

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

Pagaripärmi valgu Whi7 puhastamine bakterist *Escherichia coli*

Bakalaureusetöö

12 EAP

Rasmus Enno

Juhendajad
Ervin Valk, MSc
professor Mart Loog, PhD

TARTU 2023

Infoleht

Pagaripärmi valgu Whi7 puhastamine bakterist *Escherichia coli*

Käesoleva töö eesmärgiks on kloonida pagari pärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) valgu Whi7 geen bakteri *Escherichia coli* ekspresioonivektorisse ning välja töötada valgu Whi7 puhastamisprotokoll bakterist *Escherichia coli*.

Valgu puhastamiseks kloonitati pärmi *Saccharomyces cerevisiae* Whi7 geen bakteriaalsesse ekspresioonivektorisse ning transformeeriti saadud plasmiid *E. coli* ekspresioonitüvesse. Seejärel ekspresseeriti valgu ekspresioonitüvedes ning viidi läbi valgu puhastamine denatureerivate tingimustel kasutades immobiliseeritud metalli afiinsuskromatograafiat. Seejärel viidi läbi dialüüs valgu renatureerimiseks ning määrati valgu kontsentratsioon.

Märksõnad: valgu puhastamine, Whi7, afiinsuskromatograafia, valguekspressioon, rakutsükkel

CERCS kood: P310 Proteiinid ja ensümolooogia

Purification of budding yeast protein Whi7 from *Escherichia coli*

The aim of this thesis was to clone the budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Whi7 gene into an *Escherichia coli* expression vector and develop a protocol for Whi7 protein purification from *Escherichia coli*.

In order to purify the protein *Saccharomyces cerevisiae* Whi7 gene was cloned into an *Escherichia coli* expression vector and the vector was transformed into *E. coli* expression strains. Then the protein expression was induced and Whi7 was purified under denaturing conditions using Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). The proteins were renatured using dialysis and the protein concentration was measured.

Keywords: protein purification, Whi7, affinity chromatography, protein expression, cell cycle

CERCS code: P310 Proteins, enzymology

Sisukord

Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1. Eukariootne rakutsükkel	7
1.1.1. Rakutsükli START pagaripärmis	7
1.1.2. START'i regulaatorvalk Whi7	9
1.2. Valgu puhastamine	9
1.2.1. Valgu ekspresseerimine ja puhastamine.....	10
2. Eksperimentaalosa	13
2.1. Töö eesmärk	13
2.2. Materjalid ja meetodika.....	13
2.2.1. Töös kasutatud plasmiidid ja <i>E. coli</i> tüved.....	13
2.2.2. Töös kasutatud puhvrid	14
2.2.3. Töös kasutatud ensüümid ja reagensid:	15
2.2.4. Töös kasutatud oligonukleotiidid	16
2.2.5. Plasmiidide konstrueerimine	16
2.2.6. <i>E. coli</i> rakkude kasvatamine	17
2.2.7. <i>E. coli</i> rakkude ekspressiooni kontrolliks indutseerimine ja rakulüsaatide tegemine	18
2.2.8. SDS-poliakrüülamiid geelelektroforees.....	18
2.2.9. Western Blot analüüs ekspressiooni kontrolli lüsaatidega.	18
2.2.10. <i>E. coli</i> rakkude indutseerimine ja rakulüsaatide tegemine Whi7 lahustuvuse kontrolliks.....	19
2.2.11. <i>E. coli</i> rakkude kasvatamine valgu puhastamiseks.....	19
2.2.12. Rakkude lüüsimine	20
2.2.13. Valgu puhastamine	20
2.2.14. Dialüüs.....	20
2.2.15. Valgu kontsentratsiooni määramine	21

2.3. Tulemused ja arutelu	21
2.3.1. Ekspressiooniplasmiidi konstrueerimine	21
2.3.2. Whi7 ekspressiooni kontrollimine	22
2.3.3. Western blot analüüs Whi7 asukoha kontrollimiseks.....	23
2.3.4. Whi7 lahustuvus natiivsetel tingimustel rakulüsaadis.....	24
2.3.5. Western Blot analüüs lahustuvuse kontrollist	25
2.3.6. Whi7 lahustuvus denatureerivatel tingimustel	25
2.3.7. Valgu Whi7 puhastamine	26
2.3.8. Dialüüs.....	27
2.3.9. Valgu koguse hindamine	28
Kokkuvõte	30
Summary.....	31
Kasutatud kirjandus	32
Lihtlitsents	34

Kasutatud lühendid

BME – beeta-merkaptotoetanool

BSA – veise seerum albumiin

Cam – klooramfenikool

CDK – tsükliinist sõltuv kinaas

ER – endoplasmaatiline retiikulum

HIS-marker – polühistidiin marker

IMAC – immobiliseeritud metalli afiinsus kromatograafia

Km – kanamütsiin

Sissejuhatus

Rakutsükkel on protsess, mille käigus rakusisesed komponendid duplitseeritakse ning jaotatakse võrdselt kahe tütaraku vahel. Eukarüootides on rakutsükkel jaotatud neljaks faasiks: G1-, S-, G2- ja M-faas. Rakutsükli regulatsioon on kontrollitud tsükliinist sõltuvate kinaaside (CDK) ja neid mõjutavate tsükliinide poolt.

Whi7 on pärmi *Saccharomyces cerevisiae* regulaatorvalk, mis toimib nagu ankur ja hoiab Cdk1-Cln3 kompleksi endoplasmaatilisel retiikulil (ER) kinni. Lisaks takistab Whi7 SBF transkriptsioonifaktoril Cln2 promootorile kinnitumist ja takistab seeläbi rakutsükli START'i. Pärmi *Saccharomyces cerevisiae* esineb Whi7 rakutsükli vältel erinevate fosforüülimis tasemetega. Fosforüülimis tasemest sõltub ka Whi7 stabiilsus. Whi7 on kõige stabiilsem just fosforüülimata olekus.

Käesoleva töö kirjanduslikus osas antakse ülevaade rakutsükli START'i regulatsioonist ja Whi7 olulisusest selle reguleerimisel. Lisaks antakse väike ülevaade ka valgu puhastamise põhiprintsiipidest bakteris *Escherichia coli*. Töö eksperimentaalses osas kloonitakse *Saccharomyces cerevisiae* valk Whi7 bakteri *E. coli* ekspresiooniplasmiidi ja optimeeritakse valgu Whi7 puhastamisprotokoll bakterist.

Töö eesmärgiks on kloonida pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) valgu Whi7 geen bakteri *Escherichia coli* ekspresioonivektorisse ning välja töötada valgu Whi7 puhastamisprotokoll bakterist *Escherichia coli*.

Töö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis professor Mart Loogi laboris.

Märksõnad: valgu puhastamine, Whi7, afiinsuskromatograafia, valguekspressioon, rakutsükkel

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Eukarüootne rakutsükkel

Rakutsükkel on protsess, kus rakusisesed komponendid duplitseeritakse ja jaotatakse võrdselt kahe tütaraku vahel (Barnum & O'Connell, 2014). Eukarüootides on rakutsükkel jagunenud neljaks faasiks: G1-, S-, G2- ja M-faasiks. Ühest faasist teise üleminekut kontrollib tugevalt konserveerunud süsteem, mis lisaks rakutsükli koordineerimisele, põimib ka rakuvälised signaalid rakutsükliga, et kontrollida raku jagunemist (Cooper, 2000). Selle süsteemi peamisteks regulaatoriteks on tsükliinidest sõltuvad kinaasid (Cdk) ning neid mõjutavad tsükliinid (Gomar-Alba et al., 2017).

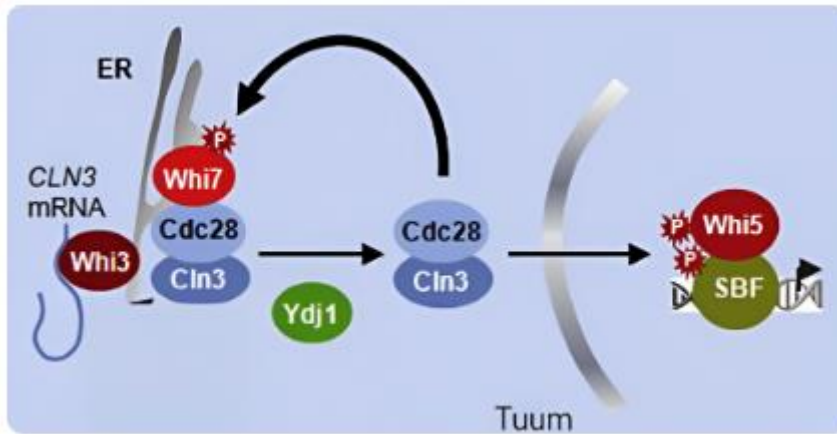
Cdk-d on perekond ensüüme, mis on rakutsükli peamisteks regulaatoriteks. Cdk-d katalüüsivad fosforüülimise reaktsioone, kus adenosiin trifosfaadilt (ATP) võetakse fosfaatmolekul ja kinnitatakse see valgu spetsiaalsetesse fosfaatrühma ühinemiskohtadesse. Ühinemiskohtadeks saavad olla ainult kolme aminohappe kõrvalrühmad. Nendeks aminohapeteks on seriin, treoniin ja türosiin. Fosforüülimisreaktsioonide tulemusel muutub valgu ensümaatilise aktiivsuse või selle interaktsioon teiste molekulidega. Cdk-de aktiivsus on rakutsükli ajal pidevas muutumises. Nende aktiivsuse muutus toob kaasa muutuse erinevate rakukomponentide fosforüülimises ning seeläbi toimuvad muutused ka rakutsükli. Cdk-d on aktiveeritud regulaatorsete valkude poolt, mida nimetatakse tsükliinideks. Cdk aktiivsuse muutus sõltub just raku olevatest tsükliinidest ja nende hulgast. Erinevatel rakutsükli faasidel toodetakse raku erinevaid tsükliine erinevas koguses, mille tulemusel tekivad kindlad Cdk-tsükliin kompleksid, mis põhjustavad rakutsükli erinevaid sündmusi. Tsükliinide kogus ja Cdk aktiivsus on kontrollitud paljude erinevate mehhanismide poolt, mis koos moodustavadki rakutsükli regulatsioonimehhanismi (Morgan, 2007).

