

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOGIA INSTITUUT

Toomas-Julius Lill

**Proteiinkinaasi CK2 α ja punase fluorestseeruva valgu TagRFP
aktiivse liitvalgu tootmine bakterirakkudes**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: MSc. Ganesh babu Manoharan

PhD. Asko Uri

Tartu 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1 Proteiinkinaaside üldisloomustus.....	5
1.2 Proteiinkinaasi CK2 üldisloomustus.....	6
1.2.1 CK2 struktuur.....	7
1.2.2 CK2 valksubstraadid ja funktsioon	7
1.2.3 CK2 inhibiitorid	9
1.3 Fotoluminestsentsi mõõtmisel põhinevad analüüsimeetodid.....	10
1.3.1 Fluorestsentsi anisotroopiaal põhinevad analüüsimeetodid.....	11
1.3.2 Fösteri resonantsenergia ülekandel põhinevad analüüsimeetodid	12
1.4 Punane fluorestseeruv valk TagRFP	12
1.5 Inimese rekombinantsete valkude ekspresseerimine bakterirakkudes.....	14
2. EKSPERIMENTAALOSA	16
2.1 Töö eesmärk.....	16
2.2 Materjal ja meetodika	16
2.2.1 Kloneerimine.....	16
2.2.2 HisCK2 α RFP ekspresseerimine	18
2.2.3 Valgu analüüs.....	19
2.2.4 Fotoluminestsentsi mõõtmised	20
2.3 Tulemused ja arutelu.....	22
2.3.1 Plasmidi pET-HisCK2 α RFP kloneerimine	22
2.3.2 HisCK2 α RFP ekspressioon.....	24
2.3.3 Fluorestseeruva valgu kontsentratsiooni määramine	26
2.3.4 Biokeemilised testid	27
KOKKUVÕTE	29
SUMMARY	30
KIRJANDUSE LOETELU.....	31
LIHTLITSENTS.....	35

KASUTATUD LÜHENDID

AH – Aminohape

bp – Aluspaar (inglise keeles *basepair*)

BSA – Veise vereseerumi albumiin (i. k. *Bovine serum albumin*)

FA – Fluorestsentsi anisotroopia

FI – Fluorestsentsi intensiivsus

FP – Fluorestseeruv valk (i. k. *Fluorecent protein*)

FRET – Fösteri resonantsenergia ülekanne (i. k. *Föste resonance energi transfer*)

IPTG – *isopropüül-β-D-tiogalaktopüranosiid*

MCS – Kordne kloonimissait (i. k. *Multiple cloning site*)

MW – Molekulmass (i. k. *Molecular weight*)

PBS - Fosfaatpuhver

PF674 – *PromoFluor674*

PK – Proteiinkinaas

T7 RNAP – T7 RNA polümeraas

SISSEJUHATUS

Inimorganismis toimuvate protsesside seletamine on üks bioteaduste põhilistest probleemidest. Uurimismeetodite arenedes on jõutud järel dusteni, et eluslooduses on geneetilise koodi realiseerumise mehhanismis kesksel kohal valgud. Seepärast pannakse erinevates teadusharudes suurt rõhku just valkude uurimisele.

Proteiinkinaasid on ensümaatilised valgud, mis katalüüsivad biokeemilisi reaktsioone, mille käigus kantakse fosfaatrühm nukleotiidtrifosfaadilt mõne kindla aktseptorvalgu koosseisu. Sellise fosfaatrühma ülekandumise tagajärjel võivad toimuda erinevad muutused sihtmärkvalgu konformatsioonis, mille tulemusena käivituvad edasised spetsiifilised reaktsioonide kaskaadid.

CK2 on proteiinkinaas, mida leidub inimorganismi kõikides rakkudes ning millel on väga palju substraatvalke. CK2 üheks eriliseks omaduseks on selle katalüütiline aktiivsus nii holoensüümina kui ka vaba katalüütilise CK2 α alaühikuna. Erinevat tüüpi vähkkasvajate rakkudes on täheldatud CK2 kõrgeenenud aktiivsust. Seetõttu on CK2 potentsiaalseks sihtmärgiks ravimiarenduses.

Eukarüootsete organismide valkude uurimiseks on neid vaja toota suurtes kogustes, mida on otstarbekas teha bakterites. Teadusuuringutes on näidatud, et geenitehnoloogiliste võtete abil saab panna baktereid tootma rekombinantseid valke ja liitvalke, mille struktuur on edasiste uuringute lihtustamiseks modifitseeritud. Sellise modifitseerimise näiteks on liitvalgu osana fluorestseeruvate valkude kasutamine, mis võimaldab valkude seondumist hinnata mõõtes spektraalomaduste muutuseid.

Käesoleva töö eesmärgiks on toota aktiivset liitvalku, mis koosneks inimese proteiinkinaas CK2 katalüütilisest subühikust CK2 α ja punasest fluorestseeruvast valgust TagRFP ning millel oleks valgu edasise puhastamise lihtsustamise eesmärgil heksahistidiini märgis.

Bakalaureusetöö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi geenitehnoloogia õppekava raames, eksperimentaalne osa on läbi viidud Tartu Ülikooli keemia instituudi meditsiinilise keemia uurimisrühmas.

Märksõnad: Proteiinkinaas CK2 α , Punane fluorestseeruv valk TagRFP, FRET, Liitvalk.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Proteiinkinaaside üldiseloostus

Proteiinkinaasid (PK) on valgulised ensüümid, mis katalüüsivad kõrge energiatasemega γ -fosfaatrühma ülekannet doonormolekuli (enamasti ATP) koosseisust mingi kindla aktseptorvalgu aminohappe (AH) seriini, treoniini või türosiini jäägi hüdroksüülrühmale. Selline fosfaatrühma ülekanne kutsub esile muutuseid aktseptori aktiivsuses, lokaliseerimises ja/või interaktsioonides teiste valkudega (Schwartz ja Murray, 2011). Kirjeldatud fosfaatrühma ülekannet nimetatakse fosforüülimiseks ning see on rakkudes üks peamistest valkude translatsioonijärgse modifitseerimise meetoditest.

Inimese proteoomi uurides on sellest leitud üle 500000 potentsiaalse fosforüülimissaidi. 7000 seni uuritud valgu puhul on näidatud 25000 fosforüülimissaiti ning nende arv kasvab pidevalt (Lemmer ja Heck, 2009). Fosforüülimissaidis asuvad kesksed AH-d on ebasümeetriliselt jaotunud: 85 % juhtudest on fosforüülitavaks AH jäägiks seriin, 11,8 % juhtudest treoniin ja 1,8 % juhtude puhul türosiin (Olsen *et al.*, 2006). Praeguseks on teada 538 inimgenoomis kodeeritud PK-d, millest kokku vaid 90 fosforüülivad türosiini. Ülejäänud teadaolevatest PK-dest fosforüülivad seriini ja/või treoniini jääke või on võimelised kasutama fosforüülimissaitidena kõiki kolme nimetatud aminohappe jääkidest (Schwartz ja Murray, 2011; Dhanasekaran ja Reddy, 1998).

Proteiinkinaasid jaotuvad omavahelise sarnasuse alusel kaheksasse rühma: AGC, CAMK, CK1, CMGC, RGC, STE, TK ja TKL.

AGC rühma PK-d on enamasti seriin/treoniinkinaasid mille substraatvalgu fosforüülimissaidi läheduses leidub aluselisi AH jääke. Paljud AGC rühma kinaasid vajavad sekundaarse virgatsaine poolset aktiveerimist (Zhu *et al.*, 2005).

CAMK rühma kuuluvad kaltsium/kalmoduliin-sõltuvad kinaasid ning sarnaselt AGC rühma kinaasidele fosforüülivad valke, mille seondumissaidi ümbrus on aluseline (Klimecka ja Muszyska, 2007).

CK1 rühma PK-d on seriin/treoniin spetsiifilised ning nende sihtmärkvalkudel leidub seondumissaidi läheduses happelisi AH jääke (Knippschild *et al.*, 2005).

CMGC rühma kuulub suur hulk raku metabolismi ja geeniekspressiooni jaoks võtmetähtsusega seriin/treoniinkinaase (Biondi ja Nebreda, 2003).

RGC rühma PK-d on sarnased TK rühma kinaasidega, kuid erinevad neist autokatalüütilise seriini fosforüülimise poolest (Aparicio ja Applebury, 1996).

STE rühma kuuluvad mitogeen-aktiveeritavad kinaasid, mis osalevad rakutsükli regulatsioonis (Zhu *et al.*, 2005).

TK rühma kinaasid fosforüülivad AH jääki türosiini (Tibes *et al.*, 2005).

TKL rühma kinaasid sarnanevad järjestuselt ja konformatsioonilt TK kinaasidega, kuid on oma olemuselt seriin/treoniinkinaasid (Scharpfenecker *et al.*, 2007).

Proteiinkinaaside katalüüsitud fosforüülimiskaskaadidega on reguleeritud suur hulk organismis toimuvatest protsessidest, seega viivad kõrvalekalded normaalsest PK-de aktiivsusest häireteni organismi talitluses. Inimese PK-de aktiivsuse muutumisega on seostatud rohkem kui 400 haigust, nende hulgas erinevat tüüpi pahaloomulused kasvajakasvud, diabeet, HIV, Alzheimeri tõbi, malaaria ja hüpertoonia. Sellest tulenevalt on PK-d oluliseks ravimiarenduse sihtmärgiks (Vaasa *et al.*, 2008). Ameerika Ühendriikides on viimase 15 aasta jooksul 28 erinevat madalmolekulaarset PK inhibiitorit (ühend, mis seostub ensüümiga ja vähendab seeläbi ensüümi aktiivsust) saanud kohaliku ravimiameti heakskiidu kliiniliseks kasutuseks. Veel 400 uut PK inhibiitorit on jõudnud kliiniliste katsetuste faasi (Manoharan *et al.*, 2015). PK-de suur mitmekesisus, lai spetsiifika ja aina kasvav tähtsus potentsiaalse ravimiarenduse sihtmärgina teeb nende edasise uurimise perspektiivikaks.

1.2 Proteiinkinaasi CK2 üldisloomustus

Proteiinkinaas CK2 on püsivalt aktiivne ensüüm, mida leidub kõigis eukarüootsetes rakkudes nii tuumas kui ka tsütoplasmas (Kramerov ja Ljubimov, 2012). CK2 on organismis laialdaselt ekspresseeritud seriin/treoniinkinaas (samas on näidatud ka türosiini fosforüülimist), mille teeb eriliseks omadus kasutada fosfaatrühma doonorina ATP kõrval ka GTP-d (Allende J.E. ja Allende C.C., 1995). Erinevat tüüpi vähkkasvajate rakkudes on täheldatud CK2 kõrge aktiivsust. Seetõttu on CK2 potentsiaalseks sihtmärgiks ravimiarenduses (Litchfield, 2003).

1.2.1 CK2 struktuur

Rakus on CK2 harilikult holoensüümina – hetero-tetrameerina, mis koosneb neljast alaühikust, millest kaks on regulatoorsed [CK2 β (25 kDa)] ja kaks katalüütilised [CK2 α (42-44 kDa) ja/või CK2 α' (38 kDa)]. Inimese CK2 katalüütilised subühikud α ja α' on individuaalsete geenide produktid, mis on N-otstes (AH-d 1-330) üle 90 % homoloogilised, kuid erinevad C-otsa poolest. Katsetes hiirtega, kus üks kahest regulatiivset subühikut (α või α') on geneetiliselt välja lülitatud, on näidatud, et katalüütilised subühikud on võimelised osaliselt üksteise funktsioone asendama, mis tuleneb nende ulatuslikust homoloogiast (Litchfield, 2003).

Regulatoorne CK2 β subühik, mis ei oma homoloogiat ühegi PK katalüütilise subühikuga, kontrollib holoensüümi aktiivsust mitmel tasandil. CK2 hetero-tetrameeri korrektseks tekkimiseks on kõigepealt vajalik kahe CK2 β subühiku vahelise homodimeeri moodustumine – alles siis inkorporeeritakse CK2 hetero-tetrameeri koosseisu katalüütilised subühikud. Samuti on näidatud, et CK2 β subühik mõjutab ensüümi ja substraadi vahelise interaktsiooni omadusi (Kramerov ja Ljubimov, 2010).

