

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR-JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ÜLDISE- JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Aivar Meldre

Potentsiaalsete replikatsioonis osalevate valkude deletsiooni mõju mitokondriaalse DNA
stabiilsusele ja hulgale

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendaja PhD Tiina Sedman

TARTU 2017

INFOLEHT

Potentsiaalsete replikatsioonis osalevate valkude deletsiooni mõju mitokondriaalse DNA stabiilsusele ja hulgale

Valgud Rpo41 (*RNA polymerase*), Mgm101 (*mitochondrial genome maintenance*) ja Mhr1 (*mitochondrial homologous recombination*) on vajalikud mitokondriaalse DNA (mtDNA) stabiilsuseks, kuna nende valkude deletsioon viib mtDNA kadumiseni või fragmenteerumiseni metsiktüüpi (ρ^+) rakkudes. Pagaripärmis toimuva mtDNA replikatsiooni kohta on välja pakutud kaks hüpoteesi: transkriptsioon-sõltuv ning rekombinatsioon-sõltuv replikatsioon. Mitokondriaalsel replikatsioonil osalevate valkude deletsioonist tingitud fenotüüpi saab uurida ρ^- pärmitüvedes, sest kirjanduse põhjal on teada, et ρ^- mutandid on võimelised säilitama mitokondriaalset genoomi erinevate mtDNA stabiilsuse eest vastutavate valkude puudumise korral. Käesolevas töös kasutati nende valkude deletsiooni mõju uurimiseks tüve HSp⁻ a1184.

Märksõnad: mitokondriaalne DNA, valk Rpo41, valk Mgm101, valk Mhr1, mtDNA stabiilsus, pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae*, ρ^- mutant

CERCS kood: P320 (Nukleiinhappe süntees, proteiini süntees)

Effects on maintenance and volume of mitochondrial DNA caused by the deletion of potential replicational proteins

Proteins Rpo41 (*RNA polymerase*), Mgm101 (*mitochondrial genome maintenance*) and Mhr1 (*mitochondrial homologous recombination*) are essential for the maintenance of the mitochondrial genome (mtDNA), for the deletion of any of these proteins lead to either fragmentation or complete loss of mtDNA in wild-type (ρ^+) cells. Hypothetically, mtDNA replication in yeast can occur either transcription-dependently or recombination-dependently. The three given proteins and the phenotypes caused by their deletions can be studied in ρ^- yeast strains, for the deletion in ρ^- mutants does not lead to the fragmentation/complete loss of mtDNA. In given study, a hypersuppressive strain, HSp⁻ a1184, is used.

Keywords: mitochondrial DNA, protein Rpo41, protein Mgm101, protein Mhr1, mtDNA stability, baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, ρ^- mutant

CERCS code: P320 (Nucleic acid synthesis, protein synthesis)

SISUKORD

Sisukord.....	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Pagaripärm <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
1.2 Mitokonder.....	7
1.3 Mitokondriaalne DNA	8
1.4 Hingamismutandid pagaripärmis	9
1.5 Replikatsioonimudelid pagaripärmis	10
1.6 Mitokondriaalse DNA stabiilsust mõjutavad valgud.....	11
1.6.1 Valk Rpo41	14
1.6.2 Valk Mgm101	14
1.6.3 Valk Mhr1	15
2 EKSPERIMENTAALOSA	17
2.1 Töö eesmärgid.....	17
2.2 Materjal ja meetodika	17
2.2.1 Töös kasutatud pärmitüved ja söötmed.....	17
2.2.2 Töös kasutatud plasmiidid, praimerid ja PCR reaktsioonid.....	20
2.2.3 PCR produkti puhastamine.....	25
2.2.4 DNA transformatsioon <i>S. cerevisiae</i> 'sse kasutades LiOAc meetodit.....	26
2.2.5 DNA eraldus LiOAc meetodil (Lõoke <i>et al.</i> , 2011).....	28
2.2.6 <i>S. cerevisiae</i> genoomse DNA eraldamine	28
2.2.7 DNA restriksioon	30
2.2.8 Southern blot	30
2.2.9 Pagaripärmi rakkude värvimine DAPI meetodil.....	33
2.3 Tulemused ja arutelu.....	34
2.3.1 Töös kasutatud pärmitüvede valmistamine	34
2.3.2 a1184 tüvede Δ rpo41, Δ mgm101, Δ mhr1 ja Δ ste5 mtDNA analüüs.....	36
2.3.3 a1184 topeltmutantide mtDNA analüüs	38
2.3.4 a1184 topeltmutantide mtDNA hulga kvantitatiivne analüüs	42
2.3.5 Arutelu.....	49
KOKKUVÕTE.....	52
RESUME.....	53
Tänuõnad.....	55
KASUTATUD KIRJANDUS	56

LISAD	64
LIHTLITSENTS.....	71

KASUTATUD LÜHENDID

DSB – kaheaahelaline katke DNA ahelas (*double-stranded break*)

dsDNA – kaksikahelaline DNA (*double stranded DNA*)

EtBr – etiidiimbromiid

Hph – hügomütsiin B (antibiootikum)(*hygromycin*)

HS ρ^- - hüpersupressiivne pärmitüvi (*hypersuppressive*)

Kb – tuhat aluspaari (*kilo basepair*)

LiOAc – liitiumatsetaat (*lithium acetate*)

mtDNA – mitokondriaalne DNA (*mitochondrial DNA*)

N ρ^- – neutraalne pärmitüvi (*neutral*)

Nt – nukleotiid (*nucleotide*)

ORF – avatud lugemisraam (*open reading frame*)

Ori – replikatsiooni alguspunkt (*origin of replication*)

RC – veereva ratta mudel (*rolling circle*)

$\rho(\text{rho})^-$ – pärmitüvi, millel on säilinud, kuid mitte funktsionaalne mtDNA

$\rho(\text{rho})^0$ – pärmitüvi, millel on täielikult kadunud mtDNA

$\rho(\text{rho})^+$ – pärmitüvi, millel on funktsionaalne mitokondriaalne DNA (fenotüübilt metsiktüüpi)

S ρ^- – supressiivne pärmitüvi (*suppressive*)

ssDNA – üksikahelaline DNA (*single stranded DNA*)

Wt – metsiktüüpi pärmitüvi (*wild-type*)

YPD – glükoosi sisaldav sööde (*yeast extract peptone dextrose*)

SISSEJUHATUS

Pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* väiksed mõõtmed, lihtne kultiveeritavus ning võime ilma mitokondrita hakkama saada teevad temast ideaalse mudelorganismi, uurimaks mitokondrit ja sellega seonduvaid protsesse. Mitokondri on organell, mis võimaldab eukarüootsetes rakkudes oksüdatiivset fosforülatsiooni, varustades seega eukarüootset rakku energiaga. Funktsionaalne mitokondri eeldab funktsionaalset mitokondriaalset DNA-d (mtDNA), mis kodeerib hingamisahela toimimiseks vajalikke valke. Mitokondriaalse DNA säilimise alusel jaotatakse pagaripärm ρ^+ , ρ^- ja ρ^0 (rho) tüvedeks, milles on vastavalt: funktsionaalne mtDNA, mittefunktsionaalne, kuid säilinud mtDNA ning täielikult puuduv mtDNA.

Minu töös püstitatud probleemiks oli: kas ja millised valgud osalevad mtDNA replikatsioonil. Kuna ajalooliselt on püstitatud kaks hüpoteetilist mtDNA replikatsioonimehhanismi *S. cerevisiae*'s – transkriptsioon-sõltuv ja rekombinatsioon-sõltuv. Minu töö eesmärgiks oli deleteerida kolm potentsiaalselt replikatsioonil osalevat valku algtüvest HSp⁻ a1184. Nendeks valkudeks olid: Rpo41, Mgm101 ja Mhr1. Seejärel analüüsisin mtDNA säilivust *Southern blot* meetodil.

Valk Rpo41 on mitokondriaalne RNA polümeraas, mis võib osaleda transkriptsiooni põhisel DNA replikatsioonil ja on seega oluline mtDNA säilitamisel (Graves *et al.*, 1998).