1.1.1. Rakutsükli START pagaripärmis

Hetke pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) rakutsükli, kus rakk otsustab alustada uut ringi rakujagunemist nimetatakse START'iks. START toimub G1-faasi lõpuks ning on kriitiliseks otsustamis kohaks, mille järel rakk alustab pöördumatut sündmuste kaskaadi (Charvin et al., 2010). START'i jaoks vajaminevate geenide ekspressioon sõltub transkriptsioonifaktoritest SBF ja MBF. Mõlemad on heterodimeersed kompleksid, mida kontrollivad regulaatorsed alaühikud. SBF-i kontrollib Swi6 ja Swi4 ning MBF-i Swi6 ja Mbp1. SBF-i ülesandeks on kontrollida paljude geenide, sealjuures ka G1 tsükliinide Cln1 ja Cln2, ekspressiooni. MBF reguleerib S-faasi tsükliinide Clb5 ja Clb6 ning DNA metabolismi geene (Barik et al., 2010).

START'i transkriptsiooni aktiveerimine on reguleeritud G1 Cdk-st ja temaga seostunud tsükliini tegevusest. G1-faasi peamised Cdk-tsükliin kompleksid koosnevad Cdk-st nimega Cdk1, teise nimega ka Cdc28, ja tsükliinidest Cln1, Cln2 ja Cln3 (Gomar-Alba et al., 2017). G1-faasi esimeseks esinevaks tsükliiniks on Cln3. Cln3 on kontrollitud valgu Whi3 poolt, mille ülesandeks on Cln3 transkriptsiooni reguleerimine, Cln3 säilitamine endoplasmaatilisel retiikulil (ER) ja Cdk1 kohale toomine (Yahya et al., 2014) (Joonis 1). Kui Cdk1 ja Cln3 omavahel seostuvad on nad võimelised fosforüülima valku Whi5, kuid selleks peab Cdk1-Cln3 dimeer esmalt vabanema ER-ilt. Whi7 on valk, mis toimib nagu ankur ja hoiab Cdk1-Cln3 kompleksi ER-il kinni. ER-ilt toimub esimene Cdk1-Cln3 dimeeri vabastamine tšaperoni Ydj1 poolt. Edasine vabastamine toimub läbi positiivse tagasiside tsükli, kus juba vabastatud Cdk1-Cln3 fosforüülib Whi7, muutes selle inaktiivseks, ja seeläbi vabastades veel Cdk1-Cln3 dimeeri (Gomar-Alba et al., 2017). Piisavas koguses Cdk1-Cln3 vabanemisel fosforüülitakse tuumas valk Whi5 (Barik et al., 2010). Whi5 on SBF transkriptsioonifaktori repressor. Whi5 fosforüülimisel saadetakse Whi5 tuumast välja ning SBF saab kinnituda Cln1 ja Cln2 promootorile alustada nende transkriptsiooni. Cln1 ja Cln2 seostuvad Cdk1-ga moodustades kaks eraldi kompleksi: Cdk1-Cln1 ja Cdk1-Cln2, mis jätkavad Whi5 fosforüülimist (Gomar-Alba et al., 2017). MBF-i ja SBF-i abil transkripteeritud geenid alustavad pungumise, käävikheha duplitseerimise ja DNA replikatsiooni, mis on esmatähtsad protsessid rakutsükli korrektseks edasi liikumiseks (Barik et al., 2010).

Alati ei ole rakud valmis rakutsükliks edasi liikuma ja selleks on spetsiaalsed mehhanismid, mis takistavad rakutsükli edasi liikumist. Selline takistus võib olla tingitud erinevatest oludest, kuid üldiselt viitab see rakustressile (Barik et al., 2010). Lisaks valkudele Whi3 ja Whi5 represserib *Saccharomyces cerevisiae* rakutsükli START'i valk Whi7. Whi7 represserib rakutsükli START'i kahel viisil. Esiteks, hoiab see Cdk1-Cln3 kompleksi ER-il kinni, ning teiseks, toimib Whi7 sarnaselt Whi5-le ning kinnitub Cln2 promootorile ja takistab seeläbi SBF-i seondumist sellele (Yahya et al., 2014) (Gomar-Alba et al., 2017).



Joonis 1. Rakutsükli START'i regulatsioon. Whi3 reguleerib Cln3 translatsiooni, aitab seda säilitada ER-il ja toob Cdk1, teise nimega ka Cdc28, kohale. Whi7 hoiab Cdk1-Cln3 kompleksi ER-il kinni, kuni esimesed kompleksid vabastatakse tsaperoni Ydj1 poolt. Seejärel toimub positiivse tagasiside tsükel, mille käigus juba vabastatud Cdk1-Cln3 fosforüülib Whi7, muutes selle inaktiivseks, ja seeläbi vabastades veel Cdk1-Cln3 kompleksi. Seejärel liigub Cdk1-Cln3 tuuma, kus see fosforüülib Whi5 ja peatab seeläbi SBF transkriptsioonifaktori inhibitsiooni ning SBF transkriptsioonifaktor alustab paljude geenide transkriptsiooni. (Yahya et al., 2014).

1.1.2. START'i regulaatorvalk Whi7

Whi7 või Srl3 on 27468,1 Da suurune valk, mis esialgu avastati Rad53 letaalsuse supressorina (Desany et al., 1998). Lisaks, on teada, et Whi7 on fosforüülitatud Cdk1 poolt ning Whi7 on ka valgu Whi5 paraloo (Ubersax et al., 2003) (Gomar-Alba et al., 2017). Whi7 ja Whi5 on järjestuse poolest sarnased eriti kohtades, kus toimub nende fosforüülimine Cdk1 poolt. Nii Whi7 kui ka Whi5 fosforüülimine toimub G1/S-faasi üleminekul või pärast Cln3 indutseerimist. Whi7 on rakutsükli vältel erineva tasemega fosforüülitatud ning fosforüülimise tase sõltub hetkest rakutsükli alguses on Whi7 vähem fosforüülitatud kui rakutsükli lõpus. Whi7 stabiilsus sõltub tema fosforüülimise tasemest. Rohkem fosforüülitatud Whi7 valgud on ebastabiilsemad kui vähem fosforüülitatud Whi7 valgud. Whi7 on lagundatud ubikvitiini ligaasi kompleksi poolt nimega SCF^{Grr1}. SCF^{Grr1} vajab lagundamiseks fosforüülitatud substraate (Gomar-Alba et al., 2017).

1.2. Valgu puhastamine

Valguekspressioon on rakkudes väga täpselt reguleeritud süsteem, mille abil saavad rakud toota endale eluks vajalikke valke. Anfinsen näitas juba peaaegu pool sajandit tagasi, et informatsioon valgu tertsiaarstruktuuriks peitub DNA-s (Anfinsen, 1973). Õige tertsiaarstruktuur on valgu jaoks väga oluline, sest see määrab ära suuresti valgu funktsionaalsuse. Tänapäeva biotehnoloogias sünteesitakse valke heteroloogsetes süsteemides, kuna naturaalses süsteemides on soovitava valgukoguse saamine väga

keeruline või võimatu. Peamiseks eesmärgiks on ekspresseerida ja puhastada võimalikult suures koguses funktsionaalset valku. Selle sooritamiseks tuleb leida optimaalne ekspressiooniorganism ning parimad tingimused, mis sõltuvad peamiselt uuritavast valgust (Ferrer-Miralles et al., 2015).

Rekombinantse valgu puhastamise jaoks kasutatakse palju erinevaid organisme nagu näiteks: bakter, pärmseen, erinevate putukate rakud, bakuloviiruse süsteem, imetaja rakud, rakkude vabad süsteemid ja taime rakud. Olenemata võimaluste küllusest on kõige populaarsemaks valikuks uurijate seas ikkagi bakteriaalsed süsteemid. Bakteriaalsetest süsteemidest on üheks kõige populaarsemaks organismiks *E.coli*. *E. coli* on kõige rohkem kasutatud just seetõttu, et seda on võimalik suhteliselt lihtsalt geneetiliselt mõjutada, on olemas spetsiaalsed ning suhteliselt odavad ekspressioonivektorid. Lisaks kasvab *E. coli* kiiremini kui teised süsteemid (Wingfield, 2015).

Vahel tuleb heteroloogses organismis rekombinantse valgu ekspresseerimisel ja puhastamisel arvesse võtta ka selle organismi koodonkasutus eelistust. Koodonkasutus eelistus põhineb selles, et enamus aminohapetele vastab rohkem kui üks koodon. Koodonkasutuse eelistus võib liigiti erineda ning sellest tulenevalt on heteroloogses organismis rekombinantse valgu ekspresseerimisel või puhastamisel vaja uuritava valgu geen koodonoptimeerida.

Koodonoptimeerimisel sünteesitakse uuritav geen vastavalt heteroloogse organismi koodoneelistusele. Selleks kasutatakse sünonüümseid mutatsioone, mille käigus muutub koodon, kuid translatsiooni käigus sünteesitav aminohape jääb samaks.

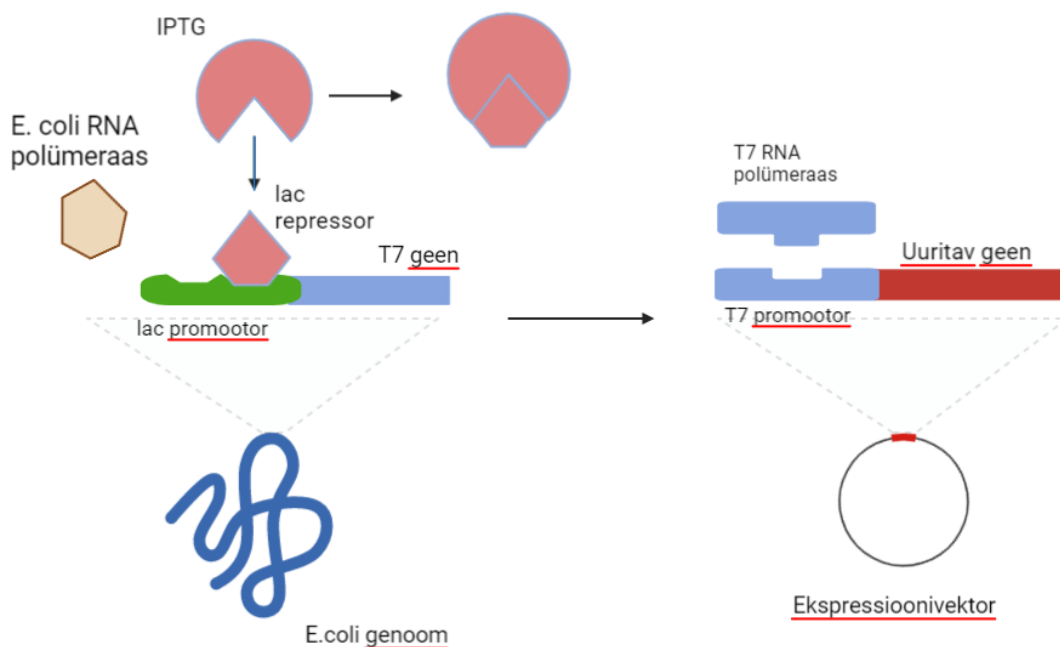
Koodonoptimeerimine võib olla vajalik rekombinantse valgu ekspressiooni või puhastamise efektiivsuse suurendamiseks (Parvathy et al., 2022).

