

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

POLINA VERHOVTSOVA

**Geenist ülesvoolu paiknevate avatud lugemisraamide poolt vahendatud
geeniekspressiooni regulatsioon pärmis *Saccharomyces cerevisiae***

Magistritöö molekulaarbioloogia erialal

Juhendaja prof. Juhan Sedman

Tartu 2006

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1. Pärmis <i>S. cerevisiae</i> uORFide iseloomustus	6
<i>uORFide funktsioneerimisega seotud struktuursed omadused</i>	7
a) <i>uORFi</i> initsiatsioonikoodoni lähedus mRNA 5'-otsale ja initsiatsioonikoodoni kontekst	8
b) <i>uORFi</i> pikkus.....	9
c) <i>uORFi</i> terminatsioonikoodoni ümbrus	9
d) <i>uORFi</i> lähedus allavoolu paiknevale initsiatsioonikoodonile	10
e) <i>uORFi</i> poolt kodeeritud peptiid.....	10
Pärmis <i>S. cerevisiae</i> GCN4 geen	11
2. „Ekspress” projekt.....	12
<i>Projekti tehnoloogiline taust</i>	13
<i>Peptiidide selektsioon bakteris</i>	14
<i>Peptiidide selektsioon pärmis</i>	15
<i>Peptiidide selektsioon imetajas</i>	15
TÖÖ EESMÄRGID	16
MATERJALID JA MEETODID	16
1. Oligonukleotiidid.....	16
2. Plasmiidid.....	17
3. Rakutüved ja nende kasvatamine	17
<i>Süntetilised drop-out söötmed</i>	17
4. Tempelkülv.....	19
5. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	20
6. DNA lõikamine restriktasididega	22
7. DNA lüüsimine	24
8. Fenooltöötlus ja DNA sadestamine	25
9. DNA kontsentratsiooni mõõtmine.....	26
10. DNA eraldamine 1% agarose/1× TAE geelist.....	26
11. Sekveneerimine	26
12. Plasmiidse DNA eraldamine bakterirakkudest aluselise lüüsi meetodil.....	27
13. Plasmiidse DNA eraldamine bakterirakkudest QIAGEN Plasmid Maxi Kiti abil	27
14. Plasmiidse DNA eraldamine pärmirakkudest.....	28
15. Pärmis <i>S. cerevisiae</i> rakulüsaadi valmistamine.....	28
16. Totaalse valgu kontsentratsiooni mõõtmine pärmis <i>S. cerevisiae</i> rakulüsaadist Bradfordi meetodil.....	29
17. Lutsiferaasi ekspressioonitaseme mõõtmine	29
18. Bakteri <i>E. coli</i> transformeerimine CaCl ₂ meetodil	29
19. Bakteri <i>E. coli</i> kompetentsete rakkude valmistamine elektroporeerimiseks	30

20. Bakteri <i>E. coli</i> elektroporeerimine.....	30
21. Pärm <i>S. cerevisiae</i> transformeerimine Li-atsetaadi meetodil	31
22. Pärm <i>S. cerevisiae</i> kompetentsete rakkude valmistamine elektroporeerimiseks	31
23. Pärm <i>S. cerevisiae</i> elektroporeerimine	32
TULEMUSED JA ARUTELU	33
1. uORFide DNA raamatukogu konstrueerimine	33
<i>Kloneerimine</i>	34
<i>uORFide DNA raamatukogu puhastamine</i>	34
2. Selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu skriinimine.....	36
<i>Selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu esimene skriinimine</i>	36
<i>Selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu teine skriinimine</i>	40
<i>Negatiivne kontroll selektiivsetes vedelsöötmetes skriinimisel</i>	43
3. Selektiivsetel tardsöötmetel uORFide DNA raamatukogu skriinimine	44
<i>Optimaalse erütromütsiini kontsentratsiooni määramine selektiivsetel tardsöötmetel skriinimise läbiviimiseks</i>	45
<i>Selektiivsetel tardsöötmetel uORFide DNA raamatukogu skriinimine</i>	46
4. Bakteriaalses süsteemis funktsioneerivate uORFide kontrollimine pärmisüsteemis	48
<i>Kloneerimine</i>	49
<i>Integreerimine pärm <i>S. cerevisiae</i> LEU2 lookusesse</i>	49
<i>Lutsiferaasi ekspressioonitaseme mõõtmine</i>	49
5. Pärm <i>S. cerevisiae</i> geenidest ülesvoolu paiknevate avatud lugemisraamide (uORFide) kaardistamine	51
<i>uORFide kaardistamine</i>	51
6. Pärmide <i>Saccharomyces bayanus</i> , <i>Saccharomyces castellii</i> , <i>Saccharomyces kluyveri</i> , <i>Saccharomyces kudriavzevii</i> , <i>Saccharomyces mikatae</i> ja <i>Saccharomyces paradoxus</i> aminoatsüül-tRNA süntetaaside geenidest ülesvoolu paiknevate avatud lugemisraamide (uORFide) kaardistamine	53
<i>uORFide kaardistamine</i>	54
KOKKUVÕTE	55
SUMMARY	56
KASUTATUD KIRJANDUS	57

KASUTATUD LÜHENDID

BHK-21	beebi-hamstri neerurakkude liin
bp	aluspaar
BSA	veise seerumi albumiin
ddNTP	didesoksünukleosiidtrifosfaat
DMSO	dimetüülsulfoksiid
DNase	desoksüribonukleaas
dNTP	desoksünukleosiidtrifosfaat
dsDNA	kaksikahelaline DNA
DTT	ditiotreitool
EDTA	etüleendiamiintetraatsetaat
eIF2	eukarüootne translatsiooni initsiatsioonifaktor 2
EGFP	võimendatult roheliselt fluorestseeruv valk
GFP	roheliselt fluorestseeruv valk
kbp	kiloaluspaar
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani sööde
MOPS	3-(N-morfoliino)propaansulfoonhape
mRNA	informatsiooniline RNA
mtDNA	mitokondriaalne DNA
NP-40	nonüülfenoksüpolüetoksüetanool
nt	nukleotiid
OA	orotaat
OD	optiline tihedus
OMP	orotidiin-monofosfaat
ORF	avatud lugemisraam
<i>ori</i>	replikatsiooni alguspunkt
PBS	fosfaat puhverdatud soolalahus
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon
PEG	polüetüleenglükool
RNase	ribonukleaas
rpm	pööret minutis
rRNA	ribosomaalne RNA
SDS	naatriumdodetsüülsulfaat
SFV-1	Semliki Forest viirus
TAE	Tris-atsetaat/EDTA
Tris	2-amino-2-hüdroksümetüülpropaan-1,3-diool
Triton X-100	t-oktüülfenoksüpolüetoksüetanool
U	ühik
UMP	uridiin-monofosfaat
uORF	geenist ülesvoolu paiknev avatud lugemisraam
YPD	pärmiekstrakti, peptooni ja glükoosi sisaldav sööde
2YT	pärmiekstrakti ja trüptooni sisaldav sööde
5-FOA	5-fluoroorotaat
5-FOMP	5-fluoroorotidiin-monofosfaat
5-FUMP	5-fluorouridiin-monofosfaat
5'-UTR	mittetransleeritav ala mRNA 5'-otsas

SISSEJUHATUS

Geenide ekspressioon on reguleeritud mitmel erineval tasemel sealhulgas mRNA transkriptsiooni, posttranskriptsioonilise protsessimise, stabiilsuse ja translatsiooni tasemel. Translatsiooni tasemel geeniekspressiooni regulatsioonis võivad mitmete mRNA *cis* elementide hulgas osaleda ka geenidest ülesvoolu paiknevad avatud lugemisraamid e. uORFid.

Käesoleva töö teoreetiline osa annab ülevaate pagaripärmi *S. cerevisiae* mRNAde 5'-mittetransleeritavates regioonides e. 5'-UTRides sisaldavate uORFide struktuursetest omadustest, nelja lühikese uORFi koosfunktsioneerimisest *S. cerevisiae* transkriptsioonifaktori *GCN4* ekspressiooniregulatsioonis ja ka „Ekspress” projektist, mille eesmärgiks on luua uudsed, antibiootikumite poolt paindlikult reguleeritavad ja ohutud geeniekspressioonisüsteemid kasutamiseks geenide ekspresseerimisel, geeniteraapias ja -vaktsiinides. See süsteem põhineks makroliidide ja kasvava peptiidi vahelise interaktsiooni tulemusel saavutataval translatsiooni regulatsioonis.

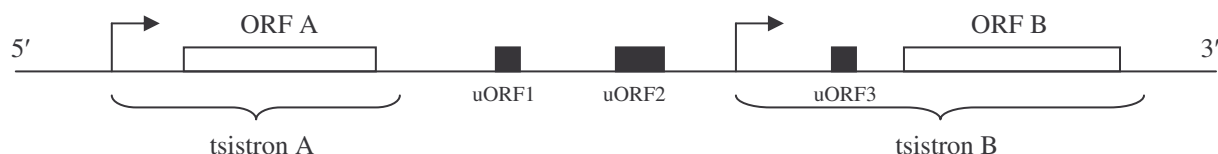
Käesoleva töö eesmärgiks on konstrueerida ja skriinida uORFide DNA raamatukogu selleks, et leida uORFe, mis võimaldaksid erütromütsiini poolt reguleeritava geeniekspressioonisüsteemi loomist pärmis *S. cerevisiae*. Töö eksperimentaalses osas kirjeldatakse uORFide DNA raamatukogu konstrueerimist ja skriinimist pärmisüsteemis. Lisaks eksperimentaalses osas kirjeldatakse pärmi *S. cerevisiae* 5'-UTRides sisaldavate uORFide *in silico* kaardistamist.

Käesolev töö on valminud Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi üldise ja mikroobibiokeemia labori juures. Nõuannete ja toetuse eest töö valmimisel soovin tänada oma juhendajat prof. Juhan Seedmanit ja teadur Tiina Tamme.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. Pärmis *S. cerevisiae* uORFide iseloomustus

uORF (ingl. k. *upstream open reading frame*) on geenist ülesvoolu asuv avatud lugemisraam. uORF võib paikneda nii tsistroni siseselt geeni 5'-UTR regioonis kui ka tsistronist ülesvoolu, sattudes niiviisi intertsistronilisesse alasse (vt. Joonis 1). uORFid võivad kattuda nii omavahel kui ka geenide ORFidega.



Joonis 1. uORFide paiknemine genoomis. Noolega on tähistatud vastava tsistroni mRNA algus. uORFid 1 ja 2 paiknevad tsistronite A ja B vahelises alas. uORF3 paikneb tsistroni B siseselt geeni B 5'-UTRis.

uORFide pikkus on väga varieeruv, kõikudes eksperimentaalselt uuritud pärmis *S. cerevisiae* 5'-UTRides 3 kuni 55 koodonini, kaasa arvatud initsiatsiooni- ja terminatsioonikoodon (vt. Tabel 1). Üldjuhul võib öelda, et uORFid on geenidest ja klassifitseerimata ORFidest lühemad.

Tabel 1. Näided pärmis *S. cerevisiae* uORFe sisaldavatest 5'-UTRidest¹.

Geen	5'-UTRi pikkus ² (nt)	uORFide arv ja pikkus (kdn) ³	Geeni produkt
<i>CBS1</i>	101	uORF (4)	Tsütokroomi <i>b</i> translatsiooniline aktivaator
<i>CLN3</i>	864	uORF (4)	G1 tsükliin
<i>CPA1</i>	244	uORF (26)	Karbamüülfosfaadi süntetaasi väike subühik
<i>DCD1</i>	33	uORF (4)	dCMP deaminaas
<i>GCN4</i>	591	uORF1 (4) uORF2 (3) uORF3 (4) uORF4 (4)	Aminohapete biosünteesis osalevate geenide transkriptsiooniline aktivaator
<i>HAP4</i>	~280	uORF1 (10) uORF2 (4)	<i>CYC1</i> transkriptsioonilise aktivaator-kompleksi subühik
<i>HOL1</i>	~385	uORF (6)	Oletatav ionide transportvalk
<i>INO2</i>	105	uORF (20)	Fosfolipiidide biosünteesis osalevate geenide transkriptsiooniline aktivaator
<i>LEU4</i>	85	uORF (12)	Alfa-isopropüülmalalaadi süntaas
<i>PET111</i>	459	uORF1 (6) uORF2 (31) uORF3 (11) uORF4 (30)	Tsütokroomi <i>c</i> oksüdaasi subühiku II translatsiooniline aktivaator

<i>PPR1</i>	50	uORF (6)	Regulaatorvalk, mis kontrollib pürimidiinide biosünteesirajas osalevate geenide transkriptsiooni
<i>SCH9</i>	~600	uORF (55)	Proteiinkinaas, mis reguleerib G1 faasi kulgemist
<i>SCO1</i>	~150	uORF (3)	Cu ²⁺ -seostuv valk, mis on vajalik tsütokroomi <i>c</i> oksüdaasi aktiivsuse tagamiseks
<i>STA1-3</i>	~100	uORF (5)	Glükoamülaasid
<i>TIF4631</i>	295	uORF1 (12) uORF2 (20) uORF3 (16) uORF4 (8) uORF5 (12) uORF6 (22)	Translatsiooni initsiatsioonifaktor eIF-4F
<i>YAP1</i>	164	uORF (7)	Transkriptsioonifaktor, mis on vajalik oksüdatiivse stressi leevendamiseks
<i>YAP2</i>	157	uORF1 (6) uORF2 (23)	Transkriptsioonifaktor, mis on vajalik oksüdatiivse stressi leevendamiseks

¹ Vilela and McCarthy, 2003 järgi.

² mRNA põhitranskripti 5'-UTRi pikkus nukleotiidides.

³ uORFide pikkus on toodud koodonites, kaasa arvatud initsiatsiooni- ja terminatsioonikoodon.

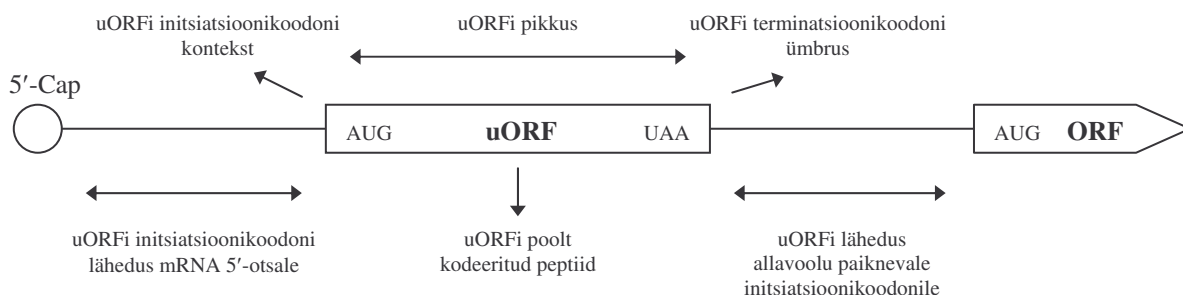
Geenide ekspressioon on reguleeritud mitmel erineval tasemel sealhulgas mRNA transkriptsiooni, posttranskriptsioonilise protsessimise, stabiilsuse ja translatsiooni tasemel. Translatsiooni tasemel geeniekspressiooni regulatsioonis võivad mitmete mRNA *cis* elementide hulgas (Morris, 1997) osaleda ka uORFid. On täheldatud, et uORFid sageli esinevad kasvufaktorite, tsütokiinide, transkriptsioonifaktorite, kinaaside ja teiste regulaatorsete geenide 5'-UTRides (Kozak, 1991a).

uORFide leidmine lihtsamate eukarüootide genoomist *in silico* ei ole keeruline. Probleem seisneb aga selles, et mRNA 5'-otsi ei ole võimalik ennustada järjestus-spetsiifilise mustri järgi, neid saab kindlaks teha ainult eksperimentaalselt. Seega ei teata, millised *in silico* leitud uORFidest satuvad geenide 5'-UTR regioonidesse, millised mitte. Pärmi *S. cerevisiae* mRNA 5'-UTRid on keskmiselt 52 nt pikad (Li and Wang, 2004), kuid uORFe sisaldavate 5'-UTRide pikkused on määratud eksperimentaalselt vaid väga vähesel hulgal geenide jaoks (vt. Tabel 1). Lähtudes nendest vähestest andmetest, mis on olemas uORFe sisaldavate mRNAde kohta, arvatakse, et ainult väike protsent *S. cerevisiae* mRNAdest (ligikaudu 100 kuni 200 transkripti umbes 6000 geeni kohta) sisaldab funktsionaalseid uORFe, mis reguleerivad allavoolu paikneva geeni ekspressiooni (McCarthy, 1998; Vilela *et al.*, 1998). Lõplik uORFe sisaldav mRNAde arv selgub alles siis, kui kõik *S. cerevisiae* mRNAde 5'-otsad saavad määratud.

uORFide funktsioneerimisega seotud struktuursed omadused

Iga uORFi iseloomustavad mitmed struktuursed omadused, mis määravad selle, kas uORF on funktsionaalne või mitte. uORFi peetakse funktsionaalseks siis, kui ta paikneb geeni 5'-UTRis ja reguleerib selle geeni ekspressiooni. Allpool on vaadeldud uORFide struktuursed

omadused pärmi *S. cerevisiae* näitel (vt. Joonis 2 ja tekst). Üldiselt kõiki neid omadusi võib ekstrapoleerida ka kõrgematele eukarüootidele.



Joonis 2. uORFide funktsioneerimisega seotud struktuursed omadused. Joonisel on skemaatiliselt näidatud mRNA, mis kannab ühte uORFi ülesvoolu põhilugemisraamist ORF.

a) uORFi initsiatsioonikoodoni lähedus mRNA 5'-otsale ja initsiatsioonikoodoni kontekst

Eukarüootne translatsioon algab sellest, et 43S ribosoomi preinitsiatsioonikompleks, mis koosneb ribosoomi 40S subühikust ja sellega seostunud eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{Met} ternaarsest kompleksist, seostub monotsistronse mRNA 5'-cap struktuuriga ning alustab skaneerimist 5'-3' suunas. Kui preinitsiatsioonikompleks tunneb ära initsiatsioonikoodoni AUG, liitub sellega ribosoomi 60S subühik ning toimub valgusünteesi initsiatsioon (Merrick and Hershey, 1996).

Initsiatsioonikoodoni äratundmine ribosoomi poolt võib olla häiritud, kui ta paikneb liiga lähedal mRNA 5'-otsale. *In vitro* katsetega, kus kasutati erineva pikkusega sünteetilisi mRNA transkripte, tehti kindlaks, et 5'-UTRi minimaalne pikkus ligikaudu 20 nt on vajalik selleks, et vältida lekkivat ribosoomi skaneerimist (*leaky ribosome scanning*) e. sellist olukorda, kui ribosoomi preinitsiatsioonikompleks liigub initsiatsioonikoodonist mööda ilma translatsiooni initsieerimiseta (Kozak, 1991b). Seega, juhul kui kaugus mRNA 5'-otsast kuni uORFi AUG koodonini on alla 20 nt, siis selle AUG äratundmine on suure tõenäosusega häiritud ning seetõttu antud uORF ei ole funktsionaalne.

Initsiatsioonikoodoni vahetus ümbruses olevat konsensusjärjestust nimetatakse initsiatsioonikoodoni kontekstiks. Tugev initsiatsioonikoodoni kontekst on ribosoomile oluliseks signaaliks translatsiooni initsiatsiooni alustamiseks, soodustades AUG äratundmist kõrgemates eukarüootides (Kozak, 1991a). *S. cerevisiae* eeldatav optimaalne AUG kontekst (A/U)A(A/C)AA(A/C)AUGUC(U/C) määrati *in silico*, analüüsides kõrgelt ekspresseerunud pärmi geene (Hamilton *et al.*, 1987). Siinkohal tuleks mainida, et AUG koodoni A nukleotiid on kokkuleppeliselt positsioonis +1, sellest üles- ja allavoolu olevaid nukleotide tähistatakse vastavalt negatiivsete ja positiivsete täisarvudega. Võrreldes kõrgemate eukarüootidega on *S. cerevisiae* puhul initsiatsioonikoodoni konteksti mõju AUG äratundmisele aga palju väiksem.

Erinevalt imetajatest on pärmi ribosoomid rohkem tundlikud mRNA sekundaarstruktuuridele kui AUG kontekstile (Vega Laso *et al.*, 1993). Eksperimentaalsed andmed näitavad, et kui -3, -2, ja -1 positsioonides esinevad *in silico* kindlaks tehtud *S. cerevisiae* kontekstist erinevad nukleotiidid, see kas ei avalda translatsiooni initsiatsiooni efektiivsusele mingit mõju või vähendab seda vähesel määral. Andmed -6, -5, -4, +4, +5 ja +6 positsioonide kohta puuduvad (Miyasaka, 1999). Seega toetudes eksperimentaalsetele andmetele võib järeldada, et pärmi funktsionaalse uORFi AUG koodon võiks olla võimalikult tugevas kontekstis, kuid see ei ole kohustuslik tingimus.

b) uORFi pikkus

Kui ribosoom initsieerib uORFi translatsiooni, tema võime reinitseerida uORFist allavoolu sõltub sellest, mitu uORFi koodonit ta peab transleerima e. sellest, kui pikk on antud uORF. Pärmi *S. cerevisiae* on näidatud, et ribosoom praktiliselt ei ole võimeline reinitseerima peale pikema kui 35 koodonilise uORFi transleerimist (Rajkowitsch *et al.*, 2004). Tähelepanuväärne on see fakt, et peaaegu kõik uORFid eksperimentaalselt uuritud pärmi mRNAde korral on lühemad kui 35 koodonit (Vilela and McCarthy, 2003; vt. Tabel 1). Erandiks on vaid *SCH9* geeni 55-koodoniline uORF.

uORFi pikkuse efekti ribosoomi reinitseerimisele seletatakse sellega, et translatsiooni elongatsiooni käigus seni identifitseerimata initsiatsioonifaktorid järk-järgult dissotsieeruvad ribosoomilt (Hinnebusch, 1997; Kozak, 2001). Järelikult, mida kiirem on uORFi elongatsioonietapp e. mida lühem on uORF, seda suurema tõenäosusega enamik allavoolu reinitseerimiseks vajalikust faktoritest jäävad ribosoomi 40S subühikuga seostunuks. Lisaks arvatakse, et ka uORFi järjestus mingil määral mõjub ribosoomi reinitseerimise võimet (Vilela and McCarthy, 2003).

c) uORFi terminatsioonikoodoni ümbrus

Ka uORFi terminatsioonikoodoni ümbruses olevad järjestused avaldavad mõju ribosoomi reinitseerimisele uORFist allavoolu. Uurimistöös *S. cerevisiae GCN4* mRNA-l leiti, et A+U-rikaste järjestuste esinemine uORFi terminatsioonikoodoni ees olevas koodonis ja ka terminatsioonikoodonile järgnevas 10 nt pikkuses järjestuses (nn. terminatsiooni regioon) tõstab reinitseerimise efektiivsust uORFist allavoolu (Grant and Hinnebusch, 1994). G+C-rikkad järjestused uORFi eelviimases koodonis ja terminatsiooni regioonis aga vastupidi vähendavad reinitseerimise efektiivsust. Saadud tulemuste seletamiseks pakuti mudel, mille järgi uORFi terminatsioonikoodoni ümbruses olevad G+C-rikkad järjestused paarduvad komplementaarsete järjestustega kas kuskil mujal uORFi kandval mRNA-l või rRNA-l (Grant and Hinnebusch, 1994). Teadaolevalt, RNA sekundaarstruktuuri stabiliseerivatest interaktsioonidest on kõige tugevamad

need interaktsioonid, mis sisaldavad mitu järjestikust CG aluspaari (Turner and Sugimoto, 1988). Selliste stabiilsete mRNA-mRNA või mRNA-rRNA interaktsioonide moodustumise tõttu ribosoomi liikumine mööda terminatsiooni regiooni aeglustub, mis võib olla põhjuseks ribosoomi dissotsieerumisele mRNAlt ning sellisel juhul uORFist allavoolu skaneerimist ja reinitsieerimist ei toimu.

d) uORFi lähedus allavoolu paiknevale initsiatsioonikoodonile

Ribosoomid, mis jäävad mRNAga seotuks peale uORFi translatsiooni terminatsiooni, ei ole võimelised koheselt reinitsieerima uORFist allavoolu. Nagu on ülalpool juba mainitud, ribosoomi võime initsieerida translatsiooni sõltub sellest, kas vajalikud initsiatsioonifaktorid on seostunud ribosoomiga või mitte. On teada, et initsiatsioonifaktor eIF2 vabaneb ribosoomilt siis, kui viimane tunneb ära AUG initsiatsioonikoodoni. AUG koodoni äratundmisega ja sellele järgneva translatsiooni protsessiga võivad kaasneda ka teiste seni identifitseerimata initsiatsioonifaktorite vabanemine ribosoomilt (Hinnebusch, 1997). Nii et peale uORFi translatsiooni ilma initsiatsioonifaktoriteta ribosoom ei ole võimeline reinitsieerima. Ribosoomide võime reinitsieerida taastub aga skaneerimisega 3'-suunas. Arvatakse, et skaneerimise käigus toimub vajalike initsiatsioonifaktorite tagasi seostumine ribosoomi 40S subühikuga (Hinnebusch, 1997).

