

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Äädikakärbse valgu Mus101 rolli genoomse DNA replikatsiooni initsieerimises

Bakalaureusetöö

12 EAP

Maia-Triin Melsas

Juhendaja PhD Nele Tamberg

Kaasjuhendaja PhD Ivar Ilves

TARTU 2019

Äädikakärbse valgu Mus101 roll genoomse DNA replikatsiooni initsieerimises

Äädikakärbse valk Mus101 on oluline laadimisvalk genoomse DNA replikatsiooni initsieerimisel, kuna see aitab laadida kromatiinile teisi regulatoorseid valke ja on vajalik CMG kompleksi moodustamisel. Genoomse DNA replikatsiooni on palju uuritud pärmis, aga kõrgemates eukariootides on selle regulatsioon veel põhjalikult uurimata. Siinne bakalaureusetöö on osa projektist, mille eesmärk on uurida kõrgemate eukariootide replikatsiooni initsieerimist ning valgu Mus101 rolli selles protsessis. Selle jaoks loodi töös rekombinantsed bakuloviirused, mille abil ekspresseerida valku Mus101, et analüüsida, millised domeenid on vajalikud teiste replikatsioonis osalevate regulaatorvalkudega seondumiseks. Planeeriti üheksa rekombinantset bakuloviirust, millest õnnestusid viis ja neid saab kasutada edasistes projektides.

Märksõnad: valk Mus101, replikatsiooni initsiatsioon, BRCT domeenid, rekombinantsed bakuloviirused

CERCS B200 Tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia

The role of fruit flies protein Mus101 in genomic DNA replication initiation

Fruit flies protein Mus101 is an important loading protein in genomic DNA replication initiation, because it helps other regulatory proteins to bind with chromatin and is vital for forming the CMG complex. Genomic DNA replication is thoroughly studied in yeast, but in metazoans its mechanisms are still unclear. This bachelor thesis is part of the project that aims to research metazoans replication initiation by using the protein Mus101. For that this thesis created recombinant baculoviruses that can be used to analyse what domains are needed to bind new proteins and to which domains they bind with. The plan was to create nine recombinant baculoviruses and five of them were created successfully and can be used in further research.

Keywords: protein Mus101, replication initiation, BRCT domains, recombinant baculoviruses

CERCS B200 Cytology, oncology, cancerology

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Genoomse DNA replikatsiooni initsiatsioon eukariootides	8
1.1.1 Genoomse DNA replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine.....	9
1.1.2 Replikatiivse helikaasi aktiveerimine	10
1.2 DNA replikatsiooni initsiatsiooni valgud hulkraksetes	12
1.2.1 TopBP1/XCut5/Mus101	12
1.2.2 Treslin.....	16
1.2.3 RecQL4.....	16
1.3 Mudelorganism äädikakärbses	17
1.4 Bakuloviiruse geeniekspressiooni süsteem	17
2. EKSPERIMENTAALOSA	19
2.1 Töö eesmärgid	19
2.2 Töö materjalid ja meetodika.....	19
2.2.1 Mus101 valgu ekspresioonikonstruktide disain.....	19
2.2.2 Kloneerimine	21
2.2.3 Bac-to-Bac™ bakuloviiruse ekspresioonisüsteem.....	26
2.2.4 Bakmiidse DNA transfekterimine SF9 putukarakkudesse	28
2.2.5 Western blot.....	29
2.3 Tulemused ja arutelu	30
2.3.1 Rekombinantseid valke kodeerivate nukleotiidsete järjestuste kloneerimine pFastBac™ 1 plasmidi.....	33
2.3.2 Rekombinantse bakmiidide loomine	39
2.3.3 Rekombinantse bakmiidi transfekterimine SF9 rakkudesse	40
2.3.4 Rekombinantse bakuloviiruste loomine ja rekombinantsete valkude ekspresiooni kontroll	40
KOKKUVÕTE	43
RESÜMEE/SUMMARY	44
TÄNUSÕNAD	46

KIRJANDUSE LOETELU.....	47
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	51
LIHTLITSENTS.....	52

KASUTATUD LÜHENDID

AAD – ATR-i aktiveeriv domeen (*ATR activation domain*)

ATR – ATM-Rad3'ga seotud (*ATM-Rad3-related*)

BRCA1 – Rinnavähi geen 1 (*breast cancer gene 1*)

BRCT – BRCA1 karboksüterminaalne (BRCA1 C-terminal)

Cdc6/7/45 – Raku jagunemise tsükkel 6/7/45 (*cell division cycle 6/7/45*)

CDK – Tsükliinist sõltuv kinaas (*cyclin dependent kinase*)

Cdt1 – Raku jagunemise tsüklist 10 sõltuv transkript 1 (*cell division cycle 10-dependent transcript 1*)

CMG – Cdc45-Mcm2-7-GINS kompleks

Ctf4 – DNA polümeraasi alfat siduv valk (*DNA polymerase alpha-binding protein*)

Dbf4 – *dumbbell forming 4*

DDK – Dbf4-st sõltuv kinaas (*Dbf4-dependent kinase*)

Dpb11 – DNA polümeraas B II (*DNA polymerase B II*)

E2F1 – E2F transkriptsiooni factor 1 (*E2F transcription factor 1*)

GINS – *go, ichi, ni, san* (jpn viis, üks, kaks, kolm) kompleks

HRP – Mädarõika peroksüdaas (*Horseradish peroxidase*)

Mcm2-7/10 – Minikromosoomi hooldavad valgu 2-7/10 (*minichromosomal maintenance proteins 2-7/10*)

Mdc1 – Kahjustatud DNA *checkpoint*'i valgu 1 vahendi (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*)

Mus101 – Mutageeni tundlik 101 (*mutagen-sensitive 101*)

ORC – *Origin*'i äratundev kompleks (*origin recognition complex*)

Pol ϵ – DNA polümeraas ϵ (*DNA polymerase ϵ*)

pre-LC – Prelaadimis kompleks (*pre-loading complex*)

pre-RC – Prereplikatiivne kompleks (*pre-replicative complex*)

Psf1/2/3– Sld5 partner 1/2/3 (*partner of Sld5 1/2/3*)

ReQL4 – ReQ-laadne helikaas 4 (*RecQ like helicase 4*)

SF9 – *Spodoptera frugiperda* 9

Sld2/3/5/7 – Sünteetiliselt letaalne koos Dpb11-ga 2/3/5/7 (*synthetically lethal with Dbp11 2/3/5/7*)

Ticrr – TopBP1-ga interakteeruv *checkpoint*'i ja replikatsiooni regulaator (*TOPBP1 interacting checkpoint and replication regulator*)

TopBP1 – Inimese topoisomeraasi II β siduv valk (*human topoisomerase II β binding protein*)

Xcut5 – *Xenopus cutinase 5*

SISSEJUHATUS

Genoomse DNA replikatsioon on omane kõikidele organismidele ja selle täpne läbi viimine on väga oluline, et hoida ära mutatsioone, mis võivad kahjustada organismi toimetulekut. Genoomse DNA replikatsioonikompleksi üks olulisemaid komponente on replikatiivne DNA helikaas. Genoomse DNA replikatsioonil osalev helikaasikompleks moodustatakse ja aktiveeritakse replikatsiooni initsieerimisel. Replikatsiooni initsieerimine on rangelt reguleeritud ja jaguneb sellepärast kahte etappi. Esimeses etapis laetakse kromatiinile inaktiivne Mcm2-7 heksameer. Teises etapis laetakse Mcm2-7 kompleksile valgud Cdc45 ja GINS, mille tulemusena moodustub aktiivne replikatiivne helikaasikompleks CMG (Cdc45-Mcm2-7-GINS). Genoomse DNA replikatsiooni initsiatsioonil ning CMG kompleksi moodustumisel mängib kesket rolli pagaripärmi valk Dpb11.

Genoomse DNA replikatsiooni on põhjalikult uuritud pagaripärmis, kuna see on lihtne üherakuline mudelorganism. Replisoomi põhikomponendid on evolutsiooni jooksul tugevasti konserveerunud, kuid regulatoorsed valgud on kõrgemates eukarüootides muutunud keerulisemaks ja replikatsiooni regulatsioon vajab endiselt põhjalikumat uurimist. Ivar Ilvese laboris tehtud uuringute eesmärgiks on kõrgemate eukarüootide replikatsiooni initsiatsiooni üksikasjalikum uurimine ja sellest tulenevalt keskendutakse ühele replikatsiooni initsiatsiooni kesksemale valgule Dpb11-le. Pagaripärmi valk Dpb11 on oluline faktor replikatsiooni initsieerimisel, kuna see laeb enda külge teisi valke ja aitab neil seonduda kromatiiniga. Valgu Dpb11 funktsionaalsed homoloogid on inimeses TopBP1 ja äädikakärbses Mus101. Siinne töö aitab kaasa valgu Mus101 uurimisele, võimaldades saada uudset informatsiooni replikatsiooni initsiatsiooni kohta ning leida seni avastamata valgu Mus101 interaktsioonipartnereid.

Bakalaureusetöö teoreetilises osas antakse ülevaade genoomse DNA replikatsiooni initsiatsiooni mehhanismist ja selles osalevatest valkudest. Samuti tuuakse esile pagaripärmi valgu Dpb11 ja selle funktsionaalsete homoloogide vahelised sarnasused ning erinevused. Eksperimentaalselt kirjeldatakse, kuidas loodi äädikakärbses valgu Mus101 rekombinantseid bakuloviiruseid, millelt ekspresseeritud rekombinantsete valkude abil oleks võimalik põhjalikumalt uurida replikatsiooni initsieerimisel osalevaid valke ja määrata detailselt nende seondumist Mus101 valguga. Siinne töö tehti Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis Ivar Ilvese uurimisrühmas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Genoomse DNA replikatsiooni initsiatsioon eukarüootides

Genoomse DNA replikatsioon leiab aset kõigis elusorganismides ja see jaguneb kolmeks etapiks: initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon (Heinaru, 2012). DNA replikatsioon toimub kahesuunaliselt ehk moodustuvad kaks replikatsioonikahvlit, mille ülesanne on keerata lahti ahelad ning sünteesida uued komplementaarsed DNA ahelad. Lahtikeerdumist viivad läbi DNA helikaasid ja uue DNA ahela sünteesivad DNA polümeraasid, mida on eukarüootides kolm: polümeraas α , polümeraas δ ja polümeraas ϵ (Heinaru, 2012). Korrektselt DNA paljundamisest sõltub raku jätkusuutlikuks ja normaalne funktsioneerimine. Nimelt on näidatud, et kahjustatud replikatsioonikahvel ja replikatsiooni stressist põhjustatud kahjustused DNA-s on seotud kromosoomide struktuursete ning arvuliste mutatsioonidega, mis võivad omakorda viia vähi tekkeni (Burrell *et al.*, 2013). See ilmestab DNA replikatsiooni uurimise ja seda läbiviivate faktorite leidmise olulisust, kuna need aitavad paremini mõista tingimusi, mis on vajalikud korrektseks DNA replikatsiooniks.

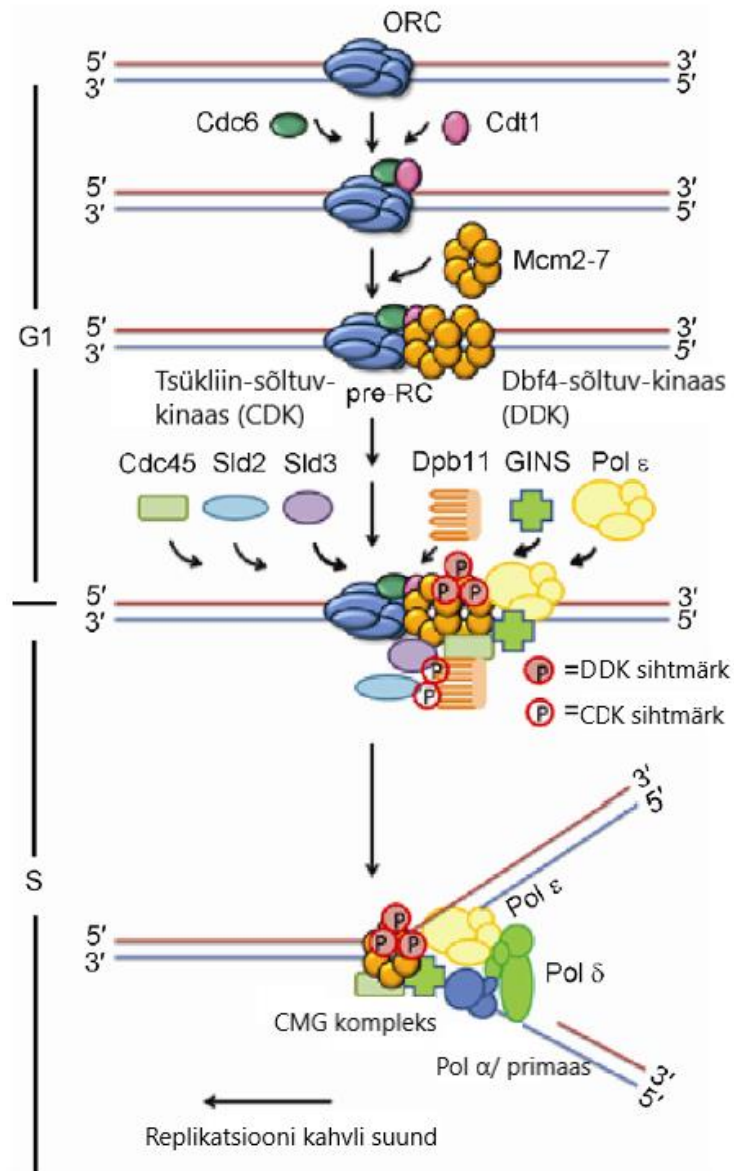
Siinses töös lähtutakse genoomse DNA replikatsiooni kirjeldamisel pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) põhjal loodud mudelist, kuna DNA replikatsiooni protsessi mõistmisel on see enim uuritud mudelorganism ja selleks vajalikud faktorid on pärmis evolutsiooniliselt konserveerunud (Masai *et al.*, 2010).

Replikatsiooni toimumise eelduseks on replisoomi moodustumine, mis on mitmevalguline kompleks ja see tekib DNA-l olevatele *origin* järjestustele (Remus ja Diffley, 2009). Pagaripärmis on *origin*'id 11-17 aluspaari pikkused konserveerunud järjestused, mida iseloomustavad: adeniini ja tümiini nukleiinhapete rikkad järjestused, dinukleotiidsed kordused ning ebasümmeetrilised püriini ja pürimidiini järjestused (Masai *et al.*, 2010). *Origin*'idele seonduvad erinevaid valgukompleksid, mis lõpptulemusena initsieerivad replikatsiooni (Hua ja Orr-Weaver, 2017). Eukarüootides on mitu *origin* kompleksi, kuna nende genoomid on väga suured ja selleks, et replikatsioon toimuks kiirelt ning efektiivselt on vaja omada mitut replikatsiooni alguspunkti (Remus ja Diffley, 2009). Mitme *origin*'i omamisel on aga väga oluline nende regulatsioon. Selle tarvis on eukarüootides jagunenud replikatsiooni initsieerimine kahte faasi, mille abil saab eristada replitseeritavat ja mitte replitseeritavat DNA-d (Blow ja Dutta, 2005). Täpsemini jaguneb replikatsiooni alustamine kaheks etapiks: *origin*'i litsenseerimiseks ja *origin*'i aktiveerimiseks (Yekezare *et al.*, 2013). Esimene etapp toimub rakutsükli hilise M-faasi ja varase G1-faasi jooksul, mille ajal seonduvad kromatiinile inaktiivne

DNA helikaasi mootor (Tognetti *et al.*, 2015) (Joonis 1). S-faasis on selle laadimine aga takistatud, mis kindlustab, et replikatsioon toimub ainult ühe korra rakutsükli jooksul (Tognetti *et al.*, 2015). Teine etapp leiab aset S-faasis, mille ajal lisatakse inaktiivsele helikaasi mootorile abistavaid valke, mis aktiveerivad helikaasi, et see saaks hakata DNA-d lahti keerama (Tognetti *et al.*, 2015).

1.1.1 Genoomse DNA replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine

Replikatsiooni alguses toimub prereplikatiivse kompleksi moodustumine (pre-RC, ingl *pre-replicative complex*), mis koosneb ORC-ist (ingl *origin recognition complex*), Cdc6-st (ingl *cell division cycle 6*), Mcm2-7-st (ingl *minichromosome maintenance proteins 2-7*) ja Cdt1-st (ingl *cell division cycle 10-dependent transcript 1*) (Zegerman, 2015). Esimesena seondub replikatsiooni *origin*'dele ORC kompleks, siis sellele seondub Cdc6 ja järgnevad Cdt1 koos Mcm2-7-ga (Masai *et al.*, 2010) (Joonis 1). Seejärel eemaldub kompleksist Cdt1, mille järel saab Mcm2-7 heksameer paremini kinnituda ORC-DNA kompleksile (Zegerman, 2015). Kaheahelalisele DNA-le seotakse kaks Mcm2-7 heksameeri, mis on omavahel seotud *head-to-head* orientatsioonis ja ahelate lahti sulamisel saab kumbki ahel ühe heksameeri (Gambus *et al.*, 2011; Ishimi, 2018). Ühtlasi laetakse ühele ORC-ile mitu Mcm2-7 kompleksi, et kui esimesed replikatsiooni kahvlid rakutsükli jooksul hävinevad, siis on koheselt võimalik moodustada uued (Tognetti *et al.*, 2015). Peale selle on Mcm2-7 kompleks ise väga tugev ja peab vastu kõrgetele soola kontsentratsioonile, mis on vajalik liikumisel G1-faasist S-faasi, kuna S-faasis on uute komplekside moodustamine inhibeeritud (Tognetti *et al.*, 2015). *Origin*'i litsentseerimise lõpuks on pre-RC kompleks veel inaktiivne ja see aktiveerub alles S-faasis, kui sellele seonduvad teised replikatsiooni faktorid (Tognetti *et al.*, 2015).



