

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOGIA INSTITUUT
MOLEKULAARBIOLOGIA ÕPPETOOL

Kristiina Raja

OsTIR1 ja Utp5-AID* valke ekspresseeriva pagaripärmi tüve konstrueerimine

Bakalaureusetöö

Juhendaja PhD Tiina Tamm

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Ribosoomi üldiseloomustus.....	7
1.1.1 Ribosoomi struktuur.....	7
1.1.2 Ribosoomi subühikud.....	8
1.1.3 Eukarüoodi ribosoom.....	10
1.2 Eukarüoodi ribosoomi biogenees.....	11
1.2.1 Pagaripärmi ribosoomi biogenees	11
1.3 Indutseeritavad valkude degradeerimise süsteemid	14
1.3.1 Ankruga Eemale meetod	14
1.3.2 Valgu aktiivsuse kontroll läbi hormoonkompleksi	16
1.3.3 Temperatuuritundlik degron.....	18
1.3.4 Auksiinitundlik degron.....	20
2. EKSPERIMENTAALOSA	23
2.1 Töö eesmärgid.....	23
2.2 Materjal ja meetodika	23
2.2.1 <i>LoxP</i> järjestustega <i>kanMX6</i> kasseti amplifitseerimine.....	26
2.2.2 <i>LoxP</i> järjestustega <i>kanMX6</i> markergeeni sisaldava plasmidi konstrueerimine	27
2.2.3 Bakterirakkude transformatsioon	27
2.2.4 Miniprep plasmiidse DNA eraldamine <i>E. coli</i> rakkudest	28
2.2.5 Restriktsioonanalüüs	28
2.2.6 Degronkasseti ning <i>ARG4</i> ja <i>LYS1</i> deletsioonikassetide amplifitseerimine enne transformatsiooni	28

2.2.7	Pagaripärmi transformeerimine.....	29
2.2.8	Pärmi genoomse DNA eraldamine ja transformantide analüüs PCR meetodil.....	30
2.2.9	Rekombinatsioon Cre rekombinaasiga.....	30
2.2.10	Sporulatsioon ja tetraadide analüüs.....	31
2.2.11	Rakulüsaadi valmistamine Western blot analüüsi jaoks	31
2.2.12	Western blot analüüs	31
2.3	Tulemused ja arutelu.....	33
2.3.1	<i>LoxP</i> järjestustega deletsioonimarkeri konstrueerimine	33
2.3.2	<i>ARG4</i> ja <i>LYS1</i> deletsioonimutantide konstrueerimine kasutades <i>loxP</i> järjestusi sisaldavat deletsioonikassetti.....	35
2.3.3	Rekombinatsioon Cre rekombinaasiga.....	37
2.3.4	$\Delta arg4\Delta lys1$ haploidse tüve konstrueerimine	38
2.3.5	OsTIR1 $\Delta arg4\Delta lys1$ ekspressioonitüve konstrueerimine.....	39
2.3.6	UTP5-AID hübriidvalku ekspresseeriva pärmitüve konstrueerimine	40
2.3.7	Utp5-AID ning OsTIR1 ekspresseeriva pärmitüve konstrueerimine	44
2.4	Arutelu	46
	KOKKUVÕTE.....	49
	SUMMARY	50
	KIRJANDUSE LOETELU.....	52
	LISAD	57
	Lisa 1. Töös kasutatud bakteri söötmete koostised	57
	Lisa 2. Töös kasutatud pärmi söötmete koostised	57
	Lisa 3. Haploidides läbi viidud rekombinatsiooni järel saadud diploidide tetraadide analüüs .	58
	Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	59

KASUTATUD LÜHENDID

AID* - auksiin-indutseeritud degron

cs – külmatundlik (ingl. k *cold sensitive*)

EDTA - etüleendiamiintetraatsetaat

ETS - välimine vahejärjestus (ingl. k *external transcribed spacer*)

FRB - FKBP12-rapamütsiini-sidumis domeen

DHFR - dihidrofolaaadi reduktaas

DMSO - dimetüül-sulfoksiidi

dNTP - desoksünukleosiidtrifosfaat

HBD - hormooni siduv domeen

Hph - hügromütsiin

ITS - sisemine vahejärjestus (ingl. k *internal transcribed spacer*)

Nat - nourseotritsiin

NLS - tuuma lokalisatsiooni signaal (ingl. k *nuclear localization signal*)

nt - nukleotiid

PCR - polümeraasi ahelreaktsioon (ingl. k *polymerase chain reaction*)

rRNA - ribosomaalne ribonukleiinhape

SILAC - stabiilsete isotoopidega märgistamine rakukultuuris aminohapete abil (ingl. k *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*)

snoRNA - väike tuuma RNA

TBE - TrisHCl-boorhape-EDTA

ts – temperatuuritundlik (ingl. k *temperature sensitive*)

U – ühik (ingl. k *unit*)

SISSEJUHATUS

Esimene eukarüootne genoom, mille sekveneerimisel saadud järjestus avaldati 1996. aastal, oli pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* genoom (Goffeau jt., 1996). Pagaripärmi ligi 6000 geenist on 18,7% hädavajalikud rakkude kasvamiseks laboritingimustes (30°C juures glükoosi sisaldaval rikkal söötmel) (Giaever et al., 2002). Hädavajalikeks on enamjaolt geenid, mis on seotud elutähtsate protsessidega: DNA replikatsioon, transkriptsioon, splaissimine, ribosoomide biosüntees, translatsioon, rakumembraani ja rakukesta biogenees, tuumatransport ning põhilised tsütoskeleti funktsioonid.

Eluks hädavajalikke geenide poolt kodeeritud valkude funktsioonide uurimiseks kasutatakse enamasti konditsionaalsete mutantide meetodit. Konditsionaalsetel mutantidel säilib metsiktüübi lähedane fenotüüp lubatud e. permissiivsetel kasvutingimustel. Piiravatel e. mittepermissiivsetel kasvutingimustel avaldub aga mutatsioonist põhjustatud fenotüüp. Alternatiivseks meetodiks hädavajalike valkude funktsioonide uurimiseks on nende valkude lokaliseerimise või aktiivsuse muutmine ning valgu kontrollitud konditsionaalne degradeerimine rakus. Sellisteks meetoditeks on näiteks Ankruga Eemale meetod, valgu aktiivsuse kontroll läbi hormoonkompleksi ning degranmutandi meetod.

Ribosoomide biosüntees on raku jaoks hädavajalik ning tugeva kontrolli all olev protsess. Ribosoomide biogeneesil osaleb üle 200 kokkupanekufaktori ning rohkem kui 70 snoRNA-d (Woolford ja Baserga, 2013). Osad valgud, mis ribosoomide küpsemisel osalevad on raku eluks hädavajalikud. Üheks selliseks valguks on näiteks Utp5, mis osaleb ribosoomi väikese subühiku küpsemisel.

Antud töö on üheks osaks suuremast uurimisprojektist, mille käigus uuritakse ribosoomivalkude vahetumist *in vivo*. Vahetuvate ribosoomivalkude määramiseks on vajalik ribosoomi biogeneesi peatamine varasel küpsemise etapil. Tsütoplasmas sünteesitud uute ribosoomivalkude märgistamiseks kasutatakse SILAC (ingl. k *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) meetodit. SILAC meetod seisneb valkude märgistamises kerge või raske märgistusega aminohapetega. Antud töö käigus konstrueeriti esimeses etapis $\Delta arg4\Delta lys1$ tüvi, mille *ARG4* ja *LYS1* lookustes puuduvad selektsioonimarkerid. Teise etapina uuriti, kas Utp5-le on võimalik C-

terminaalsesse ossa lisada degronkasset. Lisaks uuriti, kas on võimalik konstrueerida tüve, mis ekspresseerib samaaegselt nii OsTIR1 kui Utp5-AID* hübriidvalku.

Soovin tänada oma juhendajat Tiina Tamme suure kannatlikkuse ja veel suurema abi eest käesoleva töö valmimisel. Samuti soovin tänada kõiki väga toredaid ja abivalmeid laborikaaslasi.

Auksiinitundlik degron, OsTIR1, Utp5-AID*, SILAC, pagaripärm

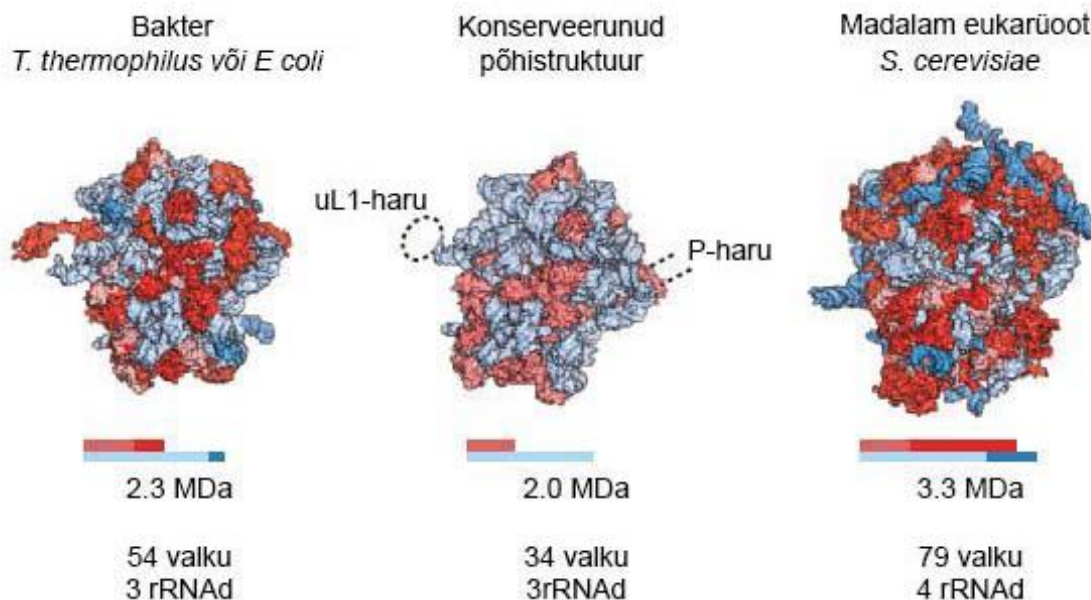
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Ribosoomi üldiseloostus

1.1.1 Ribosoomi struktuur

Ribosoomid on universaalselt konserveerunud ensüümid, mis teostavad valkude biosünteesi ehk translatsiooni. Translatsioon on protsess, mille käigus lülitatakse aminohapped peptiidahelasse vastavalt mRNA nukleotiidsele järjestusele (Ramakrishnan, 2002). Kõik ribosoomid koosnevad kahest subühikust: suurest subühikust ja väiksest subühikust, mis omakorda koosnevad rRNAst ja valkudest. Bakteri 70S ribosoom koosneb 30S ja 50S subühikust, eukariooti 80S ribosoom 40S ja 60S subühikust, kus S tähistab Svedbergi ühikut (joonis 1).

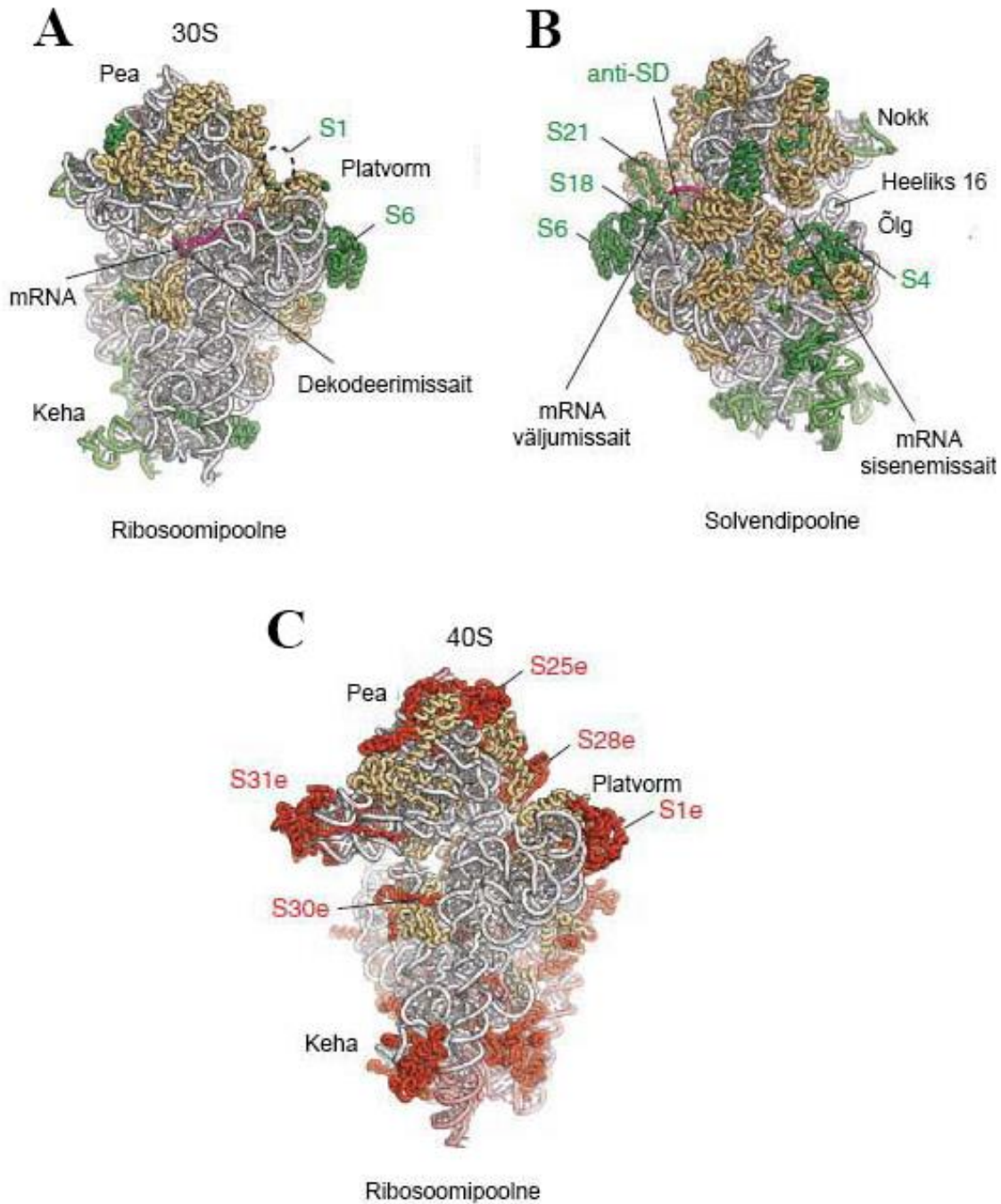
Ribosoomidel on konserveerunud põhistruktuur, mis on olemas kõikides elusorganismides: eukariootides, arhedes ja bakterites (joonis 1). Antud põhistruktuur sisaldab endas 34 konserveerunud valku. Nendest 15 asuvad väikeses subühikus ja 19 suures subühikus. Lisaks sisaldab konserveerunud põhistruktuur konserveerunud rRNA-d, mis moodustab peamised ribosoomi funktsionaalsed keskused: dekodeeriv sait, peptidüültransferaasi keskus ja tRNA sidumissaidid (Melnikov et al., 2012; Wilson ja Doudna Cate, 2012).



Joonis 1. Bakteri ja eukariooti ribosoomide võrdlus. Bakteri ja eukariooti ribosoomil on ühine konserveerunud põhistruktuur, mis moodustub rRNAst (helesinine) ja valkudest (helepunane). Bakteri- ja eukariootispetsiifilised valgud ja valgudomeenid on joonistel kujutatud punaselt, rRNA lisasegmenid ning 5.8S rRNA ja 25S-28S rRNA on joonisel kujutatud siniselt (modifitseeritud Melnikov et al., 2012 järgi).

1.1.2 Ribosoomi subühikud

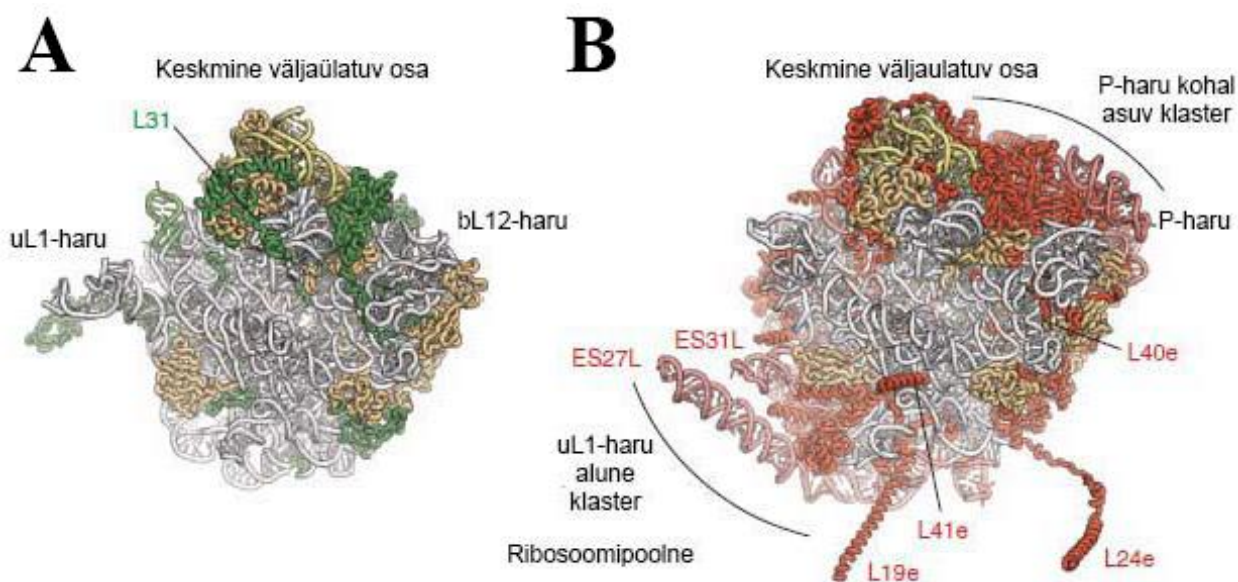
Ribosoomi väikesel subühikul, prokariöodis vastavalt 30S ja eukariöodis 40S, on sarnane kuju. Mõlemal on olemas pea, keha, platvorm, nokk ning õlg (joonis 2).



Joonis 2. Bakteri (A ja B) ja pagaripärmi (C) ribosoomi 40S subühikute struktuurid. (A-C) Konserveerunud põhistruktuur on kujutatud valgelt (rRNA) ja kollaselt (valgud), bakterispetsiifilised osad roheliselt, eukariöodispetsiifilised osad punaselt (modifitseeritud Melnikov et al. 2012 järgi).

Nii mRNA kui kolme tRNA sidumissaidid asuvad väikesel subühikul. mRNA sisenemistunnel asub pea ning õla vahel ning väljumistunnel pea ja platvormi vahel (joonis 2). Dekodeerimissait, kus toimub koodoni ja antikoodoni äratundmine, asub väikese subühiku keskel. Dekodeerimissait koosneb kolmest domeenist, mis pärinevad peast, õlast ning jalast (joonis 2). 30S subühikus on mRNA väljumissait ümbritsetud nelja bakteriispetsiifilise valguga: bS1, bS6, bS18 ja bS21 (uus nomenklatuur Ban et al., 2014 järgi). Eukarüootides ümbritsevad mRNA väljumissaiti eukarüoodispetsiifilised valgud ning rRNA lisasegendid (vaata peatükist 1.1.3), millel pole 30S subühikus analooge. Sellisteks valkudeks on eS7, eS17, eS25, eS27 ning eS28 (Rabl et al., 2011).

Ribosoomi suurel subühikul, prokarüootis vastavalt 50S ja eukarüootis 60S, on üldiselt sarnane kroonikujuline vorm (joonis 3).



Joonis 3. Bakteri (A) ja pagaripärmi (B) ribosoomi 60S subühikute struktuurid. Konserveerunud põhistruktuur on kujutatud valgelt (rRNA) ja kollaselt (valgud), bakteriispetsiifilised osad roheliselt, eukarüoodispetsiifilised osad punaselt (modifitseeritud Melnikov et al. 2012 järgi).

