontrollid õnnestusid mõlemas agrobakteri tüves (Joonis 12).

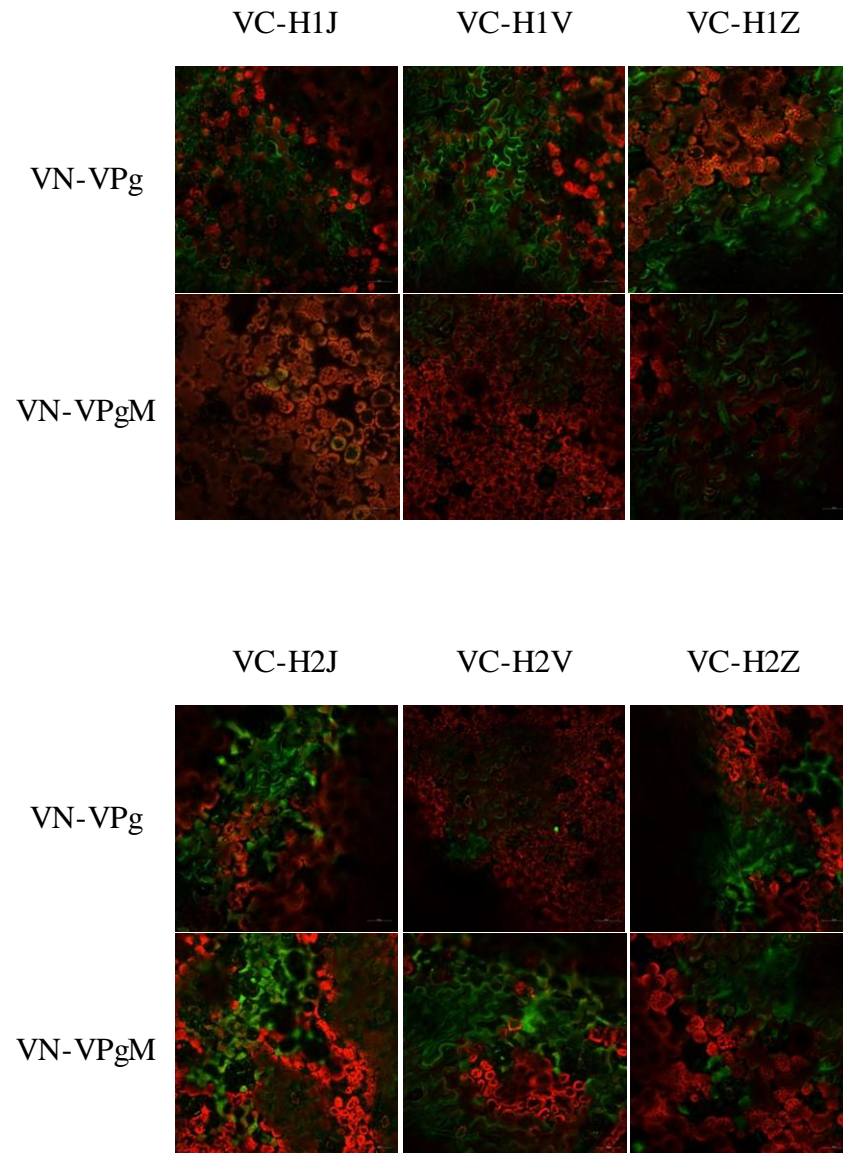


**Joonis 8** BiFC meetodiga CfMV VN-orientatsioonis VPg ja VPgM ning kaerasortide “Jaak” ja “Veli” ja nisuusordi “Zebra” eIFiso4G VC- orientatsioonis HEAT1 ja HEAT2 domäänide interaktsioonide uurimine C58C1 tüves. *N. benthamiana* lehekude konfokaalmikroskoobis. Punane signaal tuleneb kloroplastide autofluorestsentsist ning roheline signaal on Venus valgu signaal. Valgega märgistatud mõõtkava tähistab 50 µm.