Joonis 1. Genoomse DNA replikatsiooni initsieerimine eukariootides. Replikatsiooni initsiatsioon jaguneb kaheks etapiks: litsenseerimine ja aktiveerimine. Esimesena seondub *origin* alale ORC kompleks, kuhu lisanduvad valgud Cdc6 ja Cdt1. Nende külge haakub inaktiivne replikatiivne helikaasi mootor Mcm2-7 heksameer ja tekib pre-RC. Helikaasi aktiveerimiseks on vajalik CDK kinaas ja DDK kinaas. DDK fosforüleerib Mcm2-7 subühikuid, et sinna saaksid kinnituda Cdc45 ja Sld3. Lisaks moodustub pre-LC, mille puhul CDK fosforüleerib Sld2 ja Sld3, mis kinnituvad valgu Dpb11 BRCT domeenidele ning domeenide vahelisele alale seondub ka GINS kompleks ning Pol ϵ . Pre-LC kinnitub Pre-RC-le, mille tulemusena tekib CMG kompleks ja helikaas aktiveerub ning hakkab DNA-d lahti keerama. Joonis on tehtud Wu *et al.*, 2014 põhjal.

1.1.2 Replikatiivse helikaasi aktiveerimine

Replikatsiooni edasine initsiatsioon litsenseeritud *origin*'ilt saab toimuda ainult sisenemisel S-faasi, kuna selleks on vaja Dbf4-st (ingl *dumbbell forming 4*) sõltuvat kinaasi (DDK, ingl *Dbf4-*

dependent kinase) ja tsükliinist sõltuvat kinaasi (CDK, ingl *cyclin dependent kinase*) ning mõlemad on G1-faasis inhibeeritud (Zegerman, 2015). DDK koosneb Cdc7 katalüütilisest ja Dbf4 regulaatorsest subühikutes, mille viimase kontsenratsioon tõuseb G1- ja S-faasi piiril, on kõrgeim S-faasis ja langeb hilses M-faasis (Tanaka ja Araki, 2013). DDK põhiline roll on fosforüleerida Mcm2-7 helikaasi ja see aktiveerida, et heksameerile saaksid lisanduda teised kofaktorid (Zegerman, 2015). Selle tarbeks DDK interakteerub Mcm2-7-ga valkude Dbf4 ja Cdc7 abil, mille puhul Dbf4 seondub subühikuga Mcm2 ning Cdc7 seondub omakorda subühikutega Mcm4/ Mcm5 (Tognetti *et al.*, 2015).

Enne kui saab tekkida aktiivne replikatiivne helikaas peavad Mcm2-7 heksameerile seonduma lisaks veel viis ko-faktorit: Cdc45 valk (ingl *cell division control protein 45*) ja nelja subühikuga GINS kompleks (jpn *go, ichi, ni, san*; viis, üks, kaks, kolm), mis lõpuks moodustavad kokku Cdc45-Mcm2-7-GINS (CMG) kompleksi (Zegerman, 2015). GINS koosneb subühikutest Sld5 (ingl *synthetically lethal with Dbp11 5*), Psf1 (ingl *partner of Sld5 1*), Psf2 ja Psf3 ning osaleb nii replikatsiooni initsiatsioonil kui ka elongatsioonil (Muramatsu *et al.*, 2010). Esimesena seondub Cdc45 Sld3/Sld7 kompleksi vahendusel pre-RC-le (Muramatsu *et al.*, 2010) (Joonis 1). Teisena seondub GINS osana prelaadimis kompleksist (pre-LC, ingl *pre-loading complex*) (Muramatsu *et al.*, 2010) (Joonis 1). Pre-LC koosneb peale GINS-i veel teistest valkudest nagu Dpb11 (ingl, *DNA polymerase B II*), DNA polümeraas ϵ (Pol ϵ , ingl *DNA polymerase ϵ*) ja Sld2 (Tanaka ja Araki, 2013). CMG kompleksi moodustamise tarvis fosforüleerib CDK kinaas valgud Sld2 ja Sld3, mis on vajalik nende seandumiseks Dpb11 valgu BRCA1 karboksüterminaalsetele (BRCT) domeenidele (Tanaka ja Araki, 2013) (Joonis 1). Need domeenid käituvad kui fosfopeptiide siduvad alad (Tanaka ja Araki, 2013). Sld3 seondub valgul Dpb11 domeenidele BRCT1-2 ja Sld2 seondub domeenidele BRCT3-4 (Zegerman, 2015). Omakorda liitub valguga Dpb11 ka GINS kompleks, mis kinnitub Sld2 ja Sld3 vahele jäävale seandumisalale, mida nimetatakse GINI regiooniks (Tanaka *et al.*, 2013). Dpb11 on oluline valk, kuna see laeb teisi valke enda külge ja aitab neil seonduda kromatiiniga (Kumagai *et al.*, 2010). Dpb11 ja sellele kinnituvad valgud interakteeruvad eraldiseisvana ja liituvad kromatiiniga Sld3-Cdc45 kompleksi abil, kus on ühenduslüliks fosforüleeritud Sld3 seandumine Dpb11-ga (Masai *et al.*, 2010; Muramatsu *et al.*, 2010). Ühtlasi moodustub pre-LC kinnitumisel pre-RC-le ka CMG kompleks ja lõplikuks replikatsiooni kompleksi aktiveerimiseks on vaja veel Mcm10-ne, DNA polümeraasi δ ning teiste oluliste valkude seandumine (Bruck *et al.*, 2015; Tognetti *et al.*, 2015). Pre-LC kompleksis olev polümeraas ϵ viib läbi juhtahela replikatsiooni ja polümeraas δ osaleb mahajääva ahela replikatsioonis (Bruck *et al.*, 2015) (Joonis 1). Viimasena lisandub valgu Ctf4 (ingl *DNA polymerase alpha-binding*

protein) abiga DNA polümeraas α /primaas, mis annab mahajääva ahela replikatsiooniks esimese algjärjestuse (Simon *et al.*, 2014) (Joonis 1). Sellega lõppeb DNA replikatsiooni initsiatsioon ja saab käivituda replikatsioon.

1.2 DNA replikatsiooni initsiatsiooni valgud hulkraksetes

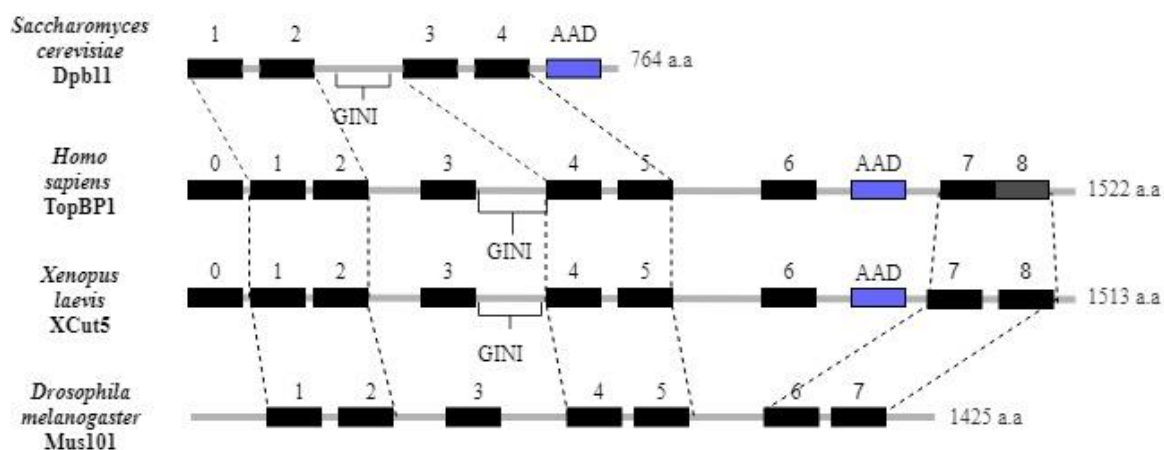
Replikatsiooni alustamiseks vajalik mehhanism ja replikatiivse helikaasi subühikud Mcm2-7, Cdc45 ja GINS on eukarüootides tugevalt konserveerunud, kuid pre-LC kompleksi jaoks vajalikud faktorid nagu Dpb11, Sld2 ja Sld3 on evolutsiooni jooksul edasi arenenud (Tanaka ja Araki, 2013). Nende valkude funktsionaalsed homoloogid kõrgemates eukarüootides on vastavalt TopBP1 (ingl *human topoisomerase II β binding protein*)/XCut5 (ingl *Xenopus cutinase 5*)/Mus101 (ingl *mutagen-sensitive 101*), ReQ4/ReQL4 (ingl *RecQ like helicase 4*) ja Treslin/Ticrr (ingl *TOPBP1 interacting checkpoint and replication regulator*) (Tanaka ja Araki, 2013). Need homoloogid on pagaripärmis esinevatest valkudest tunduvalt suuremad, kuid nukleotiidsetes järjestustes on leitud organismide vahelisi sarnasusi (Tanaka ja Araki, 2013).

1.2.1 TopBP1/XCut5/Mus101

Dpb11 on oluline replikatsiooni alustamisel, kuna ta käitub laadimisvalguna, mis aitab laadida replikatiivse helikaasi aktiveerimiseks vajalikke subühikuid kromatiinile. Lisaks on valgul Dpb11 oluline roll kahjustatud DNA signaali edasikandmisel. *Saccharomyces cerevisiae* valgu Dpb11 homoloogid hulkraksetes organismides on inimeses ehk *Homo sapien*'is TopBP1, äädikakärbses ehk *Drosophila melanogaster*'is Mus101 ja kannuskonnas ehk *Xenopus laevis*'es Xcut5 (Sokka *et al.*, 2010). Dpb11 ja tema funktsionaalsed homoloogid omavad nii ehituselt kui ka funktsioonilt mitmeid sarnasusi ning erinevusi. Kõigepealt võrreldakse töös valkude ehituslikke ja seejärel funktsionaalseid omadusi.

TopBP1 on BRCA1 (ingl *breast cancer gene 1*) karboksüterminaalseid domeene omav valk (Garcia *et al.*, 2005). BRCA1 valgul, mida seostatakse päriliku rinna- ja munasarja vähiga, leiti kõige esimesena karboksüterminaalses osas alasid, mida hakati nimetama BRCT kordusteks (Glover *et al.*, 2004). Hiljem on leitud sarnaseid BRCT kordusi ka teistes valkudes ja need moodustavad valkude perekonna, mille liikmed on ka Dpb11 ja selle funktsionaalsed homoloogid (Glover *et al.*, 2004). BRCT kordused koosnevad konserveerunud hüdrofoobsetest aminohapetest ja glütsiini jääkidest ning nende baasstruktuur on hästi säilinud kõigis kordustes (Glover *et al.*, 2004). BRCT domeenide peamiseks funktsiooniks on moodustada valk-valk interaktsioone, mis on rakus sageli fosforüleerimise kaudu reguleeritud ja mida viivad läbi fosfataasid ning kinaasid (Wardlaw *et al.*, 2014). BRCT domeenide järjestused on tugevalt

konserveerunud läbi mitmete organismide. Näiteks pagaripärmi Dpb11 domeenid BRCT1–2 on järjestuselt kõige sarnasemad valgu TopBP1 domeenidega BRCT1–2 ning Dpb11 domeenid BRCT3–4 on järjestuselt sarnased TopBP1 domeenidega BRCT4–5 (Garcia *et al.*, 2005) (Joonis 2). Võiks nimetada veel ka Mus101 valgu sarnasuse TopBP1-ga, mille puhul Mus101 valgu aminoterminaalne osa on 24% identne TopBP1-ga, mille alla kuuluvad domeenid BRCT1–5 ja Mus101 valgu karobksükterminaalne osa on 33% identne TopBP1-ga, sisaldades BRCT domeene 6–7, mis võrduvad inimese homoloogis domeenidega BRCT7–8 (Yamamoto *et al.*, 2000). Teiseks sarnasuseks on see, et Dpb11, TopBP1 ja Xcut5 omavad kõik ATR-i aktiveerimise domeeni (AAD, ingl *ATR activation domain*), mis asub hulkraksetes organismides domeenide BRCT6 ja BRCT7 vahelisel alal ning pärmides domeeni BRCT4 järel (Wardlaw *et al.*, 2014) (Joonis 2). Kuigi homoloogid on ehituselt sarnased, siis on evolutsiooni jooksul tekkinud ka olulised muutused. Peamised erinevused on uute BRCT domeenide lisandumise kaudu valgu pikenemine ja replikatsiooni initseerimiseks vajalike domeenide muutumine. Evolutsiooni jooksul on tekkinud juurde domeenid BRCT0, BRCT3 ja BRCT6–8, mis võivad omada kõrgemate eukarüootsete rakkude jaoks tähtsaid lisafunktsioone (Garcia *et al.*, 2005) (Joonis 2). Peale selle on valgu Xcut5 domeenid BRCT0–3 piisavad, et initsieerida DNA replikatsioon, kuid valgus Dpb11 on replikatsiooni initseerimiseks vajalikud kõik domeenid (Kumagai *et al.*, 2010). Lisaks erinevad osaliselt valgu Dpb11 ja tema funktsionaalsete homoloogide BRCT domeenid, mille külge laaditakse teisi replikatsioonifaktoreid (Wardlaw *et al.*, 2014)



Joonis 2. Erinevate Dpb11 funktsionaalsete homoloogide skemaatiline ülesehitus. Joonisel on kujutatud Dpb11 ja selle funktsionaalsete homoloogide BRCT domeene sisaldavad järjestused. Paremalt on ära toodud iga valgu aminohappiline pikkus. Mustade kastidega on märgitud BRCT domeenid ja nende kohale on kirjutatud domeeni number. Siniste kastidega on märgitud AAD domeenid. Joonisel on näidatud ka GINI regioonid, kuhu seondub valgukompleks GINS. Punktiirjoontega on näidatud BRCT domeenide konserveerumist.: Dpb11 BRCT1–2 on sarnased teiste valkude BRCT1–2 domeenidega ja Dpb11 BRCT3–4 on sarnased teiste valkude BRCT4–5 domeenidega. Lisaks on konserveerunud omavahel TopBP1 ja XCut5 BRCT7–8 ja Mus101 domeenid BRCT6–7. Valgul Mus101 puuduvad BRCT6 ja AAD domeenidele vastavad järjestused. Joonis on koostatud Garcia *et al.*, 2005 ja Tanaka *et al.*, 2013 põhjal.

Homoloogide funktsionaalseks sarnasuseks võiks nimetada seda, et nad moodustavad pre-LC kompleksi ja on seega olulised replikatsiooni initsieerimisel (Garcia *et al.*, 2005; Wardlaw *et al.*, 2014). TopBP1 valgu ja selle homoloogide ülesanne on initsieerida DNA replikatsioon, kus see aitab kromatiinile laadida faktoreid Cdc45, RecQ4/RecQL4, Treslin ning Pol ϵ (Tanaka ja Araki, 2013). Sarnasus on ka Sld3/Treslin'i laadimisel. Sld3 aitab valgul Cdc45 osaleda CMG kompleksi moodustumisel ja selle homoloog kõrgemates eukarüootides on Treslin/Ticrr, väljaarvatud *Drosophila melanogaster*, kus Sld3 homoloogi ei ole veel leitud. Sld3/Treslini seondumine on tugevasti konserveerunud, kuna nii valgul Dpb11, TopBP1 ja Xcut5 seonduvad need domeenidele BRCT1–2 (Boos *et al.*, 2011; Kumagai *et al.*, 2010). Seevastu erinevus hulkraksete ja pärmide replikatsiooni algatamisel on näiteks valgu Cdc45 seondumine, kus *Saccharomyces cerevisiae*'s ei sõltu Cdc45 kromatiinile laadimine valgust Dpb11, kuid *Homo sapiens*'is ja *Xenopus laevis*'es vajab Cdc45 kromatiinile kinnitumisel vastavalt valke TopBP1 ja Xcut5 (Hashimoto ja Takisawa, 2003; Tanaka ja Araki, 2013). Cdc45 kinnitub valgus TopBP1 domeenidele BRCT0–2 ja BRCT6 (Tanaka ja Araki, 2013). Teine erinevus on see, et erinevalt pärmidest toimub kõrgemates eukarüootides kromatiiniga seondumine CDK kontsentratsioonist sõltuvalt (Tognetti *et al.*, 2015). Nimelt madala kontsentratsiooni juures interakteerub Xcut5 kromatiiniga ORC kompleksi kaudu ja kõrge kontsentratsiooni juures seondub see pre-RC kompleksi kaudu, kuid replikatsiooni initsiatsioon saab toimuda mõlema kontsentratsiooni puhul (Tognetti *et al.*, 2015).