Valk Mgm101 osaleb mtDNA säilitamises, seda mtDNA replikatiivsetes ja reparatiivsetes protsessides osalemisega. On näidatud, et Mgm101 võib osaleda kaheaahelaliste DNA katkete (DSB, *double strand break*) parandamisel ja telomeeride elongatsioonil kromosoomi replikatsioonil (Rendeková *et al.*, 2016).

Valk Mhr1 on vajalik mtDNA säilitamiseks, osaledes potentsiaalselt homoloogial põhineva replikatsiooni initsiatsioonil. Mhr1 kadumisel kaob ka võime kokku viia homoloogseid DNA kaksikahelaid (Ling & Shibata, 2002).

Bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida valkude Mhr1, Mgm101 ja Rpo41 deletsiooni mõju mitokondriaalse DNA säilimisele ja hulgale pärimitüves HSp⁻ a1184.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae*

Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* on seente riiki (*Fungi*) kuuluv 5-10µm läbimõõduga eukariootne ainurakne organism, mis on võimeline reprodutseeruma nii suguliselt, kui suguta. Pagaripärm on fakultatiivne anaeroob, olles võimeline elama ilma funktsionaalse hingamisahelata, kasutades energia saamiseks glükolüüsi. Väiksed mõõtmed, lihtne ning mugav kultiveeritavus ja lühike generatsiooniaeg (~100 minutit optimaaltingimustes) teevad temast suurepärase uurimismudeli, uurimaks eukariootsete protsesside seas ka mitokondriaalset DNA-d (mtDNA) ning sellega seonduvaid protsesse (Herskowitz, 1988). Pagaripärm oli esimene eukarioot, kelle genoom sekveneeriti täielikult 1996. aastal (Goffeau *et al.*, 1996). Tema genoom on ~12Mb ning kodeerib umbes 6000 geeni, kusjuures ka mtDNA on täielikult sekveneeritud ning geenid identifitseeritud (Foury *et al.*, 1998).

1.2 Mitokonder

Mitokonder on organell, mis on omane ainult eukariootsetele rakkudele. Mitokondri üks tähtsamaid funktsioone on ATP tootmine läbi oksüdatiivse fosforülatsiooni, milles osalevaid valke kodeerib mitokondri oma genoom – mtDNA. Samuti kodeerib see mtDNA ka ribosomaalseid valke, rRNA-d ning tRNA-d (Chakraborty *et al.*, 2016).

Oksüdatiivne fosforüleerimine ehk OXPHOS (*oxidative phosphorylation*) on süsteem, mis koosneb neljast elektrontranspordi kompleksist - I, II, III ja IV, koensüüm Q-st ning tsütokroom *c*-st. Samuti kuulub süsteemi F₁F₀-ATPaas, mida loetakse viiendaks kompleksiks (V). Need kompleksid asuvad mitokondri sisemembraanis ning osalevad ATP sünteesil läbi aeroobse hingamise (Barrientos *et al.*, 2009).

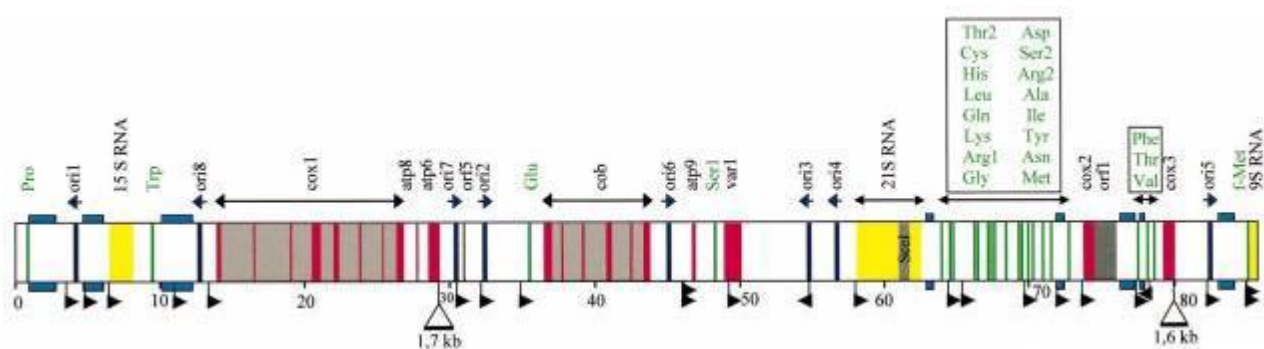
Mitokondrid on peale ATP sünteesi seotud nii rakusise signalisatsiooni, raku diferentseerumise ning apoptoosi ehk kontrollitud rakusurma mehhanismidega ja ka rakutsükli- ja kasvu kontrolliga (McBride *et al.*, 2006). Elektronülekandeahelas tekitatud prootongradienti on vaja ka valkude mitokondrisse importimisel (Geissler *et al.*, 2000). Mitokondritel on oluline roll ka Fe-S klastrite kokkupanemisel mitokondris. Fe-S klastrid on olulised oksüdatiivsel fosforüleerimisel, hapnikuradikaalide moodustamisel ja biosünteesis osalemisel väävel- doonorina ning ka raua homöostaasi säilitamisel rakus (Stehling & Lill, 2013). Samuti toimub mitokondris rasvhapete metabolism (β -oksüdatsioon) ning urea tsükkel (Yogev *et al.*, 2010).

1.3 Mitokondriaalne DNA

Pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* mtDNA on ~85kb suurusega, kodeerides 8-t valku: tsütokroom *c* oksüdaasi subühiku valgud I, II ja III (*cox1*, *cox2* ja *cox3*), ATP-süntaasi subühiku valgud 6, 8 ja 9 (*atp6*, *atp8* ja *atp9*), ribosomaalne valk Var1 (*var1*) ning apotsütokroom *b* valk (*cytb*). Lisaks sellele kodeeritakse 21S ja 15S ribosomaalseid RNA-sid, 24 tRNA-d ning 9S RNA sub-ühikut valgu RNase P jaoks. Samuti on pagaripärmi mtDNA-s sõltuvalt tüvest 7-8 hüpoteetilist ORI-regiooni (*origin of replication*), mis sisaldavad tavaliselt kolme G/C-rikast blokki: A, B ja C-*box*, mis funktsioneerivad transkriptsioonifaktorite seondumissaitidena (Foury *et al.*, 1998). Ori-regioonidest peetakse aktiivseteks vaid kolme: *ori2*, *ori3* ja *ori5*.

Pärmi mtDNA on palju suurem (~85 kb), kui näiteks imetajate oma (~16 kb). Pagaripärmi mtDNA-st suure osa moodustavad mittekodeeritavad alad (nitronid) ja kordusjärjestused (Ling *et al.*, 2000). Inimese mtDNA on kõigest 16,5kb, kuid kodeerib 13 valku, 22tRNA-d ning 2 kahte rRNA-d (Shadel, 1999). Seega kodeerib pärmi mtDNA hoolimata oma suurusest vähem valke, kui inimese mtDNA. Pagaripärmi DNA moodustab arvatavasti umbes 15% kogu DNA hulgast rakus ning seda võib olla ühes rakus enam kui 50 koopiat (Williamson, 2002). Mitokondris on DNA pakitud nukleoididesse - valk-DNA kompleksidesse, millest igas on tavaliselt kuni 10 koopiat mtDNA-d (Osman *et al.*, 2015). Need nukleoidid on 20-50nm läbimõõduga (Zuo *et al.*, 2002).

Lisaks geenivaesusele on pärmi mtDNA adenosiini-tümidiini (A-T) rikas (ligi 70%), kusjuures enamasti on need, geenivaesed A-T rikkad järjestused paarsada nukleotiidi pikad ning nende vahel asuvad 10-80 nukleotiidised guanosiini-tsütidiini (G-C) rikkad alad (Foury *et al.*, 1998).