Seega intertsistronilise regiooni pikkus uORFi ja sellest allavoolu asuva geeni vahel osutub oluliseks parameetriks uORFi funktsioneerimise seisukohalt, sest lühikese intertsistronilise regiooni korral initsiatsioonifaktorid ei jõuaks ribosoomiga uuesti seostuda selleks ajaks, kui ribosoom skaneeriks põhilugemisraami initsiatsioonikoodonini. *YAP1* ja *GCN4* uORFide näitel tehti kindlaks, et lühikeste uORFide ja põhilugemisraami vaheliste intertsistroniliste regioonide pikendamine suurendab reinitsiatsiooni efektiivsust uORFist allavoolu (Vilela *et al.*, 1999; Kozak, 1987).

e) uORFi poolt kodeeritud peptiid

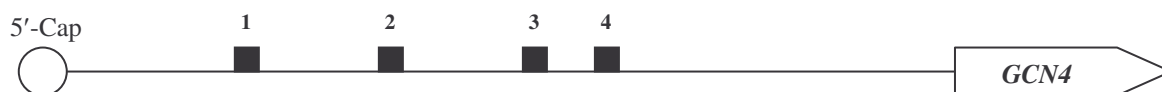
Mõningatel juhtudel koregulaatormolekuli juuresolekul uORFi poolt kodeeritud peptiid interakteerub ribosoomi peptidüültransferaasse tsentriga translatsiooni elongatsiooni või terminatsiooni käigus, põhjustades ribosoomi peatumist mRNA-l (*stalling*). Peatunud ribosoom blokeerib ka järgmiste mRNAle seostuvate ribosoomide skaneerimist uORFist allavoolu (Morris and Geballe, 2000). Teadaolevad koregulaatorid on madalmolekulaarsed ained nagu polüamiinid (spermiidiin, spermiin), aminohapped (arginiin, trüptofaan) ja erinevad antibiootikumid (Morris and Geballe, 2000).

Siiani on pärmis *S. cerevisiae* leitud ainult üks mRNA, mille korral põhilugemisraami translatsiooni represseeritakse uORFi poolt kodeeritud peptiidist sõltuvalt. See on arginiini-spetsiifilise karbamooülfosfaadi süntetaasi väikest subühikut kodeeriva *CPA1* geeni mRNA, mis sisaldab 26-koodonilist uORFi (Werner *et al.*, 1987). *CPA1* on negatiivselt kontrollitud translatsiooni tasemel vastuseks arginiini kontsentratsiooni kõikumisele kasvukeskkonnas: kõrgetel arginiini kontsentratsioonidel *CPA1* uORFi poolt kodeeritud peptiid, mida nimetatakse arginiini attenuaator-peptiidiks (AAP), põhjustab ribosoomi peatumist terminatsioonikoodonis ja seega blokeerib *CPA1* translatsiooni; madalatel arginiini kontsentratsioonidel kasvukeskkonnas ribosoomid skaneerivad *CPA1* uORFist mööda lekkiva skaneerimise abil ja initsieerivad *CPA1* translatsiooni (Gaba *et al.*, 2001).

Eespool vaadeldi uORFide funktsioneerimisega seotud struktuurseid omadusi sellise juhtumi korral, kui 5'-UTR sisaldab ainult ühte uORFi (vt. Joonis 2). Nagu on Tabelist 1 näha, sisaldab osa eksperimentaalselt uuritud *S. cerevisiae* 5'-UTRidest mitut uORFi. Sellisel juhul uORFide funktsioneerimine võib olla üksteisega seotud ning seetõttu komplitseerub. Mitme uORFi koosfunktsioneerimist on allpool käsitletud *GCN4* mRNA näitel.

Pärmi *S. cerevisiae* *GCN4* geen

Pärmi *GCN4* geeni translatsiooniline kontroll on kõige paremini läbi uuritud näide regulaatorsete uORFide omavahelistest interaktsioonidest. *GCN4* kodeerib transkriptsioonifaktorit, mis aktiveerib ligikaudu 50 aminohappe biosünteesis osaleva geeni ekspressiooni. Aminohapete nälja korral inhibeeritakse raku üldist valgusünteesi, *GCN4* mRNA translatsiooni aga võimendatakse (Hinnebusch, 1996). *GCN4* translatsiooni võimendamine vastuseks aminohapete puudumisele on reguleeritud *GCN4* 5'-UTRis sisaldavate nelja lühikese uORFi (vt. Tabel 1 ja Joonis 3) omavahelise interaktsiooniga.



Joonis 3. *GCN4* 5'-UTRi skemaatiline struktuur. Numbritega 1-4 on tähistatud vastavad uORFid.

Peale uORF1 transleerimist on ribosoomid võimelised reinitseerima uORF1-st allavoolu 50% efektiivsusega. uORFid 2, 3 ja 4 on rohkem inhibitoorsed võrreldes uORF1-ga. Näiteks, uORF4 üksi inhibeerib põhilugemisraami translatsiooni 99% (Hinnebusch, 1996). Leiti, et *GCN4*

5'-UTRis sisaldavate uORFide inhibitoorne efekt on seotud uORFide terminatsioonikoodonite ümbruses olevate järjestustega (Grant and Hinnebusch, 1994; vt. uORFide funktsioneerimisega seotud struktuursed omadused).

uORF1 alandab ribosoomi initsiatsioonivõimet. Ribosoomi initsiatsioonivõime taastamine sõltub eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{Met} ternaarse kompleksi kontsentratsioonist. eIF2 on eukariootne translatsiooni initsiatsioonifaktor 2, mis viib metioniiniga laetud initsiaator-tRNA^{Met} (Met-tRNA_i^{Met}) ternaarses kompleksis GTP-ga ribosoomi 40S subühikule, moodustades 43S preinitsiatsioonikompleksi (Merrick and Hershey, 1996). Aminohapete nälja korral eIF2 α subühik fosforüleeritakse ning initsiatsioonifaktor ei ole võimeline moodustama ternaarset kompleksi ja initsieerima translatsiooni. Seega aminohapete nälja korral, kui ternaarse kompleksi kontsentratsioon on madal, ei jõua ribosoomi reinitseerimisvõime peale uORF1 translatsiooni taastada selleks ajaks, kui ta jõuab inhibitoorsete uORFideni (2, 3 ja 4), seega ribosoom liigub inhibitoorsetest uORFidest mööda, ilma et initsieeriks nende translatsiooni. Skaneerides edasi inhibitoorsetest uORFidest allavoolu jõuab ribosoom *GCN4* initsiatsioonikoodonini, selleks ajaks tema reinitseerimisvõime taastub ning toimub *GCN4* translatsioon. Normaalsetel kasvutingimustel eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{Met} ternaarse kompleksi kontsentratsioon on kõrge ning peale uORF1 translatsiooni seostub ternaarne kompleks ribosoomiga enne, kui ta jõuab inhibitoorsete uORFideni, seetõttu toimub inhibitoorsete uORFide translatsioon ja seetõttu *GCN4* ekspressiooni pärsitakse (ülevaade Hinnebusch, 1996; Morris and Geballe, 2000).

2. „Ekspress” projekt

„Ekspress” projekti vastutavaks juhiks on Tartu Ülikooli tehnoloogia instituudi (TÜTI) molekulaarbioloogia vanemteadur, Tanel Tenson. Projekti on kaasatud peale TÜTI Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi (TÜMRI) ja Eesti Biokeskuse (EBK) onkogeneesi laborite uurijad. Antud projekt kujutab endast rakendusuuringut, mis on jätkuks mainitud laborites seni edukalt läbi viidud alusuuringutele.

„Ekspress” projekti põhieesmärgiks on luua uudsed, makroliidide poolt paindlikult reguleeritavad ja ohutud geeniekspressioonisüsteemid kasutamiseks geenide ekspresseerimisel, geeniteraapias ja -vaktsiinides. See süsteem põhineks makroliidide ja kasvava peptiidi vahelise interaktsiooni tulemusel saavutataval translatsiooni regulatsioonil.

Imetajas kasutatavaid, makroliididega reguleeritavaid geeniekspressioonisüsteeme on maailmas juba olemas (Weber *et al.*, 2002; Fux *et al.*, 2003). Kuid võrreldes olemasolevate süsteemidega on käesolev projekt uudne kahel põhjusel: 1) regulatsioon toimub translatsiooni

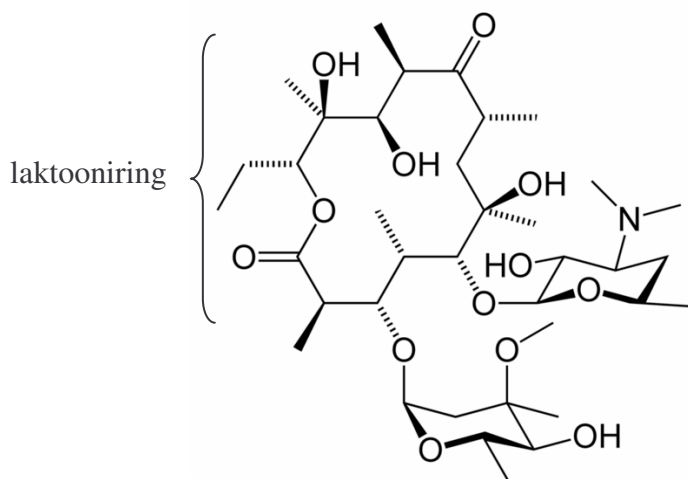
tasemel; 2) regulatsioon saavutatakse kasvava peptiidi ja madalmolekulaarse ühendi vahelise interaktsiooni tulemusena ribosoomis. Kasvava peptiidi ja madalmolekulaarse ühendi vahelise interaktsiooni tulemusena saavutatavat regulatsiooni on mõnedes bioloogilistes süsteemides kirjeldatud, kuid siiani ei ole see tehnoloogilist kasutamist leidnud (Tenson and Ehrenberg, 2002).

Projekti tehnoloogiline taust

Makroliidid on meditsiinis laialt kasutatav antibiootikumide rühm, mille keskseks struktuurelemendiks on laktooniring (Hansen *et al.*, 2002). Sellel antibiootikumirühmal on head farmakokineetilised ja farmakodünaamilised omadused ning vähesed kõrvalmõjud (Alvarez-Elcoro and Enzler, 1999).

Peptiidside moodustatakse ribosoomi suuremas subühikus asuvas peptidüültransferaases tsentris (Moore and Steitz, 2002). Sealt edasi liigub kasvav peptiid ribosoomi suuremat subühikut läbivasse tunnelisse (Tenson and Ehrenberg, 2002). Makroliidid inhibeerivad translatsiooni seondudes peptiidi tunnelisse ja seega peatades sünteesitava peptiidi edasise kasvu ribosoomis. On näidatud, et makroliidide poolt põhjustatud translatsiooni peatumine sõltub kasvava peptiidi järjestusest (Tenson *et al.*, 2003).

Kõige tuntumaks makroliidide näiteks on erütromütsiin (vt. Joonis 4). Erütromütsiin seondub eelistatult prokariootset tüüpi ribosoomile, kuid on näidatud, et märgatav seondumine, mille afiinsus on ligikaudu kaks suurusjärku madalam, toimub ka arheobakterite ja eukariootide ribosoomidega (Pestka, 1977; Hansen *et al.*, 2002).



Joonis 4. Erütromütsiini keemiline struktuur.

Siiani on makroliidide ja kasvava peptiidi vahelisi interaktsioone uuritud prokariootides (Weisblum, 1995; Tenson and Mankin, 2001). „Ekspress” projekti eesmärgiks on kasutada

kasvava peptiidi ja makroliidide vahelisi interaktsioone ka eukariootse ribosoomi peatamiseks. Tulevikus makroliididest sõltuvalt translatsiooni peatavaid peptiidide järjestusi (uORFe) saab kasutada konstrueerimaks ekspressioonivektoreid, millelt geeniekspressioon on kas antibiootikumidest sõltuvalt represseritud või indutseeritud. Represseeritava süsteemi konstrueerimiseks asetatakse funktsionaalne uORF huvipakkuva geeni lugemisraami ette. Indutseeritava süsteemi konstrueerimiseks asetatakse uORF repressorgeeni lugemisraami ette, mille produkt represserib huvipakkuva geeni ekspressiooni.

Makroliidide poolt reguleeritava geeniekspressioonisüsteemi loomiseks on vaja selgitada välja, millised peptiidid makroliididega ribosoomis seonduvad. Selleks asetatakse juhusliku järjestusega uORFid markervalku kodeeriva lugemisraami ette ning valmistatakse sellise konstruktsiooniga ekspressioonikassette sisaldavate plasmiidide raamatukogu. uORFide raamatukogu skriinimiseks kasutatakse selektsioonisüsteemi nii bakteris, pärmis kui imetajas. Skriinimise käigus selekteeritakse välja need uORFide raamatukogu sisaldavad rakud, kus markergeeni ekspressioon toimub makroliidi puudumisel ning on represseritud makroliidi lisamisel rakkude kasvukeskkonda. Projekti esialgsetes selektsioonisüsteemides kasutatakse erütromütsiini kui kõige paremini läbiuuritud toimega makroliidi.

Kuna ribosoomi aktiivtsentrid on konserveerunud (Moore and Steiz, 2002) ja samas on näidatud, et mõningal juhul reguleeriva kasvava peptiidi funktsionaalsus säilib ka teises, väga kauges organismirühmas (Fang *et al.*, 2004), arvatakse, et mingi osa bakteriaalses süsteemis selekteeritud peptiididest säilitavad oma funktsionaalsust ka eukariootsetes süsteemides (pärmis ja imetajas). Projekti põhieesmärgi saavutamiseks peaksid selekteeritud uORFid olema kasutatavad imetaja süsteemis.

Peptiidide selektsioon bakteris

Peptiidide selektsiooni bakteris *Escherichia coli* viiakse läbi TÜTI vanemteadur T. Tensoni töörühma poolt.

uORFide DNA raamatukogu konstrueerimiseks kasutatakse markergeenidena kas *lacZ*, mille puhul on võimalik jälgida rakukoloonia värvi (Miller, 1992) või GFPd (roheliselt fluorestseeruv valk), mille sisalduse alusel on võimalik rakke jaotada läbivoolu tsütomeetri abil (Miyawaki *et al.*, 2003). uORFide DNA raamatukogu skriinimise esimeses etapis selekteeritakse bakterirakke, kus markergeen ekspresseerub. Teises etapis madalas kontsentratsioonis (30 µg/mL) erütromütsiini lisamisel selekteeritakse rakke, kus erütromütsiini mõjul on markergeeni ekspressioon lakanud.

Peptiidide seleksioon pärmis

Peptiidide seleksiooni pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* viiakse läbi TUMRI üldise ja mikroobibiokeemia labori uurijate, kaasa arvatud käesoleva töö autori poolt üldise ja mikroobibiokeemia prof. J. Sedmani juhendamisel. Peptiidide seleksiooni pärmis on kirjeldatud käesoleva töö tulemuste ja arutelu osas.

uORFide DNA raamatukogu konstrueerimiseks kasutatakse pärmi metaboolset markergeeni *URA3*, mis võimaldab läbi viia nii positiivset (aktiivse *URA3* geeni järgi) kui ka negatiivset (aktiivse *URA3* geeni vastu) seleksiooni, kasvatades pärmirakke vastavalt uratsiili mittesisaldaval (Ausubel *et al.*, 1995) ja 5-FOAd (5-fluoroorotaat) sisaldaval (Brown and Szostac, 1983) selektiivsöötmel. uORFide DNA raamatukogu skriinimise käigus selekteeritakse esialgu pärmirakke, kus markergeen ekspresseerub – positiivne kasv uratsiili mittesisaldaval söötmel. Seejärel selekteeritakse rakke, kus erütromütsiini mõjul on markergeeni ekspressioon repressseeritud – positiivne kasv erütromütsiini ja 5-FOAd sisaldaval söötmel. Seejuures selleks, et välistada valepositiivsete 5-FOAle resistentsete rakkude selekteerimist, kontrollitakse selekteeritud rakud erütromütsiinita 5-FOAd sisaldaval söötmel – positiivne kasv valepositiivsete rakkude korral. Pärmirakkude skriinimisel esialgu kasutatakse erütromütsiini kontsentratsiooniga 500 µg/mL.

Peptiidide seleksioon imetajas

Peptiidide seleksiooni imetajarakkudes viiakse läbi EBK onkogeneesi labori uurijate poolt, mida juhatab mikrobioloogia ja viroloogia erakorraline prof. A. Merits.

uORFide raamatukogu konstrueeritakse SFV-1 (Semliki Forest viirus) vektorsüsteemi põhjal. SFV-1 on positiivse polaarsusega RNA genoomne viirus, mis kuulub sugukonda *Togaviridae* ja perekonda *Alphavirus*. On näidatud, et selle perekonna viiruste vektorsüsteemidel põhinevad juhuslike järjestuste ja geenipankade analüüsiks kasutatavad seleksioonisüsteemid on kõrge läbilaskevõimega (Koller *et al.*, 2001). Markergeeninna SFV-1 vektorsüsteemis kasutatakse EGFPd (võimendatult roheliselt fluorestseeruv valk), mille positiivseid rakke selekteeritakse läbivoolu tsütomeetri abil. uORFide raamatukogu skriinimise esimeses etapis nakatatakse uORFe kandvate modifitseeritud SFV-1 viirustega BHK-21 rakke (beebi-hamstri neerurakkude liin) ja selekteeritakse neid rakke, kus markergeen ekspresseerub. Teises etapis erütromütsiini juuresolekul selekteeritakse rakke, kus erütromütsiini mõjul on markergeeni ekspressioon repressseeritud.

TÖÖ EESMÄRGID

Käsil oleva töö autor seab eesmärgiks a) konstrueerida ja skriinida uORFide DNA raamatukogu selleks, et leida uORFe, mis võimaldaksid erütromütsiini poolt reguleeritava geeniekspressioonisüsteemi loomist pärmis *S. cerevisiae*; b) kontrollida pärmisüsteemis vanemteadur T. Tensoni töörühma (TÜTI) poolt isoleeritud bakteriaalses süsteemis funktsioneerivad uORFid; c) kaardistada pärmi *S. cerevisiae* geenide 5'-UTRides paiknevad uORFid selleks, et tulevikus uurida uORFide poolt vahendatud geeniregulatsiooni mehhanisme.

MATERJALID JA MEETODID

1. Oligonukleotiidid

Eksperimentaalse töö käigus kasutatud oligonukleotiidid (DNA Technology A/S) on toodud Tabelis 2.

Tabel 2. Töös kasutatud oligonukleotiidid.

Oligonukleotiid	Järjestus (5'→3')	Tüüp	Kasutamise otstarve
5ECO	AATGAATTCATGNNNNNNNNNNNNNNNNNNATGTCGAAA GCTACATATAAG*	Pärisuunaline	DNA raamatukogu konstrueerimine
5ECOSTOP	AATGAATTCATGNNNNNNNNNNNNNNNNNTAAATGTCG AAAGCTACATATAAG	Pärisuunaline	DNA raamatukogu konstrueerimine
3NCO	TGCCCTCCATGGAAAAATC	Vastassuunaline	DNA raamatukogu konstrueerimine
LIBRSEQ	TTTTGATTCGGTAATCTCCG	Pärisuunaline	DNA raamatukogu sekveneerimine
5BAM1804-46	ATAGGATCCAAAATGCTGGTGCGCAACTTTTTCGGGATGGA AGACGCCAAAAACATA	Pärisuunaline	Isolaadi 1804-46 testimine
5BAM2903-24	ATAGGATCCAAAATGATCAGTGTGTGGCTTGTGCTATGGA AGACGCCAAAAACATA	Pärisuunaline	Isolaadi 2903-24 testimine
5BAM2903-24tg	ATAGGATCCAAAATGGCTGTCTTTGGGTGAGTATCATGGA AGACGCCAAAAACATA	Pärisuunaline	Tagurpidi koodonitega isolaadi 2903-24 testimine
5BAMnegkEcoli	ATAGGATCCAAAATGTGTCCACAGGCTGAGAAGACTATGGA AGACGCCAAAAACATA	Pärisuunaline	Negatiivne kontroll isolaatide testimisel
5BAMWOORF	ATAGGATCCAAAATGGAAGACGCCAAAAACATA	Pärisuunaline	Negatiivne kontroll isolaatide testimisel
5BAMTA09	ATAGGATCCAAAATGGTGGTGAATGCCGTTTTATGGA AGACGCCAAAAACATA	Pärisuunaline	Isolaadi TA09 testimine
5BAMY16	ATAGGATCCAAAATGATCTGCGTTAGGAGCTAGATGGA AGACGCCAAAAACATA	Pärisuunaline	Isolaadi YP16 testimine
LUC-S	ATAGAATTCAAGAGATACGCC	Pärisuunaline	Integreerimiskonstruktide kontrollimine
LUCXHO-AS	TTACACGGCGATCTTTCC	Vastassuunaline	Integreerimiskonstruktide tegemine ja kontrollimine

* N – suvaline desoksüribonukleotiid. Joon on alla tõmmatud uORFide järjestustele.

2. Plasmiidid

Eksperimentaalse töö käigus erinevates katsetes kasutatud plasmiidid on toodud Tabelis 3.

Tabel 3. Töös kasutatud plasmiidid.