Lisaks replikatsiooni initsieerimisele on valgul Dpb11 ja selle funktsionaalsetel homoloogidel ka teisi tähtsaid funktsioone. Need on olulised ka DNA kahjustuste ja replikatsiooni stressi *checkpoint*'ide aktiveerimisel (Wardlaw *et al.*, 2014). *Checkpoint*'id on signaalirajad, mis kontrollivad rakutsükli normaalset toimimist ja homeostaasi (Barnum ja O'Connell, 2014). *Checkpoint*'i aktivatsioon aeglustab rakutsükli selleks, et DNA parandamiseks vajalikud mehhanismid suudaksid kahjustuse eemaldada enne geneetilise materjali edasikandumist

tütarrakkudesse (Abraham, 2001). DNA kahjustuste parandamisel fosforüleeritakse ja aktiveeritakse palju kinaase, millest üks on ATR (ingl *ATM-Rad3-related*) poolt aktiveeritav kinaas Chk1 (ingl *checkpoint kinase 1*), mille roll on stabiliseerida replikatsiooni kahvlid ja peatada teiste DNA helikaaside aktiveerumised (Parrilla-Castellar *et al.*, 2004). Chk1 aktiveerumiseks seonduvad kromatiiniga üksteisest sõltumatult ATR-ATRIP kompleks, 9-1-1 kompleks (Rad9-Hus1-Rad1 valkude kompleks) ja valk Claspin (Parrilla-Castellar *et al.*, 2004), mille puhul Rad9 seondub valguga TopBP1 domeenide BRCT0–2 kaudu (Wardlaw *et al.*, 2014). Lisaks suurendab TopBP1 kinaasi ATR aktiivsust ja TopBP1 regulatsiooni vähenemine ei lase fosforüleerida ATR kinaasi sihtmärkidel nagu näiteks Chk1 (Sokka *et al.*, 2010). ATR-i aktiveerivaks domeeniks valgus TopBP1 ja Xcut5-s on domeen AAD (Sokka *et al.*, 2010).

Tabel 1. Dpb11 ja selle homoloogide interaktsioonipartnerid ning seondumises osalevad domeenid. Kõige vasakpoolsemas tulbas on toodud Dpb11 ja selle funktsionaalsed homoloogid. Ülemises reas on märgitud domeenid. Domeenide alla on märgitud nendele domeenidele seonduvad faktorid. Pagaripärmi valkude Rad9 ja Dcd1 juurde on kirjutatud väiksemas kirjas nende valkude inimeses asuvad ortoloogid. Osade valkude kõrvale on märgitud (3–4)/(3–6), mis näitab, et see valk seondub domeenidele BRCT3–4 või BRCT3–6. Seonduvate valkude funktsioonid: Topoisomeraasid teevad ahelatesse lühiajalisi katkeid, vähendades ahelate lahtikeerumisel esinevaid pingeid (Bush *et al.*, 2015), Mdc1 (ingl *mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) vallandab seondumisel signaalide kaskaadi (Wardlaw *et al.*, 2014) ja E2F1 (ingl *E2F transcription factor 1*) on vajalik rakutsükli vahelisel liikumisel G1-faasist S-faasi ja reguleerib transkriptsiooni *checkpoint*'e (Garcia *et al.*, 2005). Tabel on koostatud Boos *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2016; Garcia *et al.*, 2005; Kumagai *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2008; Zegerman, 2015; Tanaka *et al.*, 2013; Wardlaw *et al.*, 2014; Matsuno *et al.*, 2006; Ohlenschläger *et al.*, 2012 põhjal

	BRCT0-2	BRCT3	BRCT4-5	BRCT 6	AAD	BRCT7-8
Dpb11 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sld3, Rad9 ^{53BP1}	Sld2, Ddc1 ^{Rad9} (3-4)	Sld2, Ddc1 ^{Rad9} (3-4)			
TopBP1 <i>Homo sapiens</i>	Treslin, Rad9, Cdc45		Mdc1, 53BP1	Cdc45, E2F-1	ATR/ ATRIP	RecQL4
Xcut5 <i>Xenopus laevis</i>	Rad9, Treslin, NBS1, CtIP	MRN(3-6)	MRN (3-6)	MRN(3-6)	ATR/ ATRIP	RecQL4
Mus101 <i>Drosophila melanogaster</i>	Topo II					

Valgul TopBP1 on avastatud seoseid rinnavähiga (Wardlaw *et al.*, 2014). TopBP1 heterosügootsel polümorfismil, mille puhul toimub mutatsioon domeenide BRCT2 ja BRCT3 vahel, on leitud korrelatsioon kõrgema riskiga rinna- ja munasarjavähi tekkimisele (Wardlaw *et al.*, 2014). Valgu TopBP1 olulisus seoses vähiga ei ole veel selge, aga andmed on näidanud, et erinevate TopBP1 ekspressiooni tasemetega ja vähkkasvaja tekke vahel on olemas seosed.

1.2.2 Treslin

Pagaripärmi valgu Sld3 funktsionaalseks homoloogiks kõrgemates eukariootides on pakutud valku Treslin (Kumagai *et al.*, 2011). Valkudel Sld3 ja Treslin on sarnaseid funktsioone: nad on olulised replikatsiooni initsieerimisel, on võimelised seonduma kromatiinile ilma kinaasi CDK fosforüleerimiseta, osalevad Cdc45 laadimisel kromatiinile ja seonduvad fosforüleerituna valgule Dpb11/TopBP1 (Kumagai *et al.*, 2011). Treslin seondub TopBP1-ga kahe fragmendi kaudu, millest regioon 1-247 aminohapet seondub nõrgemalt ja regioon 893-1257 aminohapet seondub tugevamini ning on eeldatavasti interaktsioonil TopBP1-ga olulisem (Kumagai *et al.*, 2011). Nii Treslin kui ka TopBP1 laaditakse Pre-RC-ile üksteisest sõltumatult ja need seonduvad omavahel juba kromatiinil olles, kus Treslini fosforüleerib CDK2, et see saaks interakteeruda TopBP1-ga (Kumagai *et al.*, 2010). CDK poolt fosforüleeritavateks sihtmärkideks valgus Sld3 on aminohappe järjestused T600 ja S622, mis on Treslinis konserveerunud vastavalt T969 ja S1001 ning mõlema sihtmärgi mutatsioonide korral kaob Treslini võime seonduda TopBP1-ga (Boos *et al.*, 2011). TopBP1 ja Treslini vahelist seost on leitud kõigis rakutsükli faasides, kuid see suureneb tugevasti just S-faasis, mida tekitab arvatavasti CDK aktiivsuse suurenemine (Kumagai *et al.*, 2011). Treslini puudumisel ei saa Cdc45-te kromatiinile laadida (Kumagai *et al.*, 2010). Samuti ei ole Cdc45 võimeline kromatiinile seonduma ka ilma TopBP1-ta, seega toimub Cdc45 kromatiinile laadimine valkude Treslini ja TopBP1 koostöös (Kumagai *et al.*, 2010).

1.2.3 RecQL4

Pagaripärmi valgu Sld2 funktsionaalseks homoloogiks inimeses ja kannuskonnas on RecQL4 ja äädikakärbses RecQ4. Kuid RecQL4 omab lisaks Sld2 sarnasele domeenile ka helikaasi domeeni, mille olulisus ilmneb kõige paremini just selle ala mutatsioonides, mis põhjustavad geneetilisi haigusi nagu II tüüpi Rothmund-Thomsoni sündroom, Baller-Gerold sündroom ja RAPADILINO (akronüüm tuleneb haiguse sümptomitest) sündroom (Capp *et al.*, 2010). Antud sündroomid omavad sarnaseid fenotüüpilisi sümptomeid: kasvu puudulikus, näo deformatsioon ja kederлуу anomaaliad (Capp *et al.*, 2010). Ometigi on *Xenopus laevis*'ses näidatud, et replikatsiooni toimumiseks on vajalik ainult RecQL4 aminotermiinaalne domeen, mis on oluline

DNA polümeraasi α seondumisel kromatiiniga (Matsuno *et al.*, 2006). Teised homoloogide vahelised erinevused on seotud nende seondumisega kromatiinile ja Dpb11/TopBP1-le. Valk Sld2 vajab pagari pärmi laadimisvalgule Dpb11 seondumisel fosforüleerimist ja kinnitub kromatiinile osana pre-LC kompleksist. Erinevalt Sld2-st ei vaja kõrgemates eukariootides valk RecQL4 fosforüleerimist, et seonduda valguga TopBP1 ja samuti laaditakse valk RecQL4 ilma TopBP1 abita kromatiinile (Matsuno *et al.*, 2006; Sangrithi *et al.*, 2005). Inimeserakkudes tehtud uuringute põhjal on replikatsiooni jaoks oluline just RecQL4 ja Mcm10 valgu kompleks, kuna see stabiliseerib CMG kompleksi, aidates CMG kompleksi faktoritel üksteisega tugevamini seonduda (Capp *et al.*, 2010). RecQL4-Mcm10 kompleks ja Pre-RC seonduvad omavahel S-faasi alguses ja aitavad moodustada CMG kompleksi, mis omakorda interakteerub polümeraas α 'ga (Im *et al.*, 2009; X. Xu *et al.*, 2009).

1.3 Mudelorganism äädikakärbses

Replikatsiooni initsiatsiooni uurimine on kõrgemates eukariootides raskendatud, kuna somaatilistes rakkudes on paljude replikatsiooni regulaatorvalgude tase väga madal. Seetõttu on neid ka keeruline rakkudest puhastada, et saada piisav kogus valke biokeemilisteks analüüsideks. Sellest tulenevalt kasutatakse mudelorganismina *Drosophila melanogaster*'it. Äädikakärbses embrüotes aktiveerub samaaegselt suurel hulgal *origin*'e ning terve genoom replitseeritakse väga kiiresti (Sasaki *et al.*, 1999). Tiheda replikatsiooni tõttu on embrüotes suurel hulgal replikatsiooni initsieerimiseks vajalikke valgukomplekse k.a valku Mus101, mida saab kasutada kõrgemate eukariootide replikatsiooni initsiatsiooni uurimisel. Lisaks on äädikakärbses võimalik kasutada palju erinevaid biotehnoloogilisi võtteid nagu FLAG-afiinsus järjestuse lisamine ja mutatsiooni analüüs organismis. *Drosophila melanogaster* on nüüdisajal saanud väga populaarseks mudelorganismiks hulkraksete DNA replikatsiooni uurimisel (Hua ja Orr-Weaver, 2017). Näiteks 2000 aastal avastati äädikakärbses valk DUP, mis on oluline replikatsioonil ja sarnaneb pagari pärmi valguga Cdt1 (Whittaker *et al.*, 2000). Lisaks kasutati *Drosophila melanogaster*'it mudelorganismina CMG kompleksi moodustumise näitamisel (Ilves *et al.*, 2010; Moyer *et al.*, 2006).

1.4 Bakuloviiruse geeniekspressiooni süsteem

Käesolevas bakalaureusetöös kasutatakse valkude tootmiseks bakuloviiruse geeniekspressiooni süsteemi. Bakuloviiruse geeniekspressiooni süsteemi on kasutatud geeni ekspressioonis juba üle 30 aasta (Ono *et al.*, 2018). Bakuloviiruste tugev geeni ekspressioon on tingitud sellest, et nakkuse hilises faasis on raku enda promootorid toimetud ja transkribeeritakse viiruse polühedriin ja p10 promootorite poolt kontrollitud gene (Mansouri ja Berger, 2018).

Bakuloviirust on geeni ekspresseerumisel teistest viirustest parem kasutada, kuna ta on võimeline kandma kaasas suuremaid valke ja transduktsioon toimub nii jagunevates kui ka mittejagunevates rakkudes (Mansouri ja Berger, 2018). Lisaks on bakuloviirus ka mitte integreeruv viirus ja ta ei tekita immuunsussüsteemi tugevat vastureaktsiooni (Mali, 2013; Mansouri ja Berger, 2018). Tema puudusteks on ajakulukas viiruse loomine ja putuka kultuuride kasvatamise jaoks vajalik erivarustust (Mansouri ja Berger, 2018).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Kõrgemate eukariootide genoomse DNA replikatsioonimasina põhikomponendid on suures osas teada, kuid replikatsiooni initsiatsiooni protsessi reguleerimises osas on veel palju ebaselget. Siinne bakalaureusetöö on osa projektist, mille eesmärgiks on uurida kõrgemate eukariootide replikatsiooni initsiatsiooni. Uurimiseks kasutatakse töös valku Mus101. Valk Mus101 ja selle funktsionaalsed homoloogid on ühed kesksed reguleerivad faktorid genoomse DNA replikatsiooni alustamisel, kuna need seovad endaga teisi olulisi regulaatorvalke ja osalevad replikatiivse helikaasi CMG kompleksi kokkupanekul (Garcia *et al.*, 2005). Projekti tulemusena soovitakse leida replikatsiooni initsiatsioonil osalevaid valguga Mus101 seonduvaid seonduvaid valke ja valgu Mus101 ning seonduvate valkude vaheliste interaktsioonide analüüsil saada uutset informatsiooni kõrgemate eukariootide k.a inimese replikatsiooni initsiatsioonil osalevate valkude kohta. Bakalaureusetöö eesmärgiks on luua vahendid, mille abil oleks võimalik Mus101 seonduvate valkudega detailselt uurida.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgid on:

- Valmistada rekombinantset bakuloviirused, mille abil saaks detailselt uurida *Drosophila melanogaster*'i valgu Mus101 seonduvate valkudega.
 - Luua rekombinantset bakuloviirused, mille abil saaks ekspresseerida Mus101 valku, millel puudub kindel BRCT domeen. Deletereeritud BRCT domeeniga Mus101 valgu abil saab uurida, millised alad on Mus101 valgus uutsete faktoritega seonduvateks vajalikud.
 - Luua rekombinantset bakuloviirused, mille abil saab ekspresseerida kindlat Mus101 valgu domeeni, et teha kindlaks, millistele aladele seonduvad uued faktorid.
- Analüüsida, kas viirusega nakatatud putukarakkudes toodetakse soovitud valke, kasutades selleks *western blot* meetodit.

2.2 Töö materjalid ja meetoodika

2.2.1 Mus101 valgu ekspressioonikonstruktsioonide disain

TopBP1 valgu osalemist kõrgemate eukariootide replikatsiooni initsiatsioonil on põhjalikumalt uuritud inimeses ning kannuskonnas. Nendes organismides on teada replikatsiooni

initsieerimiseks vajalikud BRCT domeenid ja kindlad valgud, mis seonduvad nendele domeenidele. Valgu Mus101 ekspressioonikonstruktide kloonimiskeemi väljatöötamisel võeti aluseks valgu Mus101 BRCT domeenide kohta avaldatud info (Yamamoto *et al.* 2000) ning lisaks arvestati ka varasemates uurimistöödes kasutatud inimese ja kannuskonna TopBP1 ekspressioonivektorite disaini, kuna nende puhul on teada, milliseid valgu osasid võib eemaldada, et valk oleks endiselt funktsionaalne ja millised osasid saab iseseisvalt ekspresseerida. Domeenide ülesmärkimisel kasutati ka artikleid Boos *et al.*, 2011; Kumagai *et al.*, 2010; Sansam *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2008. Esmalt joondati omavahel valgud Mus101, TopBP1 ja Xcut5. Nimetatud valkude järjestused võeti FASTA formaadis NCBI andmebaasist, kus valkude referentsjärjestuse koodid on vastavalt Mus101 (NP_524909.1), TopBP1 (NP_008958.2) ja Xcut5 (NP_001082568.1) ning nende järjestuste joondamisel kasutati programme Clustal Omega ja Muscle (European Bioinformatics Institute). Programmide abil saadud joondamise failid sisestati Jalviewisse, et nende omavahelist võrdlust paremini visualiseerida. Võrreldes Mus101, Xcut5 ja TopBP1 BRCT domeene ja kasutades konstruktide disainil ka teiste teadlaste edukalt kasutatud valkude TopBP1/Xcut5 ekspressioonikonstruktide disaini, märgiti ära valgul Mus101 domeenid: BRCT0-7 ja AAD. Deletsiooniga konstruktide moodustamiseks otsustati deleteerida domeenid: BRCT1-2, BRCT3, BRCT4-5 ja BRCT6-7. Lisaks valiti üksinda ekspresseerimiseks domeenid: BRCT0-2, BRCT3, BRCT4-5, BRCT6-7 ja AAD. Edasises töös viidatakse konstruktidele nende konstrukti nime järgi, mis on väljatoodud tabelis 2. Lisaks kontrolliti kristalliseerimise konstrueerimise disaineriga (Crystallisation Construct Designer 2), et domeenide välja lõikamise tagajärjel ei lõhutaks olulisi valgu struktuuri elemente ja veenduti, et struktuuris häirivaid muudatusi ei teki.

Tabel 2. Bakalaureusetöö käigus loodud konstruktide nimetused ja Mus101 valgu järjestuses tehtav muudatus. Tabeli vasakul küljel on loodud konstrukti nimi. Tabeli keskel on esitatud valgus Mus101 tehtav muutus. Tabeli paremal küljel on valgu ennustatud suurus kilodaltonites (kDa).