Joonis 1. Foury ja kaasautorite poolt sekveneeritud mtDNA tüvest FY1679. Pilt on kujutatud lineaarsel kujul. Punasega on tähistatud eksonid ja valke kodeerivad geenid; halliga on tähistatud intronid ning intronitega seotud ORF-id; rohelisega tähistatud tRNA-d; kollasega 9S, 15S ja 21S RNA-d; tumesiniseega on tähistatud *ori* elemendid; helesiniseega on tähistatud antud artiklis mtDNA sekvenerimise käigus täidetud lüngad; seest valged kolmnurgad (Δ) tähistavad vastavalt deletsioone 1,7kb ja 1,6kb positsioonides 29295 ja 80030; Mustad kolmnurgad tähistavad transkriptsiooni

initsiatsioonisaite ning kolmnurkade suund tähistab transkriptsiooni suunda (neid on 19). Märkitud on ka mtDNA poolt kodeeritavad 8 valku (*cox1*, *cox2*, *cox3*, *atp6*, *atp8*, *atp9*, *cytb* ja *var1*). Joonisel on toodud ka *ori* regioonid (7), rRNA-d (15S RNA ja 21S RNA), 24tRNA-d ja RNAas P 9S komponent (9S RNA)(Foury *et al.*, 1998).

Lisaks eelnevatele erinevustele imetajate mtDNA-ga on pärmide ja taimede mtDNA tavaliselt lineaarne, samas, kui imetajate oma on tsirkulaarne (Shadel, 1999). Sellegipoolest ei esine pagaripärmi mtDNA ühe, lineaarse, sirge molekulina, vaid konkatemeerina, mis koosneb paljudest DNA koopiatest, mis on omavahel ots-otsaga ühenduses (Maleszka *et al.*, 1991) ning mille moodustamises võib osaleda hüpoteetiliselt valk Mhr1 (Ling & Shibata, 2004).

1.4 Hingamismutandid pagaripärmis

Laboris kasutatavatel *Saccharomyces cerevisiae* tüvedel esineb loomulikult 1% sagedusega *petite* fenotüübi nähtus, mis tähendab, et mtDNA on ebafunktsionaalne kas tuuma poolt tingitud mõjutustest või mtDNA defektsusest. Neis rakkudes on osa või kogu mtDNA genoomist on kaduma läinud (Fangman *et al.*, 1989). Kuna defektse mtDNA puhul tekkinud mutante nimetatakse *rho*-mutantideks, nimetatakse pagaripärmi mtDNA-d ka *rho*-faktoriks (Williamson, 2002). Hoolimata defektsest hingamisahelast on pagaripärm võimeline elus püsima ilma funktsionaalse mtDNA-ta, eeldades, et keskkonnas on saadav kääritatav süsinikuallikas (nt glükoos)(Heude *et al.*, 1979).

Selliste *petite* mutantide seas eristatakse nii ρ^- , kui ρ^0 rakke, milles on vastavalt kadunud kas mingi osa mtDNA-st või kogu mtDNA. ρ^- -mutantides on säilinud võime replitseerida allesjäänud mtDNA fragmenti, mis, nagu käesolevast töös, võib olla ka vaid ~1kb suurune. Kuigi ρ^- -rakkudes säilinud mtDNA fragment võib olla märkimisväärselt väiksem, kui seda on metsiktüüpi (ρ^+) rakkudel. Siiski on täheldatud, et ρ^- -mutantides toimub mtDNA võimendamine (koopjaarvu suurendamine) ligikaudselt selle mahuni nagu seda on metsiktüüpi rakkude mtDNA (MacAlpine *et al.*, 2001). Hoolimata sellest, et ρ^- puhul võib olla säilinud mtDNA fragment stabiilne, ei ole see võimeline toetama hingamist.

Petite mutantide seas eristatakse ka ρ^- mutante vastavalt fenotüübile, mida nad annavad, kui ristata neid metsiktüüpi (ρ^+) rakkudega. Mutante on kolm: neutraalsed ($N\rho^-$), suppressiivsed ($S\rho^-$) ning hüpersuppressiivsed ($HS\rho^-$) ρ^- -mutandid (Blanc & Dujon, 1980). Neutraalsete ρ^- mutantide ristamisel metsiktüübiga on kõik järglased metsiktüüpi mtDNA-ga, suppressiivsete ρ^- mutantide ristamisel metsiktüübiga on järglaste seas nii metsiktüüpi kui ka mutantse mtDNA-

ga rakke ning hüpersuppressiivsete ρ^- mutantide ristamisel metsiktüübiga on peaaegu kõik järglased mutantse mtDNA-ga (Blanc *et al.*, 1980).

Petite-fenotüüpi võivad põhjustada paljud erinevad faktorid: stressitingimused (nälg, ebameeldiv keskkonna temperatuur), UV-kiirgus ning kemikaalid, mis on võimelised integreerima DNA aluspaaride vahele, nt EtBr (etiidiimbromiid)(Heude *et al.*, 1979). *Petite*-fenotüüpi võib põhjustada ka näiteks mingi geeni deletsioon, mille poolt kodeeritud valk osaleb otseselt mitokondriaalse DNA replikatsiooni –ja reparatsiooniprotsessides. Sellisteks valkudeks on näiteks mtDNA polümeraas Mip1 ja ssDNA-d siduv valk Rim1 (Zuo *et al.*, 2002).

1.5 Replikatsioonimudelid pagaripärmis

Kuna mitokondritel on oma genoom, toimub neis nii replikatsioon, transkriptsioon kui ka translatsiooni sõltumatult tuumast. Erinevalt tuumast, mille replikatsioon toimub ainult rakutsükli S-faasis, toimub mitokondri replikatsioon iseseisvalt kogu rakutsükli jooksul (Westermann, 2014).

Pagaripärmis on mtDNA replikatsiooni täpne toimumine veel hüpoteetiline. Välja on pakutud kaks replikatsiooni initsiatsiooni mehhanismi: transkriptsioon-sõltuv (Maleszka *et al.*, 1991) ning rekombinatsioon-sõltuv replikatsioon (Ling *et al.*, 2007).

Maleszka ja kaasautorite töös pakuti välja ka, et pagaripärmis võiks mtDNA replikatsioon toimuda veereva ratta mudeli järgi, kuna seda mudelit toetab kolm fakti: lasso-struktuuride esinemine, suurem osa DNA-st esineb lineaarsel kujul ning esinevad nn rõngad koos ssDNA sabadega (Maleszka *et al.*, 1991). Rõngaste esinemine vihjab sellele, et ahelate süntees ei toimu sama kiirusega ning mahajääva ahela sünteesil tekivad augud, mis täidetakse Okazaki fragmentidega (Maleszka *et al.*, 1991). Ka on välja pakutud valgud, mis pagaripärmis viivad läbi transkriptsioon-sõltuvat mtDNA replikatsiooni: Mip1 (mitokondriaalne DNA polümeraas γ), Rim1 (ssDNA-d siduv valk, vahendab RNA praimerilt initsieeritavat DNA replikatsiooni Mip1 poolt), Rpo41 (mitokondriaalne RNA polümeraas, mis sünteesib RNA praimerit) ning Mtf1 (mitokondriaalne transkriptsiooni faktor)(Shadel, 1999).

Teise hüpoteetilise replikatsioonimehhanismina on välja pakutud rekombinatsioon-sõltuv replikatsioonimehhanism. Kuigi on palju artikleid, mis toetavad transkriptsioon-sõltuvat replikatsiooni, on samuti palju vastuväiteid, et see ei saa olla (vähemalt mitte ainus) replikatsioonimehhanism pärmis. Seda seetõttu, et nii *ori*-regioonid kui ka mitokondriaalne

RNA polümeraas Rpo41 ei ole vajalikud selleks, et mtDNA säiliks rho⁻ tüvedes (Ling *et al.*, 2007).