See kroonikujuline vorm koosneb keskmisest väljaulatavast osast, uL1-harust ja bL12 (varem L7/L12) harust, mille analoogiks eukarüootis on P-haru (joonis 3). Ribosomaalse suure subühiku pinnal on 3 tRNA sidumissaiti A, P ja E ning peptidüültransferaasi keskus, kus katalüüsitakse peptiidideme moodustamist. Translatsiooni ajal liigub kasvav peptiidahel väljumistunnelisse. Prokarüootides moodustuvad peptiidahela väljumistunneli 23S rRNA konserveerunud piirkonnad ning uL4, uL22 ning uL23 prokarüoodispetsiifiline lisasegment. Eukarüootides on prokarüoodispetsiifiline valk uL23 asemel eukarüoodispetsiifiline valk eL39e-ga. Nii 50S kui 60S

subühikutes moodustavad peptiidahela väljumistunneli valgud uL4 ning uL22. Solvendipoolses osas on tunneli servas nii eukariöodi- kui prokariöodispetsiifilisi valke ning valkude lisasegmente (Klinge et al., 2011).

1.1.3 Eukariöodi ribosoom

Eukariöodi 80S ribosoom erineb prokariöotest 70S ribosoomist ehituslikult kui talituslikult. Eukariöodi ribosoomid on vähemalt 40% suuremad kui prokariöodi ribosoomid: ribosoomide molekulmass varieerub 2,3 MDa-st bakterites 4,3 MDa-ni kõrgemates eukariöotides (Ramakrishnan ja Moore, 2001). Ribosoomi suuruste erinevus tuleneb eukariöodispetsiifilistest rRNA lisasegmentidest valkudest ja valgudomeenidest. rRNA lisasegmentid on konserveerunud põhistruktuuris olevale rRNAle lisandunud eukariöodispetsiifilised osad (Ben-Shem et al., 2011). Eukariöodispetsiifilised rRNA ja valkude järjestused on molekulmassiga umbes 1,53 MDa. Suurem osa nendest eukariöodispetsiifilistest osadest asuvad ribosoomi pinnal kattes evolutsiooniliselt konserveerunud põhistruktuuri (Ben-Shem et al., 2011, Melnikov et al., 2012).

Eukariöodi ribosoomi 40S subühik on prokariöotest 30S subühikust peaaegu 500 kDa võrra suurem (Dresios et al., 2006, Clemons et al., 1999). On teada, et lisaks eukariöodispetsiifilistele valkudele on rohkem kui pooltel konserveerunud valkudest olemas eukariöodispetsiifilised domeenid. Seetõttu on ka valgu ja rRNA suhe väikeses subühikus 1:1 erinevalt prokariöotidest, kus valgu ja rRNA suhteks on 1:2. 40S subühik koosneb 18S rRNAst ning 33 valgust. Nendest 33st valgust 18 on sellised, mis puuduvad 30S subühikus (Rabl et al., 2011). Põhiliseks 40S subühiku eukariöodispetsiifilistest elementidest asub ES6S-ES3S klastrites (Ben-Shem et al., 2011).

Eukariöodi ribosoomi 60S subühik on prokariöotest 50S subühikust suurem 700 kDa võrra. Erinevalt 50S subühikust, kus on vaid 2 rRNA-d on 60S subühikus 3 rRNA-d: 5S, 5,8S ning 25S rRNA. Eukariöotes ribosoomis asetseb 5,8S rRNA kohas, kus 50S subühikus asub 23S rRNA 5' ots (Klinge et al., 2011). Eukariöodispetsiifilised elemendid 60S subühikus paiknevad põhiliselt kolmes piirkonnas: P-haru taga, L1-haru taga ning keskmises väljaulatavas osas (Ben-Shem et al., 2011). Kõige rohkem on näiteks rRNA lisasegmente P-haru taga (Wilson ja Doudna Cate, 2012).

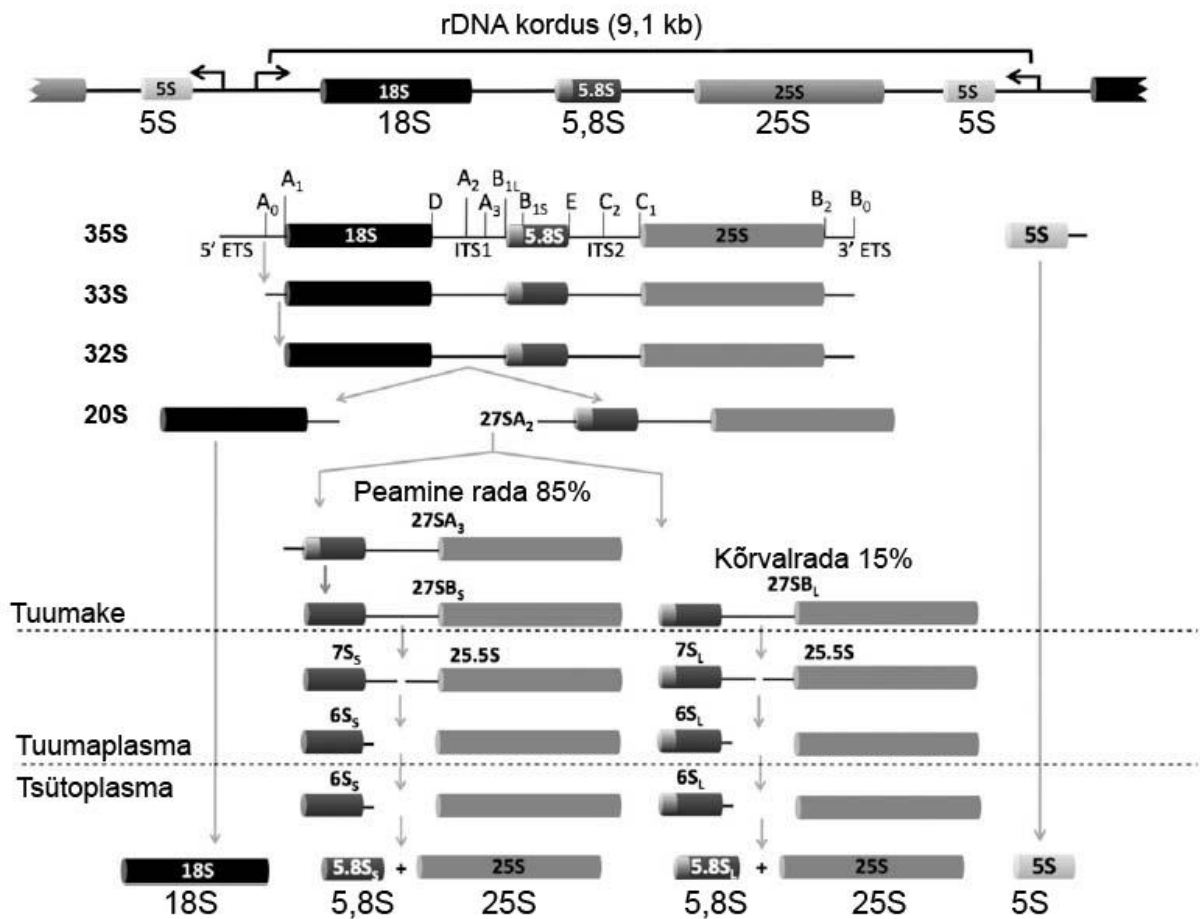
1.2 Eukariöodi ribosoomi biogenees

Ribosoomi biogenees on ribosoomi kokkupanek rakkus ning on väga tugeva kontrolli all olev protsess (Lafontaine, 2015). Ribosoomide kokkupanek on rakkude jaoks väga oluline ning vajab suurt osa raku ressurssidest makromolekulide sünteesiks ning liikumiseks raku eri piirkondade vahel (Woolford Jr. ja Baserga, 2013).

Eukariöodi ribosoomi biogenees algab rRNA transkriptsiooniga tuumakeseks. Tuumake on piirkond, mis on moodustunud rRNAde kodeeriva DNA piirkonna ümber. Rakutuumas toimub rRNAst vahejärjestuste (ingl. k. *internal transcribed spacer*) eemaldamine endonukleolüütiliste ja eksonukleolüütiliste reaktsioonide abil, ribosomaalsete valkude liitumine, ribonukleotiidide modifitseerimine ning rRNA pakkimine. Ribosoomide kokkupanekul osalevad rohkem kui 200 kokkupanekufaktorit ja 76 snoRNAde (ingl. k. *small nucleolar RNA*). Tuumast eksporditakse preribosoomid tsütoplasmasse, kus nad läbivad viimased muutused, et saada funktsioneerivaks ribosoomiks (Woolford ja Baserga, 2013). Kuna antud töös käsitletakse pagaripärmi, siis edaspidi on antud ülevaade pagaripärmi ribosoomi biogeneesist.

1.2.1 Pagaripärmi ribosoomi biogenees

Saccharomyces cerevisiae ribosoomi biogenees algab tuumas, tuumamembraaniga mitteseotud piirkonnas, seitsmenda kromosoomi juures. RNA polümeraas I transkribeerib 35S primaarse transkripti, millest hiljem protsessimise käigus saab 18S, 5,8S ja 25S rRNA. RNA polümeraas I sidumiseks promootorile on vajalikud 4 peamist transkriptsioonifaktorit ning nende kompleksi. Sellisteks transkriptsioonifaktoriteks on UAF (*upstream activation factor*), TATA-t siduv valk, tuumikfaktor ning Rrn3 (Milkereit ja Tschochner, 1998). Peale 18S, 5,8S ja 25S rRNAle sisaldab ribosoom ka 5S rRNAde, seda transkribeerib RNA polümeraas III (Woolford ja Baserga, 2013). Lisaks transkriptsioonifaktoritele on ribosoomi subühikute küpsemiseks vajalikud suured kompleksid, mis koosnevad kokkupanekufaktoritest, ribosoomaalsetest valkudest ning snoRNAdest (Bax et al., 2006).



Joonis 4. Pärimis rRNA küpsemise rada. Näidatud on rRNAd ja nende eellased: 18S (must), 5,8S (tumehall), 25S (hall), 5S (helehall). rRNA protsessimine on jagatud neljaks osaks vastavalt protsessimise lõpp-produktidele: 18S rRNA, 5,8S rRNA ja 25S rRNA kaks protsessimise rada (peamine ja väiksem) ning 5S rRNA. 35S, 33S, 32S, 20S ja 43S on rRNA küpsemise vaheproduktide suurused. A₀, A₁, D, A₂, A₃, B_{1L}, B_{1S}, E, C₂, C₁, B₂ ja B₀ tähistavad lõikekohti pre-rRNAs, ITS sisemisi vahejärgestusi ning ETS välimisi vahejärgestusi.

Pre-rRNA protsessimine algab juba transkriptsiooni ajal. Protsessimise alguses seonduvad pre-rRNAle ka osad ribosomaalsed valgud. Esimeseks intermediaadiks on 35S rRNA, mis sisaldab endas pre-18S rRNA, pre-5,8S rRNA ja pre-25S rRNA järjestusi ning 2 ETS-i (ingl. k *external transcribed spacer*) ning 2 ITS-i (ingl. k *internal transcribed spacer*) (joonis 4). Esimene suur valk-RNA kompleks moodustub 35S pre-rRNAle, mida nimetatakse 80S/90S preribosoomiks. Kõigepealt toimub 90S partiklis 5' ETS-i eemaldamine lõikekohtadega A₀ ning A₁-s (joonis 4), mille käigus saab 35S pre-rRNAst pärast A₀ saidis lõikamist 33S pre-rRNA ning pärast A₁ saidis lõikamist 32S pre-rRNA (joonis 4). Lõikekoht ITS1-s A₂ saidis või alternatiivselt A₃ saidis viib 90S preribosoomi lahkumisel 43S ning 66S preribosoomideks (joonis 4) (Bax et al., 2006). A₂ lõikekoha tekkimise jaoks on vajalik U3 snoRNA, mis U3 snoRNA ja pre-rRNA aluste

paardumisel moodustab koos 28 valguga väikese subühiku (SSU) protsessosoomi (Woolford ja Baserga, 2013). Antud töös käsitletakse valku Utp5 (*U three protein*), mis on üks 28st valgust, mis moodustab koos U3snoRNA-ga ribonukleoproteini (RNP), mis on vajalik 18S rRNA protsessimiseks (Dragon et al., 2002). Utp5 on vajalik lõikekoha tekkimiseks A₀, A₁ ja A₂-s (joonis 4). On näidatud, et Utp5 deleteerimine viib kõikide rRNA prekursorite vähenemiseni rakus. Seda ilmselt seetõttu, et vastavaid Utp-sid (Utp4, Utp5, Utp8, Utp9, Utp10, Utp15 ja Utp17) on vaja rDNA optimaalseks transkriptsiooniks. Gallagher jt näitasid, et Utp5 koguse vähendamisel rakus rDNA transkriptsiooni tase langes, kuid mitte sellisel tasemel nagu RNA polümeraas I koguse vähendamisel. Seetõttu hakati vastavaid Utp-sid, mis on olulised rDNA transkriptsioonil (Utp5, Utp10, Utp15 ja Utp17), nimetama t-Utp-deks (transkriptsiooni Utp) (Gallagher et al., 2004).

20S ja 27SA₂ pre-rRNA tekkimine eraldab pre-rRNA protsessimise ja subühiku küpsemise rajad (joonis 4). 20S pre-rRNA on pakitud 43S partiklitesse ja 27SA₂ 66S pre-rRNPsse. 43S partiklis on lisaks 20S pre-rRNAle ka 7 kokkupanekufaktorit, puuduvad ribosomaalsed valgud S10 ja S26. 43S pre-rRNP eksporditakse tuumakesest läbi tuumaplasmatsütoplasmasse, kus 20S pre-rRNAst saab läbi endonukleolüütilise protsessi küps 18S rRNA (Woolford ja Baserga, 2013).

66S preribosoomide küpsemine on palju kompleksem ning ajakulukam. 27SA₂ pre-rRNA protsessimine jätkub tuumakeses 2 alternatiivset teedpidi (joonis 4). Esimeseks viisiks, mis toimub 80-95% juhtudest, viiakse endonukleolüütilise lõikamise abil 27SA₂ 27SA₃-ks. Allesjäänud vahejärjestused eemaldatakse 5'-3' eksonukleaaside poolt, mille tulemusel saadakse 27SBS pre-rRNA 5' ots (joonis 4). Teiseks viisiks, mis toimub 10-15% juhtudest, on 27SA₂ pre-rRNA B1_L saidis seotud otse tundmatu endonukleaasiga, mille tulemusel saadakse 27SBL pre-rRNA (joonis 4). Nii 27SB_S kui 27SB_L pre-rRNA-d läbivad identse endonukleolüütilise protsessimise, mis läbi saadakse 25,5S ning 7S_S või 7S_L pre-rRNA-d. 25,5S rRNA-d kärbitakse 5' otsast, et saada küps 25S rRNA. 7S pre-rRNA-sid töödeldakse mitme erineva sammuna et saada küps 5.8S_S ja 5.8S_L rRNA (joonis 4) (Woolford ja Baserga, 2013).

Ribosoomide kokkupanekul on ribosomaalsetel valkudel tähtis roll. Deleteeritud valgu mutantide fenotüübid sõltuvad uuritavate ribosomaalsete valkude asukohast küpsetes ribosoomides. Näiteks ribosomaalsed valgud, mis asuvad väikese subühiku kehas 18S rRNA 5' domeenide lähedal, on vajalikud pre-rRNA protsessimises varajases faasis, samas ribosomaalsed valgud, mis asuvad 18S

rRNA 3' domeenide läheduses väikese subühiku peas, on olulised pre-rRNA protsessimise hilises faasis (Woolford ja Baserga, 2012).

Ribosomaalsete valkude liitumine on hierarhiline protsess. Paljud ribosomaalsed valgud seonduvad preribosoomidega juba subühikute varajases biogeneesi faasis (Kruiswijk et al. 1978). On leitud, et ribosomaalsete valkude ning preribosoomide vaheline assotseerumine muutub seda tugevamaks, mida edasi läheb ribosoomide kokku panek (Ferreira-Cerca et al. 2007). Mõned ribosomaalsed valgud seonduvad preribosoomidega alles ribosoomi biogeneesi hilises faasis tsütoplasmas. Sellisteks valkudeks on S10, S26, L10, L29, L40, L42, P0, P1 ning P2 (Savenau et al. 2003).

1.3 Indutseeritavad valkude degradeerimise süsteemid

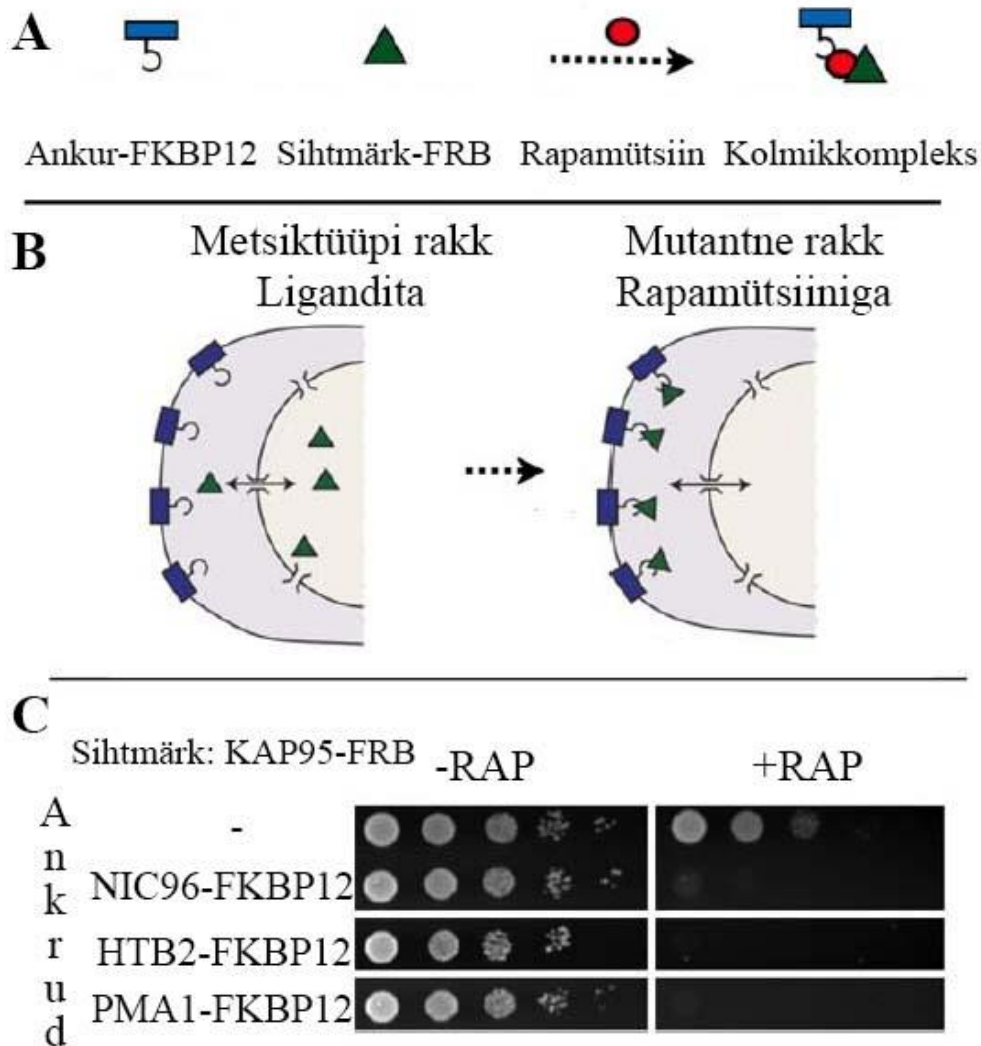
Elutähtsate valkude uurimiseks on vajalik nende konditsionaalne degradeerimine rakus (Dohmen et al., 1994). Enimkasutatud meetodiks on konditsionaalsete mutantide konstrueerimine, mille puhul on kõige sagedamini kasutatavad fenotüübid *ts* ehk kuumatundlik ning *cs* ehk külmatundlik (Hampsey, 1997). Konditsionaalsete mutantide konstrueerimise alternatiivseteks meetoditeks on sihtmärkvalgu konditsionaalne degradatsioon, inaktiveerimine või valgu lokaliseerimise muutmise rakus. Sellistest alternatiivsetest meetoditest antakse ülevaade järgnevas alapeatükis.

1.3.1 Ankruga Eemale meetod

Konditsionaalsete mutantide saamiseks on võimalik kasutada Ankruga Eemale meetodit. Selle meetodiga seotakse sihtmärkvalk tema algsest asukohast rakus, näiteks tuumast, ning viiakse teise raku piirkonda, näiteks tsütoplasmasse. Sellise meetodi töötasid välja Haruki jt., kelle eesmärgiks oli uurida tuumas lokaliseeruvaid valke.