Konstrukti nimi	Konstrukti kirjeldus	Valgu ennustatud suurus (kDa)
Mus101-del1-2	Deleteeritud BRCT1-2	137
Mus101-del3	Deleteeritud BRCT3	149
Mus101-del4-5	Deleteeritud BRCT4-5	137
Mus101-del6-7	Deleteeritud BRCT6-7	135
Mus101-BRCT0-2	BRCT0-2 sisaldava ala iseseisev ekspresseerimine	45
Mus101-BRCT3	BRCT3 sisaldava ala iseseisev ekspresseerimine	30
Mus101-BRCT4-5	BRCT4-5 sisaldava ala iseseisev ekspresseerimine	30

Mus101-BRCT6-7	BRCT6-7 sisaldava ala iseseisev ekspresseerimine	31
Mus101-AAD	AAD sisaldava ala iseseisev ekspresseerimine	45

2.2.2 Kloneerimine

Rekombinantsete valkude ekspresseerimiseks rakendati Bac-to-Bac™ bakuloviiruse ekspressioonisüsteemi (ThermoFisher). Kasutati ekspressioonikomplektiga kaasatulevaid vektoreid ja kompetentseid *Escherichia coli* rakke ning ekspressioonisüsteemi läbiviimisel lähtuti ThermoFisher'i juhendist. Bac-to-Bac bakuloviiruse ekspressioonisüsteemi erinevate etappide detailne kirjeldus on toodud joonisel 4.

Rekombinantsete valkude kodeerimiseks vajalike DNA lõikude saamiseks viidi läbi polümeraasi ahelreaktsioon (PCR). Konstruktide loomisel kasutati Nele Tambergi tehtud plasmidi pFastBac™1-flag-Mus101, mis sisaldab FLAG-afiinsus järjestust ja täispikka Mus101 valku kodeerivat järjestust. Soovitud järjestuste amplifitseerimiseks disainiti *forward* ja *reverse* praimerid, mida kontrolliti programmiga OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies). Osade *reverse* praimerite otsa lisati veel *FastDigest* XbaI restriктаasi (ThermoFisher) lõigatav järjestus (Tabel 3), et PCR produkti ja vektorit oleks parem kokku ligeerida. Soovitud praimerid telliti firmalt Microsynth. Konstruktide kloneerimiseks tehti deleteeritud domeenidega plasmidi saamiseks *inverse* PCR (iPCR). iPCR on vastupidine tavalisele PCR-ile, kuna ei amplifitseerita praimerite vahele jäävat järjestust, vaid alasid, mis asuvad mõlemal pool deleteerimiseks mõeldud järjestust. Selle jaoks disainitakse praimerid kindla järjestuse külgedele ja amplifitseeritakse alad, mis jäävad mõlemale poole seda kindlat järjestust. Saadudprodukte lõigati restriктаasiga, et saada tõmbid otsad. Selle järel ligeeriti otsad kokku ja transformeeriti *Escherichia coli* tüve DH5a keemiliselt kompetentsetesse rakkudesse. BRCT domeenide ekspressioonikonstruktide saamiseks amplifitseeriti PCR-iga soovitud järjestust. PCR-i produkte ja vektorit lõigati restriктаasidega ja ligeeriti omavahel kokku, mille tulemusena transformeeriti ka need *Escherichia coli* tüve DH5a keemiliselt kompetentsetesse rakkudesse.

Tabel 3. Kloneerimisel kasutatud PCR-i praimerid. Tabelis on näidatud konstruktide loomiseks kasutatud polümeraasi ahelreaktsiooni praimerid. F tähistab *forward* praimerit ja R tähistab *reverse* praimerit. Osade praimerite nukleotiidsetele järjestustele on juurde lisatud *FastDigest* XbaI järjestus, mis on kirjutatud kirjatähtedes.

Konstrukt	Praimeri nimetus	Kasutatud praimerid (5' – 3')
Mus101-del1-2	Mus101_delI-II_F	CCCACCAAGACCACTCGTCCGGG
	Mus101_delI-II_R	GCCCTCGGGAATGGGTTCATTGCGC
Mus101-del3	Mus101_delIII_F	TCGATGCCACAGAATCGAGAACCAGACGT
	Mus101_delIII_R	TTTCGCCTGACGCGGTTCAATCTCGG
Mus101-del4-5	Mus101_delIV-V_F	GACAGCAATAGCCGGACAGC
	Mus101_delIV-V_R	ATCGAAATCAATGGATAGAGTGC
Mus101-del6-7	Mus101_dVI-VII_F	TGATCTAGAGCCTGCAGTCTCGAGG
	Mus101_dVI-VII_R	ACCGCCAGAGGATCTTCTCTTTGCC
Mus101-BRCT0-2	Mus101-bluntF	ATGAGCATAAGCATGAGCATGGACG
	Mus101_BRCT02_R	gctctagaTCATTTTCGCCTGACGCGGTTC
Mus101-BRCT3	Mus101_BRCT3_F	GTCTCCGGCTCGCGTCGCATGTG
	Mus101_BRCT3_R	gctctagaTCACGGCAATTGCAAACCCTCAGC
Mus101-BRCT4-5	Mus101_BRCT45_F	GTTAGTCTCCTTCAACCAGCGGCAAG
	Mus101_BRCT45_R	gctctagaTCACGGTCTTCTTGCTGTCCGG
Mus101-BRCT6-7	Mus101_BRCT67_F	GAGGTGCAGTATGTGCAGCCC
	Mus101_BRCT67_R	gctctagaTCAAAGGAGCTGGTACTTTCCCAG
Mus101-AAD	Mus101_AAD_F	CGGGACAGCAATAGCCGGACAG
	Mus101_AAD_R	gctctagaTCACGAACCGCCAGAGGATCTTC

2.2.2.1 Deletsioonide *inverse* PCR ja ligeerimine

Deletsiooniga rekombinantsete Mus101 valkude saamiseks kasutati plasmidi pFastBacTM1-flag-Mus101 iPCR-il matriitsina. Reaktsiooni segu (50 µl), sisaldas 10 µl 5 × HF puhvrit (sisaldab 7,5 mM MgCl₂, ThermoFisher), 5 µl 2mM dNTP segu, 2,5 µl *forward* ja *reverse* 10 mM praimerit (Tabel 3), 12,5 ng plasmidi, 0,5 µl ThermoFisher *Phusion* polümeraasi ja reaktsioonisegu lõppmahuni *Milli-Q* vett. Polümeraasi ahelreaktsioonid viidi läbi

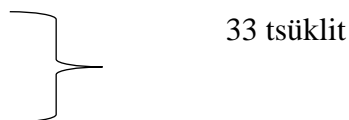
termotsükleris (Aeris Thermal Cycler, Esco) ja kasutati konstruktide Mus101-del1-2, Mus101-del3, Mus101-del6-7 PCR-il järgnevat programmi:

98 °C 30 sekundit

98 °C 10 sekundit

72 °C 3 minutit

72 °C 7 minutit



Konstrukti Mus101-del4-5 puhul kasutati järgmist programmi:

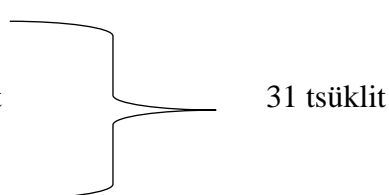
98 °C 30 sekundit

98 °C 10 sekundit

66 °C 20 sekundit

72 °C 3 minutit

72 °C 7 minutit



Saadud produktid eraldati 0,8% agarosgeelis DNA geelelektroforeesil $1 \times$ TAE(Tris-atsetaat-EDTA) puhvris (40 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA, pH 8.0). Kõigil geelelektroforeesidel kasutati *GeneRuler* 1 kb DNA ladder, ready-to-use markerit (ThermoFisher).

Saadud PCR produktid ligeeriti uuesti kokku, kasutades selleks ThermoScientific T4 ligaasi. Ligatsioonisegu (20 μ l) sisaldas 2 μ l T4 DNA ligaaspuhvrit (ThermoFisher), 1 μ l PNK (ingl T4 polynucleotide kinase, ThermoFisher), 1 μ l *FastDigest* DpnI restriктаasi (ThermoFisher) , 50 ng PCR produkti ja lõppmahuni *Milli-Q* vett. Neid inkubeeriti 37 °C juures 30 minutit ja järgmisena lisati 2 μ l PEG400 (polüetüleenglükool 400) ja 1 μ l T4 DNA ligaasi ning inkubeeriti jääl 10 minutit. Kõik bakalaureusetöös kasutatud restriктаasid on firma ThermoFisher *FastDigest* ensüümid.

2.2.2.2 Ekspresseeritavate domeenide PCR ja ligeerimine

Konstruktide Mus101-BRCT0-2, Mus101-BRCT3, Mus101-BRCT4-5, Mus101-BRCT6-7 ja Mus101-AAD loomisel kasutati samuti Nele Tambergi loodud plasmidi pFastBacTM1-flag-Mus101. Esimeseks kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni, et amplifitseerida kindlaid Mus101 valgu alasid kodeerivad järjestused. PCR-i reaktsioonisegusse (50 μ l) lisati 10 μ l $5 \times$ HF puhvrit, 5 μ l 2mM dNTP segu, 2,5 μ l forward ja reverse 10 mM praimerit (Tabel 3.), 12,5 ng plasmidi, 0,5 μ l ThermoFisher *Phusion* polümeraasi ja reaktsioonisegu lõppmahuni *Milli-Q*

vett. Reaktsioonid viidi läbi termotsükleris (Aeris Thermal Cyclers, Esco) ja amplifitseerimiseks kasutati järgnevat programmi:

98 °C 30 sekundit

98 °C 10 sekundit

66 °C 20 sekundit

72 °C 20 sekundit

4 tsüklit

98 °C 10 sekundit

70 °C 20 sekundit

72 °C 20 sekundit

30 tsüklit

72 °C 2 minutit

Saadud produktid lahutati geelelektroforeesiga, kasutades selleks 0,8% agarosgeeli ja 1 × TAE puhvrit. Geelis ilmunud ahelad olid õigete suurustega, seega lõigati produktid geelist välja ja puhastati, kasutades komplekti *FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit* (Favorgen Biotech Corp.) ja järgiti tootja loodud juhiseid.

PCR-i produktide vektorisse sisestamiseks tuli nii amplifitseeritud järjestusi kui ka vektorit lõigata restriктаasidega. Geelist puhastatud produkte lõigati restriктаasiga XbaI ja vektorit pFastBac™1-flag lõigati restriктаasidega XbaI ja EheI. PCR-i produkte ei pidanud restriктаasiga EheI lõikama, kuna see restriктаas jätab vektorit lõigates tõmbi otsa, kuhu produkt saab kinnituda. PCR-i produktide restriksioonisegu (30 µl) koosnes 26 µl puhastatud PCR produktist, 1 µl XbaI restriктаasist ja 3 µl 10 × *FastDigest* puhvrist (ThermoFisher), mida inkubeeriti 37 °C juures umbes tund aega. Seejärel puhastati restriksioonisegusid komplektiga *FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit* ja puhtuse ning õige suuruse kontrolliks tehti geelelektroforees, mille jaoks laeti puhastatud konstruktid uuesti 0,8% agarosgeelile koos 1 × TAE puhvriga. Vektori restriksioonisegu tarvis võeti 1 µl XbaI restriктаasi, 1 µl EheI restriктаasi, 10 kordset *FastDigest* puhvrit (ThermoFisher), 1,5 µg vektorit ja lisati *Milli-Q* vett kuni 20 µl täitumiseni. Vektori restriksioonisegu hoiti 37 °C juures 1 tund ja lõigatud vektorid puhastati *FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit* komplektiga vastavalt tootja poolsele juhendile.

Järgmiseks ligeeriti omavahel lõigatud vektor ja PCR-i produktid. Ligatsioonisegu (10 µl) sisaldas 50 ng PCR-i produkti, vektorit kolm korda väiksemas koguses kui produkti, 1 µl T4 DNA puhvrit, 0,5 µl T4 DNA ligaasi ja lõppmahuni *Milli-Q* vett. Proove hoiti üleöö 16 °C juures.

2.2.2.3 Transformatsioon

Transformatsioonis kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α keemiliselt kompetentseid rakke, mida on valmistatud Nele Tamberg. Rakke hoitakse -80 °C juures ja need sulatati üles jääs. Üheks transformatsiooniks kasutati 50 μ l DH5 α rakke ja lisati 2 μ l ligatsioonisegu ning neid inkubeeriti 30 minutit jääs. Iga 10 minutit möödudes segati tuube kergelt. Järgmiseks tehti rakkudele kuumašokk, hoides neid 60 sekundit 42 °C juures. Pärast hoiti rakke veel 5 minutit jääs, kus neid ei liigutatud. Seejärel plaaditi rakud 100 μ g/ml ampitsiliini sisaldavatele LB (ingl *lysogeny broth*) agarsöötmega tassidele. Iga konstrukti kohta plaaditi 2 tassi, kus ühele lisati 50 μ l S.O.C Mediumi söödet (ingl *Super Optimal broth with Catabolite repression*, ThermoScientific) ja 5 μ l ligatsiooni ning teisele tassile lisati ülejäänud rakusegu ehk 45 μ l. Tassidele plaatimiseks kasutati pallikesi (Novagen CoilRollers Plating Beads) ja plaate inkubeeriti 37 °C juures 18 h.

Plaatidelt külvati iga konstrukti kohta 3 kolooniat, mis sisestati 3 ml LB vedelsöötmega katseklaasidesse. Iga kolooniaga külvati tuubidesse ka ampitsiliini lõppkontsentratsioonini 100 μ g/ml. Järgmiseks hoiti katseklaase loksutil 37 °C juures 16 tundi. Lõpuks fuugiti rakud Heraeus Pico17 mikrotsentrifuugiga 3000 rpm 1 minut ja plasmiidide eraldamisel kasutati FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corp.) ning järgiti tootja kirjutatud juhiseid. Saadud plasmiidse DNA kontsentratsioonid mõõdeti NanoDrop (Thermo Scientific™) masinaga.

2.2.2.4 Restriksioonianalüüs

Saadud rekombinantseid vektoreid kontrolliti restriksioonianalüüsiga. Restriksioonisegu (10 μ l) sisaldas 2,5 μ l plasmiidset DNA-d, 1 μ l 10 \times FastDigest puhvrit, 0,1 μ l restriктаasi ja lõppmahuni Milli-Q vett. Konstruktide analüüsiks kasutatud restriктаasid ja saadavate fragmentide pikkused on toodud välja tabelis 4. Restriksioonisegusid hoiti tund aega 37 °C juures. Pärast seda visualiseeriti tulemused geelektroforeesil, kus segud laeti 0,8 % agarosgeelile 1 \times TAE puhvris.

Tabel 4. Konstruktide restriksioonianalüüsis kasutatud restriктаasid ja restriksiooni tulemusel oodatavad DNA fragmentide pikkused. Tabelis on toodud konstruktide analüüsiks kasutatud restriктаasid, et kontrollida kloneerimise korrektsust. Samuti on toodud eduka kloneerimise puhul restriksioonil saadavad fargmentide pikkused.

Konstruktid	Restriktaasid	Oodatavad fragmentide pikkused (ap)
Mus101-del1-2	Hind III	2751, 5676
	BamHI	1025, 7402
Mus101-del3	Esp3I + SacI	1251, 1911, 5583
	EcoRI + NheI	275, 2066, 6404
Mus101-del4-5	EcoRI	2020, 6404
	EcoRV+ SacI	1426, 1772, 5226
Mus101-del6-7	EcoRI+ XhoI	749, 2620, 4974
	SacI + SphI	1073, 7270
Mus101-BRCT0-2	ScaI	1519, 4406
Mus101-BRCT3	EcoRV + KpnI	2051, 3466
Mus101-BRCT4-5	EcoRV + KpnI	2051, 3466
Mus101-BRCT6-7	BamHI + HindIII	876, 4671
	ScaI	1519, 4028
Mus101-AAD	ScaI	1519, 4412

Restriksioonianalüüsil korrektse tulemuse andnud plasmiidid saadeti koos laborist pärit praimeritega Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse sekveneerimisele. Sekveneerimistulemusi analüüsiti programmiga Clone Manager.

2.2.3 Bac-to-Bac™ bakuloviiruse ekspressioonisüsteem

Rekombinantset bakmiidi sisaldavate *Escherichia coli* rakkude saamiseks sulatati Mus101 järjestusi sisaldavad pFastBac™1-flag vektorid ja kompetentsed DH10Bac™ *E. coli* rakud jääl. Vektoreid lahjendati kontsentratsioonini 50 ng/μl. Transformatsioonisegu saamiseks lisati 100 μl kompetentsetele DH10Bac™ *E. coli* rakkudele 1 μl vektorit ja inkubeeriti tuube 30 min jääl. Järgmiseks tehti transformatsioonisegudele kuumašokk, hoides neid 60 sekundit 42 °C juures. Pärast kuumašokki inkubeeriti rakke 5 minutit jääl ja lõpuks lisati segule 900 μl S.O.C Medium söödet ning hoiti loksutis 4 tundi 37 °C juures. Järgnevalt plaaditi rakud spetsiaalselt valmistatud LB agartassidele, mis sisaldasid 50 μg/ml kanamütsiini, 7 μg/ml gentamütsiini, 10 μg/ml tetratsükliini, 100 μg/ml Bluo-gal-i (ingl *halogenated indolyl-β-galactoside*) ja 40 μg/ml IPTG (ingl *isopropyl β-D-thiogalactopyranoside*). Esimesena plaaditi igast konstruktest 100 μl ja teisele tassile kõik ülejäänud rakud. Tasse hoiti 37 °C juures valguse eest kaitstult 2 päeva. Tassidel tekkinud kolooniatest valiti iga konstrukti kohta kaks valget kolooniat, mis viidi

kasvatamiseks LB vedelsöötmesse (3 ml), kuhu oli lisatud 50 µg/ml kanamütsiini, 10 µg/ml tetratsükliini ja 7 µg/ml gentamütsiini. Tuube hoiti loksutil 37 °C juures 24 h.