Homoloogilisest rekombinatsioonist sõltuva replikatsiooni võtmelemendiks peetakse konkatemeere - DNA koopiaid, mis on ots-otsaga omavahel ühenduses ning mille moodustamises arvatakse osalevat valk Mhr1 (Ling *et al.*, 2007). Sünteesi läbiviimise mehhanismiks peetakse samuti veereva ratta mudelit, kuna see selgitab hästi konkatemeeride moodustumist (Ling *et al.*, 2007) ning erineva pikkusega ssDNA ahelate tekkimist, mis tekivad ilmselt mahajääva ahela sünteesil (Gerhold *et al.*, 2014). Ka arvatakse, et see toimub sarnaselt sellele, mida bakteriofaag lambda (λ) viib läbi *E. coli*'s (Ling *et al.*, 2007). Gerholdi ja kaasautorite poolt 2010. aastal avaldatud artiklis näidati *Candida albicans*'iga teostatud katsetes, et kahedimensionaalsel geelektroforeesil (2D-AGE) oli Y-kujuliste molekulide (*Y-arcs*) teke otseses sõltuvuses rekombinatsiooni aktiivsusest. Y-kujulised molekulid on tõenäoliselt replikatsioonikahvlid (Gerhold *et al.*, 2010). Seega saab nende tulemuste põhjal teha järelduse rekombinatsiooni tähtsusest pärmi mtDNA replikatsioonil. Samas võiks Rpo41 osaleda mahajääva ahela sünteesil, osaledes oma primaasse aktiivsusega Okazaki fragmentide moodustamisel (Wanrooij & Falkenberg, 2010). Ka teostasid Gerhold ja kaasautorid katseid *Candida parapsilosis*'ega, kus nad leidsid, et mitokondriaalse DNA replikatsioonil mängivad rolli ka mitokondriaalse DNA telomeerid, mis on tõenäoliselt rekombinatsioon-sõltuva replikatsiooni korral replikatsiooni *hot-spot*'ideks ja seda veereva ratta mudeli initsiatsioonil (Gerhold *et al.*, 2014).

1.6 Mitokondriaalse DNA stabiilsust mõjutavad valgud

Pagaripärmi mtDNA kodeerib RNA-sid ja valke, mis on vajalikud nii mitokondriaalseks translatsiooniks, elektrontranspordiks ning ATP sünteesiks. Tavaliselt on ühes pärmirakus 50-100 koopiat mtDNA-d, mis on kokku pakitud nukleoididena. Nukleoidi moodustamises osalevad valgud (nt Abf2, *ARS-binding factor*), mis sarnanevad funktsioonilt histoonidele ja mis täidavad sama rolli tuumas (Cho *et al.*, 2001; Hermann & Shaw, 1998). Lisaks Tabelos 1 toodud mitokondris lokaliseeruvatele, kuid tuumas kodeeritavatele valkudele on YGD (Yeast/Saccharomyces Genome Database; www.yeastgenome.org) järgi veel enam kui 300 valku, mille roll on otseselt või kaudselt seotud mitokondri metabolismiga ning ka mtDNA säilitamisega. Sellisteks valkudeks võivad olla tuuma poolt kodeeritud valgud, mille mõju mtDNA-le ja selle säilimisele võib olla nii otseselt seotud replikatsiooni-ja reparatsiooniprotsessidega (nt mitokondriaalne polümeraas Mip1 või RNA polümeraas Rpo41), kui ka kaudselt (nt ribonukleotiidi reduktaas Rnr2)(Elledge & Davis, 1987; Foury, 1989).

Tabel 1. Pagaripärmi mtDNA säilitamisega otseselt seotud valgud ning nende funktsioonid.

Valgu nimetus	Valgu funktsioon	Allikas
Abf2p (<i>ARS-binding factor</i>)	DNA pakkimine ja säilitamine (HMG-tüüpi valk)	(Miyakawa <i>et al.</i> , 2010)
Aco1 (<i>Aconitase</i>)	dsDNA ja ssDNA sidumisvõime, akonitaasne aktiivsus	(Chen <i>et al.</i> , 2007)(Gangloff <i>et al.</i> , 1990)
Cdc9 (<i>Cell division cycle</i>)	DNA ligaas	(Tomkinson <i>et al.</i> , 1992; Waga & Stillman, 1998)
Din7 (<i>DNA damage inducible</i>)	5'→3' eksonukleas	(Ling <i>et al.</i> , 2013; Mieczkowski <i>et al.</i> , 1997)
Exo5 (<i>Exonuclease</i>)	ssDNA 5'→3' eksonukleas	(Burgers <i>et al.</i> , 2010)
Hmi1 (<i>Helicase in mitochondria</i>)	ATP-sõltuv 3'→5' DNA helikaas	(Kuusk <i>et al.</i> , 2005; Sedman <i>et al.</i> , 2000)
Irc3 (<i>Increased recombination centers</i>)	ATP-sõltuv dsDNA helikaas	(Sedman <i>et al.</i> , 2014)
Mgm101 (<i>Mitochondria genome maintenance</i>)	ssDNA-d siduv võime, võimalik reparatsioonimehhanismides osalemine	(Mbantenkhu <i>et al.</i> , 2011; Nardozzi <i>et al.</i> , 2012; Pevala <i>et al.</i> , 2016)
Mhr1 (<i>Mitochondrial homologous recombination</i>)	Rekombinaas, ssDNA-d siduv võime, mitoribosoomi struktuurne valk	(Ling <i>et al.</i> , 2002) (Masuda <i>et al.</i> , 2009) (Amunts <i>et al.</i> , 2014)

Mip1 (<i>Mitochondrial DNA polymerase</i>)	DNA polümeraasne ning 3'→5' eksonukleasne aktiivsus	(Germaniuk <i>et al.</i> , 2002; Szczepanowska & Foury, 2010)
Mmm1 (<i>Maintenance of mitochondrial morphology</i>)	mtDNA replikatsiooni regulatsioon	(Hobbs <i>et al.</i> , 2001; Meisinger <i>et al.</i> , 2007)
Msh1 (<i>MutS homolog</i>)	Osalus mtDNA mismatch-parandusel	(Mookerjee <i>et al.</i> , 2005; Reenan & Kolodner, 1992)
Mtf1 (<i>Mitochondrial transcription factor</i>)	Tagab mitokondriaalse RNA polümeraasi promootorispetsiifilisuse	(Paratkar & Patel, 2010; Savkina <i>et al.</i> , 2010)
Ntg1 (<i>Endonuclease three-like glycosylase</i>)	Osalus BER-is (<i>base excision repair</i>)	(Meadows <i>et al.</i> , 2003; Sentürker <i>et al.</i> , 1998)
Pif1 (<i>Petite integration frequency</i>)	DNA 5'→3' helikaasne aktiivsus, telomeraasi inhibeeriv aktiivsus, ssDNA-d siduv aktiivsus. Osalus reparatsioonil	(Lahaye <i>et al.</i> , 1993) (Boulé <i>et al.</i> , 2005) (Ramanagoudr-Bhojappa <i>et al.</i> , 2013)
Rim1 (<i>Replication in mitochondria</i>)	ssDNA-d siduv valk. Ühendab RNA praimerit ja DNA polümeraasi Mip1 mitokondriaalsel replikatsioonil	(Sanchez-Sandoval <i>et al.</i> , 2015; Van Dyck <i>et al.</i> , 1992)
Rpo41 (<i>RNA polymerase</i>)	Mitokondriaalne RNA polümeraas, RNA primaasne aktiivsus	(Greenleaf <i>et al.</i> , 1986; Sanchez-Sandoval <i>et al.</i> , 2015)

1.6.1 Valk Rpo41

Valk Rpo41 on mitokondriaalne RNA polümeraas (*RNA polymerase*), koosneb 1351-st aminohappest, molekulmassiga 153 kDa.

Rpo41 on vajalik nii mitokondriaalseks transkriptsiooniks kui ka võimalikuks transkriptsioon-sõltuvaks mtDNA replikatsiooniks, kuna valgul Rpo41 on võime sünteesida RNA praimerit *ori*-promootorilt (Graves *et al.*, 1998; Greenleaf *et al.*, 1986). Samuti on seda vaja rho⁺ tüvedes mtDNA stabiilsuse säilitamiseks (Fangman *et al.*, 1990). Rpo41 on pagaripärmi mitokondriaalse RNA polümeraasi (mtRNAP) polümeraasset aktiivsust omav komponent. Teiseks komponendiks peetakse valku Mtf1 (*Mitochondrial Transcription Factor*), mis on mitokondriaalse transkriptsiooni faktorvalk (Matsunaga & Jaehning, 2004b). Rpo41 ei vaja valku Mtf1, et olla transkribeerimisvõimeline, küll aga on seda valku vaja promootor-spetsiifiliseks transkriptsiooniks (Matsunaga & Jaehning, 2004a; Yang *et al.*, 2015).