Ankruga Eemale tehnoloogias kasutatakse kahte liitvalku: ankur-FKBP12 ja sihtmärk-FRB. Liitvalk ankur-FKBP12 koosneb inimese FKBP12 valgust (ingl. k *FK506-binding protein 12*), mis paikneb ankurvalgu C-terminaalses otsas. FKBP12 on endogeenne valk, mis omab rakutsükli regulaatori funktsiooni (Aghdasi et al, 2001). Ankurvalgus on valk, mille koopiaid rakus on palju ning mis asub selles raku osas, kuhu sihtmärkvalk viia tahetakse. Seetõttu on headeks ankruteks näiteks ribosomaalsed valgud. Teine liitvalk koosnes FKBP12 rapamütsiini siduvast mTORi

domeenist (FRB), mis paikneb sihtmärkvalgu C-terminaalses otsas. Rapamütsiini lisamisel seob rapamütsiini FKBP12 ja FRB domeenid ning moodustab kompleksi ning uuritav valk transporditakse raku ossa, kus lokaliseerub ankurvalk (joonis 5). Seepärast kasutatakse mutantide selekteerimiseks rapamütsiini sisaldavat söödet. Mutandid ei kasva rapamütsiini juuresolekul, samas, rapamütsiinita söötmel nad kasvavad.



Joonis 5. Ankruga Eemale tehnoloogia. (A) Näidatud on kaks liitvalku: ankur-FKBP12 ja uuritav valk-FRB. Rapamütsiini lisamisel tekib kolmikkompleks. (B) Uuritava valgu (kolmnurk) lokaliseerimine raku rapamütsiini lisamisel. Rakus on kujutatud ankruna valku Pma1 (ristkülik). (C) Tilk-külv testi analüüs rapamütsiini mittedisaldaval ja rapamütsiini sisaldaval söötmel, kasutati rapamütsiiniresistentseid tüvesid. Uuritavaks valguks on Kap95, ankurvalkudena on kasutatud Nic96, Htp2 ja Pma1 (modifitseeritud Haruki et al. 2008 järgi).

Haruki jt kasutasid oma katsetes ankruna 3 erinevat valku: Pma1p valku, mis on rakule eluks hädavajalik plasmamembraani H⁺-ATPaas, H2B histooni ning tuumapoori valku Nic96p (joonis

5). Need 3 valku ekspresseeriti liitvalguna koos FKBP12-ga. Märklaudvalguks kasutati Kap95p, kariöferiin β valku, mis on vajalik NLS signaaliga valkude importimiseks tuuma (joonis 5). Selle valgu puhul kasutati kõiki 3 ankrut. Kõigi 3 ankru kasutamisel ilmnes, et rapamütsiini sisaldaval söötmel rakud ei olnud eluvõimelised, kuid kontrollplaadil, mis rapamütsiini ei sisaldanud, oli kasv tugev (joonis 5). Ankruga Eemale meetodi puhul on tähtsaim ankru valimine: headeks ankruteks on osutunud ribosomaalsed valgud.

Sellist meetodit kasutati 43 tuumavalgu uurimiseks. Uuritud valkude hulka kuulus nii transpordi, kromosoomi struktuuri kui transkriptsiooniga seotud valke. Nii uuriti näiteks valgu Mex67 olulisust mRNA transpordil. Leiti, et Mex67 on oluline mRNA transpordil tuumast tsütoplasmasse. Rapamütsiini lisamisel kasvukeskkonda koondus polüA sabaga mRNA signaal tuuma ning see osutus rakkude jaoks letaalseks.

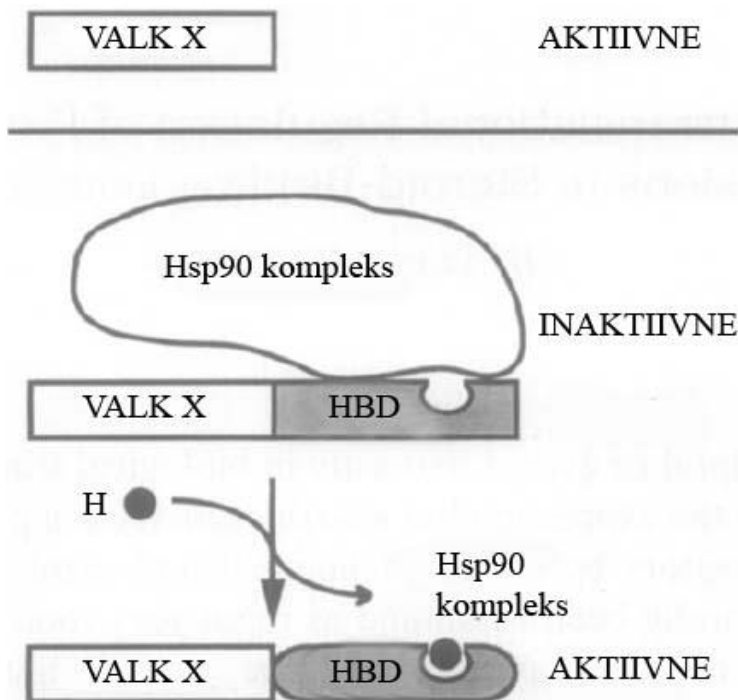
Ankruga Eemale meetodi eeliseks teiste ees on võimalus uurida tuumavalkude funktsioone. Samas on antud tehnoloogia puuduseks see, et kõiki tuumavalke pole siiski võimalik nii uurida. Sellisteks valkudeks on näiteks struktuurvalgud, mis on seotud tugevatesse kompleksidesse. Ankruga Eemale meetodiga pole võimalik uurida ka tsütoplasmas paiknevaid valke. On olemas teooria, kuidas seda teha: tsütoplasmast viiakse valk tuuma, mille jaoks sobiks hästi histoonankur (Haruki et al. 2008).

1.3.2 Valgu aktiivsuse kontroll läbi hormoonkompleksi

Tihti on vajalik valkude uurimisel muuta ka valgu aktiivsust rakus. Seetõttu on leitud, et rakusisesed retseptorid, mille transkriptsiooni on hormooni poolt reguleeritud, on headeks reguleeritavateks tööriistadeks. Üheks selliseks süsteemiks on hormooni siduva domeeni (ingl. k *hormone-binding domain* ehk HBD) integreerimine uuritava valgu lugemisraami. HBD funktsiooniks rakus on transkriptsiooni regulatsioon, hormooni sidumine ning retseptori funktsiooni määramine hormooni sidumisel. HBD põhjustab ka retseptori tugevat seondumist Hsp90 (ingl. k *heat shock protein 90*) kompleksiga (Pratt ja Welsh, 1994). Hsp90 on üks konserveerunud molekulaarne tšaperon ning omab ATPaasset aktiivsust. Sellise meetodi töötas välja Picard (Picard, 2000).

Antud viisil konstrueeritud liitvalgus on HBD autonoomseks reguleeritavaks elemendiks ning antud valgu aktiivsus on hormonaalse kontrolli all. Liitvalk konstrueeritakse HBD viimisel uuritava

valguga lugemisraami N- või C-terminaalsesse otsa. Kui rakkude kasvukeskkonnas on olemas steroidne ligand, siis on valk aktiivne. Steroidse ligandi puudumisel puudub aga valgul tema funktsionaalne aktiivsus, kuna HBD-le on seondunud Hsp90 (joonis 6).



Joonis 6. Heteroloogse valgu regulatsioon HBD integreerimisel valgu lugemisraami. Kui kasvukeskkonnas puudub hormoon, siis on uuritav valk inaktiivne. Hormooni lisamisel kasvukeskkonda seondub hormoon HBDga ning uuritava valgu aktiivsus taastub (modifitseeritud Picard, 2000 järgi).

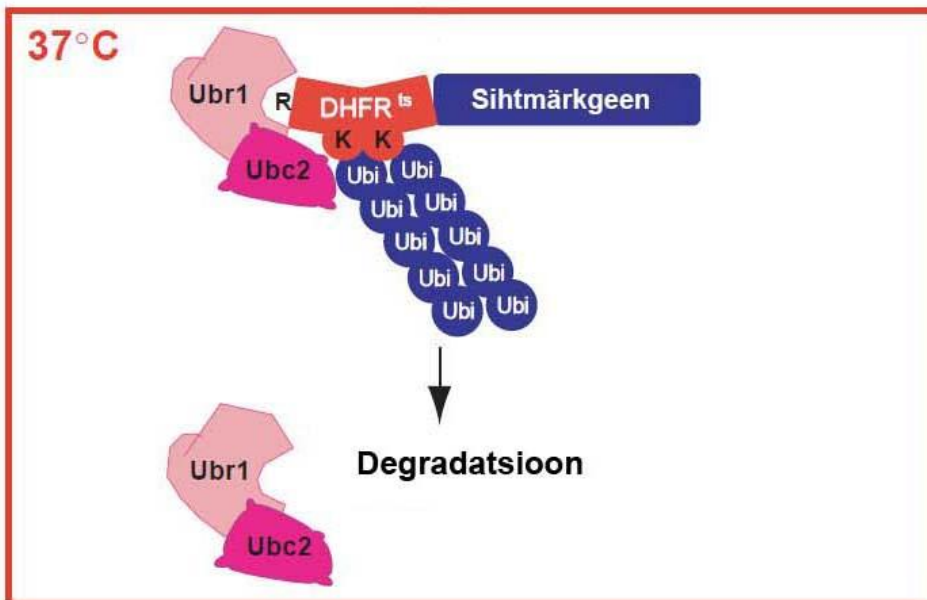
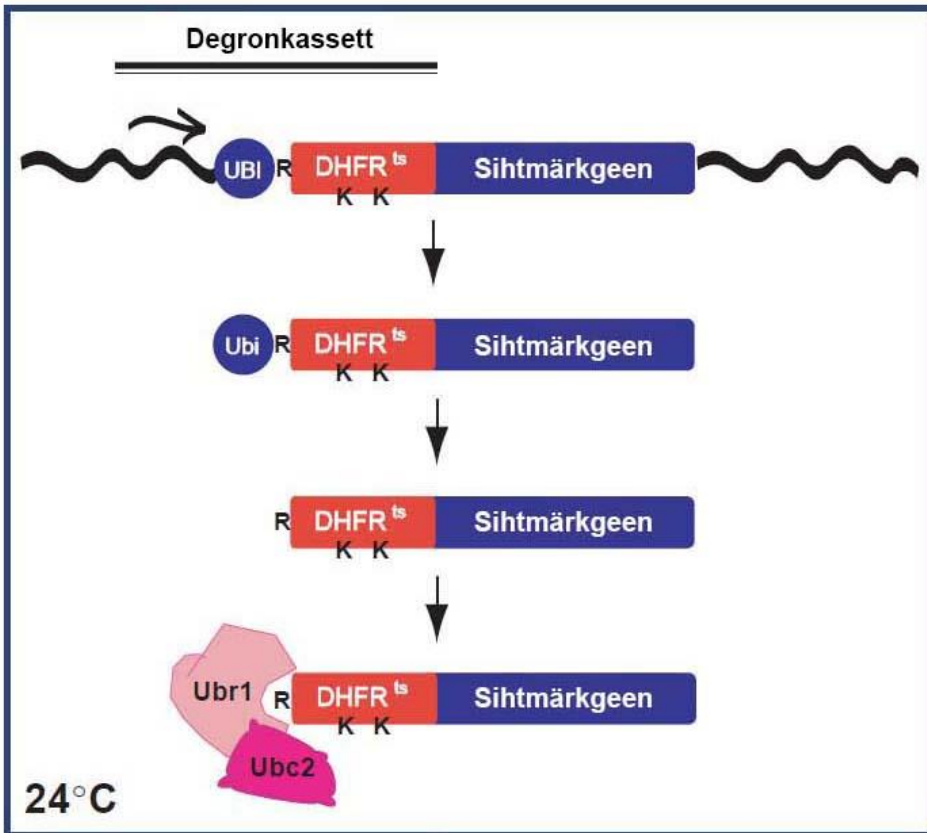
Antud meetodi miinuseks on HBD teiste funktsioonide olemasolu raku, näiteks transkriptsiooni regulatsioon. Seetõttu ei ole HBD raku neutraalne. Lisaks võivad HBD-d aidata kaasa hormoonidest sõltuval dimeriseerumisele ning valgu tuuma lokaliseerumisele. Selliste omaduste tõttu ei ole soovitatav kasutada antud meetodit näiteks transkriptsioonifaktori regulatsioonil. Kuna osad valgud kaotavad oma funktsionaalsuse domeenide liitmisel, ei ole võimalik sellise meetodiga kõiki valke uurida.

Antud meetodi eelisteks on valgu aktiivsuse regulatsioon. Nii ei pea valku raku degradeerima selleks, et saavutada valgu inaktiivsus. Selline valgu inaktivatsioon raku aitab uurida elutähtsaid valke, mida ei saa teha deletsioonimutandis. Suureks eeliseks on meetodi pööratavus. Hormooni eemaldamisel kasvukeskkonnast valk inaktiveerub uuesti (Picard, 2000).

1.3.3 Temperatuuritundlik degron

Üheks lihtsaks valkude indutseeritud degradeerimise meetodiks on liitvalgu konstrueerimine, kus valgu lugemisraami on viidud degradatsiooni indutseeriva domeeni järjestus. (Labib et al., 2000). Esimesed degronmutandid olid N-otsa reeglil põhinevad temperatuuritundlikud tüved (Dohmen et al., 1994). N-otsa reegel määrab valgu *in vivo* poolestusaja rakus N-terminaalse aminohappejäägi alusel. Seetõttu on temperatuuritundliku degroni puhul uuritava valgu N-terminaalsesse otsas destabiliseeriv aminohappe jääk (Varshavsky, 2011). Eukarüootides on N-otsa reeglil põhinev rada osa valkude degradeerimise süsteemist, mistõttu saab degronmutante konstrueerida ainult eukarüootides.

Temperatuuritundliku degroni konstrueerimiseks integreeritakse degronkassett uuritava valgu kromosomaalsesse lookusesse. Selleks amplifitseeritakse DNA kassett, mis koosneb *kanMX6* markergeenist, *CUPI* promootorist ning degronjärjestusest (joonis 7), PCR-iga. Degronjärjestuseks on temperatuuritundlik hiire dihüdrolaadi reduktaas (DHFR). Degronkassetti võib transformeerida nii haploidsetesse kui diploidsetesse tüvedesse. Kiireim viis degrontüve konstrueerimiseks on degronkasseti viimine haploidsetesse tüvesse. Kuna temperatuuritundlik degron töötab ainult valgu N-terminaalses otsas, siis on lisaks eelpool nimetatud osadele vajalik ka promootori olemasolu kassetis. Selliseks promootoriks oli näiteks *CUPI* promootor, mis on indutseeritud CuSO_4 poolt (Sanchez-Diaz et al., 2004).



Joonis 7. Temperatuuriga-indutseeritava degroni tööpõhimõte. Degronkassetti sisaldav valk on stabiilne 24°C juures ja degradeeritakse 37°C kraadi juures. Ubi tähistab ubikvitiini, Ubr1 E3 ubikvitiini ligaasi, Ubc2 ubikvitiini konjugeerivat ensüümi E2 (modifitseeritud Sanchez-Diaz et al., 2004 järgi).

Degroni liitvalk algab ubikvitiini molekuliga, mis eemaldatakse kiiresti pärast translatsiooni (joonis 7). Seetõttu paljastub muteeritud hiire dihüdrofolaaadi reduktaasi N-terminuses arginiinijääk. Sellele arginiinijäägile seondub Ubr1 valk, mida ekspresseeritakse rakus üle, kuna Ubr1 valk ei tohi olla reaktsioonil limiteerivaks. Ubr1 on assotseerunud ubikvitiini konjugeeriva ensüümiga Ubc2. Ubr1 indutseerib degronkasseti pinnal olevate lüsiinijääkide ubikvitineerimist. Ubikvitineerimine omakorda viib valgu degradeerimiseni proteosoomis. Temperatuuritundliku degroni puhul viiakse valk degradeerimisele juhul kui temperatuuri tõstetakse 24°C 37°C-le (joonis 7) (Sanchez-Diaz et al., 2004). Temperatuuri tõstmisel 37°C juurde avaneb DHFRi struktuur nii, et ubikvitiini molekulid saavad seonduda lüsiinijääkidele (Dohmen et al., 1994).

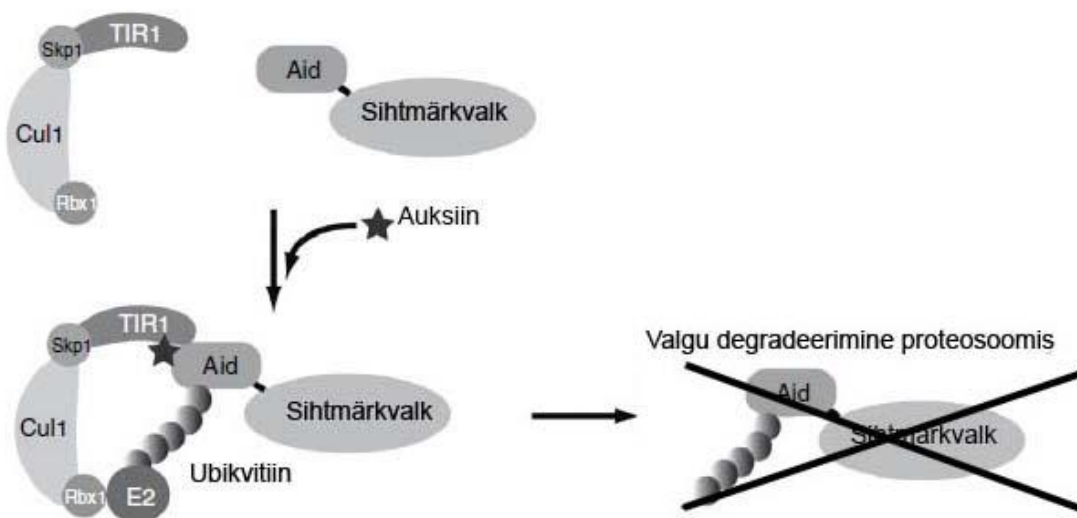
Temperatuuritundliku degronmutandi kasutamise miinuseks on selle limiteeritus Temperatuuritundlikku degronmutandi konstrueerimisel saab degronkasseti viia ainult valgu N-terminusse, ning seetõttu tuleb välja vahetada ka promootor, mille alt liitvalku ekspresseeritakse. Rakkude viimisel 24°C juurest 37°C juurde võib põhjustada rakkudes kuumašoki.

Temperatuuritundliku degronmutandi kasutamise eelisteks on valgu kiire degradatsioon rakus Ubr1 valgu üleekspresseerimisel ning temperatuuri tõstmisel. Valgu degradatsioon toimub 30 minutiga. Antud meetod on sobiv elutähtsate valkude uurimiseks, kuna uuritavat valku saab konditsionaalselt degradeerida erinevalt deletsioontüvedest. Lisaks sellele on antud meetodit kergem rakendada, kuna ei ole vaja eraldi ligandi, millega vastav süsteem töötaks (Sanchez-Diaz et al. 2004, Nishimura et al. 2009).

1.3.4 Auksiinitundlik degron

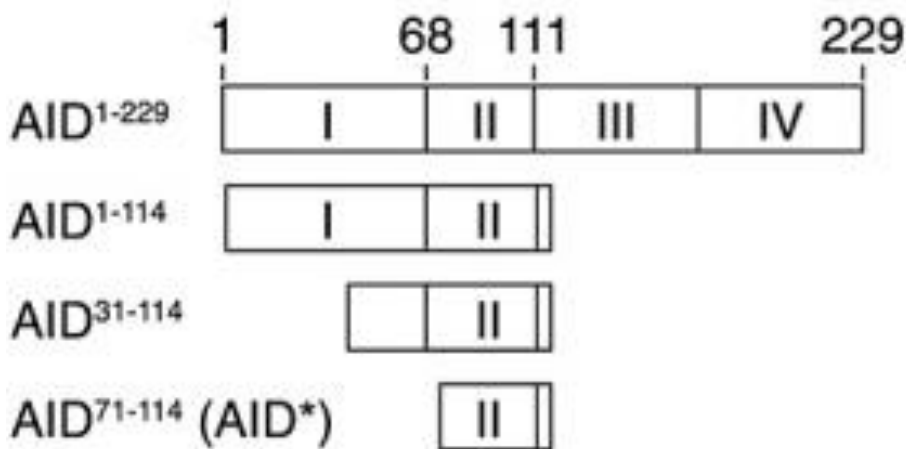
Uuemaks meetodiks on auksiini poolt indutseeritav degronsüsteem. Selle meetodi puhul kantakse taimedest pärit olev auksiinist sõltuv degradatsioonirada üle teistesse eukarüootidesse. Auksiinitundliku degroni puhul seondub auksiin valgule TIR1, mis on rakus ekspresseeritud tugeva promootori alt. Auksiini seondumine TIR1-le aitab kaasa interaktsioonile sihtmärkvalgu lugemisraamis oleva auksiin-indutseeritud degroni (AID) ning TIR1 vahel. SCF-TIR1 on E3 ubikvitiini ligaasiks ning seeläbi paneb tööle E2 ligaasi. See viib AID degroni poliubikvitineerimiseni ning sihtmärkvalk degradeeritakse proteosoomis (Nishimura et al., 2009). Antud meetodi rakendamiseks on vajalik AID kasseti ning TIR1 valgu järjestuste viimine raku, ülejäänud kompleksid on juba rakus olemas.