1.2.1. Valgu ekspresseerimine ja puhastamine

Selleks, et uuritavat valku saaks üldse puhastada tuleb seda kõigepealt ekspresseerida.

Bakteris *E. coli* on kõige laialdasemalt kasutatavaks ekspressioonisüsteemiks T7lac promootoril põhinevad plasmiidid (Joonis 2). T7lac promootor süsteem koosneb T7 promootorist, mis kontrollib uuritava valgu ekspressiooni, lac operaatorist ja lac repressorist, mille koostoimel takistatakse T7 promootori tööd ja välditakse tahtmatut valguekspressiooni. Lisaks on vajalik ka spetsiaalne *E. coli* ekspressioonitüvi, mille genoomi on LacUV5 promootori kontrolli alla integreeritud T7 polümeraasi geen. T7 polümeraas on vajalik T7 promootori aktiveerimiseks ja seeläbi valgu ekspresseerimiseks ning LacUV5 promootor on vajalik T7 polümeraasi ekspressiooni kontrollimiseks. LacUV5 repressoriks on eelpool mainitud lac repressor, mis paikneb plasmiidis. T7 promootori kontrolli all olevat valgu

ekspressiooni on võimalik indutseerida isopropüül- β -D-tiogalaktopüranosiidi (IPTG) abil. IPTG peatab lac repressori inhibitsioonivõime, võimaldades T7 polümeraasi ekspressiooni ja indutseerides seeläbi uuritava valgu ekspressiooni (Studier et al., 1990). Ekspresseerimisel on ka oluline, et uuritavat valku ei lagundataks rakusiseste proteaaside poolt. Selleks kasutatakse ekspresseerimiseks *E. coli* tüvesid, mis ei sisalda proteaase (Wingfield, 2015).



Joonis 2. T7-lac promootoril baseeruva ekspressiooniplasmiidi põhimõte. Autori joonis. Lac promootoril asetseb lac repressor, mis takistab *E. coli* RNA polümeraasi kinnitumist LacUV5 promootorile (lac promootorile). IPTG lisamisel ühineb IPTG lac repressoriga ning lac promootor vabastatakse. *E. coli* RNA polümeraas saab uuesti lac promootorile kinnituda ning sünteesima hakatakse T7 RNA polümeraasi. T7 RNA polümeraas kinnitub ekspressioonivektoris asetsevale T7 promootorile, mille tagajärjel algab uuritava geeni pealt transkriptsioon.

Edukal valguekspresseerimisel toodab indutseeritud peremeesorganism suures koguses uuritavat valku. Lisaks uuritavale valgule toodab organism ka teisi enda eluks vajalikke, kuid uurimiseks tahtmatuid, valke. Sellegipoolest tuleb esmalt valgud muus rakumassist eraldada. Valkude eraldamiseks rakud lüüsitakse. Rakkude lüüsimiseks kasutatakse lüüsipuhvrit, mis sisaldab lüotsüümi, detergenti ja soolalahust. Lisaks, pannakse lüüsipuhvrise valgu stabiliseerimiseks ka glütsrooli ja proteaasi inhibiitoreid nagu fenüülmetüülsulfonüüli ning pepstatiin A-d. Rakkude lüüsimisel saadakse rakulüsaat, mis võib olla suhteliselt viskoosne. Viskoossus on peamiselt tingitud rakkudest vabanevast DNA-st ja RNA-st ning nende vähendamiseks lisatakse rakulüsaati DNAasi ja RNAasi. Viimaks, tsentrifuugitakse rakulüsaat, et eraldada lahustuvad valgud mittelahustuvatest valkudes ja muudest rakukomponentidest (Wingfield, 2015).

Uuritava valgu eraldamiseks teistest valkudest kasutatakse afiinsusmarkereid.

Afiinsusmarkerid on polüpeptiidid, ensüümid või väikesed valgud, mis kinnitatakse rekombinantse valgu N- või C-terminusse. Lisaks, võivad afiinsusmarkerid suurendada ka valgu lahustuvust. Üheks kõige laialdasemalt kasutatavaks afiinsusmarkeriks on polühistiidin-marker (Mishra, 2020).

Polühistiidin-marker (His-marker) koosneb tavaliselt 6-10st histidiini molekulist. Selle saab kloonida valgu nii C- kui ka N-terminusse. His-markeri abil on võimalik läbi viia valgu puhastamiseks immobiliseeritud metalli afiinsus kromatograafiat (IMAC). IMAC on kiire meetod valgu puhastamiseks, mille käigus histidiini molekulid seonduvad immobiliseeritud divalentse metalliga, näiteks koobalti või nikliga. Markerit vabastamiseks metalli küljest kasutatakse etüleendiamiintetraetaanhapet (EDTA) või imidasooli. Oma väikese olemuse tõttu ei sega His-marker valgu kristallstruktuuri moodustumist ning seetõttu ei pea seda enamikel juhtudel pärast valgu puhastamist valgu küljest eemaldama (Liu ja Mander, 2010).

2. Eksperimentaalosa

2.1. Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärgiks on kloneerida pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) valgu Whi7 geen bakteri *Escherichia coli* ekspressioonivektorisse ning välja töötada valgu Whi7 puhastamisprotokoll bakterist *Escherichia coli*.

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Töös kasutatud plasmiidid ja *E. coli* tüved

Tabel 1. Plasmiidid.

Plasmiid	Iseloomustus
pET28a Whi7	Bakteriofaag T7 promootori kontrolli all olev koodonoptimeeritud geen Whi7; Km ^R

Tabel 2 *E. coli* tüved.

Tüvi	Genotüüp	Allikas
BL21(DE3)	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5	New England Biolabs Inc.
NEB® Turbo kompetentne <i>E. coli</i>	F' proA+B+ lacIq ΔlacZM15 / fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV galK16 galE15 R(zgb-210::Tn10)TetS endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5	New England Biolabs Inc.
Rosetta (DE3)	F-ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE (CamR)	Merck Biosciences
NiCo21(DE3)	can::CBD fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] arnA::CBD slyD::CBD glmS6A1a ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-	New England Biolabs Inc.

	B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5	
--	---	--

Tabel 3. Kasutatud söötmed.

Sööde	Koostis	Allikas
Luria-Bertani (LB) vedelsööde	1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl	(Bertani, 1951)
Luria-Bertani (LB) agarsööde	1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1,5% agar	(Bertani, 1951)

Vedelsöötme ja agarsöötme puhul lisati plasmidi resistentsusele vastavat antibiootikumi lõppkontsentratsioon:

50 µg/ml kanamütsiin (Km)

50 µg/ml klooramfenikool (Cam)

2.2.2. Töös kasutatud puhvrid

Tabel 4. Töös kasutatud puhvrid.

Puhver	Koostis
1x SDS proovipuhver	50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) broomfenoolsinine, 10% (v/v) glütserool, 2,5% BME
2x SDS proovipuhver	100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) broomfenoolsinine, 20% (v/v) glütserool, 5% BME
1x PBS puhver	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,3)
Puhver A (lüüsipuhver)	50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 600 mM NaCl, 1% Triton x-100, 5% glütserool

Puhver B (lüüsipuhver denatureeriv)	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 600 mM NaCl, 1% Triton x-100, 5% glütserool, 8M urea
Puhver C (pesupuhver denatureeriv)	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 5% glütserool, 8M urea
Puhver D (elueerimispuhver denatureeriv)	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 5% glütserool, 8M urea, 200 mM imidasool
Puhver E	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 5% glütserool
1x TBST	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% (w/v) Tween® 20 detergent
1x TAE puhver	40 mM Tris, 20 mM etaanhape, 1 mM EDTA
1x SDS voolutuspuhver	25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 0,1% SDS

2.2.3. Töös kasutatud ensüümid ja reagentid:

DNA suurusmarker ZipRuler Express DNA Ladder 2 (Thermo Fisher), valkude suurusmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher), endonukleaas FastDigest NotI (Thermo Fisher), endonukelaas FastDigest NdeI (Thermo Fisher), Phusion DNA polümeraas (Thermo Fisher), dNTP (firma), lõss (firma), 10x FastDigest Green restriksioonipuhver (Thermo Fisher), DNAas (firma), (Thermo Fisher), 5x Phusion Green HF puhver (Thermo Fisher), Veise seerum albumiin (Thermo Fischer), 6x His-markeri monoklonaalne antikeha 1mg/ml (Thermo Fischer), sekundaarne antikeha Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP 1mg/ml (Thermo Fischer).

2.2.4. Töös kasutatud oligonukleotiidid

Tabel 5. Töös kasutatud oligonukleotiidid

Praimeri nimi	Oligonukleotiidi järjestus
Whi7F	5' - CGCGCGGCAGCCATATGTTTCT-GAAAACCCCGAATTGGG – 3'
Whi7R	5' –GTA AAACGACGGCCAGT– 3'
Sekvenerimis praimer	5' -TAATACGACTCACTATAGGG– 3'

2.2.5. Plasmiidide konstrueerimine

Rekombinantse Whi7 valgu puhastamiseks bakterist oli vaja konstrueerida plasmiid, kus faagi T7 promotori kontrolli alla on viidud koodonoptimeeritud Whi7 geen. Selleks kasutati pET28a vektorit, mis lisab uuritavale valgule N-terminusse His-markeri.