Samuti arvatakse, et valku Rpo41 on vaja mahajääva ahela sünteesil Okazaki fragmentide moodustamisel (Wanrooij *et al.*, 2010). Ka on *in vitro* katsetes näidatud, et Rpo41 transkribeerib praimerit, millelt alustab Mip1 (*Mitochondrial DNA polymerase*) DNA sünteesi (Sanchez-Sandoval *et al.*, 2015). Samuti näidati Ramachandran *et al.* 2016. aasta artiklis, et *in vivo* toimub mitokondriaalne transkriptsioon siiski tõenäoliselt Rpo41-Mtf1 valkude kompleksi poolt. Nimelt ssDNA-d siduv valk Rim1, mis ilmselt oma sidumisvõimega määrab ära transkriptsiooni maatriksahela, inhibeeris tugevalt Rpo41-vahendatud transkriptsiooni, kuid mitte Rpo41-Mtf1-kompleksi poolt vahendatud transkriptsiooni (Ramachandran *et al.*, 2016).

Seega võiks valk Rpo41 avaldada oma mõju mtDNA stabiilsusele läbi oma primaarse aktiivsuse, kas siis replikatsiooni initsiatsioonil transkriptsioon-sõltuval replikatsioonil ja/või mahajääva ahela sünteesil, Okazaki fragmentide moodustamisel.

1.6.2 Valk Mgm101

Valk Mgm101 (*Mitochondria Genome Maintenance*), koosneb 269-st aminohappest, molekulmassiga 30 kDa (Chen *et al.*, 1993). Mgm101 on Rad52-tüüpi valk, mis kuulub mitokondri nukleoidi koosseisu, millel on ssDNA-d siduv võime ning ka ahelasse tungimise võime (Pevala *et al.*, 2016).

Valgul Mgm101 on tõenäoliselt funktsioon reparatsiooniradades, kuna selle valgu deletsioon suurendab nii UV kui ka reaktiivsete hapnikuühendite (ROS, *reactive oxygen species*) poolt tekitatud mtDNA kahjustusi (Meeusen *et al.*, 1999; Zuo *et al.*, 2007). MGM101 on vajalik rho⁺

tüvedes mtDNA stabiilsuse säilitamiseks, kuna MGM101 puudumine viib mtDNA kadumiseni/fragmenteerumiseni ρ^+ tüvedes (Zuo *et al.*, 2002). Samuti on MGM101 funktsioon sõltuv *ori*-järjestusest, kuna tüvedes, kus on säilinud *ori*-järjestus, on MGM101 deletsioonist põhjustatud mtDNA ebastabiilsus küll märkimisväärne, kuid tüvedes, kus puudub *ori*-järjestus, viib MGM101 deletsioon täielikult ρ^0 fenotüübi tekkeni või vähendab drastiliselt mtDNA stabiilsust (Zuo *et al.*, 2002).

Mgm101 omab struktuurset, biokeemilist ja funktsionaalset sarnastust valguga Rad52 (*Radiation sensitive*) (Mbantenkhu *et al.*, 2011; Zuo *et al.*, 2002). Valk Rad52 vahendab Rad51 tööd, Rad51 omakorda osaleb homoloogilisel rekombinatiivsel DNA parandusel (HRR, *homologous recombinational repair*) (Ivanov *et al.*, 1996). Kuna varasemalt on näidatud et Rad52 osaleb DNA homoloogilisel rekombinatsioonil (Mortensen *et al.*, 1996), on postuleeritud, et valk Mgm101 võiks osaleda homoloogilisel rekombinatsioonil sarnaste mehhanismide läbi. Ka võib valku Mgm101, nagu ka valku Rad52, leida nii mitokondris, kus Mgm101 osaleb ilmselt mtDNA stabiliseerimisel, osaledes nukleoidi moodustamisel, kui ka tuumas, kus Mgm101 osaleb ahelasisesel parandusel (Ward *et al.*, 2012). *Candida parapsilosis*'es leiduv Mgm101 moodustab rõngaid sarnaselt Rad52-le (Pevala *et al.*, 2016). Ka näitasid katsed *C. parapsilosis*'ga, et Mgm101-l on nii ssDNA-d siduv võime kui ka ahelasse-tungimise aktiivsus, mõlemad sarnasel sellega, mis on Rad52-l. Veel spekulēeriti eelnevas artiklis, et Mgm101-l võib olla ka roll telomeeride säilitamisel, seda läbi t-rõngaste (*t-loop*) moodustamise.

1.6.3 Valk Mhr1

Valk Mhr1 (*Mitochondria Homologous Recombination*) koosneb 226-st aminohappest, molekulmassiga 26,9 kDa (Ling *et al.*, 2000). Valk Mhr1 omab rekombinaasset ning ssDNA-d siduvat aktiivsust (Ling *et al.*, 2002; Masuda *et al.*, 2009).

Valku Mhr1 on vaja DNA parandamisel, rekombinatsioonil ning mitokondriaalse DNA stabiilsuse säilitamisel (Ling *et al.*, 1995; Senbongi *et al.*, 1999). Samuti toetab eelnevat Ling *et al.* 2000. aastal avaldatud töö, kus näidati, et nende Mhr1-defektsetel tüvedel oli suurenenud UV-kiirguse ja ROS-ide mõjul tekkinud ρ -mutantide arvukus (Ling *et al.*, 2000). Ka on näidatud, et valgul Mhr1 võiks olla roll konkatemeeride moodustamisel, mis võiks tekkida mtDNA veereva ratta mudelil toimuval sünteesil (Ling *et al.*, 2004). Ka viib MHR1 deletsioon ρ^+ tüvedest ρ -mutantide järglaskonna tekkeni. Valgul Mhr1 on ssDNA-d siduv omadus, mida arvatakse vaja minevat ahelate kokku viimisel homoloogsel paardumisel põhineval

replikatsioonil või homoloogilisel rekombinatsioonil põhineval DSB-de parandamisel (Ling *et al.*, 2013).

Vastuolu tõi Amunts *et al* 2014. aastal avaldatud artikkel, milles analüüsiti mitoribosoomi (mitokondriaalse ribosoomi) koosseisu kuuluvaid valke ning leiti, et nende seas on ka Mhr1 (Amunts *et al.*, 2014). Sarnastele tulemustele jõudsid Woellhaf ja kaasautorid oma 2016. aasta töös, kus leiti, et paljude uuritavate geenide (sealhulgas MHR1) deletsioonil oli kahanenud mitoribosoomi translatsioonivõime, millega kaasnes sagedasti ka mtDNA kadumine (Woellhaf *et al.*, 2016). See on ilmselt tingitud sellest, et mitoribosoomide tegevus – mitokondriaalne translatsioon – on vajalik mtDNA stabiilsuseks.

Seega on praegusel ajahetkel Mhr1 täpne funktsioon veel uurimisel, kuid on kindel, et antud valk mõjutab mtDNA stabiilsust kas otseselt – osaledes replikatsiooni –ja/või reparatsioonimehhanismides – või kaudselt – kuuludes mitoribosoomi koosseisu.

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Minu bakalaureusetöö oli osa TÜMRI Üldise-ja Mikroobibiokeemia laboris teostatavast projektist, mille käigus uuritakse *Saccharomyces cerevisiae* mtDNA replikatsiooni mudelit ning mitokondri genoomi metabolismis osalevaid valke. Minu töö eesmärgiks oli välja selgitada, millist fenotüüpi põhjustab seni teada olevate potentsiaalsete mtDNA replikatsioonis osalevate valkude deleteerimine mitokondriaalses genoomis. Selle väljaselgitamiseks oli vaja:

- Teha potentsiaalsete mtDNA replikatsioonis osalevate mitokondriaalsete valkude deletsioonitüved algtüvest HS rho⁻ a1184. Uuritavate valkude hulka kuuluvad Rpo41 (RNA polümeraas, mis võiks hüpoteetiliselt osaleda transkriptsioon-sõltuval replikatsioonil), Mgm101 (valk, mis osaleb reparatsiooni-ja rekombinatsiooniprotsessides) ja Mhr1 (potentsiaalne rekombinatsioon-sõltuva replikatsiooni valk). Deleteerisin need valgud tüvest HS rho⁻ a1184 ükshaaval ning samuti tegin topeltmutandid kõigis variatsioonides.
- Eraldada deletsioonitüvedest DNA ning analüüsida seda *Southern blot* meetodil
- Kvantiteerida saadud tulemused ning sellest järeldada valkude mõju mtDNA stabiilsusele ja hulgale