Auksiinitundliku degroni konstrueerimiseks kasutatakse sarnaselt temperatuuritundliku degraadantüvega kasseti integreerimist uuritava valgu lugemisraami. Degronkassett koosneb AID järjestusest ehk IAA17 valgust, epitoobi märgistusest ning selektsioonimarkerist. N terminusse integreeritavate kassettide korral oli vajalik promootori olemasolu kassetis, C terminusse integreeritavate puhul mitte (Nishimura et al., 2009).



Joonis 8. Auksiini poolt indutseeritava degroni tööpõhimõte. Rbx1 tähistab RING valku, Cul1 kulliini 1 valku, Skp1 SCF ligaasi komponenti. Need kolm valku moodustavad kompleksi, mis interakteerub TIR1 valguga ning indutseerib uuritava valgu degradatsiooni (modifitseeritud Nishimura et al. 2009 järgi).

Täispikk IAA17 valg (229 aminohapet, 25 kDa) suurendab uuritavat valku oluliselt ning seetõttu võib muuta selle funktsiooni või ekspressiooni. Seetõttu uurisid Morawska ja Ulrich, milline oleks optimaalne AID suurus: piisavalt suur, et indutseerida degradatsiooni, kuid nii väike kui võimalik, et vähendada AID järjestuse mõju uuritava valgu funktsioneerimisele ning ekspressioonile rakus. Katsete käigus leiti, et optimaalseks AID suuruseks on 43 aminohapet. Selline AID järjestus sisaldab IAA17 valgu aminohappeid 71-114 ning hõlmab suurt osa domeenist II ja väikest osa domeenist III (joonis 9). Vastav optimaalne AID järjestus nimetati AID* (Morawska ja Ulrich, 2013).



Joonis 9. IAA17 valgu struktuur ning erinevad AID variandid. I-IV tähistavad IAA17 valgu kõrgelt konserveerunud domeene. AID* tähistab lühimat töötanud AID järjestust (Morawska ja Ulrich, 2013).

Auksiini poolt indutseeritud degronsüsteemi miinuseks on see, et antud süsteemi ei saa kasutada taimerakkude uurimiseks. Antud süsteemi kasutamise teeb natuke raskemaks ka asjaolu, et lisaks degronkassetile on vaja rakku viia ka TIR1 valku kodeeriv geen ning süsteemi toimimiseks on vaja eraldi ligandi, auksiini.

Auksiini poolt indutseeritava degronsüsteemi eelisteks on valgu kiire degradatsioon rakus, mis toimub juba 30 minuti jooksul. Erinevalt temperatuuritundlikust degronist töötab AID nii valgu C- kui N-terminaalses otsas. AID süsteemi eelisteks on võimlus rakukultuuri hoida konstantsel temperatuuril, lisaks sellele saab antud meetodil uurida ka selliseid rakus toimivaid protsesse, näiteks meioosi, mis ei toimu pärmis 37° C juures (Nishimura et al. 2009).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesolev bakalaureuse töö on üheks osaks suuremast mille eesmärgiks on välja selgitada kas ja millises ulatuses toimub pagari pärmi rakkudes ribosoomivalkude vahetumine. Selle protsessi uurimiseks kasutatakse valkude märgistamist SILAC meetodil. SILAC meetod seisneb valkude märgistamises stabiilse isotoobiga märgistatud aminohapetega ning valke analüüsitakse massispektrometriaal. Uute ribosoomide kokkupanemise peatamiseks kasutatakse ribosoomi biogeneesi blokeerimist. Võimalik on kasutada biogeneesi varastel etappidel oluliste valkude konditsionaalset degradatsiooni. Üheks selliseks meetodiks on auksiinitundlik degronsüsteem. Bakalaureusetöö üheks eesmärgiks on konstrueerida $\Delta arg4\Delta lys1$ tüvi, milles ARG4 ja LYS1 lookustes puuduvad markergeenid, et vastavaid markergeene saaks tulevikus kasutada teiste lookuste märgistamisel. Töö teiseks eesmärgiks oli uurida, kas Utp5 C-terminaalsesse ossa on võimalik lisada degronkassett. Lisaks oli antud töö eesmärgiks uurida, kas on võimalik konstrueerida tüve, milles ekspresseeruvad nii OstIR1 kui Utp5-AID* hübriidvalk.

2.2 Materjal ja meetodika

Töös kasutatud praimerid on toodud ära tabelis 1. Kasutatud pagari pärmi tüved on toodud ära tabelis 2. Kasutatud plasmiidid on toodud ära tabelis 3. Kõiki pagari pärmi tüvesid kasvatati 30°C juures. Kasutatud söötmed on toodud ära lisades 1 ja 2. Töös kasutati *E. coli* tüve DH5 α genotüübiga $\Phi80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 \lambda- thi-1 gyrA96 relA1$.

Tabel 1. Töös kasutatud praimerid.

Nimi	Järjestus (5'-3')	Milleks kasutati
<i>LoxP_forw_Sall</i>	GAAGCTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	<i>LoxP</i> järjestustega <i>kanMX6</i> kasseti paljundamine
<i>LoxP_rev_EcoRI</i>	ATCGATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC CTGCAGCGTACGGATATCACCTA	<i>LoxP</i> järjestustega <i>kanMX6</i> kasseti paljundamine

<i>Arg4_S1_forw</i>	GCAATTGAAGAGCTCAAAGCAGG TAACTATATAACAAGACT AAGGCAAACCGTACGCTGCAGGTCGAC	Deletsioonikasseti paljundamine
<i>Lys1_S1_forw</i>	CATACCATAAGATAACAACGAAA ACGCTTTATTTTTCACAC AACCGCAAACGTACGCTGCAGGTCGAC	Deletsioonikasseti paljundamine
<i>Arg4_S2_rev</i>	CCTAGAAGTACCAGACCTGA TGAAATTCTTGCGCATAACGT CGCCATCTGATCGATGAATTCGAGCTCG	Deletsioonikasseti paljundamine
<i>Lys1_S2_rev</i>	AAACTTGTAATGTCAGCGTAAC GATAATGTATATACTTTAAA TGTAACATCGATGAATTCGAGCTCG	Deletsioonikasseti paljundamine
<i>Arg4_contr_forw</i>	CTCTTCCAAACCCTCTGTTAACGAC	Transformantide kontroll PCR meetodil
<i>pYM_check_rev</i>	GCGCACGTCAAGACTGTCAAGG	Transformantide kontroll PCR meetodil
<i>Lys1_contr_forw</i>	CCTGCGATTTAGCGACAAAGAGTCA	Transformantide kontroll PCR meetodil
<i>UTP5_S3_forw</i>	TAGAAACGGAGCAGAGCGACGGCG AGGAGGAAGCCGATATAGTGACG TTGAGATGGAACGTACGCTGCAGG TCG	Degronkasseti paljundamine
<i>UTP5_S2_rev</i>	GTGGTGA ACTCTATATAAGTATTT ATGTGCCTAGAGATTATTTTGTGTA TTCTGATGCGTGATCGATGAATTC GAGCTC	Degronkasseti paljundamine
<i>UTP5_check_forw</i>	GGTCATTAGGGATACTATCTTCCGT	Transformantide kontroll PCR meetodil

Tabel 2. Töös kasutatud *S. cerevisiae* tüved

Tüve nimi kollektsoonis	Genotüüp	Päritolu
TYSC9	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36</i>	Labori kollektsoon
TYSC10	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36</i>	Labori kollektsoon
TYSC151	<i>MATa his3Δ200 trp1Δ36 Δlys1::hphMX6 Δarg4::natMX6 ura3-52::ADH1-OsTIR1- 9myc::URA3</i>	Labori kollektsoon
TYSC152	<i>MATa his3Δ200 trp1Δ36 Δlys1::hphMX6 Δarg4::natMX6 ura3-52::ADH1-OsTIR1- 9myc::URA3</i>	Labori kollektsoon
TYSC299	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δlys1::loxP-kanMX6-loxP</i>	Selles töös valmistatud
TYSC301	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4::loxP-kanMX6-loxP</i>	Selles töös valmistatud
TYSC309	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 trp1Δ36 leu2Δ1 Δarg4 Δlys1</i>	Selles töös valmistatud
TYSC310	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1</i>	Selles töös valmistatud
TYSC350	<i>MATa leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 ura3-52::ADH1-OsTIR1-9myc::URA3</i>	Selles töös valmistatud
TYSC351	<i>MATa leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 ura3-52::ADH1-OsTIR1-9myc::URA3</i>	Selles töös valmistatud
TYSC352	<i>MATa leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 ura3-52::ADH1-OsTIR1-9myc::URA3</i>	Selles töös valmistatud
TYSC399	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 UTP5-AID*-6myc::hphMX6</i>	Selles töös valmistatud

TYSC400	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 UTP5-AID*-6HA::hphMX6</i>	Selles töös valmistatud
TYSC401	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 Δarg4 Δlys1 UTP5-AID*-6myc::hphMX6</i>	Selles töös valmistatud
TYSC402	<i>MATa leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 ura3-52::ADH1-OsTIR1-9myc::URA3 UTP5-AID*-6myc::hphMX6</i>	Selles töös valmistatud
TYSC403	<i>MATa leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ36 ura3-52::ADH1-OsTIR1-9myc::URA3 UTP5-AID*-6myc::hphMX6</i>	Selles töös valmistatud

Tabel 3. Töös kasutatud plasmiidid

Plasmidi nimi	Milleks kasutati
<i>pFA6a-kanMX6</i>	<i>loxP</i> järjestustega DNA kasseti paljundamine
<i>pFA6a-loxP-kanMX6-loxP</i>	<i>loxP</i> järjestustega deletsioonikasseti paljundamine
<i>pSH47</i>	Cre rekombinaasi ekspresseerimiseks
<i>2152c pHyg-Aid*-9myc</i>	Degronkasseti paljundamiseks
<i>2352c pHyg-Aid*-6HA</i>	Degronkasseti paljundamiseks

2.2.1 *LoxP* järjestustega *kanMX6* kasseti amplifitseerimine

PCR viidi läbi 50µl reaktsioonisegus, mis sisaldas 2,5 U Taq polümeraasi, umbes 100ng plasmiidset DNAd (*pFA6a-kanMX6*), 20 pmol *loxP_forw_SallI* praimerit, 20 pmol *loxP_rev_EcoRI* praimerit, 1x PCR puhvrit (100mM Tris-HCl (pH 8,85); 25mM KCl; 5mM (NH₄)₂SO₄; 2mM MgSO₄), 0,2mM dNTP segu ning 2,5mM MgCl₂.

PCR viidi läbi järgnevalt (Biometra UNO II):

94°C 3 min

30 tsükli: 94°C 30 sek, 55°C 30 sek, 72°C 1 min 45sek.

Plasmiidilt *pFA6a-kanMX6* paljundati fragment pikkusega 1600 nukleotiidi. 1/10 reaktsioonisegust analüüsiti 0,8% agaros-TBE geelelektroforeesil (Bio-Rad Laboratories PowerPac basic ja Biometra Compact XS/X horisontaalne geelelektroforeesi süsteem).

2.2.2 *LoxP* järjestustega *kanMX6* markergeeni sisaldava plasmidi konstrueerimine

Restriksioon viidi läbi 50µl reaktsioonisegus, mis sisaldas *SalI* 10U (Fermentas), *EcoRI* 10U (Fermentas), 10x O puhvrit (50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 37°C juures, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA) (Fermentas) ja DNAd (vastavalt kas insert või vektor). Plasmidne DNA puhastati kitiga (Fermentas) vastavalt tootjapoolsele juhendile. Seejärel vektor-DNA defosforüleeriti lisades 1U FastAP (Fermentas) aluselist fosfataasi ning inkubeerides 37°C juures 10 minutit. Reaktsioon peatati reaktsioonisegu viimisel 75°C juurde 5 minutiks. DNA fragmendid lahutati 0,8% agaros-TBE geelelektroforeesil. Agarosgeelist lõigati välja õige pikkusega DNA fragmendid. DNA puhastati geelist *GeneJet Gel Extraction Kit* abil (Fermentas). Geelitükile lisati võrdses mahus *Binding Buffer*'it ning inkubeeriti 60°C juures 10 minutit. Segu kanti puhastuskolonnile ning tsentrifuugiti 13 000 rpm juures lauatsentrifuugis (Heraeus Biofuge Pico) 1 minut toatemperatuuril. Puhastuskolonnile lisati 100µl *Binding buffer*'it tsentrifuugiti 1 minut lauatsentrifuugis 13 000 rpm juures toatemperatuuril. Puhastuskolonnile lisati 700µl *Wash Buffer*'it, tsentrifuugiti 1 minut toatemperatuuril 13 000 rpm juures lauatsentrifuugis ning korraldi pesu. Puhastuskolonnile tsentrifuugiti toatemperatuuril 1 minut 13 000 rpm juures lauatsentrifuugis, et eemaldada *Wash Buffer*'i jäägid. Elueerimiseks lisati puhastuskolonnile 30µl *Elution buffer*'it, inkubeeriti 2 minutit toatemperatuuril ning tsentrifuugiti 1 minut toatemperatuuril 13 000 rpm juures lauatsentrifuugis. DNA ligeerimiseks tehti reaktsioonisegu mahuga 10µl, mis sisaldas 100ng lineaarset vektori DNAd, *loxP* järjestustega DNA kassetti, T4 DNA ligaasi 5U (Fermentas) ning inkubeeriti toatemperatuuril 3 tundi.

2.2.3 Bakterirakkude transformatsioon

Bakterirakkude transformeerimiseks segati jääl kokku 5µl ligeerimissegu ja 50µl kompetentseid rakke (DH5α) ning inkubeeriti jääl 30 minutit. Seejärel tehti rakkudele kuumašokk 42°C juures 1,5 minutit, misjärel rakud viidi 3 minutiks jääle. Rakkudele lisati 500µl LB söödet (lisa 1) ning rakke inkubeeriti 45 minutit 37°C juures. Rakud külvati LB söötmele, mis sisaldas ampitsilliini (100µg/ml), ning kasvatati 37°C juures üleöö.

2.2.4 Miniprep plasmiidse DNA eraldamine *E. coli* rakkudest

3 ml LB vedelsöötmesse, mis sisaldas 100µg/ml ampitsilliini, inokuleeriti *E. coli* üksikkoloonia. Rakke kasvatati 37°C juures üleöö. Rakke tsentrifuugiti toatemperatuuril 13 000 rpm juures lauatsentrifuugis 1 minut. Pärast tsentrifuugimist eemaldati supernatant. Rakud resuspendeeriti 150µl-s SolI-s (50mM glükoos, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) ning segati vortexil (BioSan Vortex V1 plus). Rakkudele lisati SolII (0,2N NaOH, 1% SDS), segati õrnalt ja inkubeeriti ruumitemperatuuril 3-5 minutit. Seejärel lisati jääkülm SolIII (3M KOAc, 5M äädikhape), segati õrnalt ning inkubeeriti jääl 5-7 minutit. Rakud tsentrifuugiti 4°C 13 000 rpm juures 5 minutit (Heraeud Biofuge Fresco). Supernatant viidi uude tuubi, lisati 455µl isopropanooli ning segati vortexil. Supernatandi ja isopropanooli segu tsentrifuugiti ruumitemperatuuril 13 000 rpm juures 5 minutit. Sadet pesti 80% etanooliga. Pärast pesu sade kuivatati ning resuspendeeriti 100µl T₁₀E₁-s (10mM Tris-HCl (pH 8,0) 1mM EDTA (pH8,0))+Rnaasis (20 µg/ml) ja inkubeeriti 65°C juures 45 minutit. Siis lisati 1/10 3M NaOAc (pH 7,0) ning fenool/kloroformi (pH7,0), segati vortexil ning tsentrifuugiti toatemperatuuril 13 000 rpm juures 5 minutit. Ülemine faas viidi uude tuubi, lisati 2,5 kordne kogus 96% etanooli ning segati vortexil. Segu inkubeeriti -20°C juures 20 minutit ning tsentrifuugiti toatemperatuuril 13 000 rpm juures 5 minutit. Sadenenud DNA-d pesti 80% etanooliga ning sade kuivatati. DNA resuspendeeriti 50µl destilleeritud vees.

2.2.5 Restriktsioonanalüüs

Restriktsioonanalüüs viidi läbi 20µl reaktsioonisegus, mis sisaldas 1x restriktsioonipuhvrit R (10 mM Tris-HCl (pH 8.5 37°C juures), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA) ja 0,5U *Pst*I restriitaasi või 1x restriktsioonipuhvrit O (50 mM Tris-HCl (pH 7.5 37°C juures) ning 0,5U *Hind*III ja *Xho*I restriktase ning plasmiidset DNAd. Restriktsioonisegu inkubeeriti 2 tundi toatemperatuuril ning analüüsiti seejärel 0,8% agaros-TBE geelelektroforeesil (Bio-Rad Laboratories PowerPac basic ja Biometra Compact M horisontaalne geelelektroforeesi süsteem).

2.2.6 Degronkasseti ning *ARG4* ja *LYS1* deletsioonikassetide amplifitseerimine enne transformatsiooni

Deletsioonikassett amplifitseeriti plasmiidilt *pFA6a-loxP-kanMX6-loxP*. Kasutati pikki 70 nukleotiidi pikkuseid lookusspetsiifilisi *S1_forw* ja *S2_rev* praimereid, milles oli 50 nukleotiidi pikkune homoloogiline ala *ARG4* või *LYS1* lookusega ning 20 nukleotiidi pikkune identne järjestus *pFA6a-loxP-kanMX6-loxP* plasmiidiga. *ARG4* deletsioonikasseti amplifitseerimiseks kasutati

Arg4_S1_forw ja *Arg4_S2_rev* ning *LYS1* deletsioonikasseti amplifitseerimiseks kasutati *Lys1_S1_forw* ja *Lys1_S2_rev* praimereid.

Degronkassett amplifitseeriti plasmiididelt *2152c pHyg-Aid*-9myc* ning *2352c pHyg-Aid*-6HA*. Kasutati pikki 70 nukleotiidipikkuseid praimereid *UTP5_S2_rev* ning *UTP5_S3_forw*, milles oli 50 nukleotiidi pikkune homoloogiline ala UTP5 lookusega ning 20 nukleotiidi pikkune identne järjestus *2152c pHyg-Aid*-9myc* ja *2352c pHyg-Aid*-6HA* plasmiididega.

PCR viidi läbi 50µl reaktsioonisegus, mis sisaldas 2,5 U Pfu polümeraasi, umbes 100ng plasmiidset DNAd, 15 pmol vastavat *S2_rev* praimerit, 15 pmol vastavalt kas *S3_forw* või *S1_forw* praimerit (tabel 1), 1x PCR puhvrit (100mM Tris-HCl (pH 8,85); 25mM KCl; 5mM (NH₄)₂SO₄; 2mM MgSO₄), 0,2mM dNTP segu ning 2,5mM MgCl₂.

PCR viidi läbi järgnevalt (Biometra UNO II):

94°C 4 min, lisati Pfu polümeraas

30 tsükli: 94°C 30 sek, 55°C 30 sek, 72°C 4 min+40sek.

Plasmiidilt *pFA6a-loxP-kanMX6-loxP* paljundati fragment pikkusega 1600 nukleotiidi. Plasmiidilt *2152c pHyg-Aid*-9myc* paljundati fragment pikkusega 2300 nukleotiidi ning plasmiidilt *2352c pHyg-Aid*-6HA* 2100 nukleotiidi. 1/10 reaktsioonisegust analüüsiti 0,8% agaros-TBE geelelektroforeesil. Ülejäänud PCRi reaktsioonisegu sadestati 2 mahu 96% etanooli ning 1/10 mahu 3M Na-atsetaadiga (pH 7,0) -20°C juures, tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga 5 minutit 13 000 rpm juures lauatsentrifuugis, pesti 80% etanooliga ning resuspendeeriti 50µl vees.