Järgnevalt eraldati bakterirakkudest rekombinantne bakmiidne DNA. Selle tarvis pandi söötme ja rakkude segud 1,5 ml tuubidesse ja neid fuugiti Heraeus Pico17 mikrotsentrifuugis 2 minutit 2500 xg. Seejärel eemaldati supernatant ja rakkudele lisati 300 µl RES-EF lahust, kuhu oli lisatud RNAas (*Resuspension buffer*, Macherey-Nagel™), milles need uuesti suspendeeriti. Järgmisena lisati 300 µl lahust LYS-EF (*Lysis buffer*, 0,5-20% NaOH, Macherey-Nagel™), mille järel tuube segati kergelt ja inkubeeriti 2 minutit toatemperatuuril. Viimasena lisati 300 µl NEU-EF (*Neutralization buffer*, Macherey-Nagel™), mida omakorda segati ja tuube inkubeeriti jääl 10 minutit. Edaspidi tsentrifugiti suspensioone 10 minutit 14,000 xg. Pärast fuugimist tõsteti 750 µl supernatanti uutesse tuubidesse ning lisati 750 µl isopropanooli. Segu segati kergelt ja inkubeeriti jääl 10 minutit. Bakmiidse DNA sadestamiseks fuugiti mikrotsentrifuugis 15 minutit 14,000 xg. Järgmisena eemaldati supernatant ja tuubi põhjas olevale DNA sademele lisati 0,5 ml 70% etanooli ning segati kergelt. Tuubid pandi mikrotsentrifuugi 5 minutiks 14,000 xg. Lõpuks eemaldati tuubist ettevaatlikult kogu etanool ja jäeti epsid lahtisena lauale kuivama, et põhjas olev DNA sade saaks kuivada. Kuivanud sademele lisati 40 µl 1 × TE puhvrit (Tris-HCl, EDTA). Bakmiidset DNA-d säilitati 4 °C juures.

Rekombinantset bakmiidi kontrolliti polümeraasi ahelreaktsiooniga. Selle jaoks kasutatakse spetsiaalseid praimereid, millega saab kontrollida, kas on tegemist tühja bakmiidiga või bakmiidiga, millele on lisatud soovitud järjestus (Tabel 5). Reaktsioonisegu (20 µl) sisaldas 4 µl 5 × HF puhvrit, 2 µl dNTP-d, 1 µl M13 *forward* ja *reverse* praimerit (Tabel 5), 0,1 µl ThermoFisher *Phusion* polümeraasi, 0,5 µl DNA-d ja reaktsioonisegu lõppmahuni *Milli-Q* vett.

Tabel 5. Rekombinantse bakmiidse DNA PCR analüüsis kasutatud M13 praimerite nukleotiidsed järjestused. Tabelis on toodud bakmiidse DNA analüüsiks kasutatud PCR praimerite nukleotiidsed järjestused suunal 5'-3'.

M13 <i>forward</i>	5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'
M13 <i>reverse</i>	5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3'

Polümeraasi ahelreaktsiooni läbiviimisel kasutati konstruktide Mus101-del1-2, Mus10-del3, Mus101-del4-5 ja Mus101-del6-7 bakmiidse DNA puhul programmi :

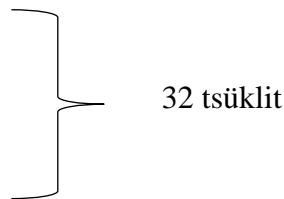
98 °C 30 sekundit

98 °C 10 sekundit

52 °C 20 sekundit

72 °C 1 minut 34 sekundit

72 °C 10 minutit



Konstruktide Mus101-BRCT1-2, Mus101-BRCT3, Mus101-BRCT4-5, Mus101-BRCT6-7 ja Mus101-AAD puhul kasutati programmi:

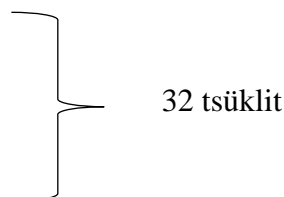
98 °C 30 sekundit

98 °C 10 sekundit

52 °C 20 sekundit

72 °C 1 minut 11 sekundit

72 °C 10 minutit



PCR-i reaktsiooni viidi läbi termotsükleris Aeris Thermal Cycler (Esco).

2.2.4 Bakmiidse DNA transfektsioonimine SF9 putukarakkudesse

Spodoptera frugiperda 9 (SF9) putukarakkudesse transfektsioonimisel kasutati 6 auguga plaate (ühe augu diameeter on 3,5 cm), kuhu lisati igasse auku 2 ml ExCell 420 söödet ja 1×10^6 SF9 rakku. Transfektsioonisegu tarvis segati tuubis 5 μ l bakmiidset DNA-d ja 25 μ l filtersteriliseeritud *Milli-Q* vett. Teises tuubis segati kokku 2 μ l transfektsioonireagenti 007 (Icosagen) ja 18 μ l *Milli-Q* vett. Järgmisena lisati bakmiidse DNA segule (30 μ l) reagent 007 segu (20 μ l) ja segati kergelt ning inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Viimaseks lisati 50 μ l transfektsioonisegu 6 auguga plaadil kasvavatele rakkudele ning inkubeeriti 27 °C juures 3 päeva.

Esimese viirusstoki P1 kogumiseks eemaldati plaadilt sööde ja koguti 15 ml Falcon™ tsentrifuugtuubi (Fisher Scientific) ning fuugiti tsentrifuugis 5810 R (Eppendorf) rootoriga A-4-81 (Eppendorf) 5 minutit 1500 rpm. Seejärel tõsteti fuugitud tuubidest supernatant, mis sisaldas viiruseosakesi, ümber puhtasse 15 ml Falcon™ tsentrifuugtuubi ja neid hoiti edaspidi pimedas 4 °C juures. Korduv nakatamiseks lisati 500 μ l P1 virione uutele SF9 rakkudega 10 cm tassidele, kuhu lisati igasse auku 10 ml ExCell 420 söödet ja 8×10^6 SF9 rakku. Tasse inkubeeriti 3 päeva 27 °C juures.

Teine viirusstokk P2 koguti sarnaselt P1 virionidele. Nakatanud SF9 rakkude kogumiseks eemaldati rakkudelt kogu sööde, seejärel suspendeeriti rakud 3,5 ml PBS puhvril (ingl *phosphate buffered saline*; 10 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,8 mM KH₂PO₄). 500 µl PBS-rakusegu tõsteti jää peal olevasse puhtasse tuubi. Rakusegusid tsentrifugeeriti Heraeus Pico17 mikrotsentrifuugis 5 minutit 2000 rpm. Tuubi põhjas olevatelt rakkudelt eemaldati PBS puhver ja rakud resuspendeeriti 100 µl 2 × Laemmli SDS puhvril (4% SDS, 20% glütserool, 10% β-merkaptopetaanool, 0,04% bromofenoolsinine, 0,125 mM Tris HCl, pH 6,8) ning keedeti 100 °C juures 5 minutit. Proove säilitati -20 °C juures.

2.2.5 Western blot

Western blot'is kasutati P1 virionidega nakatatud SF9 rakke, et neid analüüsida ja kontrollida, kas nakatatud rakud ekspresseerivad soovitud valke. Laemmli puhvril lüüsitud rakke sonikeeriti (Diagenode Bioruptor™ UCD-200) 5 minutit, et lõhkuda genoomne DNA. Valgud lahutati 10% poliakrüülamiidgeelil ja jooksutati 1 × SDS jooksupuhvril. Markerina kasutati *Prestained Protein Molecular Weight Marker Lot-specific* (ThermoFisher). Geeli jooksutati alguses 120 V juures, kuni proovid jõudsid geeli ja järgmisena 150 V juures kontsentreeriva osa lõpuni ning kuni geeli lõpuni jooksutati proove 180 V juures. Lahutatud valkudega geel pandi metanoolis aktiveeritud PVDF membraani peale, mis ümbritseti mõlemalt poolt kolmekordse kihiga Whatmani filterpaberiga ning pandi Trans-Blot® *Semi-Dry* ülekandemasinasse (Bio-Rad). Ülekanne toimus *semi-dry* puhvril (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% metanool) 12V juures, 30 minutit. Pärast ülekanne toimumist blokeeriti membraan 5% lõssi lahuses [2,5 g lõssi, 50 ml *western*'i pesulahust (1M Tris, pH 7,5, 5 M NaCl, 10% *Tween*-20)] ja loksutati 1 h toatemperatuuril. Järgnevalt lisati membraanile 2% lõssilahus ja esmane antikeha. Esmane antikeha oli *anti-flag* antikeha lahjendusega 1:1000 (mouse monoclonal, Sigma-Aldrich). Segu loksutati üleöö -4 °C juures, mille järel pesti membraani 3 × 5 minutit ja 1 × 10 minutit *western blot*'i pesulahusega. Seejärel lisati 2% lõssilahus koos sekundaarse antikehaga. Sekundaarne antikeha oli HRP-ga (ingl *horseradish peroxidase*) konjugeeritud hiire antikeha ära tundev kitses tehtud antikeha lahjendusega 1:1000 (Goat anti-Mouse IgG, Invitrogen). Nimetatud segu loksutati toatemperatuuril 1 h ja pesti membraani sarnaselt esmise antikeha puhastamisega. Membraanile seondunud valkude visualiseerimiseks kasutati Amersham ECL (GE Healthcare) ilmutusreagenti ja röntgenfilmi (AGFA Healthcare).

2.3 Tulemused ja arutelu

Võrreldes pagaripärmiga on kõrgemates eukariootides muutunud replikatsiooni alustamine keerukamaks ja on lisandunud uusi lisafaktoreid. Replikatsiooni initsiatsioonil osalevad regulaatorvalgud on kõrgemates eukariootides teada, kuid nende regulatsioonis on veel palju ebaselgelt. Üheks selliseks regulaatorvalguks on äädikakärbse valk Mus101, mis käitub kui laadimisvalk, sidudes endaga mitmeid lisafaktoreid ja aidates laadida neid kromatiinile. Sel põhjusel aitaks detailne valgu Mus101 ja sellele seonduvate valkude interaktsioonide mõistmine kaasa ka replikatsiooni initsiatsiooni protsessi paremale mõistmisele.

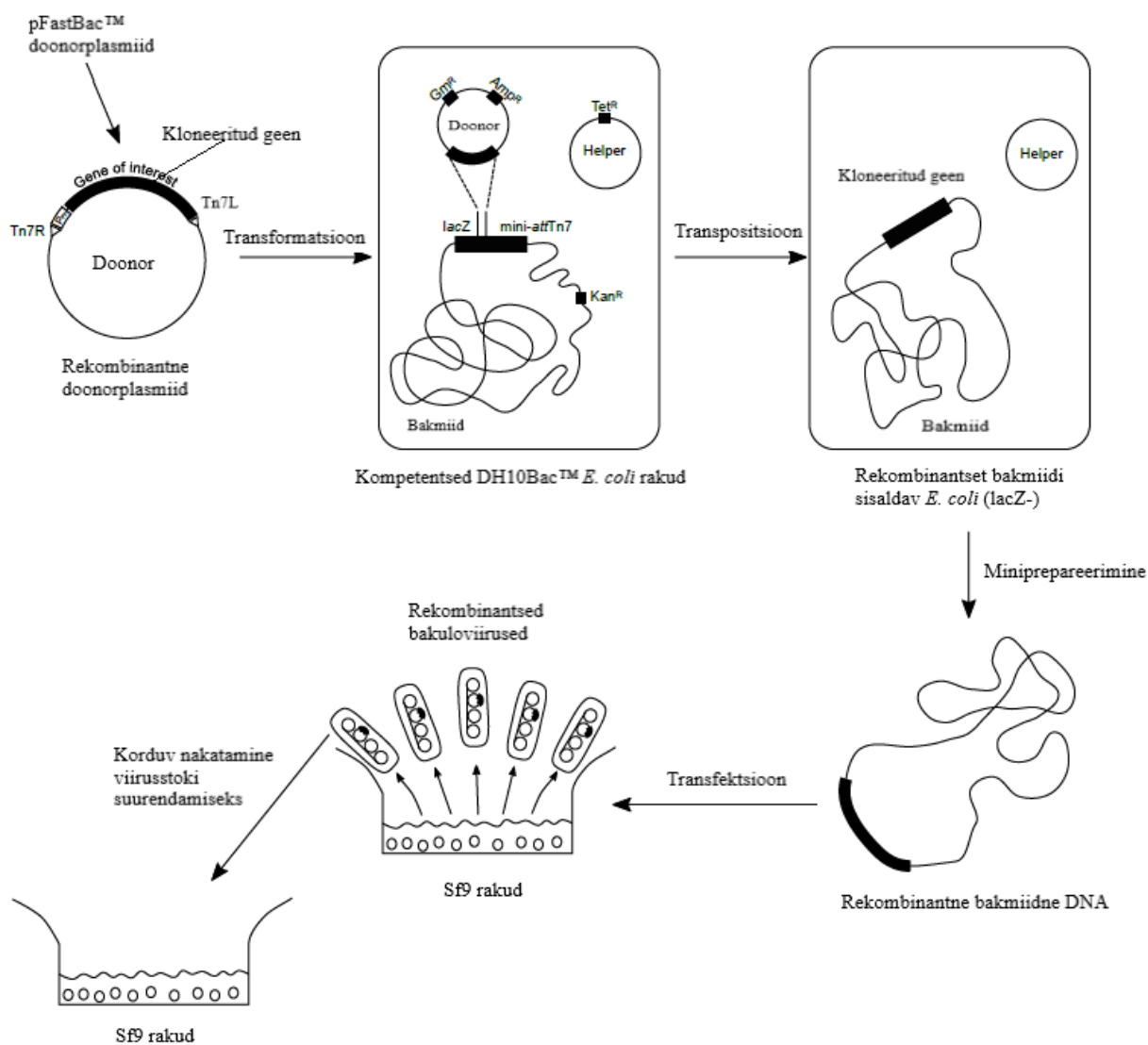
Ivar Ilvese labor uurib kõrgemate eukariootide replikatsiooni ja selle regulatsiooni, kasutades selleks mudelorganismina äädikakärbest. Siinse bakalaureusetöö eesmärgiks oli luua töövahendid, mis aitaksid uurida replikatsiooni regulaatorvalku Mus101. Töö tulemusena valmistati bakuloviiruse geeniekspressiooni vektorid, mille abil analüüsida valgu Mus101 seondumist teiste valkudega ja määrata valgus Mus101 erinevate funktsioonide toimumiseks vajalikke alasid.

Otsustati luua bakuloviirused, mille abil ekspresseerida valku, kus on deleteeritud domeenid BRCT1–2, BRCT3, BRCT4–5 ja BRCT6–7. Lisaks loodi bakuloviirused, mis ekspresseerivad valke domeenidega BRCT1–2, BRCT3, BRCT4–5, BRCT6–7 ja AAD. Deleteeritud BRCT domeenidega tehakse kindlaks, millised alad on uute faktoritega seondumiseks vajalikud ja iseseisvaid BRCT domeene ekspresseerivad bakuloviirused aitavad kaardistada alad, kuhu seonduvad uudsed faktorid. Valgu Mus101 konstruktide loomisel joondati omavahel äädikakärbse, inimese ja Aafrika kannuskonna nukleotiidsed järjestused, et näha rohkem konserveerunud alasid ja panna paika valgus Mus101 olevad domeenid (detailsem info materjalid ja meetodikas). Mus101 valgus otsustati eemaldada aminohapped 114–312 (BRCT1–2), 393–485 (BRCT3), 607–806 (BRCT4–5) ja 1199–1637 (BRCT6–7) (Joonis 3). Eraldi AAD domeeni ala ei eemaldatud, kuna äädikakärbsel puuduvad inimese või kannuskonna AAD domeenile sarnased järjestused. Siiski otsustati BRCT domeenide 5 ja 6 vahele jääv ala iseseisvalt ekspresseerida, kuna inimesel ja kannuskonnal on selles piirkonnas domeen AAD ja ka BRCT6 ning võib olla teatud valgud ikkagi interakteeruvad valgus Mus101 selle alaga. Iseseisvalt ekspresseerimiseks valiti aminohapped 0–392 (BRCT0–2), 339–594 (BRCT3), 561–816 (BRCT4–5), 1160–1425 (BRCT6–7) ja 806–1199 (AAD) (Joonis 3).



Joonis 3. Mus101 valgud, mida soovitakse ekspresseerida. Joonisel on kujutatud valgud, mida töös loodud bakuloviiruste abil soovitakse ekspresseerida. BRCT domeenide numbrid on märgitud numbritega, mis on esitatud joonel asuvatel kastidel. Joonisel on toodud välja ka täispikk Mus101 valk, et illustreerida täispikal valgul asuvaid domeene ja pikkust. Täispika valguga nimetus on värvitud siniselt ja rekombinantsete valgude nimetused on värvitud mustalt. Valgu mudelite lõpus on toodud valgude suurused aminohapetes (ah).

