

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion Matemaattis-luonnontieteellinen		Laitos – Institution Biotieteiden laitos	
Tekijä – Författare Pia Rydman			
Työn nimi – Arbetets titel Uusien PRD1-bakteriofaagille välttämättömien proteiinien tunnistus amber-mutanttien avulla; gpp ja gpc toimivat kapsidin ja pentoniulokkeen muodostuksessa.			
Oppiaine – Läroämne Perinnöllisyystiede			
Työn laji – Arbetets art Pro gradu		Aika - Datum Syyskuu 1997	Sivumäärä – Sidoantal 60
Tiivistelmä – Referat			
<p>PRD1 on monia Gram-negatiivisia bakteerilajeja infektoiva Tectiviridae-heimoon kuuluva bakteriofaagi. Virioni koostuu kaksisäikeistä DNA-genomia ympäröivästä ikosahedraalisesta proteiinkapsidista, jonka sisäpinnan äärioviivoja myötäilee lipidikalvo. Genomin 5'-päissä on kovalenttisesti kiinnittyneinä terminaaliset proteiinit, jotka toimivat DNA-replikaation alukkeina.</p> <p>PRD1:n genomi on sekvensoitu ja se sisältää kaikkiaan 49 avointa lukukehystä (ORF), joista noin kolmenkymmenen uskotaan ohjaavan proteiinisynteesiä. Geenien kartoituksessa ja niiden biologisen toiminnan selvittämisessä on käytetty apuna PRD1:n amber-mutantteja. Käytettävissä olevien mutanttien geenivirheet sisältyivät kuitenkin vain seitsemääntoista komplementaatioryhmään, ja varsinkaan pieniin avoimiin lukukehyksiin ei mutaatioita ole osunut, joten lukukehysten merkitys viruksen toiminnalle on jäänyt epäselväksi.</p> <p>Työn tarkoituksena oli tuottaa NTG-mutageneesin avulla PRD1:n amber-mutantteja, kartoittaa mutaatioiden sijainti faagigenomissa komplementaatiotestausten avulla ja analysoida mahdollisesti uusiin geeneihin osuneiden mutaatioiden vaikutuksia faagin rakenteeseen ja toimintaan. Komplementaatiotestauksia varten viruksen geenejä ja avoimia lukukehyksiä kloonattiin plasmideihin, jotka transformoitiin kartoitukseen sopivaan bakteerisäntään. Löydetyistä uusista mutanteista tutkittiin niiden partikkelinmuodostuskykyä sakkaroosigradienttisentrifugoinnilla sekä elektronimikroskooppisilla menetelmillä, minkä lisäksi mutanttivirusen proteiinikoostumusta selvitettiin SDS-PAGE-proteiinigeelissä ja osa mutanttigeeneistä sekvensoitiin.</p> <p>Kaikkiaan NTG-mutageneesi tuotti 248 mutanttia, joista 113 saatiin kartoitettua tietylle alueelle PRD1:n genomiin. Mutaatiot osuivat enimmäkseen geeneihin, joihin mutantteja oli jo olemassa. Mutaatioita kartoittui kuitenkin myös kahteen uuteen avoimeen lukukehykseen, ORF p:hen ja ORF c:hen. Geenituotteiden (gene product, gp) gpp tai gpc puuttumista ei voitu kuitenkaan havaita proteiinigeelissä niiden pienen koon takia. Viiden mutantin geenivirheet kartoituivat ORF p:hen. Näiden mutaatioiden sijainti avoimessa lukukehyksessä vahvistettiin sekvensoimalla. Sekä täysien virusten vyöhykkeen puuttuminen sakkaroosigradientista että elektroni-mikroskooppikuvissa havaitut epätäydelliset viruspartikkelit osoittavat, että mutantti ei kykene normaaliin partikkelinmuodostukseen. Tämä tarkoittaa, että ORF p:n geenituote joko on kapsidin rakenteellinen osa tai tarvitaan sen kokoamiseen. PRD1 <i>sus525</i>-mutantin geenivirhe kartoittui avoimeen lukukehykseen c. Täysien partikkelien vyöhykkeen koon väheneminen sakkaroosigradientissa osoittaa, että mutantti ei kykene pakkaamaan DNA:ta tyhjiin partikkeleihin yhtä tehokkaasti kuin villityyppinen virus. SDS-PAGE-proteiinigeelissä voidaan havaita, että mutanttipartikkeleissa viruksen adsorptiossa tarvittavan pentoni-ulokkeen muodostavien proteiinien P2:n ja P5:n määrät ovat vähentyneet. Tämä viittaa gpc:n toimintaan ulokkeen muodostuksessa.</p>			
Avainsanat - Nyckelord PRD1-bakteriofaagi, amber-mutantti, komplementaatiokartoitus, partikkelinmuodostus			
Säilytyspaikka - Förvaringställe Perinnöllisyystieteen osaston kirjasto			
Muita tietoja			