Plasmiid	Iseloomustus	Allikas
pExp2	5'851 aluspaariline kõrge koopiaarvuga tsentromeerne kloneerimisvektor. Sobib kasutamiseks nii pärmis <i>S. cerevisiae</i> kui ka bakteris <i>E. coli</i> . Konstrueeritud ülekandevaktori pRS316 põhjal, kuhu kloneeriti <i>TRP1</i> geen. Lisaks kannab <i>URA3</i> , pärmi markergeeni, ampitsilliinile resistentsust tagava <i>bla</i> geeni, <i>f1 ori</i> , <i>pMB1 ori</i> , <i>CEN6/ARSH4</i> . Plasmidi kaart on toodud Lisas 1.	Konstrueeritud kraadiõppur P. Jõersi poolt
pGL3-Basic	4'818 aluspaariline vektor. Kannab <i>LUC</i> reportergeeni, ampitsilliinile resistentsust tagava <i>bla</i> geeni, <i>f1 ori</i> , <i>ColE1 ori</i> . Plasmidi kaart on toodud Lisas 2.	Promega
pLRL- <i>URA3</i>	Konstrueeritud pLRL põhjal, kuhu kloneeriti <i>TRP1</i> geen, <i>URA3</i> promootori ja <i>CYC1</i> terminaatori järjestused. Kannab <i>LEU2</i> geeni eesmist (L) ja tagumist (R) otsa.	Konstrueeritud teadur T. Tamme poolt

3. Rakutüved ja nende kasvatamine

Töös kasutatud rakutüved on toodud Tabelis 4.

Tabel 4. Töös kasutatud rakutüved.

Rakutüvi	Genotüüp	Viide
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>hsdR17(r_K⁻m_K⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 $\Delta(lacZYA-argF)_{U169}(m80lacZ\Delta M15)$</i>	Hanahan, 1983
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
W303 α	<i>MATα ade2-1 leu2-3,112 his3-11,15 can1-100 ura3-1 trp1-1</i>	Rothstein, 1983

E. coli rakke kasvatati 37°C juures LB (Luria-Bertani) söötmel (0.5% pärmiekstrakt, 1% trüptoon, 1% NaCl) või 2YT söötmel (1% pärmiekstrakt, 1.6% trüptoon, 0.5% NaCl). Selekteerimiseks lisati söötmetele 100 µg/mL ampitsilliini (Balkanpharma). *S. cerevisiae* rakke kasvatati 30°C juures YPD söötmel (1% pärmiekstrakt, 2% peptoon, 2% glükoos) või vastaval sünteetilisel selektiivsel söötmel (vt. Sünteetilised *drop-out* söötmed). Vedelsöötmetes kasvatamisel aereeriti nii bakteri- kui ka pärmikultuure loksutil (SI-900, Jeio Tech) 200 rpm.

Sünteetilised *drop-out* söötmed

Sünteetiline *drop-out* sööde sisaldab kõiki pärmi kasvuks vajalikke aineid v.a. lämmastikalus uratsiil või üks või mitu aminohapet. *Drop-out* söötmed võimaldavad selekteerida pärmirakke söötmes puuduva aine biosünteesis osaleva aktiivse geeni olemasolu järgi (Ausubel et al., 1995). See on nn. positiivne seleksioon. Näiteks, -TRP *drop-out* sööde selekteerib

selliseid pärmirakke, millel on olemas aktiivne *TRP1* geen, mis osaleb trüptofaani biosünteesis. Töös kasutatud sünteetiliste *drop-out* söötmete koostised on toodud Tabelis 5.

Tabel 5. Töös kasutatud sünteetiliste *drop-out* söötmete koostised¹.

Söötme komponendid	LK ²	-TRP	-TRP, sorbitool	-TRP, -URA	-TRP, -URA, sorbitool	-TRP, erütromütsiin	-TRP, 5-FOA, erütromütsiin	-TRP, -URA, glütserool, erütromütsiin
Lämmastikalused ³	0.67%	+	+	+	+	+	+	+
-Ade, -His, -Leu, -Lys, -Trp, -Ura <i>drop-out</i> aminohapete segu ⁴	0.2%	+	+	+	+	+	+	+
Adeniin	0.002%	+	+	+	+	+	+	+
Histidiin	0.01%	+	+	+	+	+	+	+
Leutsiin	0.025%	+	+	+	+	+	+	+
Lüsiin	0.01%	+	+	+	+	+	+	+
Uratsiil	0.005%	+	+	-	-	+	+	-
Glükoos	2%	+	+	+	+	+	+	-
Glütserool	3%	-	-	-	-	-	-	+
Sorbitool	1 M	-	+	-	+	-	-	-
Erütromütsiin ⁵	Var.	-	-	-	-	+	+	+
5-FOA ⁶	0.1%	-	-	-	-	-	+	-
Agar ⁷	2%	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

¹ Söötmete koostised on toodud Rose *et al.*, 1990 järgi.

² LK – söötmete komponentide lõppkontsentratsioonid.

³ Pärmilämmastikalused ilma aminohapeteta (Difco).

⁴ Segu sisaldab kõiki pärmil kasvuks vajalikke aminohappeid (Sigma) v.a. Ade – adeniin, His – histidiin, Leu – leutsiin, Lys – lüsiin, Trp – trüptofaan ja lämmastikalus Ura – uratsiil. Segamine vt. Ausubel *et al.*, 1995 või Rose *et al.*, 1990.

⁵ Sõltuvalt katsest erütromütsiini (Sigma) kontsentratsioon söötmes varieerub.

⁶ 5-FOA e. 5-fluoroorotaat (Toronto Research Chemicals).

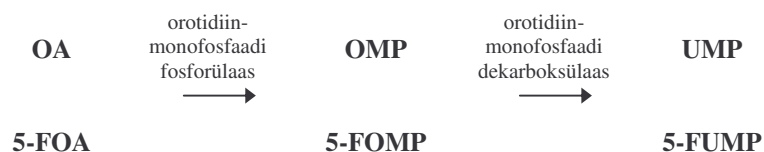
⁷ Agarit lisati ainult tardsöötmete valmistamisel.

Käesolevas töös kasutati enamasti fermenteeritava (glükoos), kuid selektiivsetel tardsöötmetel optimaalse erütromütsiini kontsentratsiooni määramiseks ka mittefermenteeritava (glütserool) süsinikuallikaga sünteetilisi *drop-out* söötmeid.

Metsiktüüpi *S. cerevisiae* rakkudes 5-fluoroorotaat (5-FOA) lülitub uratsiili biosünteesirajasse orotaadi (OA) asemel (vt. Joonis 5). Orotidiin-monofosfaadi fosforülaas konverteerib 5-FOA 5-fluoroorotidiin-monofosfaadiks (5-FOMP). Järgnevalt orotidiin-monofosfaadi dekarboksülaas, mida kodeerib pärmi *URA3* geen, dekarboksüleerib 5-FOMP 5-fluorouridiin-monofosfaadiks (5-FUMP). 5-FUMPi lagunemisel tekib fluorodesoksüuriidiin, mis

on tümidülaat süntetaasi tugevaks inhibiitoriks ja seetõttu on rakkudele väga toksiline. Seega metsiktüüpi pärmirakud ei ole eluvõimelised 5-FOAd sisaldaval söötmel. Kuid *ura3⁻* mutandid, mis aktiivse orotidiin-monofosfaadi dekarboksülaasi puudumise tõttu ei sünteesi FUMPd, on võimelised kasvama 5-FOA söötmel (Boeke *et al.*, 1984). Samal ajal *ura3⁻* mutandid ei suuda sünteesida UMPd ja seetõttu nad on uratsiili auksotroofid ning kasvamiseks vajavad uratsiili või uridiini lisamist söötmesse.

Seega 5-FOA sööde võimaldab selekteerida aktiivse pärmi *URA3* geeni vastu. See on nn. negatiivne seleksioon (Brown and Szostac, 1983).



Joonis 5. 5-fluoororotaadi lülitumine uratsiili biosünteesirajasse orotaadi asemel. OA – orotaat, OMP – orotidiin-monofosfaat, UMP – uridiin-monofosfaat, 5-FOA – 5-fluoororotaat, 5-FOMP – 5-fluoororotidiin-monofosfaat, 5-FUMP – 5-fluorouridiin-monofosfaat.

Söötmete vahetamiseks uORFide DNA raamatukogu selektiivsetes vedelsöötmetes skriinimise käigus tsentrifuugiti pärmikultuurid 5 min 2000 rpm 4°C juures (GSA rootor, Sorvall RC-5B, Du Point Instruments), pesti kaks korda autoklaavitud ddH₂O-ga ja resuspendeeriti vastavates söötmetes.

4. Tempelkülv

Selektiivsetel tardsöötmetel uORFide DNA raamatukogu skriinimisel uORFide DNA raamatukoguga elektroporeeritud W303α pärmirakud külvati 50-le sorbitooliga -TRP, -URA tassile ja kasvatati 48 tundi 30°C juures. Negatiivseks kontrolliks oli plasmiidiga pExp2 elektroporeeritud pärmirakkudega tass. Igal tassil üleskasvanud pärmikolooniaid külvati kolmele erinevale tassile (-TRP, FOA; 1 mg/mL erütromütsiiniga -TRP, FOA; -TRP, -URA) tempelmeetodil. Selleks kasutati spetsiaalset templit, mis kaeti steriilse vahetatava sametiga. Matriitsina kasutatava pärmikolooniatega sorbitooli sisaldavast -TRP, -URA söötmeplaadist tekitati templikattele jäljend ja vastava uue söötmeplaadi inokuleerimiseks kergelt vajutati seda templikattele. Inokuleeritavate tasside põhjale eelnevalt märgiti tembeldamise suund. Iga uue sorbitooliga -TRP, -URA tassi korral vahetati templikatet. 153 niiviisi inokuleeritud tassi inkubeeriti 48 tundi 30°C, seejärel analüüsiti ja vajadusel tehti mõningatest tassidest pildid UVIpro Gold pildistussüsteemi (Uvitec) abil.

5. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Eksperimentaalse töö käigus erinevates katsetes teostatud polümeraasi ahelreaktsioonide (PCR) tingimused on toodud Tabelites 6-10.

Tabel 6. PCRi tingimused ilma terminatsioonikoodonita uORFide DNA raamatukogu konstrueerimisel.

A.

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
Puhver PWO polümeraasi jaoks* 10×	5
Roche	
BSA (veise seerumi albumiin, 1 mg/mL)	5
dNTP (2 mM)	5
5ECO (10 µM)	5
3NCO (10 µM)	5
pExp2 (10 ng/µL)	1
PWO DNA polümeraas (5 U/µL) Roche	0.4
ddH ₂ O	23.6
Kokku:	50

* Puhver PWO polümeraasi jaoks (Roche) 10×: 100 mM Tris (2-amino-2-hüdroksümetüülpropan-1,3-diool)-HCl pH 8.85, 250 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄.

B.

Programm termotsükleris
Eppendorf Mastercycler:
Tube: 0.2 mL
Lid = 105°C
1. 95°C 0:02:00
2. 95°C 0:00:30
3. 51°C 0:00:30
4. 72°C 0:00:30
5. GO TO 2 REP 30
6. 10°C 0:02:00
HOLD 15°C

Tabel 7. PCRi tingimused terminatsioonikoodoniga uORFide DNA raamatukogu konstrueerimisel.

A.

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
Puhver PWO polümeraasi jaoks* 10×	5
Roche	
BSA (1 mg/mL)	5
dNTP (2 mM)	5
5ECOSTOP (10 µM)	5
3NCO (10 µM)	5
pExp2 (10 ng/µL)	1
PWO DNA polümeraas (5 U/µL) Roche	0.4
ddH ₂ O	23.6
Kokku:	50

* Puhver PWO polümeraasi jaoks (Roche) 10×: 100 mM Tris-HCl pH 8.85, 250 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄.

B.

Programm termotsükleris
Eppendorf Mastercycler:
Tube: 0.2 mL
Lid = 105°C
1. 95°C 0:02:00
2. 95°C 0:00:30
3. 46°C 0:00:40
4. 72°C 0:00:30
5. GO TO 2 REP 30
6. 10°C 0:02:00
HOLD 15°C

Tabel 8. PCRI tingimused integreerimiskonstruktide tegemisel.**A.**

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
Puhver PWO polümeraasi jaoks* 10×	5
Roche	
dNTP (2 mM)	5
5BAM1804-46/ 2903-24/ 2903-24tg/ negkEcoli/ WOORF/ TA09/ YP16 (10 µM)	1.5
LUCXHO-AS (10 µM)	1.5
pGL3-Basic (2 ng/µL)	5
PWO DNA polümeraas (5 U/µL) Roche	0.5
ddH ₂ O	31.5
Kokku:	50

B.

Programm termotsükleris
Eppendorf Mastercycler:

Tube: 0.2 mL
Lid = 105°C
1. 95°C 0:02:00
2. 95°C 0:00:20
3. 51°C 0:00:30
4. 72°C 0:01:15
5. GO TO 2 REP 10
6. 95°C 0:00:20
7. 55°C 0:00:30
8. 72°C 0:02:00
9. GO TO 6 REP 15
10. 72°C 0:07:00
11. 10°C 0:02:00
HOLD 15°C

* Puhver PWO polümeraasi jaoks (Roche) 10×: 100 mM Tris-HCl pH 8.85, 250 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄.

Tabel 9. Koloonia PCRI tingimused DH5α rakkudest integreerimiskonstruktide tegemisel.**A.**

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
PCR puhver* 10×	1
MgCl ₂ (25 mM)	1
dNTP (2 mM)	1
LUC-S (10 µM)	0.5
LUCXHO-AS (10 µM)	0.5
1 koloonia	-
Taq DNA polümeraas (5 U/µL) in-house puhastatud	0.5
ddH ₂ O	5.5
Kokku:	10

B.

Programm termotsükleris
Biometra T1 Thermocycler:

Tube: 0.2 mL
Lid = 105°C
1. 95°C 0:04:00
2. 95°C 0:00:30
3. 52°C 0:00:30
4. 72°C 0:01:45
5. GO TO 2 REP 25
6. 72°C 0:05:00
7. 10°C 0:02:00
HOLD 15°C

* PCRI puhver 10×: 100 mM Tris-HCl pH 8.8, 500 mM KCl, 0.8% NP-40 (nonüülfenoksupolietoksüetanool).

Tabel 10. Koloonia PCRI tingimused pärmi *S. cerevisiae* LEU2 lookusesse integreerimise kontrollimisel.**A.**

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
PCR puhver* 10×	1
MgCl ₂ (25 mM)	1
dNTP (2 mM)	1
LUC-S (10 µM)	0.5
LUCXHO-AS (10 µM)	0.5
1 koloonia purustamisel saadud lüsaat	1
Taq DNA polümeraas (5 U/µL) in-house puhastatud	0.5
ddH ₂ O	4.5
Kokku:	10

B.

Programm termotsükleris
Biometra T1 Thermocycler:

Tube: 0.2 mL
Lid = 105°C
1. 95°C 0:04:00
2. 95°C 0:00:30
3. 52°C 0:00:30
4. 72°C 0:01:45
5. GO TO 2 REP 35
6. 72°C 0:05:00
7. 10°C 0:02:00
HOLD 15°C

* PCRI puhver 10×: 100 mM Tris-HCl pH 8.8, 500 mM KCl, 0.8% NP-40.

PCRide negatiivseks kontrolliks oli selline reaktsioon, kus DNA matriitsi asemel reaktsioonisegusse pandi sama kogus ddH₂O-d. PCR produkte kontrolliti geelelektroforeesil 1%

agaroos/1× TAE (Tris-atsetaat/EDTA) geelis (1% agaroos, 40 mM Tris-atsetaat, 2 mM EDTA (etüleendiamiintetraatsetaat) pH 8.0, 1 µg/mL etiidumbromiid).

6. DNA lõikamine restriктаasidega

uORFide DNA raamatukogu konstrueerimisel PCRi produkti ja plasmidi pExp2 lõigati restriктаasidega *EcoRI* ja *NcoI* kolm tundi 37°C juures. Vastavad reaktsioonisegud on toodud Tabelis 11.

Tabel 11. DNA lõikamine restriктаasidega uORFide DNA raamatukogu konstrueerimisel.

A. PCR produkti lõikamine

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
Puhver Y ⁺ /Tango* 10× Fermentas	8
PCRi produkt	23
<i>EcoRI</i> (10 U/µL) Fermentas	0.4
<i>NcoI</i> (10 U/µL) Fermentas	0.4
ddH ₂ O	8.2
Kokku:	40

B. Plasmidi pExp2 lõikamine

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
Puhver Y ⁺ /Tango* 10× Fermentas	4
pExp2 (0.2 µg/µL)	10
<i>EcoRI</i> (10 U/µL) Fermentas	0.2
<i>NcoI</i> (10 U/µL) Fermentas	0.2
ddH ₂ O	5.6
Kokku:	20

* Puhver Y⁺/Tango (Fermentas) 10×: 330 mM Tris-atsetaat pH 7.9, 100 mM Mg-atsetaat, 660 mM K-atsetaat, 1 mg/mL BSA.

uORFide DNA raamatukogu kontrollimiseks raamatukogu DNAle tehti restriksioonanalüüs erinevate restriктаasidega. Reaktsioonisegud (vt. Tabel 12) inkubeeriti kolm tundi 37°C juures.

Tabel 12. Restriksioonanalüüs uORFide DNA raamatukogu kontrollimiseks.

A.

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
Puhver Y ⁺ /Tango ¹ 10× Fermentas	4
pExp2/raamatukogu DNA (1 µg/µL)	0.5
<i>EcoRI</i> (10 U/µL) Fermentas	0.2
<i>BamHI</i> (10 U/µL) Fermentas	0.2
ddH ₂ O	15.1
Kokku:	20

B.

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
Puhver Y ⁺ /Tango ¹ 10× Fermentas	4
pExp2/raamatukogu DNA (1 µg/µL)	0.5
<i>BamHI</i> (10 U/µL) Fermentas	0.2
<i>NcoI</i> (10 U/µL) Fermentas	0.2
ddH ₂ O	15.1
Kokku:	20

C.

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
Puhver R ⁺² 10× Fermentas	2
pExp2/raamatukogu DNA (1 µg/µL)	0.5
<i>XhoI</i> (10 U/µL) Fermentas	0.2
<i>HindIII</i> (10 U/µL) Fermentas	0.2
ddH ₂ O	17.1
Kokku:	20

D.

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
Puhver R ⁺² 10× Fermentas	2
pExp2/raamatukogu DNA (1 µg/µL)	0.5
<i>EcoRV</i> (10 U/µL) Fermentas	0.2
ddH ₂ O	17.3
Kokku:	20

¹ Puhver Y⁺/Tango (Fermentas) 10×: 330 mM Tris-atsetaat pH 7.9, 100 mM Mg-atsetaat, 660 mM K-atsetaat, 1 mg/mL BSA.

² Puhver R⁺ (Fermentas) 10×: 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 100 mM MgCl₂, 1 M KCl, 1 mg/mL BSA.

uORFide DNA raamatukogu skriinimise käigus selekteeritud pärmirakkudest eraldatud plasmiidsele DNAle tehti restriksioonanalüüs *EcoRV*-ga. Reaktsioonisegud (vt. Tabel 13) inkubeeriti kaks tundi 37°C juures.

Tabel 13. Restriksioonanalüüs uORFide DNA raamatukogu skriinimisel.

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
Puhver R ⁺ * 10× Fermentas	2
Plasmiidne DNA	3
<i>EcoRV</i> (10 U/µL) Fermentas	0.3
ddH ₂ O	14.7
Kokku:	20

* Puhver R⁺ (Fermentas) 10×: 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 100 mM MgCl₂, 1 M KCl, 1 mg/mL BSA.

Pärmi *S. cerevisiae* *LEU2* lookusesse integreerimiseks konstruktide klonerimise käigus PCRi produktid lõigati *Bam*HI ja *Xho*I restriктаasidega kolm tundi 37°C juures. Vastavad reaktsioonisegud on toodud Tabelis 14.

Tabel 14. DNA lõikamine restriктаasidega integreerimiskonstruktide tegemisel.

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
Puhver <i>Bam</i> HI jaoks* 10× Fermentas	4
PCRi produktid	30
<i>Bam</i> HI (10 U/µL) Fermentas	0.75
<i>Xho</i> I (10 U/µL) Fermentas	1.25
ddH ₂ O	4
Kokku:	40

* Puhver *Bam*HI jaoks (Fermentas) 10×: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.2% Triton X-100, 1 mg/mL BSA.

Pärmi *S. cerevisiae* *LEU2* lookusesse integreerimiseks konstruktide tegemise käigus ligeeritud konstruktidele tehti restriksioonanalüüs *Pae*I ja *Xba*I restriктаasidega. Reaktsioonisegud (vt. Tabel 15) inkubeeriti kaks tundi 37°C juures.

Tabel 15. Restriksioonanalüüs integreerimiskonstruktide tegemisel.

A.

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
Puhver B ⁺ 10× Fermentas	2
Plasmiidne DNA	3
<i>Pae</i> I (10 U/µL) Fermentas	0.3
ddH ₂ O	14.7
Kokku:	20

¹ Puhver B⁺ (Fermentas) 10×: 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 1 mg/mL BSA.

² Puhver Y⁺/Tango (Fermentas) 10×: 330 mM Tris-atsetaat pH 7.9, 100 mM Mg-atsetaat, 660 mM K-atsetaat, 1 mg/mL BSA.

B.

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
Puhver Y ⁺ /Tango ² 10× Fermentas	2
Plasmiidne DNA	3
<i>Xba</i> I (10 U/µL) Fermentas	0.3
ddH ₂ O	14.7
Kokku:	20

Pärmi *S. cerevisiae* *LEU2* lookusesse integreerimiseks konstruktide tegemise käigus ligeeritud konstruktid lõigati *CpoI*-ga kolm tundi 37°C juures. Vastavad reaktsioonisegud on toodud Tabelis 16.

Tabel 16. Ligeeritud konstruktide lõikamine *CpoI*-ga integreerimiskonstruktide tegemisel.

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
Puhver Y ⁺ /Tango* 10× Fermentas	3
Plasmiidne DNA	7
<i>CpoI</i> (10 U/µL) Fermentas	1
ddH ₂ O	19
Kokku:	30

* Puhver Y⁺/Tango (Fermentas) 10×: 330 mM Tris-atsetaat pH 7.9, 100 mM Mg-atsetaat, 660 mM K-atsetaat, 1 mg/mL BSA.

Kõikides katsetes restriksiooniprodukte lahutati geelelektroforeesil 1% agaros/1× TAE geelis. Restriksioonireaktsioonid viidi läbi Fermentase soovitatud protokollide alusel (Molecular Biology Catalog & Product Application Guide 2006-2007, Fermentas).

7. DNA ligeerimine

uORFide DNA raamatukogu konstrueerimisel *EcoRI*- ja *NcoI*-ga restrikteeritud PCR produkti ja plasmidi pExp2 ligeeriti üleöö 18°C juures, seejärel puhastati ligeerimisreaktsioonid fenooltöötlemisega ja elektroporeeriti DH5α rakkudesse. Selleks et määrata kõige efektiivsem insert/pExp2 molaarne suhe, mille korral transformantide arv oleks maksimaalselt suur, viidi läbi 10 µL-s ligeerimisreaktsioone erinevate insert/pExp2 molaarsete suhetega (10:1, 5:1, 2.5:1, 1.25:1). Määratud optimaalse insert/pExp2 suhte järgi viidi läbi ligeerimine suuremas mahus (180 µL-s). Ligeerimisreaktsioonide negatiivseks insert-kontrolliks oli selline reaktsioon, kus plasmidi pExp2 asemel reaktsioonisegusse pandi 1 µL ddH₂O-d. Negatiivseks vektor-kontrolliks oli reaktsioon, kus PCR produkti asemel reaktsioonisegusse pandi 1 µL ddH₂O-d. 180 µL-s ligeerimise juures positiivseks kontrolliks oli 10 µL-s ligeerimisreaktsioon. Vastavad reaktsioonisegud on toodud Tabelis 17.