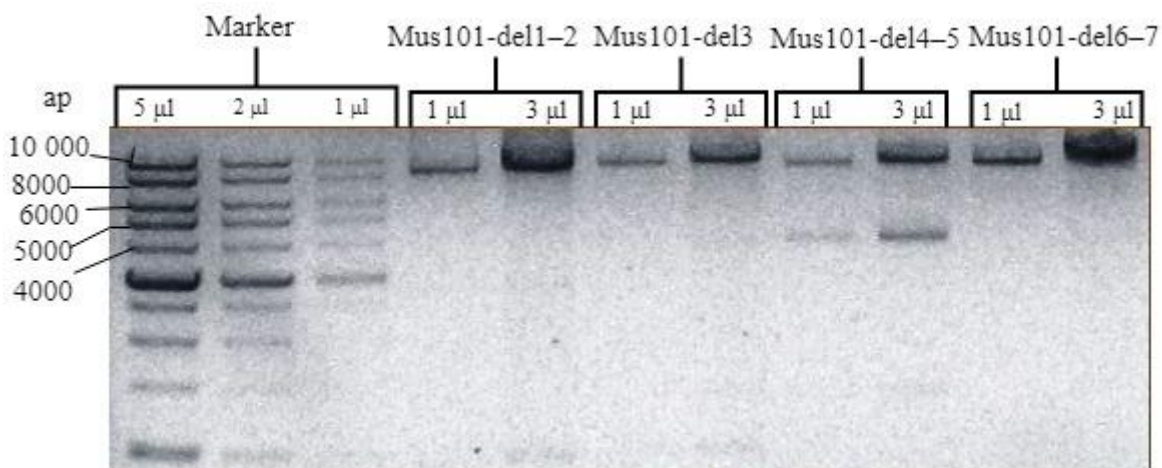
Valkude ekspresseerimisel kasutati ThermoFisher'i Bac-to-Bac™ bakuloviiruse ekspressioonisüsteemi (Joonis 4). See põhineb huvipakkuva järjestuse viimisel bakmiidi, mis transfekteeritakse putukarakkudesse, milles toimub järjestust sisaldavate bakuloviiruste moodustumine. Töös kasutatakse sellist meetodit, sest see on kiire ja efektiivne meetod rekombinantsete valgude ekspresseerimisel ja bakuloviiruste loomisel, kuna kasutab rekombinantse bakmiidi loomisel *Escherichia coli* kohtspetsiifilist transpositsiooni ning vektor omab tugevat polühedriin promootorit (Bac-to-Bac™ bakuloviiruse ekspressioonisüsteemi toote info, ThermoFisher). Joonisel 4 on toodud Bac-to-Bac™ bakuloviiruse ekspressioonisüsteemi skemaatiline ülesehitus.



Joonis 4. Rekombinantse bakuloviiruse loomine ja soovitud valkude tootmine Sf9 rakkudes, kasutades Bac-to-bac™ bakuloviiruse ekspressioonisüsteemi. Ekspresseeritavat valku kodeeriv järjestus sisestatakse pFastBac™1 doonorplasmii ja täpsemalt Tn7 transposooni õlgade Tn7R ja Tn7L vahele. Saadud vektor transformeeritakse *E. coli* DH10Bac™ rakkudesse, milles on Tn7 sihtmärkjärjestust mini-attTn7 sisaldav bakmiidne DNA. Transpositsioonile aitab kaasa *helper*-plasmiid, mis kodeerib transposaasi ja annab resistentsuse tetratsükliini vastu. Rekombineerunud bakmiidide eristamiseks kasutatakse LacZ-põhist sini-valge seleksiooni, sest huvipakkuva järjestuse edukal sienemisel bakmiidi lõhutakse LacZ peptiidi ekspressioon. Korrektsed bakmiidid miniprepareeritakse ja need transfekteeritakse Sf9 putukarakkudesse. Putukarakkudes toodetud bakuloviirused kogutakse ja korduv nakatatakse sobiva tiitri saamiseni. Joonis on mugandatud versioon Bac-to-bac™ bakuloviiruse ekspressioonisüsteemi kasutusjuhendis olevast joonisest (ThermoFisher).

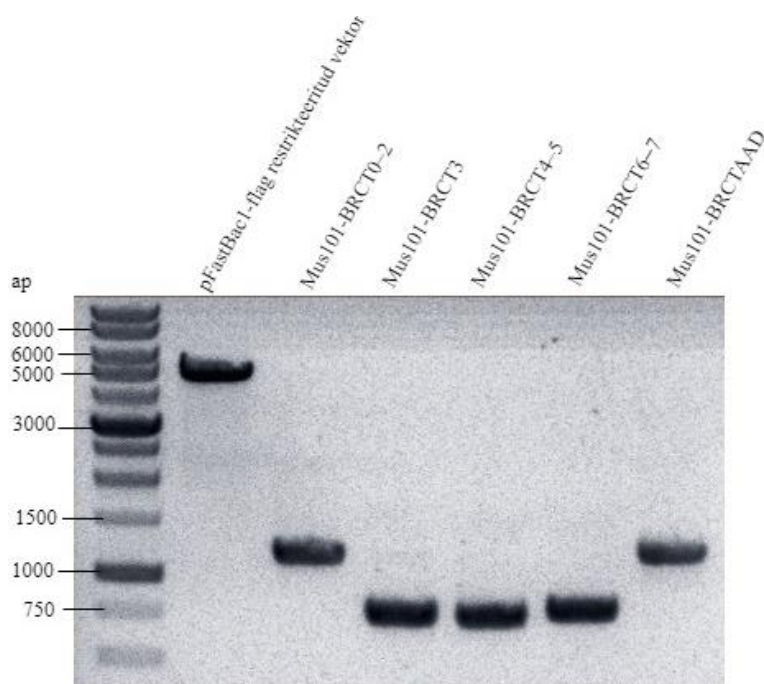
2.3.1 Rekombinantseid valke kodeerivate nukleotiidsete järjestuste klonereimine pFastBac™ 1 plasmidi

Rekombinantseid valke kodeerivate järjestuste saamiseks viidi läbi polümeraasi ahelreaktsioon, millega amplifitseeriti järjestused, kus puudusid domeenid BRCT1–2, BRCT3, BRCT4–5 ja BRCT6–7. Lisaks amplifitseeriti üksikult domeenide BRCT1–2, BRCT3, BRCT4–5, BRCT6–7 ja AAD järjestused. Deletsioonidega konstruktide saamiseks kasutati iPCR meetodit, mille puhul amplifitseeritakse PCR-i abil kogu plasmiid, välja arvatud see ala, mida deleteerida soovitakse. Eemaldatava ala kummassegi äärde disainiti praimerid ja amplifitseeriti kogu plasmiid k.a Mus101 valgu ala, mida soovitakse ekspresseerida. Disainitud praimerid, mida kasutati konstruktide klonereimise PCR-il, on välja toodud tabelis 3. Deleteeritud domeenidega amplifitseeritud järjestuste pikkused pidid olema 8426 aluspaari (Mus101-del1–2), 8744 aluspaari (Mus101-del3), 8423 aluspaari (Mus101-del4–5) ja 8342 aluspaari (Mus101-del6–7) (Joonis 5). Markereid laeti geelile erinevates kogustes, et visuaalselt määrata, kui suur on saadud PCR-i produktide hulk nanogrammides (Joonis 5). Samal põhjusel laeti geelile ka produktid kahes erinevas koguses (Joonis 5). Mus101-del1–2, Mus101-del3 ja Mus101-del6–7 klonereimiseks vajalikud PCR-i produktid olid oodatud suurusega, millest võib järeldada, et PCR-il saadud järjestused olid korrektsed ja disainitud praimerid olid kinnitunud õigesse kohta. Mus101-del4–5 PCR-i tulemuseks oli segu 8423 aluspaari ja umbes 4000 aluspaari pikkustest fragmentidest (Joonis 5). Mus101-del4–5 konstrukti puhul korrati PCR-i neli korda, kus muudeti ahelreaktsiooni tsüklite arvu ja praimerite seondumise temperatuuri, kuid väiksem mittespetsiifiline fragment ei kadunud ära. Tekkiva vale fragmendi põhjuseks on arvatavasti praimerite mittespetsiifiline seondumine teistele järjestusele lisaks töö jaoks vajalikule järjestusele. Töös kasutati ikkagi Mus101-del4–5 PCR-i produkti, kuna see sisaldas õige suurusega fragmenti ja korrektsed konstruktid tehakse kindlaks restriksioonianalüüsi abil. Järgmiseks lõigati plasmide restriktaaasiga DpnI ja ligeeriti plasmiidide otsad kokku.



Joonis 5. Deleteeritud BRCT domeenidega konstruktide klonerimiseks vajalike PCR-i produktide analüüs geelektroforeesil. Joonisel on kujutatud geelektroforeesiga lahutatud valgu Mus101 konstruktide klonerimiseks vajalikud PCR-i produktid, millelt on deleteeritud kindlad domeenid. Kõikidel reaktsioonidel kasutatud praimerid leiab tabelist 4. Vasakul pool on toodud markeri aluspaaride (ap) pikkused ja üleval on toodud geelile laetud markerid ning produktid. Samuti on välja toodud markeri ja produktide geelile laetud kogused mikrolitrites.

BRCT domeenide konstruktide saamiseks amplifitseeriti PCR-iga soovitud domeen, mida lõigati restriктаasiga ja sisestati sama restriктаasiga lõigatud pFastBacTM1-flag vektorisse FLAG-järjestuse järel. Lõpptulemuseks on FLAG-järjestust sisaldav rekombinantset valku kodeeriv plasmiid. BRCT domeenide ekspressioonikonstruktide klonerimiseks tehtud PCR-i analüüsiti agarosgeelil, et olla kindel saadud järjestuste korrektsuses. Geelile laetud produktid olid õigete suurustega ja sellepärast lõigati need ka geelist välja. Seejärel puhastati need geelist ja lõigati produkte restriктаasiga XbaI ning pFastBacTM1-flag vektorit restriктаasidega EheI ja XbaI. Restriктаasidega lõigatud fragmente analüüsiti uuesti geelektroforeesil selleks, et vaadata ega produktide segud ei ole saastunud (Joonis 6). BRCT domeenide ekspressioonikonstruktide nukleotiidsed järjestused pidid olema 1176 aluspaari (Mus101-BRCT0–2), 765 aluspaari (Mus101-BRCT3), 765 aluspaari (Mus101-BRCT4–5), 795 aluspaari (Mus101-BRCT6–7) ja 1179 aluspaari (Mus101-AAD). Lõigatud pFastBacTM1-flag vektori järjestus pidi olema 5930 aluspaari. Geelile laetud produktide fragmendid ja lõigatud pFastBacTM1-flag vektor olid õigete suurustega (Joonis 6). Restrikteeritud vektor pFastBacTM1-flag ja ekspressiooni produktid ligeeriti omavahel kokku.



Joonis 6. BRCT domeenide ekspressioonikonstruktid kloonimiseks vajalike restrikteeritud PCR-i produktide ja restrikteeritud pFastBacTM1-flag vektori analüüs geelelektroforeesil. Joonisel on toodud geelelektroforeesiga lahutatud PCR-i produktid ja vektor. Konstruktid loomisel kasutatud praimerid on leitavad tabelis 3. Vasakul pool on toodud markeri fragmentide pikkused aluspaarides (ap). Üleval on toodud geelile laetud konstruktid ja vektori nimetus.

Ligatsiooni õnnestumise ning korrektse järjestusega plasmidi saamise kontrollimiseks tehti plasmiididele restriksioonianalüüs. Deletsioonidega konstruktid restriksioonianalüüsi tulemused on toodud joonisel 7. Konstruktid analüüsiks kasutatud restriктаasid ja lõikamisel oodatavad DNA fragmentide pikkused on toodud tabelis 4.

Konstrukti Mus101-del1-2 kontrollimisel restriктаasiga HindIII peaks saama fragmendid suurustega 2751 ja 5676 aluspaari ning kontrollimisel restriктаasiga BamHI peaks saama fragmendid suurustega 1025 ja 7402 aluspaari. Konstruktil Mus101-del1-2 olid korrektsed fragmendid kloonidel 1 ja 2 (Joonis 7B). Kloonil 3 oli restriктаasi BamHI kasutamisel tekkinud 2 fragmendi asemel 3 ja selle kõige väiksem fragment oli liiga suur, seega kolmandal plasmiidil pole ligatsioonis õiged fragmendid kokku ligeerunud (Joonis 7B). Sekvencerimiseks valiti kloon 1, plasmiid Mus101-del1-2#1.

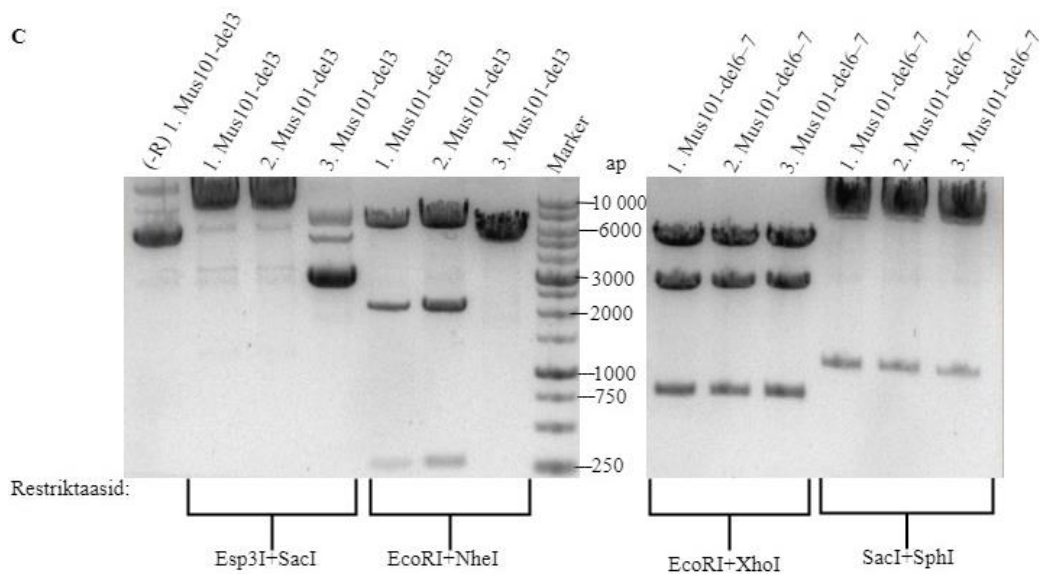
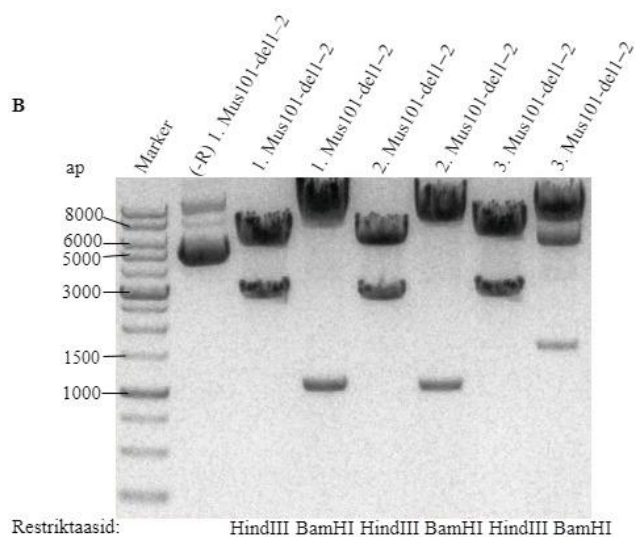
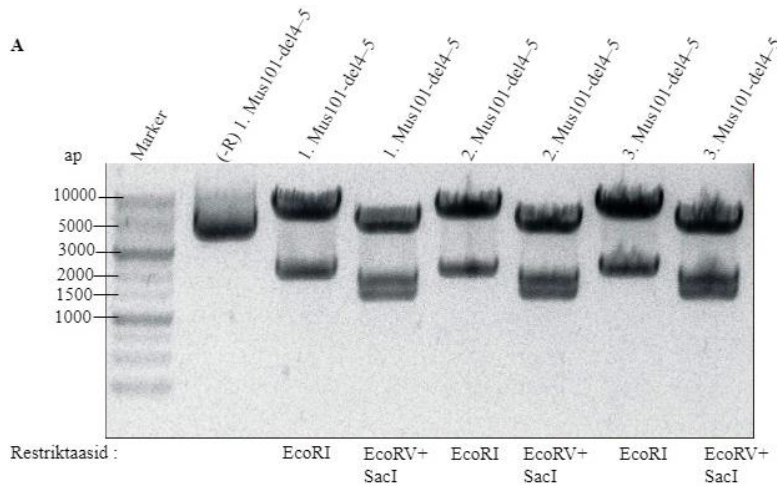
Konstrukti Mus101-del3 lõikamisel restriктаasidega Esp3I + SacI peaks saama fragmendid suurustega 1251, 1911 ja 5583 aluspaari ning lõigates restriктаasidega EcoRI+NheI peaks saama fragmendid suurustega 275, 2066 ja 6404 aluspaari. Konstrukti Mus101-del3 kõigi kolme valitud klooni puhul toimus restriктаasidega Esp3I+SacI restriksioon, kuid saadud fragmendid olid valede suurustega (Joonis 7C). Kloone 1 ja 2 on arvatavasti lõiganud ainult üks kasutatud restriктаasidest, sest geelelektroforeesil on näha lineaarne DNA (Joonis 7C). Klooni 3 puhul on geelil näha lõikamata tsirkulaarne DNA ja ei ole toimunud restriksiooni (Joonis 7C). Seevastu restriктаasiga EcoRI + NheI lõigati õigesti kloone 1 ja 2, kuid kloonil 3 saadi EcoRI ja NheI kasutamisel lineaarne molekul, mis näitab, et plasmidi lõikas ainult üks restriктаas (Joonis 7C). Sekvencerimiseks valiti kloon 2, plasmiid Mus101-del3#2.