2.2.7 Pagaripärmi transformeerimine

25ml YPD vedelsöötmesse (lisa 2) inokuleeriti *S.cerevisiae* üksikkoloonia. Rakke kasvatati 30°C juures üleöö. Hommikul lahjendati rakukultuur OD_{600nm}=0,3. Rakke kasvatati kuni OD₆₀₀=0,6-0,8. Rakke tsentrifuugiti 3 minutit 3200 rpm ruumitemperatuuril Rotina 420R tsentrifuugis (Swing-out rotor Cat. No. 4723). Pärast tsentrifuugimist eemaldati supernatant. Rakke pesti H₂O-ga, tsentrifuugiti ning eemaldati supernatant. Rakkudele pesti 15ml LiOAc-TE-ga (0,1M LiOAc, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA). Rakkudele lisati 20µl denatureeritud carrier DNAd (10mg/ml) ning segati vortexiga. Rakkude ja DNA segust võeti 50µl ning segati kokku 5µl PCRi produkti või plasmiidse DNAGA ning inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril. DNA ja rakkude segule lisati 300µl PEG-LiOAc-TE (40% PEG LiOAc-TE lahuses), segati vortexil ning hoiti toatemperatuuril 15 minutit. Seejärel lisati 30µl dimetüül-sulfoksiidi (DMSO), segati vortexil ning tehti rakkudele kuumašokk 42°C juures 10 minutit. Transformatsioonisegu tsentrifuugiti 3 minutit 3000 rpm

toatemperatuuril lauatsentrifuugiga, eemaldati supernatant. Degronkasseti ja deletsioonikasseti transformeerimisel resuspendeeriti rakud 1,5ml YPD vedelsöötmes ning inkubeeriti üleöö 30°C juures. Seejärel tsentrifuugiti rakke 5 minutit 5000 rpm juures lauatsentrifuugiga ning rakud külvati YPD tassidele, mis sisaldasid vastavalt hügomütsiini (300mg/ml) või G418 (200mg/l) ning inkubeeriti 30°C juures kolooniate tekkimiseni. Plasmidi transformeerimisel resuspendeeriti rakud 150µl vees ning külvati SC-URA söötmele (lisa 2).

2.2.8 Pärimi genoomse DNA eraldamine ja transformantide analüüs PCR meetodil

Pärimi genoomse DNA eraldamiseks kasutati LiOAc-SDS töötlust (Lööke et al. 2011). Rakud resuspendeeriti 100µl LiOAc-SDS (200 mM LiOAc, 1% SDS) lahuses ning inkubeeriti 70°C juures 10 minutit, lisati 300µl 96% etanooli ning segati vortexil. Seejärel hoiti rakke 2 minutit ruumitemperatuuril. Rakkude, LiOAc-SDS ja etanooli segu tsentrifuugiti 13 000 rpm toatemperatuuri juures 2 minutit lauatsentrifuugiga. Sadet pesti 0,5 ml 80% etanooliga, tsentrifuugiti 13 000 rpm toatemperatuuri juures 2 minutit lauatsentrifuugiga ja eemaldati supernatant. Sade kuivatati 37°C juures 4 minutit. Sade lahustati 100µl T_{10E0.1}-s (10mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,1mM EDTA (pH8,0)). Segu tsentrifuugiti 15 000 rpm toatemperatuuri juures 1 minut lauatsentrifuugis, et lahusest sadeneks välja rakkude jäägid. DNA säilitati -20°C juures.

Reaktsioonisegu mahuks oli 20µl, mis sisaldas 1,5 U Taq DNA polümeraasi, 2µl transformandi genoomset DNAd, 2,5mM MgCl₂, 1x PCR puhvrit (100mM Tris-HCl (pH 8,85); 25mM KCl; 5mM (NH₄)₂SO₄; 2mM MgSO₄), 0,2mM dNTP segu, 10pmol *pYM_check_rev* praimerit ning 10pmol lookusespetsiifilist praimerit.

PCR viidi läbi järgnevalt:

94°C 4 min

35 tsükli: 94°C 30 sek, 55°C 30 sek, 72°C 1 min 15sek.

2.2.9 Rekombinatsioon Cre rekombinaasiga

Üksikkoloonia inokuleeriti YPRaf söötmesse (lisa 2) ning kasvatati üle öö 30°C juures. Hommikul lahjendati rakukultuur OD₆₀₀=0,35. Rakke kasvatati kuni OD₆₀₀=0,6-0,8, lisati galaktoosi (3%) ning kasvatati üleöö. Seejärel külvati rakud YPD söötmele.

2.2.10 Sporulatsioon ja tetraadide analüüs

Üksikkoloonia inokuleeriti 3 ml YPD vedelsöötmes ning kasvatati üle öö 30°C juures. 3 ml sporulatsiooni söötmesse (lisa 2) lisati 300µl üle öö kasvatatud rakukultuuri ning kasvatati vähemalt 5 päeva 30°C juures. Kui rakud olid sporuleerunud, tsentrifuugiti 1 ml sporulatsioonisegu 5000 rpm juures lauatsentrifuugis 5 minutit ruumitemperatuuril. Rakud pesti veega ning seejärel resuspendeeriti rakud 500µl H₂O-s. 50µl pestud spoore segati 50µl zümolaasi lahusega (0,6 mg/ml) ning seejärel inkubeeriti 7 minutit toatemperatuuril. Tetraadid eraldati mikroskoobiga (Singer Instruments MSM Tetrad Dissection Microscope).

2.2.11 Rakulüsaadi valmistamine Western blot analüüsi jaoks

Üksikkoloonia inokuleeriti 25 ml YPD vedelsöötmes ning inkubeeriti üle öö 30°C juures. Hommikul lahjendati rakukultuuri OD₆₀₀=0,3. Rakke kasvatati kuni OD₆₀₀=0,6-0,8. 15 ml rakkudest tsentrifuugiti 3200 rpm, 4°C juures Rotina 420R tsentrifuugis 3 minutit. Rakke pesti 1 ml külma ddH₂O-ga. Rakkudele lisati 200µl 20% TCA-d (trikloroäädikhape) ja 500µl klaaskuule (diameeter 0,1mm). Rakud lüüsi Precellys 24 homogenisaatoriga, kasutati programmi 6000rpm 3 korda 60 sekundit 60 sekundiliste vahedega (6000-3x60-60). Peale rakkude lüüsimist lisati lüsaadile 500µl 5% TCA-d ning rakulüsaat eraldati tsentrifuugides 2100 rpm ja 4°C juures Rotina 420R tsentrifuugis 2 minutit. Rakulüsaati tsentrifuugiti 13 000 rpm ja 0°C juures lauatsentrifuugis 5 minutit, supernatant eraldati ning sade resuspendeeriti 70µl 1x Laemmli puhvris (0,1% 2-merkaptotetanool, 0,00005% bromofenoolsinine, 2% SDS, 63 mM Tris-HCl (pH 6.8)). Seejärel lisati 30µl 1M Tris/HCl pH 8,0. Lüsaat külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80°C juures.

2.2.12 Western blot analüüs

Valgud denatureeriti 95°C juures 5 minutit. Rakulüsaadist kanti geelile 20µl ning valgud lahutati molekulmassi järgi kasutades 10% polüakrüülamiid geeli (Sambrook ja Russel, 2001). Geelelektroforeesi läbiviimiseks kasutati Bio-Rad Mini PROTEAN Tetra Systemi masinat, geeli voolutamiseks kasutati Tris-glütsiin elektroforeesi puhvrit (125mM Tris, 960mM glütsiin, 0,5% SDS). Konsentreeriva geeli ulatuses rakendati pinget 80V, lahutava geeli ulatuses 120 V. Seejärel viidi läbi valkude kandmine (BioRad semi-dry Fastblot B44) nitrotselluloosmembraanile (Pure Nitrocellulose unsupported 0,45µm transfer membrane (AppliChem)), kasutades poolkuiva süsteemi (25 mM Tris, 193 mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% metanool) ning rakendati pinget 10 mV 40 minutit. Seejärel viidi läbi nitrotselluloosmembraani blokkimine lõssipulbri seguga (5%

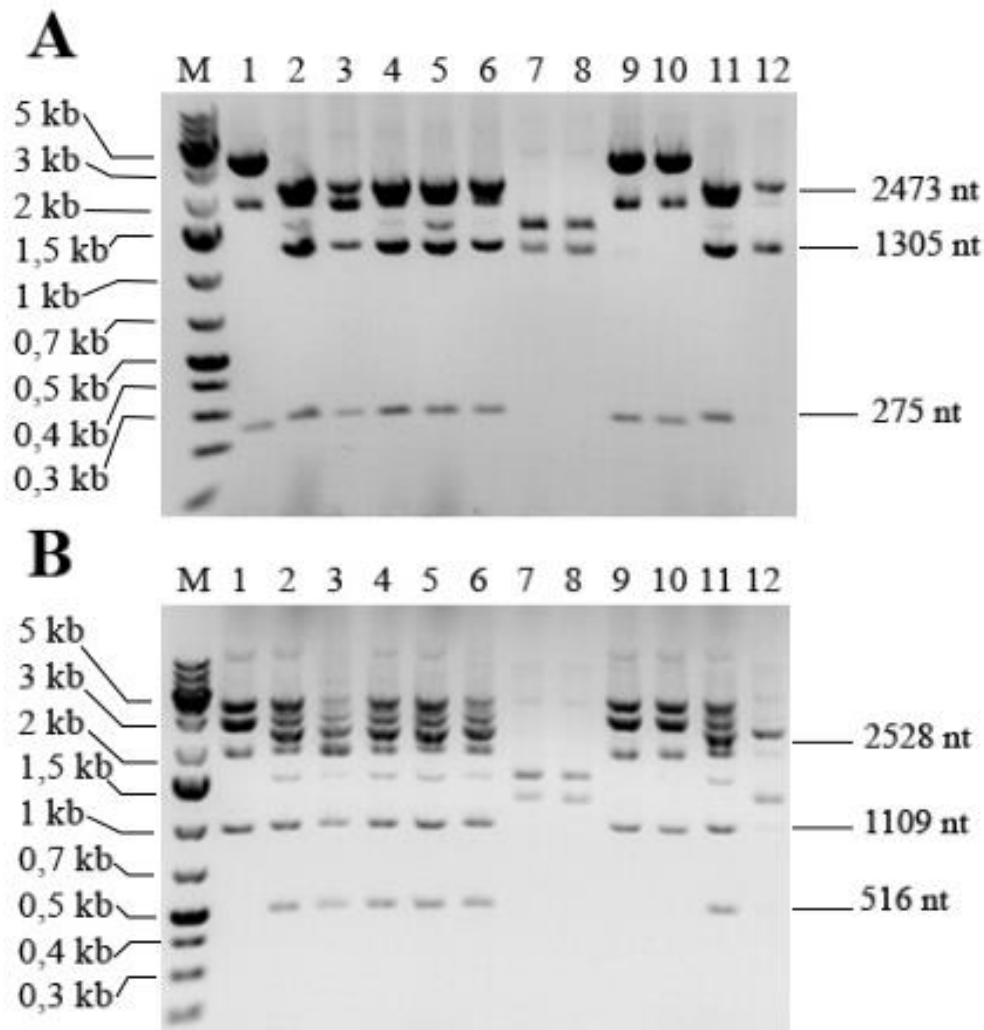
lõssi 1x PBS lahuses (14mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄). Pärast blokkimist tehti 3 kiiret pesu 1x PBS lahusega ning seejärel 3 pikemat, 10 minutist pesu toatemperatuuril. Lisati primaarne antikeha (monokloonne antikeha 9E10 anti-9myc 1:200 lahjendus 1x PBS puhvris ja 1% lõssis, monokloonne antikeha 12CA5 anti-6HA 1:200 lahjendus 1x PBS puhvris ja 1% lõssis) ning inkubeeriti 4°C juures üleöö. Membraani pesti 3 korda kiirelt ning 3 korda 10 minutit 1x PBS lahusega toatemperatuuril ning inkubeeriti sekundaarse antikehaga (kitse hiirevastane IgG konjugeeritud aluselise fosfataasiga (Sigma) 1:10 000 lahjendus 1xPBS puhvris) 1 tund toatemperatuuril. Membraani pesti 3 korda kiirelt ning 3 korda 10 minutit 1x PBS lahusega toatemperatuuril. Aluselise fosfataasi reaktsioon läbiviimiseks segati 33µl NBT (nitrosinine tetrasooliumkloriid) (50mg/ml) lahustatud 70% DMFis (dimetüülformamiid) ja 66µl BCIP (5-bromo-4-kloro-3'-indoolfosfaat p-toluidiini sool) (50 mg/ml) lahustatud 100% DMFis ja 10 ml aluselise fosfataasi puhvrit (100mM Tris/HCl, 100mM NaCl, 5 mM MgCl₂) valkude visualiseerimiseks toatemperatuuril. Reaktsioon peatati membraani pesemisel destilleeritud veega.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 *LoxP* järjestustega deletsioonimarkeri konstrueerimine

Varem olid laboris kasutusel tüved, milles *ARG4* ja *LYS1* geenid on deleteeritud *hphMX6* ja *natMX6* markergeenidega. Seetõttu oli vaja konstrueerida tüvi, mille *ARG4* ja *LYS1* geenid on deleteeritud ning vastavates lookustes puuduvad markergeenid. Markergeenidest oli vaja vabaneda, et tulevikus oleks võimalik kasutada rohkem seleksioonimarkereid. Üheks võimaluseks markergeenidest vabanemiseks on kasutada Cre/Lox süsteemi (Guldener et al., 1996). Cre/Lox süsteem seisneb *loxP* järjestustega seleksioonimarkeri ning Cre rekombinaasi ekspresseeriva plasmidi transformeerimises rakku. Cre rekombinaasi ekspresseerimisel rakus rekombineeritakse välja *loxP* järjestuste vahel olnud markergeen ja 1 *loxP* järjestus. *LoxP* järjestustega plasmidi *pFA6a-loxP-kanMX6-loxP* konstrueerimiseks kasutati plasmidi *pFA6a-kanMX6*, millelt amplifitseeriti *loxP* järjestusi sisaldavate praimeritega *loxP_forw_SalI* ja *loxP_rev_EcoRI kanMX6* markergeeni sisaldav DNA fragment. Seejärel lõigati *loxP* järjestusi sisaldavat DNA fragmenti *SalI* ja *EcoRI* restriктаasidega. Samade restriктаasidega lõigati ka plasmidi *pFA6a-kanMX6*. Insert ning vektor ligeeriti ning saadud ligatsioonisegu transformeeriti bakteritüvesse DH5 α . Transformandid selekteeriti LB söötmel (lisa 1), mis sisaldas ampitsilliini.

Bakterirakkudest eraldati miniprep DNA, mida analüüsiti hiljem restriksioonanalüüsil (joonis 10). Restriksioonanalüüsil lõigati DNAd esimesel juhul *PstI* restriктаasiga (joonis 10, paneel A), teisel juhul *HindIII* ja *XhoI* restriктаasidega (joonis 10, paneel B). Juhul kui plasmiid sisaldas *loxP* järjestustega markergeeni olid *PstI* restriктаasiga lõikamisel õiged DNA fragmentide pikkused 2473, 1305 ja 275 nt (joonis 10, paneel A) ning *HindIII* ja *XhoI* restriктаasidega lõikamisel 2528, 1109 ja 516 nt (joonis 10, paneel B).

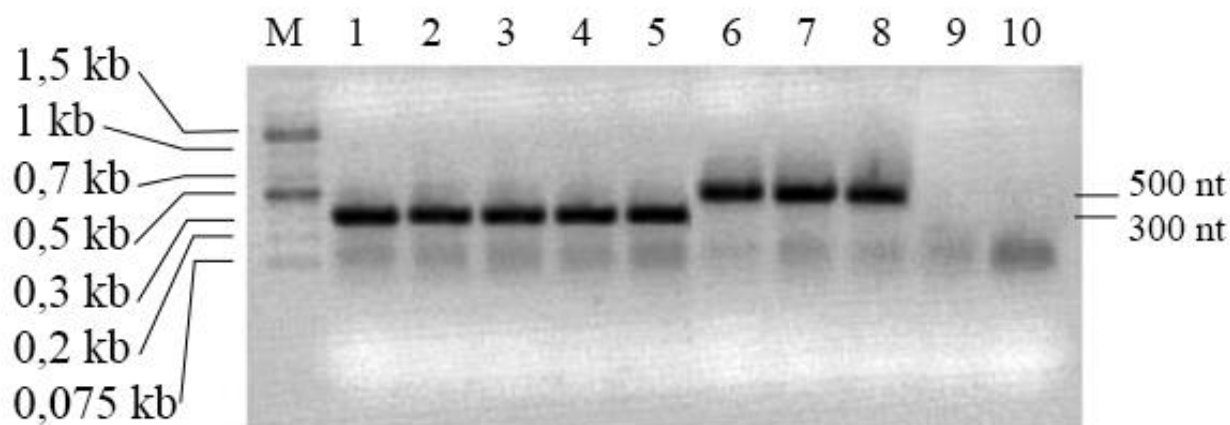


Joonis 10. Plasmiidse DNA analüüs. A. Plasmiidne DNA on lõigatud *PstI* restriктаasiga, B. Plasmiidne DNA on lõigatud *HindIII* ja *XhoI* restriктаasidega. M tähistab markerit (Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA ladder plus). Õiged fragmentide pikkused on näitatud paremal joonise kõrval. Saadud DNA fragmendid analüüsiti 0,8% agaros-TBE geelelektroforeesil.

Joonisel 10 on näha, et õige plasmiidiga *pFA6a-loxP-kanMX6-loxP* on tegu radadel 2, 3, 4, 5, 6 ja 11. Järjestuse kontrollimiseks saadeti plasmiidset DNAd 4 ja 5 sekveneerimisele. Sekveneerimise teenus telliti Biokeskuse tuumiklaborist, sekveneerimiseks kasutati primereid *pFA6a_forw* ning *pYM_rev*. Mõlema DNA sekveneerimistulemuste võrdlemisel referentsjärjestustega leiti, et mõlemad plasmiidid olid õige järjestusega. Edaspidises töös kasutati plasmiidset DNAd nr 5. See plasmiid nimetati: *pFA6a-loxP-kanMX6-loxP*.

2.3.2 ARG4 ja LYS1 deletsioonimutantide konstrueerimine kasutades loxP järjestusi sisaldavat deletsioonikasseti

Markergeenideta $\Delta arg4$ ja $\Delta lys1$ tüvede konstrueerimiseks amplifitseeriti plasmiidilt *pFA6a-loxP-kanMX6-loxP* deletsioonikasseti. ARG4 deleteerimiseks vajaliku kasseti paljundamiseks kasutati primereid *arg4_S1_forw* ning *arg4_S2_rev*. LYS1 deleteerimiseks vajaliku kasseti paljundamiseks kasutati primereid *lys1_S1_forw* ning *lys1_S2_rev*. Pärast deletsioonikasseti amplifitseerimist viidi läbi transformatsioon kahes eri tüves. Tüvesse TYSC9 transformeeriti *loxP* järjestusi sisaldav deletsioonikasseti ARG4 deleteerimiseks. Tüvesse TYSC10 transformeeriti *loxP* järjestusi sisaldav deletsioonikasseti LYS1 deleteerimiseks. Transformandid selekteeriti YPD+G418 (200mg/l) tassidel, kuna *kanMX6* markergeen annab resistentsuse genitsiniinile.