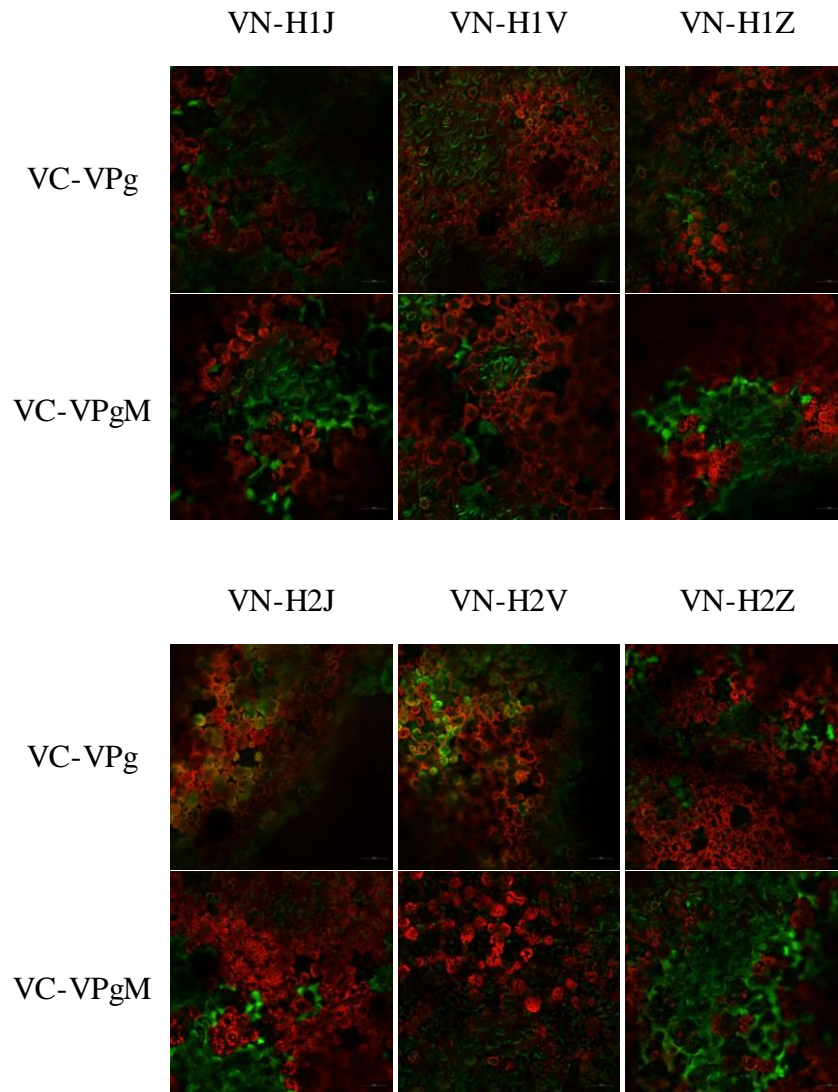


**Joonis 9.** BiFC meetodiga CfMV VC-orientatsioonis VPg ja VPgM ning kaerasortide “Jaak” ja “Veli” ja nisuusordi “Zebra” eIFiso4G VN- orientatsioonis HEAT1 ja HEAT2 domäänide interaktsioonide uurimine C58C1 tüves. *N. benthamiana* lehekude konfokaalmikroskoobis. Punane signaal tuleneb kloroplastide autofluorestsentsist ning roheline signaal on Venus valgu signaal. Valgega märgistatud mõõtkava tähistab 50 µm.



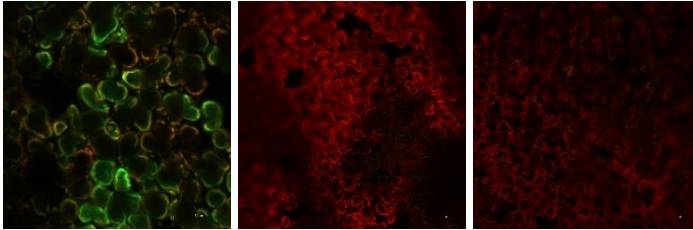


Joonis 10. BiFC meetodiga CfMV VN-orientatsioonis VPg ja VPgM ning kaerasortide “Jaak” ja “Veli” ja nisosordi “Zebra” eIFiso4G VC- orientatsioonis HEAT1 ja HEAT2 domäänide interaktsioonide uurimine GV3101 tüves. *N. benthamiana* lehekude konfokaalmikroskoobis. Punane signaal tuleneb kloroplastide autofluorestsentsist ning roheline signaal on Venus valgu signaal. Valgega märgistatud mõõtkava tähistab 50 µm.



Joonis 11. BiFC meetodiga CfMV VC-orientatsioonis VPg ja VPgM ning kaerasortide “Jaak” ja “Veli” ja niusordi “Zebra” elFiso4G VN- orientatsioonis HEAT1 ja HEAT2 domäänide interaktsioonide uurimine GV3101 tüves. *N. benthamiana* lehekude konfokaalmikroskoobis. Punane signaal tuleneb kloroplastide autofluorestsentsist ning roheline signaal on Venus valgu signaal. Valgega märgistatud mõõtkava tähistab 50 µm.

VN-Cn-X6+	pDEST-VYNE+	pDEST-VYNE+
VC-Cn-X6	pDEST-VYCE C	pDEST-VYCE G

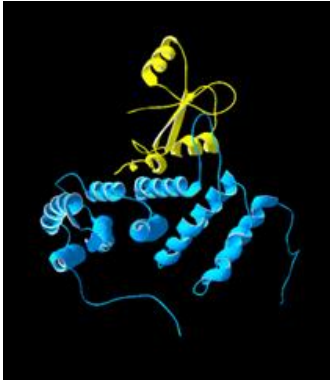


**Joonis 12. BiFC katse positiivne kontroll ning negatiivsed kontrollid.** Positiivseks kontrolliks valiti ainult C58C1 tüves kasvanud VN-Cn-X6 + VC-CN-X6 konstruktipaar. Negatiivseteks kontrollideks oli valitud mõlemas tüves kasvanud pDEST-VYNE + pDEST-VYCE konstruktipaarid. Pildil tähistab “C”-C58C1 ja “G”-GV3101 agrobakteri tüvi. *N. benthamiana* lehekude konfokaalmikroskoobis. Punane signaal tuleneb kloroplastide autofluorestsentsist ning roheline signaal on Venus valgu signaal. Valgega märgistatud mõõtkava tähistab 50  $\mu$ m.