Mus101-del4-5 lõikamisel restriктаasiga EcoRI peaks saama fragmendid suurustega 2020 ja 6404 aluspaari ning lõikamisel restriктаasidega EcoRV+SacI peaks saama fragmendid suurustega 1426, 1772 ja 5226 aluspaari. Konstrukti Mus101-del4-5 restrikteeritud plasmiidid olid kõik õigete suurustega ja seega õnnestus korrektne ligatsioon kõikidel valitud kloonidel (Joonis 7A). Sekvencerimiseks valiti kloon 1, plasmiid Mus101-del4-5#1.

Konstrukti Mus101-del6-7 lõikamisel restriктаasidega EcoRI+XhoI peaks saama fragmendid suurustega 749, 2620 ja 4974 aluspaari ning lõikamisel restriктаasidega SacI+SphI peaks saama fragmendid suurustega 1073 ja 7270 aluspaari. Konstruktid Mus101-del6-7 lõikamisel saadi

mõlema restriktiooni paariga õigete suurustega fragmendid (Joonis 7C). Sekvencerima saadeti kloon 1, plasmiid Mus101-del6-7#1.

Valitud plasmiidide sekvencerimistulemused osutusid korrektseteks, seega oli deleteeritud domeenidega valgu Mus101 konstruktide kloonimine õnnestunud.



Joonis 7. Deleteeritud BRCT domeenidega Mus101 konstruktide restriksioonanalüüs.

Restriktaasidega analüüsiti iga konstrukti puhul kolmest erinevast kolooniast saadud plasmide. Konstruktide nimed on esitatud joonise peal ja kontrolliks kasutatud restriктаas on joonise all. (A) Joonisel on toodud konstrukti Mus101-del4–5 restriksioonanalüüs. Kontrollina kasutati 1. kloni Mus101-del4–5 plasmidi, mis on lõikamata ja joonisel on see märgitud (-R) märgiga. (B) Joonisel on konstrukti Mus101-del1–2 restriksioonanalüüs. Kontrollina kasutati 1. kloni Mus101-del1–2 plasmidi, mis on lõikamata ja joonisel on see märgitud (-R) märgiga. (C) Joonisel on konstruktide Mus101-del3 ja Mus101-del6–7 restriksioonanalüüs. Kontrollina kasutati 1. kloni Mus101-del3 plasmidi, mis on lõikamata ja joonisel on see märgitud (-R) märgiga.

BRCT domeenide ekspresioonikonstruktidega viidi samuti läbi restriksioonanalüüs. Analüüsil kasutatud restriктаasid ja nende kasutamisel saadavad fragmendid on toodud tabelis 4. Sarnaselt deleteeritud domeenidele valiti iga konstrukti kohta 3 kolooniat, mida kasvatati vedelsöötmes, eraldati plasmidne DNA ning teostati restriksioonanalüüs. BRCT domeene ekspresseerivate konstruktide restriksioonanalüüsil saadud geelipildid on esitatud joonisel 8.

Konstruktide Mus101-BRCT0–2 lõikamisel restriктаasiga ScaI peaks saama fragmendid suurustega 1519 aluspaari ning 4406 aluspaari. Restriktaasiga ScaI lõikamise tulemuseks olid õigete suurusega fragmendid konstrukti Mus101-BRCT0–2 kõigil plasmiididel (Joonis 8A). Sekvencerima saadeti kloon 1, plasmid Mus101-BRCT0–2#1.

Konstruktide Mus101-BRCT3 lõikamisel restriктаasidega EcoRV+KpnI peaks saama fragmendid suurustega 2051 ja 3466 aluspaari. Kõikide plasmiidide fragmendid olid geelil õigete suurustega ja nendest saadeti sekvencerimisele kloon 1, plasmid Mus101-BRCT3#1 (Joonis 8B).

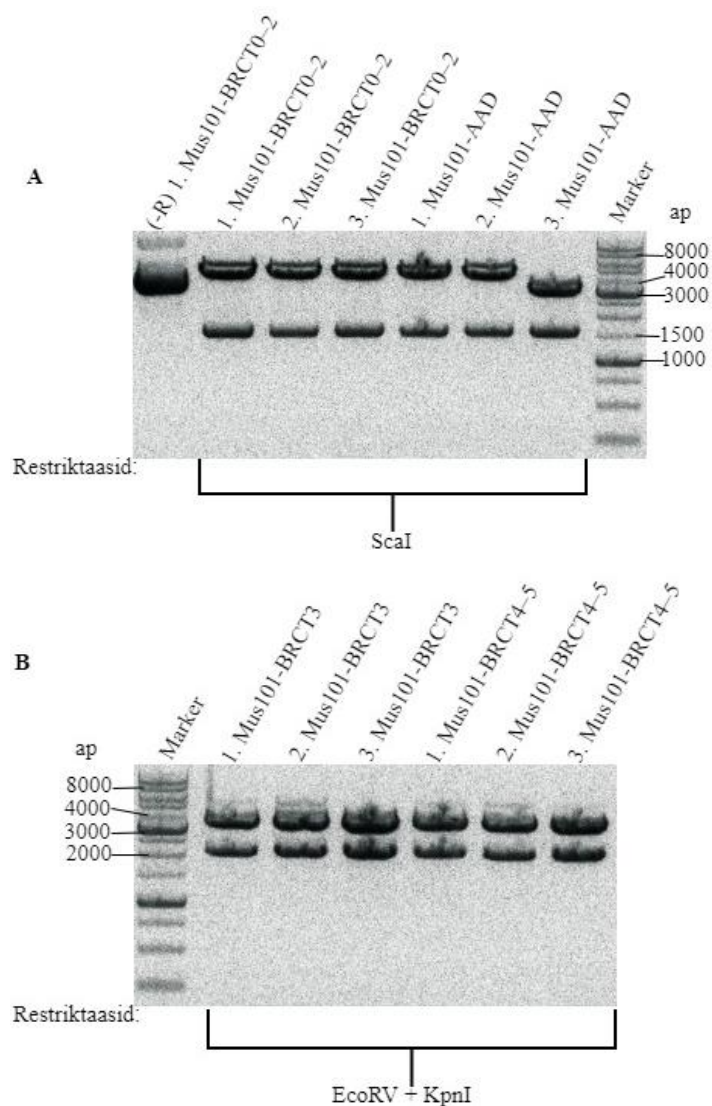
Konstruktide Mus101-BRCT4–5 lõikamisel restriктаasidega EcoRV+KpnI peaks saama fragmendid suurustega on 2051 ja 3466 aluspaari. Kõikide plasmiidide fragmendid olid geelil õigete suurustega ja nendest saadeti sekvencerimisele kloon 1, plasmid Mus101-BRCT4–5#1 (Joonis 8B).

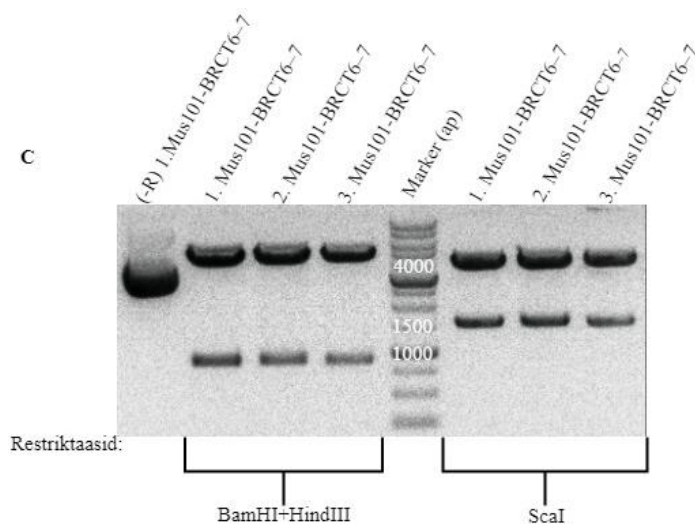
Konstrukti Mus101-BRCT6–7 lõigati restriктаasidega BamHI+HindIII, mille tulemusena peaks fragmentide suurus olema 876 ja 4671 aluspaari ja restriктаasiga ScaI, millega peaks saama fragmendid suurustega 1519 aluspaari ja 4028 aluspaari. Gelelektroforeesil lahutatud plasmiidide fragmendid olid korrektsete suurustega ja sekvencerima saadeti kloon 1, plasmid Mus101-BRCT6–7#1 (Joonis 8C).

Konstrukti Mus101-AAD lõikamisel restriктаasiga ScaI peaks saama fragmendid suurustega 1519 aluspaari ning 4412 aluspaari. Restriktaasiga ScaI lõikamise tulemuseks olid õige suurusega fragmendid kloonidel 1 ning 2 (Joonis 8A). Mus101-AAD kloonis 3 ei toimunud

ligatsiooni soovitud fragmentide vahel, kuna restriksioonil saadud fragmendi pikkused on iseloomulikud tühjale pFastBacTM1-flag plasmiidile (Joonis 8A). pFastBacTM1-flag plasmidi lõikamisel restriiktaasiga ScaI, saadakse fragmendid pikkustega 1519 aluspaari ja 3272 aluspaari, mis on näha konstrukti Mus101-AAD kloni 3 puhul (Joonis 8A). Sekvenerima saadeti kloon 1, plasmiid Mus101-AAD#1.

Kõik sekvenerima saadatud konstruktide järjestused olid korrektsed, seega oli kloneerimine õnnestunud.





Joonis 8. Valgu Mus101 BRCT domeenide ekspressioonikonstruktide restriksioonanalüüs.

Restriktaasidega analüüsiti iga konstrukti kolmest erinevast kolooniast saadud plasmide. Joonise peal on toodud konstrukti nimi ja joonise all on konstrukti kontrollimisel kasutatud restriктаasid. (A) Joonisel on esitatud konstruktide Mus101-BRCT0–2 ja Mus101-AAD restriктаasidega lõikamisel saadud fragmendid. Kontrollina kasutati kloon 1. Mus101-BRCT0–2 lõikamata plasmidi ja joonisel on see märgitud (-R) märgiga. (B) Joonisel on restrikteeritud ja geelil lahutatud konstrukti Mus101-BRCT3 ja Mus101-BRCT4–5 fragmendid. (C) Joonisel on restrikteeritud ja geelil lahutatud konstrukti Mus101-BRCT6–7 fragmendid. Kontrollina kasutati kloon 1 Mus101-BRCT6–7 lõikamata plasmidi ja joonisel on see märgitud (-R) märgiga.

2.3.2 Rekombinantse bakmiidide loomine

Valmistatud Mus101 konstruktid transformeeriti kompetentsetesse DH10Bac™ *Escherichia coli* rakkudesse, mille sees oli bakuloviiruse genoomi sisaldav bakmiid. Ekspresseritavat valku kodeeriv nukleotiidjärjestus lisandub bakuloviiruse genoomile transpositsiooni abil ja tekkinud rekombinantne bakmiid eraldatakse miniprepareerimisega DH10Bac™ *Escherichia coli* rakkudest. Selleks et kontrollida soovitud järjestuse lisandumist bakmiidsesse DNA-sse, tehti bakmiididele PCR kontroll. Bakmiide amplifitseeriti praimeritega, mille järjestused on leitavad tabelis 5. Antud praimerid seonduvad bakmiidses DNA-s selle ala kummassegi otsa, kuhu huvipakkuv järjestus rekombinatsiooni abil sisenes. Pärast polümeraasi ahelreaktsiooni analüüsitiprodukte geelelektroforeesiga. Geelil olid kõigil konstruktidel näha õige suurusega fragmenti, seega võib öelda, et bakmiididele olid lisandunud rekombinantse Mus101 valgu ekspresseerimiseks vajalikud järjestused.

2.3.3 Rekombinantse bakmiidi transfekterimine SF9 rakkudesse

Rekombinantne bakuloviiruse genoomi sisaldav bakmiid transfekteriti SF9 putukarakkudesse, et amplifitseerida bakuloviiruseid ja ekspresseerida valke. Pärast putukarakkude nakatamist koguti 3 päeva möödudes P1 viirusvaru ja nendega nakatati uusi SF9 putukarakke. Rakke korduvalt nakatati, et suurendada viiruste kogust ja võimaldada kasutada viirusvarusid ka edaspidistes uuringutes valguga Mus101. Uuetest rakkudest koguti 3 päeva möödudes P2 viirusvaru.

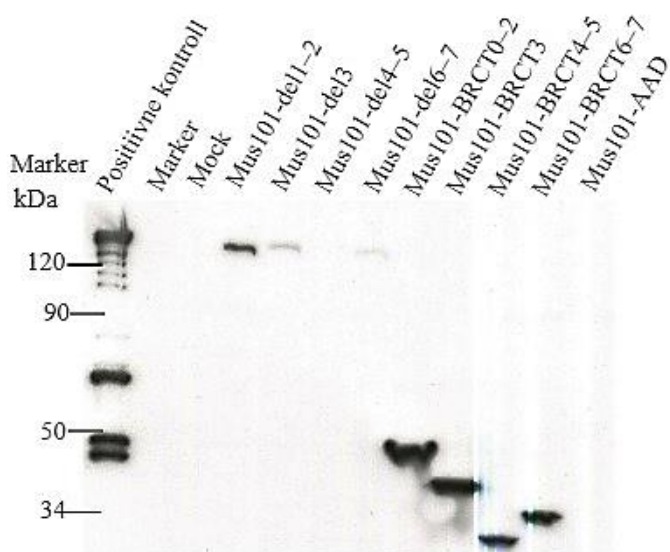
2.3.4 Rekombinantse bakuloviiruste loomine ja rekombinantsete valkude ekspressiooni kontroll

Rekombinantne bakuloviiruse genoomi sisaldav bakmiid transfekteriti SF9 putukarakkudesse. Peale esmase viirusvaru (P1) kogumist paljundati seda veel üks kord, et suurendada viiruste tiitrit vajalikule tasemele efektiivse valguekspressiooni jaoks.

Uurimaks, kas bakuloviirusega nakatatud rakkudes ekspresseeriti rekombinantseid Mus101 valke, analüüsiti P1 viirustega nakatatud rakke *western blot* meetodil (Joonis 9). *Western blot* 'il kasutati esmase antikehana *anti-flag* antikeha, kuna see tunneb ära rekombinantsetel valkudel N-terminuses oleva FLAG epitoobi. Geelile laeti positiivse kontrollina FLAG-afiinsuskromatograafia abil puhastatud täispikk Mus101 valk, millel on samuti aminoterminuses FLAG epitop. Täispikk Mus101 valk on umbes 180 kDa suurune. Joonisel on näha nii täispikale valgule vastavat signaali, kuid ka väiksemaid ribasid, mis on arvatavasti degradatsiooniproduktid (Joonis 9).

Oodatavad suurused valgu Mus101 deletsioonidega konstruktide valkudele on 137 kDa (Mus101-del1–2), 149 kDa (Mus101-del3), 137 kDa (Mus101-del4–5) ja 135 kDa (Mus101-del6–7) (Tabel 2). *Western blot* 'il oli näha Mus101-del1–2, Mus101-del3 ja Mus101-del6–7 viiruste puhul õige suurusega rekombinantsete valkude ekspressiooni (Joonis 9). Kõige tugevamini on ekspresseerunud viirus Mus101-del1–2, ent viirused Mus101-del3 ja Mus101-del6–7 on madalama ekspressioonitasemega (Joonis 9). Mus101-del3 ja Mus101-del6–7 nõrgema signaali põhjuseks võivad olla madal viiruse tiiter või valgu ebastabiilsus. SF9 rakke võiks nende konstruktide rekombinantsete bakuloviirustega uuesti nakatada ja korrata *western blot* meetodit. Juhul kui tiitri suurendamine ei tõsta rekombinantsete valkude ekspressioonitaset, siis peaks disainima uued konstruktid. Viirusel Mus101-del4–5 kahjuks signaal puudus, mida võib põhjustada madal viiruse tiiter või pole valku kodeeriv järjestus õigesti bakmiidi sisenenud (Joonis 9). Viirust Mus101-del4–5 oleks vaja veel kord nakatada, et suurendada viiruse tiitrit ja uuesti analüüsida *western blot* meetodil.

BRCT ekspressioonikonstruktid valkude oodatavad suurused on 45 kDa (Mus101-BRCT0–2), 30 kDa (Mus101-BRCT3), 30 kDa (Mus101-BRCT4–5), 31 kDa (Mus101-BRCT6–7) ja 45 kDa (Mus101-AAD) (Tabel 2). Valkude Mus101-BRCT0–2 ja Mus101-BRCT4–5 puhul oli näha õigete suurustega fragmente ja neil oli ka *western blot*’il tugev signaal (Joonis 9). BRCT domeenide ekspressioonikonstruktidest oli Mus101-BRCT3’l ja Mus101-BRCT6–7’l samuti näha tugevaid signaale, kuid need olid eeldatud suuruselt suuremad (Joonis 9). 30 kDa asemel jooksid nad umbes 40 ja 34 kDa juures (Joonis 9). Sarnane anomaalia on tekkinud ka Chen *et al.*, 2016 uuringus, kus ta ekspresseeris rekombinantseid Mus101 valke ning *western blot* analüüsil olid osad valgud eeldatust suuremad (Chen *et al.*, 2016). Siinse töö puhul ei saanud viga olla kloneerimises, kuna Mus101-BRCT3 ja Mus101-BRCT6–7 ekspressioonikonstruktid olid sekveneeritud ja sisaldasid õigeid Mus101 domeene kodeerivaid alasid. Samuti võib eeldada, et rekombinantseid valke kodeerivad järjestused said sisestatud bakmiidi, kuna rekombinantsetele bakmiididele tehti kontrolliks PCR ja geelelektroforeesi analüüsil oli näha fragmente õigetel suurustel. Valkude Mus101-BRCT3 ja Mus101-BRCT6–7 suurused on ennustuslikud ja jätavad võimaluse, et Mus101-BRCT3 ja Mus101-BRCT6–7 viiruste abil ekspresseeriti soovitud valke, aga ekspresseerimise käigus on valke modifitseeritud, mis muudab valgu liikuvust. Seda võib põhjustada valkude fosforüleerimine, kuna varasemad tööd on näidanud, et näiteks valku TopBP1 fosforüleeritakse (Garcia *et al.*, 2005). Lisaks neile ei olnud konstruktidel Mus101-del4–5 ja Mus101-AAD *western blot*’il signaali näha, seega võib eeldada, et nende valkude ekspresseerimist SF9 rakkudes ei toimunud või jäid ekspresseeritud valkude tasemed alla *western blot* meetodi detektsioonipiiri (Joonis 9).