Tabel 17. DNA ligeerimine uORFide DNA raamatukogu konstrueerimisel.

A. Kõige efektiivsema insert/pExp2 suhte määramine

	Negatiivne insert-kontroll	Negatiivne vektor-kontroll	Ligeerimine 10 µL-s
Reagendid	µL 1-le reaktsioonile	µL 1-le reaktsioonile	µL 1-le reaktsioonile
Puhver T4 ligaasi jaoks* 10× Fermentas	1	1	1
PCRi produkti (<i>EcoRI</i> , <i>NcoI</i>) lahjendused	1	-	1
pExp2 (<i>EcoRI</i> , <i>NcoI</i>)	-	1	1
T4 DNA ligaas (5 U/µL) Fermentas	0.2	0.2	0.2
ddH ₂ O	7.8	7.8	6.8
Kokku:	10	10	10

B. Ligeerimine 180 µL-s

	Positiivne kontroll	Negatiivne insert-kontroll	Negatiivne vektor-kontroll	Ligeerimine 180 µL-s
Reagendid	µL 1-le reaktsioonile	µL 1-le reaktsioonile	µL 1-le reaktsioonile	µL 1-le reaktsioonile
Puhver T4 ligaasi jaoks* 10× Fermentas	1	1	1	18
PCRi produkt (<i>EcoRI</i> , <i>NcoI</i>)	0.25	0.25	-	4.5
pExp2 (<i>EcoRI</i> , <i>NcoI</i>)	1	-	1	18
T4 DNA ligaas (5 U/µL) Fermentas	0.2	0.2	0.2	3.6
ddH ₂ O	7.55	8.55	7.8	135.9
Kokku:	10	10	10	180

* Puhver T4 DNA ligaasi jaoks (Fermentas) 10×: 400 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP pH 7.8.

Pärmi *S. cerevisiae* *LEU2* lookusesse integreerimiseks konstruktide kloneerimisel *Bam*HI- ja *Xho*I-ga lõigatud PCRi produktid ning *Bam*HI- ja *Sal*I-ga lõigatud pLRL-*URA3* plasmidi ligeeriti omavahel kokku üks tund toatemperatuuril. Vastavad reaktsioonisegud on toodud Tabelis 18.

Tabel 18. DNA ligeerimine integreerimiskonstruktide tegemisel.

Reagendid	µL 1-le reaktsioonile
Puhver T4 ligaasi jaoks* 10× Fermentas	1
PCRi produktid (<i>Bam</i> HI, <i>Xho</i> I)	4
pLRL- <i>URA3</i> (<i>Bam</i> HI, <i>Sal</i> I)	0.5
T4 DNA ligaas (5 U/µL) Fermentas	0.5
ddH ₂ O	4
Kokku:	10

* Puhver T4 DNA ligaasi jaoks (Fermentas) 10×: 400 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP pH 7.8.

Ligeerimisreaktsioonid viidi läbi Fermentase soovitatud protokollil alusel (Molecular Biology Catalog & Product Application Guide 2006-2007, Fermentas).

8. Fenooltöötlus ja DNA sadestamine

Plasmiidsele DNAle, PCRi produktile või ligeerimisreaktsioonile lisati 20 µL 3 M Na-atsetaati, 8 µL 5 µg/µL dekstraani, saadud lahuse maht viidi T₁₀E₁ puhvriga (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) 200 µL-ni, lisati 100 µL fenool/kloroformi (1:1) pH 7.5, segati *vortex*'il 2× 30 s ja tsentrifuugiti 2 min 13000 rpm (MiniSpin, Eppendorf). Järgnevalt eraldati lahustunud DNAd sisaldav vesifaas, millele lisati 600 µL 96% etanooli, segati *vortex*'il, sadestati DNAd 1 tund -20°C juures, tsentrifuugiti 10 min 13000 rpm (MiniSpin, Eppendorf), sadet pesti 70% etanooliga ja resuspendeeriti T₁₀E₁ puhvril. (Sambrook *et al.*, 1989).

9. DNA kontsentratsiooni mõõtmine

5 µL puhastatud uORFide raamatukogu plasmiidset DNAd pipeteeriti 1 mL ddH₂O-sse, segati *vortex*'il, DNA lahustati pipeteeriti kvartsküveti ning mõõdeti OD_{260nm} ja OD_{280nm} spektrofotomeetri (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) abil. Arvestades sellega, et 50 µg/mL dsDNA lahuse OD₂₆₀ võrdub ühega, arvutati mõõdetava plasmiidse DNA kontsentratsioon. Selleks et kontrollida puhastatud plasmiidse DNA puhtust, arvutati OD_{260nm} ja OD_{280nm} suhe. Kui OD_{260nm}/OD_{280nm} on ligikaudu 1.8, tegemist on puhta DNA prooviga, kui see suhe on väiksem kui 1.8, siis DNA proov on valguga kontamineeritud ning juhul, kui OD_{260nm}/OD_{280nm} on kahest suurem, siis DNA proov on RNaga kontamineeritud. (Sambrook et al., 1989).

10. DNA eraldamine 1% agarose/1× TAE geelist

uORFide DNA raamatukogu konstrueerimisel DNA eraldamiseks 1% agarose/1× TAE geelist kasutati NucleoSpin Extract Kiti (Macherey-Nagel). Teistes katsetes DNA eraldamiseks geelist kasutati Ultra Clean 15 DNA Purification Kiti (Mo Bio Laboratories).

11. Sekveneerimine

uORFide DNA raamatukogu sekveneerimiseks tehti reaktsioon, mille tingimused on toodud Tabelis 19. uORFide DNA raamatukogu skriinimisel selekteeritud pärmirakkudest eraldatud plasmiidse DNA sekveneerimiseks tehti analoogiline reaktsioon, kus reaktsioonisegusse võeti 1 µL plasmiidset DNAd.

Tabel 19. Sekveneerimisreaktsiooni tingimused uORFide DNA raamatukogu kontrollimisel.

A.		B.
Reagentid	µL 1-le reaktsioonile	Programm termotsükleris Eppendorf Mastercycler: Tube: 0.2 mL Lid = 105°C
LIBRSEQ (5 µM)	1	1. 95°C 0:00:20
Premix* Amersham Pharmacia Biotech	4	2. 50°C 0:00:15
Raamatukogu DNA (2.42 µg/µL)	0.5	3. 60°C 0:01:00
ddH ₂ O	4.5	4. GO TO 1 REP 29
Kokku:	10	5. 10°C 0:02:00 HOLD 15°C

* Premix sisaldab Thermo Sequenase II DNA polümeraasi, dNTPsid ja ddNTPsid, millest igaüks omab erinevat fluorestseeruvat märgist.

Seejärel sekveneerimisreaktsioonile lisati 1 µL Na-atsetaat/EDTA puhvrit (1.5 M Na-atsetaat pH > 8.0, 250 mM EDTA; Amersham Pharmacia Biotech), 2 µL 10 µg/µL dekstraani, 40 µL 96% etanooli, segati *vortex*'il, sadestati DNAd 1 tund -20°C juures, tsentrifuugiti 15 min 13000 rpm (MiniSpin, Eppendorf), sadet pesti 70% etanooliga ja resuspendeeriti 3 µL formamiidis (Formamide Loading Dye, Amersham Pharmacia Biotech). Proovid analüüsiti ABI

Prism 377 (Perkin-Elmer) sekvenaatoriga. (Modifitseeritud protokoll DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kiti (Amersham Pharmacia Biotech) juhendi järgi).

12. Plasmiidse DNA eraldamine bakterirakkudest aluselise lüüsi meetodil

3 mL LB söödet, kuhu oli selekteerimiseks lisatud 100 µg/mL ampitsilliini, inokuleeriti plasmidi sisaldava DH5α bakterikolooniaga ja kasvatati rakke 37°C juures üleöö. Seejärel tsentrifuugiti rakud põhja 1 min 8000 rpm (MiniSpin, Eppendorf), resuspendeeriti 100 µL lahuses I (50 mM glükoos, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA), lisati 200 µL lahust II (200 mM NaOH, 1% SDS (naatriumdodetsüülsulfaat)), aeg-ajalt segades inkubeeriti 5 min jääl, lisati 150 µL lahust III (3 M K-atsetaat, 11.5% äädikhape), segati *vortex*'il, inkubeeriti 5 min jääl, saadud rakulüsaati tsentrifuugiti 5 min 13000 rpm (MiniSpin, Eppendorf). Plasmiidse DNA sadestamiseks lisati rakulüsaadi supernatandile 400 µL isopropanooli, segati *vortex*'il, inkubeeriti 5 min toatemperatuuril, tsentrifuugiti DNA põhja 5 min 13000 rpm (MiniSpin, Eppendorf). Sadet pesti 70% etanooliga, resuspendeeriti 50 µL T₁₀E₁ puhvril, kuhu oli lisatud 20 µg/mL RNAasi (DNAasi vaba pankrease RNAas, Sigma) ja inkubeeriti 20 min 65°C juures. Vajadusel puhastati niiviisi eraldatud plasmiidne DNA fenooltötlusega. (Sambrook *et al.*, 1989).

13. Plasmiidse DNA eraldamine bakterirakkudest QIAGEN Plasmid Maxi Kiti abil

uORFide DNA raamatukoguga elektroporeeritud DH5α bakterirakud kasvatati 110 mL 2YT söötmes, kuhu oli selekteerimiseks lisatud 100 µg/mL ampitsilliini, 37°C juures üleöö. Seejärel tsentrifuugiti rakud põhja 15 min 6000 rpm 4°C juures (GSA rootor, Sorvall RC-5B, Du Point Instruments), resuspendeeriti 10 mL puhvril P1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNAas A; Plasmid Maxi Kit, QIAGEN), lisati 10 mL puhvrit P2 (200 mM NaOH, 1% SDS; Plasmid Maxi Kit, QIAGEN), segati 5 korda ja inkubeeriti 5 min toatemperatuuril. Saadud rakulüsaadile lisati 10 mL jääl jahutatud puhvrit P3 (3 M K-atsetaat pH 5.5; Plasmid Maxi Kit, QIAGEN), segati 5 korda, inkubeeriti 20 min jääl, tsentrifuugiti 30 min 13000 rpm 4°C juures (SS-34 rootor, Sorvall RC-5B, Du Point Instruments), supernatanti tsentrifuugiti uuesti 15 min samadel tingimustel. 120 µL rakulüsaadi supernatanti tõsteti kõrvale (proov Q1) ning ülejäänud supernatant kanti QIAGEN-tip 500 kolonnile (Plasmid Maxi Kit, QIAGEN), mis oli eelnevalt tasakaalustatud 10 mL puhvriga QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS (3-(N-morfoliino)propaansulfoonhape) pH 7.0, 15% isopropanool, 0.15% Triton X-100 (t-oktüülfenoksüpolüetoksüetanool); Plasmid Maxi Kit, QIAGEN). 120 µL läbijooksu tõsteti kõrvale (proov Q2). Kolonni pesti 30 mL puhvriga QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15%

isopropanool; Plasmid Maxi Kit, QIAGEN) kaks korda, 240 µL läbijooksu tõsteti kõrvale (proov Q3). Plasmiidset DNAd elueeriti kolonnilt 15 mL puhvriga QF (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 15% isopropanool; Plasmid Maxi Kit, QIAGEN), 60 µL eluaati tõsteti kõrvale (proov Q4). Seejärel DNA sadestamiseks lisati eluaadile 10.5 mL isopropanooli, segati *vortex*'il ja tsentrifuugiti 30 min 11000 rpm 4°C juures (SS-34 rootor, Sorvall RC-5B, Du Point Instruments). Tsentrifuugimisel kasutati Ultra-Clear tuubi (25×89 mm Ultra-Clear Tube, Beckman Instruments). DNA sadet pesti 5 mL 70% etanooliga, tsentrifuugiti 10 min 11000 rpm 4°C juures (SS-34 rootor, Sorvall RC-5B, Du Point Instruments), kuivatati 10 min toatemperatuuril ja lahustati 300 µL T₁₀E₁ puhvris. Puhastatud plasmiidse DNA kontsentratsiooni mõõdeti spektrofotomeetriga ning DNA puhastamisprotseduuri kontrolliti geelelektroforeesil 1% agaros/1× TAE geelis kasutades erinevatel puhastamisetappidel kõrvale tõstetud Q1-Q4 proove. (Modifitseeritud protokoll QIAGEN Plasmid Maxi Kiti juhendi järgi).

14. Plasmiidse DNA eraldamine pärmirakkudest

2 mL -TRP, -URA söödet inokuleeriti ühe pärmikolooniaga ja kasvatati rakke 30°C juures üleöö. Seejärel tsentrifuugiti 1.5 mL saadud pärmikultuuri 1 min 2500 rpm (MiniSpin, Eppendorf), rakud resuspendeeriti 200 µL Triton X-100 sisaldavas lahuses (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton X-100), lisati 200 µL fenool/kloroformi (1:1) ja 200 µL 0.5 mm klaaskuulikesi (BioSpec Products), segati *vortex*'il 2 min ning tsentrifuugiti 5 min 13000 rpm (MiniSpin, Eppendorf). Rakulüsaadi supernatant tõsteti eraldi tuubi ja tsentrifuugiti uuesti samadel tingimustel. Saadud plasmiidset DNAd sisaldavat supernatanti kasutati DH5α bakterirakkude elektroporeerimiseks. (Rose *et al.*, 1990).

15. Pärm *S. cerevisiae* rakulüsaadi valmistamine

30 mL 1 mg/mL erütromütsiiniga või ilma erütromütsiiniga -TRP söödet inokuleeriti ühe pärmikolooniaga, rakke kasvatati 30°C juures kuni OD_{600nm} 0.6-0.7. 10 mL saadud pärmikultuuri pipeteeriti 15 mL tuubi, tsentrifuugiti 3 min 3200 rpm toatemperatuuril (rootor 1617, Universal 32 R, Hettich Zentrifugen), sade resuspendeeriti 1 mL 50 mM Tris-HCl pH 7.5, tõsteti ümber 1.5 mL tuubi ja tsentrifuugiti 5 min 3500 rpm toatemperatuuril (MiniSpin, Eppendorf). Sademele lisati 200 µL 50 mM Tris-HCl pH 7.5 ja 200 µL 0.5 mm klaaskuulikesi (BioSpec Products), segati *vortex*'il 2 min ning lisati 300 µL sama Tris-HCl puhvrit. Purustatud rakkudega tuubi põhja tehti auk nõela abil ja asetati tuub uude lahtise kaanega 1.5 mL tuubi. Kahest tuubist kokkuseade asetati 50 mL tuubi ja tsentrifuugiti 2 min 2200 rpm toatemperatuuril (rootor 1617, Universal 32 R, Hettich Zentrifugen). Rakulüsaati sisaldav tuub tõsteti 50 mL tuubist välja,

pandi kaas kinni ja tsentrifuugiti lüsaati 5 min 13400 rpm toatemperatuuril (MiniSpin, Eppendorf). Saadud rakulüsaadi supernatanti kasutati totaalse valgu kontsentratsiooni ja lutsiferaasi ekspressioonitaseme mõõtmiseks.

Pärmi *S. cerevisiae* rakulüsaadi valmistamisel PCR analüüsiks üks pärmikoloonia resuspendeeriti 20 µL 1× PBS puhvril pH 7.4 (fosfaat puhverdatud soolalahus; 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na₂HPO₄, 0.024% KH₂PO₄) 1.5 mL tuubis, lisati 200 µL 0.5 mm klaaskuulikesi (BioSpec Products) ja segati *vortex*'il 2 min. Purustatud rakkudega tuubi põhja tehti auk nõela abil ning edasi toimiti analoogselt ülalpool toodud protokollile. (Ausubel *et al.*, 1995).

16. Totaalse valgu kontsentratsiooni mõõtmine pärmi *S. cerevisiae* rakulüsaadist Bradfordin meetodil

Kõigepealt valmistati 300 µL kindla kontsentratsiooniga (0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ja 0.05 mg/mL) BSA lahjendused 50 mM Tris-HCl pH 7.5 puhvril. Igale BSA lahjendusele lisati 600 µL Bradfordin lahust (0.01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 5% etanool, 8.5% fosforhape), segati *vortex*'il, inkubeeriti 10 min toatemperatuuril ning mõõdeti lahuste OD_{590nm} spektrofotomeetri (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) abil. Teostatud mõõtmiste alusel koostati BSA standardite graafik, kus *x*-teljel on BSA kontsentratsioon (mg/mL) ja *y*-teljel on OD_{590nm}.

Totaalse valgu kontsentratsiooni mõõtmiseks pärmi rakulüsaadis pipeteeriti 5 µL rakulüsaati 300 µL 50 mM Tris-HCl pH 7.5 puhvril, lisati 600 µL Bradfordin lahust, segati *vortex*'il, inkubeeriti 10 min toatemperatuuril ning mõõdeti lahuse OD_{590nm}. Teostatud OD mõõtmiste ja BSA standardite graafiku alusel arvutati valgu kontsentratsioon rakulüsaadis. (Bradford, 1976).

17. Lutsiferaasi ekspressioonitaseme mõõtmine

Aktiivse lutsiferaasi ekspressioonitaset mõõdeti luminesentsi järgi. 5 µL pärmi rakulüsaati pipeteeriti plastküveti, lisati 50 µL lutsiferiini lahust (Luciferase Assay Reagent, Promega), segati kaks korda ning mõõdeti luminesentsi 10 s jooksul standard tingimustel luminomeetri (TD-20/20 DLReady, Turner Designs) abil.

18. Bakteri *E. coli* transformeerimine CaCl₂ meetodil

Kõigepealt valmistati bakteritüve DH5α kompetentsed rakud. 3 mL 2YT söödet inokuleeriti DH5α ühe kolooniaga, rakke kasvatati 37°C juures kuni OD_{600nm} 0.5, seejärel jahutati bakterikultuuri 5 min jääl ja tsentrifuugiti 5 min 3000 rpm 4°C juures (2424 rootor,

Mikro 200 R, Hettich Zentrifugen). Rakud resuspendeeriti 1.5 mL 100 mM CaCl₂-s, inkubeeriti 15 min jääl, tsentrifuugiti samadel tingimustel, resuspendeeriti 100 µL 100 mM CaCl₂-s ja inkubeeriti 2 tundi jääl.

Transformeerimiseks lisati 100 µL kompetentsetele DH5α rakkudele 5 µL plasmiidset DNAd, inkubeeriti 15 min jääl, seejärel inkubeeriti 2 min 37°C juures, lisati 1 mL 10 mM MgSO₄ sisaldavat 2YT söödet ja inkubeeriti 1 tund 37°C juures. Järgnevalt tsentrifuugiti rakud põhja 5 min 3000 rpm (MiniSpin, Eppendorf) ning külvati välja ampitsilliiniga LB söötmele. (Sambrook *et al.*, 1989).

19. Bakteri *E. coli* kompetentsete rakkude valmistamine elektroporeerimiseks

3 mL LB söödet inokuleeriti bakteritüve DH5α ühe kolooniaga, rakke kasvatati 37°C juures üleöö, saadud kultuuriga inokuleeriti 500 mL 2YT söödet ning kasvatati 37°C juures kuni OD_{600nm} 0.5-0.7. Seejärel jahutati bakterikultuuri 15 min jääl, tsentrifuugiti rakud põhja 15 min 5000 rpm 4°C juures (GSA rootor, Sorvall RC-5B, Du Point Instruments), resuspendeeriti 500 mL jääkülmas 10% glütseroolis, tsentrifuugiti 15 min 5000 rpm 4°C juures (GSA rootor, Sorvall RC-5B, Du Point Instruments), resuspendeeriti 250 mL jääkülmas 10% glütseroolis ning uuesti tsentrifuugiti samadel tingimustel. Seejärel resuspendeeriti rakud 20 mL jääkülmas 10% glütseroolis, tsentrifuugiti 15 min 5000 rpm 4°C juures (1617 rootor, Universal 32 R, Hettich Zentrifugen) ja lõpuks resuspendeeriti rakud 2 mL jääkülmas 10% glütseroolis. Saadud kompetentsete rakkude kontsentratsioon peaks olema ligikaudu 1-3×10¹⁰ rakke/mL. Antud protokoll järgi valmistatud kompetentseid rakke kas kohe kasutati elektroporeerimiseks või külmutati läbi vedelas lämmastikus ja hoiti -70°C juures. (Gene Pulser Xcell Electroporation System, BIO-RAD Laboratories).

20. Bakteri *E. coli* elektroporeerimine

2 µL DNAd T₁₀E₁ puhvris pipeteeriti 1.5 mL tuubi, jahutati jääl, lisati 40 µL kompetentseid bakterirakke, resuspendeeriti pipetiga ja hoiti 1 min jääl. Seejärel pipeteeriti rakkude ja DNA segu jääl jahutatud ja eelnevalt 25 min UV-kiirtega steriilitud 0.2 cm küvetti. Rakke poreeriti 5 ms jooksul (2500 V, 25 µF ja 200 Ω juures) elektroporaatori (Gene Pulser Xcell Electroporation System, BIO-RAD Laboratories) abil. Poreeritud rakkudele lisati võimalikult kiiresti 1 mL 2YT söödet, kuhu oli lisatud 20 mM glükoos, 10 mM MgCl₂ ja 10 mM MgSO₄, seejärel tõsteti rakud ümber 1.5 mL tuubi, inkubeeriti 1 tund 37°C juures aereerides loksutil, tsentrifuugiti rakud põhja 5 min 3000 rpm (MiniSpin, Eppendorf) ning külvati välja

ampitsilliiniga LB söötmele. (Gene Pulser Xcell Electroporation System, BIO-RAD Laboratories).

21. Pärmis *S. cerevisiae* transformeerimine Li-atsetaadi meetodil

30 mL YPD söödet inokuleeriti pärmitüve W303 α ühe kolooniaga, rakke kasvatati 30°C juures kuni OD_{600nm} 0.7, seejärel tsentrifuugiti rakud põhja 3 min 3200 rpm (rootor 1617, Universal 32 R, Hettich Zentrifugen), pesti üks kord 40 mL steriilse ddH₂O-ga ja üks kord 25 mL Li-atsetaadi puhvriga (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM Li-atsetaat). Pestud rakkudele lisati 300 μ L Li-atsetaadi puhvrit ja 50 μ L eelnevalt 7 min 95°C juures denatureeritud ning seejärel jääl jahutatud DNA *carrier*'it (Amresco), segati *vortex*'il. Iga transformatsiooni kohta võeti 30 μ L niiviisi töödeldud pärmirakke, lisati plasmiidne DNA, resuspendeeriti pipetiga ja inkubeeriti 15 min toatemperatuuril. Seejärel lisati rakkudele 180 μ L PEGi (polüetüleenglükool) lahust (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM Li-atsetaat, 40% PEG), segati *vortex*'il, inkubeeriti 15 min toatemperatuuril, lisati 20 μ L DMSO-d (dimetüülsulfoksiid), segati *vortex*'il ja inkubeeriti 10 min 42°C juures. Järgnevalt tsentrifuugiti rakud põhja 3 min 3000 rpm (MiniSpin, Eppendorf), resuspendeeriti 100 μ L steriilses ddH₂O-s ning külvati selektiivsetele tardsöötmetele. Tasse inkubeeriti 48 tundi 30°C juures. (Rose *et al.*, 1990).