## 5.2 In silico modelleerimine kasutades *Alphafold 2* ja *Swiss PDB Viewer*

Programmi Alphafold 2 kasutati CfMV VPg ja VPgM valkude, kaerasortide “Jaak” ja “Veli” ning niusordi “Zebra” HEAT1 ja HEAT2 domäänide modelleerimiseks. Modelleerimise tulemusena saadi viirusvalgust (VPg või VPgM) ning eFiso4G HEAT1 või HEAT2-st koosnev kvaternaarstruktuur, mida vaadeldi Swiss PDB Viewer’is. Modelleerimisel nähti, et HEAT1 domään paikneb CfMV VPg/VPgM valkudele rohkem lähestikku kui HEAT2 domään. VPg ja VPgM valkude struktuurid olid sarnased, sõltumata VPgM Ser71Ala mutatsioonist C-terminaalses osas, ning nende struktuurikomponentideks olid  $\alpha$ -heeliksid ja antiparalleelsed  $\beta$ -lehed. HEAT1 ja HEAT2 domäänide struktuurid olid samuti sarnased, sisaldades ainult  $\alpha$ -heelikseid, kuid erinesid selle poolest, et HEAT2 domääni struktuuridele oli omane pikk struktureerimata N-terminaalne osa.

HEAT1 "Jaak" + VPg



HEAT1 "Veli" + VPg



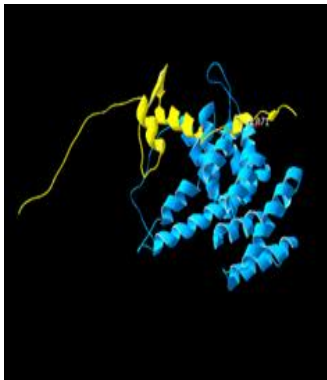
HEAT1 "Zebra" + VPg



HEAT1 "Jaak" + VPgM



HEAT1 "Veli" + VPgM



HEAT1 "Zebra" + VPgM



HEAT2 "Jaak" + VPg



HEAT2 "Veli" + VPg



HEAT2 "Zebra" + VPg



HEAT2 “Jaak” + VPgM

HEAT2 “Veli” + VPgM

HEAT2 “Zebra” + VPgM



**Joonis 13.** Swiss PDB vieweris illustreeritud CfMV valkude VPg/VPgM ning kaerasortide “Jaak” ja “Veli” ning nisusordi “Zebra” eIFiso4G HEAT1/HEAT2 domäänide kvaternaarne struktuur. Kollase värviga on tähistatud CfMV VPg ja VPgM. Sinise värviga on tähistatud HEAT1 või HEAT2 domäänid. VPgM struktuuridel on märgistatud ära mutatsioonisait Ser71Ala.

## 6. Arutelu

Käesolevas töö eesmärgiks oli uurida CfMV valkude VPg ja VPgM potentsiaalset interaktsiooni kaerasortide “Jaak” ja “Veli” ning nisusordi “Zebra” eIFiso4G HEAT1 ja HEAT2 domäänide vahel, kasutades kahte erinevat *A. tumefaciens* tüve: C58C1 ja GV3101. Katsesse kaasati VPgM põhjusega, et näha, kas on erinevust VPg ja VPgM interaktsioonide vahel. CfMV fosforülatsioonisaitidesse (T-20 ja S-71) sisse viidud mutatsioonid võivad muuta CfMVinfektsioonivõimet (Kamsol, 2010). Eelnevalt oli nende valkude vahelisi interaktsioone C58C1 tüves testitud Agnes Kivistiku ja Anna Akkermani poolt, kuid vähese katsekorduste arvuga. Agnes Kivistiku ja Anna Akkermani poolt läbi viidud katsed näitasid interaktsiooni eIFiso4G HEAT2 domääni ning CfMV VPg/VPgM vahel, kuid interaktsioon eIFiso4G HEAT1 ja CfMV VPg/VPgM vahel jäi küsitavaks (Kivistik, 2017; Akkermann, 2018). On teada, et sobemoviiruste perekonda kuuluva RYMV puhul interakteerub RYMV VPg riisi eIFiso4G HEAT domääniga (Hébrard, 2010), seetõttu võib oletada, et samasse perekonda kuuluva CfMV puhul on interaktsioonid VPg ja eIFiso4G vahel võimalikud.

Interaktsioonikatsete tulemusi käesolevas töös interpreteerides saadi tulemuseks, et interaktsioon on võimalik mõlemas orientatsioonis kaerasortide “Jaak” ja “Veli” ja nisusordi “Zebra” nii HEAT1 kui HEAT2 domäänide ning mõlemas orientatsioonis CfMV valkude VPg või VPgM vahel, erandiks C58C1 tüves testitud VC-orientatsioonis „Zebra“ HEAT2 domään VN-orientatsioonis olevate VPg ja VPgM valkudega. Kuigi võib oletada, et interaktsioon VN-orientatsioonis VPg ja VPgM valkude ja VC-orientatsioonis oleva „Zebra“ HEAT2 domääni puhul on siiski võimalik, kuna tüves GV3101 oli näha mainitud interaktsiooni.