Lisaks holoensüümile omab iseseisvat katalüütilist aktiivsust ka vaba CK2 α , kuid selle substraatspetsiifilisus võib olla holoensüümiga võrreldes mõnevõrra erinev (Enkvist *et al.*, 2012). Ka stabiliseerib holoensüümi konformatsioon CK2 α ning seeläbi on holoensüümi katalüütiline aktiivsus kõrgem, kui vaba α subühiku oma (Meggio *et al.*, 1992).

Vaatamata kristallstruktuuri andmetele vaba CK2 α subühiku, CK2 holoensüümi ja ka nende mõlema seondumise kohta ATP-konkurentsete inhibiitoritega, pole õnnestunud saada lõpliku selgust kompleksi CK2 α /substraat kristallstruktuuri kohta. Seetõttu pole ka kindlaks määratud CK2 katalüütilises reaktsioonis osalevate AH jääkide täpne 3-D positsioon (Enkvist *et al.*, 2012). Vaatamata sellele on teada, et CK2 katalüütiline subühik omab kaht eraldi substraadi seondumissaiti, millest ühte seondub fosforüülrühma doonor (tavaliselt ATP), teise fosfaatrühma aktseptoriks olev substraatvõrk (Niefind ja Battistutta, 2013).

1.2.2 CK2 valksubstraadid ja funktsioon

CK2 katalüüsitud fosforüülimismärklauaks on AH jääk seriin, treoniin või harva ka türosiin. Kõikides teadaolevates CK2 märklaudsaitides on fosforüülitava AH jäägi ümbruses happelise kõrvalahelaga AH jäägid (tavaliselt rohkem kui viis happelist AH jääki). Kõige olulisemaks loetakse äratundmisjärjestuses positsiooni n+3, kus 90 % juhtudest leidub happeline AH jääk ka juhul, kui see on antud äratundmisjärjestuse ainus happeline AH jääk.

Äratundmisjärjestuses loetakse tähtsusele teiseks positsiooni n+1, kus 75 % juhtudest leidub happeline AH jääk. Kui positsioonis n+3 ei ole happelist jääki, leidub see positsioonis n+1 ja vastupidi. Valgud, mis on CK2 fosforüülimissihtmärkideks, omavad enamasti järgmist 6 AH jäägi pikkust motiivi:

(Glu/Asp/X)-(Ser/Thr/Tyr)-(Glu/Asp/X')-(Glu/Asp/X)-(Glu/Asp)-(Glu/Asp/X)

Motiivi positsioon 2 (Ser/Thr/Tyr) on fosfaatrühma aktseptoriks; X võib olla ükskõik mis AH jääk mis ei ole aluseline; X' välistab selles positsioonis lisaks aluselistele AH jääkidele ka proliini (Pinna, 2002). Selle äratundmismotiivi kirjeldamine on viinud paljude CK2 sihtmärkide avastamiseni, kuid samuti on leitud AH jääke, mida CK2 fosforüülib, ent mis ei vasta eelpool kirjeldatud konsensusjärjestusele, näiteks tuumori supressorfaktor p53 seriin³⁹² (Litchfield 2003).

Katsetes imetaja rakkudega, kasutades CK2 alaühikute spetsiifilisi antisens oligonukleotiide, CK2 antikehi ja CK2 inhibiitoreid, on näidatud CK2 funktsioneerimist rakutsükli faaside G0/G1, G1/S ja G2/M ülemineku vahendajana (St-Denis ja Litchfield, 2009).

Rakkude apoptoosi ja CK2 vaheliste seoste uurimisest on ilmnenu, et rakud, milles on normaalsest kõrgem CK2 ekspressioon, on paremini kaitstud apoptoosi esile kutsuvate ravimite eest. Nende katsetega on jõutud arvamusele, et CK2 osaleb nii retseptor-vahendatud kui ka DNA kahjustuste tõttu esilekutsutud rakusiseste apoptootiliste signaalide vahendamises. Katsetega on näidatud, et CK2 inhibeerimine muudab vähkasvaja rakke tundlikuks mõlema eelpool mainitud apoptoositüübi suhtes. Samuti on näidatud, et CK2 inhibeerimine suurendab NK-tapjarakkude võimet hävitada vähkasvaja rakke, tõstes veelgi rohkem esile CK2 inhibeerimise uurimise potentsiaali seoses vähiraviga. (St-Denis ja Litchfield, 2009).

Eukarüootsete rakkude RNA transkriptsiooni mõjutamine on samuti CK2 oluliseks funktsiooniks, seda läbi RNA polümeraaside I, II ja III aktiivsuse otsese reguleerimise. Nende polümeraaside aktiivsuse mõjutamismehhanismis CK2 poolt on palju sarnasusi, mis viitab CK2 funktsioonile rakus üldise transkriptsiooni regulaatorina (Panova *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006; Cabrejos *et al.*, 2004; Johnston *et al.*, 2002).

Mitmed viirused, nagu Epstein-Barri viirus, Herpes simplex viirus, HI-viirus jpt. on adapteerunud kasutama CK2 fosfaatrühma ülekandjana nende viiruste elutsükliks vajalikele valkudele fosforüülimisel. Selle teeb võimalikuks CK2 konstitutiivne ehk pidev aktiivsus.

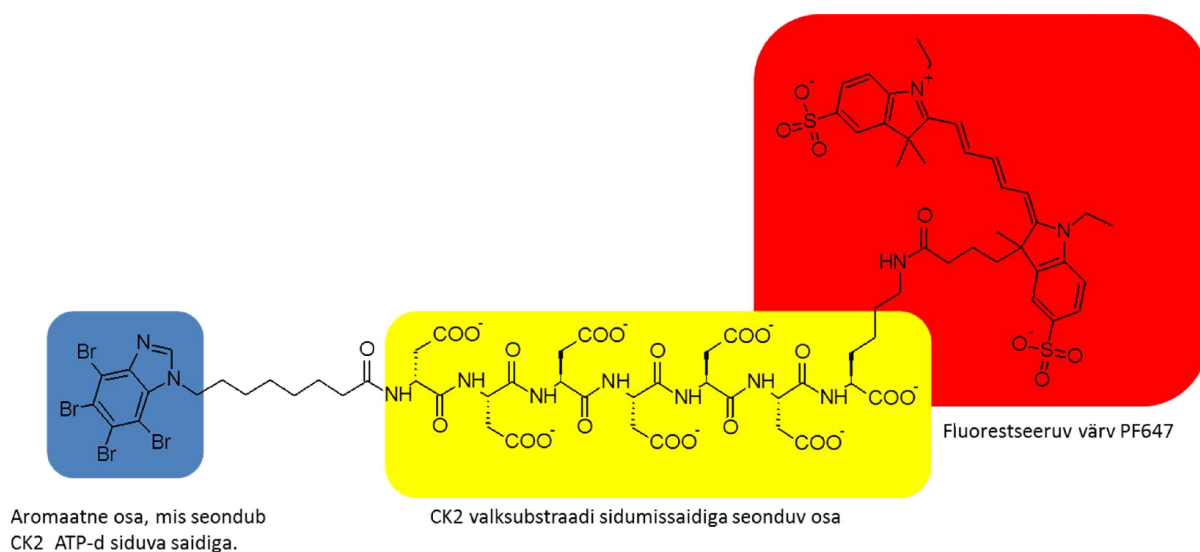
Loetletud on üle 40 viirusliku valgu, mis kasutavad fosforüülumiseks CK2-e (St-Denis ja Litchfield, 2009).

1.2.3 CK2 inhibiitorid

PK-de inhibeerimist terapeutilistel eesmärkidel hakati uurima juba 1980. aastate lõpul Baselis, kui firmas *Novartis* hakati tegelema seda tüüpi ensüümide aktiivsust inhibeerivate molekulide identifitseerimisega. Kuigi inimeste genoomist kodeerib PK-se vähem kui 2%, on need valgud hetkel potentsiaalsete vähiravimi sihtmärkidena ühed tähtsamatest. 20-30% ravimifirmades käimasolevatest projektidest on seadnud eesmärgiks töötada välja mõne PK-d, sealhulgas ka CK2, inhibeeriva ühendi (Bozulic *et al.*, 2007). CK2 inhibiitoreid saab jagada rühmadesse vastavalt toimemehhanismile.

- 1) ATP-konkurentsed inhibiitorid. Selliste inhibiitorite nõrkuseks on madal selektiivsus, mis on tingitud asjaolust, et erinevate ATP-siduvate valkude vastavad saidid on kõrgelt konserveerunud. Samuti on selliste inhibiitorite töötamise takistuseks kõrge rakusisene ATP kontsentratsioon (1-10 mM) – ATP konkureerib inhibiitoriga sihtmärkvalgu seondumissaidis. Sellele vaatamata on mitmed sellisel inhibitsiooni mehhanismil baseeruvad ühendid ravimiarenduses kliiniliste katsetuste faasis (Niefind ja Battistutta, 2013). Eduka näitena võib tuua välja CK2 ATP-konkurentse inhibiitori CX-4945, mida on katsetatud vähiravimina (Kim J. ja Kim SH., 2012).
- 2) Mitte-ATP-konkurentsed inhibiitorid. Siia rühma kuuluvad inhibiitorid, mis ei seonu kinaasi ATP saidiga, kuid suudavad siiski ensüümi katalüütilist aktiivsust vähendada. Mitte-ATP-konkurentsetel inhibiitorel on kaks peamist toimemehhanismi:
 - a. Allosteeriline toime, mis takistab CK2 korrektset funktsioneerimist (Adrian *et al.*, 2006).
 - b. Molekulidevahelistel, peamiselt valk-valk interaktsioonidel baseeruv toime, kus inhibiitor seondub otse CK2 valksubstraadi seondumissaiti, takistades nii õige CK2 märklaudvalguga seondumist (Bogoyevitch *et al.*, 2005).Seda tüüpi inhibiitorite eeliseks ATP-konkurentsete ees on kõrgem selektiivsus (ATP-seondumissaitide välised alad on erinevatel valkudel vähem konserveerunud) ja asjaolu, et need ei pea konkureerima seandumisel ATP-ga (millel on rakus kõrge kontsentratsioon). Seetõttu saab neid efektiivselt kasutada madalamatel kontsentratsioonidel (Niefind ja Battistutta, 2013).
- 3) Bisubstraatsed inhibiitorid. Selle rühma ühendid koosnevad kahest konjugeeritud inhibeerivast osast, millest üks seondub kinaasi ATP saidiga ja teine sama kinaasi

valksubstraadi saidiga. Selliste bisubstraatsete inhibiitorite eeliseks on väga kõrge (pikomolaarne) affiinsus substraadi suhtes ning vastupidavus struktuursetele modifikatsioonidele (näiteks kõrvalahelate lisamine või immobiliseerimine) sihtmärgi suhtes affiinsust kaotamata. See omadus teeb võimalikuks kirjeldatud bisubstraatsete inhibiitorite baasil erinevate fluorestseeruvate sondide, adsorbentide ja biosensorite valmistamise (Enkvist *et al.*, 2012). Üheks näiteks võib tuua Tartu Ülikooli keemia instituudi meditsiinilise keemia uurimisrühmas sünteesitud fluorestsseeruva värviga PromoFluor647 (PF647) märgistatud CK2 spetsiifilist sondi ARC-1504 (Joonis 1).



Joonis 1: CK2 spetsiifiline sond ARC-1504, mis on märgistatud fluorestseeruva värviga PF647 [Ergastusspektri maksimum λ 654 nm, Emissioonispektri maksimum λ 672 nm] (Enkvist *et al.*, 2012).

1.3 Fotoluminestsentsi mõõtmisel põhinevad analüüsimeetodid

Fotoluminestsentsi mõõtmisel põhinevad analüüsimeetodid on laialdaselt kasutusel iseloomustamiseks ühendite struktuuri, neid ümbritsevat keskkonda, nende interaktsioone valkudega, ühendite lokaliseerimise rakkudes ning kudedes jne. Spektrofotomeetrite areng on teinud tulemuste saamise üha kiiremaks ja usaldusväärsemaks.