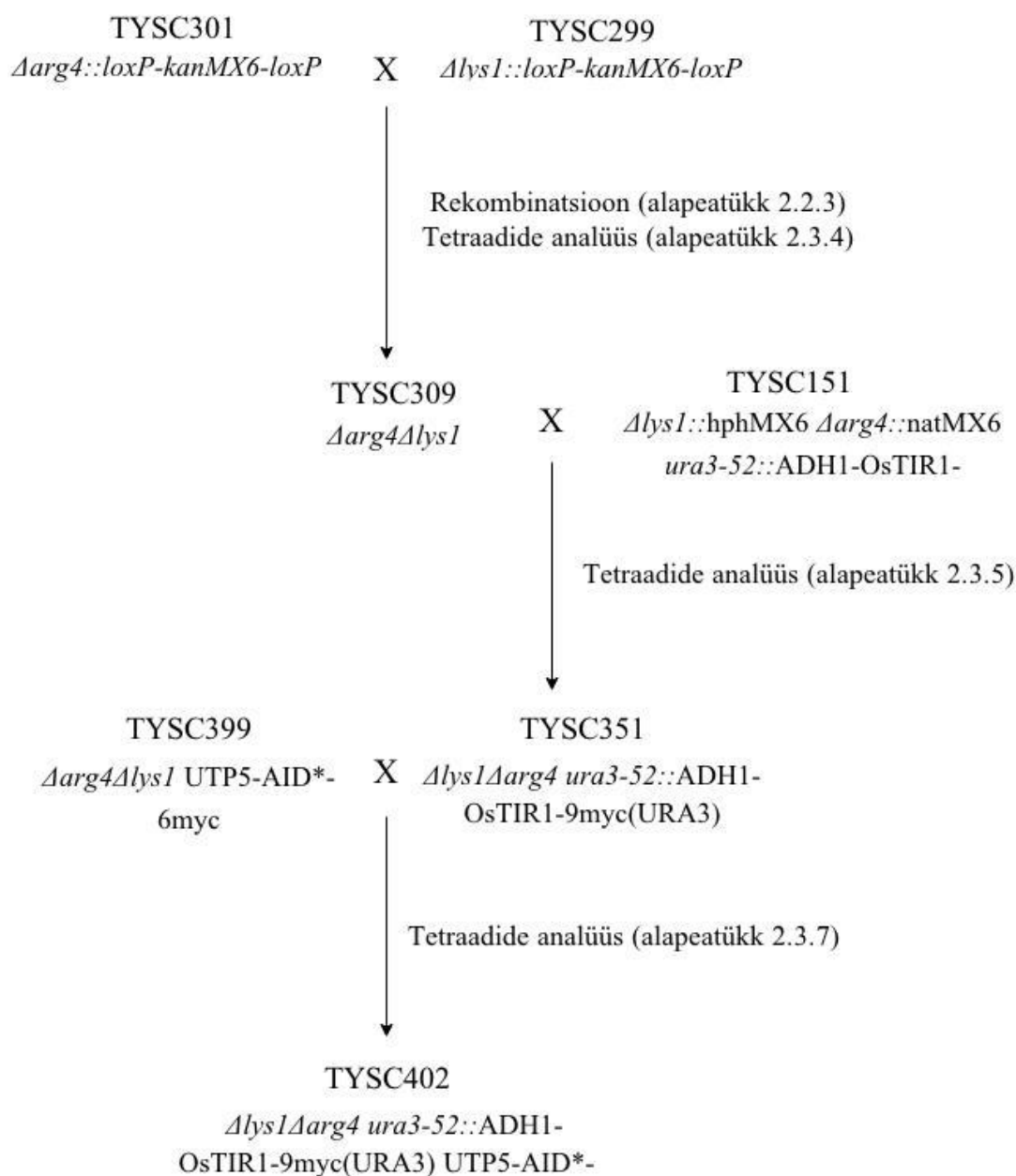


Joonis 11. Transformantide kontroll PCR meetodil. M tähistab markerit (Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA ladder plus), 1-5 on $\Delta lys1$ tüved, 6-9 $\Delta arg4$ tüved, 9 tüvi TYSC9 ja 10 tüvi TYSC10 metsiktüüpi kontrollid. Joonise kõrval on märgitud DNA fragmentide õiged pikkused. Gelelektroforees viidi läbi 0,8% agaros-TBE süsteemis.

Transformantidest eraldati totaalne DNA ning viidi läbi transformantide analüüs PCR meetodil (joonis 11) PCR reaktsioonide jaoks kasutati primereid *arg4_contr_forw* ja *pYM_check_rev* ARG4 lookusesse integreeritud deletsioonikasseti analüüsimiseks ning *lys1_contr_forw* ja *pYM_check_rev* LYS1 lookusesse integreeritud deletsioonikasseti analüüsimiseks. DNA fragmentid eraldati 0,8% agaros-TBE gelelektroforeesi, et määrata PCR-iga amplifitseeritud DNA fragmentide pikkused. LYS1 lookusesse integreeritud deletsioonikasseti analüüsil oli DNA fragmendi õige pikkus 300nt, ARG4 lookusesse integreeritud deletsioonikasseti analüüsil 500nt. (joonis 11). Joonisel 11 on näha, et kõigil radadel (1-8) on õigete pikkustega DNA fragmendid. Kontrollidel, mis on deletsioonikassetita TYSC9 ja TYSC10, ei ole signaali. Seetõttu võib väita, et

transformatsioon on olnud edukas kõikides tüvedes (joonis 11). Edaspidi kasutati tüvesid 3, 4, 6 ja 7. Need tüved nimetati vastavalt TYSC299, TYSC300, TYSC301 ja TYSC302.

Antud töö käigus teostati rida ristamisi, seetõttu on tulemuste paremaks mõistmiseks lisatud töösse joonis 12. Peale ristamiste on joonisel ära toodud, millistes alapeatükkides vastavaid ristamisi ja ristamiste vahepeal läbi viidud protsesse on kirjeldatud.

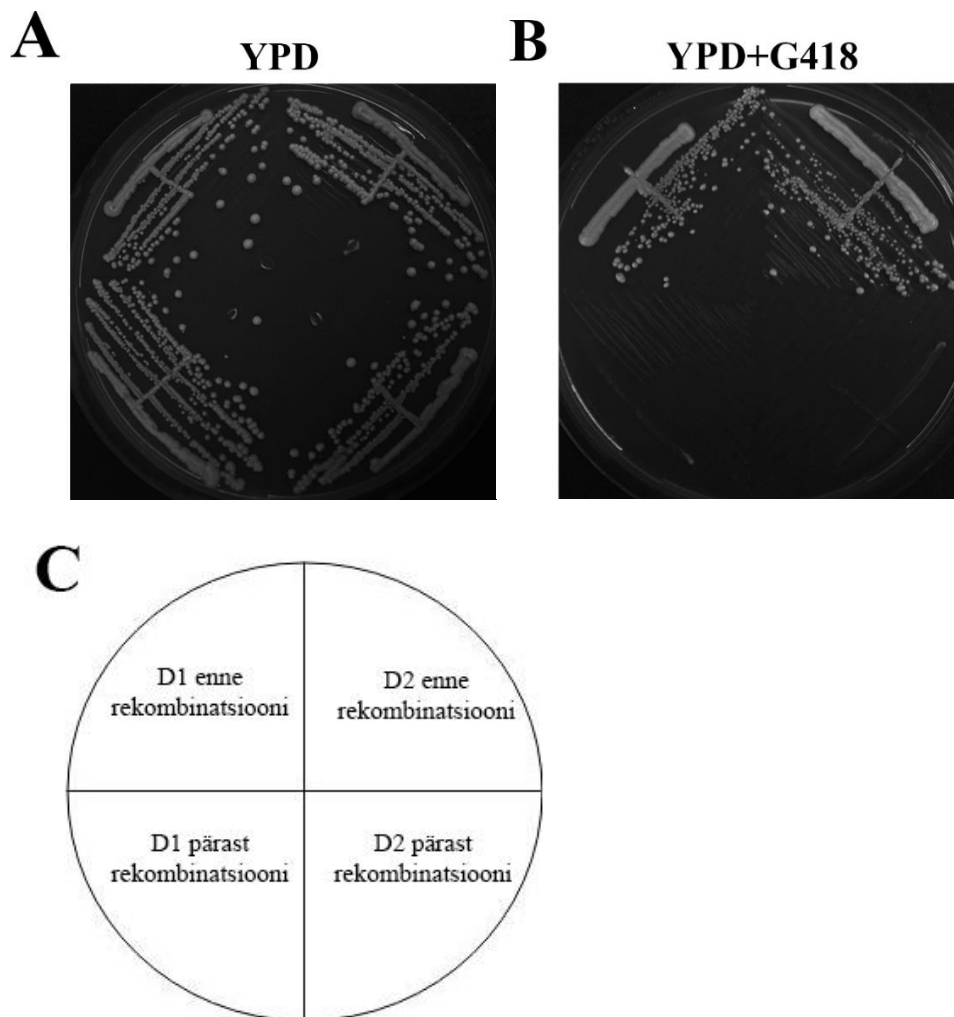


Joonis 12. Töös teostatud ristamiste skeem. Välja on toodud tüved, mida omavahel ristati, ning olulised osad genotüübist. X tähtsustab kahe tüve ristamist, noolega viidatud tüved on tetraadide analüüsidel saadud haploidid. Lisaks on ära toodud alapeatükid, kus vastavatest ristamistest ja nende tulemustest räägitakse.

2.3.3 Rekombinatsioon Cre rekombinaasiga

Kuna eelnevalt transformeeritud tüvedes oli ühes lookuses olemas *loxP* järjestustega selektsioonimarker, kuid teises see puudus, oli vaja ristata omavahel tüved TYSC299 ja TYSC301 (joonis 12). Tüvede ristamisel saadi diploidid. Diploidid selekteeriti raku suuruse järgi vaatlusena valgusmikroskoobis (Olympus CX31).

Deleksioonimutantide konstrueerimisel kasutatud markergeeni eemaldamiseks genoomist kasutati Cre/Lox süsteem. Selleks transformeeriti diploididesse plasmiid *pSH47*, milles on olemas Cre rekombinaasi kodeeriv geen, mis on galaktoosi poolt indutseeritava promotori all, ning *URA3* markergeen. Transformandid selekteeriti SC-URA söötmel. Cre rekombinaasi ekspresseerimiseks kasvatati rakud üles YPRaf söötmel, misjärel kasvukeskkonda lisati galaktoosi (3%), millega indutseeriti Cre rekombinaasi ekspressioon.

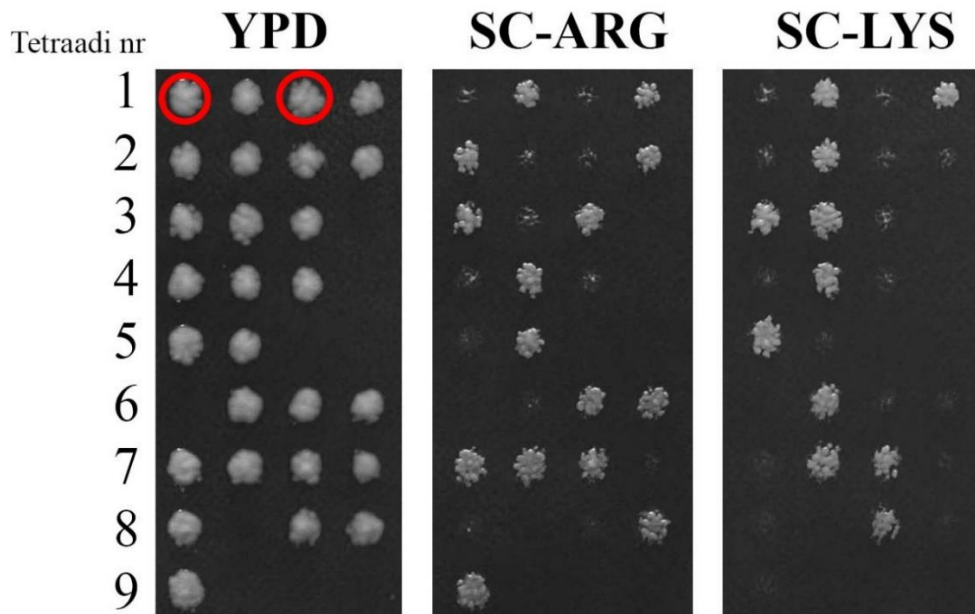


Joonis 13. Rekombinatsiooni kontroll. A. Rakke kasvatati YPD söötmel 30°C juures 3 päeva. B. Rakke kasvatati YPD+G418 (200mg/l) söötmel 30°C 3 päeva. C. Tüvede asetus tassidel: D1 tähistab diploidset tüve TYSCD1, D2 diploidset tüve TYSCD2.

Pärast rekombinatsiooni toimumist külvati rakud YPD söötmele. YPD söötmel üles kasvanud kolooniatest tehti templid, mis kanti selektiivsöötmetele YPD+G418 (200mg/l) ning SC-URA. Kolooniad, kus oli toimunud rekombinatsioon, ei kasvanud YPD+G418 (200mg/l) söötmel (joonis 13). Joonisel ei ole tempelkülv vaid lisakontroll. Plasmidi olemasolu rakkudes kontrolliti kasvatades rakke SC-URA söötmel. Kolooniatest, mis ei kasvanud SC-URA söötmel, oli plasmid *pSH47* kadunud. Edaspidiseks tööks eelistati rakke, millest *pSH47* oli kaduma läinud. *LoxP* järjestustega *kanMX6* markergeeniga rakud kasvavad YPD+G418 söötmel, kuna *kanMX6* annab resistentsuse genitsiniinile. Seetõttu tüved, milles on toimunud rekombinatsioon, ei kasva YPD+G418 söötmel, kuna neil puudub *kanMX6* geen (joonis 13). Samas rakud, millesse *pSH47* plasmidi veel transformeeritud ei olnud, kasvasid YPD+G418 söötmel (joonis 13). Rekombinatsiooni tulemusena saadi 2 tüve: TYSCD1 ning TYSCD2. Neid tüvesid kasutati edaspidises töös.

2.3.4 *Δarg4Δlys1* haploidse tüve konstrueerimine

Rekombinatsiooni järel oli vajalik uuesti haploidse tüve saamine, kus nii *ARG4* kui *LYS1* lookuses pole enam markergeeni (joonis 12). Selleks indutseeriti sporulatsioon tüvedes TYSCD1 ja TYSCD2. Haploidide eraldamiseks viidi läbi tetraadide analüüs. Rakke inkubeeriti sporulatsioonisöötmes vähemalt 5 päeva. Sporulatsiooni läbiviimisel selgus, et tetraadide teke oli aeglane ning nelja spooriga askuste asemel tekkis palju askuseid, mis sisaldasid kolm spoori. Pärast tetraadide analüüsi selgus, et eraldatud spoorid ei olnud väga eluvõimelised (joonis 14).

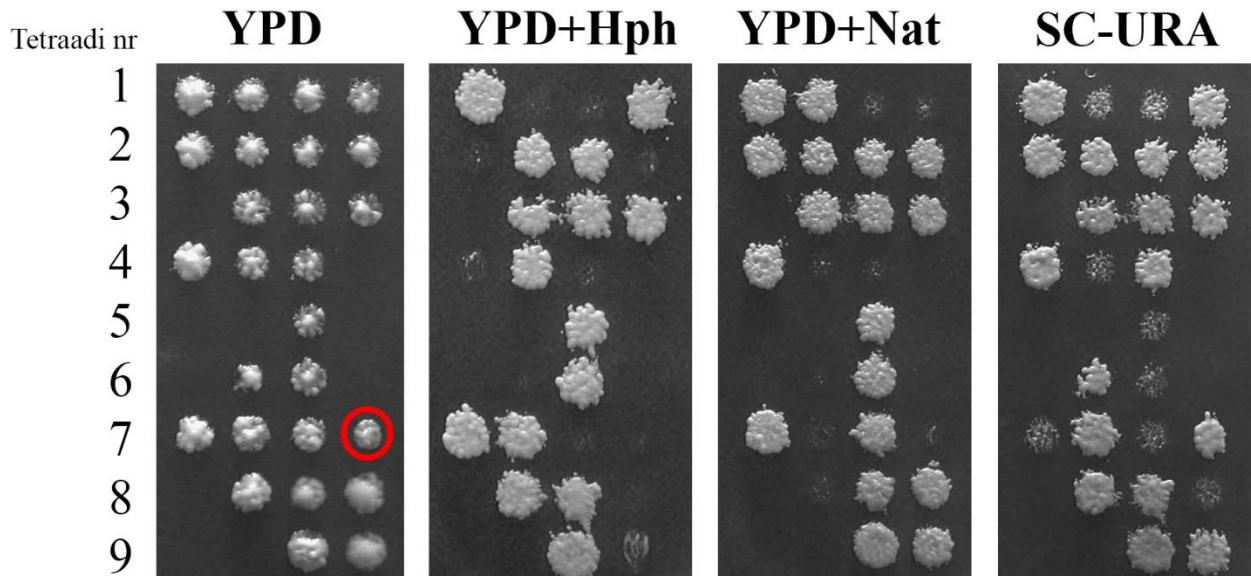


Joonis 14. Ristamisel saadud diploidi tetraadide analüüs. Tetraadide numbrid on toodud vasakul, rakke kasvatati YPD, SC-ARG ning SC-LYS söötmel 3 päeva 30°C juures. Punasega on märgitud edaspidises töös kasutatud tüved.

Ühe diploidse raku sporulatsioonil tekkinud neli spoori eraldati tetraadide mikroskoobi abil. Tetraadide eraldamise järel kasvatati kolooniaid 3 päeva 30°C juures. Seejärel tehti plaadist tempel ning rakud kanti üle SC-ARG ning SC-LYS selektiivsöötmetele. Edaspidiseks analüüsiks sobisid tetraadid, kus YPD söötmel oli üles kasvanud 4 kolooni (joonis 14, tetraadid 1, 2 ja 7) ning tunnuste pärandumine oli 2:2 (joonis 14, tetraad 1). *Δarg4Δlys1* genotüübiga tüved on sellised kolooniad, mis kasvavad YPD söötmel kuid ei kasva SC-ARG ja SC-LYS selektiivsöötmetel. Tetraadide analüüsi tulemusena saadi 2 *Δarg4Δlys1* tüve. Neid tüvesid kasutati edaspidises töös. Saadud tüved nimetati TYSC309 ja TYSC310.

2.3.5 OsTIR1 *Δarg4Δlys1* ekspressioonitüve konstrueerimine

Labori kollektsioonis oli olemas tüvi, mis ekspresseeris OsTIR1 valku, kuid mille *ARG4* ja *LYS1* olid deleteeritud markergeenidega. Auksiinitundliku degronmutandi konstrueerimiseks oli vajalik OsTIR1 valku ekspresseeriv tüvi, mille *ARG4* ning *LYS1* lookustest on eemaldatud selektsioonimarkerid. Markergeenidest vabanemiseks ristati omavahel tüved TYSC151 ja (joonis 12). Diploidid seleteeriti raku suuruse järgi ning viidi läbi sporulatsioon.

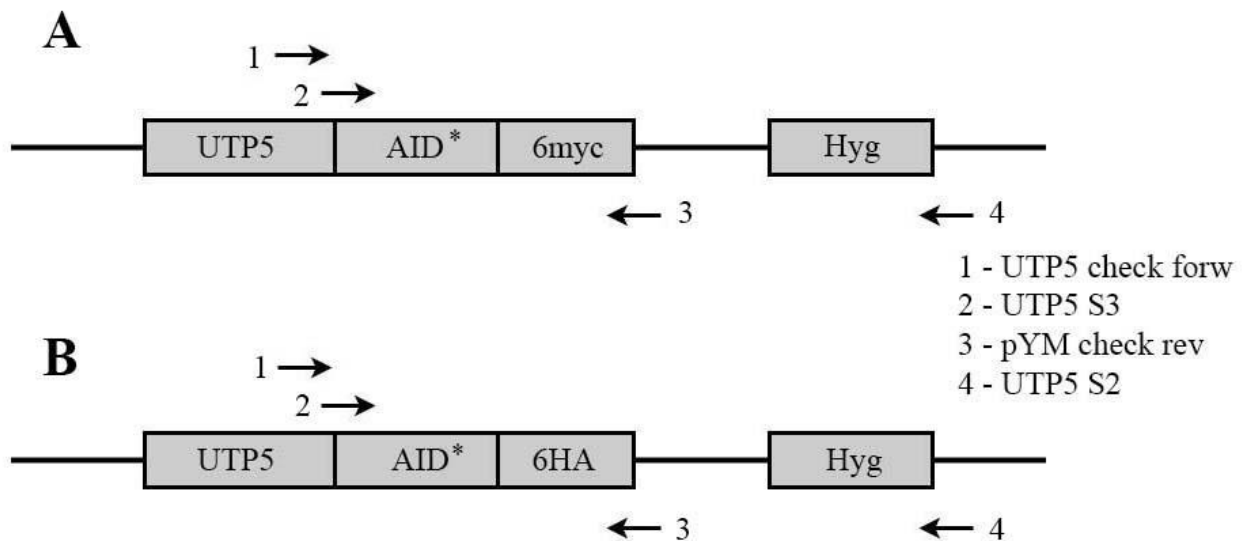


Joonis 15. OsTIR1 ekspresseeriva tüve tetraadide analüüs. Rakke kasvatati YPD, YPD+Hph (300mg/ml), YPD+Nat(100mg/ml) ja SC-URA söötmetel 3 päeva 30°C juures. Punasega on märgitud edaspidises töös kasutatud tüvi.