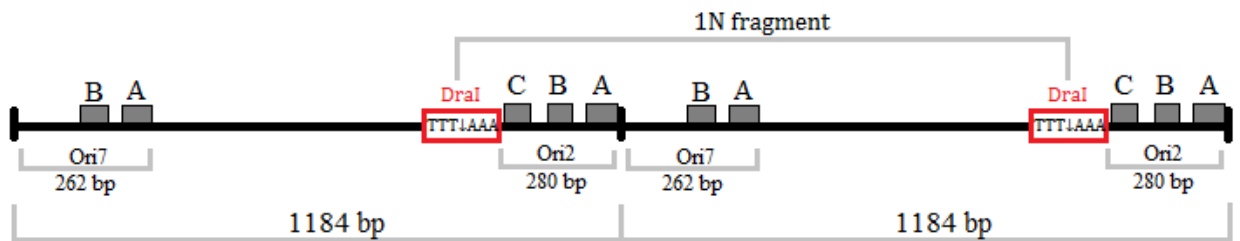
2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Töös kasutatud pärmitüved ja söötmed

Antud töös kasutatud pärmitüve W303 HSρ⁻ a1184 sain oma juhendajalt Tiina Sedmanilt, kelle juhendatud magistrant Karin Villemson tegi selle tüve oma magistritöö katseteks 2013. aastal.

Selles tüves on *wt* mtDNAs säilinud 1184 aluspaarine DNA järjestus. See 1184bp pikkune fragment esindab ühte ühikut, mis kordub konkatemeeridena. Selles ühikus on säilinud funktsionaalne *ori2* regioon koos C, B ja A C/G-plokiga ning inaktiivne *ori7* regioon, milles on säilinud vaid B ja A plokk (vaata lisaks a1184 mtDNA järjestust lisa 1).

Joonisel 2 on toodud pagaripärmi tüve HSρ⁻ a1184 mtDNA skeem.



Joonis 2. Pagaripärmi tüve HSp⁻ a1184 mtDNA skeem. Joonisel on toodud kaks koopiat tüve HSp⁻ a1184 mtDNA-d. 1184bp kujutab ühte mtDNA ühikut, hallid kastid on vastavate *ori* regioonide A, B, C ja G/C plokid. Ori järjestus on 280 bp pikkune, punasega märgitud restriктаasi DraI lõikesait ning 1N fragment tähistab tekkivat DNA järjestust, mis tekib lõikamise tulemusena.

Tabel 2. Töös kasutatud pärmitüved

Tüve nimetus	Tüve genotüüp	Tüve autor
W303 MATa	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i>	(Thomas & Rothstein, 1989)
W303 HS a1184 (edaspidi a1184)	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i>	(Villemson, 2013)
a1184 Δ <i>rpo41</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 RPO41::HphMX6</i>	Töö autor
a1184 Δ <i>mgm101</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 MGM101::HphMX6</i>	Töö autor
a1184 Δ <i>mhr1</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 MHR1::HphMX6</i>	Töö autor
a1184 Δ <i>ste5</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 STE5::HphMX6</i>	Töö autor
a1184 Δ <i>rpo41</i> Δ <i>mgm101</i>	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 RPO41::HphMX6 MGM101::KanMX4</i>	Töö autor

a1184 Δ rpo41 Δ mhr1	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i> RPO41:: <i>HphMX6</i> MHR1:: <i>KanMX4</i>	Töö autor
a1184 Δ rpo41 Δ ste5	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i> RPO41:: <i>HphMX6</i> STE5:: <i>KanMX4</i>	Töö autor
a1184 Δ mgm101 Δ rpo41	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i> MGM101:: <i>HphMX6</i> RPO41:: <i>KanMX4</i>	Töö autor
a1184 Δ mgm101 Δ mhr1	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i> MGM101:: <i>HphMX6</i> MHR1:: <i>KanMX4</i>	Töö autor
a1184 Δ mgm101 Δ ste5	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i> MGM101:: <i>HphMX6</i> STE5:: <i>KanMX4</i>	Töö autor
a1184 Δ mhr1 Δ rpo41	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i> MHR1:: <i>HphMX6</i> RPO41:: <i>KanMX4</i>	Töö autor
a1184 Δ mhr1 Δ mgm101	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i> MHR1:: <i>HphMX6</i> MGM101:: <i>KanMX4</i>	Töö autor
a1184 Δ mhr1 Δ ste5	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i> MHR1:: <i>HphMX6</i> STE5:: <i>KanMX4</i>	Töö autor
a1184 Δ ste5 Δ rpo41	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i> STE5:: <i>HphMX6</i> RPO41:: <i>KanMX4</i>	Töö autor
a1184 Δ ste5 Δ mgm101	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i>	Töö autor

	STE5:: <i>HphMX6</i> MGM101:: <i>KanMX4</i>	
a1184 Δ ste5 Δ mhr1	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i> STE5:: <i>HphMX6</i> MHR1:: <i>KanMX4</i>	Töö autor

Töös kasutasin pagaripärmi kasvatamiseks YPD (*Yeast extract peptone dextrose*) söödet: vedelsöötme korral 1% pärmiekstrakti, 2% glükoosi, 2% peptooni ning tardsöötme korral lisaks 1,7% agarit.

Samuti lisasin selekteerimisel üksikmutantide puhul tardsöötmele antibiootikumi hph (hügromütsiin B). Topeltnutantide korral lisasin tassidele nii G418-sulfaati (genetitsiin) kui ka hph-d. Mõlema antibiootikumi lõppkontsentratsiooniks oli 0,3 μ g/ml.

Pärmitüvesid kasvasin 30°C juures, vedelsöötme puhul loksutil (180rpm) ning tardsöötme puhul 30°C kapis.

2.2.2 Töös kasutatud plasmiidid, praimerid ja PCR reaktsioonid

Töös kasutasin kahte plasmidi, et amplifitseerida vastavat antibiootikumikassetti, mida kasutasin transformatsiooni teel saadud mutantide selekteerimiseks. Nendeks olid hügromütsiin puhul pFA6a HphMX6, mis sisaldas hph-resistentsusgeeni Hyg^R ning genetitsiini puhul pFA6a KanMX4, mis sisaldas G418-sulfaadi vastast resistentsusgeeni Kan^R. Mõlemad plasmiidid on toodetud firma *Euroscarf* poolt. Hügromütsiin B-d kasutasin üksikmutantide selekteerimisel ning topeltnutantide selekteerimisel kasutasin peale Hügromütsiin B ka G418-sulfaati.

Tabelis 3 on toodud töös kasutatud praimerid. Praimerite Mhr1 S1, Mhr1 S2, RpoUpKan, RpoDownKan, Mgm101 hph 5', Mgm101 hph 3', Ste5 KANMX4N ja Ste5 KANMX4C puhul on tumedaga tähistatud plasmiidiga komplementaarne ala ning tavalises kirjas on järjestus, mis on komplementaarne *ORF*-ist allavoolu paikneva järjestusega (vastassuunaline) või *ORF*-st ülesvoolu paikneva järjestusega (pärisuunaline).

Tabel 3. Töös kasutatud praimerid.