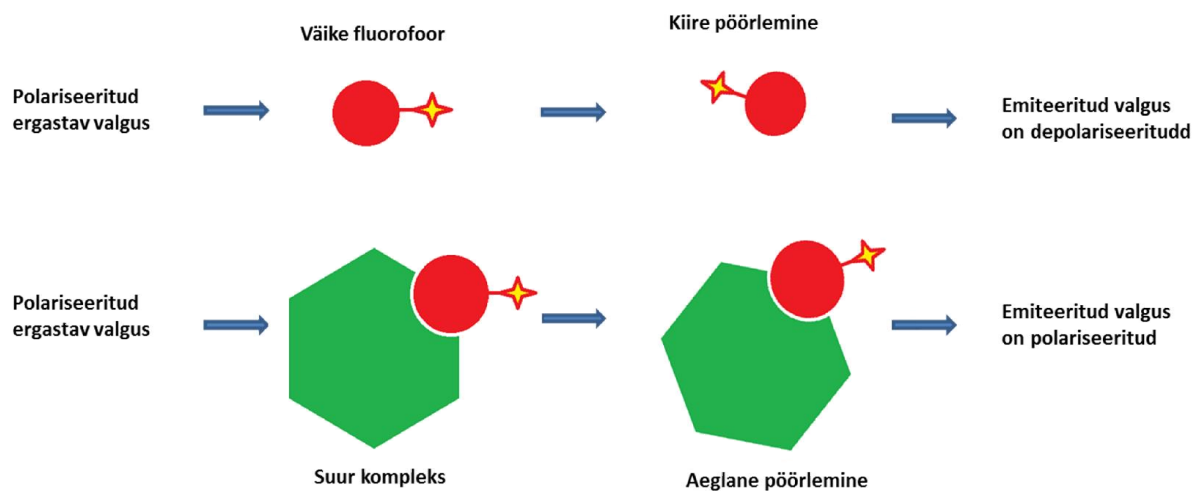
Fluorestsents, fotoluminestsentsi üks tüüpidest, on nähtus, kus mingi ühend või süsteem neelab valgust ühel lainepikkusel ning emitteerib seda teisel, harilikult pikemal lainepikkusel. Fluorestsents toimub harilikult nanosekundite jooksul. Fluorestsseeruva molekuli ergastamisel valgusega lähevad selle elektronid põhielekust kõrgema energiaga ergastatud olekusse (fotonid neelduvad). Seejärel liiguvad elektronid võnkerelaksatsiooni või sisekonversiooni

tulemusel madalamale ergastatud vibratsioonilisele tasemele, mille käigus kaotab molekul soojusenergiat. Edasine kiirguslik üleminek madalamalt ergastatud vibratsiooniliselt tasemelt tagasi põhiolekusse põhjustab footoni eraldumise, mida nimetataksegi fluorestsentsiks. Elektronide vahepealse kõrgematelt madalamatele ergastatud energiatasemetele liikumise tõttu toimub energia kadu soojusena, mille tõttu on eraldunud foton madalama energiaga, st. emiteeritud valgus on pikema lainepikkusega. Seda neelduvate ja emiteeritavate energiatega ja lainepikkuste erinevust nimetatakse Stokesi nihkeks ning see on oluline faktor fluorofooride valikul analüüsimeetodites (Lakowicz, 2006).

Fluorofooride tähtsateks omadusteks on ka kvantsaagis ja fluorestsentsi eluiga. Kvantsaagis iseloomustab fluorofoori fluorestsentsprotsessi efektiivsust ning on kirjeldatud kui neeldunud ja kiiratud footonite suhe. Fluorestsentsi eluiga on keskmine aeg, mil elektronid on ergastatud olekus. Fluorestsentsi intensiivsus (FI) on korrelatsioonis neeldunud valguse intensiivsuse ja fluorestsentsi kvantsaagisega, molaarse ekstinktsioonikoeffitsendi ja fluorofoori kontsentratsiooniga. Näiteks saab mõõta meile huvipakkuva, kindla kontsentratsiooniga puhta fluorestseeruva valguga (FP) neeldumis- ja emissioonispektri. Neid spektreid teades saab mõõta FI lahjenduste seerias ning saadud andmete abil koostada FP kalibratsioonikõvera, sest FI on lineaarses sõltuvuses kontsentratsioonist. Saadud kõverat kasutades on võimalik määrata antud FP kontsentratsiooni uuritavas proovis (Valeur ja Berberan-Santos, 2013).

1.3.1 Fluorestsentsi anisotroopia põhinevad analüüsimeetodid

Fluorestsentsi anisotroopia (FA) põhineb molekulide erineval pöörlemiskiirusel. Kui väikese molaarmassiga fluorofoori ergastada polariseeritud valgusega, on tema poolt emiteeritud valgus suurel määral depolariseeritud (madal FA signaal). Väike fluorofoor teeb lahuses 50-100 ps jooksul pöörde ümber oma telje, fluorestsentsi eluiga on aga mõõdetav nanosekundites (harilikult 1-10 ns), mille jooksul väike fluorofoor jõuab mitmeid kordi pöörelda, mis muudab emiteeritava valguse depolariseerituks. Kui aga väike fluorofoor (või sellega ühendatud väike molekul) seondub mõne suurema molekuliga (näiteks valguga või nukleiinhappega), muutub kompleksi pöörlemine aeglasemaks ning kiirgunud valgus jääb suure osas polariseerituks ja mõõdetud FA on kõrge (Joonis 2). FA mõõtmisega saab seega detekteerida ühendite interaktsioone otse lahustes (Lakowicz, 2006).



Joonis 2: FA nähtust selgitav skeem. Polariseeritud valgusega ergastatud väikese fluorofoori ja suure kompleksi emiteeritava valguse polariseeritus on erinev. Fluorestsentsi eluea jooksul jõuab väike molekul mitmeid kordi pöörlelda, emiteeritav valgus on depolariseeritud. Suurema molekuliga seotuna aga on pöörlemiskiirus väiksem ja emiteeritav valgus on polariseeritud. (Invitrogen, 2006)

1.3.2 Fösteri resonantsenergia ülekandel põhinevad analüüsimeetodid

Fotoluminestsentsi nähtust kasutatakse madalmolekulaarsete ühendite ja valkude interaktsioonide uurimiseks ka sellise meetodiga, mis põhineb Fösteri resonantsenergia ülekandel (FRET, i. k. *Föster resonance energi transfer*). FRET on fluorofooride vaheline mittekiiruslik energia ülekanne. FRET-i toimumise eelduseks on kattuvus doonori emissioonispektri ja aktseptori ergastusspektri (neeldumisspektri) vahel. Doonormolekuli ergastamisel annab see footonite emiteerimise asemel dipool-dipool interaktsioonide tulemusel energia edasi aktseptormolekulile, mis saadud energia toimel omakorda ergastub ja seejärel kiirgab. FRET toimub ainult juhul, kui ülekandes osalevad fluorofoorid on üksteisele piisavalt lähedal (see distants on harilikult 1-10 nm vahel). Kaugust, mille korral FRET-i efektiivsus on 50 %, nimetatakse Fösteri raadiuseks. FRET-i efektiivsus sõltub ka fluorofooride asetusest üksteise suhtes ehk nendevahelisest nurgast. Need omadused võimaldavad FRET-i efektiivsuse abil mõõta interakteeruvate molekulide vahelisi kauguseid, seondumist, DNA hübridisatsiooni, geeniekspressiooni ja palju muud (Clegg, 2009).

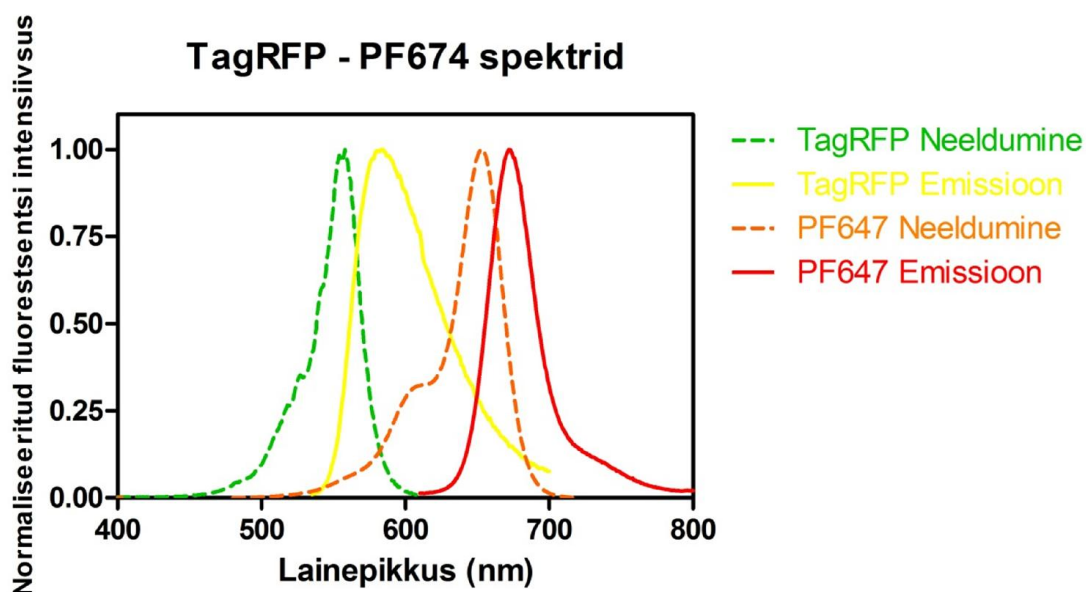
1.4 Punane fluorestseeruv valk TagRFP

TagRFP on FP, mille neeldumisspektri maksimum on 555 nm ja emissioonispektri maksimum 584 nm (Samarkina *et al.*, 2007). FP-de kasutusalaudeks on valkude paiknemise ja koostoime

uurimine, raku- ja koespetsiifiliste markerite disainimine, geeniekspressiooni ja promootorite aktiivsuse jälgimine, geneetiliselt kodeeritud sensorite tootmine, geeniteraapia jpm. Suure hulga erinevate kasutusvõimaluste tõttu otsitakse ja isoleeritakse üha uusi FP-sid, mis oleksid vastavad uuringutes vajalikele omadustele (Merzlyak *et al.*, 2008).

Punane FP TagRFP on laboratoorsetes tingimustes loodud valk, mis töötati välja loodusliku valgu eqFP578 alusel (isoleeritud merisiilikust *Entacamea quadricolor*). Looduslikud FP-d, mis kuuluvad oraanži, punasesse ja kaugpunasesse spektrisse (emissioonimaksimumidega üle 550 nm), esinevad di- või tetrameeride kujul. Kui kasutada mõnda neist looduslikest FP-dest fluorestseeruva märgisena liitvalgu koosseisus, eesmärgiga uurida huvipakkuva valgu lokaliseerimise, ekspressiooni, toimet, liikumist või mõnda muud omadust, põhjustab nende FP-de oligomeriseerumine liitvalkude ebatäpset seondumist ja agregeerumist. Seega on FP-de puhul, mida soovitakse kasutada markerina, tähtsaks omaduseks monomeerse konfiguratsiooni säilitamine kõrgete FP kontsentratsioonide korral. TagRFP ei oligomeriseeru isegi kõrgete, kuni 0.4 mM kontsentratsioonide juures. Liitvalgu koosseisus ka pikema aja jooksul agregate mitte moodustav TagRFP on sobilik FP erinevateks fluorestsentsi intensiivsuse mõõtmisel põhinevate uuringute läbiviimiseks (Samarkina *et al.*, 2007).

TagRFP moodustab fluorestseeruva värviga PF647 FRET ülekande mõõtmiseks sobiliku paari. See on tingitud asjaolust et TagRFP emissioonispekter maksimumiga lainepikkusel 585 nm kattub PF647 ergastusspektri maksimumiga lainepikkusel 654 nm (Joonis 3).



Joonis 3: Doonorfluorofoor TagRFP ja aktseptorfluorofoor PF647 spektrid ja nende kattuvus.

1.5 Inimese rekombinantsete valkude ekspresseerimine bakterirakkudes

Inimese organismis on valgud asendamatud. Valgud vahendavad rakkudevahelist ja –sisest signalisatsiooni, katalüseerivad ja osalevad biokeemilistes reaktsioonides, täidavad rakkude tugi- ja liikumisfunktsioone, osalevad rakkudesiseses ja -vahelises transpordis jne. Hinnanguliselt arvatakse inimese genoomis olevat 20000-30000 erinevat valku kodeerivat geeni, millelt alternatiivse splaissingu ja translatsioonijärgse modifitseerimise tagajärjel kodeeritakse veelgi suuremat arvu erinevaid valke. Meditsiini jaoks tähendab valkude uurimine võimalust erinevate haiguste põhjuste väljaselgitamiseks. Et valkude funktsioone saaks paremini uurida, on neid tarvis suurtes kogustes ja võimalikult väikeste kulutustega toota. Üheks selliseks võimaluseks on geenitehnoloogiliste võtetega luua transgeenseid baktereid, näiteks *Escherichia coli*, mis ekspresseeriks vajaminevat valku (Pennisi, 2003; Leader *et al.*, 2008).