Joonis 9. Rekombinantsete Mus101 valkude ekspressiooni analüüs *western blot* meetodil. Geeli igale rajale laeti 8 µl P1 viirustega nakatatud SF9 rakkude lüsaati. Valguekspressiooni detekteeriti, kasutades esmase antikehana *anti-flag* antikeha. Markeril valgu suurused on toodud paremal kilodaltonites. Positiivse kontrollina kasutati täispikka puhastatud Mus101 valku. Negatiivse kontrollina on geelile laetud nakatamata SF9 rakkude lüsaat (mock).

Siinse bakalaureusetöö eesmärgiks oli luua rekombinantsed bakuloviirused, mille abil ekspresseerida Mus101 valke, mida saab kasutada järgnevates uurimustes, et leida valgu Mus101 interaktsioonipartnerid. Planeeriti üheksa rekombinantset bakuloviirust, millest õnnestus luua viis rekombinantset valgu Mus101 bakuloviirust ja neid on võimalik kasutada edasistes projektides.

KOKKUVÕTE

Replikatsiooni initsieeritakse kõrgemates eukarüootides mitmelt *origin*'ilt ja see on rangelt reguleeritud ning jaguneb kahte etappi. Esimese etapi ajal laetakse *origin*'ile inaktiivne helikaas Mcm2-7 heksameer. Teise etapi ajal laetakse kromatiinile Cdc45 ja GINS ning moodustub aktiivne replikatiivne helikaasikompleks CMG (Cdc45-GINS-Mcm2-7). Replikatsiooni initsiatsioonil mängib kesksel rolli pagripärmi valk Dpb11, mille ülesandeks on GINS kompleksi ja teiste lisafaktorite kromatiinile laadimine. Dpb11 funktsionaalsed homoloogid kõrgemates eukarüootides on TopBP1 (*Homo sapiens*), XCut5 (*Xenopus laevis*) ja Mus101 (*Drosophila melanogaster*).

Bakalaureusetöö eesmärgiks oli luua äädikakärbse valgu Mus101 rekombinantsed bakuloviirused, mille abil on võimalik uurida, et millised alad on uute faktoritega seondumiseks vajalikud ja millistele domeenidele need faktorid seonduvad. Valku Mus101 kasutatakse sellepärast, kuna see on vajalik faktor replikatsiooni initsieerimisel ja see mängib olulist rolli CMG kompleksi loomisel. Samuti on *Drosophila melanogaster* hea mudelorganism replikatsiooni initsiatsiooni uurimisel, kuna selle varajastes embrüotes aktiveeritakse korraga palju *origin*'e ja seal on replikatsiooni initsiatsioonis osalevate valkude ning valgukomplekside tase tunduvalt kõrgem kui somaatilistes rakkudes.

Töö tulemusel loodi rekombinantsed bakuloviirused, mille abil saab toota deleteeritud BRCT1–2, BRCT3, BRCT4–5 või BRCT6–7 domeenidega Mus101 valke ja iseseisvalt ekspresseeritud BRCT0–2, BRCT3, BRCT4–5, BRCT6–7 ja AAD domeenidega Mus101 valke. Rekombinantsete valkude ekspressiooni analüüsiti *western blot* meetodil. Lõpetuseks saadi viis rekombinantset valgu Mus101 bakuloviirust: Mus101-del-2, Mus101-del3, Mus101-del6–7, Mus101-BRCT0–2 ja Mus101-BRCT4–5. Neid on võimalik kasutada edasistes uuringutes valguga Mus101. Konstruktide Mus101-del4–5, Mus101-BRCT3, Mus101-BRCT6–7 ja Mus101-AAD puhul peaks kordama SF9 rakkude nakatamist viirustega või looma uued rekombinantsed bakuloviirused.

RESÜMEE/SUMMARY

The role of fruit flies protein Mus101 in genomic DNA replication initiation

Maia-Triin Melsas

Summary

Genome replication takes place in all living organisms and it is very important that it is replicated correctly. Badly replicated DNA causes mutations that may lead to cancer. In eukaryotes replication is initiated from many origins and it is strongly regulated. Replication initiation is divided into two parts: origin licensing and origin firing. First part takes place during the late M-phase and early G1-phase during which pre-replicative complex that includes Mcm2–7 hexamere is loaded onto origin. Second part takes place during the S-phase when Cdc45 and GINS that is part of the pre-loading complex are loaded on to chromatin and they form an active replicative helicase complex CMG (Cdc45-GINS-Mcm2-7). Yeasts protein Dpb11 has an important role in replication initiation, because it helps to load GINS and other vital factors on to chromatin.

Dpb11-s functional homologs in metazoans are TopBP1 (*Homo sapiens*), XCut5 (*Xenopus laevis*) and Mus101 (*Drosophila melanogaster*). Both Dpb11 and metazoan homologs have BRCT domains, but higher eukaryotes have developed few changes during the evolution: new BRCT domains have been added, replication initiation is more complex, regulation has become more intricate and new factors are participating in replication initiation.

Purpose of this bachelor thesis is to create recombinant baculoviruses of Mus101 protein that help us discover which domains are necessary for binding new factors and which domains do they bind to. Protein Mus101 is used because it is a vital for replication initiation and plays an important part in forming the CMG complex. *Drosophila melanogaster* is a good model organism for researching replication initiation, because numerous origins are fired in early embryos and during that many proteins and protein complexes are being used.

As a result there were created recombinant baculoviruses that can produce Mus101 proteins where domains BRCT1–2, BRCT3, BRCT4–5 or BRCT6–7 were deleted and also Mus101 proteins where only domains BRCT0–2, BRCT3, BRCT4–5, BRCT6–7 or AAD are expressed. Recombinant baculoviruse expression was analysed by western blot. In the end there were five successful recombinant baculoviruses: Mus101-del-2, Mus101-del3, Mus101-del6–7, Mus101-BRCT0–2 and Mus101-BRCT4–5. These can be used in further research with protein

Mus101. Recombinant baculoviruses Mus101-del4–5, Mus101-BRCT3, Mus101-BRCT6–7 and Mus101-AAD must be further amplified or recreated.

TÄNUSÕNAD

Täna enda juhendajaid Nele Tambergi ja Ivar Ilvest, kes võtsid mu vastu enda laborisse ja olid abiks siinse bakalaureusetöö valmimisel. Samuti sooviksin tänada teisi töörühma liikmeid, kes samuti selle töö valmimisel toeks olid.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abraham, R. T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15(17): 2177–2196.
- Barnum, K. J., O’Connell, M. J. (2014). Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol Biol.* 1170: 29–40.
- Blow, J. J., Dutta, A. (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 6(6): 476–486.
- Boos, D., Sanchez-Pulido, L., Rappas, M., Pearl, L. H., Oliver, A. W., Ponting, C. P., Diffley, J. F. X. (2011). Regulation of DNA Replication through Sld3-Dpb11 Interaction Is Conserved from Yeast to Humans. *Curr Biol.* 21(13): 1152–1157.
- Bruck, I., Perez-Arnaiz, P., Colbert, M. K., Kaplan, D. L. (2015). Insights into the Initiation of Eukaryotic DNA Replication. *Nucleus (Austin, Tex.).* 6(6): 449–454.
- Burrell, R. A., McClelland, S. E., Endesfelder, D., Groth, P., Weller, M.-C., Shaikh, N., Swanton, C. (2013). Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature.* 494(7438): 492–496.
- Bush, N. G., Evans-Roberts, K., Maxwell, A. (2015). DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus.* 6(2).
- Capp, C., Wu, J., Hsieh, T. (2010). RecQ4: the Second Replicative Helicase? *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45(3): 233–242.
- Chen, Y.-T. S., Wu, J., Modrich, P., Hsieh, T.-S. (2016). The C-terminal 20 Amino Acids of Drosophila Topoisomerase 2 Are Required for Binding to a BRCA1 C Terminus (BRCT) Domain-containing Protein, Mus101, and Fidelity of DNA Segregation. *J. Biol. Chem.* 291(25): 13216–13228.
- Gambus, A., Khoudoli, G. A., Jones, R. C., Blow, J. J. (2011). MCM2-7 Form Double Hexamers at Licensed Origins in Xenopus Egg Extract. *J. Biol. Chem.* 286(13): 11855–11864.
- Garcia, V., Furuya, K., Carr, A. M. (2005). Identification and functional analysis of TopBP1 and its homologs. *DNA Repair.* 4(11): 1227–1239.
- Glover, J. N. M., Williams, R. S., Lee, M. S. (2004). Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two. *Trends Biochem. Sci.* 29(11): 579–585.
- Hashimoto, Y., Takisawa, H. (2003). Xenopus Cut5 is essential for a CDK-dependent process in the initiation of DNA replication. *EMBO J.* 22(10): 2526–2535.
- Heinaru, A. (2012). *Geneetika*. Tartu Ülikooli Kirjastus.

- Henderson, D. S. (1999). DNA Repair Defects and Other Mistakes in *Drosophila melanogaster*. *Methods*. 18(3): 377–400.
- Hua, B. L., Orr-Weaver, T. L. (2017). DNA Replication Control During *Drosophila* Development: Insights into the Onset of S Phase, Replication Initiation, and Fork Progression. *Genetics*. 207(1): 29–47.
- Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J. J., Botchan, M. R. (2010). Activation of the MCM2-7 Helicase by Association with Cdc45 and GINS Proteins. *Mol. Cell*. 37(2): 247–258.
- Im, J.-S., Ki, S.-H., Farina, A., Jung, D.-S., Hurwitz, J., Lee, J.-K. (2009). Assembly of the Cdc45-Mcm2–7-GINS complex in human cells requires the Ctf4/And-1, RecQL4, and Mcm10 proteins. *PNAS*. 106(37): 15628–15632.
- Ishimi, Y. (2018). Regulation of MCM2-7 function. *Genes. Genet. Syst.* 93(4): 125–133.
- Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Dunphy, W. G. (2010). Treslin Collaborates with TopBP1 in Triggering the Initiation of DNA Replication. *Cell*. 140(3): 349–359.
- Kumagai, A., Shevchenko, A., Dunphy, W. G. (2011). Direct regulation of Treslin by cyclin-dependent kinase is essential for the onset of DNA replication. *J. Cell Biol.* 193(6): 995–1007.
- Mali, S. (2013). Delivery systems for gene therapy. *Indian J. Hum. Genet.* 19(1): 3–8.
- Mansouri, M., Berger, P. (2018). Baculovirus for gene delivery to mammalian cells: Past, present and future. *Plasmid*. 98: 1–7.
- Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., Oda, M. (2010). Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu. Rev. Biochem.* 79: 89–130.
- Matsuno, K., Kumano, M., Kubota, Y., Hashimoto, Y., Takisawa, H. (2006). The N-Terminal Noncatalytic Region of *Xenopus* RecQ4 Is Required for Chromatin Binding of DNA Polymerase α in the Initiation of DNA Replication. *Mol. Cell. Biol.* 26(13): 4843–4852.
- Moyer, S. E., Lewis, P. W., Botchan, M. R. (2006). Isolation of the Cdc45/Mcm2–7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *PNAS*. 103(27): 10236–10241.
- Muramatsu, S., Hirai, K., Tak, Y.-S., Kamimura, Y., Araki, H. (2010). CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pol ϵ , and GINS in budding yeast. *Genes. Dev.* 24(6): 602–612.
- Ohlenschläger, O., Kuhnert, A., Schneider, A., Haumann, S., Bellstedt, P., Keller, H., Pospiech, H. (2012). The N-terminus of the human RecQL4 helicase is a homeodomain-like DNA interaction motif. *Nucleic Acids Res.* 40(17): 8309–8324.

- Ono, C., Okamoto, T., Abe, T., Matsuura, Y. (2018). Baculovirus as a Tool for Gene Delivery and Gene Therapy. *Viruses*. 10(9).
- Parrilla-Castellar, E. R., Arlander, S. J. H., Karnitz, L. (2004). Dial 9–1–1 for DNA damage: the Rad9–Hus1–Rad1 (9–1–1) clamp complex. *DNA Repair*. 3(8–9): 1009–1014.
- Remus, D., Diffley, J. F. (2009). Eukaryotic DNA replication control: Lock and load, then fire. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21(6): 771–777.
- Sangrithi, M. N., Bernal, J. A., Madine, M., Philpott, A., Lee, J., Dunphy, W. G., Venkitaraman, A. R. (2005). Initiation of DNA Replication Requires the RECQL4 Protein Mutated in Rothmund-Thomson Syndrome. *Cell*. 121(6): 887–898.
- Sansam, C. L., Cruz, N. M., Danielian, P. S., Amsterdam, A., Lau, M. L., Hopkins, N., Lees, J. A. (2010). A vertebrate gene, *ticrr*, is an essential checkpoint and replication regulator. *Genes. Dev.* 24(2): 183–194.
- Sasaki, T., Sawado, T., Yamaguchi, M., Shinomiya, T. (1999). Specification of Regions of DNA Replication Initiation during Embryogenesis in the 65-Kilobase DNA α -dE2F Locus of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* 19(1): 547–555.
- Schmidt, U., Wollmann, Y., Franke, C., Grosse, F., Saluz, H.-P., & Hänel, F. (2008). Characterization of the interaction between the human DNA topoisomerase II β -binding protein 1 (TopBP1) and the cell division cycle 45 (Cdc45) protein. *Biochem. J.* 409(1): 169–177.
- Simon, A. C., Zhou, J. C., Perera, R. L., van Deursen, F., Evrin, C., Ivanova, M. E., Pellegrini, L. (2014). A Ctf4 trimer couples the CMG helicase to DNA polymerase α in the eukaryotic replisome. *Nature*. 510(7504): 293–297.
- Sokka, M., Parkkinen, S., Pospiech, H., Syväoja, J. E. (2010). Function of TopBP1 in Genome Stability, p. 119–141. In H.-P. Nasheuer (ed.), *Genome Stability and Human Diseases*, 1st ed., vol. 50. Springer Netherlands.
- Zegerman, P. (2015). Evolutionary conservation of the CDK targets in eukaryotic DNA replication initiation. *Chromosoma*. 124(3): 309–321.
- Tanaka, S., Araki, H. (2013). Helicase activation and establishment of replication forks at chromosomal origins of replication. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 5(12).
- Tanaka, S., Komeda, Y., Umemori, T., Kubota, Y., Takisawa, H., Araki, H. (2013). Efficient initiation of DNA replication in eukaryotes requires Dpb11/TopBP1-GINS interaction. *Mol. Cell Biol.* 33(13): 2614–2622.
- Tognetti, S., Riera, A., Speck, C. (2015). Switch on the engine: how the eukaryotic replicative helicase MCM2-7 becomes activated. *Chromosoma*. 124(1): 13–26.

- Wardlaw, C. P., Carr, A. M., Oliver, A. W. (2014). TopBP1: A BRCT-scaffold protein functioning in multiple cellular pathways. *DNA Repair*, 22: 165–174.
- Whittaker, A. J., Royzman, I., Orr-Weaver, T. L. (2000). *Drosophila* Double parked: a conserved, essential replication protein that colocalizes with the origin recognition complex and links DNA replication with mitosis and the down-regulation of S phase transcripts. *Genes Dev.* 14(14): 1765–1776.
- Wu, L., Liu, Y., Kong, D. (2014). Mechanism of chromosomal DNA replication initiation and replication fork stabilization in eukaryotes. *Sci. China Life Sciences.* 57(5): 482–487.
- Xu, X., Rochette, P. J., Feyissa, E. A., Su, T. V., Liu, Y. (2009). MCM10 mediates RECQ4 association with MCM2-7 helicase complex during DNA replication. *EMBO J.* 28(19): 3005–3014.
- Yamamoto, R. R., Axton, J. M., Yamamoto, Y., Saunders, R. D., Glover, D. M., Henderson, D. S. (2000). The *Drosophila* mus101 gene, which links DNA repair, replication and condensation of heterochromatin in mitosis, encodes a protein with seven BRCA1 C-terminus domains. *Genetics.* 156(2): 711–721.
- Yekezare, M., Gómez-González, B., Diffley, J. F. X. (2013). Controlling DNA replication origins in response to DNA damage - inhibit globally, activate locally. *J. Cell Sci.* 126(Pt 6): 1297–1306.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Clustal Omega programm (kasutatud august 2018): <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

Muscle programm (kasutatud august 2018): <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>

Crystallisation Construct Designer ² (kasutatud august 2018): <https://ccd.rhpc.nki.nl/>

OligoAnalyzer programm (kasutatud august 2018):

<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>

Jalview kodulehekül (kasutatud august 2018): <http://www.jalview.org/>

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Maia-Triin Melsas

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose “ Äädikakärbse valgu Mus101 roll genoomse DNA replikatsiooni initsieerimises ”, mille juhendajad on Nele Tamberg ja Ivar Ilves, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.