Täheldati ka seda, et jälgitud interaktsioonide tugevus erines kaerasortide vahel ning seda eriti C58C1 tüves kasvatatud VPg ja VPgM puhul. Interaktsioonid kaerasordi “Jaak” HEAT1 domääni ja VPg vahel olid selgemad, kui HEAT 1 ja VPgM vahel. Vastupidiselt oli kaerasordi „Veli“ HEAT1 domääni interaktsioonid selgemad VPgM-ga kui VPg-ga. Katse tulemuseks saadi, et üldjoones ei erine CfMV valgud VPg ja VPgM võime poolest interakteeruda eIFiso4G-ga. Selle töö raames ei kvantifitseerinud Venuse valgu fluorestsentsi tugevust ja seega ei saa kindlalt väita, kas ühes või teises valkude kombinatsioonis olid interaktsioonid tugevamad või nõrgemad.

Nii C58C1 kui ka GV3101 tüve puhul oli märgata, et kaerasordi “Jaak” ja nisusordi “Zebra” interaktsioonid olid sarnasema intensiivsusega, kui kaerasortide omavahelised interaktsioonid. Seda võib põhjendada seosega, et kaerasordi “Jaak” eIFiso4G järjestus oli *Genbank* andmebaasi järgi sarnasem nisusordile “Zebra” kui kaerasordile “Veli” (Kivistik, 2014).

Eelnevad tööd (Kivistik, 2017; Akkermann, 2018) olid kirjeldanud oletatavaid interaktsioone ainult kõrreliste HEAT2 domääni ja VPg/VPgM vahel. Siin katsetati lisaks C58C1 tüvega ka GV3101 tüvega, ning selgus, et ka HEAT1 on potentsiaalne VPg/VPgM interaktor, nagu on riisi iso4G ja RYMV VPg puhul. Järelikult on tähtis korrata katset ka teises agrobakteri tüves.

Antud magistritöö teiseks eesmärgiks oli modelleerida CfMV valke VPg ja VPgM koos kaerasortide "Jaak" ja "Veli" ning nisuusordi "Zebra" eIFiso4G HEAT1 ja HEAT2 domäänidega, et näha kuidas paiknevad CfMV kodeeritud VPg ning kaerasortide ja nisuusordi HEAT1 ja HEAT2 valgud teineteise suhtes. Alphafold2 ja Swiss PDB Vieweriga saadud tulemuste põhjal võib arvata, et nii VPg kui ka VPgM interaktsioon on HEAT1 domääni puhul ulatuslikum kui HEAT2 puhul. See tulemus kinnitab BiFC katses saadud tulemusi VPg/VPgM ja HEAT1 domääni vahel, kuid ei põhjenda interaktsioonitestide tulemusi, mis on saadud HEAT2-ga, kus interaktsioonid GV3101 ja C58C1 tüves olid üldiselt selgemini näha kui interaktsioonid HEAT1-ga. Lisaks näitavad esialgsed tulemused *in silico* analüüsist, et CfMV VPg-iso4G ja RYMV VPg-iso4G interaktsioonid on ruumilise paiknemise poolest väga erinevad (vestlus Eugénie Hébrard'iga). RYMV VPg eIFiso4G HEAT1 domääni interaktsioon on ainus seni tõestatud interaktsioon (*in planta*) sobemoviiruse poolt kodeeritud VPg ja eIFiso4G vahel.

## 7. Kokkuvõte

Interaktsioon keraheina laiguviiruse (CfMV) VPg ning peremeesraku eukarüootse translatsioonimasinaga on oluline viraalsete valkude translatsiooni läbiviimiseks ja seega ka infektsiooniks

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida CfMV VPg ja selle fosforülatsiooni mutandi (VPgM, Ser71Ala) interaktsioone kaerasortide „Jaak” ja „Veli” ning nisusordi „Zebra” eukarüootse initsiatsioonifaktori iso4G HEAT1/HEAT2 domäänide vahel. Interaktsioonide uurimiseks kasutati bimolekulaarset fluorestsentsi komplementatsiooni meetodit (BiFC). Töö tulemusena selgus, et CfMV VPg ja selle mutantne vorm VPgM on võimelised interakteeruma kaerasortide „Jaak” ja „Veli” ning nisusordi „Zebra” eIFiso4G nii HEAT1 kui HEAT2 domäänidega.

Magistritöös modelleeriti lisaks, bioinformaatilisi meetodeid kasutades, CfMV VPg ja VPgM võimalikku ruumilist paiknemist interaktsioonil kaera ja nisu eIFiso4G HEAT1 ja HEAT2 domäänidega, neid omavahel paarides testides. Modelleerimise tulemuseks saadi kolmemõõtmeline struktuur valgukompleksist, mis sisaldas kas CfMV VPg-d või VPgM ning HEAT1 või HEAT2 domääni. Saadud mudelite võrdlusel jõuti järeldusele, et CfMV VPg või VPgM interakteerub suurema tõenäosusega eIFiso4G HEAT1 domääniga kui HEAT2 domääniga.