22. Pärmis *S. cerevisiae* kompetentsete rakkude valmistamine elektroporeerimiseks

3 mL YPD söödet inokuleeriti pärmitüve W303 α ühe kolooniaga, rakke kasvatati 30°C juures 6 tundi, saadud kultuuriga inokuleeriti 500 mL YPD söödet ning kasvatati üleöö 30°C juures kuni pärmikultuuri 1:10 lahjenduse OD_{600 nm} 0.30-0.35. Seejärel jahutati pärmikultuuri 15 min jääl, tsentrifuugiti rakud põhja 5 min 5000 rpm 4°C juures (GSA rootor, Sorvall RC-5B, Du Point Instruments), rakkudele lisati 90 mL steriilset ddH₂O-d, resuspendeeriti rakud *vortex*'il, lisati 10 mL 10 $\times$ Li-atsetaat/TE puhvrit (1 M Li-atsetaat, 0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.01 M EDTA pH 8.0), inkubeeriti 45 min 30°C juures aereerides rakke loksutil 85 rpm, lisati 2.5 mL 1 M DTT (ditiotreitool) ning inkubeeriti veel 15 min samadel tingimustel. Seejärel viidi kultuuri maht steriilse ddH₂O-ga 500 mL-ni, tsentrifuugiti rakud põhja 5 min 5000 rpm 4°C juures (GSA rootor, Sorvall RC-5B, Du Point Instruments), rakkudele lisati 50 mL steriilset jääkülma ddH₂O-d, resuspendeeriti *vortex*'il, uuesti viidi maht steriilse jääkülma ddH₂O-ga 500 mL-ni ja tsentrifuugiti rakud põhja samadel tingimustel, rakud resuspendeeriti 30 mL steriilses jääkülmas 1 M sorbitoolis, tsentrifuugiti 5 min 5000 rpm 4°C juures (rootor 1617, Universal 32 R, Hettich Zentrifugen) ja lõpuks resuspendeeriti 3 mL steriilses jääkülmas 1 M sorbitoolis. Saadud

kompetentsete rakkude kontsentratsioon peaks olema ligikaudu 1×10^{10} rakke/mL. Kompetentseid rakke hoiti jääl ning kasutati elektroporeerimiseks võimalikult kiiresti. (Gene Pulser Xcell Electroporation System, BIO-RAD Laboratories).

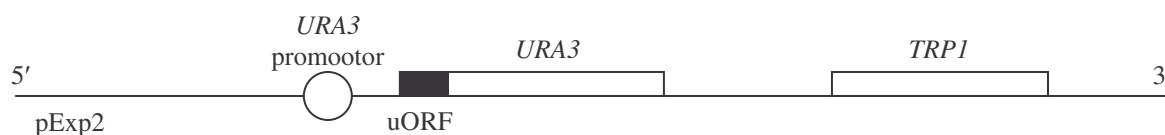
23. Pärm *S. cerevisiae* elektroporeerimine

Kuni 300 ng DNAd 5 μ L T₁₀E₁ puhvris pipeteeriti 1.5 mL tuubi, jahutati jääl, lisati 40 μ L kompetentseid pärmirakke, resuspendeeriti pipetiga ja hoiti 5 min jääl. Seejärel pipeteeriti rakkude ja DNA segu jääl jahutatud ja eelnevalt 25 min UV-kiirtega steriilitud 0.2 cm küvetti. Rakke poreeriti 5 ms jooksul (1500 V, 25 μ F ja 200 Ω juures) elektroporaatori (Gene Pulser Xcell Electroporation System, BIO-RAD Laboratories) abil. Poreeritud rakkudele lisati võimalikult kiiresti 1 mL steriilset jääkülma 1 M sorbitooli, rakud tõsteti ümber jahutatud 1.5 mL tuubi ning külvati välja selektiivsele 1 M sorbitooliga söötmele. (Gene Pulser Xcell Electroporation System, BIO-RAD Laboratories).

TULEMUSED JA ARUTELU

1. uORFide DNA raamatukogu konstrueerimine

Selleks, et isoleerida uORFe, mis võimaldaksid erütromütsiini poolt reguleeritava geeniekspressioonisüsteemi loomist, käesolevas töös kõigepealt konstrueeriti uORFide DNA raamatukogu plasmidi pExp2 põhjal, kuhu kloneeriti juhuslikku järjestust sisaldavad uORFid *S. cerevisiae* *URA3* markergeeni ette. Kuna *S. cerevisiae* 5'-UTRides intertsistronilise regiooni pikkus uORFi ja sellest allavoolu asuva põhilugemisraami vahel võib varieeruda, otsustati kõigepealt konstrueerida ja skriinida selline DNA raamatukogu, kus intertsistroniline regioon uORFide ja *URA3* markergeeni vahel puuduks, nii et uORFide järjestused kloneeriti *URA3* markergeeni N-terminusse liidetuna (vt. Joonis 6). Raamatukogu konstrueerimiseks otsustati esialgu kasutada ilma terminatsioonikoodonita uORFe ning uORFide pikkuseks valiti seitse koodonit, kaasa arvatud initsiatsioonikoodon ATG. Siinkohal peaks mainima, et kuna kloneeritavad uORFid sisaldavad juhuslikku järjestust, ei ole välistatud ka suvalises positsioonis terminatsioonikoodonitega uORFide inserteerumine raamatukogu plasmidi. Kuid terve raamatukogu suhtes terminatsioonikoodonitega uORFe kandvate plasmiidide protsent peaks olema väike.



Joonis 6. uORFide DNA raamatukogu skeem. Seitsmekoodonilised juhuslikku peptiidi kodeerivad ilma terminatsioonikoodonita uORFid kloneeriti plasmidi pExp2 *URA3* markergeeni N-terminusse liidetuna *URA3* promootori taha.

uORFide DNA raamatukogu konstrueerimiseks kasutati *URA3* geneetilist markerit, mis võimaldab läbi viia nii positiivset kui ka negatiivset selektsiooni, kasvatades pärmirakke vastavalt -URA ja 5-FOA selektiivsöötmele. Selliste omadustega geneetiline marker on mugav vahend antibiootikumi poolt reguleeritavate uORFe kandvate plasmiidide skriinimiseks pärmis. uORFide raamatukogu plasmid pExp2 sisaldas peale *URA3* geeni ka *S. cerevisiae* *TRP1* markergeeni, mille järgi kontrolliti raamatukogu plasmidi sisaldust pärmirakkudes negatiivse selektsiooni katsetes *URA3* geeni vastu. uORFide DNA raamatukogu rekombinantsete konstruktide paljundamiseks ja puhastamiseks kasutati DH5 α bakterirakke, mida selekteeriti raamatukogu plasmidis sisaldava ampitsilliini resistentsusmarkeri järgi.

Kloneerimine

Plasmiidilt pExp2 amplifitseeriti PCRi abil 250 bp DNA fragment, kasutades 5ECO ja 3NCO oligonukleotiidide. 5ECO oligonukleotiid kannab ilma terminatsioonikoodonita seitsmekoodonilisi uORFide järjestusi ATG NNN NNN NNN NNN NNN NNN, kus N on suvaline desoksüribonukleotiid. uORFide järjestustele järgneb *URA3* geeni alguse järjestus. Vastassuunaline 3NCO oligonukleotiid paardub *URA3* geeni sees oleva komplementaarse järjestusega.

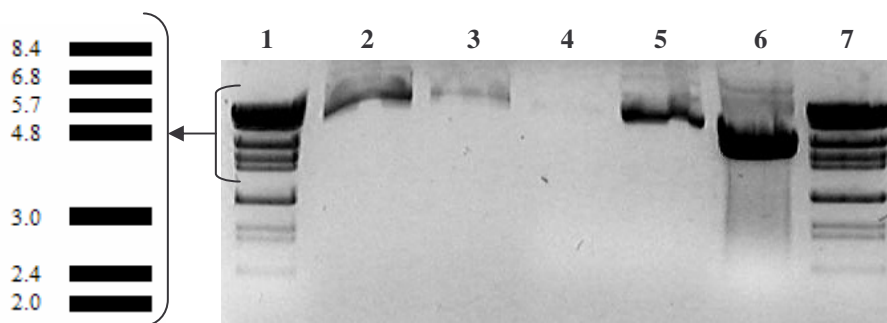
Saadud PCRi produkt ja plasmiid pExp2 lõigati *EcoRI* ja *NcoI* restriктаasidega ning restriksiooniproduktid ligeeriti kokku. uORFide DNA raamatukogu plasmidi suurus on 5'872 bp. Selleks, et valmistada võimalikult suurema rekombinantsete kloonide arvuga uORFide DNA raamatukogu, määrati kõigepealt kõige efektiivsem insert/pExp2 molaarne suhe, mille korral bakteritransformantide arv oleks maksimaalselt suur. Selleks viidi läbi ligeerimisreaktsioonid 10 µL-s erinevate insert/pExp2 molaarsete suhetega (10:1, 5:1, 2.5:1, 1.25:1) ja elektroporeeriti DH5α bakterirakkudesse. Kõige efektiivsemaks osutus ligeerimisreaktsioon, kus insert/pExp2 suhe oli 5:1, andes ligikaudu 120'000 transformanti. Seejärel viidi läbi määratud optimaalse insert/pExp2 suhte järgi ligeerimisreaktsioon 180 µL-s. Suuremas mahus ligeerimisreaktsiooni elektroporeerimiseks DH5α bakterirakkudesse tehti 10 elektroporatsiooni. Elektroporeeritud rakud tõsteti kokku, saadud rakkude segust tehti erineva lahjendusega väljakülvid ampitsilliiniga LB tassidele ja ülejäänud rakud kasvatati 110 mL ampitsilliiniga 2YT söötmes üleöö. Seejärel puhastati transformeeritud bakterirakkudest plasmiidne DNA.

Tehtud väljakülvide abil arvutati saadud transformantide arv, milleks oli 2'320'000. Ligeerimisreaktsiooni negatiivne kontroll näitas, et ligikaudu 4% transformeeritud bakterirakkudest olid valepositiivsed. Eeldades, et iga transformeeritud bakterirakk sisaldab erineva uORFiga DNA raamatukogu plasmidi, saadi kloneerimise tulemusena ligikaudu 2'230'000 erinevast rekombinantsest kloonist koosnev uORFide DNA raamatukogu.

uORFide DNA raamatukogu puhastamine

uORFide DNA raamatukoguga transformeeritud DH5α bakterirakkudest puhastati plasmiidne DNA QIAGEN Plasmid Maxi Kiti abil. Puhastatud plasmiidse DNA kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriliselt, mis andis DNA saagiseks 726 µg. Selleks, et kontrollida puhastatud plasmiidse DNA puhtust, arvutati OD_{260nm}/OD_{280nm} suhe, mis oli 2.24. Seega järeldati, et puhastatud DNA raamatukogu on RNAGA kontamineeritud. Vaatamata sellele jätkati puhastatud DNA raamatukoguga eksperimentaalset tööd.

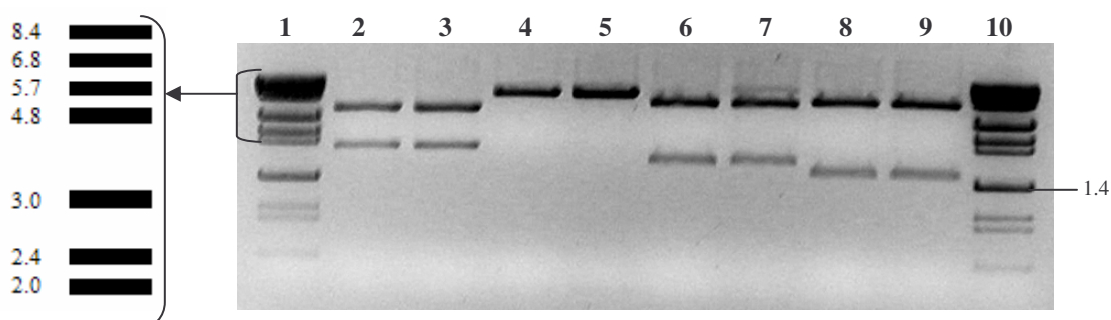
Läbi viidud plasmiidse DNA puhastamisetappe kontrolliti geelelektroforeesil 1% agaros/1× TAE geelis (vt. Joonis 7).



Joonis 7. uORFide DNA raamatukogu puhastamine. 1% agaros/1× TAE geel. Rajad: 1 – DNA marker; 2 – proov Q1 (rakulüsaadi supernatant), 20 µL; 3 – proov Q2 (läbijooks peale rakulüsaadi supernatandi kandmist QIAGEN-tip 500 kolonnile), 20 µL; 4 – proov Q3 (pesemisetapi läbijooks), 20 µL; 5 – proov Q4 (plasmiidse DNA eluaat), 20 µL; 6 – puhastatud uORFide DNA raamatukogu, 5 µg 2 µL-s ; 7 – DNA marker. DNA markeri suurus on toodud kiloaluspaarides.

Jooniselt 7 on näha, et enamik rakulüsaadi supernatandis sisalduvast plasmiidsest DNAST seostus QIAGEN-tip 500 kolonni külge (võrdle omavahel proovid Q1 ja Q2, rajad 2 ja 3). Elueeritud plasmiidse DNA sadestamise käigus DNA kontsentreerus (võrdle proovi Q4 puhastatud DNA raamatukogu prooviga, rajad 5 ja 6).

Juhuslikku järjestust sisaldavate uORFide inserteerumist puhastatud DNA raamatukogu plasmidi kontrolliti sekveneerimisel ning lisaks tehti raamatukogu DNale restriksioonanalüüs erinevate restriktasididega (vt. Joonis 8).



Joonis 8. Restriksioonanalüüs uORFide DNA raamatukogu kontrollimiseks. 1% agaros/1× TAE geel. Rajad: 1 – DNA marker; 2 – pExp2/*EcoRV*, 0.5 µg; 3 – raamatukogu DNA/*EcoRV*, 0.5 µg; 4 – pExp2/*XhoI*+*HindIII*, 0.5 µg; 5 – raamatukogu DNA/*XhoI*+*HindIII*, 0.5 µg; 6 – pExp2/*EcoRI*+*BamHI*, 0.5 µg; 7 – raamatukogu DNA/*EcoRI*+*BamHI*, 0.5 µg; 8 – pExp2/*NcoI*+*BamHI*, 0.5 µg; 9 – raamatukogu DNA/*NcoI*+*BamHI*, 0.5 µg; 10 – DNA marker. DNA markeri suurus on toodud kiloaluspaarides.

Puhastatud uORFide DNA raamatukogu konstruktid erinevad algsest plasmiidist pExp2 ainult inserteeritud uORFide järjestuste poolest, mille inserteerimisega plasmidi pExp2 ei kaasnenud ühtegi restriksioonisaidi muutumist. Seega plasmidi pExp2 ja raamatukogu DNA

lõikamisel ühtede ja samade restriктаasidega peaksid tekkima ühesuured restriksiooniproduktid. Jooniselt 8 on näha, et puhastatud DNA raamatukogu plasmiid annabki plasmiidiga pExp2 ühesuurseid restriksiooniprodukte, mis näitab seda, et puhastamise käigus raamatukogu plasmiidi järjestuses ei ole toimunud ümberkorraldusi.

Lisaks alustati käesolevas töös uue uORFide DNA raamatukogu konstrueerimist, mis erines olemasolevast puhastatud ja skriinitud raamatukogust ainult selle poolest, et uue raamatukogu uORFide järjestused sisaldasid lisaks terminatsioonikoodonit TAA. Terminatsioonikoodoniga uORFide raamatukogu kloneerimiseks kasutati SECOSTOP oligonukleotiidi, mis kannab terminatsioonikoodoniga kaheksakoodonilisi uORFide järjestusi ATG NNN NNN NNN NNN NNN NNN TAA, ja kõiki kloneerimiskatseid tehti analoogiliselt nagu ilma terminatsioonikoodonita raamatukogu konstrueerimisel. Terminatsioonikoodoniga uORFide raamatukogu skriinimine tulevikus annaks lisavõimaluse isoleerida funktsionaalseid uORFe.

2. Selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu skriinimine

Kuna üldise ja mikroobibiokeemia laboris (TÜMRI) kraadiõppurite A. Auna ja K. Viikovi poolt olid tehtud eel katsed, kus uuriti *S. cerevisiae* erütromütsiini erinevate kontsentratsioonide taluvust selektiivsetes vedelsöötmetes, otsustati esialgu läbi viia uORFide DNA raamatukogu skriinimine, kasutades pärmirakkude selekteerimiseks vastavaid söötmeid. Eel katsed näitasid, et 500 µg/mL erütromütsiini juuresolekul pärmis kasv selektiivsetes vedelsöötmetes ei ole pärsitud. See oli kõige suurem kontsentratsioon, mida eel katses vaadeldi ja kuna see oli üsna kõrge võrreldes vanemteadur T. Tensoni tööühma (TÜTI) poolt bakteriaalses süsteemis skriinimise korral kasutatud kontsentratsiooniga (30 µg/mL), otsustati kasutada seda käesolevas töös vedelsöötmetes skriinimise läbiviimiseks.

Selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu esimene skriinimine

Alustati sellega, et määrati pärmis *S. cerevisiae* uORFide DNA raamatukoguga elektroporeerimise efektiivsus. Selleks elektroporeeriti W303α pärmirakke kolme erineva raamatukogu DNA kogusega (100, 200 ja 300 ng). Suurim arv pärmitransformante ühe elektroporatsiooni kohta saadi 300 ng raamatukogu DNA korral – ligikaudu 19'000 transformanti. Saadud andmete alusel arvutati, et puhastatud DNA raamatukogu katmiseks, mis koosneb ligikaudu 2'230'000 erinevast rekombinantsest kloonist, oleks vaja teha korraga 118

elektroporatsiooni, kasutades 300 ng raamatukogu DNAd iga elektroporatsiooni kohta. Piiratud inim- ja laboriressursside tõttu ei olnud võimalik teostada elektroporeerimist sellises mahus. Seetõttu otsustati teha 26 elektroporatsiooni, millega oleks võimalik saada ligikaudu 500'000 transformanti, mis kataks olemasoleva DNA raamatukogu osaliselt. Mitme skriinimise läbiviimine väiksemas mahus tulevikus võimaldaks hõlmata tervet raamatukogu.

Seega esimeses uORFide DNA raamatukogu skriinimises tehti 26 W303 α pärmirakkude elektroporatsiooni, kasutades iga elektroporatsiooni kohta 300 ng uORFide raamatukogu DNAd. Esimese skriinimise käigus, mille skeem on toodud allpool Joonisel 9, teostati kaks pärmirakkude seleksioonietappide ringi. Skriinimise esimeses ringis elektroporeeritud pärmirakud tõsteti kokku ja kasvatati 100 mL-s sorbitooliga -TRP, -URA söötmes ühe pooldumistsükli vältel (28 tundi). Selle aja jooksul selekteeriti pärmirakke, mis sisaldasid uORFide DNA raamatukogu plasmidi. Et kontrollida elektroporeerimise efektiivsust, tehti kokku tõstetud elektroporeeritud rakkude segust erineva lahjendusega väljakülvid sorbitooliga -TRP, -URA tassidele. Selgus, et elektroporeerimise efektiivsus oli sama kõrge, nagu eelnevalt määrati 300 ng raamatukogu DNA korral.

Seejärel vahetati sorbitooliga -TRP, -URA sööde 100 mL 500 μ g/mL erütromütsiiniga -TRP söötme vastu ja oodati, kuni rakud pooldusid 1.5 korda (16 tundi). See oli vaheetapiks 5-FOAd sisaldavale söötmele üleminekuks, kuna ei teatud, milline kemikaal, kas erütromütsiin või 5-FOA satub pärmirakkudesse kiiremini. Juhul kui 5-FOA pääseks rakkudesse enne erütromütsiini, võiks see põhjustada muuhulgas ka funktsionaalseid uORFe sisaldavate rakkude surma.

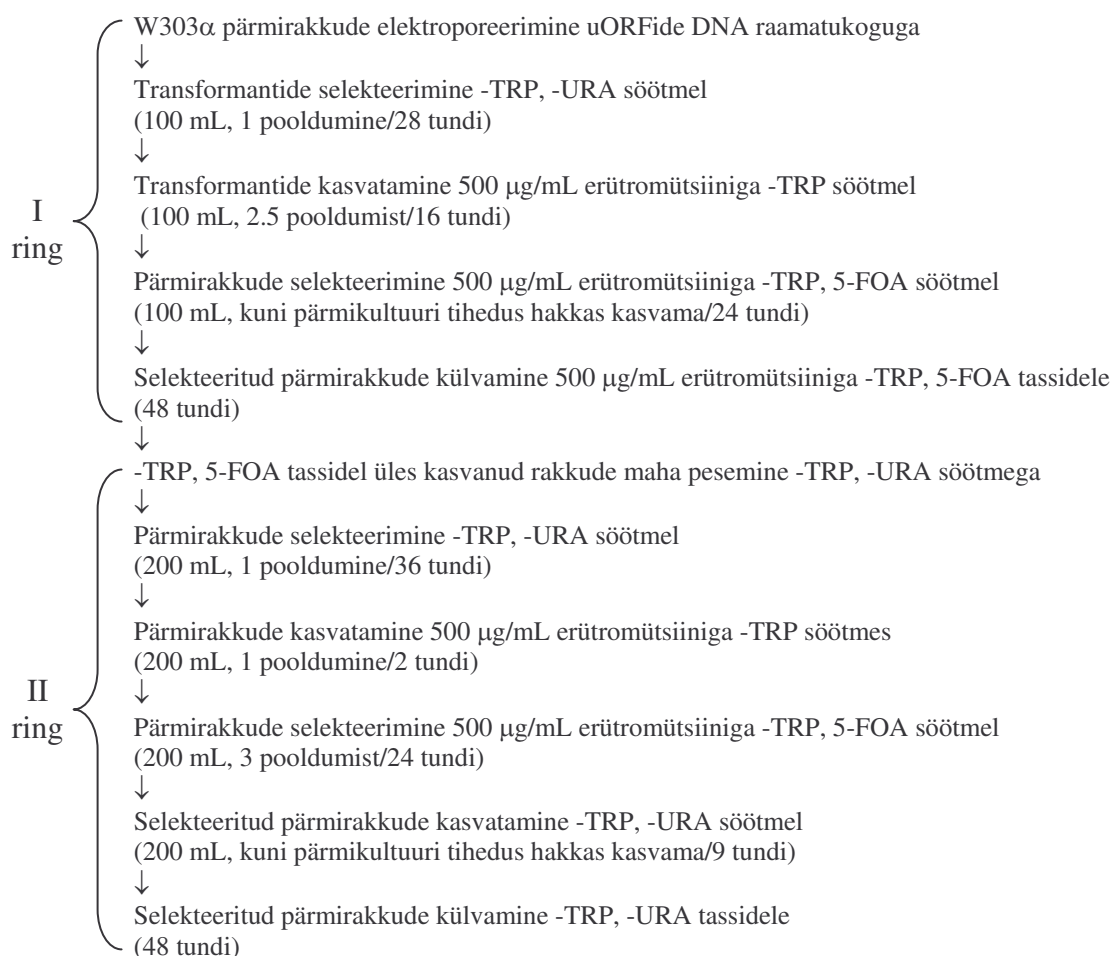
Järgnevalt vahetati 500 μ g/mL erütromütsiiniga -TRP sööde 100 mL 500 μ g/mL erütromütsiiniga -TRP, 5-FOA söötme vastu ja selekteeriti funktsionaalseid uORFe (e. selliseid uORFe, mis erütromütsiinist sõltuvalt represseerivad *URA3* markergeeni translatiooni) sisaldavaid pärmirakke, inkubeerides saadud pärmikultuuri kuni selle tihedus hakkas kasvama (24 tundi).