Kloneerimiseks amplifitseeriti polümeraas ahelreaktsiooni (PCR) abil koodonoptimeeritud Whi7. Koodonoptimeeritud Whi7 telliti firmalt Twist Bioscience sünteetilise DNA-na, mis asetses pUC19 vektoris. PCR-i jaoks tehti järgnev reaktsioonisegu: 5µl 5x Phusion Green HF puhver, 1µl Whi7 DNA, 2,5µl praimer Whi7F (10µM), 2,5µl praimer Whi7R (10µM), 4µl 2,5 mM dNTP, 0,5µl Phusion DNA polümeraas, 34,5µl MQ.

PCR tehti järgneva programmiga:

- 1) 95°C 5 min DNA denatureerimine
- 2) 95°C 20 sek DNA denatureerimine
- 3) 52°C 20 sek praimerite seondumine
- 4) 72°C 15 sek DNA süntees
- 5) 72°C 5 min DNA otsade lõplikuks sünteesiks

Tsükli (2-4) korrati 30 korda. PCR reaktsiooniks kasutati Aeris™ PCR *Thermal Cycler* masinat.

Amplifitseeritud Whi7 DNA fragmendid puhastati reaktsioonisegust kasutades Favorgen FavorPrep™ *GEL/PCR Extraction Mini* komplekti ning elueeriti 50µl.

pET28a vektorit ja Whi7 DNA fragmenti lõigati restriktasidega FastDigest NotI ja FastDigest NdeI temperatuuril 37°C 1h. Selleks tehti 1,5 ml tuubidesse järgnevad reaktsioonisegud:

pET28a reaktsioonisegu (20µl):

2µl 10x FastDigest Green reaktsioonipuhver, 10µl puhastatud pET28a vektor, 1µl NotI, 1µl NdeI, 16µl MQ.

Whi7 reaktsioonisegu (50µl):

5µl 10x FastDigest Green reaktsioonipuhver, 43µl puhastatud Whi7 fragment, 1µl NotI, 1µl NdeI.

Pärast restriksiooni DNA fragmendid eraldati TAE geelelektroforeesil. Selleks jooksutati DNA fragmendid 1% TAE geeli 220V 25 minutit 1x TAE puhvril. Seejärel puhastati DNA fragmendid geelist kasutades *FavorGen FavorPrep™ GEL/PCR Extraction Mini* komplekti ning ligeeriti T4-DNA ligaasiga. Ligeerimiseks kasutati järgnevat reaktsioonisegu: 2µl T4 ligaasi puhver, 1µl lõigatud pET28a, 5µl lõigatud Whi7 DNA, 1µl T4 ligaas, 11µl MQ. Ligeerimisreaktsioon toimus toatemperatuuril 1h.

3µl ligeerimissegu transformeeriti NEB® Turbo kompetentsetesse *E. coli* rakkudesse, mis plaaditi LB + Km (50µg/ml) selektiivsöötmele. Rakke inkubeeriti 37°C juures kolooniate moodustumiseni. Kolooniate moodustumisel inokuleeriti agarostassilt 2 kolooniat erinevatesse katseklaasidesse ning inkubeeriti neid 5ml LB+Km selektiivsöötmes 37°C, 180 RPM-i üleöö. Seejärel eraldati rakkudest plasmiidid kasutades FavorGen FavorPrep™ *Plasmid DNA Extraction Mini* komplekti, mõõdeti plasmiidide kontsentratsioon kasutades NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetrit ning kontrolliti neid sekveneerimisega. Sekveneerimiseks kasutati sekveneerimis praimerit. Pärast kontrollimist transformeeriti plasmiid BL21(DE3), Rosetta (DE3) ja Nico21(DE3) kompetentsetesse *E. coli* ekspressioonitüvedesse. Lisaks transformeeriti kontrolltüve tegemiseks tühi pET28a plasmiid BL21(DE3) rakkudesse. Rakud plaaditi LB + antibiootikum(id) (50µg/ml) selektiivsöötmele ning inkubeeriti 37°C juures kolooniate moodustumiseni

2.2.6. *E. coli* rakkude kasvatamine

E. coli rakkude kasvatamiseks inokuleeriti agarostassilt 1 rakukoloonia, mida kasvatati 5 ml LB + antibiootikum(id) (lisati 50µg/ml vastavalt tüvedele ja plasmiididele) 37°C juures kuni $OD_{600} \approx 0,5$.

2.2.7. *E. coli* rakkude ekspressiooni kontrolliks indutseerimine ja rakulüsaatide tegemine

Pärast rakkude kasvatamist $OD_{600} \approx 0,5$ jagati iga tüve rakud kahe katseklaasi vahel võrdselt ja lisati ühele kasvukeskkonda 1mM IPTG ning kasvatati mõlemaid veel 3h. Seejärel tsentrifugeeriti (Thermo Fischer Sorvall Lynx 6000 tsentrifuug, 5000g, +4 °C, 10 minutit) rakud kokku ning eemaldati supernatant. Valguproovide tegemiseks lisati sademele 100µl 1xSDS proovipuhvrit. Proovid lahutati 10% SDS-poliüakrüülamiidgeelis vastavalt 2.2.8. kirjeldatud meetodile.

2.2.8. SDS-poliüakrüülamiid geelelektroforees

Proovide analüüsimiseks lahutati proovid SDS-poliüakrüülamiidgeelis kasutades geel elektroforeesi. Selleks, kuumutati proovid 95°C 5 minutit, tsentrifugeeriti (Eppendorf® mikrotsentrifuug 5415, 11000g, toatemperatuuril, 30 sekundit) ning lahutati 10% SDS-poliüakrüülamiidgeelis 15 mA, 200V, 1,5h 1x SDS voolutuspuhvril. Valkude visualiseerimiseks värviti geel värviga *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

2.2.9. Western Blot analüüs ekspressiooni kontrolli lüsaatidega.

Western Blot analüüs tehti määramaks Whi7 valgu olemasolu. Selleks kasutati ära valgu N-terminuses olevat His-markerit. His-markeri jaoks on olemas His-markeri monoklonaalne antikeha, mis telliti firmalt Thermo Fischer. Western Bloti läbi viimiseks kasutati ekspressiooni kontrolliks tehtud rakulüsaate. 10% SDS-poliüakrüülamiidgeelile kanti 4µl proovi ning proovid lahutati vastavalt 2.2.8. kirjeldatud meetodile. Valgud kanti SDS-poliüakrüülamiidgeelist üle nitrotselluloos membraanile (Amersham™ Protran® Premium 0,45µm nitrotselluloos membraan) poolkuiva ülekande abil (Bio-Rad Trans-Blot® SD *Semi-Dry Transfer Cell*). Ülekanne sooritati 40 minutit pingel 15V. Seejärel blokeeriti membraan blokeerimislahuses (5% lõss, 1xTBST) üleöö +4°C. Inkubeerimislahusesse (3% lõss, 0,03% NaN₃, 1xTBST) lisati primaarne antikeha (1:1000) ja inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril. Pärast inkubeerimist, membraan pesti 3 korda 15 minutit TBST puhvril. Seejärel membraan inkubeeriti sekundaarse antikeha Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP (Thermo Fischer) lahusega (3%, 1xTBST) (antikeha lahjendus 1:7500) 1 tund toatemperatuuril. Membraani pesti 3 korda 15 minutit 1xTBST puhvril. Järgmiseks viidi läbi ilmutusreaktsioon. Selleks asetati membraan Supersignal™ West Pico PLUS *Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fischer) lahusesse 5 minutiks. Seejärel eemaldati membraanilt üleliigne vedelik ning membraan skaneeriti üles masinaga LI-COR® Odyssey Imager.

2.2.10. *E. coli* rakkude indutseerimine ja rakulüsaatide tegemine Whi7

lahustuvuse kontrolliks.

Rakke kasvatati vastavalt eeltoodud meetodile (2.2.6.) ning indutseeriti vastavalt eeltoodud meetodile (2.2.7.). Seejärel tsentrifugiti (Thermo Fischer Sorvall Lynx 6000 tsentrifuug, 5000g, +4 °C, 10 minutit) rakud põhja ning külmutati vedelas lämmastikus. Rakud lüüsi 2ml puhvris A, millele lisati 2mg lüsotsüümi ning 2µl DNAasi. Seejärel inkubeeriti rakulüsaati +4°C juures pidevalt pöörates 40 minutit ning eraldati 100µl uude tuubi ja lisati sinna 100µl 2xSDS proovipuhvrit. Ülejäänud lüsaat tõsteti 2 ml tuubi ja tsentrifugiti (Thermo Fischer Fresco™ 21 mikrotsentrifuug, 21100g, +4°C, 20 minutit), et eraldada lahustumatu ning lahustuv fraktsioon. 100µl supernatanti tõsteti uude tuubi, lisati sellele 100µl 2xSDS proovipuhvrit ning ülejäänud supernatant visati ära. Sademele lisati 1,9ml 1xSDS proovipuhvrit. Proovid lahutati 10% SDS-poliakrüülamiidgeelis vastavalt 2.2.8. kirjeldatud meetodile.

Lahustuvuskontroll tehti ka denatureerivatel tingimustel. Rakke kasvatati vastavalt eeltoodud meetodile (2.2.6) ja indutseeriti vastavalt eeltoodud meetodile (2.2.7.). Seejärel tsentrifugiti (Thermo Fischer Sorvall Lynx 6000 tsentrifuug, 5000g, +4 °C, 10 minutit) rakud põhja ning külmutati vedelas lämmastikus. Rakkude lüüsimiseks kasutati puhvrit B. Rakud lüüsisid koheselt, seega inkubeerimine polnud vajalik. Lüsaadist eraldati 100µl uude tuubi, millele lisati 100µl 2xSDS proovipuhvrit. Ülejäänud lüsaat tsentrifugiti (Thermo Fischer Fresco™ 21 mikrotsentrifuug 21100g, toatemperatuur, 20 minutit), et eraldada lahustuv ja lahustumatu fraktsioon. Seejärel eraldati uude tuubi 100µl supernatanti, mis segati 100µl 2xSDS proovipuhvriga ning ülejäänud supernatant visati ära. Sademele lisati 1,9ml 1xSDS proovipuhvrit. Proovid lahutati 10% SDS-poliakrüülamiidgeelis vastavalt 2.2.8. kirjeldatud meetodile.