Nii BiFC katsetes kui *in silico* interaktsioonide modelleerimisel ei tuvastanud vahet VPg ja tema mutandi vahel

Töö edasiarendamiseks on oluline jätkata interaktsioonikatsetega *in silico*. Modelleerida tuleks CfMV VPg ja VPgM valke koos kaerasortide „Jaak” ja „Veli” ning nisusordi „Zebra” eIFiso4G tervikliku valguga ning uurida millised aminohappejäägid osalevad VPg või VPgM ja eIFiso4G vahelises interaktsioonis ning kuidas asetsevad HEAT1 ja HEAT2 domäänid sellises mudelis.



## 8. Abstract

Cocksfoot mottle virus (CfMV) belongs to genus Sobemovirus. Genome of CfMV consists of single stranded positive sense RNA. The length of CfMV genome is 4.2 kb nucleotides and contains 5 open reading frames. Similarly to other sobemoviruses, the CfMV genome contains genome linked protein (VPg) at the 5' end and lacks poly(A) tail on its 3' end. The VPg interaction with the host cell eucaryotic translation initiation factor iso4G is crucial for viral infection and translation of viral proteins.

The aim of current master's thesis was to investigate CfMV VPg and CfMV VPgM possible interactions with eucaryotic translation initiation factor iso4G HEAT1 and HEAT2 domains of oat cultivars "Jaak" and "Veli" and wheat cultivar "Zebra. Two versions of VPg were used: wild-type VPg and VPg, which has serine residue replaced with alanine residue at 71 position (VPgM). Interaction analyses were performed *in planta*, using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) method. Results from BiFC indicated that both CfMV VPg and its mutant form VPgM are capable of interaction with beforementioned oat cultivars and wheat cultivar eIFiso4G HEAT1 and HEAT2 domains.

The second aim of current study was to visualize the structures of CfMV VPg, CfMV VPgM and the HEAT1 and HEAT2 domains of eIFiso4G from "Jaak", "Veli" and "Zebra", using Alphafold2 and Swiss PDB viewer. Quaternary protein structures were modelled in 3D consisting of either VPg or VPgM and HEAT1 or HEAT2 domains to provide information about special location of CfMV VPg/VPgM and host HEAT1/HEAT2 domains. As a result of comparing different models, the CfMV VPg and VPgM are more prone to interact with eIFiso4G HEAT1 domain of oat cultivars "Jaak" and "Veli" and wheat cultivar "Zebra". This result should be analysed more thoroughly by studying which amino acid residues are responsible for the interactions between CfMV VPg/VPgM and HEAT1.

## 9. Kasutatud kirjandus

1. Akkerman, A. (2018). Keraheina laiguviiruse (CfMV) VPG fosforülatsiooni roll interaktsiooni eukarüootse initsiatsioonifaktoriga iso4G
2. Brito AF, Pinney JW. (2017). Protein-Protein Interactions in Virus-Host Systems. *Front Microbiol.*
3. Brückner, 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(6), 2763–2788.
4. Bushell, M., & Sarnow, P. (2002). Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *The Journal of cell biology*, 158(3), 395–399.
5. Campbell, A. & Guy, Paul. (2001). Cocksfoot mottle virus spreads to the South Island of New Zealand. *Australasian Plant Pathology*.
6. Dutt, Som & Parkash, J. & Mehra, R. & Sharma, N. & Singh, Brajesh & Raigond, Pinky & Joshi, Alka & Chopra, S. & Singh, Bibhu. (2015). Translation initiation in plants: roles and implications beyond protein synthesis. *Biologia Plantarum*.
7. Firth, A. E., & Brierley, I. (2012). Non-canonical translation in RNA viruses. *The Journal of general virology*, 93(Pt 7), 1385–1409.
8. Gallie, D. R., & Kado, C. I. (1989). A translational enhancer derived from tobacco mosaic virus is functionally equivalent to a Shine-Dalgarno sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(1), 129–132.
9. Genus - Sobemovirus, Editor(s): Andrew M.Q. King, Michael J. Adams, Eric B. Carstens, Elliot J. Lefkowitz, *Virus Taxonomy*, Elsevier, 2012, Pages 1185-1189, ISBN 978012384684.
10. Gillen J, Nita-Lazar A. (2019) Experimental Analysis of Viral-Host Interactions. *Front Physiol.*
11. Gingras AC, Gstaiger M, Raught B, Aebersold R. Analysis of protein complexes using mass spectrometry (2007). *Nat Rev Mol Cell Biol*.
12. Hébrard E, Pinel-Galzi A, Bersoult A, Siré C, Fargette D. (2006). Emergence of a resistance-breaking isolate of Rice yellow mottle virus during serial inoculations is due to a single substitution in the genome-linked viral protein VPg. *J Gen Virol*.
13. Hébrard, E., Poulicard, N., Gérard, C., Traoré, O., Wu, H. C., Albar, L., Fargette, D., Bessin, Y., & Vignols, F. (2010). Direct interaction between the Rice yellow mottle virus (RYMV) VPg and the central domain of the rice eIF(iso)4G1 factor correlates with rice susceptibility and RYMV virulence. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 23(11), 1506–1513. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-10-0073>
14. Hinnebusch, A. G., & Lorsch, J. R. (2012). The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(10), a011544. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011544>
15. Hodge B A and Stewart L R. (2020.) Cocksfoot mottle virus (cocksfoot mottle virus). *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CABI.
16. Jackson, R. J., Hellen, C. U., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(2), 113–127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>