Lõpuks resuspendeeriti selekteeritud pärmirakud väiksemas mahus 500 μ g/mL erütromütsiiniga -TRP, 5-FOA söötmes, külvati sama selektiivse söötmega suurtele tassidele (diameetriga 13.5 cm) ja inkubeeriti 48 tundi. Tassidel kasvas üles ligikaudu 100'000 pärmikolooniat.

Skriinimise teises ringis korraldati seleksioonietappe esimeses ringis selekteeritud pärmirakkudega. Pärmikolooniad pesti tassidelt maha -TRP, -URA söötmega. Kuna saadud pärmikultuuri tihedus oli kõrge, lahjendati pärmikultuuri 200 mL -TRP, -URA söötmesse ja kasvatati ühe pooldumistsükli vältel (36 tundi). Järgnevalt lahjendati pärmikultuuri 200 mL 500 μ g/mL erütromütsiiniga -TRP söötmesse ja lasti rakkudel poolduda 1 kord (2 tundi). Seejärel

lahjendati pärmikultuuri 200 mL 500 µg/mL erütromütsiiniga -TRP, 5-FOA söötmesse ning lasti rakkudel kasvada kolme pooldumistsükli vältel (24 tundi). Järgnevalt lahjendati pärmikultuuri 200 mL -TRP, -URA söötmesse, oodati, kuni kultuuri tihedus hakkas kasvama (9 tundi), seejärel resuspendeeriti väiksemas mahus -TRP, -URA söötmes ja erinevad rakkude lahjendused külvati sama selektiivse söötmega suurtele tassidele. Tasse inkubeeriti 48 tundi.

Esimese skriinimise käigus jälgiti, kuidas kasvab pärmikultuur erinevatel selektiivsetel söötmetel. Näiteks, ei teatud, kui palju aega läheb pärmirakkude selekteerimiseks 5-FOAd sisaldaval söötmetel. Negatiivset kontrolli esimesel skriinimisel ei olnud.



Joonis 9. Selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu esimese skriinimise skeem. Sulgudes on toodud pärmirakkude kasvatamise tingimused: söötme kogus, mitu korda rakkudel lasti poolduda/millise ajavahemiku jooksul. Esimese skriinimise käigus teostati kaks pärmirakkude seleksioonietappide ringi (I ja II ring).

Esimese skriinimise lõpus kasvas -TRP, -URA tassidel üles suur kogus selekteeritud pärmikolooniaid. Üksikuid kolooniaid oli võimalik eristada ainult kõige lahjemate väljakülvide korral. Edasiseks analüüsimiseks valiti 30 kolooniat, eraldati nendest plasmiidne DNA ja elektroporeeriti sellega DH5α bakterirakke. Iga klooni kahest transformeeritud bakterikolooniast omakorda eraldati plasmiidne DNA, millele tehti restriksioonanalüüs uORFide DNA

raamatukogu sisalduse kontrollimiseks ja sekveneeriti uORFid. Sekveneerimise tulemusena selgus, et kõik analüüsitud pärmikolooniad sisaldasid ühte ja sama uORFide DNA raamatukogu rekombinantset kloon (YP16), mis kannab uORFi järjestusega ATG ATC TGC GTT AGG AGC TAG (vastav peptiid – Met Ile Cys Val Arg Ser). Siinkohal peaks tähelepanu pöörama sellele, et selekteeritud uORFi viimane koodon TAG on terminatsioonikoodon.

Paralleelselt käesolevas töös läbi viidud selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu esimese skriinimisega üldise ja mikroobibiokeemia laboris (TÜMRI) viidi sõltumatult läbi analoogiline skriinimine sama DNA raamatukoguga teadur T. Tamme ja kraadiõppur A. Auna poolt. Skriinimise tulemusena isoleeriti samuti üks uORFide DNA raamatukogu kloon (TA09), mis kandis uORFi järjestusega ATG GTG GTG AAT GCC GTT TTT (vastav peptiid – Met Val Val Asn Ala Val Phe).

See, et käesoleva töö autori poolt läbi viidud skriinimises isoleeriti ainult üks uORF ning T. Tamme ja A. Auna poolt läbi viidud skriinimises – samuti üks uORF, viib järeldusele, et läbi viidud skriinimiste mingil etapil pärmikultuuris hakkas domineerima vastava isoleeritud uORFi kandvate rakkude populatsioon. Arvati, et see võiks toimuda tõenäoliselt skriinimise teises ringis pärmirakkude selekteerimise käigus 500 µg/mL erütromütsiiniga -TRP, 5-FOA söötmel, kus rakke kasvatati kolme pooldumistsükli vältel (vt. Joonis 9). Seega järgmises skriinimises otsustati võimalikult vähendada pärmirakkude selekteerimisega kõikidel etappidel, et vältida mingit konkreetset uORFi kandva pärmirakkude populatsiooni domineerimist. Samal ajal peaks selekteerimisaeg olema piisavalt pikk tagama funktsionaalseid uORFe sisaldavate pärmirakkude selekteerimist. Arvati, et pärmikultuuri kasvatamine selektiivsel söötmel kuni selle tihedus hakkab kasvama e. kuni selekteeritud rakud hakkavad poolduma peaks olema optimaalne.

See, et T. Tamm ja A. Aun isoleerisid töö autori poolt isoleeritud uORFist erineva järjestusega uORFi, viib järeldusele, et tõenäoliselt iga uue skriinimisega on võimalik isoleerida uus uORF. Seega arvati, et kui skriinimise alguses uORFide DNA raamatukoguga elektroporeeritud pärmirakud jaotada mitmesse erinevasse rakukultuuri ning samaaegselt läbi viia eraldi skriinimised saadud rakukultuuridega, oleks võimalik välja selekteerida rohkem erinevaid uORFe.

Arvestades eespool tehtud järeldusi viidi läbi teine selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu skriinimine.

Selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu teine skriinimine

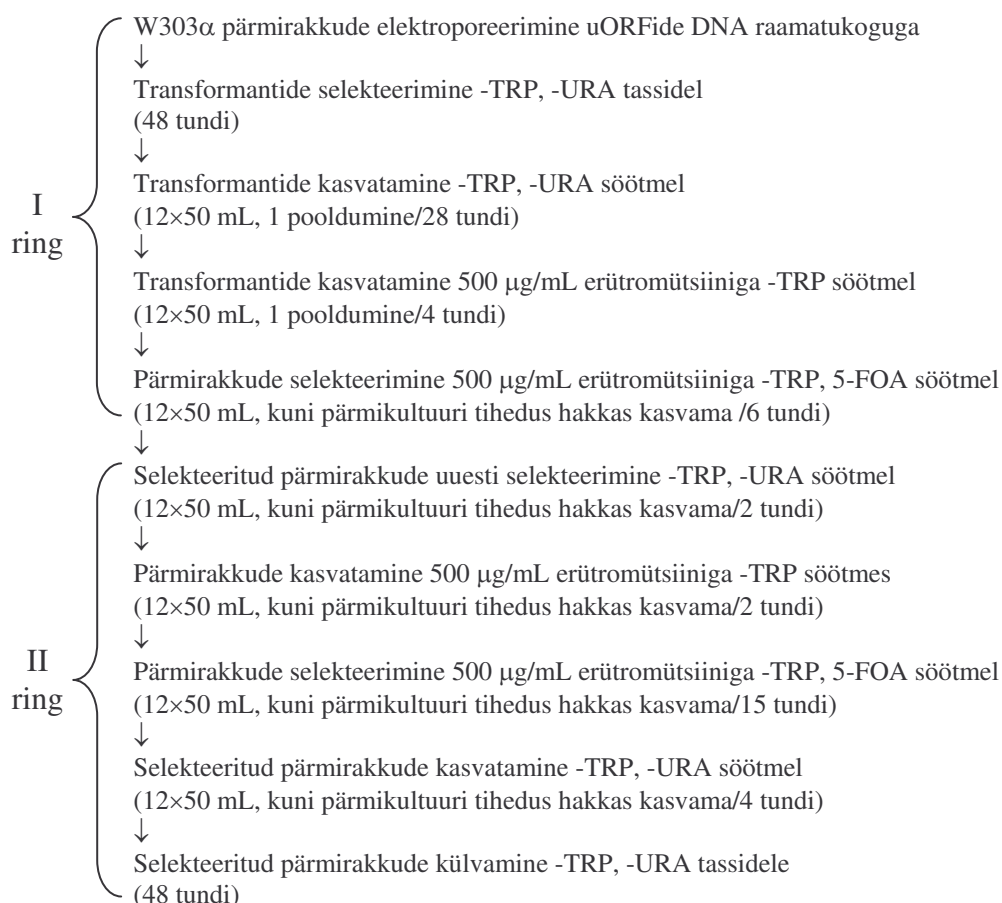
Teises uORFide DNA raamatukogu skriinimises tehti 24 W303 α pärmirakkude elektroporatsiooni, kasutades iga elektroporatsiooni kohta 300 ng uORFide raamatukogu DNAd.

Teise skriinimise käigus teostati samuti kaks pärmirakkude selektsioonietappide ringi (vt. Joonis 10 allpool). Skriinimise esimeses ringis elektroporeeritud pärmirakud, tõsteti kokku kahe elektroporatsiooni kaupa, saadud 12 rakkude segu külvati välja eraldi sorbitooliga -TRP, -URA suurtele tassidele (A-L) ja inkubeeriti 48 tundi. Elektroporeerimise efektiivsuse kontrollimiseks tehti erineva lahjendusega väljakülvid mitmest erinevast elektroporeeritud rakukultuurist sama söötmega tassidele. Elektroporeerimise efektiivsus oli sama kõrge, nagu eelnevalt määrati 300 ng raamatukogu DNA korral ning suurtel tassidel (A-L) kasvas üles ligikaudu 456'000 uORFide DNA raamatukogu plasmidi sisaldavat pärmikolooniat.

Saadud pärmikolooniad pesti tassidelt maha -TRP, -URA söötmega. Iga erineva tassi pealt maha pestud pärmikultuuri lahjendati 50 mL -TRP, -URA söötmesse 12 eraldi kolbi (A-L) ja kasvatati ühe pooldumistsükli vältel (4 tundi). Ka edaspidi kasvatati A-L pärmikultuure eraldi.

Seejärel lahjendati pärmikultuurid 25 mL 500 μ g/mL erütromütsiiniga -TRP söötmesse ja lasti rakkudel poolduda 1 kord (4 tundi). Järgnevalt selekteeriti pärmirakke, kasvatades neid 50 mL 500 μ g/mL erütromütsiiniga -TRP, 5-FOA söötmel kuni rakukultuuri tihedus hakkas kasvama (6 tundi).

Skriinimise teises ringis 5-FOAd sisaldaval söötmel selekteerimise läbinud pärmikultuurid lahjendati 50 mL -TRP, -URA söötmesse ja oodati kuni kultuuride tihedus hakkas kasvama (2 tundi). Järgnevalt vahetati -TRP, -URA sööde 50 mL 500 μ g/mL erütromütsiiniga -TRP söötme vastu ja inkubeeriti pärmikultuure kuni nende tihedus hakkas kasvama (2 tundi). Seejärel lahjendati pärmikultuurid 50 mL 500 μ g/mL erütromütsiiniga -TRP, 5-FOA söötmesse ning kasvatati kuni kultuuride tihedus hakkas kasvama (15 tundi). Selekteeritud pärmikultuurid lahjendati uuesti 50 mL -TRP, -URA söötmesse ja oodati kuni rakkude tihedus hakkas kasvama (4 tundi). Seejärel resuspendeeriti rakud väiksemas mahus -TRP, -URA söötmes ja külvati sama söötmega 12 suurele tassidele (A-L). Tasse inkubeeriti 48 tundi.



Joonis 10. Selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu teise skriinimise skeem. Sulgudes on toodud pärmirakkude kasvatamise tingimused: söötme kogus, mitu korda rakkudel lasti poolduda/millise ajavahemiku jooksul. Teise skriinimise käigus teostati kaks pärmirakkude selektsioonietappide ringi (I ja II ring).

Teise skriinimise lõpus kasvas -TRP, -URA tassidel (A-L) üles suur kogus selekteeritud pärmikolooniaid v.a. tass D, mille peal ei kasvanud üles ühtegi kolooniat. Kõigilt pärmikolooniatega 11 tassilt valiti kaks kolooniat ja analüüsiti analoogiliselt esimese skriinimisega: valitud pärmikolooniatest eraldati plasmiidne DNA, elektroporeeriti sellega DH5α bakterirakke, seejärel eraldati iga kloon ühest bakterikolooniast plasmiidne DNA, kontrolliti restriksioonanalüüsiga ja sekveneeriti uORFid. Sekveneerimine näitas, et erinevatest selekteeritud pärmikultuuridest pärit kolooniad sisaldasid erinevaid uORFide DNA raamatukogu rekombinantseid kloone (vt. Tabel 20). Kultuuride B, C, F ja J korral õnnestus isoleerida kultuurisiseselt kahte erineva järjestusega uORFi.

Tabel 20. Selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu teises skriinimises isoleeritud uORFide järjestused.

Pärmikultuur	uORFi järjestus (5'-3')	uORFi peptiid
A	ATG CCG TTT GAA CGT ATA ATT ¹	Met Pro Phe Glu Arg Ile Ile
B	ATG CGG TGC GTT TGT GTC TTC ATG CCG AAC TGC GGA AGG ACC	Met Arg Cys Val Cys Val Phe Met Pro Asn Cys Gly Arg Thr
C	ATG GTA CTT TTG TGT <u>TAG</u> AGT ² ATG TCC TTG TCG CAG TGG ATC	Met Val Leu Leu Cys Stop Ser Met Ser Leu Ser Gln Trp Ile
E	ATG <u>TAA</u> CTG ACG ATG CCA TCA	Met Stop Leu Thr Met Pro Ser
F	ATG CGG CGG GCT AGC GGT ATT ATG GTC TCA AGC CAG TCT TTT	Met Arg Arg Ala Ser Gly Ile Met Val Ser Ser Gln Ser Phe
G	ATG GCC GCA TGT GCT TGG TCT	Met Ala Ala Cys Ala Trp Ser
H	ATG AGT TAC TAC TGT AGG CTT	Met Ser Tyr Tyr Cys Arg Leu
I	ATG CCG GAG CAC TGG CCA AGA	Met Pro Glu His Trp Pro Arg
J	ATG GTT GTG GGC CGA CCT CAT ATG CGG CCC TGG GGT CCT AGT	Met Val Val Gly Arg Pro His Met Arg Pro Trp Gly Pro Ser
K	ATG TTG GTG CTA ACT GCT CCC	Met Leu Val Leu Thr Ala Pro
L	ATG GGT GCG TTA ACC AGT CGC	Met Gly Ala Leu Thr Ser Arg

¹ Pärmikultuuride A, E, G, H, I, K ja L korral kahest kloonist isoleeritud uORFid olid ühesugused.

² Joon on alla tõmmatud terminatsioonikoodonitele, mis on peptiidide aminohappelises järjestuses tähistatud kui „Stop”.

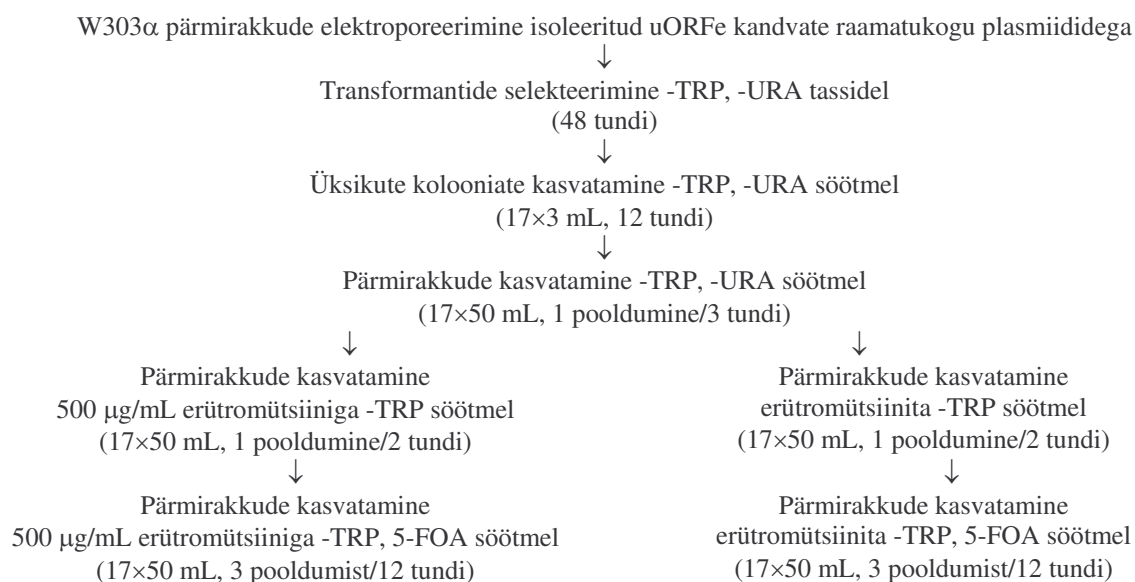
Selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu teise skriinimise tulemusena isoleeriti 15 erineva järjestusega uORFi, millest ükski ei olnud aminohappelise järjestuse poolest sarnane ei üksteisega ega esimeses skriinimises isoleeritud kahe uORFiga. Üks pärmikultuurist C isoleeritud uORFidest sisaldas terminatsioonikoodonit ja pärmikultuurist E isoleeritud uORF koosnes ainult kahest koodonist – initsiatsioonikoodonist ATG ja sellele koheselt järgnevast terminatsioonikoodonist TAA. Tegelikult viimase puhul ei saa öelda, et tegemist on uORFiga, kuna ta ei kodeeri peptiidi.

Saadud tulemustest võib järeldada, et võrreldes esimese skriinimisega uORFide DNA raamatukoguga elektroporeeritud pärmirakkude jaotamine erinevatesse rakukultuuridesse ja nende eraldi skriinimine, aga ka pärmirakkude selekteerimisaja vähendamine aitas isoleerida rohkem erinevaid uORFe. Arvati, et just tänu pärmirakkude selekteerimisaja vähendamisele õnnestus isoleerida erinevaid uORFe kultuuride (B, C, F, J) siseselt, sest see võimaldas vältida ühte konkreetset uORFi kandvate rakkude populatsiooni domineerimist pärmikultuurides.

Negatiivne kontroll selektiivsetes vedelsöötmetes skriinimisel

Selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu teises skriinimises isoleeritud uORFidele ja ka esimeses skriinimises isoleeritud kahele uORFile (YP16 ja TA09) tehti negatiivsed kontrollid. Negatiivse kontrolli põhimõte seisnes selles, et vaadata, kuidas käituvad selekteeritud uORFe kandvad pärmirakud ilma erütromütsiiniga 5-FOAd sisaldaval söötmel. Juhul, kui tegemist on tõepoolest erütromütsiini poolt reguleeritavate uORFidega, siis ilma antibiootikumita 5-FOAd sisaldaval söötmel ei tohiks neid kandvad pärmirakud eluvõimelised olla.

Negatiivse kontrolli katses, mille skeem on toodud Joonisel 11, 17 erinevat isoleeritud uORFi kandvad plasmiidid transformeeriti tagasi W303 α pärmirakkudesse Li-atsetaadi meetodil, külvati -TRP, -URA tassidele ja inkubeeriti 48 tundi. Iga analüüsitava uORFi korral inokuleeriti üks pärmikoloonia 3 mL -TRP, -URA söötmesse, kasvatati üleöö (12 tundi), seejärel tehti lahjendused 50 mL samasse söötmesse ja kasvatati ühe pooldumistsükli vältel (3 tundi). Järgnevalt jaotati saadud pärmikultuurid kaheks osaks, üks osa lahjendati 50 mL 500 μ g/mL erütromütsiiniga -TRP söötmesse ja teine 50 mL ilma antibiootikumita -TRP söötmesse. Rakkudel lasti poolduda üks kord (2 tundi). Seejärel vahetati vastavad söötmed kas 500 μ g/mL erütromütsiiniga -TRP, 5-FOA või -TRP, 5-FOA söötme vastu ning inkubeeriti pärmirakke üleöö (12 tundi). Saadud pärmikultuuridel mõõdeti optiline tihedus ja vaadeldi rakke valgusmikroskoobis.



Joonis 11. Negatiivse kontrolli katse skeem selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu skriinimisel. Sulgudes on toodud pärmirakkude kasvatamise tingimused: söötme kogus, mitu korda rakkudel lasti poolduda/millise ajavahemiku jooksul.

Tulemuseks saadi, et kõikide analüüsitud peptiidide korral nii erütromütsiini sisaldaval kui ka ilma erütromütsiinita -TRP, 5-FOA söötmel inkubeeritud pärmikultuurid pooldusid kolm korda ja kultuuride tihedused olid ligikaudu võrdsed. Vaadeldes rakke valgusmikroskoobis, oli näha et kultuurides oli valdavalt pungadega rakud.

Saadud tulemused viitavad sellele, et isoleeritud uORFid on võimelised inhibeerima *URA3* geeni translatsiooni, mistõttu neid kandvad pärmirakud on 5-FOA-le resistentsed, kuid seejuures *URA3* geeni translatsiooni inhibitsioon ei ole reguleeritav erütromütsiini poolt.

Seega selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu skriinimise käigus ei õnnestunud isoleerida funktsionaalseid uORFe. Selle üheks põhjuseks võis olla uORFide DNA raamatukogu mittetäielik katmine. Arvutati, et kui esimeses skriinimises alustati ligikaudu 500'000, T. Tamme ja A. Auna poolt läbi viidud skriinimises samuti 500'000, ning teises skriinimises ligikaudu 456'000 transformeeritud pärmirakuga, siis kokku skriiniti ligikaudu 1'456'000 raamatukogu plasmidi kandvat pärmirakku, mis teeb ligikaudu 65% olemasolevast DNA raamatukogust. DNA raamatukogu täielikuks katmiseks oleks vaja läbi viia veel kaks analoogilist skriinimist. Lisaks arvati, et funktsionaalsete uORFide isoleerimise ebaõnnestumise põhjuseks võis samuti olla see, et selektiivsete vedelsöötmete kasutamine skriinimises ei võimalda jälgida iga uORFide DNA raamatukoguga transformeeritud kloni kasvu, mis on vedelsöötmetes skriinimise peamiseks puuduseks. DNA raamatukogu skriinimine selektiivsetel tardsöötmetel võiks selle probleemi lahendada, sest tardsöötmetel on võimalik jälgida kõikide kloonide kasvu. Tardsöötmetel skriinimise ainsaks puuduseks on suur töömaht võrreldes vedelsöötmetes skriinimisega. Sellele vaatamata otsustati proovida raamatukogu skriinimist selektiivsetel tardsöötmetel.

3. Selektiivsetel tardsöötmetel uORFide DNA raamatukogu skriinimine

Enne selektiivsetel tardsöötmetel uORFide DNA raamatukogu skriinimise alustamist tehti eelkatsed, kus uuriti pärmis *S. cerevisiae* erütromütsiini erinevate kontsentratsioonide taluvust selektiivsetel tardsöötmetel. Seejuures testiti selektiivsetes vedelsöötmetes skriinimise käigus kasutatud erütromütsiini kontsentratsioonist (500 µg/mL) kõrgemaid kontsentratsioone, sest arvati, et kasutatud kontsentratsioon ei ole võib-olla siiski piisav selleks, et erütromütsiin avaldaks regulatoorset mõju otsitud uORFide poolt põhjustatud *URA3* markergeeni translatsiooni inhibitsioonile.