1.5.1 *E. coli* eelised ja puudused eksogeensete valkude ekspressioonil

Huvipakkuva valgu tootmiseks omab *E. coli* kasulikke omadusi: lühike generatsiooniaeg; lai valik kaubanduslikult kättesaadavaid tüvesid; suure tihedusega kultuuri kasvatamine vedelsöötmes (kuni 200 g bakteri kuivmassi milliliitri vedelsöötme kohta); vähenõudlikkus söötme komponentide osas; eksogeense DNA-ga transformeerimise suhteline lihtsus (Rosano ja Ceccarelli, 2014).

Samas on ka mitmeid piiranguid. Eukarüootse organismi valk võib vajada korrektseks funktsioneerimiseks intronite splaissingut mRNA tasemel või translatsioonijärgset modifitseerimist, mis prokarüoodis ei ole võimalik (Shadev *et al.*, 2008). Võõra rekombinantse valgu tootmine võib olla bakterile koormav või toksiline, vähendades valgusaagist või mõjudes bakterile surmavalt (Sezonov, 2007). Valgu õige voltumise toimumiseks vajalikud disulfiid-sillad ei pruugi prokarüoodis tekkida. Koodonite erinevused pro- ja eukarüootide vahel võivad viia ebatäpse translatsioonini. DNA, millelt rekombinantset valku loodetakse ekspresseerida, võib sisaldada järjestusi, mis prokarüoodis viivad translatsiooni termineerumiseni. On ka võimalik rekombinantsete valkude lagundamine proteaaside poolt (Brown, 1995).

1.5.2 *E. Coli* transformeerimine

Bakterites rekombinantsete võõrvalkude tootmine on andnud suure tõuke biokeemia arenguks. Valgu tootmiseks bakteris on tarvis sisestada uurimisobjektiks olevat valku kodeeriv geen või geenid raku. Kõige enam kasutatud meetodiks on vajaliku DNA fragmendi klonereimine vektorisse, näiteks plasmidi ja selle plasmidiga kompetentsete *E. coli* rakkude transformeerimine (Graumann ja Premstaller, 2006)

pET vektorid, näiteks plasmid pET-28a (*Novagen*), on töötatud välja efektiivseks rekombinantsete valkude ekspressiooniks *E. coli*-s. pET vektorites asetseb kordne klonereimissait (MCS i. k. *Multiple cloning site*) selliselt, et sinna klonereitud järjestus jääb bakterofaag T7 promootori kontrolli alla. T7 promootori tunneb ära faagi T7 RNA polümeraas (T7 RNAP), mida kodeeriv geen asetseb kas transformeeritava tüve kromosoomses genoomis või mõnes teises plasmidis. T7 promootori kontrolli all olevalt järjestuselt transkribeeritakse RNA-d ainult siis, kui rakus leidub aktiivset T7 polümeraasi, mis võimaldab huvipakkuva valgu sünteesi toimumist kontrollida (Rosano ja Ceccarelli, 2014).

E. coli tüvi DH5 α on spetsiaalselt välja töötatud plasmiidide paljundamiseks ja nendega transformeerimise lihtsustamiseks. Tänu mutatsioonidele *endA1* ja *recA1* geenides, on rakusiseste endonukleaaside aktiivsus allasurutud, mis aitab kaasa edukale transformatsioonile ja plasmidi ülekandumisele tütarrakudesse. Seetõttu sobib nimetatud tüvi rekombinantsete plasmiidide paljundamiseks (Taylor *et al.*, 1993; *Invitrogen*, 2006).

Rekombinantse valgu tootmiseks, mida kodeeriv järjestus on klonereitud pET vektorisse, sobib näiteks *E. coli* tüvi BL21(DE3)PlysS Rosetta. Selle bakteritüve genoomis on *lacUV5* promootori kontrolli all profaagi (λ DE3) T7 RNAP. Laktoosiga või selle analoogi IPTG-ga (*isopropüül- β -D-tiogalaktopüranosiid*) mõjutamisel sünteesitakse T7 RNAP, mis omakorda võimaldab pET vektoris oleva T7 promootori alt transkriptsiooni toimumist (Rosano ja Ceccarelli, 2014). Lisaks on nimetatud tüves PlysS plasmid, millelt sünteesitakse valku T7 lüsoosüüm. T7 lüsoosüüm seob ja inhibeerib rakus ensüümi T7 RNAP, mida võib „lekkiva“ ekspressiooni tõttu rakus moodustuda ja mis sidumata kujul põhjustaks soovimatul hetkel rekombinantse valgu sünteesi T7 promootori kontrolli alt. Promootori *lacUV5* transkriptsioonilise aktiveerumise korral tekib T7 lüsoosüümi suhtes suur ülehulk T7 RNAP-d, mis omakorda indutseerib soovitud transgeense valgu sünteesi. Lisaks on selle *E. coli* tüve tRNA koodonid kohandatud eukarüootsete rakkude valkude sünteesimiseks. (Stano ja Patel, 2004; Rosano ja Ceccarelli, 2014).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on toota aktiivset liitvalku bakterirakus. Töös prooviti toota FP ja KP liitvalku, millel oleks säilinud seda moodustava FP fluorestsentsomadused ning PK ensümaatilise aktiivsuse. Selle eesmärgi saavutamiseks oli vaja lahendada järgnevad etapid:

1. Disainida plasmiid.
2. Teostada kloneerimine ja bakterirakkude transformatsioon
3. Teha kindlaks sünteesitud liitvalgu korrektne konformatsioon

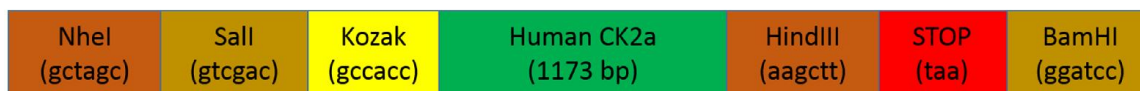
2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kloneerimine

2.2.1.1 Plasmidi pET-HisCK2 α RFP disainimine

Käesoleva töö jaoks vajaliku plasmidi disainimisel võeti aluseks Tartu Ülikooli keemia instituudi meditsiinilise keemia uurimisrühmas konstrueeritud plasmiid pET-HisTagRFP. TagRFP geen on lõigatud välja plasmidist pTagRFP-N (*Evrogen*, FP142) ja sisestatud plasmidi pET28a (*Novagen*, 69864-3) kasutades SacI ja NotI restriktase. Saadud rekombinantne plasmiid kodeerib liitvalku TagRFP mille N-otsas on heksahistidiinmärgis [MW (molekulmass) 33 kDa].

Inimese PK CK2 α geenijärjestust sisaldav plasmiid pUCKan-CK2 α (3841 bp) saadi tellimusena firmalt *Genewiz Inc.* koos valitud restriksioonisaitidega. Tellitud plasmidi disain vastab joonisele 4.



Joonis 4: Plasmidi pUCKan-CK2 α restriksioonisaitide paiknemist illustreeriv skeem (Manoharan *et al.*, 2015).

2.2.1.2 Restriksioon

Doonorplasmidi pUCKan-CK2 α ja akseptorplasmidi pET-HisTagRFP restriksiooniks kasutati restriksioonien süüme NheI (*Life Technologies*, ER0971) ja kahekordses liias HindIII (*Life Technologies*, ER0501) *Tango* puhvri (*Life Technologies*, BY5) juuresolekul. Restriksioonireaktsiooni lasti toimuda 37 °C juures 3 tundi. Restrikteeritud fragmendid eraldati üksteisest elektroforeetilisel agarosgeelil. Restriksioonikava ja ennustatavad DNA fragmentide pikkused saadi kasutades *Serial Cloner* v2.6.1 tarkvara. Plasmiidikaartide koostamiseks kasutati programmi *SnapGene Viewer* v2.8.1.

2.2.1.3 Geelelektroforees

Geelelektroforees sooritati 1 % agarosgeelis, kuhu oli lisatud etiidium bromiidi (25 μ g/ml), TAE puhvris (40 mM Tris, 20 mM äädikhape, 1 mM EDTA; pH 8,2). Proovidele lisati foreesivärvi (0,04 % broomfenooli lahus 50 % glütseriinis). DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutati *GeneRuler 1kb DNA ladder* molekulmassi markerit (*Thermo Scientific*, SM0313). Forees teostati kasutades *Biorad*-i foreesi süsteemi 125 V pinge juures TAE puhvris 15 minuti jooksul. DNA paiknemine tehti kindlaks visuaalselt UV kiirgusega ergastades.

2.2.1.4 DNA puhastamine

DNA puhastamine agarosgeelist toimus komplekt *Gel Extraction Kit* (*Thermo Scientific*, K0691) abil tootjapoolset protokollit järgides. Puhastatud DNA kontsentratsioon mõõdeti *Nano Drop 2000c* (*Thermo Scientific*) abil.

2.2.1.5 Ligeerimine

Restrikteeritud pUCKan-CK2 α ja pET-HisTagRFP fragmentide omavaheline ligeerimine toimus kasutades ensüümi *T4 DNA Ligase* (*Thermo Scientific*, EL0014) *T4 Ligase* puhvris (*Thermo Scientific*, B69). Reaktsioon toimus 1 tund 22 °C juures.

2.2.1.6 Rakkude transformatsioon

Kompetentseid *Escherichia coli* DH5 α tüve rakke transformeeriti eelnevalt valmistatud ligeerimisseguga. *E. coli* DH5 α rakke hoiti jääs ning seejärel lisati plasmiid pET-HisCK2 α RFP. Segu pandi uuesti jääle ning 5 minuti möödudes teostati rakkudele kuumašokk (rakud viidi 90 sekundiks 42 °C termoblokkile). Koheselt pärast kuumašokki tõsteti rakud tagasi jääle ja lasti seista veel 5 minutit. Seejärel lisati rakkudele SOC meedium (2% trüpton,

0,5% pärmiekstrakt, 10 nM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glükoos) ja pandi kasvama 37 °C juurde loksutile 1,5 tunniks. Seejärel plaaditi rakud 1,5 % agarit sisaldavale LB (trüpton, pärmiekstrakt, NaCl) selektiivsöötmele (kanamütsiin 25 µg/ml). Plaati hoiti üleöö 37 °C juures ja teostati kolooniate skriinimine.

2.2.1.7 Kolooniate skriinimine

Üleöö LB 1,5 % agari selektiivsöötmele (kanamütsiin 25 µg/ml) kasvanud *E. coli* DH5α rakkudest valiti juhuslikult välja neli kolooniat, mis inokuleeriti LB vedelsöötmes ja pandi üleöö 37 °C juurde loksutile kasvama. Järgmisel päeval võeti kõigist neljast proovist bakterid, mis eraldati tsentrifuugi abil söötimest ning seejärel isoleeriti neist plasmiidid. Plasmiidide eraldamine viidi läbi *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (*Thermo Scientific*, K0502) abil tootjapoolset protokollit järgides (kasutati tsentrifuugi CM-50 *Sky Line*, 12000 rpm). Eraldatud proovide DNA sisaldus tehti kindlaks spektrofotomeetrit *Nano Drop 2000c* kasutades. Plasmiidset DNA-d restriktreeriti kasutades NheI ja HindIII restriktase. Restriktreeritud DNA-d geelelektroforeesi kasutades, kontrollimaks katses oodatud pikkusega DNA molekulide olemasolu. Samuti saadeti osa plasmiidest DNA-st Tartu Ülikooli Mikrobioloogia Instituuti sekveneerimiseks, et kontrollida kloneerimise edukust. Sekveneerimisel kasutati T7 päripidist ja T7 äraspidist praimerit.