17. Jiang, J., & Laliberté, J. F. (2011). The genome-linked protein VPg of plant viruses—a protein with many partners. *Current opinion in virology*, 1(5), 347–354.
18. Kamsol, K. (2010). Keraheina laiguviiruse VPg valgu fosforülatsioonisaitide mutatsioonanalüüs. Magistritöö, Tallinna Tehnikaülikool.
19. Kerppola T. K. (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annual review of biophysics*, 37, 465–487.
20. Kivistik, A. (2017). Keraheina laiguviiruse (CfMV) viraalse genoomiseoselise valgu (VPg) ja kahe kaerasordi translatsiooni initsiatsioonifaktori iso4G oletatava interaktsiooni uurimine. Magistritöö, Tallinna Tehnikaülikool.
21. Koegl M, Uetz P. Improving yeast two-hybrid screening systems. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2007 Dec;6(4):302-12.
22. Li, Z., Pogany, J., Panavas, T., Xu, K., Esposito, A. M., Kinzy, T. G., & Nagy, P. D. (2009). Translation elongation factor 1A is a component of the tombusvirus replicase complex and affects the stability of the p33 replication co-factor. *Virology*, 385(1), 245–260.
23. Ling, R., Pate, A. E., Carr, J. P., & Firth, A. E. (2013). An essential fifth coding ORF in the sobemoviruses. *Virology*, 446(1-2), 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.033>
24. M. Meier, A. Olsper, C. Sarmiento, E. Truve, Sobemovirus, Editor(s): Brian W.J. Mahy, Marc H.V. Van Regenmortel, Encyclopedia of Virology (Third Edition), Academic Press, 2008, Pages 644-652, ISBN 9780123744104, me
25. Martinez-Salas, E., Francisco-Velilla, R., Fernandez-Chamorro, J., & Embarek, A. M. (2018). Insights into Structural and Mechanistic Features of Viral IRES Elements. *Frontiers in microbiology*, 8, 2629.
26. Meier M, Paves H, Olsper A, Tamm T, Truve E. (2006). P1 protein of Cocksfoot mottle virus is indispensable for the systemic spread of the virus. *Virus Genes*.
27. Merchante, C., Stepanova, A. N., & Alonso, J. M. (2017). Translation regulation in plants: an interesting past, an exciting present and a promising future. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 90(4), 628–653.
28. Miras, M., Miller, W. A., Truniger, V., & Aranda, M. A. (2017). Non-canonical Translation in Plant RNA Viruses. *Frontiers in plant science*, 8, 494.
29. Mäkeläinen, K. (2006). Lost in translation: translation mechanisms in production of cocksfoot mottle virus proteins.
30. Mäkinen K, Tamm T, Naess V, Truve E, Puurand U, Munthe T, Saarma M. Characterization of cocksfoot mottle sobemovirus genomic RNA and sequence comparison with related viruses. *J Gen Virol*. 1995 Nov;76 ( Pt 11):2817-25.
31. Nair, S., & Savithri, H. S. (2010). Natively unfolded nucleic acid binding P8 domain of SeMV polyprotein 2a affects the novel ATPase activity of the preceding P10 domain. *FEBS letters*, 584(3), 571–576.
32. Niepel, M., & Gallie, D. R. (1999). Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. *Journal of virology*, 73(11), 9080–9088.
33. Olsper A, Arike L, Peil L, Truve E. (2011). Sobemovirus RNA linked to VPg over a threonine residue. *FEBS Lett*. 2011 Oct 3;585(19):2979-85.
34. Otsus M, Uffert G, Sõmera M, Paves H, Olsper A, Islamov B, Truve E. Cocksfoot mottle sobemovirus establishes infection through the phloem (2012). *Virus Res*. 2012 Jun;166