Kuna erütromütsiin seondub eelistatult prokarüootset tüüpi ribosoomile, kontrolliti eelkatsetes lisaks ka seda, ega pärmi mitokondriaalsete ribosoomide funktsioneerimine ei ole häiritud kõrgete erütromütsiini kontsentratsioonide juures. Juhul kui pärmi mitokondrite funktsioneerimine on mingitel põhjustel häiritud, siis moodustavad sellised pärmirakud fermenteeritava süsinikuallikaga (glükoos) söötmel *petite* kolooniaid (Mol *et al.*, 1974), mis ei ole eluvõimelised mittefermenteeritava süsinikuallikaga (glütserool) söötmel. *Petite* kolooniate detekteerimiseks võrreldi pärmikolooniate kasvu glükoosiga ja glütserooliga tardsöötmel.

Optimaalse erütromütsiini kontsentratsiooni määramine selektiivsetel tardsöötmel skriinimise läbiviimiseks

Plasmiidiga pExp2 transformeeritud W303α pärmirakke kasvatati 30 mL -TRP, -URA söötmes kuni OD₆₀₀ 0.25, seejärel tehti väljakülvid erineva erütromütsiini kontsentratsiooniga (0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5 ja 2 mg/mL) ja süsinikuallikaga (glükoos/glütserool) -TRP, -URA tassidele. Positiivseks kontrolliks olid ilma antibiootikumita vastavad glükoosiga ja glütserooliga -TRP, -URA söötmed. Glükoosiga tasse inkubeeriti 48 tundi, glütserooliga – 120 tundi. Peale seda analüüsiti pärmikolooniate kasvu erinevate erütromütsiini kontsentratsioonide juures ja kontrolliti *petite* mutantide teket võrreldes vastavaid glükoosiga ja glütserooliga tasse. Katse tulemused on esitatud Tabelis 21.

Tabel 21. Pärm *S. cerevisiae* erütromütsiini erinevate kontsentratsioonide taluvus selektiivsetel tardsöötmel.

Erütromütsiini kontsentratsioon söötmes (mg/mL)	Pärmikolooniate kasv 2% glükoosiga -TRP, -URA tardsöötmel	Pärmikolooniate kasv 3% glütserooliga -TRP, -URA tardsöötmel
-	++++ / +++++, -p*	++++ / +++++
0.05	++++ / +++++, -p	++++ / +++++
0.1	++++ / +++++, -p	+++ / ++++
0.5	++++ / +++++, -p	+++ / ++
1	++++ / +++++, -p	+++ / ++
1.5	++++ / +++++, -p	++ / +
2	++++ / +++++, -p	-

* „+“ märkidega on tähistatud kolooniate suhteline arv ja suurus (arv/suurus). „-p“ tähistab ilma *petite* mutantideta tasse.

Saadud tulemused näitasid, et ühelgi glükoosiga tassil ei tekkinud *petite* mutante. See viib järeldusele, et pärmi *S. cerevisiae* mitokondriaalsete ribosoomide funktsioneerimine ei ole häiritud testitud erütromütsiini kontsentratsioonide juures (0.05 kuni 2 mg/mL). Pärmikolooniate kasv glükoosiga tardsöötmel kõikide testitud antibiootikumi kontsentratsioonide korral oli sama hea nagu positiivsel kontrollil. Kuid glütserooliga tassidel erütromütsiini kontsentratsiooni

tõusuga pärmikolooniate arv ja suurus kahanesis ning 2 mg/mL erütromütsiini korral kasvu ei olnud üldse.

Pärmi kasv glütserooliga tassidel oli erütromütsiinile tundlikum sellepärast, et mittefermenteeritava süsinikuallika kasutamine on pärmirakule koormav ja seetõttu erütromütsiini mõju koormatud rakkudele on tugevam võrreldes glükoosil kasvavate rakkudega. Kuna uORFide DNA raamatukogu skriinimises kasutatakse glükoosiga selektiivsõotmeid, siis glütserooliga tardsõotmete korral saadud tulemusi ei võetud arvesse ja otsustati tardsõotmetel skriinimise läbiviimiseks kasutada 1 mg/mL erütromütsiini.

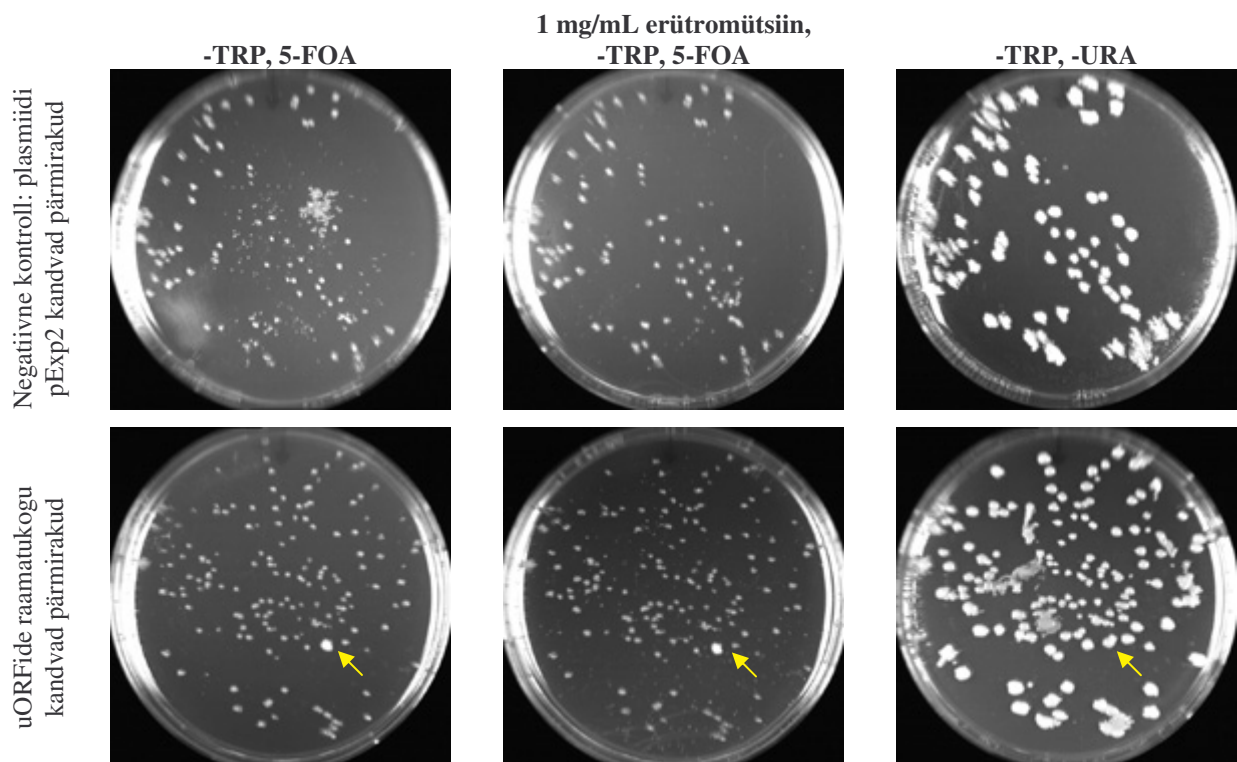
Selektiivsetel tardsõotmetel uORFide DNA raamatukogu skriinimine

Esimeses selektiivsetel tardsõotmetel uORFide DNA raamatukogu skriinimises tehti kolm W303 α pärmirakkude elektroporatsiooni, kasutades iga elektroporatsiooni kohta 300 ng uORFide raamatukogu DNAd. Oodatav transformantide arv oli ligikaudu 57'000, kuid elektroporeerimise kontrollkatse näitas, et seekord elektroporeerimise efektiivsus oli varaste skriinimistega võrreldes madalam – saadi ligikaudu 10'000 transformanti.

DNA raamatukoguga elektroporeeritud pärmirakud külvati 50-le sorbitooliga -TRP, -URA tassile ja kasvatati 48 tundi. Igal tassil kasvas üles keskmiselt 150 pärmikolooniat. Negatiivseks kontrolliks oli ilma uORFideta pExp2 plasmiidiga elektroporeeritud pärmirakkudega tass.

Seejärel külvati tempelmeetodil kõik 50-l tassil ja ka negatiivse kontrolli tassil üleskasvanud pärmikolooniad kolmele erineva söötmega (1 mg/mL erütromütsiiniga -TRP, 5-FOA; -TRP, 5-FOA; -TRP, -URA) tassile ja kasvatati 48 tundi. -TRP, -URA tassidele korduv külvamine oli vajalik positiivseks kontrolliks.

Saadud pärmikolooniaid analüüsiti kolme tassi kaupa. Kõikidel positiivse kontrolli tassidel (-TRP, -URA) olid pärmikolooniad suured ja roosakad. Enamikul 1 mg/mL erütromütsiiniga -TRP, 5-FOA ja -TRP, 5-FOA tassidel oli kolooniate kasv pärsitud – kolooniad olid valged ja positiivse kontrolli kolooniatest väiksemad. 14 korral 1 mg/mL erütromütsiiniga -TRP, 5-FOA ja -TRP, 5-FOA tassidel märgati aga üksikuid 5-FOA-le resistentseid kolooniaid, mis olid suuremad ja roosakamad võrreldes pärsitud kasvuga kolooniatega (vt. Joonis 12). Seejuures erütromütsiiniga söötmel 5-FOA-le resistentsete kolooniate kasv ilma erütromütsiinita söötmel vastavate kolooniate kasvust.



Joonis 12. uORFide DNA raamatukoguga transformeeritud pärmikolooniate kasv selektiivsetel tardsöötmetel. Noolega on tähistatud 5-FOAle resistentne pärmikoloonia.

Läbiviidud skriinimise tulemusena isoleeriti 14 5-FOAle resistentset pärmikolooniat, kuid seejuures ei õnnestunud detekteerida ühtegi erütromütsiini poolt reguleeritava geeniekspressioonisüsteemi kandvat pärmikolooniat. Seega loobuti ka edasise üksikute 5-FOAle resistentsete kolooniate analüüsimisest.

Läbiviidud selektiivsetel tardsöötmetel skriinimise käigus skriiniti ligikaudu 10'000 uORFide DNA raamatukoguga elektroporeeritud pärmirakku, mis on kaduvväike arv võrreldes olemasoleva DNA raamatukogu suurusega (ligikaudu 0.45% raamatukogust). Seega plaanitakse tulevikus läbi viia suuremas mahus skriinimine rohkemate inimressurssidega, kasutades 13.5 cm diameetriga *Petri* tase ja vastava suurusega templit. Fakt, et selektiivsetel tardsöötmetel skriinimise käigus isoleeriti 14 5-FOAle resistentset pärmikolooniat ligikaudu 10'000 transformandi kohta ja selektiivsetes vedelsöötmetes isoleeriti ainult 17 5-FOAle resistentset andvat peptiidi 1'456'000 transformandi kohta, näitab seda, et selektiivsetes vedelsöötmetes skriinimine on väga madala lahutuvusega. Sellel põhjusel loobuti lõplikult selektiivsetes vedelsöötmetes skriinimise läbiviimisest tulevikus.

Lisaks arvati, et erütromütsiini erinevate makroliidide kasutamine uORFide DNA raamatukogu selektiivsetel tardsöötmetel skriinimisel annaks lisavõimaluse isoleerida funktsionaalseid uORFe.

4. Bakteriaalses süsteemis funktsioneerivate uORFide kontrollimine pärmisüsteemis

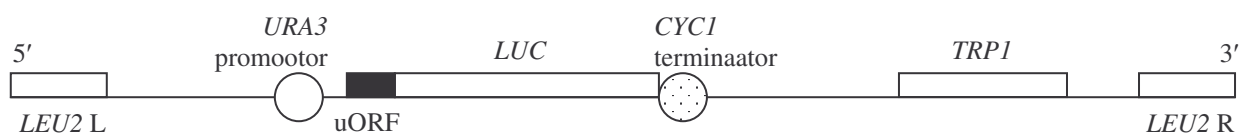
Bakteriaalses süsteemis uORFide DNA raamatukogu skriinimise käigus vanemteadur T. Tensoni töörühma (TÜTI) poolt isoleeritud kaheksakoodonilised ilma terminatsioonikoodonita uORFid 1804-46 ja 2903-24 (vt. Tabel 22), mis inhibeerivad reportergeeni translatsiooni 30 µg/mL erütromütsiini juuresolekul, kontrolliti funktsioneerimise suhtes käesolevas töös kasutatud pärmisüsteemis. Seejuures negatiivseteks kontrollideks olid T. Tensoni poolt pakutud järjestus 2903-24 tagurpidi koodonitega (2903-24tg) ja kontrolljärjestus negkEcoli, mis peamiselt koosneb koodonitest, mis puuduvad järjestustes 1804-46, 2903-24 ja 2903-24tg (vt. Tabel 22).

Tabel 22. Bakteriaalses süsteemis skriinimise käigus isoleeritud järjestused.

Isolaat	uORFi järjestus (5'-3')	uORFi peptiid
1804-46*	ATG CTG GTG CGC AAC TTT TTC GGG	Met Leu Val Arg Asn Phe Phe Gly
2903-24	ATG ATC AGT GTG TGG CTT GTT GCT	Met Ile Ser Val Trp Leu Val Ala
2903-24tg	ATG GCT GTT CTT TGG GTG AGT ATC	Met Ala Val Leu Trp Val Ser Ile
negkEcoli	ATG TGT CCA CAG GCT GAG AAG ACT	Met Cys Pro Gln Ala Glu Lys Thr

* Järjestused 1804-46 ja 2903-24 funktsioneerivad bakteriaalses süsteemis, inhibeerides reportergeeni translatsiooni erütromütsiini juuresolekul. Järjestused 2903-24tg ja negkEcoli on negatiivsed kontrollid. Järjestus 2903-24tg on tagurpidi koodonitega järjestus 2903-24 ja negkEcoli järjestus koosneb koodonitest (v.a. GCT), mis puuduvad ülejäänud järjestustes. Järjestused on saadud T. Tensoni töörühma (TÜTI) poolt.

T. Tensoni töörühma poolt isoleeritud uORFide kontrollimiseks pärmisüsteemis kloneeriti mainitud järjestused *LUC* reportergeeni ette ning valmistati integreerimiskonstruktid (vt. Joonis 13), mis integreeriti haploidse pärmi *S. cerevisiae* *LEU2* lookusesse. Negatiivseks kontrolliks oli ilma uORFita *LUC* geeni sisaldav konstrukti. Seejärel mõõdeti erinevate uORFide korral lutsiferaasi ekspressioonitaset, kasvatades vastavaid pärmirakke ilma erütromütsiinita ja erütromütsiiniga selektiivsetel söötmetel. Analooiliselt kontrolliti ka käesolevas töös selektiivsetes vedelsöötmetes esimese skriinimise käigus isoleeritud kahte uORFi – YP16 ja TA09.



Joonis 13. uORFe kandvad integreerimiskonstruktid pärmi *S. cerevisiae* *LEU2* lookusesse integreerimiseks. Järjestused 1804-46, 2903-24, 2903-24tg, negkEcoli, YP16 ja TA09 kloneeriti *LUC* reportergeenigeeni N-terminusse liidetuna *URA3* promootori taha. *LEU2* L tähistab *S. cerevisiae* *LEU2* geeni 5'-otsa ja *LEU2* R vastavalt 3'-otsa.

Kloneerimine

Kõigepealt amplifitseeriti plasmiidilt pGL3-Basic PCRi abil *LUC* geen, kasutades erinevaid pärisuunalisi – 5BAM1804-46, 5BAM2903-24, 5BAM2903-24tg, 5BAMnegkEcoli, 5BAMTA09, 5BAMYYP16, 5BAMWOORF oligonukleotiide ja vastassuunalist LUCXHO-AS oligonukleotiidi. 5BAM1804-46, 5BAM2903-24, 5BAM2903-24tg, 5BAMnegkEcoli, 5BAMTA09, 5BAMYYP16 oligonukleotiidid kannavad kontrollitavate uORFide järjestusi. uORFide järjestustele järgneb *LUC* geeni alguse järjestus. 5BAMWOORF on ilma uORFita oligonukleotiid negatiivse kontrolli integreerimiskonstrukti tegemiseks. Vastassuunaline LUCXHO-AS paardub *LUC* geeni lõpus oleva komplementaarse järjestusega.

Saadud PCRi produktid lõigati *Bam*HI ja *Xho*I restriктаasidega. Restrikteeritud PCRi produktid ligeeriti *Bam*HI- ja *Sal*I-ga lõigatud pLRL-*URA3* plasmiidiga (lõigatud plasmiid oli saadud teaduri T. Tamme käest) ning transformeeriti DH5 α bakterirakkudesse. Transformante kontrolliti koloonia PCRi abil *LUC* geeni sisalduse järgi ja bakterirakkudest eraldati plasmiidne DNA. Eraldatud ligeeritud konstrukte kontrolliti restriksioonanalüüsi abil.

*Integreerimine pärmis *S. cerevisiae* LEU2 lookusesse*

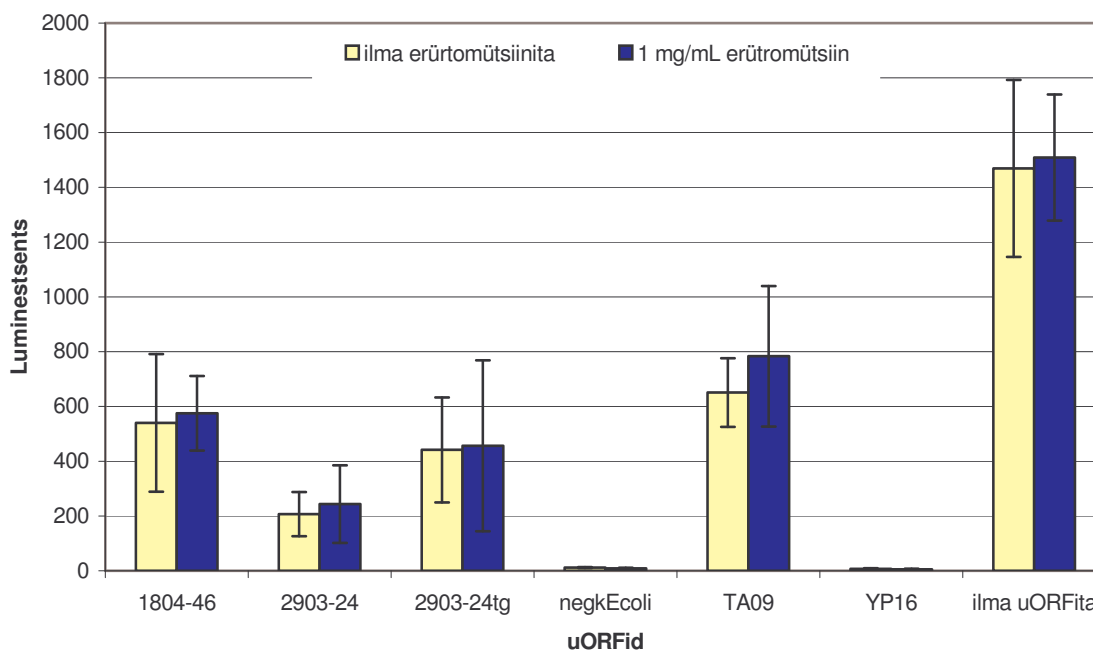
Ligeerimisel saadud uORFe kandvad konstruktid lõigati *Cpo*I-ga ja transformeeriti restriksioonisegud haploidse pärmitüve W303 α rakkudesse Li-atsetaadi meetodil. *Cpo*I lõikamisega eelnevalt ligeeritud konstruktidest saadakse integreerimiskonstruktid (vt. Joonis 13), mille otstel on pärmis *LEU2* geeni eesmine (L) ja tagumine (R) osa. Sellise konstrukti transformeerimisel pärmis toimub homoloogiline rekombinatsioon integreerimiskonstrukti *LEU2* L ja R järjestuste ning pärmis III kromosoomis asuva *LEU2* geeni vastavate järjestuste vahel, mille tulemusena *LUC* reportergeeni kandev konstrukti integreerub pärmis kromosoomi. Integreerimisel kasutati haploidset pärmitüve, et tagada ainult ühe konstrukti integreerimine ühe pärmiraku kohta.

Integreeritud konstruktidega pärmirakke selekteeriti konstruktidest sisalduva *TRP1* markergeeni järgi, kasvatades rakke -TRP tassidel 48 tundi. Lisaks sellele, kontrolliti transformante koloonia PCRi abil *LUC* geeni sisalduse järgi.

Lutsiferaasi ekspressioonitaseme mõõtmine

Iga erineva *LUC*-konstrukti kohta kasvatati kolm kolooniat -TRP söötmel nii 1 mg/mL erütromütsiini juuresolekul kui ka ilma antibiootikumita kuni OD_{600nm} 0.6 – 0.7 (6 tundi). Seejärel tehti saadud kultuuridest rakulüsaadid, mida kasutati lutsiferaasi ekspressioonitaseme ning totaalse valgu kontsentratsiooni mõõtmiseks Bradfordini meetodil. Aktiivse lutsiferaasi ekspressioonitaseme mõõdeti luminesentsi järgi. Saadud näidud arvutati ümber 1 mg/mL

rakulüsaadi totaalse valguga kohta. Seejärel arvutati iga erineva konstrukti kohta kolme koloonia keskmised näidud ja standardhälbed. Tulemused on esitatud graafikuna Joonisel 14.



Joonis 14. Aktiivse lutsiferaasi ekspressioonitase erinevate uORFide korral.

Jooniselt 14 on näha, et võrreldes negatiivse kontrolliga (ilma uORFita konstrukt) inhibeervad kõik analüüsitud uORFid (sealhulgas ka bakteriaalse süsteemi negatiivsed kontrollid, 2903-24tg ja negkEcoli) lutsiferaasi translatsiooni erineva tugevusega. Seejuures erütmütsiin ei avalda lutsiferaasi translatsioonile mingit mõju.

Kuna bakteriaalse süsteemi negatiivsete kontrollide järjestused ei olnud eelnevalt bakteriaalses süsteemis testitud, siis ei ole võimalik prognoosida nende järjestuste poolt avaldavat mõju lutsiferaasi translatsioonile pärmisüsteemis ainult selle alusel, et nende järjestuste poolt kodeeritud peptiidid erinevad bakteriaalses süsteemis funktsioneerivate uORFide peptiididest (1804-46 ja 2903-24). Seega ei ole pärmisüsteemis *LUC* reportergeeni inhibeerimine 2903-24tg ja negkEcoli järjestuste poolt välistatud.

Käesolevas töös selektiivsetes vedelsöötmetes esimese skriinimise käigus isoleeritud uORFid YP16 ja TA09, mis olid võimelised inhibeerima *URA3* geeni translatsiooni, andes neid kandvate pärmirakkudele 5-FOAle resistentsust, on võimelised ka antud süsteemis inhibeerima *LUC* reportergeeni translatsiooni.

Bakteriaalses süsteemis uORFide DNA raamatukogu skriinimisel vanemteadur T. Tensoni töörühma poolt isoleeritud uORFid 1804-46 ja 2903-24, mis inhibeervad reportergeeni

translatsiooni erütromütsiinist sõltuvalt, ei ole funktsionaalsed käesolevas töös kasutatud pärmissüsteemis – uORFid 1804-46 ja 2903-24 inhibeerivad *LUC* reportergeeni translatsiooni, kuid saavutatav inhibitsioon ei ole reguleeritav erütromütsiini poolt.