2.2.2 HisCK2αRFP ekspresseerimine

2.2.2.1 Ekspressioonitüve transformatsioon

Liitvalgu ekspressiooniks valiti *E. coli* tüvi BL21(DE3)pLysS Rosetta (*Novagen*, 70956), mida kasvatati enne transformeerimist üleöö 37 °C juures. Üleöö kasvanud BL21(DE3)pLysS Rosetta tüve rakke inokuleeriti 10 ml LB söötmes, lisati klooramfenikool (34 µg/ml) ning pandi loksutile 37 °C juurde kasvama. Rakke kasvatati loksutil ja mõõdeti optilist tihedust, kuni inokuleeritud rakkude optiline tihedus oli saavutanud väärtuse 0,6. Seejärel eraldati rakud söötimest tsentrifuugi (*Sigma*, 3-16PK, rootor 12154-h, 13000 rpm, 4 °C juures) abil. Rakud transformeeriti, lisades neile 0,5 µg pET-HisCK2αRFP plasmidi DNA-d. Transformeeritud rakud pandi kasvama LB vedelsöötmesse kanamütsiini (25 µg/ml) ja klooramfenikooli (34 µg/ml) juuresolekul.

2.2.2.2 Ekspressioon

Transformeeritud *E. coli* BL21(DE3)pLysS Rosetta rakke kasvatati LB vedelsöötmes kanamütsiini (25 µg/ml) ja klooramfenikooli (34 µg/ml) juuresolekul kuni segu saavutas

optilise tiheduse väärtuse 0,6. Plasmiidse valgusünteesi aktiveerimiseks indutseeriti rakke lisades LB söötmesse 0,5 mM IPTG-d. Indutseeritud rakke kasvatati loksutil 25 °C juures üleöö. Seejärel rakud eraldati tsentrifuugi abil söötimest, resuspendeeriti fosfaatpuhvrises (PBS), kuhu oli lisatud proteaase inhibeeriv kokteil ja lüüsi sonikaatori (*BANDELIN SONOPLUS*) abil. Sonikeerimine viidi läbi 90 % võimsuse juures 10 sekundi kaupa, mille vahel hoiti proove 30 sekundit jääl. Seda tsükli korrati 2 korda. Sonikeeritud lüsaat tsentrifuugiti ning eraldati supernatant.

2.2.3 Valgu analüüs

2.2.3.1 Polüakrüülamiid geelelektroforees SDS-PAGE

SDS-PAGE viidi läbi 12 % lahutusgeeli ja 4 % kogumisgeeli kasutades. Polüakrüülamiidgeelid valmistati *Invitrogen*-i geeli valmistamise protokolle järgides järgnevatest komponentidest: 50 % akrüülamiid/BIS, eraldusgeeli puhver (*Invitrogen*, 1 M Tris-HCl; pH 6,8), 10 % SDS, kogumisgeeli puhver (*Invitrogen*, 0,375 M Tris-HCl; pH 6,8), ammonium persulfaadi (*BioTop*, 4121) vesilahus, TEMED (*BioTop*, 4151). Foreesi proovid koostati järgnevalt: 20 % lõppkontsentratsiooniga raku lüsaat, *NuPage LDS sample buffer* (*Thermo Scientific*, NP0007) DTT (50 mM), PBS. Proove hoiti 95 °C juures 10 minutit. Seejärel laeti proovid kogumisgeeli kaevudesse ja teostati forees 125 V pinge juures puhvrises *NuPAGE MES Running* (*Thermo Scientific*, NP0002). Valkude molekulmasside hindamiseks kasutati markerina eelmärgistatud valgustandardeid (*Thermo Scientific*, *Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard*, LC5800). Forees teostati kasutades *Xcell SureLock* (*Invitrogen*) süsteemi.

2.2.3.2 Western Blot

Polüakrüülamiidgeelilt viidi valgud PVDF membraanile (*InvitrolonTM*, 0,45 µM, *Invitrogen*, LC2007) kasutades *Invitrogen*-i *semi dry blotting* süsteemi (20 V, 1 tund). Membraanile viidud valkudega teostati *Western Blot* analüüs kasutades kolme erinevat primaarset antikeha. Valgu CK2α osa detekteerimiseks kasutati närilise monoklonaalset antikeha lahjendussuhtega 1:250 [*Biaffin*, AB-CK2A-100, epitoop baseerub inimese proteiinkinaas CK2α C-otsale (aminohapped 319-324)] ja küüliku polükloonaalset antikeha lahjendussuhtega 1:500 [*Millipore*, 06-873, epitoop baseerub inimese proteiinkinaas CK2α N-otsale osale (aminohapped 7-22)]. Liitvalgu TagRFP osa detekteerimiseks kasutati küüliku polükloonaalset antikeha *Anti-tRFP* (*Evrogen*, AB233) lahjendussuhtega 1:2000. Sekundaarsete antikehadena kasutati aluselise fosfataasiga konjugeeritud kitse hiirevastaseid IgG ja IgM (*Life*

Technologies, T2192) ja kitse küülikuvastast IgG (*Life technologies*, T2191), lahjenduste suhtega 1:5000.

2.2.4 Fotoluminestentsi mõõtmised

Mõõtmised teostati kasutades testpuhvrit (50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,005% Tween 20, 5 mM DTT, 7,5 μ M BSA) 20 μ l ruumalas. Mõõtmistel kasutati musti 384-kaevulisi mitte-siduva pinnaga polüstüreenmikroplaate (*Corning*, 3676). Sond ARC-1504 seondumistesti puhul ei kasutatud testpuvri koostisosana BSA-d.

2.2.4.1 Fluorestsentspektrite võtmine

Valkude TagRFP ja HisCK2 α RFP fluorestsentsi emissioonispekterid mõõdeti kasutades Cytation5 (*Biotek*) plaadilugejat. Proovide ruumala oli 20 μ l, katseid tehti kolmes paralleelis mikrotiiterplaatidel. Kontrolliks kasutati 100 nM rTagRFP valku (*Axxora*, EVN-FP154-C100), lahustatuna PBS-is. Proove ergastati lainepikkusel 500(20) nm ja emissiooni intensiivsust mõõdeti lainepikkustel 530 nm kuni 700 nm (monokromaatori pilu laius 20 nm).

2.2.4.2 Lüsaadis leiduva fluorestseeruva valgus konsentratsiooni hindamine

Lüsi valgus HisCK2 α RFP kontsentratsiooni määramiseks lüsaadis koostati valgus rTagRFP FI mõõtmiste põhjal kalibratsioonikõver. Selleks valimstati 384-kaevulise mikroplaadil testpuhvris rTagRFP lahjenduseeria kahekordsete lahjendustega alates kontsentratsioonist 200 nM ning proove inkubeeriti 30 °C juures 20 minutit. FI mõõdeti kasutades *PHERASTAR* (*BMG Labtech*) plaadilugeja FI moodulit [ergastusfilter 540(20) nm, emissioonifilter 590(20) nm]. Kalibratsioonikõvera saamiseks kanti saadud FI andmed *GraphPad Prism v5* tarkvara lineaarsesse regressioonivalemisse. Seejärel valmistati uuritava rakulüsaadi kahekordsete lahjendustega lahejenduseeria testpuhvris ning mõõdeti FI. Saadud tulemusi võrreldi eelnevalt saadud kalibratsioonikõveraga.

2.2.4.3 Biokeemilised testid

Lüsaatidest valmistati 384-kaevulisel mikroplaadil testpuhvris (BSA-d ei lisatud) lahjenduseeriad kahekordsete lahjendustega ja lisati juurde fluorestsentssond ARC-1504 lahus lõppkontsentratsiooniga 10 nM. Paralleelselt valmistati samasugused lahjenduseeriad, kuid nendele lisati veel inhibiitor CX-4945 (lõppkontsentratsiooniga 10 μ M). Lahjenduseeriatega mõõtmisplaati inkubeeriti 30 °C juures 20 minutit ja mõõdeti lahuste FA kasutades *PHERASTAR* plaadilugeja polarisatsioonimoodulit [FP moodul: ergastusfilter

590(50), emissioonifilter 675(50)]. Samuti mõõdeti lahuste FRET doonorfluorofoorilt TagRFP (punane FP TagRFP kiirgab valgust tegelikult spektri oranžis piirkonnas: fluorestsentsi emissioonispektri maksimum 590 nm juures) aktseptorfluorofoorile (punane fluorestsentsvärv PF647 : ergastusspektri maksimum 645 nm juures, emissioonispektri maksimum 670 nm juures), kasutades spektromeetri PHERAstar kaksikemissioonimoodulit [FI, ergastusfilter 540(20), emissioonifiltrid 590(20) ja 675(50)].

Aktiivset kinaasi CK2 α sisaldava liitvalgu kontsentratsioon rakulüsaadis tehti kindlaks FA mõõtmiste kaudu kasutades valemit 1.

$$Z = \frac{L_t + K_d + k \times x - \sqrt{(L_t + K_d + k \times x)^2 - 4 \times L_t \times k \times x}}{2 \times L_t}$$

$$M = \frac{Q \times Z}{1 + Z \times (Q - 1)}$$

$$Y = (1 - M) \times A_f + M \times A_b$$

Valem 1. k – aktiivne/summaarne kinaasi kontsentratsioon, Y – mõõdetud anisotroopia väärtus, K_d – kinaasi ja ligandi kompleksi dissotsiatsioonikonstant, L_t – ligandi summaarne kontsentratsioon, x – ensüümi summaarne kontsentratsioon, Q – seotud ja vaba fluorestsentsligandi fluorestsentsi intensiivsuste jagatis, A_b – täielikult seotud ligandi anisotroopia, A_f – Vaba ligandi anisotroopia (Vaasa *et al.*, Anal Biochem).

Hindamaks FRET-i intensiivsust analüüsti FI andmeid kasutades valemit 2.

$$\text{Relatiivne FI suhe} = \frac{I_a/I_d}{I_a(D)/I_d(D)}$$

Valem 2. I_a – aktseptori (fluorestsentsvärv PF647) valgusemissiooni intensiivsus, I_d – doonori (fluorestseeruv valk TagRFP) valgusemissiooni intensiivsus, $I_a(D)$ – aktseptori valgusemissiooni intensiivsus konkureeriva seonduja (CX-4945) juuresolekul, $I_d(D)$ – doonori valgusemissiooni intensiivsus konkureeriva seonduja juuresolekul. (Manoharan *et al.*, Anal Biochem 2015)

2.2.4.4 Sondi ARC-1504 kontsentratsiooni määramine

Sondi ARC-1504, mis on märgistatud fluorestsentsvärviga PF647, kontsentratsioon määrati kasutades *NanoDrop* 2000c. Kontsentratsioon arvutati kasutades Beer-Lamberti seadusest tuletatud valemit (valem 3). Proovi neeldumist mõõdeti 653nm lainepikkusel. Arvutuses kasutati neeldumismaksimumi ja molaarset ekstinktsioonikoefitsienti $250,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

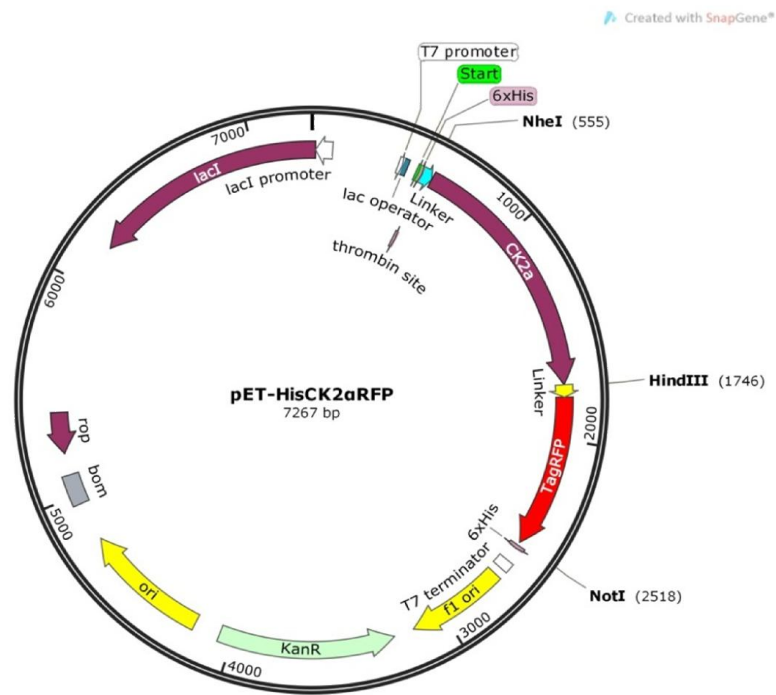
$$A = \varepsilon \times l \times c$$

Valem 3. A – neeldumismaksimum, ε – molaarne ekstinktsioonikoefitsient, l – distant, mille valgus peab läbima, c – kontsentratsioon.