35. Paudel, D. B., & Sanfaçon, H. (2021). Mapping of sequences in the 5' region and 3' UTR of tomato ringspot virus RNA2 that facilitate cap-independent translation of reporter transcripts in vitro. *PLoS one*, 16(4), e0249928.
36. Pelletier, J., & Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 334(6180), 320–325.
37. Pitre S, Alamgir M, Green JR, Dumontier M, Dehne F, Golshani A. (2008). Computational methods for predicting protein-protein interactions. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2008;110:247-67. doi: 10.1007/10\_2007\_089. PMID: 18202838.
38. Sanfaçon H. Plant Translation Factors and Virus Resistance (2015). *Viruses*. 2015;7(7):3392–3419.
39. Satheshkumar PS, Gayathri P, Prasad K, Savithri HS. "Natively unfolded" VPg is essential for Sesbania mosaic virus serine protease activity. *J Biol Chem*. 2005 Aug 26;280(34):30291-300.
40. Satheshkumar PS, Lokesh GL, Savithri HS. Polyprotein processing: cis and trans proteolytic activities of Sesbania mosaic virus serine protease. *Virology*. 2004 Jan 5;318(1):429-38.
41. Shatsky, Ivan & Terenin, Ilya & Smirnova, Victoria & Andreev, Dmitry. (2018). Cap-Independent Translation: What's in a Name?. *Trends in Biochemical Sciences*.
42. Simon, A. E., & Miller, W. A. (2013). 3' cap-independent translation enhancers of plant viruses. *Annual review of microbiology*, 67, 21–42.
43. Sömera, M., Fargette, D., Hébrard, E., Sarmiento, C., & Consortium, I. C. T. V. R. (2021, December 24). *ICTV Virus Taxonomy Profile: Solemoviridae 2021*. *Journal of General Virology*.
44. Tamm T, Truve E. RNA-binding activities of cocksfoot mottle sobemovirus proteins. *Virus Res*. 2000 Feb;66(2):197-207.
45. Tamm, T., & Truve, E. (2000). Sobemoviruses. *Journal of virology*, 74(14), 6231–6241.
46. Titeca K, Lemmens I, Tavernier J, Eyckerman S. Discovering cellular protein-protein interactions: Technological strategies and opportunities. *Mass Spectrom Rev*. 2019 Jan;38(1):79-111. doi: 10.1002/mas.21574. Epub 2018 Jun 29. PMID: 29957823.
47. Wong, S. M., Koh, D. C., & Liu, D. (2008). Identification of plant virus IRES. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 451, 125–133. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-102-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-102-4_9)

## 11. Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajaid Cecilia Sarmiento't ning Merike Sömera't abi, hea juhendamise ja kannatlikuse eest. Samuti soovin tänada kõiki taimelabori 253 liikmeid, kes on mind töö tegemisel toetanud. Lisaks soovin tänada ka Cécile Gerdy't ja Eugénie Eugénie Hébrard'i, kes olid mulle abiks Prantsusmaal. Täna ka PARROT' programmi Prantsusmaa reisi rähasure eest.

## 12. Lisad

### Lisa 1. Töös kasutatud reagentide koostised.

1. E1: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA;
2. E2: 0,2 M NaOH, 1%SDS;
3. LB-vedelsööde: 0,5% pärmiekstrakt, 1% NaCl, 1% trüptoon (pH 7.0, reguleeriti 1 M NaOH-ga);
4. LB-tardsööde: 0,5% pärmiekstrakt, 1% NaCl, 1% trüptoon (pH 7.0, reguleeriti 1 M NaOH-ga);
5. Süstimispuhver (100 ml puhvri kohta): 1 ml 1M MES (pH 6.3 ), 0,5 ml 2M MgCl<sub>2</sub>, 600 µl 25 mM atsetosüriigoon ning 97,9 ml mQ-H<sub>2</sub>O;
6. PCR reaktsioonisegu lõppmaht 20 µl: 10 µl DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), 1 µl attB1 *forward* praimer, 1 µl attB2 *reverse* praimer , 7 µl nukleaasivaba vesi, 1 µl DNA matriitsahel (500ng/µl),

**Lisa 2. Töös kasutatud konstruktid.**

Sisestusvektor	Sihtmärkvektor	Konstrukti nimi
HEAT1 Jaak	G2	VN-H1J
HEAT1 Veli		VN-H1V
HEAT1 Zebra		VN-H1Z
HEAT2 Jaak		VN-H2J
HEAT2 Veli		VN-H2V
HEAT2 Zebra		VN-H2Z
VPg		VN-VPg
VPgM		VN-VPgM
Cn-X6		VN-Cn-X6
pDEST-VYNE		pDEST-VYNE
HEAT1 Jaak		G4
HEAT1 Veli	VC-H1V	
HEAT1 Zebra	VC-H1Z	
HEAT2 Jaak	VC-H2J	
HEAT2 Veli	VC-H2V	
HEAT2 Zebra	VC-H2Z	
VPg	VC-VPg	
VPgM	VC-VPgM	
Cn-X6	VC-Cn-X6	
pDEST-VYCE	pDEST-VYCE	

VPg ning HEAT1 ja HEAT2 („Jaak ja Veli“) plasmiidne DNA oli kloneeritud Agnes Kivistik’u poolt. VPgM, pDEST-VYNE, pDEST-VYCE, VN-Cn-X6, VC-Cn-X6 ning „Zebra“ HEAT1 ja HEAT2 plasmiidne DNA oli kloneeritud Anna Akkerman’i poolt.