See, et bakteriaalses süsteemis selekteeritud uORFid ei säilitanud oma funktsionaalsust pärmissüsteemis ei tähenda, et kasutatud pärmissüsteem oleks mittesobilik uORFide DNA raamatukogu skriinimiseks. „Ekspress” projekti alguses ei olnud selge, kas bakteris selekteeritud uORFid säilitavad funktsionaalsust pärmi- või imetajasüsteemis. Kuid toetudes faktile, et ribosoomi aktiivtsentrid on konserveerunud ning kirjanduse andmetele, kus oli näidatud, et regulatoorse peptiidi funktsionaalsus säilib ka teises, väga kauges organismirühmas, arvati, et mingi osa bakteriaalses süsteemis selekteeritud uORFidest säilitavad oma funktsionaalsust ka eukariootsetes süsteemides.

5. Pärmis *S. cerevisiae* geenidest ülesvoolu paiknevate avatud lugemisraamide (uORFide) kaardistamine

Üldise ja mikroobibiokeemia laboris (TÜMRI) plaanitakse uurida uORFide poolt vahendatud geeniregulatsiooni mehhanisme pärmis *S. cerevisiae*. Sellega seoses käesolevas töös teise osana kaardistati *in silico* *S. cerevisiae* geenidest ülesvoolu paiknevad uORFid.

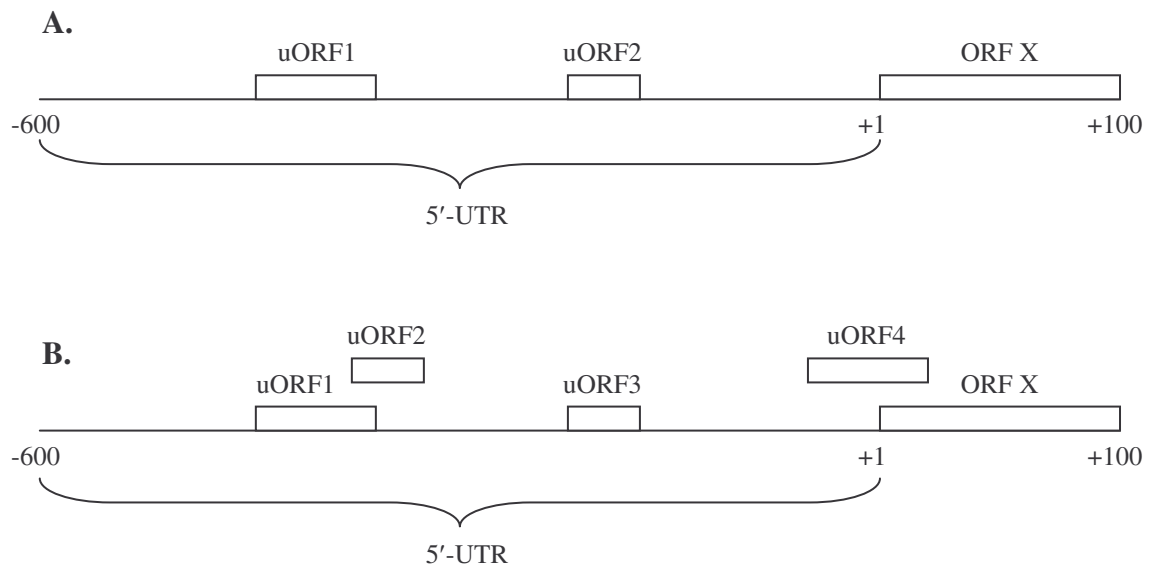
uORFide kaardistamine

Alustati sellega, et Saccharomyces Genome Database (SGD) andmebaasist (<http://www.yeastgenome.org>, Cherry *et al.*, 1997) laaditi alla pärmi *S. cerevisiae* kõikide kromosoomide ja mitokondriaalse genoomi järjestused. SGD_features.tab failist (vt. SGD), kuhu on kogutud informatsioon kõikide annoteeritud *S. cerevisiae* ORFide kohta, sorteeriti välja nii verifitseeritud (*verified*) kui ka iseloomustamata (*uncharacterized*) ORFid. Kokku saadi 5'757 ORFi. Seejuures kahtlased (*dubious*) ORFid jäeti välja.

Iga verifitseeritud ja iseloomustamata ORFi kohta ekstraheeriti pärmi genoomist 700 nt pikkune järjestus, alkoordinaadiga 600 nt ORFist ülesvoolu ja lõppkoordinaadiga 100 nt ORFi algusest allavoolu (vt. Joonis 15A). 5'-UTRide pikkuseks valiti 600 nt sellepärast, et kõige pikemad *S. cerevisiae* eksperimentaalselt määratud uORFe sisaldavad 5'-UTRid on ligikaudu 600-800 nt (vt. Tabel 1). Selleks, et kaardistada põhilugemisraamiga kattuvad uORFid, ekstraheeriti järjestused nii, et nad haaraksid põhilugemisraamist 100 nt.

Seejärel leiti ekstraheeritud järjestustest uORFide alg- ja lõppkoordinaadid põhilugemisraami initsiatsioonikoodoni A nukleotiidi suhtes. Seejuures defineeriti uORF kui

lugemisraam minimaalse pikkusega kolm koodonit, kaasa arvatud initsiatsiooni- ja terminatsioonikoodon. uORFi maksimaalne pikkus oli piiratud ekstraheeritud järjestuste pikkusega (700 nt). uORFid võisid kattuda nii omavahel kui ka põhilugemisraamiga (vt. Joonis 15B).



Joonis 15. Pärsi *S. cerevisiae* genoomist ekstraheeritud järjestuste skeem uORFide kaardistamisel. Põhilugemisraami ORF X initsiatsioonikoodoni A nukleotiid on positsioonis +1, sellest üles- ja allavoolu olevaid nukleotiide tähistatakse vastavalt negatiivsete ja positiivsete täisarvudega. **A.** Põhilugemisraami ORF X 5'-UTR (-600 kuni +1) sisaldab kahte uORFi – uORF1 ja uORF2. **B.** Põhilugemisraami ORF X 5'-UTR (-600 kuni +1) sisaldab nelja uORFi – omavahel kattuvaid uORF1 ja uORF2, uORF3 ja põhilugemisraamiga kattuvat uORF4.

uORFide kaardistamisel kasutatud programmid, mis on toodud veebileheküljel <http://www.hot.ee/polinal6/programmid.txt>, kirjutati Delphi (Object Pascal) programmeerimiskeeles.

Tulemuseks saadi, et kõikide *S. cerevisiae* 5'757 verifitseeritud ja iseloomustamata ORFide korral leiti ekstraheeritud 5'-UTRidest uORFid. Leitud uORFide alg- ja lõppkoordinaadid ning järjestused on toodud veebileheküljel http://www.hot.ee/polinal6/S._cerevisiae_uORFid.txt.

Geenide arv, mis vaadeldud 5'-UTRides sisaldavad uORFe, on üllatavalt suur. Arvati, et *in vivo* mRNA 5'-UTRides funktsionaalseid uORFe kandvate geenide arv on märkimisväärselt väiksem eelkõige sellepärast, et osa kaardistatud uORFidest jääb mRNA 5'-UTRidest ülesvoolu, kuna *S. cerevisiae* mRNA 5'-UTRid on keskmiselt 52 nt pikad (Li and Wang, 2004). Juhul kui kaardistatud uORFid satuvad *S. cerevisiae* mRNA 5'-UTRidesse, ei pruugi nad funktsionaalsed olla, näiteks ebasoodsa initsiatsioonikoodoni konteksti tõttu või sellepärast, et paiknevad liiga lähedal mRNA 5'-otsale.

6. Pärmide *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces castellii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces mikatae* ja *Saccharomyces paradoxus* aminoatsüül-tRNA süntetaaside geenidest ülesvoolu paiknevate avatud lugemisraamide (uORFide) kaardistamine

Peale pärmide *S. cerevisiae* uORFide kaardistamist otsustati keskenduda ühele konkreetsele geenirühmale, milleks valiti aminoatsüül-tRNA süntetaaside geenirühm (vt. Tabel 23). Kõikide *S. cerevisiae* aminoatsüül-tRNA süntetaaside korral leiti 5'-UTRidest uORFid, kuid ei olnud aru saada, kas tegemist on funktsionaalsete uORFidega. Selleks, et seda kindlaks teha, otsustati *in silico* kaardistada aminoatsüül-tRNA süntetaaside geenidest ülesvoolu paiknevad uORFid pärmide *S. cerevisiae* lähedastest liikidest, milleks on *S. bayanus*, *S. castellii*, *S. kluyveri*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* ja *S. paradoxus* ning võrrelda leitud uORFe *S. cerevisiae* aminoatsüül-tRNA süntetaaside omadega. Arvati, et funktsionaalsed uORFid peaksid olema nendes liikides konserveerunud.

Tabel 23. Pärmide *S. cerevisiae* aminoatsüül-tRNA süntetaasid.

Aminohape	Tsütoplasmaatilised aminoatsüül-tRNA süntetaasid	Mitokondriaalsed aminoatsüül-tRNA süntetaasid	Teadmata lokalisatsiooniga aminoatsüül-tRNA süntetaasid
Ala ¹	ALA1	-	
Arg	YDR341C ²	MSR1	
Asn	DED81	SLM5	
Asp	DPS1	MSD1	
Cys	YNL247W	-	
Gln	GLN4	-	
Glu	GUS1	MSE1	
Gly	GRS1, GRS2	GRS1	
His	HTS1	HTS1	
Ile	ILS1	ISM1	
Leu	CDC60	NAM2	
Lys	KRS1	MSK1	
Met	MES1	FMT1, MSM1	
Phe	FRS1, FRS2	MSF1	
Pro			YHR020W
Ser	SES1	DIA4	
Thr	THS1	MST1	
Trp	WRS1	MSW1	
Tyr	TYS1	MSY1	
Val	VAS1	VAS1	

¹ Tabeli esimeses veerus on toodud aminohapped, mida vastav aminoatsüül-tRNA süntetaas seob spetsiifilise tRNA molekuliga. Näiteks, tsütoplasmaatiline aminoatsüül-tRNA süntetaas Ala1 seobalaniini tRNA^{Ala}-ga.

² Osadel *S. cerevisiae* aminoatsüül-tRNA süntetaasidel puudub standardne geeni nimetus ja nende kohta on toodud süstemaatiline geeni nimetus.

uORFide kaardistamine

Kõigepealt laaditi alla Saccharomyces Genome Database (SGD) andmebaasist (<http://www.yeastgenome.org>, Cherry *et al.*, 1997) pärmide *S. bayanus*, *S. castellii*, *S. kluyveri*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* ja *S. paradoxus* kõikide geenide kohta 500 nt pikkused 5'-UTRid. Seejärel sorteeriti allalaaditud järjestustest välja aminoatsüül-tRNA süntetaaside 5'-UTRid. Siin peaks mainima, et pärmile *S. cerevisiae* ülaltoodud lähedaste liikide geenid on SGD andmebaasis annoteeritud analoogiliselt *S. cerevisiae* geenidega.

Aminoatsüül-tRNA süntetaaside 500 nt pikkustest 5'-UTRide järjestustest leiti uORFid analoogiliselt pärmi *S. cerevisiae* uORFide kaardistamisele. Selleks vajalik programm, mis on toodud veebileheküljel <http://www.hot.ee/polina16/programmid.txt>, kirjutati Delphi (Object Pascal) programmeerimiskeeles. Kõigi erinevate aminoatsüül-tRNA süntetaaside kohta leitud uORFide alg- ja lõppkoordinaadid ning järjestused on toodud veebileheküljel http://www.hot.ee/polina16/aa-tRNA_syntetaaside_uORFid.doc.

Kõikide erinevate aminoatsüül-tRNA süntetaaside kaardistatud uORFide järjestusi ja positsioone 5'-UTRis võrreldi käsitsi erinevate pärmi liikide vahel. Tulemuseks saadi, et ühegi aminoatsüül-tRNA süntetaasi korral leitud uORFid ei olnud vaadeldud liikides konserveerunud. Need on aga esialgsed tulemused, kuna jõuti võrrelda vaid uORFide nukleotiidseid järjestusi. Tulevikus plaanitakse joondada leitud uORFide aminohappelised järjestused. Seega saadud tulemuste põhjal ei ole veel võimalik järeldada, kas tegemist on *S. cerevisiae* aminoatsüül-tRNA süntetaaside funktsionaalsete uORFidega.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärkideks oli 1) konstrueerida ja skriinida uORFide DNA raamatukogu selleks, et leida uORFe, mis võimaldaksid erütromütsiini poolt reguleeritava geeniekspressioonisüsteemi loomist pärmis *S. cerevisiae*; 2) kontrollida pärmisüsteemis vanemteadur T. Tensoni tööühma (TÜTI) poolt isoleeritud bakteriaalses süsteemis funktsioneerivad uORFid; 3) kaardistada pärmis *S. cerevisiae* geenide 5'-UTRides paiknevad uORFid selleks, et tulevikus uurida uORFide poolt vahendatud geeniregulatsiooni mehhanisme.

Antud töö kirjanduslikus osas anti ülevaade pärmis *S. cerevisiae* 5'-UTRides sisalduvate uORFide struktuursetest omadustest, kirjeldati mitme uORFi koosfunktsioneerimist *S. cerevisiae* transkriptsioonifaktori *GCN4* ekspressiooni regulatsioonil ja anti ülevaade „Ekspress” projektist, mille eesmärgiks on luua uudsed, makroliidide poolt paindlikult reguleeritavad ja ohutud geeniekspressioonisüsteemid kasutamiseks geenide ekspresseerimisel, geeniteraapias ja -vaktsiinides.

Eksperimentaalse töö tulemused olid järgmised:

1) Eksperimentaalse töö käigus ei õnnestunud isoleerida erütromütsiini poolt reguleeritavaid uORFe: selektiivsetes vedelsöötmetes uORFide DNA raamatukogu skriinimise tulemusena isoleeriti 17 erinevat peptiidi kodeerivat uORFi, mis olid võimelised inhibeerima *URA3* markergeeni translatsiooni, kuid seejuures *URA3* geeni translatsiooni inhibitsioon ei olnud reguleeritav erütromütsiini poolt; ka selektiivsetes tardsöötmetes uORFide DNA raamatukogu skriinimise tulemusena ei õnnestunud detekteerida ühtegi erütromütsiini poolt reguleeritava geeniekspressioonisüsteemi kandvat pärmikolooniat.

2) Bakteriaalses süsteemis uORFide DNA raamatukogu skriinimise tulemusena isoleeritud funktsionaalsete uORFide testimine pärmisüsteemis näitas, et bakteriaalses süsteemis selekteeritud uORFid ei ole funktsionaalsed käesolevas töös kasutatud pärmisüsteemis.

3) Pärmis *S. cerevisiae* 600 nt pikkustes 5'-UTRides sisalduvate uORFide *in silico* kaardistamisel kõikide *S. cerevisiae* 5'757 verifitseeritud ja iseloomustamata ORFide korral leiti vaadeldud 5'-UTRidest uORFid.

SUMMARY

Continuing discoveries of new and surprising mechanisms of gene regulation suggest that our understanding of this complex and ubiquitous process is so far incomplete. Emerging examples illustrate that many and perhaps all genes are regulated at multiple steps including transcription, posttranscriptional processing, nuclear export and localization, stability, and translation of mature mRNA molecules. Among the various *cis* elements in mRNAs that participate in regulating translation associated upstream open reading frames (uORFs) are found.

Some of the general principles by which uORFs participate in translational control are beginning to be understood. In this study, giving examples from yeast *S. cerevisiae* we first review these principles, which include the process of recognition of uORFs, regulation of reinitiation at downstream cistrons after translation of uORFs, and regulatory effects of peptides encoded by uORFs. We then review how the translational control of yeast transcription factor *GCN4* gene is mediated through the interaction of four small uORFs within *GCN4* mRNA leader. We also review the main topics of the „Ekspress” project that aims to develop new gene expression systems that can be regulated by the macrolide antibiotics. Such a regulation is based on the interaction with the ribosome of both small nascent peptides encoded by uORFs and macrolides.

Within the „Ekspress” project we constructed and tested a yeast selection system for selecting uORFs that repress the reporter gene expression dependent on erythromycin. Surprisingly we isolated several uORFs that could indeed repress the reporter gene translation, but this repression was erythromycin-independent. In this study we also checked several functional uORFs that were isolated in bacterial selection system by other researches for function in yeast system. All checked uORFs were unable to repress the reporter gene expression dependent on erythromycin in the yeast system.

Since we are interested in gene regulation mechanisms mediated by uORFs in yeast, we also *in silico* mapped start and stop codon positions for all uORFs in the 600 nt long 5'-untranslated regions of genes in *S. cerevisiae*.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Alvarez-Elcoro, S. and Enzler, M.J.** (1999) The macrolides: erythromycin, clarithromycin and azithromycin. *Mayo Clin. Proc.*, **74**, 613-634.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.** (1995) Short protocols in molecular biology. 3-d edition, John Wiley & Sons, Inc..
- Boeke, J.D., LaCroute, F. and Fink, G.R.** (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.*, **197**, 345-346.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brown, P.A. and Szostac, J.W.** (1983) Yeast vectors with negative selection. *Methods Enzymol.*, **101**, 278-290.
- Cherry, J.M., Ball, C., Weng, S., Juvic, G., Schmidt, R., Adler, C., Dunn, B., Dwight, S., Riles, L., Mortimer, R.K. and Botstein, D.** (1997) Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **387**, 67-73.
- Fang, P., Spevak, C.C., Wu, C. and Sachs, M.S.** (2004) A nascent polypeptide domain that can regulate translation elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4059-4064.
- Fux, C., Weber, W., Daoud-el Baba, M., Heinzen, C., Aubel, D. and Fussenegger, M.** (2003) Novel macrolide-adjustable bidirectional expression modules for coordinated expression of two different transgenes in mice. *Gene Med.*, **5**, 1067-1079.
- Gaba, A., Wang, Z., Krishnamoorthy, T., Hinnebusch, A.G. and Sachs, M.S.** (2001) Physical evidence for distinct mechanisms of translational control by upstream open reading frames. *EMBO J.*, **20**, 6453-6463.
- Grant, C.M. and Hinnebusch, A.G.** (1994) Effect of sequence context at stop codons on efficiency of reinitiation in *GCN4* translational control. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 606-618.
- Hamilton, R., Watanabe, C.K. and De Boer, H.A.** (1987) Compilation and comparison of the sequence context around the AUG startcodons in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 3581-3593.
- Hannahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Hansen, J.L., Ippolito, J.A., Ban, N., Nissen, P., Moore, P.B. and Steitz, T.A.** (2002) The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Molecular Cell*, **10**, 117-128.
- Hinnebusch, A.G.** (1996) Translational control of *GCN4*: gene-specific regulation by phosphorylation of eIF2. In Hershey, J.W.B., Mathews, M.B. and Sonenberg, N. (ed.), Translational control. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Hinnebusch, A.G.** (1997) Translational regulation of yeast *GCN4*. A window on factors that control initiator-tRNA binding to the ribosome. *J. Biol. Chem.*, **272**, 21661-21664.
- Koller, D., Ruedl, C., Loetscher, M., Vlach, J., Oehen, S., Oertle, K., Schirinzi, M., Deneuve, E., Moser, R., Kopf, M., Bailey, J.E., Renner, W. and Bachmann, M.F.** (2001) A high-throughput alphavirus-based expression cloning system for mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 851-855.
- Kozak, M.** (1987) Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 3438-3445.
- Kozak, M.** (1991a) An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.*, **115**, 887-903.
- Kozak, M.** (1991b) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.*, **266**, 19867-19870.
- Kozak, M.** (2001) Constraints on reinitiation of translation in mammals. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 5226-5232.
- Li, L. and Wang, C.C.** (2004) Capped mRNA with a single nucleotide leader is optimally translated in a primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 14656-14664.
- McCarthy, J.E.** (1998) Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 1492-1553.
- Merrick, W.C. and Heshey, J.W.B.** (1996) In Hershey, J.W.B., Mathews, M.B. and Sonenberg, N. (ed.), Translational control. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miller, J.H.** (1992) A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miyasaka, H.** (1999) The positive relationship between codon usage bias and translation initiation AUG context in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 633-637.
- Miyawaki, A., Sawano, A. and Kogure, T.** (2003) Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores. *Nat. Cell Biol.*, Suppl., S1-7.
- Mol, J.N., Borst, P., Grosveld, F.G. and Spencer, J.H.** (1974) The size of the repeating unit of the repetitive mitochondrial DNA from a „low-density” petite mutants of yeast. *Biochim. Biophys. Acta.*, **374**, 115-128.
- Moore, P.B. and Steitz, T.A.** (2002) The involvement of RNA in ribosome function. *Nature*, **418**, 229-235.
- Morris, D.R.** (1997) *cis*-acting mRNA structures in gene-specific translation control. In Harford, J.B. and Morris, D.R. (ed.), RNA metabolism and post-transcriptional gene regulation. Wiley-Liss, Inc., New York.
- Morris, D.R. and Geballe, A.P.** (2000) Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 8635-8642.

Pestka, S. (1977) Inhibitors of protein synthesis. Molecular mechanisms of protein biosynthesis, 467-553. New York, San Francisco, London: Academic Press.

Rajkowitsch, L., Vilela, C., Velasco Ramirez, K.B.C. and McCarthy, J.E.G. (2004) Reinitiation and recycling are distinct processes occurring downstream of translation termination in yeast. *J. Mol. Biol.*, **335**, 71-85.

Rose, M.D., Winston, F. and Hieter, P. (1990) Methods in yeast genetics: a laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Rothstein, R. (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.*, **101**, 202-209.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2-nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Tenson, T. and Ehrenberg, M. (2002) Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel. *Cell*, **108**, 591-594.

Tenson, T. and Mankin, A. (2001) Short peptides conferring resistance to macrolide antibiotics. *Peptides*, **22**, 1661-1668.

Tenson, T., Lovmar, M. and Ehrenberg, M. (2003) The mechanisms of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J. Mol. Biol.*, **330**, 1005-1014.

Turner, D.H. and Sugimoto, N. (1988) RNA structure prediction. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **17**, 167-192.

Vega Laso, M.R., Zhu, D., Sagliocco, F., Brown, A.J.P., Tuite, M.F. and McCarthy, J.E.G. (1993) Inhibition of translation initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a function of the stability and position of hairpin structures in the mRNA leader. *J. Biol. Chem.*, **268**, 6453-6462.

Vilela, C. and McCarthy, J.E.G. (2003) Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5'untranslated region. *Molecular Microbiology*, **49**, 859-867.

Vilela, C., Linz, B., Rodrigues-Pousada, C. and McCarthy, J.E.G. (1998) The yeast transcription factor genes YAP1 and YAP2 are subject to differential control at the levels of both translation and mRNA stability. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1150-1159.

Vilela, C., Ramirez, C.V., Linz, B., Rodrigues-Pousada, C. and McCarthy, J.E.G. (1999) Post-termination ribosome interactions with the 5'UTR modulate yeast mRNA stability. *EMBO J.*, **18**, 3139-3152.

Weber, W., Fux, C., Daoud-el Baba, M., Keller, B., Weber, C.C., Kramer, B.P., Heinzen, C., Aubel, D., Bailey, J.E. and Fussenegger, M. (2002) Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nature Biotechnology*, **20**, 901-907.

Weisblum, B. (1995) Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 797-805.

Werner, M., Feller, A., Messenguy, F. and Pierard, A. (1987) The leader peptide of yeast gene CPA1 is essential for the translational repression of its expression. *Cell*, **49**, 805-813.