2.2.11. *E. coli* rakkude kasvatamine valgu puhastamiseks

E. coli rakke kasvatati, et puhastada välja rekombinante valk. LB tardsöötmetel inokuleeriti 1 ekspressioonitüve koloonia, ning kasvatati seda 5 ml LB+ 50 µg/ml kanamütsiini vedelsöötmes 37°C juures kuni $OD_{600} \approx 0,5$. Seejärel tõsteti rakud 500 ml LB+ 50 µg/ml kanamütsiini vedelsöötmesse ning kasvatati uuesti kuni $OD_{600} \approx 0,5$, misjärel lisati kasvukeskkonda 1mM IPTG ning kasvatati veel 3h. Rakud tsentrifugiti (Thermo Fischer Sorvall Lynx 6000 tsentrifuug, 5000g, +4 °C, 10 minutit), rakuõõde eemaldati ning rakuõõde pesti 25 ml 1xPBS-iga ja tsentrifugiti uuesti (Thermo Fischer Sorvall Lynx 6000 tsentrifuug,

5000g, +4 °C, 10 minutit). Lõpuks eemaldati supernatant ning rakusade külmutati lammastikus.

2.2.12. Rakkude lüüsimine

Rakusade lüüsimiseks kasutades 15ml puhvrit B. Lüsati sonikeeriti 1 kord 40 sekundit pulksonikaatoriga, et vähendada lüsandi viskoossust ning lüsandist eraldati 100µl uude tuubi ja lisati sinna 100µl 2xSDS proovipuhvrit. Ülejäänud lüsandi tõsteti 2ml tuubidesse ning lahustumatu ja lahustuv fraktsioon eraldati tsentrifuugimise (Thermo Fischer Fresco™ 21 mikrotsentrifuug, 21100g, +4°C, 20 minutit) teel. Pärast tsentrifuugimist eraldati proovi tegemiseks supernatandist 100µl uude tuubi ning lisati sinna 100µl 2xSDS proovipuhvrit. Alles jäänud supernatant tõsteti valgupuhastamiseks uutesse 2ml tuubidesse. Ühe tuubi sade jäeti alles proovi tegemiseks ning ülejäänud visati minema. Sademele lisati 1,9ml 1xSDS proovipuhvrit. Saadud proovid lahutati 10% SDS-poliakrüülamiidgeelis vastavalt 2.2.8. kirjeldatud meetodile.

2.2.13. Valgu puhastamine

Valk puhastati immobiliseeritud metalli afiinsuskromatograafia abil, kasutades 200µl afiinsuskromatograafia kolonne. Kolonn koosnes 200µl metalliiooniga kelaatuvatest sefaroosi kuulikestest (GE Healthcare), mida esmalt pesti 1ml puhvriga B. Seejärel lisati kolonnile 200µl 200mM NiSO₄ ning kolonn pesti uuesti 1ml puhvriga B. Pärast seda pipeteeriti supernatant kolonnile. Pärast kolonnist kogu supernatandi läbi laskmist pesti kolonn 10 ml puhvriga B ning seejärel 5 ml puhvriga C. Elueerimiseks kasutati puhvrit D ning elueeriti 3 korda 200µl. Tulemuseks saadi 3 eluaati. Kõikidest eluaatidest eraldati 20µl uude tuubi proovide tegemiseks. Eraldatud eluaatidele lisati 20µl 2xSDS proovipuhvrit. Saadud proovid lahutati 10% SDS-poliakrüülamiidgeelis vastavalt 2.2.8. kirjeldatud meetodile.

2.2.14. Dialüüs

Dialüüsiks kasutati Spectra/Por® MWCO 3500 dialüüsi membraani. Dialüüsi membraani keedeti 1mM EDTA lahuses 10 minutit, seejärel loputati membraan veega ning pipeteeriti membraani sisse kogu valgupuhastamisel saadud eluaat. Membraan asetati puhvrise E ning puhvrit vahetati 3 korda. 1. korda 1 tunni möödudes, 2. korda 12 tunni möödudes ning uuesti 1 tunni möödudes. Seejärel pipeteeriti membraani jäänud valgulahus uude tuubi. Valgulahusest eraldati 15µl, millele lisati 15µl 2xSDS proovipuhvrit ning ülejäänud tsentrifuugiti (Thermo Fischer Fresco™ 21 mikrotsentrifuug 21100g, +4 °C, 20 minutit), et eraldada lahustuv ja lahustumatu fraktsioon. Seejärel tõsteti supernatant uude tuubi ning eraldati sealt veel 15µl analüüsiks. Sademele lisati eemaldatud supernatandiga võrdses

koguses 1xSDS proovipuhvrit. Proovid lahutati 10% SDS-poliüakrüülamiidgeelis vastavalt 2.2.8. kirjeldatud meetodile.

2.2.15. Valgu kontsentratsiooni määramine

Valgu kontsentratsiooni määramiseks tehti Whi7 valgulahusest puhvriga E 3-kordne, 5-kordne ja 10-kordne lahjendus. Lahjendustest võeti 5µl uude tuubi ning segati see 5µl 2x SDS proovipuhvriga. Lisaks, tehti veise seerum albumiinist (BSA) lahjendused puhvrise E nii, et SDS-poliüakrüülamiidgeelile saaks kanda BSA-d kogustes 125ng, 250ng, 500ng, 750ng, 1500ng. Enne geelile kandmist segati BSA lahjendused 2x SDS proovipuhvriga suhtes 1:1. Saadud proovid lahutati SDS-poliüakrüülamiidgeelis vastavalt 2.2.8. kirjeldatud meetodile. Valkude visualiseerimiseks värviti geel kolloid Coomassie Blue G250 värviga. Geelidel olevad vöödid kvantiseeriti programmi ImageQuant TL abil, mille alusel koostati BSA standardkõver ning arvutati valgulahuse kontsentratsioon.

2.3. Tulemused ja arutelu

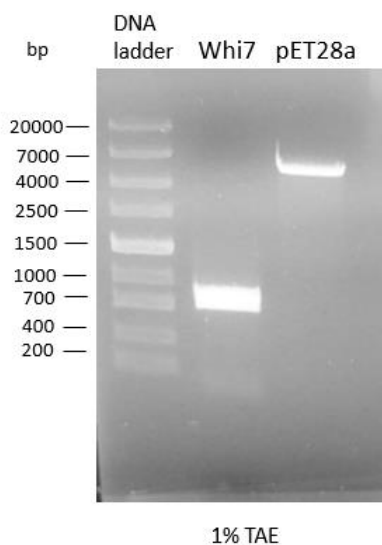
Käesoleva töö eesmärk oli välja töötada pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) valgu Whi7 puhastamisprotokoll bakterist *Escherichia coli*. Puhastamine ei saa kindlasti toimuda eukariootsest süsteemist, sest Whi7 esineb pärmis enamus ajast fosforüülitud vormis ning edasised plaanid puhastatud valguga nõuavad post-translatsiooniliste modifikatsioonide puudumist.

2.3.1. Ekspressiooniplasmiidi konstrueerimine.

Plasmiidid konstrueeriti materjalides ja meetodites alapeatükis 2.2.5. kirjeldatud viisil. DNA fragmendid eraldati TAE geelelektroforeesil (Joonis 3). Whi7 eeldatav suurus oli 738bp ja pET28a eeldatav suurus oli 5297bp, Restriksioonianalüüsis saadud suurused vastavad Whi7 DNA ja pET28a eeldatavate suurustega. Järgmiseks viidi läbi ligeerimisreaktsioon, et sisestada Whi7 fragment pET28a vektorisse. Seejärel transformeeriti ligeerimisreaktsioonisegu NEB® *Turbo* kompetentsetesse *E. coli* rakkudesse. Rakud plaaditi LB + Km (50µg/ml) selektiivsöötmele, et eristada pET28a + Whi7 plasmiidi sisaldavad rakud plasmiidita rakkudest ja inkubeeriti 37°C kuni kolooniate moodustumiseni.

Kolooniast eraldati plasmiidid vastavalt materjalides ja meetodites (2.2.5.) kirjeldatud viisile. Saadud plasmiidide kontsentratsioon mõõdeti NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga. Plasmiidide kontrollimiseks plasmiidid sekveneeriti kasutades sekveneerimis praimerit.

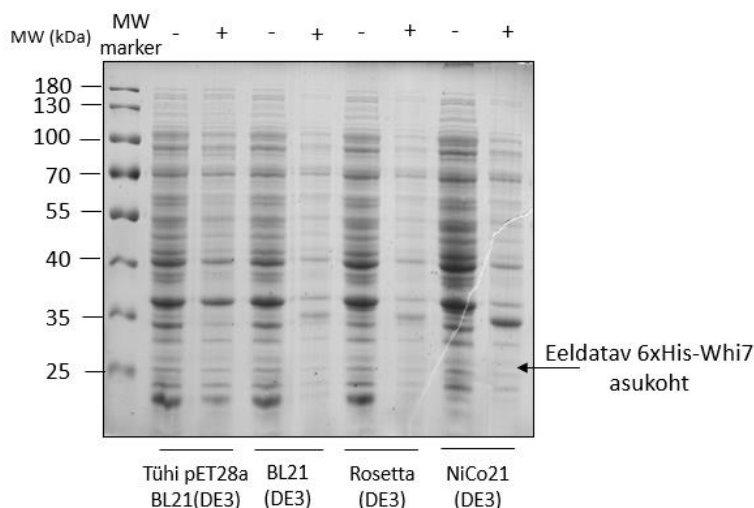
Pärast kontrollimist transformeeriti plasmiid BL21(DE3), Rosetta (DE3) ja Nico21(DE3) kompetentsetesse *E. coli* ekspressioonitüvedesse. Lisaks transformeeriti kontrolltüve tegemiseks BL21(DE) rakkudesse tühi pET28a plasmiid. Rakud plaaditi LB + antibiootikum (lisati 50µg/ml vastavalt plasmiidile ja tüvele) selektiivsõotmele, et eristada pET28a + Whi7 plasmidi sisaldavad rakud plasmiidita rakkudest ja inkubeeriti 37°C kuni kolooniate moodustumiseni.