Tetraadid eraldati mikroskoobiga. Tetraadide eraldamise järel kasvatati rakke 30°C juures 3 päeva. Seejärel tehti plaadist tempel ning rakud kanti üle selektiivsöötmetele: YPD+Hph, YPD+Nat, SC-URA (joonis 15). Edaspidiseks analüüsiks sobisid tetraadid, kus YPD söötmel oli üles kasvanud 4 kolooniat (joonis 15, tetraadid 1, 2 ja 7) ning tunnuste pärandumine oli 2:2 (joonis 15, tetraadid 1 ja 7). Spoorides, mis ei kasvanud antibiootikume sisaldavatel söötmetel (Nat ja Hph), olid meiosis tulemusena *Δarg4* ja *Δlys1* ühes rakus. Lisaks pidid tetraadid kasvama SC-URA söötmel, kuna OsTIR1 geen pärandub koos *URA3*-ga ning seetõttu on olemas funktsionaalne *URA3*. Seega on õige seitsmenda tetraadi neljas koloonia (joonis 15). Konstrueeritud tüve kasutati edaspidises töös. Konstrueeritud tüvi nimetati TYSC351.

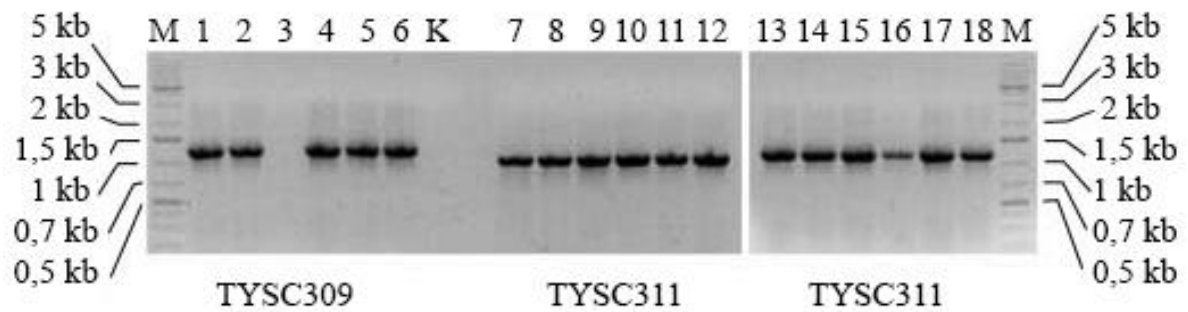
2.3.6 UTP5-AID hübriidvalku ekspresseeriva pärmitüve konstrueerimine

Auksiinitundliku degrontüve konstrueerimisel oli teiseks oluliseks etapiks Utp5-AID* hübriidvalku ekspresseeriva tüve konstrueerimine. Utp5-AID* hübriidvalku ekspresseeriva pärmitüve konstrueerimiseks amplifitseeriti plasmiididelt *2152c pHyg-Aid*-9myc* ja *2352c pHyg-Aid*-6HA* degronkassetid. Degronkasset koosnes AIDst, 6myc või 6HA epitoobi järjestusest ning hügroümüsiini resistentsusgeenist (joonis 16). Degronkasseti amplifitseerimiseks kasutati pikki 70 nukleotiidi pikkuseid primereid *UTP5_S3* ning *UTP5_S2*, millel mõlemal on 50 nukleotiidi pikkune komplementaarne ala *UTP5* lookusega (joonis 16).



Joonis 16. Degronkassett ning praimerite seondumine. Ülemisel paneelil on kujutatud *UTP5* lookuses olevat 6myc epitoobi järjestusega degronkassetti, alumisel *UTP5* lookuses olevat 6HA epitoobi järjestusega degronkassetti. Mõlemad DNA kassetid sisaldavad AID* järjestust ning hügromütsiini resistentsusgeeni. Koos kasutati primereid 1+3 ning 2+4.

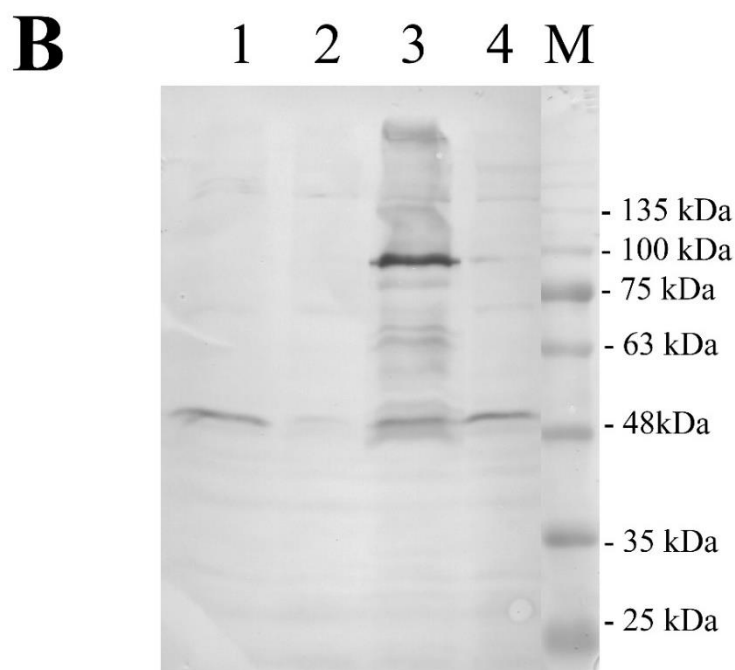
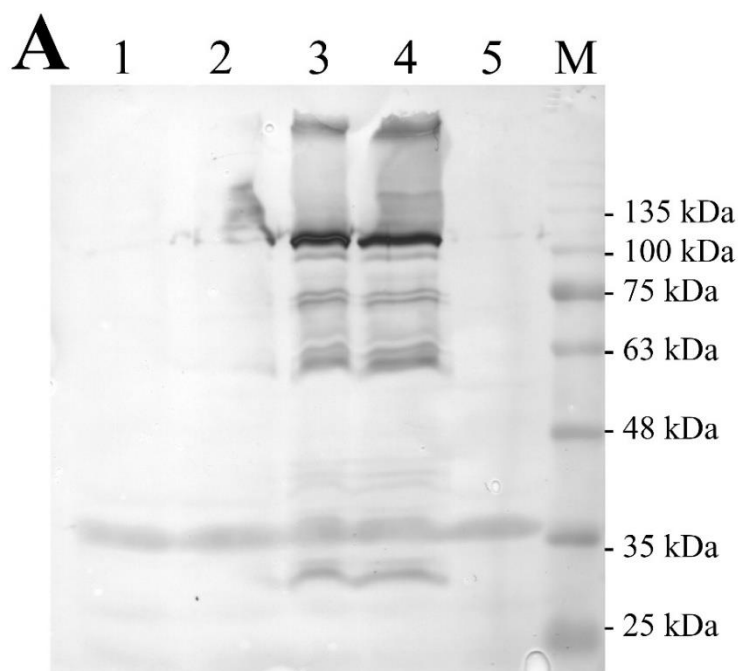
Pärast degronkassettide amplifitseerimist transformeeriti need pärmütvedesse TYSC309 ning TYSC310. Transformandid selekteeriti YPD+Hph (200mg/l) söötmel. Transformantide kontrollimiseks PCR meetodil eraldati tüvedest genoomne DNA ning sellelt amplifitseeriti *pYM_check_rev* ning *UTP5_check_forw* praimeritega üles *UTP5* lookusest DNA fragment (joonis 16). Saadud lõikude pikkusi kontrolliti 0,8% agaros-TBE geelelektroforeesil (joonis 17). Juhul kui degronkassett oli integreerunud *UTP5* lookusesse, olid õiged pikkused 6myc epitoobi järjestusega kassetide korral 1210 nukleotiidi ning 6HA epitoobi järjestuse korral 1080 nukleotiidi.



Joonis 17. Degronkasseti integratsiooni analüüs PCR meetodil. Joonisel M tähistab markerit (Thermo Scientific DNA GeneRuler 1 kb DNA ladder plus). Paneelil A on radadel 1-6 6myc epitoobi järjestust sisaldava AID* kassetiga tüved, K tähistab kontrolli TYSC309, radadel 7-12 on 6HA epitoobi järjestust sisaldava AID* kassetiga tüved, radadel 13-18 on 6myc epitoobi järjestust sisaldava AID kassetiga tüved.

Õige pikkusega DNA fragment paljudati kõikidest transformantidest välja arvatud nr 3-st (joonis 17). Kontrollimiseks, kas degnonkassett integreerus lugemisraami õigesti, oli vajalik sekveneerimine. Selleks puhastati FavorPrep kitiga 0,8% agaros-TBE geelist DNA fragmendid radadelt 5, 8 ja 16 (joonis 17). Sekveneerimiseks kasutati praimerit *UTP5_check_forw*. Sekveneerimistulemuste võrdlemisel referentsjärjestustega leiti, et kõigi kolme DNA fragmendi järjestused olid õiged. Edaspidi kasutati tüvesid 5,8 ja 16. Need tüved nimetati TYSC399, TYSC400 ja TYSC401 ning neid kasutati edaspidises töös.

Valgu ekspressioonitaseme uurimiseks viidi läbi Western blot analüüs. Eksponentsiaalses kasvufaasis olevatest rakkudest valmistati lüsaat ning valgud eraldati 10% poliakrüülamiid-SDS-geelelektroforeesil. Suuruse alusel lahutunud valgud kanti nitrotselluloosmembraanile. Kuna pärmirakkude transformeerimisel kasutati 2 erineva epitoobijärjestusega DNA fragmente, siis oli vajalik inkubeerimine 2 erineva antikehaga: 6HA ning 6myc järjestusspetsiifiliste antikehadega. Pärast sekundaarse antikehaga, mis tunneb ära hiire IgG ning on konjugeeritud aluselise fosfataasiga, töötlemist visualiseeriti valgud aluselise fosfataasi reaktsiooniga (joonis 18).



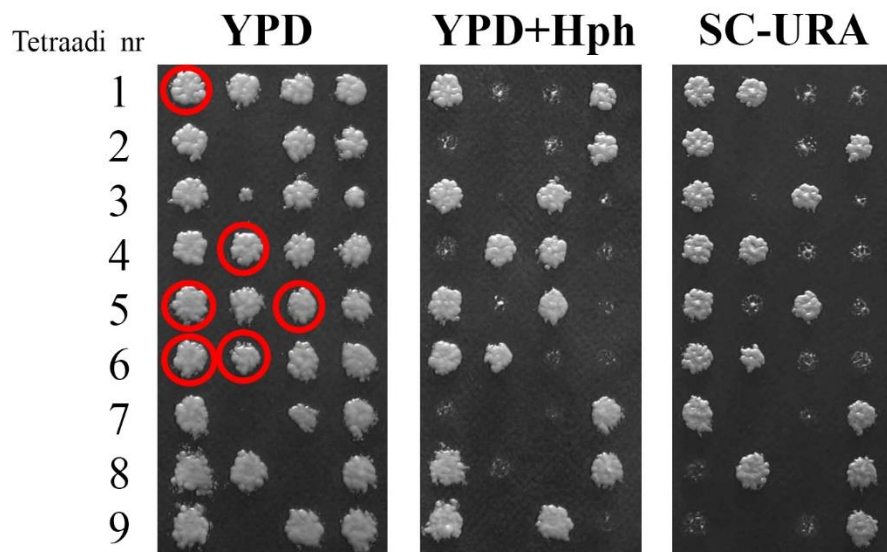
Joonis 18. Utp5-AID* hübriidvalgu ekspressiooni analüüs Western blot meetodil. A. Radadel 1-2 on WT tüved TYSC309 ja TYSC311, radadel 3-4 transformandid TYSC399 ja TYSC401, mille *UTP5* lookusesse on viidud 6myc epitoobi järjestusega degronkassett, rajal 5 on tüvi TYSC400, mille *UTP5* lookusesse on viidud 6HA epitoobi järjestusega degronkassett. Primaarseks antikehaks kasutati 9E10.

B. Radadel 1-2 on WT tüved TYSC309 ja TYSC311, rajal 3 tüvi TYSC400, mille *UTP5* lookusesse on viidud 6HA epitoobi järjestusega degronkassett, rajal 4 tüvi TYSC399, mille *UTP5* lookusesse on viidud 6myc epitoobi järjestusega degronkassett. Primaarseks antikehaks kasutati 12CA5 antikeha. M tähistab mõlemal paneelil markerit (Protein marker prestained, Naxo).

Arvutuslikud liitvalkude suurused on Utp5-AID*-6myc korral 105,3 kDa, ning Utp5-AID*-6HA korral 100,5 kDa. Kasutati kaht erinevat primaarset antikeha: 9E10, mis on 6myc järjestusspetsiifiline, ja 12CA5, mis on 6HA järjestusspetsiifiline. Sekundaarseks antikehaks oli kitse antikeha, mis tunneb ära hiire IgG. Western blot analüüsist on näha, et transformandid, mille *UTP5* lookusesse viidi 6myc epitoobijärjestusega degronkassett, ekspresseerivad Utp5-AID* hübriidvalku (joonis 18, paneel A, rajad 3 ja 4). Transformant, mille *UTP5* lookusesse viidi 6HA epitoobijärjestusega degronkassett, ekspresseerib Utp5-AID* hübriidvalku (joonis 18, paneel B, rada 3). Lisaks sellele on näha, et kontrollitud TYSC309 ning TYSC311 ei ekspresseeri kummagi epitoobijärjestusega liitvalku (joonis 18, rajad 1 ja 2). Saadud Utp5-AID* hübriidvalku ekspresseerivad tüved nimetati TYSC399, TYSC400 ja TYSC401 ning neid kasutati edaspidises töös.

2.3.7 Utp5-AID ning OsTIR1 ekspresseeriva pärmitüve konstrueerimine

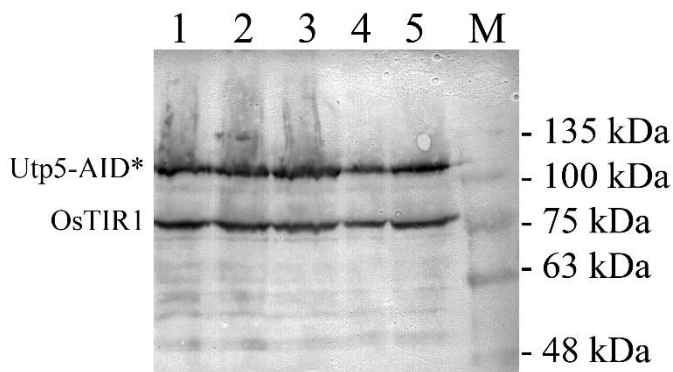
Auksiinitundliku degroni funktsioneerimiseks on rakus vajalik nii AID* järjestust sisaldavad kasseti olemasolu uuritava valgu lugemisraamis kui ka OsTIR1 ekspressioon. Utp5-AID* liitvalku ning OsTIR1 ekspresseeriva pärmitüve konstrueerimiseks ristati omavahel eelnevalt konstrueeritud Utp5-AID* hübriidvalku ekspresseeriv tüvi TYSC399 ning OsTIR1 valku ekspresseeriv tüvi TYSC351 (joonis 10).



Joonis 19. OsTIR1 ning Utp5-AID* hübriidvalku ekspresseeriva tüve tetraadide analüüs. Rakke kasvatati YPD, YPD+Hph(300mg/ml) ja SC-URA söötmetel 30°C juures 3 päeva. Punasega on märgitud edaspidises töös kasutatud tüved.

Pärast ristamist selekteeriti diploidid raku suuruse järgi. Saadud diploidid sporuleeriti ning spoorid eraldati tetraadide analüüsi abil. Utp5-AID*-6myc liitvalku ekspresseerivas tüves on olemas hügomütsiini resistentsusgeen ning *URA3* pärandub OsTIR1 valku ekspresseerivas tüves koos OsTIR1-ga. Seetõttu peab haploidne tüvi, milles on olemas mõlemad valgud, kasvama nii hügomütsiini sisaldaval söötmel kui SC-URA söötmel. Pärast tetraadide eraldamist tehti üles kasvanud kolooniatest templid ning kanti selektiivsöötmetele YPD+Hph ning SC-URA. Edaspidises analüüsiks sobisid tetraadid, kus YPD söötmel oli üles kasvanud 4 kolooniat (joonis 19, tetraadid 1, 4, 5 ja 6) ning tunnuste pärandumine oli 2:2. Edasiseks analüüsiks ei kasutatud tetraadi number 3, kuna oli näha, et teine spoor oli kasvudefektiga. Tetraadide analüüsi tulemusena saadi 6 tüve, milles on olemas nii hügomütsiini resistentsusgeen kui funktsionaalne *URA3*. Nendest tüvedest kasutati edaspidises töös esimest 5. Tüved nimetati TYSC402, TYSC403, TYSC404, TYSC405 ning TYSC406.

Utp5-AID*-6myc liitvalgu ning OsTIR1 valgu ekspressiooni analüüsiks viidi läbi Western blot analüüs. Valmistati rakulüsaadid ning viidi läbi 10% polüakrüülamiid SDS-geelelektroforees. Valgud kanti geelilt nitrotselluloosmembraanile ning inkubeeriti 9E10 antikehaga, mis on 9myc järjestusspetsiifiline ning kitse antikehaga, mis tunneb ära hiire IgG. Valkude visualiseerimiseks kasutati aluselist fosfataasi.



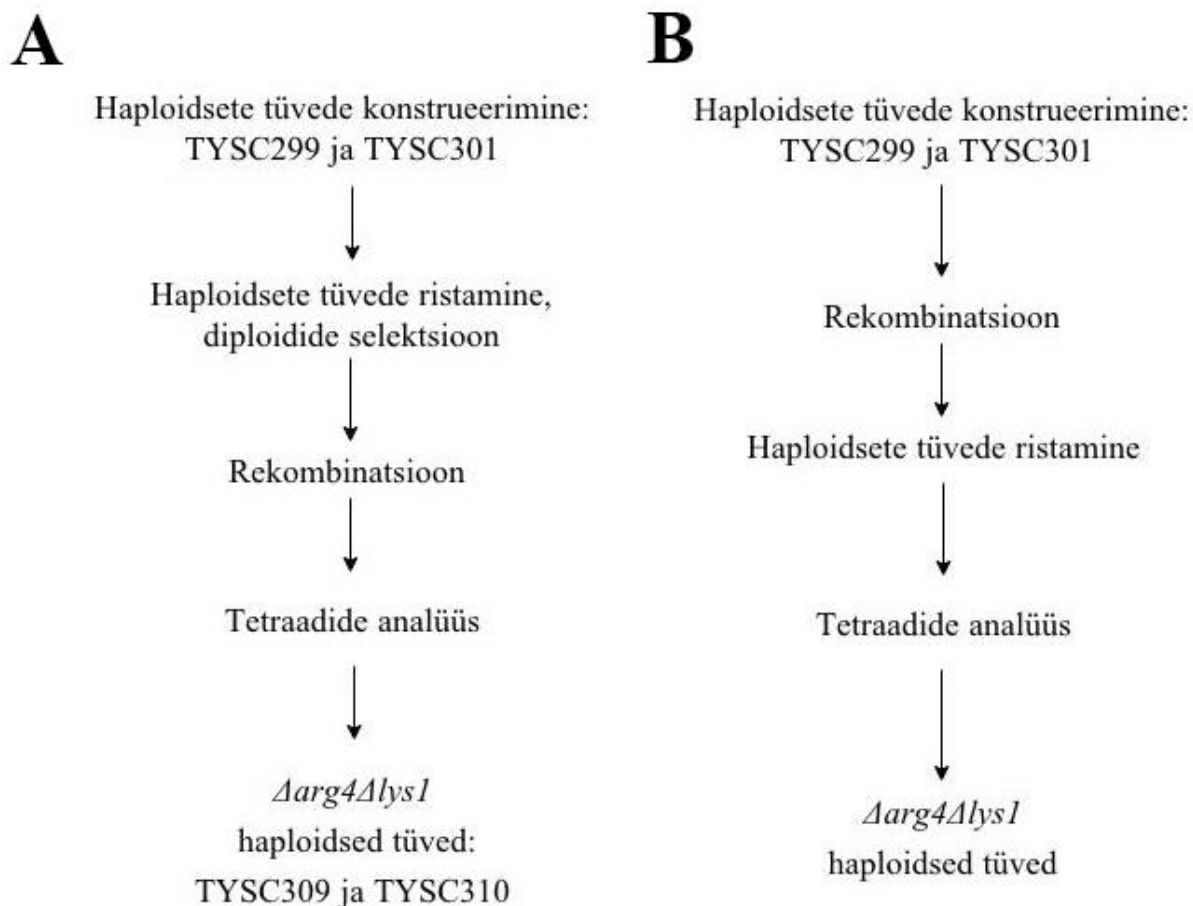
Joonis 20. OsTIR1 ning Utp5-AID* liitvalku ekspressiooni analüüs Western blot meetodil. Radadel 1-5 on tüved, mis saadi tetraadide analüüsil (TYSC402, TYSC403, TYSC404, TYSC405 ning TYSC406). Vasakul on toodud välja valgud. M tähistab markerit (Protein marker prestained, Naxo).