**Lisa 4. Töös kasutatud praimerite järjestused.**

attB1: ACAAGTTTGTAGAAAAAAGCAGGCT

attB2: ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

## Lisa 5. Modelleerimisel kasutatud järjestused.

CfMV VPg:

NSELYPDQSSGPARELDAETYTERLEQGIAFTEYNISGITVKTSREWTTAEALRVARYKPLGGGKAWGSDSDE  
DTQE

CfMV VPg Ser71Ala mut:

NSELYPDQSSGPARELDAETYTERLEQGIAFTEYNISGITVKTSREWTTAEALRVARYKPLGGGKAWGDADDE  
DTQE

Kaera „Jaak“ HEAT1:

ALIKAEVPWSARRGNLSEKDKVLKTVKGILNKLTPEKFDLLKGQLLDSGITTADILKDVISLIFEKAVFEPTFCQMYA  
RLCSELNDNLPSFPPEEPGGKEITFKRVLLNNCQAEFEGADSLRVEIASLTGPDQEMERRDKEKIFKLRTLGNIRLI  
GELLKQKMOVPEKIVHHIVRESLGSDDKACPDDEEHVEAICQFFNTIGKQLDENPKSRRINDTYFVQIKELVANPQLT  
PRSKFMVRDLIDLRSNWVPRRAEIKAKTIS

Kaera „Jaak“ HEAT2:

SFTAAPIHSPAQTASPSPSSATPASVPIPEKAASSAKVIPASLQKKTVSLLSEYFGIRILDEAQQCIEELQSPDYYPEI  
VKEAINLALDKGASFDPLVRLLEHLHAKKTFKTEDLENGCMLYGSLLDIGIDLPKAPTQFGEVIARLILSCGLRFE  
AVEGILKTMEDTFFRKDIFSSVTKLEANPAGQAILSSHAVIDACNSLLK

Kaera „Veli“ HEAT1:

ALIKAEVPWVSPKRQLSEKDKVLKTVKGILNKLTPEKFDLLKGQLLDSGITTADILKDVISLIFEKAVFEPTFCQMYA  
RLCSELNDNLPSFPPEEPGGKEITFKRVLLNNCQAEFEGADSLRVEIASLTGPDQEMERRDKEKIFKLRTLGNIRLI  
GELLKQKMOVPEKIVHHIVKELLGSDKACPDDEEHVEAICQFFNTIGKQLDENPKSRRINDTYFVQIKELVANPQLT  
PRSKFMVRDLIDLRSNWVPRRAEIKAKTIS

Kaera „Veli“ HEAT2:

SFTAAPIHSPAQTASPSPSSATPASVPIPKAASSAKVIPASLQKKTVSLLSEYLVFVSWMKHNKICIEELQSPDY  
PEIVKEAINLALDKGASFDVSLVDFWSILHAKKTFQDSKIWKTAACLYGSLLDIGIDLPKAPTQFGEVIARLILSCG  
LRFEAVEGILKTMEDTYFRKDIFSSVTKLEANPAGQAILSSHGAVIDACNSLLK

Nisu „Zebra“ HEAT1:

ALIKADVPWSARRGNLSEKDRVLKTVKGILNKLTPEKFDLLKGQLLDSGITTADILKDVISLIFEKAVFEPTFCPMYA  
QLCSELNDNLPTFPSEEPGGKEITFKRVLLNNCQAEFEGADSLRVEIASLTGPDQEMEKRDKERIFKLRTLGNIRLI  
GELLKQKMOVPEKIVHHIVKELLGSDKACPDDEEHVEAICQFFNTIGKQLDENPKSRRINDTYFVQIRELVANPQLT  
PRSKFMVRDLIDLRSNWVPRRAEIKAKTIS

Nisu „Zebra“ HEAT2:

SLTASPTPLPAQTASPSPSSATPASVPIPKAASSAKVIPAGLQKKTASLLEEFYFGIRILDEAQQCIEELQSPDYHP  
EIVKEAINLALDKGASFDPLVKLLEHLYTKKTFKTEDLENGCLLYGSLLDIGIDLPKAPTQFGEVVARLILSCGLRF  
EAAEGILKAMEDTFFRKAIFTSVTKLGADPAGQAILSS

## **Lõputöö metaandmed**

Töö pealkiri (eesti keeles): Keraheina laiguviruse viraalse genoomiseoselise valgu ning kõrreliste translatsiooni initsiatsioonifaktori iso4G interaktsiooni uuringud

Töö pealkiri (inglise keeles): Studies on the interaction between the cocksfoot mottle virus genome-linked viral protein and the translation initiation factor iso4G of grasses

Autor: Mihkel Jaan Balodis

Juhendaja(d): Cecilia Sarmiento PhD, Merike Sõmera PHD

Kaitsmise kuupäev: 02.06.2022

Töö keel: Eesti keel

Asutus (eesti keeles): Tallinna Tehnikaülikool

Asutus (inglise keeles): Tallinn University of Technology

Teaduskond (eesti keeles): Loodusteaduskond

Teaduskond (inglise keeles): School of science

Instituut (eesti keeles): Keemia ja biotehnoloogia intsituut

Instituut (inglise keeles): Department of chemistry and biotechnology

Märksõnad (eesti keeles): CfMV, eIFiso4G, VPg, VPgM,

Märksõnad (inglise keeles): CfMV, eIFiso4G, VPg, VPgM,

Õigused: Lihtlitsents