2.3 Tulemused ja arutelu

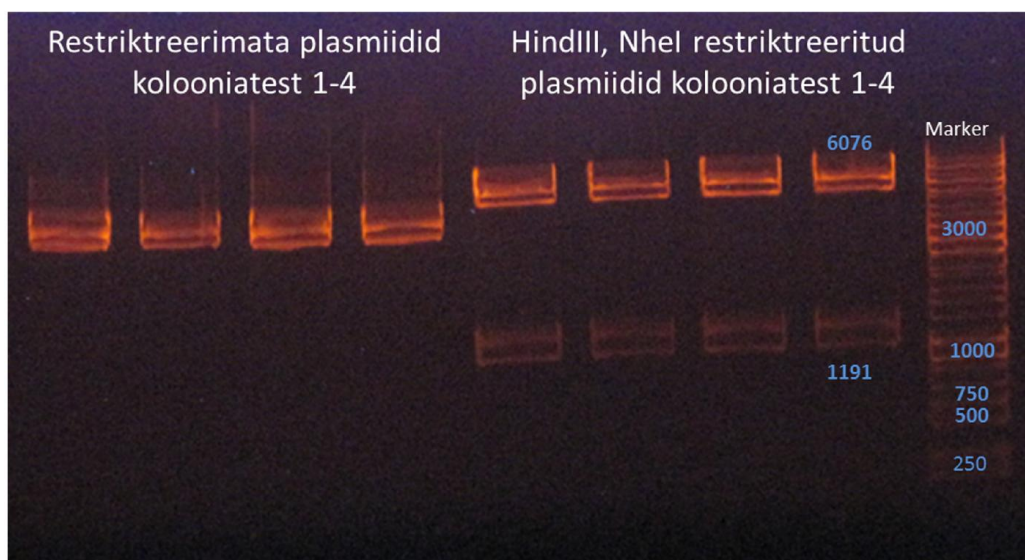
2.3.1 Plasmiiidi pET-HisCK2 α RFP kloneerimine

Käesolevas töös püstitatud eesmärgi täitmiseks oli tarvis konstrueerida plasmiid, millelt oleks võimalik ekspresseerida liitvalk HisCK2 α RFP. Selleks kasutati uurimisrühmas eelnevalt disainitud plasmiiidi pET-HisTagRFP, mis on saadud ühendades imetaja rakkudes kasutamiseks mõeldud vektor pTagRFP-N vektoriga pET28a – vektor, mis on kasutusel rekombinantsete valkude ekspresseerimiseks bakterirakkudes. Vektorite liitmise tulemuseks oli rekombinantne vektor pET-HisTagRFP. Sellelt plasmiidilt on võimalik bakterirakus sünteesida fluorestseeruvat valku TagRFP, millel on N-otsas heksahistidiinimärgis (33 kDa). Plasmiiidi pET-HisTagRFP (6127 bp) kordne kloneerimissait (MCS) asetseb selliselt, et sinna soovitud gene sisestades on võimalik ekspresseerida liitvalke, mille C-otsaga on liidetud fluorestseeruv valk TagRFP ja N-otsaga heksahistidiinimärgis. Esmalt kloneeriti plasmiidist pUCKan-CK2 α saadud CK2 α geen vektorisse pET-HisTagRFP, kasutades restriктаase NheI ja HindIII. Sellise kloneerimise tulemuseks oli plasmiid pET-HisCK2 α RFP (Joonis 5), mis kodeerib käesoleva töö uurimisobjektiks olevat liitvalku HisCK2 α RFP.



Joonis 5: Plasmidi pET-HisCK2αRF kaart (*SnapGene Viewer*).

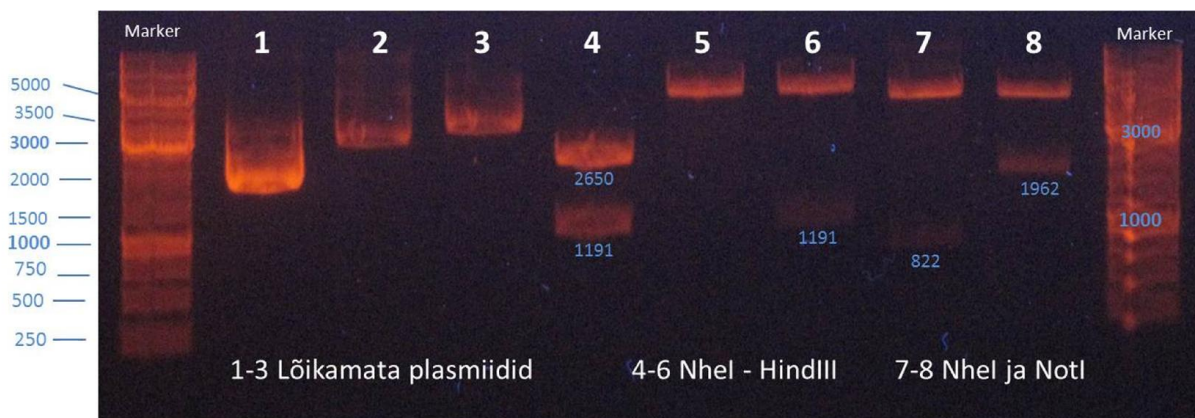
Eelnevalt kirjeldatud viisil disainitud plasmiidiga pET-HisCK2αRFP transformeeriti kompetentseid *E. coli* DH5α tüve rakke. Pärast transfoormeerimist teostati kolooniate skriinimine. Selleks valiti juhuslikult selektiivsöötmele kasvanud kultuurilt neli kolooniat ning eraldati neist plasmiidne DNA. Plasmiidid restriktreeriti kasutades restriктаase HindIII ja NheI ja DNA fragmendid lahutati elektroforeesi kasutades. Neid restriктаase kasutades olid oodatavad plasmiidse DNA lineaarsed fragmendid pikkustega 1191 bp ja 6076 bp. Joonisel 6 on näha elektroforeesil lahutatud DNA fragmendid.



Joonis 6: Agarosgeelelektroforeesi tulemused.

Elektroforeesil eraldunud DNA lõigud vastasid oodatud pikkustele, mis näitas, et rakkude transformatsioon on olnud edukas. Positiivsetest kolooniatest valiti esimene, millest eraldatud plasmiid saadeti sekveneerimiseks TÜMRI laborisse. Ka sekveneerimistulemused näitasid, et plasmiid on korrektselt konstrueeritud.

Lisaks teostati restriksioonianalüüs katses kasutusel olnud vektoritele, mille tulemused on nähtavad jooniselt 7. Joonisel on näha restriktreerimisel tekkinud plasmiidse DNA fragmendid, mis kõik vastavad oodatavatele aluspaarilistele pikkustele.



Rajad 1, 4 – pUCKan-CK2 α 3841 bp
 Rajad 2, 5, 7 – pET-HisTagRFP 6127 bp
 Rajad 3, 6, 8 – pET-HisCK2 α RFP 7262 bp

Joonis 7: Restriksioonianalüüsi tulemused.

2.3.2 HisCK2 α RFP ekspressioon

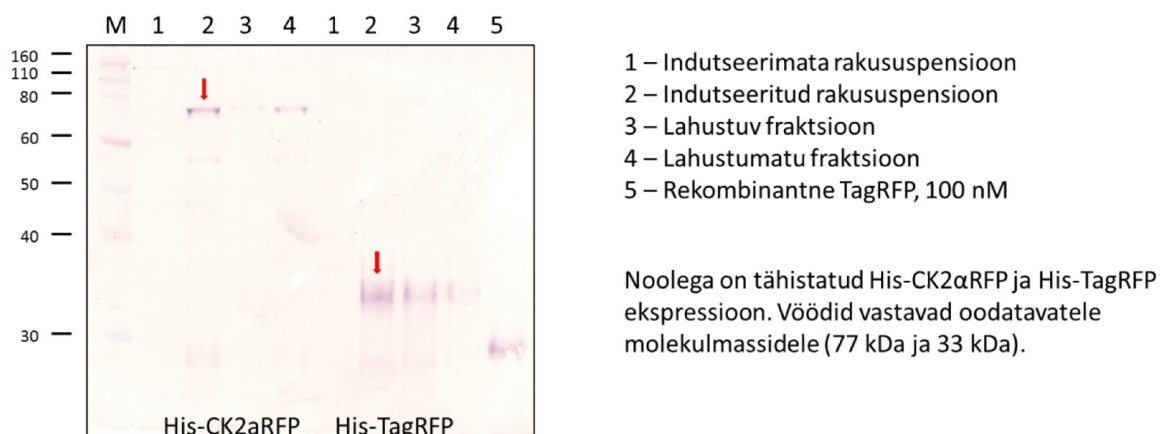
Liitvalk HisCK2 α RFP ekspresseerimiseks kasutati *E. coli* tüve BL21(DE3)pLysS Rosetta. Plasmiidiga pET-HisCK2 α RFP transformeeritud rakud indutseeriti IPTG abil valku tootma ning inkubeeriti 25 °C juures.

Liitvalgu (MW = 76,8 kDa) keskseks osaks on proteiinkinaas CK2 α , mille C-otsaga on liidetud 19 aminohappelise linker-järjestuse abil punane fluorestseeruv valk TagRFP ja N-otsaga on liidetud 17 aminohappelise linkerjärjestuse [see *linker* sisaldab ka trombiini lõikamisjärjestust (LVPR[↓]GS)] abil heksahistidiinmürgis. Heksahistidiinmürgis annab võimaluse liitvalku vajadusel eraldada ja puhastada.

Pärast inkubatsiooni söötmest eraldatud rakud olid vaatlusel roosakad, mis vihjas punase fluorestseeruva valgu olemasolule. Edasi rakud lüüsi sonikaatorit kasutades, lüsaat tsentrifugeeriti ning eraldati lahustuv ja lahustumatu fraktsioon. Kontrolliks viidi läbi

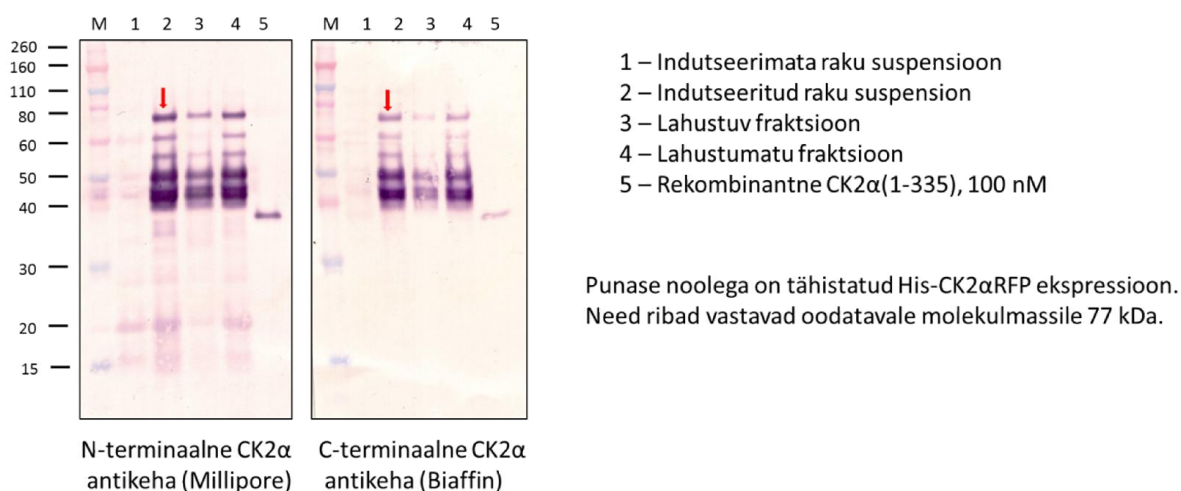
samasugune protseduur ka vektorit pET-HisTagRFP sisaldava *E.coli* tüvega, mis kodeerib valku HisTagRFP (33 kDa).