OsTIR1 valgu suuruseks koos epitoobi järjestusega on arvutuslikult 78,05kDa. Joonisel 20 on näha, et kõik tüved radadel 1-5 ekspresseerivad OsTIR1 valku. Utp5-AID*-6myc valgu arvutuslikuks suuruseks on 105,3 kDa. Joonisel 20 on näha, et lisaks OsTIR1 valgule ekspresseerivad kõik 5 tüve ka Utp5-AID*-6myc hübriidvalku.

2.4 Arutelu

Käesolev töö on üheks osaks suuremast, mille eesmärgiks on uurida pagaripäemi ribosoomivalkude vahetumist. Selleks kasutatakse valkude märgistamist aminohapetega, mis on märgistatud stabiilsete isotoopidega. Antud projekti käigus konstrueeriti $\Delta arg4\Delta lys1$ tüvi, mida saab tulevikus kasutada ribosoomi valkude vahetuse uurimiseks. Antud tüve konstrueerimiseks oli vaja valmistada tüvi, milles *ARG4* ja *LYS1* lookustes puuduvad markergeenid. Uute ribosoomide kokkupaneku peatamiseks kasutatakse ribosoomi biogeneesi blokeerimist. Selleks kasutatakse biogeneesi varastel etappidel oluliste valkude konditsionaalset degradatsiooni. Käesoleva töö teiseks eesmärgiks oli uurida, kas ribosoomi varasel biogeneesil olulise valgu Utp5 C-terminaalsesse otsa on võimalik integreerida degronkasset. Lisaks uuriti, kas on võimalik ekspresseerida rakus samaaegselt nii OsTIR1 kui Utp5-AID* hübriidvalku.

Esimese etapina konstrueeriti tüvi, mille *ARG4* ja *LYS1* on deleteeritud *loxP* järjestusi sisaldava *kanMX6* kassetiga. *KanMX6* markergeenist vabanemiseks kasutati Cre/Lox süsteemi. Diploidides viidi läbi rekombinatsioon, rakud sporuleeriti ning pärast sporulatsiooni viidi läbi tetraadide analüüs (joonis 21). Diploidid, milles oli läbi viidud rekombinatsioon, ei sporuleerunud hästi: nelja spoori sisaldavate askuste asemel moodustusid askused, mis sisaldasid kolm spoori. Saadud tüvede sporulatsioon oli aeglane. Tetraadide eraldamise järel selgus, et saadud spoorid ei olnud väga eluvõimelised. Katset viidi läbi kaks korda, seetõttu sai välistada, et tegu oli ühekordse veaga. Alternatiivseks meetodiks on rekombinatsioon läbi viia haploidsetes tüvedes enne ristamist ning moodustunud diploidse tüve sporulatsioon (joonis 21). Selgus, et rakud, milles rekombinatsioon viidi läbi enne ristamist, sporuleerusid paremini ning tetraadide analüüsil saadud spoorid olid eluvõimelisemad (lisa 3). Seega näitavad saadud tulemused, et kahest lookusest korraga selektsioonimarkeri välja rekombineerimine põhjustas sporulatsiooniprobleeme ning vähendas spooride eluvõimet.



Joonis 21. Cre/Lox süsteemi rakendamise 2 võimalust. A. Haploidid ristatakse, rekombinatsioon viiakse läbi diploidsetes rakkudes 2 lookuses korraga ning viiakse läbi sporulatsioon ja tetraadide analüüs. B. Rekombinatsioon viiakse läbi haploidsetes rakkudes 1 lookuses korraga ning seejärel ristatakse tüved ning viiakse läbi sporulatsioon ja tetraadide analüüs

Utp5-AID* hübriidvalgu ekspressiooni kontrolliti Western blot analüüsil. Hübriidvalgu konstrueerimisel kasutati 2 erinevat epitoobijärjestust. Arvutuslikult leitud liitvalkude suurused olid Utp5-AID*-6myc korral 105,3 kDa ning Utp5-AID*-6HA korral 100,5 kDa. Western blot analüüsi tulemusena leiti, et nii Utp5-AID*-6myc kui Utp5-AID*-6HA hübriidvalgul on funktsioneeriv epitoobi järjestus ning konstrueeritud tüved ekspresseerivad Utp5-AID* hübriidvalku. Utp5 on eluks hädavajalik valk. Seetõttu saab antud tulemustest järeldada, et degrokasseti integreerimisel Utp5 C terminaalsesse ossa on Utp5 rakus funktsionaalne.

Auksiinitundliku degronmutandi konstrueerimiseks on vajalik nii OsTIR1 kui Utp5-AID* ekspressioon samas tüves. Selleks ristati omavahel tüvi, mis ekspresseerib Utp5-AID* hübriidvalku ning tüvi, milles on OsTIR1 geen. Viidi läbi tetraadide analüüs ning saadud tüvesid analüüsiti Western blotil. Western blot analüüsi tulemusena leiti, et ka OsTIR1 valgul on

funktsioneeriv epitoobjärjestus ning konstrueeritud tüved ekspresseerisid nii Utp5-AID* hübriidvalku kui OsTIR1 valku. Antud tulemuste põhjal võib ka väita, OsTIR1 valk ei interakteeru rakus Utp5-AID* hübriidvalguga kui kasvukeskkonda ei ole lisatud auksiini.

Edaspidi on vaja kontrollida, kas konstrueeritud tüves degradeeritakse Utp5 valk auksiini lisamisel kasvukeskkonda. Utp5 degradatsiooni rakus saab kontrollida katsega, mille käigus lisatakse eksponentsiaalses kasvufaasis olevatele rakkudele auksiini ning rakud eraldatakse mitmes ajapunktis. Rakkudest tehakse lüsaadid ning Utp5 valgu olemasolu uuritakse Western blot analüüsil. Fenotüübi võrdlemiseks metsiktüüpi tüvedega tuleks degronmutandid külvata tilk-külv meetodil YPD tassidele ning YPD söötmele, mis sisaldab auksiini, et uurida, kas degronmutandi kasv erineb metsiktüüpi tüvede kasvust.

Utp5 valk on ribosoomi väikese subühiku protsessosoomi valk. Juhul, kui Utp5 valku auksiini lisamisel kasvu keskkonda ei degradeerita, on võimalik degronmutante konstrueerida ka teistest väikese subühiku protsessosoomi eluks hädavajalikest valkudest. Sellisteks valkudeks on näiteks Rrp7, Utp1, Utp4, Utp8, Utp9, Utp10, Utp15 ja Utp17. Lisaks on võimalik konstrueerida tüvi, milles on rohkem kui ühe valgu lugemisraami viidud degronkasset. Nii saab ribosoomi biogeneesi peatada mitme väikese subühiku protsessosoomi valgu konditsionaalsel degradeerimisel.

KOKKUVÕTE

Käesolev töö on väiksem osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on uurida ribosoomi valkude vahetust pagaripärmis. Antud töö eesmärkideks oli konstrueerida *Δarg4Δlys1* tüvi, mille *ARG4* ja *LYS1* lookustes puuduvad markergeenid, ning uurida, kas Utp5 valgu C-terminaalsesse ossa on võimalik lisada degronkasset. Lisaks uuriti, kas on võimalik OsTIR1 ning Utp5-AID* valkude ekspressioon samas tüves. Kõigepealt konstrueeriti *Δarg4Δlys1* tüvi, mida saab tulevikus kasutada massispektromeetriaks. Seejärel konstrueeriti pagaripärmi auksiinitundlik degronmutant, mis ekspresseeris nii OsTIR1 kui Utp5-AID* hübriidvalku.

Δarg4Δlys1 tüve konstrueerimisel selgus, et Cre/Lox süsteemi kasutamisel rekombinatsiooni läbiviimine kahes lookuses korraga põhjustab sporulatsiooniprobleeme. Seda järeldati, kuna diploidsed rakud, milles rekombinatsioon viidi läbi kahes lookuses korraga, ei sporuleerunud hästi ning tetraadide analüüsil saadud spoorid ei olnud eluvõimelised. Võrdluseks olid haploidid, milles rekombinatsioon viidi läbi ühes lookuses korraga ning ristati pärast rekombinatsiooni. Sellised diploidid sporuleerusid paremini ning tetraadide analüüsil saadud spoorid olid elujõulisemad.

Pagaripärmi auksiinitundliku degrontüve konstrueerimisel leiti, et Utp5 valgu funktsioon rakus ei ole häiritud, kui valgu C terminaalssesse ossa viidi degronkasset. Selline tulemus oli oluline, kuna Utp5 on rakus hädavajalik valk ning tema funktsiooni kadumisel rakud surevad. Western blot analüüsi tulemusena leiti, et konstrueeritud tüvi ekspresseeris Utp5-AID* hübriidvalku. Auksiinitundliku degronmutandi funktsioneerimiseks oli vajalik ka OsTIR1 valgu ekspressioon rakus. Western bloti tulemusena leiti, et konstrueeritud auksiinitundlikus degronmutandis ekspresseeriti nii OsTIR1 kui Utp5-AID* hübriidvalku.

The construction of OsTIR1 and Utp5-AID* expressing *S. cerevisiae* strain

Kristiina Raja

SUMMARY

Ribosomes are universally conserved enzymes that conduct protein synthesis. Although eukaryotic and prokaryotic ribosomes differ in structure, the core structure of ribosomes is conserved throughout the domains of life. In eukaryotes the ribosome biogenesis takes place in different compartments of the cell. Ribosome biogenesis starts in the nucleus where the early rRNA processing takes place. Late steps of the ribosome maturation take place in cytoplasm. Approximately 20% of budding yeast genes are required for viability. Many of them are involved in ribosome biogenesis. There are different methods for studying the functions of essential proteins. Classical method is to use conditional mutants. Other methods include the Anchor-Away technique, the regulation of protein activity by a hormone binding domain and temperature or auxin induced degradation of the protein.

This thesis was a smaller part of a bigger project that studies the substitution of the proteins in the *S. cerevisiae* ribosome. The first aim of this thesis was to construct a $\Delta arg4\Delta lys1$ strain that does not have selection markers in *ARG4* and *LYS1* loci. The second aim of this thesis was to study if it is possible to integrate a degron cassette to the C terminal region of Utp5. The third aim of this thesis was to study if Utp5-AID* fusion protein and OsTIR1 protein can be expressed in the same strain.

Firstly, the $\Delta arg4\Delta lys1$ strain was constructed. For $\Delta arg4\Delta lys1$ strain construction *ARG4* and *LYS1* genes were deleted with a DNA cassette that consisted of a *kanMX6* selection marker with *loxP* sites in both ends. Cre/Lox system was used to get rid of the selection marker. It was discovered that conducting recombination in two loci at once prevents formation of tetrads. In addition, it was discovered that after tetrad dissection the spores were not very viable.

Secondly, the strain that expressed OsTIR1 and Utp5-AID* fusion protein was constructed. First, the degron cassette was integrated into the *UTP5* locus. The protein expression was examined in Western blot analysis. It was shown that Utp5 remained its function in the cell because the cells were viable. The second step was constructing a strain that expressed Utp5-AID* fusion protein as

well as OsTIR1 protein. The protein expression was examined in Western blot analysis. It was found that the newly constructed degraon strain expressed OsTIR1 protein as well as Utp5-AID* fusion protein. This result indicated that OsTIR1 doesn't interact with Utp5-AID* without auxin.

KIRJANDUSE LOETELU

1. Agdhasi, B., Ye, K., Resnick, A., Huang, A., Ha, H. C., Guo, X., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Solomon H. Snyder, S. H. (2001) FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle. *PNAS*. 98(5):2425-2430.
2. Ban, N., Beckmann, R., Doudna Cate, J. H., Dinmann, J. D., Dragon, F., Ellis, S. R., Laftontaine, D. L. J., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J. M., McAlear, M. A., Moore, P. B., Noller, H. F., Ortega, J., Panse, V. G., Ramakrishnan, V., Spahn, C. M. T., Steitz, T. A., Tchorzewski, M., Tollervey, D., Warren, A. J., Williamson, J. R., Wilson, D., Yonath, A. and Yusupov, M. (2014) A new system for naming ribosomal proteins. *Current opinion in structural biology*. 24:165-169.
3. Bax, R., Vos, H. R., Raué, H. A., Vos, J. C. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* Sof1p Associates with 35S Pre-rRNA Independent from U3 snoRNA and Rrp5p. *Eukaryotic Cell*. 5:427-434.
4. Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G. and Yusupov, M. (2011) The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*. 334:1524-1529.
5. Clemons, W. M. Jr, May, J. L. C., Wimberly, B. T., McCutcheon, J. P., Capel, M. S. and Ramakrishnan, V. (1999). Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature*. 400:833-840.
6. Dohmen, R.J., Wu, P., and Varshavsky, A. (1994). Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants. *Science* 263:1273-1276
7. Dragon, F., Gallagher, J. E. G., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlagek, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyer, A. L., Hunt, D. F., Baserga, S. J., (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417:967-970.

8. Dresios, J., Panopoulos, P. and Synetos, D. (2006) Eukaryotic ribosomal proteins lacking a eubacterial counterpart: important players in ribosomal function. *Molecular Microbiology*. 59(6): 1651-1663.
9. Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Kühn, H., Neueder, A., Jakob, S., Herbert Tschochner, H., Milkereit, P. (2007). Analysis of the In Vivo Assembly Pathway of Eukaryotic 40S Ribosomal Proteins. *Molecular Cell*. 28(3):446-457.
10. Gallagher, J. E. G., Dunbar, D. A., Granneman, S., Mitchell, B. M., Osheim, Y., Beyer, A. L., Baserga, S. J., (2004). RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes & Development* 18:2506-2517.
11. Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H. and Oliver S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274: 546-567
12. Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., Hegemann, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research*. 24(13):2519-2524.
13. Hampsey, M. (1997). A Review of Phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 13:1099-1133.
14. Haruki, H., Nishikawa, J. and Laemmli, U.K. (2008) The anchor-away technique: rapid, conditional establishment of yeast mutant phenotypes. *Molecular Cell*. 26(31):925-32.
15. Jenner, L., Melnikov, S., Garreau de Loubresse, N., Ben-Shem, A., Iskakova, M., Urzhumtsev, A., Mesklauskas, A., Dinman, J., Yusupova, G. and Yusupov, M. (2012) Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Current opinion in structural biology*. 22:1-9.

16. Kanemaki, M., Sanchez-Diaz, A., Gambus A. and Labib, K. (2003) Functional proteomic identification of DNA replication proteins by induced proteolysis in vivo. *Nature* 423:720-724
17. Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S. and Ban, N. (2011) Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science*. 334:941-949.
18. Kruiswijk, T., Kunst, A., Planta, R. J., Mager, W. H. (1978). Modification of Yeast Ribosomal Proteins. *Biochemical Journal*. 175:221-225.
19. Lööke, M., Kristjuhan, K., Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR based applications. *Biotechniques*. 50(5): 325-328.
20. Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature structural and molecular biology*. 19(6):560-567.
21. Morawska, M. and Ulrich, H. D. (2013). An expanded tool kit for the auxin-inducible degron system in budding yeast. *Yeast*. 30(9):341-351.
22. Ong, SE., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A. and Mann, M. (2002). Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. 1(5): 376-86.
23. Picard, D. (2000) Posttranslational regulation of proteins by fusions to steroid-binding domains. *Methods in Enzymology*. 327. 385-401.
24. Pratt, W. B and Welsh, M. J. (1994) Chaperone functions of the heat shock proteins associated with steroid receptors. *Cell Biology*. 5. 88-93.

25. Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S.F., Haag, A. and Ban, N. (2011) Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science*. 331. 730-736.
26. Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*. 108: 557-572.
27. Ramakrishnan, V. and Moore, P. B. (2001). Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Current Opinion on Structural Biology*. 11: 144-154.
28. Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., Marchesi, V. and Labib, K. (2004). Rapid Depletion of Budding Yeast Proteins by Fusion to a Heat-Inducible Degron. *Science's STKE*, p18
29. Savenau, C., Namane, A., Gleizes, P. E., Lebreton, A., Rousselle, J. C., Noaillac-Depeyre, J., Gas, N., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2003). Sequential Protein Association with Nascent 60S Ribosomal Particles. *Molecular and Cellular Biology*. 23:13. 4449-4460.
30. Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol*. 350, 3-41.
31. Varshavsky, A. (2011) The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Science*. 20. 1298-1345.
32. Wilson. D. N. and Doudna Cate, J. H. (2012) The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1-13.
33. Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Doudna Cate, J. H. and Noller, H. F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5,5 Å resolution. *Science*. 292. 883-896.

Raamatud:

1. Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). SDS-polyacrlamide gel electrophoresis of proteins. A8.43 *In* Sambrook, J., Russell, D. W. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press

LISAD

Lisa 1. Töös kasutatud bakteri söötmete koostised

Luria-Betan (LB)

Komponent	Sisaldus
Agar	15g/l
Bacto pärmiekstrakt	0,5%
NaCl	0,5%
Trüptoon	1%

Lisa 2. Töös kasutatud pärmis söötmete koostised

Tahke söötme jaoks lisati agarit 20g/l kohta

YPD

Komponent	Sisaldus
<i>Bacto</i> peptoon	2%
<i>Bacto</i> pärmiekstrakt	1%
Glükoos	2%

YPRaf

Komponent	Sisaldus
<i>Bacto</i> peptoon	2%
<i>Bacto</i> pärmiekstrakt	1%
Raffinoos	3%

SC-URA

Komponent	Sisaldus
Glükoos	2%
Aminohapete segu, kust puudub uratsiil	0,2%
Pärmi lämmastikaluste segu	0,67%

SC-ARG

Komponent	Sisaldus
Glükoos	2%
Aminohapete segu, kust puudub arginiin	0,2%
Pärmi lämmastikaluste segu	0,67%

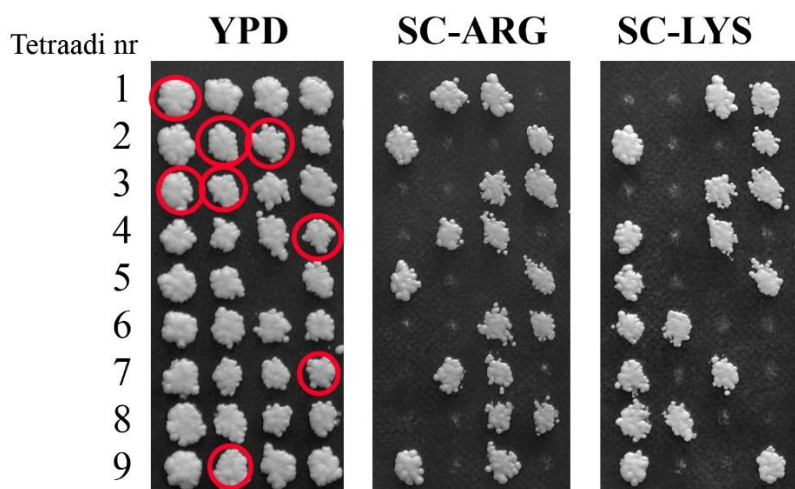
SC-LYS

Komponent	Sisaldus
Glükoos	2%
Aminohapete segu, kust puudub lüsiin	0,2%
Pärmi lämmastikaluste segu	0,67%

Sporulatsioonisööde

Komponent	Sisaldus
K-atsetaat	0,3%
Raffinoos	0,2%

Lisa 3. Haploidides läbi viidud rekombinatsiooni järel saadud diploidide tetraadide analüüs



Tetraadide analüüsi viis läbi T. Tamm. Punasega on märgitud kolooniad, mis on $\Delta arg4 \Delta lys1$ mutandid.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Kristiina Raja

(sünnikuupäev: 15.08.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose OsTIR1 ja Utp5-AID* valke ekspresseeriva pagaripärmi tüve konstrueerimine,

mille juhendaja on Tiina Tamm,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **25.05.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015