Praimeri nimi	Praimeri 5'→3' järjestus	Funktsioon	Kasutus
Mhr1 up Bam	TGG GCT GTA GAG AAC TTT CTC	Praimer seondub MHR1 geeni promootorile (pärisuunaline)	MHR1 lookuse kontroll
Mhr1 down Pst	ATG ACG ATA AGG TGA GGA GG	Praimer seondub MHR1 terminaatorile (vastassuunaline)	MHR1 lookuse kontroll
Rpo41 up5 XhoI	ATT CTC GAG GAC GTT GAT TTT AGC CTC TCC GTG	Praimer seondub RPO41 promootorile (pärisuunaline)	RPO41 lookuse kontroll
Rpo41 down3 SacI	TTG AGC TCA AAT GGC TCC GCT GCT ACC GTT A	Praimer seondub RPO41 terminaatorile (vastassuunaline)	RPO41 lookuse kontroll
Mgm101 up5	GGA TTC GAG TGA GTA GTT	Praimer seondub MGM101 promootorile (pärisuunaline)	MGM101 lookuse kontroll
Mgm101 down3	ATC GGT GAA CAA GGT AAG	Praimer seondub MGM101 terminaatorile (vastassuunaline)	MGM101 lookuse kontroll
Ste5 pr	TAT TTC GAG TGA AGA AGA AGC GTT AAA	Praimer seondub STE5 promootorile (pärisuunaline)	STE5 lookuse kontroll
Ste5 term	ATG AAC TTG AAA GAC TAA GAA GAA	Praimer seondub STE5 terminaatorile (vastassuunaline)	STE5 lookuse kontroll

Mhr1 S1	GAA TAA ATA GAG AAA CAG CGA CGG AAA AAT CGA TAT TTC AGG GCA AAA GCC GTA CGC TGC AGG TCG AC	Praimer seondub Hyg ^R või Kan ^R sisaldavale plasmiidile (pärisuunaline).	Antibiootikumikasseti amplifikatsioon vastava geeni deletsiooniks
Mhr1 S2	ATA TAT GTT TTT TTT TCT ACC TGC ATT TGT ATA TCT AAT GAC GAA GCG TTA TCG ATG AAT TCG AGC TCG	Praimer seondub Hyg ^R või Kan ^R sisaldavale plasmiidile (vastassuunaline).	Antibiootikumikasseti amplifikatsioon vastava geeni deletsiooniks
RpoUpKan	TTT ACA TTT TAT ACA TTC CTT GGA TCA GTT CCT CCC CCT CTT TGA TAT TCA CTC AAT ATG CGT ACG CTG CAG GTC GAC	Praimer seondub Hyg ^R või Kan ^R sisaldavale plasmiidile (pärisuunaline).	Antibiootikumikasseti amplifikatsioon vastava geeni deletsiooniks
RpoDownKan	TGT ATA TAT GTA CAA GTT AAA TAA AAA TAA CAC AAA TAA ATT TTA GTT TGT AGT TCA CGG CTC AGA ATT CGA GCT CGT TTT CGA CAC	Praimer seondub Hyg ^R või Kan ^R sisaldavale plasmiidile (vastassuunaline).	Antibiootikumikasseti amplifikatsioon vastava geeni deletsiooniks
Mgm101 hph 5'	GGT AGA GAC TAA AAA AGG AAA GAA AGG ACA AGT AGG AAG ATC AGC GTA CGA TTA AGG CGC GCC AGA TCT	Praimer seondub Hyg ^R või Kan ^R sisaldavale plasmiidile (pärisuunaline).	Antibiootikumikasseti amplifikatsioon vastava geeni deletsiooniks

Mgm101 hph 3'	ATT GGA ATA TAT ATA CTT ACT AAA ATT AGC TTA TAT GGT TCG CAT ATT GAA TCG ATG AAT TCG AGC TCG	Praimer seondub Hyg ^R või Kan ^R sisaldavale plasmiidile (vastassuunaline).	Antibiootikumikasseti amplifikatsioon vastava geeni deletsiooniks
Ste5 KANMX4N	CTA AAA AAG GAA GAT ACA GGA TAC AGC GGA AAC AAC TTA TAA ATG CGT ACG CTG CAG GTC GAC	Praimer seondub Hyg ^R või Kan ^R sisaldavale plasmiidile (pärisuunaline).	Antibiootikumikasseti amplifikatsioon vastava geeni deletsiooniks
Ste5 KANMX4C	GGG ATG CTT TCT TTT TAT TAT TGC ATA AAA TTT AGT GTA TAC TCT AGA ATT CGA GCT CGT TTT CGA CAC	Praimer seondub Hyg ^R või Kan ^R sisaldavale plasmiidile (vastassuunaline).	Antibiootikumikasseti amplifikatsioon vastava geeni deletsiooniks
ORI3 in	TAG GGG GAG GGG GTG GGT	Praimer seondub mtDNA <i>ori</i> regionile (vastassuunaline)	Radioaktiivse mitokondriaalse proovi valmistamine
ORI5 in	GGG GGT CCC AAT TAT TAT TTT C	Praimer seondub mtDNA <i>ori</i> regionile (pärisuunaline)	Radioaktiivse mitokondriaalse proovi valmistamine
DNA 3834	CCG AAT TCG CTA AAA TTG GTA TCT CCG TA	Praimer seondub DNA2 geenile (pärisuunaline)	Radioaktiivse nukleaarse proovi valmistamine
DNA 4193	CCG GAT CCT ATT GCT TCT TTT TGA TTC AA	Praimer seondub DNA2 geenile (vastassuunaline)	Radioaktiivse nukleaarse proovi valmistamine

Praimerite paarid, mida kasutasin deletsioonifragmentide amplifitseerimiseks:

- RPO41 geeni deleteerimiseks : RpoUpKan ja RpoDownKan
- MGM101 geeni deleteerimiseks: Mgm101 hph 5' ja Mgm101 hph 3'
- MHR1geeni deleteerimiseks Mhr1 S1 ja Mhr1 S2
- STE5geeni deleteerimiseks Ste5 KANMX4N ja Ste5 KANMX4C

Tabelis 4 on toodud töös kasutatud PCR-reaktsioonide tsüklite 2-4 kordused ning sünteesiajad. PCR (*polymerase chain reaction*) koosneb kolmest põhiastapist: denaturatsioon, praimerite seondumine ning süntees. Neid etappe korratakse vastavalt vajadusele, et saada soovitud kogus PCR produkti.

Tabel 4. Kasutatud PCR reaktsioonid.

Eesmärk	1. Primaarne DNA denaturatsioon	2. DNA denaturatsioon	3. Praimerite seondumine	4. DNA süntees	Tsüklite 2-4 kordusi
Vastava valgu deletsiooniks vajamineva antibiootikumikasseti (hph või kan) amplifitseerimine	95°C, 3 min	95°C, 30 sek	54°C, 30 sek	72°C, 2 min (hph); 2 min (kan)	29
Δ mgm101 ja Δ mhr1 deletsioonitüvede kontroll	95°C, 3 min	95°C, 30 sek	54°C, 30 sek	72°C, 2 min 40 sek	25
Δ rpo41 (ja Δ ste5) deletsioonitüvede kontroll	95°C, 3 min	95°C, 30 sek	54°C, 30 sek	72°C, 4 min, 35 sek (RPO41); 3 min 30 sek (STE5)	25
Nukleaarse proovi amplifitseerimine	95°C, 3 min	95°C, 30 sek	54°C, 30 sek	72°C, 30 sek	15
Mitokondriaalse proovi amplifitseerimine	95°C, 3 min	95°C, 30 sek	54°C, 30 sek	72°C, 25 sek	15

Töös kasutatud PCR reaktsioonisegud:

- RPO41, MGM101, MHR1 ja STE5 geenide deleteerimiseks vajaliku antibiootikumikasseti valmistamine: reaktsioonisegu ruumala 50µl; PCR puhver [75mM Tris-HCl puhver (pH 8,8); 20mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20; valmistajaks Maie Loorits], 2,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP (desoksünukleotiidtrifosfaadid), vastavaks deletsiooniks vajalike praimerite segu (mõlemat praimerit 10pmol), pFA6a HphMX (või pFA6a KanMX) plasmidi 50ng, 2U-d Pfu/Taq ensüümi (Pfu/Taq 4:1; valmistajaks Maie Loorits) ning lõpliku mahuni milli-Q (mQ; ultrafiltreeritud ja deioniseeritud vesi) H₂O-d
- RPO41, MGM101, MHR1 ja STE5 geenide deletsiooni kontroll (antibiootikumikasseti insertsiooni kontroll): reaktsioonisegu ruumala 20µl; PCR puhver, 2,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, vastavate praimerite segu (10pmol mõlemat), 3,5µl DNA-d [eraldatud LiOAc-meetodiga, vaata 2.2.5 DNA eraldus LiOAc meetodil (Lõoke *et al*, 2011)], 5U-d Taq polümeraas ensüümi (valmistatud Maie Loorits poolt) ning lõpliku mahuni mQ vett
- Radioaktiivse produkti valmistamine: reaktsioonimaht 20µl; PCR puhver, 30ng PCR-ga amplifitseeritud DNA-d (DNA2 proovi puhul oli selleks W303 genoomselt DNA-lt tehtud proov ning *ori2* puhul oli proov amplifitseeritud mtDNA-lt), 10pmol mõlemat oligo't (nukleaarse proovi korral DNA3834 ja DNA4193 ning mitokondriaalse proovi korral ORI5 in ja ORI3 in oligo'd), 0,2mM dNTP-d (-dCTP), 2,5mM MgCl₂, 5U-d Taq polümeraas ensüümi, 2µl α-³²P-dCTP-d (20µCi)(*Hartmann analytic*) ning lõpliku mahuni mQ vett

PCR reaktsioonideks kasutasin kas *Eppendorf Mastercycler Personal* või *Biometra Thermocycler T1* PCR masinat.