Joonis 3. Whi7 ja pET28a restriksioonianalüüs. NotI ja NdeI restriктаasidega lõigatud Whi7 ja pET28a fragmendid. Geelile kanti ZipRuler Express DNA Ladder 2.

2.3.2. Whi7 ekspressiooni kontrollimine

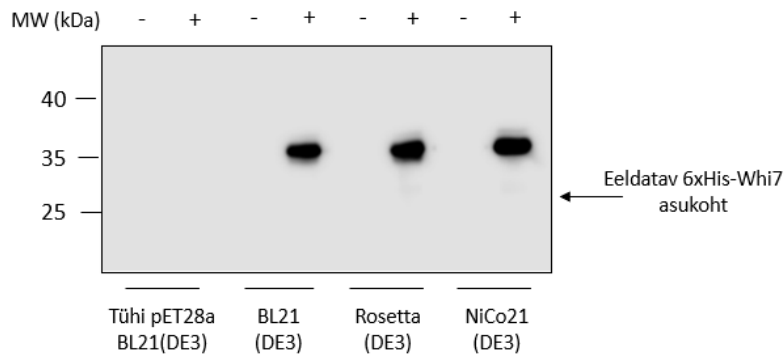
Whi7 ekspressiooni kontrollimiseks kasvatati rakke vastavalt materjalide ja meetodite alapeatükis 2.2.6. välja toodud viisile. Rakulüsaadid valmistati vastavalt materjalide ja meetodite alapeatükis 2.2.7. kirjeldatud viisile. Joonis 4 järgi ei ole valku Whi7 eeldataval kõrgusel (~27 kDa) olemas, kuid võrreldes indutseeritud ja indutseerimata proove, siis on indutseeritud rakkudel ~35 kDa juures vööt olemas, mis indutseerimata rakkudel puudub. Lisaks puudub vööt ~35 kDa juures ka tühja plasmiidiga BL21(DE3) rakkudel. Seega võib Whi7 asetseda SDS-poliakrüülamiidgeelis kõrgemal, kui selle molekulmass eeldab. Whi7 olemasolu kontrollimiseks viime läbi Western Blot analüüsi.



Joonis 4. Whi7 valgu ekspressioon erinevates tüvedes. Indutseeritud rakkudele oli lisatud 1mM IPTG. + tähistab indutseeritud rakke ja – indutseerimata rakke. Whi7 ~27 kDa. Geeli esimesel ja viimasel rajal on valgumarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher). 2. ja 3. rajal on BL21(DE3) rakud koos tühja pET28a plasmiidiga. 4. ja 5. rajal on BL21(DE) rakud koos pET28a + Whi7 plasmiidiga. 6. ja 7. rajal on Rosetta(DE3) rakud koos pET28a + Whi7 plasmiidiga. 8. ja 9. rajal on NiCo21(DE3). Geelile kanti 3µl proovi.

2.3.3. Western blot analüüs Whi7 asukoha kontrollimiseks

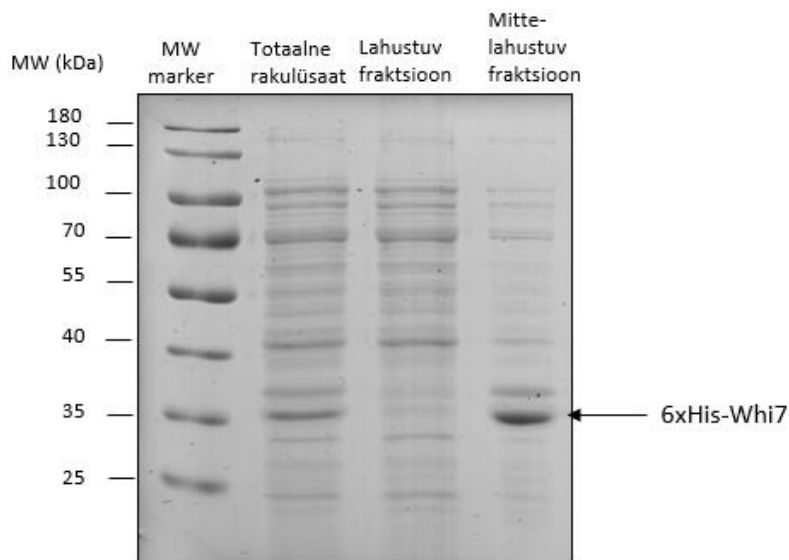
Kuna induksioonikontrolli järgi puudub valk ~27 kDa juures, kuid indutseeritud proovidel oli vööt ~35 kDa juures olemas, siis kontrolliti valgu olemasolu rakulüsaatides Western Blot analüüsi abil. Western Blot analüüs viidi läbi vastavalt materjalides ja meetodites (2.2.9.) kirjeldatud viisil. Selleks kasutati ära valgu N-terminuses olevat His-markerit. His-markeri jaoks on olemas His antikeha, mis telliti firmalt Thermo Fischer. Joonise 5 põhjal on näha, et kõikides proovides ~27 kDa juures, kus Whi7 peaks olema olemas, vööt puudub, kuid indutseeritud proovides natuke kõrgemal ~35 kDa juures on see olemas. Seega võib eeldada, et Whi7 jääb SDS-poliakrüülamiidgeelis millegipärast kõrgemale, umbes 35 kDa juurde. Lisaks on ka näha, et kõikides indutseeritud tüvedes, kus on Whi7 plasmiid, on toimunud Whi7 ekspressioon. Nendeks tüvedeks on BL21(DE), Rosetta (DE) ja NiCo21(DE) rakud. NiCo21(DE) rakud on spetsiaalselt loodud efektiivsemaks IMAC-i tegemiseks, mis on ka sinise töö edasine plaan. NiCo21(DE3) rakkudes on muteeritud valk GlnS, millel on 6 järjestikust histidiini muteeritud 6-ksalaniiniks. Sedasi ei kinnitu GlnS IMAC-i ajal metalliiooni külge ning ei põhjusta puhastamisel kontamineerumist (Robichon et al., 2011). Lisaks on jooniselt 4 ja 5 näha, et Nico21(DE3) rakkudel on sarnane Whi7 ekspressioon BL21(DE3) ja Rosetta (DE3) rakkudega. Kuna Nico21(DE3) tüvi on spetsiaalselt loodud IMAC-i läbi viimiseks ning Whi7 ekspresseerub nendes sarnaselt teiste katsetatud tüvedega, siis kasutame edasisteks katseteks ainult Nico21(DE3) tüve rakke.



Joonis 5. 6xHis-Whi7 Western Blot analüüs. + Tähistab IPTG-ga indutseeritud rakke ning – tähistab indutseerimata rakke. 6xHis-Whi7 jääb SDS-poliüakrüülamiidgeelis eeldatavast asukohast kõrgemale, umbes ~35 kDa juurde.

2.3.4. Whi7 lahustuvus natiivsetel tingimustel rakulüsaadis

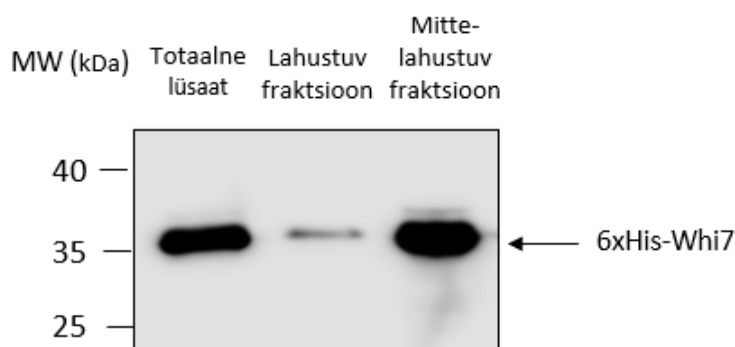
Whi7 lahustuvuse kontrollimiseks kasvatati ekspresioonitüve vastavalt käesoleva töö materjalide ja meetodite alapeatükis 2.2.6. kirjeldatud tingimustel. Rakud indutseeriti ja rakulüsaadid valmistati vastavalt materjalide ja meetodite alapeatükis 2.2.10. kirjeldatud viisil. Enne valgu puhastamist kontrollisime valgu lahustuvust rakulüsaadis. Joonis 6 järgi on rakulüsaadis Whi7 valk olemas, kuid valk jääb enamikus osas sademesse. Rakulüsaadi supernatandis valk puudub, seega suurema tõenäosusega pole suuremal skaalal natiivsetel tingimustel valgupuhastamisel mõtet. Tulemuste kontrollimiseks viiakse läbi Western Blot.



Joonis 6. Whi7 valgu lahustuvus. Esimesel rajal on valgumarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher). Totaalne rakulüsaat, rakulüsaadi lahustuv fraktsioon, rakulüsaadi mittelahustuv fraktsioon. Whi7 valk on ~35 kDa juures. Väga suur osa valgust jääb lahustumatusse fraktsiooni. Geelile kantud 4µl proovi.