Teostati Western Blot analüüs kasutades TagRFP primaarset antikeha. Kontrolliks kasutati rekombinantset TagRFP valku kontsentratsiooniga 100 nM. Analüüsi tulemused on näha jooniselt 8.



Joonis 8: Western Blot analüüs kasutades TagRFP antikeha.

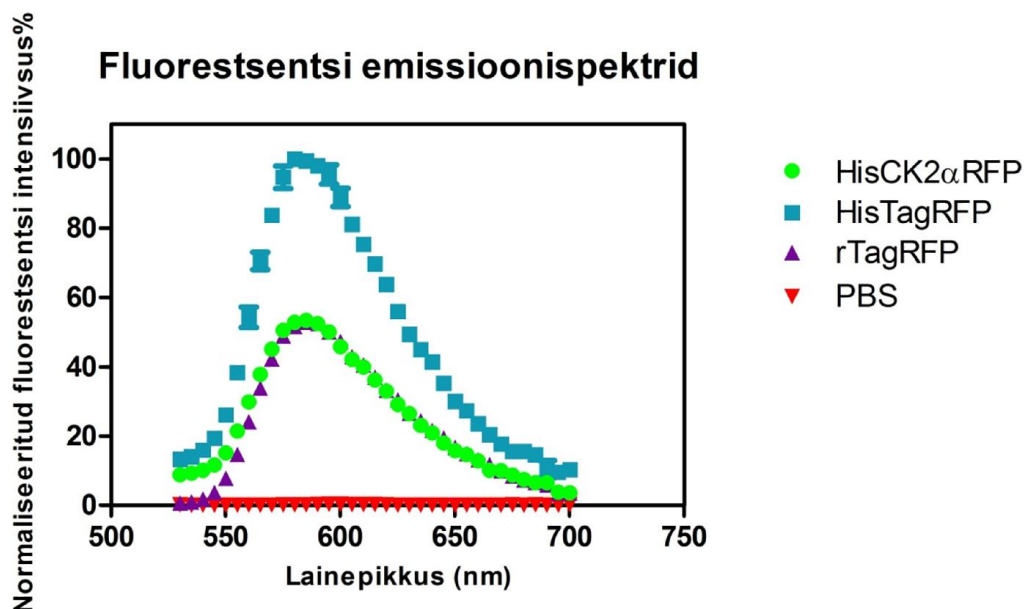
Et detekteerida korrektse liitvalgu olemasolu, teostati Western Blot analüüs ka liitvalgu kosseisu kuuluva CK2α äratundimiseks. Selleks kasutati kahte erinevat antikeha. Kontrolliks kasutati rekombinantset valku CK2α(1-335) molekulaarmassiga 40 kDa ja kontsentratsiooniga 100 nM. Katse tulemused on näha joonisel 9.



Joonis 9: Western Blot analüüsi tulemused, kasutades kaht erinevat piramaarset antikeha.

2.3.3 Fluorestseeruva valgu kontsentratsiooni määramine

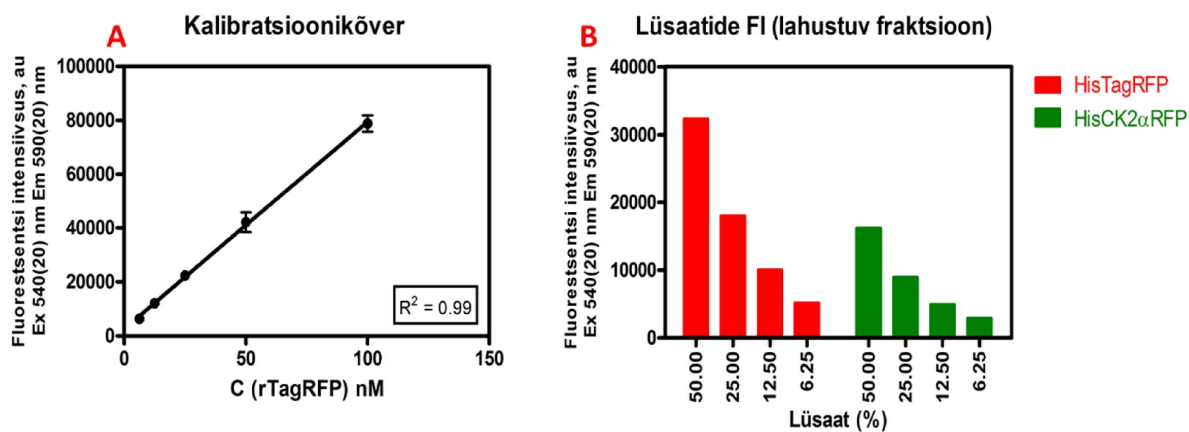
Fluorestseeruva valgu detekteerimise testid teostati rakulüsaatide lahustuvates fraktsioonides. Valkude HisTagRFP ja HisCK2 α RFP fluorestsentsi emissioonispektrid mõõdeti kasutades Cytation5 plaadilugejat. Kontrolliks kasutati PBS-is lahustatud valku rTagRFP (100 nM). Mõõtmistel saadud emissioonispektrid on kujutatud joonisel 10.



Joonis 10: Fluorestsentsi emissioonispektrid mõõdetud Cytation5 plaadilugejaga.

Mõõdetud spektrid olid omavahel piisavalt sarnased, et võib järeldada, et valk TagRFP oli kõigis analüüsitud proovides ning et see valk on säilitanud oma 3-D struktuuri, mis on vajalik fluorestsentsomaduste ilmnemiseks.

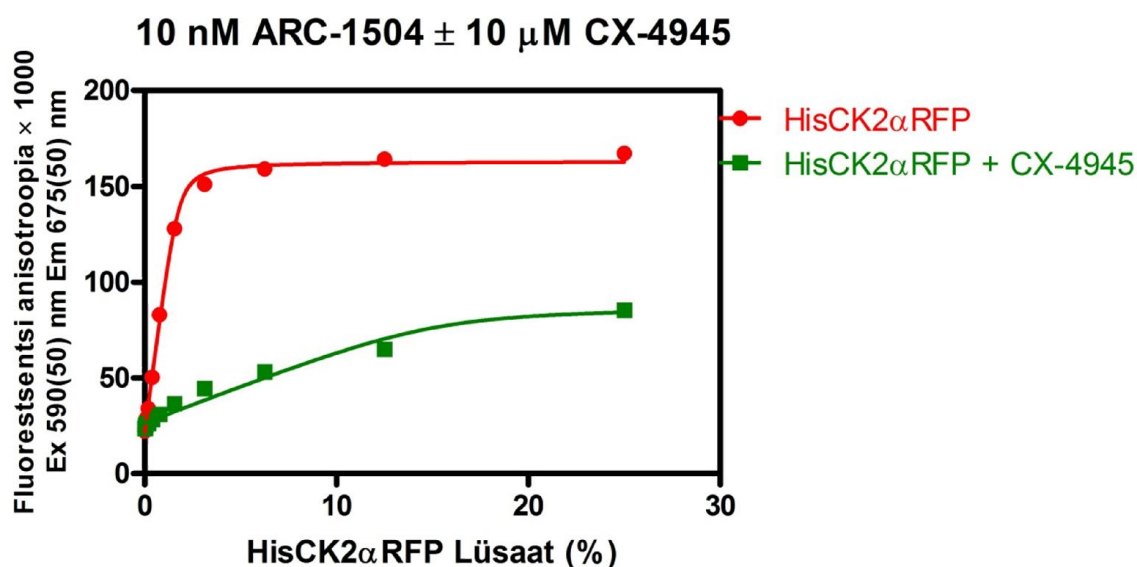
Lüsaatide lahustuvates fraktsioonides teostati fluorestseeruva valgu kontsentratsiooni mõõtmine, kasutades PHERAstar plaadilugejat. Esmalt koostati kalibratsioonikõver kasutades rekombinantset rTagRFP valgu fluorestsentsi intensiivsuse sõltuvust tema kontsentratsioonist. Kalibratsioonikõver on kujutatud joonisel 11 A. Sama plaadilugejat kasutades mõõdeti ka uuritavate proovide fluorestsentsi intensiivsus (Joonis 11 B) ning võrreldi saadud tulemusi kalibratsioonikõveraga. Sel viisil tehti kindlaks lüsaatides oleva fluorestseeruva valgu kontsentratsioon, mis oli HisCK2 α RFP puhul 38 nM ja HisTagRFP puhul 84 nM.



Joonised 11 A ja 11 B: Fluorestseeruva valgus kontsentratsiooni määramine. A: rTagRFP FI mõõtmise abil saadud kalibratsioonikõver. B: Lüsateides mõõdetud fluorestsentsi intensiivsus.

2.3.4 Biokeemilised testid

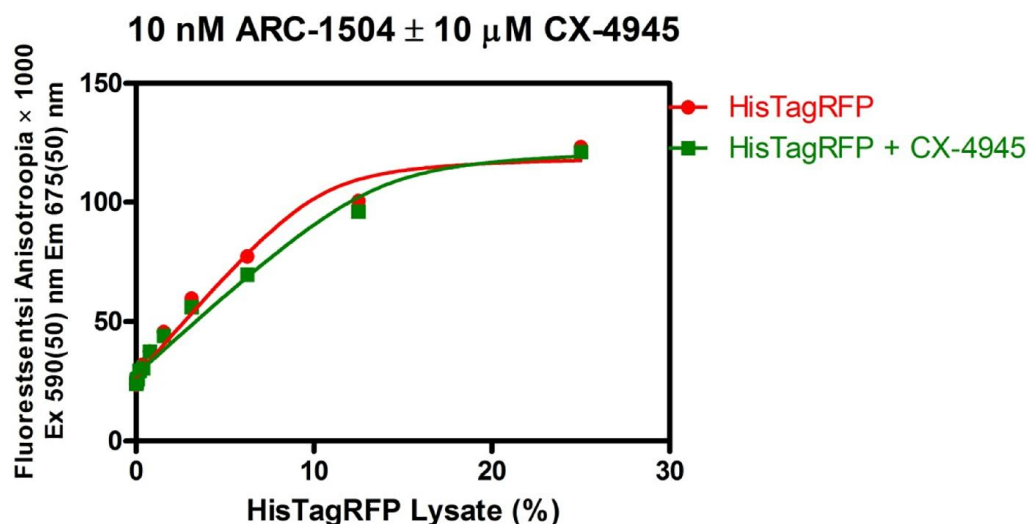
FA mõõtmistulemused näitavad, et fluorestsentsmärgisega sond ARC-1504 seondub liitvalguga CK2α osaga. Konkureeriva seonduja CX-4945 juuresolekul, mis on CK2α spetsiifiline inhibiitor, on mõõdetud FA madalam kui proovis ilma inhibiitorita. Seda illustreerib joonis 12. Saadud tulemus näitab, et bakteris toodetud liitvalgus kinaasi CK2α osa omab sondi ARC-1504 ja inhibiitori CX-4945 sidumiseks vajalikku ensümaatilist aktiivsust ning seega on vajalike fluorestsentsomadustega aktiivse kinaasi tootmine bakteri rakkudes võimalik.



Joonis 6: Fluorestsentsi anisotroopia mõõtmistulemused

Kontrolliks sooritati sama sondi ja CX-4945 kasutades mõõtmine ka valguga HisTagRFP. FA mõõtmised näitasid küll seondumist kõrge valgus kontsentratsiooni juures, kuid CX-4945

juuresolekul ei muutunud ARC-1504 anisotroopia väärtus. See näitas, et sond ARC-1504 seondus mittespetsiifiliselt lüsaadis leiduvate struktuuridega, millega seondumist konkureeriva CK2 α inhibiitori lisamine ei mõjuta. Ka omab TagRFP nõrka emissiooni 650(50) nm filtri alas (Joonis 10), mis mõjutab mõnevõrra anisotroopia mõõtmise tulemusi kõrge TagRFP kontsentratsiooni juures. Mittespetsiifilise seondumise põhjustatud FA mõõtmistulemused on näha jooniselt 13.



Joonis 13: Fluoresentsi anisotroopia mõõtmistulemused CK2 α mittesisaldava liitvalgupuhul.