2.3.5. Western Blot analüüs lahustuvuse kontrollist

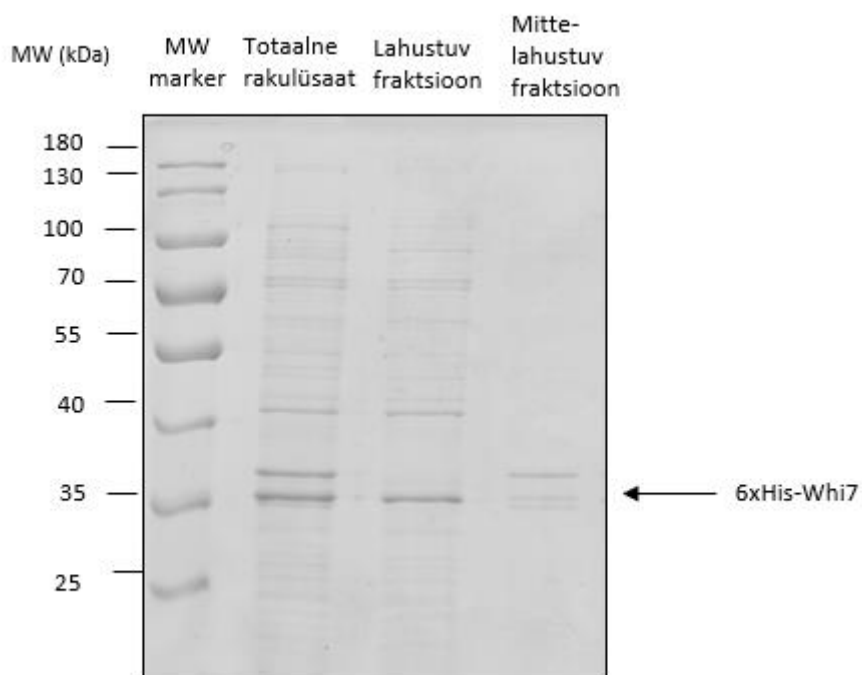
Kinnitamaks, et Whi7 ei ole natiivsetel tingimustel lahustuv, viidi läbi Western Blot analüüs. Western Blot analüüs viidi läbi vastavalt materjalides ja meetodites (2.2.9.) kirjeldatud viisile. Western Blot analüüsiks kasutati 2.2.10. tehtud proove. Joonise 7 põhjal on näha, et väga väike osa Whi7 valku jääb lahustuvasse fraktsiooni ja enamus jääb mittelahustuvasse fraktsiooni. Kuna lahustuv fraktsioonis on väga väike osa valku, ei ole suuremal skaalal natiivsetel tingimustel valgupuhastamisel mõtet, seega proovime puhastada valku denatureerivatel tingimustel.



Joonis 7. Western Blot analüüs lahustuvast ja lahustumatust fraktsioonist natiivsetel tingimustel rakulüsaadis. Enamus Whi7 valku jääb mittelahustuvasse fraktsiooni ning väga väike osa jääb lahustuvasse fraktsiooni.

2.3.6. Whi7 lahustuvus denatureerivatel tingimustel

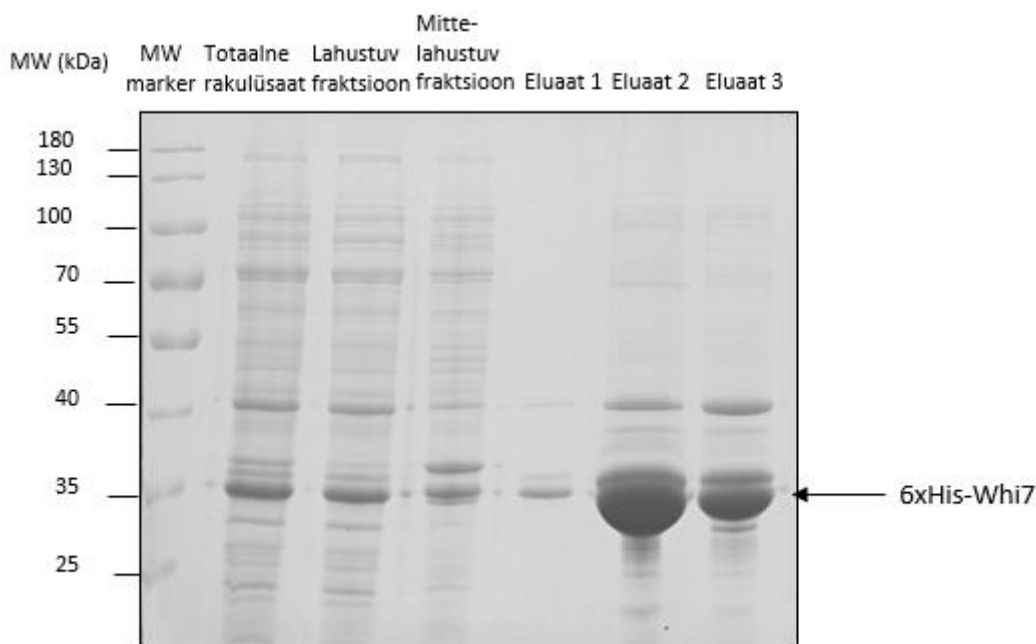
Kuna lahustuv fraktsioonis Whi7 ei esine, siis tuleb valgupuhastamist läbi viia denatureerivatel tingimustel, kuid enne suures mahus puhastamist saab kontrollida valgu lahustuvust ka denatureerivatel tingimustel. Selleks korrati lahustuvuskontrolli denatureerivatel tingimustel vastavalt materjalides ja meetodites (2.2.10.) kirjeldatud viisile. Joonise 8 põhjal on näha, et totaalses rakulüsaadis on Whi7 valk olemas, kuid seekord esineb enamik valgust lahustuv fraktsioonis ja ainult väike osa lahustumatus fraktsioonis. Seega on Whi7 valk denatureerivatel tingimustel lahustuv. Sellest tulenevalt saame edasi liikuda valgu puhastamise juurde.



Joonis 8. Whi7 lahustuvus denatureerivatel tingimustel. Esimesel rajal on valgumarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher). Totaalne rakulüsaat, rakulüsaadi lahustuv fraktsioon, rakulüsaadi mittelahustuv fraktsioon. Geelile on kantud 3µl proovi. Enamus 6xHis-Whi7 on rakulüsaadi lahustavas fraktsioonis.

2.3.7. Valgu Whi7 puhastamine

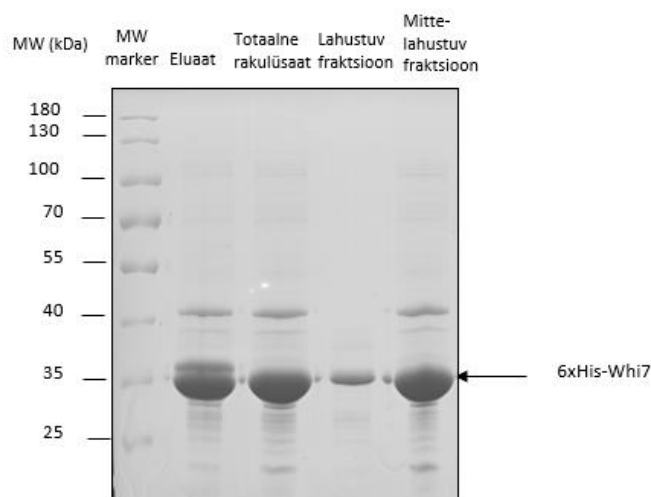
Valgu Whi7 puhastamiseks kasvatati rakke materjalides ja meetodites (2.2.11.) kirjeldatud viisil. Rakke lüüsi materjalides ja meetodites (2.2.12.) kirjeldatud viisil ning puhastamine viidi läbi materjalides ja meetodites (2.2.13.) kirjeldatud viisil. Joonise 9 alusel on näha, et enamus valgust jääb rakulüsaadi lahustuvasse fraktsiooni, kuid osa valgust sadeneb ka 8M urea juuresolekul välja, mida võis näha ka denatureerivatel tingimustel tehtud lahustuvus kontrollis. Pärast valgu puhastamist on näha, et eluaat 1-s on väga väike kogus materjali ja enamus materjalist jääb eluaat 2-te ja eluaat 3-e. Lisaks on näha, et puhastada on suudetud Whi7 valku, kuid kaasa on tulnud ka muud teadmatud valgud (~40 kDa juures). Üldiselt võib öelda, et Whi7 valgu puhastamine on denatureerivatel tingimustel olnud edukas.



Joonis 9. Suures mahus valgu puhastamine. Esimesel rajal on valgumarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher). Totaalne rakulüsaat, rakulüsaadi lahustuv fraktsioon, rakulüsaadi mittelahustuv fraktsioon, eluaat 1, eluaat 2, eluaat 3. Valguekspressioon ja puhastamine on olnud edukas ning enamuse valku on denatureerivates tingimustes lahuses. Geelile kantud 3µl proovi.

2.3.8. Dialüüs

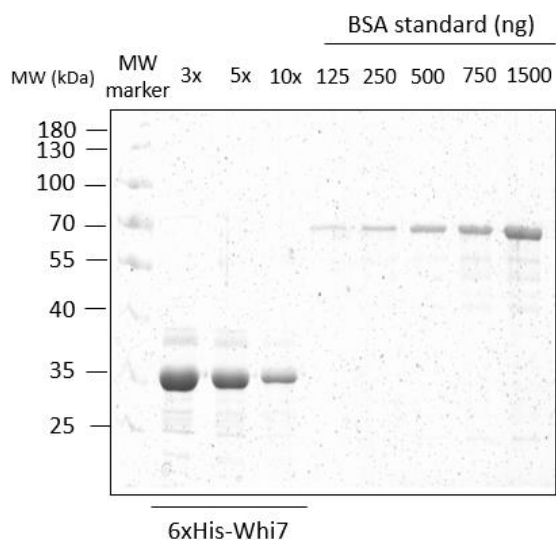
Kuna valk puhastati denatureerivatel tingimustel on vaja valgu funktsionaalsuse taastamiseks see renatureerida, kuid renatureerimine ei saa toimuda suure kontsentratsiooniga urea juuresolekul. Dialüüs viidi läbi materjalides ja meetodites alapeatükis 2.2.14. kirjeldatud viisil. Joonise 10 põhjal on näha, et pärast dialüüsi jääb enamuse Whi7 valku sademesse. Sademesse jääb valk just seetõttu, et dialüüsi käigus eemaldati lahusest urea, mis takistas valgusiseseid ja valkude vaheliste vesiniksidemete teket ning seeläbi suurendas valgu lahustuvust. Seega on eeldatav, et osa valku sadeneb pärast urea eemaldamist lahusest välja. Sellegipoolest on puhastamine ja dialüüs olnud edukad, sest osa valgust on olemas ka lahustavas fraktsioonis, seega on suudetud puhastada *Saccharomyces cerevisiae* valk Whi7 bakterist *Escherichia coli*.



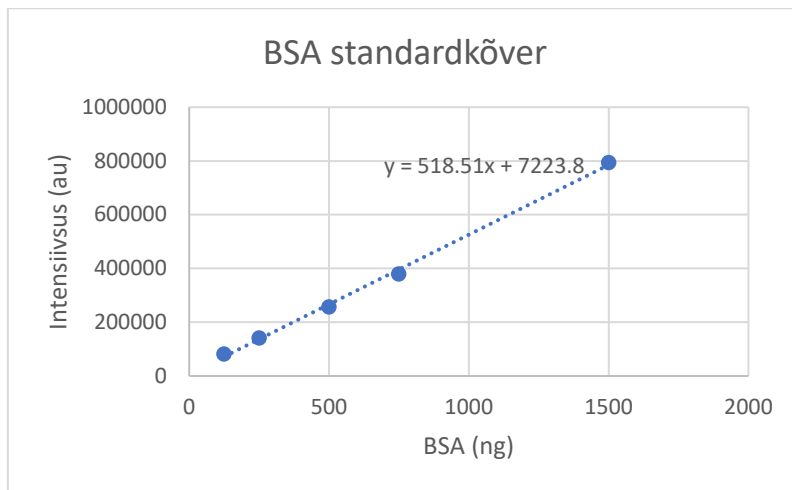
Joonis 10. Suures mahus valgu puhastamine ja dialüüs. Esimesel rajal on valgumarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher). Eluaat 1, 2 ja 3 kokku segatud, pärast dialüüsi totaalne rakulüsaat, pärast dialüüsi lahustuv fraktsioon, pärast dialüüsi mittelahustuv fraktsioon. On näha, et enamus Whi7 valku jääb sademesse, kuid sellegipoolest jääb piisavas koguses uuritavat valku ka lahustuvasse fraktsiooni. Geelile kantud 3µl proovi.

2.3.9. Valgu koguse hindamine

Valgu koguse määramiseks võrreldi Whi7 valgu lahusest tehtud lahjendusi SDS-poliakrüülamiidgeelis BSA-ga. See viidi läbi vastavalt materjalides ja meetodites (2.2.15.) kirjeldatud viisile. Joonisel 11 olevad tulemused kvantiseeriti, kasutades programmi ImageQuant TL. Tulemustest tehti BSA standardkõver (Joonis 12), mille abil arvutati valgu kontsentratsioon lahuses. Puhastatud valgulahuse kontsentratsiooniks saadi 80,135 µM.



Joonis 11. Whi7 kontsentratsiooni hindamine BSA abil. Whi7 valgulahuse lahjendused. Geelile kanti valgulahjendusi 5 µl. BSA-d kanti geelile kogustes 125ng, 250ng, 500ng, 750ng ja 1500ng.



Joonis 12. BSA standardkõver. Joonisel 8 olevatest vöödid kvantifitseeriti ning tulemustest saadi BSA standardkõver. Sirge võrrand $y = 518.51x + 7223.8$.

Käesoleva bakalaureusetöö käigus kloneeriti *Saccharomyces cerevisiae* valk Whi7 bakteri ekspressioonivektorisse ja töötati välja puhastamisprotokoll valgu Whi7 puhastamiseks bakterist *E. coli*. Bakalaureusetöö eesmärkide täitmiseks kloneeriti *Saccharomyces cerevisiae* valgu Whi7 geen bakteri *E. coli* pET28a ekspressioonivektorisse ning transformeeriti see erinevatesse *E. coli* ekspressioonitüvedesse. Valk puhastati denatureerivatel tingimustel kasutades immobiliseeritud metalli afiinsus kromatograafia ning renatureeriti dialüüsi abil. Tehtud katsete abil võib väita, et kloneerimine ja valgu puhastamine on olnud edukad, kuid puhastatud valgu funktsionaalsust tuleb veel kontrollida, kuna dialüüsi käigus võis valk valesti voltuda ja seeläbi võis muutuda valgu funktsionaalsus. Edasiseks plaaniks on puhastatud valgu funktsionaalsuse kontrollimine ning valgu funktsiooni täpsem uurimine *in vitro*. Valgu edasine uurimine on oluline just seetõttu, et see on substraadiks tsükliinile Cln3, mis on rakutsükli G1-faasis tsentraalse tähtsusega.

Kokkuvõte

Whi7 on pärmis *S. cerevisiae* rakutsükli START'i oluline regulaatorvalk. Whi7 stabiilsus sõltub valgu fosforüülimis tasemest ning kõige stabiilsem on Whi7 fosforüülimata vormis. Selleks, et Whi7 saaks edasi uurida, on vaja see stabiilses vormis puhastada. Valgu puhastamiseks kloneeriti *E. coli* jaoks koodonoptimeeritud Whi7 geen bakteriaalsesse ekspresioonivektorisse ning transformeeriti saadud plasmiid *E. coli* ekspresioonitüvesse. Seejärel ekspresseeriti valku ekspresioonitüvedes ning viidi läbi valgu puhastamine denatureerivate tingimustel kasutades immobiliseeritud metalli afiinsuskromatograafiat. Seejärel valgud renatureeriti dialüüsiga ning arvatati valgu kontsentratsioon.

Käesoleva töö eesmärgiks on kloneerida pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) valgu Whi7 geen bakteri *Escherichia coli* ekspresioonivektorisse ning välja töötada valgu Whi7 puhastamisprotokoll bakterist *Escherichia coli*.

Bakalaureusetöö käigus suudeti kloneerida *S. cerevisiae* valgu Whi7 geen bakteriaalsesse ekspresioonivektorisse ning optimeerida Whi7 puhastamisprotokoll bakterist *E. Coli*. Puhastatud valgulahuse kontsentratsioon arvatati SDS-poliüakrüülamiidgeeli vöötide kvantifitseerimisel saadud BSA standardkõvera alusel. Lisaks avastati, et Whi7 jookseb SDS-poliüakrüülamiidgeelis kõrgemal, kui selle molekulmass viitab.

Summary

Purification of budding yeast protein Whi7 from *Escherichia coli*

Rasmus Enno

Summary

Cell cycle is a process during which, cellular components are duplicated and divided evenly between 2 daughter cells. The cell cycle progression is controlled by cyclin dependent kinases (CDK) and cyclins, which activate CDK-s

Whi7 is a regulatory protein in budding yeast that acts like an anchor and holds the Cdk1-Cln3 complex, the first forming CDK-cyclin complex in G1, on the Endoplasmic reticulum (ER). In addition, Whi7 suppresses the attachment of SBF transcription factor to Cln2 promotor and therefore suppresses the transcription of cell cycle START. Whi7 stability is regulated by its level of phosphorylation. The more phosphorylated Whi7 is, the less stable it is. In order to study Whi7 in vitro, the stable and functional protein has to be purified.

The aim of this thesis was to clone the *S. cerevisiae* Whi7 gene into an *E. coli* expression vector and develop a protocol of Whi7 protein purification from *E. coli*.

In the experimental part of the thesis we cloned the Whi7 gene into an *E. coli* expression vector and transformed the vector into *E. coli* expression strains. Then the protein expression was induced and Whi7 was purified under denaturing conditions using Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). The proteins were renatured using dialysis and the protein concentration was measured.

The results of the experiments indicate that the cloning and protein purification were successful, but the functionality of the purified protein remains to be tested in the future.

Kasutatud kirjandus

- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science (New York, N.Y.)*, 181(4096), 223–230. <https://doi.org/10.1126/science.181.4096.223> (20.05.23)
- Barik, D., Baumann, W. T., Paul, M. R., Novak, B., & Tyson, J. J. (2010). A model of yeast cell-cycle regulation based on multisite phosphorylation. *Molecular Systems Biology*, 6, 405. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.55> (27.05.23)
- Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014). Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1170, 29–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2 (19.05.23)
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293–300. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951> (20.05.23)
- Charvin, G., Oikonomou, C., Siggia, E. D., & Cross, F. R. (2010). Origin of irreversibility of cell cycle start in budding yeast. *PLoS Biology*, 8(1), e1000284. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000284> (20.05.23)
- Cooper, G. M. (2000). The Eukaryotic Cell Cycle. In *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition*. Sinauer Associates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/> (20.05.23)
- Desany, B. A., Alcasabas, A. A., Bachant, J. B., & Elledge, S. J. (1998). Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes & Development*, 12(18), 2956–2970. <https://doi.org/10.1101/gad.12.18.2956> (22.05.23)
- Ferrer-Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z., & García-Fruitós, E. (2015). General introduction: Recombinant protein production and purification of insoluble proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1258, 1–24. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_1 (21.05.23)
- Gomar-Alba, M., Méndez, E., Quilis, I., Bañó, M. C., & Igual, J. C. (2017). Whi7 is an unstable cell-cycle repressor of the Start transcriptional program. *Nature Communications*, 8, 329. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00374-1> (20.05.23)
- Liu, H. W., Mander, L. 2010. Comprehensive Natural Products II, p710-712. Elsevier Ltd, Amsterdam
- Mishra, V. (2020). Affinity Tags for Protein Purification. *Current Protein & Peptide Science*, 21(8), 821–830. <https://doi.org/10.2174/1389203721666200606220109> (24.05.23)

- Morgan, D. 2007. *The Cell Cycle*, p8. New Science Press Ltd, London
- Parvathy, S. T., Udayasuriyan, V., & Bhadana, V. (2022). Codon usage bias. *Molecular Biology Reports*, 49(1), 539. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06749-4> (23.05.23)
- Robichon, C., Luo, J., Causey, T. B., Benner, J. S., & Samuelson, J. C. (2011). Engineering Escherichia coli BL21(DE3) Derivative Strains To Minimize E. coli Protein Contamination after Purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography ▽. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(13), 4634–4646. <https://doi.org/10.1128/AEM.00119-11> (22.05.23)
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., & Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*, 185, 60–89. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)85008-c](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)85008-c) (23.05.23)
- Ubersax, J. A., Woodbury, E. L., Quang, P. N., Paraz, M., Blethrow, J. D., Shah, K., Shokat, K. M., & Morgan, D. O. (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*, 425(6960), 859–864. <https://doi.org/10.1038/nature02062> (21.05.23)
- Wingfield, P. T. (2015). Overview of the Purification of Recombinant Proteins. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.]*, 80, 6.1.1-6.1.35. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80> (20.05.23)
- Yahya, G., Parisi, E., Flores, A., Gallego, C., & Aldea, M. (2014). A Whi7-anchored loop controls the G1 Cdk-cyclin complex at start. *Molecular Cell*, 53(1), 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.11.015> (22.05.23)

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Rasmus Enno

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „**Pagaripärmi valgu Whi7 puhastamine bakterist *Escherichia coli***“

mille juhendajad on Ervin Valk ja Mart Loog

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 4.0, 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.

Rasmus Enno

29.05.2023