Fluoresentsi intensiivuse mõõtmisest oodati ka FRET toimumist, kuid katse tulemused seda ei kinnitanud. Proove ergastati lainepikkusel 540(20) nm, emissiooni mõõdeti lainepikkustel 590(20) nm ja 675(50) nm kasutades PHERAstar plaadilugejat. FRET ülekande puhul oleks pidanud olema võimalik täheldada suhtelise FI (arvutatud valem 2 järgi) langust konkureeriva seonduja juuresolekul. Varasemad katsed TagRFP sisaldava liitvalguga imetajarakkudes viitavad, et FRET ülekande toimumine võib sõltuda fluorestseeruva TagRFP paiknemisest uuritava valgus N- või C-otsas (Manoharan *et al.*, 2015). Käesolevas töös tehtud katsetega saadud tulemused võivad viidata sellele, et antud liitvalgu ja ARC-1504 kompleksis paiknevad fluorofoorid (TagRFP ja PF647) teineteisest liiga kaugel (enam kui 10 nm), selleks et FRET nende vahel oleks detekteeritav. Kuigi FRET ülekannet katsetes mõõta ei õnnestunud, saab käesoleva töö raames sünteesitud liitvalku HisCK2 α RFP tulevikus kasutada biokeemilistes testides ning biofüüsikalistes uuringutes, näiteks sobivamate FRET omadustega sondide leidmiseks.

KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös töötati välja meetod fluorestseeruva valgu ja proteiinkinaasi aktiivse liitvalgu tootmiseks bakterirakkudes. Meetod võimaldab toota suurtes kogustes liitvalku, mis omab nii vajalikke fluorestsentsomadusi kui ka valkude fosforüülimise katalüüsiks vajalikku ensümaatilist aktiivsust.

Töös konstrueeriti plasmiid pET-HisCK2 α RFP, mille abil saab rakke transformeerida ja neid aktiivset liitvalku tootma indutseerida. Selle plasmiidiga transformeeritud bakterikultuur lüüsi ning eraldati lahustuv fraktsioon. Selles fraktsioonis leidis liitvalku HisCK2 α RFP, mis lisaks punasele monomeersele fluorestseeruvale valgule TagRFP ja proteiinkinaasile CK2 α sisaldas ka heksahistidiinmärgist liitvalgu võimalikuks eraldamiseks ja puhastamiseks.

Bakterite lüsaadi lahustavas fraktsioonis sisalduva liitvalgu struktuur tõestati *Western Blot* analüüsil, kasutades TagRFP ja CK2 α antikehi. Liitvalgu bioloogiliseks aktiivsuseks vajalik struktuur tehti kindlaks selle rCK2 α -ga kokkulangevate spektraalomaduste alusel ning võime järgi spetsiifiliselt siduda CK2 α aktiivsaiidi selektiivset fluorestsentsondi ARC-1504.

Katsete tulemused näitasid, et käesolevas töös kirjeldatud viisil on võimalik toota aktiivset liitvalku. Sellise liitvalguga saab teha edasisi biofüüsilisi ja –keemilisi katseid töötamaks välja uusi tehnoloogiaid ja ühendeid proteiinkinaaside uurimiseks.

SUMMARY

Production of protein kinase CK2 α fusion protein with red fluorescent protein TagRFP in bacteria

Toomas-Julius Lill

Protein kinases are enzymes which hold numerous physiological functions in the human organism by the virtue of phosphorylation of specific target proteins. Elevated activity of Protein kinase CK2 has been reported in several types of cancer. This makes CK2 an important candidate for cancer treatment studies.

In this thesis a method was developed and tested to produce an active fusion protein between a fluorescent protein and a human protein kinase in bacteria. This method can be used to produce large quantities of the fusion protein that has the desired fluorescent properties as well as the correct enzymatic activity for catalyzing phosphorylation reactions.

For transforming and inducing the expression of the desired fusion protein in bacteria, a plasmid named pET-HisCK2 α RFP was constructed. Bacterium containing this recombinant plasmid was grown and lysed. In the soluble fraction of the cell lysate, the recombinant protein called HisCK2 α RFP was detected. The fusion protein HisCK2 α RFP, consisting of a monomeric fluorescent protein TagRFP linked together with the protein kinase CK2 α , also has a N-terminal hexahistidine tag aimed to simplify future protein separation and purification.

The expected structure of the fusion protein present in the soluble fraction of the cell lysate was proven using Western Blot analysis with TagRFP and CK2 α specific antibodies. The correct structure needed for the biological activity of the fusion protein was confirmed by comparing the spectral properties of the fusion protein to the commercially available rCK2 α and the fusion protein's ability to bind with the CK2 α specific bi-substrate fluorescent probe ARC-1504.

In conclusion, the results of these tests confirmed that the method described in the thesis is suitable for production of the enzymatically active fusion protein. The protein produced has future potential in the development of new methods and substances for studying the role of protein kinases.

KIRJANDUSE LOETELU

Allende, J. E., Allende, C. C. (1995). Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. *FASEB. J.* 9: 313-323.

Biondi, R. M., Nebreda, A. R. (2003). Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem J.* 372: 1-13.

Bogoyevitch, M. A., Barr, R. K., Ketterman, A. J. (2005). Peptide inhibitors of protein kinases – discovery, characterisation and use. *Biochim. Biophys. Acta.* 1754: 79-99.

Bozulic, L., Morin, P., Hunter, T., Hemmings, B. A. (2007). Meeting report: targeting the kinome – 20 years of tyrosine kinase inhibitor research in Basel. *Sci STKE* 8.

Brown, T. A. (1995), *Gene Cloning- An Introduction*, 4th ed., Wiley-Blackwell: New Jersey, USA.

Cabrejos, M. E., Allende, C. C., Maldonado, E. (2004). Effects of phosphorylation by protein kinase CK2 on the human basal components of the RNA polymerase II transcription machinery. *J. Cell. Biochem.* 93: 2-10.

Clegg, R. M. (2009), *FRET and FLIM techniques* (ed. Gadella T.W.J.), *Föster resonance energy transfer – FRET what is it, why do it, and how it's done*. Oxford, 33: 1-57, Elsevier.

Clontech Laboratories, Inc. pDsRed2-C1 Vector Information.

Dhanasekaran, N., Reddy, E. P. (1998). Signaling by Dual Specificity Kinases. *Oncogene.* 17: 1447-1455.

Enkvist, E., Viht, K., Bischoff, N., Vahter, J., Saaver, S., Raidaru, G., Issinger, O. G., Niefind, K., Uri, A. (2012). A subnanomolar fluorescent probe for protein kinase CK2 interaction studies. *Org. Biomol. Chem.* 10(43): 8645-53.

Hansen, L. H., Knudsen, S., Sorensen, S. J. (1998). The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Curr. Microbiol.* 36 (6): 341-7.

- Johnston, I. M., Allison, S. J., Morton, J. P., Schramm, L., Scott, P. H., White, R. J. (2002). CK2 forms a stable complex with TFIIIB and activates RNA polymerase III transcription in human cells. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3757 – 3768.
- Kim, J., Kim, S. H. (2012). Druggability of the CK2 Inhibitor CX-4945 as an Anticancer Drug and Beyond. *Arch. Pharm. Res.* 8: 1293-1296.
- Klimecka, M., Muszyska, G. (2007). Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta. Biochim. Pol.* 54: 219-33.
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Lör, J., Stö, M. (2005). The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal.* 17: 675-89.
- Kramerov, A. A., Ljubimov, A. V. (2012). Focus on molecules: protein kinase CK2. *Exp .Eye. Res.* 101: 111-2.
- Lakowicz, J. R. (2006), *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer: New York, USA.
- Lavogina, D., Enkvist, E., Uri, A. (2010). Bisubstrate inhibitors of protein kinases: from principle to applications. *ChemMedChem.* 5(1): 23 -34.
- Leader, B., Baca, Q. J., Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7(1): 21-39.
- Lemeer, S., Heck, A. J. (2009). The phosphoproteomics data explosion. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13: 414–420.
- Lin, C. Y., Navarro, S., Reddy, S., Comai, L. (2006). CK2- mediated stimulation of Pol I transcription by stabilization of UBF-SL1 interaction. *Nucleic Acids Res.* 34: 4752-4766.
- Litchfield, D. W. (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J.* 369: 1-15.
- Meggio, F., Boldyreff, B., Marin, O., Pinna, L. A., Issinger, O. G. (1992). Role of the beta subunit of casein kinase-2 on the stability and specificity of the recombinant reconstructed holoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 204(1): 293-297.
- Merzlyak, E. M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M. E., Shcheglov, A. S., Fradkov, A. F., Gaintzeva, A., Lukyanov, K. A., Lukyanov, S., Gadella, T. W., Chudakov, D. M. (2007).

Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat. Methods*. 7: 555-557.

Niefind, K., Battistutta, R. (2013). Structural Bases of Protein Kinase CK2 Function and Inhibition. p. 3-61 In LA Pinna, *Protein Kinase CK2*, 1st ed., John Wiley & Sons, Inc, Ames, Iowa, USA.

Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., Mann, M. (2006). Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell*, 127: 635-648.

Panova, TB., Panov, K. I., Russell, J., Zomerdijs, J. C. (2006). Casein kinase 2 associates with initiation-competent RNA polymerase I and has multiple roles in ribosomal DNA transcription. *Mol. Cell. Biol.* 26: 5957-5968.

Pennisi, E. (2003). Gene counters struggle to get the right answer. *Science* 301: 1040–1041.

Pinna, L. A. (2002). Protein Kinase CK2: a challenge to canons. *J. Cell. Sci.*, 115: 3873-3878.

Rosano, G. L., Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advantages and challenges. *Front Microbiol.* 5: 172.

Sahdev, S., Khattar, S. K., Saini, K. S. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem.* 307: 249–264.

Samarkina, O. N., Popova, A. G., Gvozdk, E. Y., Chkalina, A. V., Zvyagin, I. V., Rylova, Y. V., Rudenko, N. V., Lusta, K. A., Kelmanson, I. V., Gorokhovatsky, A. Y., Vinokurov, L. M. (2008). Universal and rapid method for purification of GFP-like proteins by the ethanol extraction. *Protein Expr. Purif.* 65(1): 108-113.

Scharpfenecker, M., van Dinther, M., Liu, Z., van Bezooijen, R. L., Zhao, Q., Pukac, L., Lö, C. W., ten Dijke, P. (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci.* 120: 964-72.

Schwartz, P. A., Murray, B. W. (2011). Protein Kinase Biochemistry and Drug Discovery. *Bioorg. Chem.*, 39: 192-210.

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* 189: 8746–8749.

Siebold, C., Arnold, I., Garcia-Alles, L. F., Baumann, U., Erni, B. (2003). Crystal structure of the *Citrobacter freundii* dihydroxyacetone kinase reveals an eight-stranded alpha-helical barrel ATP-binding domain. *J. Biol. Chem.* 78(48): 48236-44.

Stano, N. M., Patel, S. S. (2004). T7 lysozyme represses T7 RNA polymerase transcription by destabilizing the open complex during initiation. *J. Biol. Chem.* 279: 16136-16143.

St-Denis, N. A., Litchfield, D. W. (2009). From birth to death: The role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 1817-1829.

Zhu, G., Fujii, K., Liu, Y., Codrea, V., Herrero, J., Shaw, S. (2005). A single pair of acidic residues in the kinase major groove mediates strong substrate preference for P-2 or P-5 arginine in the AGC, CAMK, and STE kinase families. *J. Biol. Chem.* 280: 36372-9.

Taylor, R. G., Walker, D. C. McInnes, R. R. (1993). *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res.* 21: 1677 -1678.

Tibes, R., Trent, J., Kurzrock, R. (2005). Tyrosine kinase inhibitors and the dawn of molecular cancer therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45: 357-84.

Valeur, B., Berberan-Santos, M. N. (2013), *Molecular Fluorescence: principles and applications*, 2nd ed., Wiley-VHC, Saksamaa.

Invitrogen Corporation (2006). *Fluorescence Polarization Technical Resource Guide. 4th ed.*, <https://tools.lifetechnologies.com/downloads/FP1.pdf>

Invitrogen Corporation (2006). *Max Efficiency DH5 alpha Competent Cells manual.* <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/18258012.pdf>

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Toomas Julius Lill (sünnikuupäev: 11.06.1987)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Proteiinkinaas CK2 α ja punase fluorestseeruva valgu aktiivse liitvalgu tootmine bakterirakkudes“ mille juhendajad on MSc. Ganesh Babu Manoharan ja PhD. Asko Uri,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 10.08.2015