2.2.3 PCR produkti puhastamine

PCR-ga saadud produkti puhastasin fenoolkloroform-etanool meetodiga Sambrook'i ja Russell'i, 2001. PCR-produkti tõstsin 0,2ml PCR tuubist 1,5ml tuubi ning viisin ruumala 200µl- ni, lisades vastavalt T₁₀E₁ lahust [10mM Tris-HCl (pH=7,5); 1mM EDTA (etüleendiamiintetraatseethape), siin ja edaspidi pH=8]. Seejärel lisasin 1/10 mahtu 3M NaOAc-i, 3µl dekstraani (20mg/ml; M=110kDa) ning 80µl fenoolkloroformi (pH=7,5). Segule tegin 30 sekundit *vorteksit*, lastes vahepeal 1 minut seista, mille järel tegin veel 30 sekundit *vorteksi*. Seejärel tsentrifugeisin kiirusel 13400rpm 3 minutit, kasutades selleks *Eppendorf 'Minispin'* lauatsentrifuugi (*tabletop*), rootoriga F-45-12-11 (nüüd ja edaspidi "lauatsentrifuug"). Seejärel tõstsin ülemise vesifaasi, jälgides sealjuures hoolikalt, et orgaanilist faasi või valke kaasa ei tuleks, uude tuubi ning lisasin vastavalt 2,5 mahtu (500µl)

96% etanooli ja tegin *vorteksi*, et lahus seguneks. Seejärel jätsin proovi sadenema -20°C juurde vähemalt 15 minutiks. Peale sadestamist tsentrifugeisin 5 minutit kiirusel 13400rpm. Seejärel eemaldasın supernatandi. Sadet pesin 200µl 80% etanooliga, lastes mõni minut toatemperatuuril seista, mille järel tsentrifugeisin 2 minutit 13400rpm ning eemaldasın supernatandi. Olles veendunud, et etanoolijäägid on täielikult eemaldatud, võtsin sademe üles 50-100µl T₁₀E_{0,1}-s (deletsiooniks kasutatava PCR produkti puhul) või 100µl TEN-is [10mM Tris-HCl (pH=7,5), 1mM EDTA, 100mM NaCl] (radioaktiivse proovi puhul). Radioaktiivseid proove kasutasin edasi kohe vastavalt protokollile ning deletsiooniks kasutatavaid PCR-iga toodetud DNA fragmente säilitasin -20°C juures.

2.2.4 DNA transformatsioon *S. cerevisiae*'sse kasutades LiOAc meetodit

Liitiumatsetaat-transformatsioonimeetod töötati välja 1983. aastal Ito ja kaasautorite poolt (Ito *et al.*, 1983). Algne protokoll on aja jooksul saanud täiustusi nagu nt DMSO (dimetüülsulfoksiid) kasutamine, mis suurendab transformatsiooni efektiivsust (Hill *et al.*, 1991).

LiOAc transformatsioonimeetodit kasutasin oma töös deletsioonitüvede valmistamiseks. Selleks võtsin üksikmutantide puhul üles tüve a1184, -80°C külmikust ning külvasin rakumassi YPD tassile. Tüvesse a1184 teostasın neli deletsiooni: Δ rpo41, Δ mgm101, Δ mhr1 ja Δ ste5, kasutades deletsiooniks Hyg^R-i sisaldavat amplifitseeritud antibiootikumikassetti ning selekteerides mutante tassil hügromütsiin B-ga. Topeltnmutantide valmistamiseks võtsin üles vastavad eelnevalt valmistatud üksikmutandid, mida säilitasin -80°C juures ning külvasin rakumassi YPD tassile. Nendesse üksikmutantidesse teostasın deletsioonid kõigis võimalikes kombinatsioonides (vaata ka Tabel 2. Töös kasutatud pärmitüved) ning kasutasın deletsiooniks Kan^R-i sisaldavat amplifitseeritud antibiootikumikassetti. Topeltnmutante selekteerisin YPD tassidel, mis sisaldasid nii hph-d kui ka G418-t.

Külvasin säilituskultuurist, mida säilitati -80°C juures, vastava tüve rakumassi YPD tassile ning kasvasın 3-4 päeva 30°C juures. Tassilt valisin koloonia, mida kasvasın edasi 50ml-s YPD vedelsöötmes loksutil (180rpm) 30°C juures OD₆₀₀ (*optical density*, tihedus) 0,4-0,5-ni. Tihedust mõõtsın spektrofotomeetriga lainepikkusel 600nm ning masına nullisın YPD söötme suhtes. Seejärel viisın söötme koos rakkudega kolbist 50ml tuubi ning tsentrifugeisin 3 minutit 3200rpm toatemperatuuril, kasutades ''Hettich'' Universal 32R tsentrifuugi, rootoriga 1617 *Swing-out*. Peale tsentrifugeimist valasın söötme pealt ära ning pesin rakke steriilse mQ veega, tegin *vorteksi* ning tsentrifugeisin rakke uuesti samadel tingimustel. Peale tsentrifugeimist

eemaldas rakusademe pealt vee. Lisasin 1ml 0,1M LiOAc/T₁₀E₁-d [100mM LiOAc, 10mM Tris-HCl (pH=7), 1mM EDTA] iga transformatsiooni kohta, tegin *vorteksi*, et rakususpensioon oleks võrdselt segunenud ning kandsin 1ml kaupa eraldi 1,5ml tuubidesse. Seejärel tsentrifuugisin 1 minut 3200rpm lauatsentrifuugis ja eemaldas supernatandi. Siis lisasin topsides olevatele rakkudele 50µl 0,1M LiOAc/T₁₀E₁-d ning tegin *vorteksi*, et rakususpensioon oleks ühtlaselt segunenud ning inkubeerisin rakke 20 minutit 30°C juures, vahepeal segu segades.

Järgnevalt lisasin rakulahusele 3-6µl (~1µg) PCR produkti (vastavalt transformatsioonile kas Hyg^R või Kan^R sisaldavat fragmenti) ning 20µl (100µg) *carrier*-DNA-d (*Salmon Sperm*, firmalt *Amresco*) (kandja-DNA-d tuli enne lisamist 5 minutit 95°C juures kuumutada ning seejärel 5 minutit jääl hoida). Saadud lahust segasin õrnalt ja inkubeerisin 20 minutit 30°C juures. Seejärel lisasin 300µl 40% PEG (polüetüleenglükool, *M*=4kDa)-0,1M LiOAc/T₁₀E₁ lahust, segasin *vorteksil* ning inkubeerisin 40 minutit 30°C juures, vahepeal õrnalt segades. Peale inkubeerimist lisasin 35µl 100% DMSO-d, segasin ning tegin kuumašoki (*heat shock*) 10 minutit 42°C juures inkubeerides. Peale kuumašokki tsentrifuugisin rakud lauatsentrifuugis 1 minut 3700rpm ning eemaldas vedela faasi. Seejärel lisasin rakkudele 500µl YPD-d, suspendeerisin rakud ning tõstsin suspensiooni 2ml YPD-d sisaldavasse katseklaasi ning kasvasin rakke 30°C juures (180rpm) 8-10 tundi.

Peale inkubeerimist setitasin rakud tsentrifuugimisel 1 minut 3700rpm, eemaldas söötme ning lisasin rakkudele 100µl steriilset mQ vett. Suspendeerisin rakud ning kandsin lahuse pipetiga YPD tassile, mis sisaldas vastavalt hph-d üksikmutantide puhul ning G418-t ja hph-d topeltnutantide puhul. Kasvasin rakke tassil 30°C juures 3-4 päeva ning seejärel valisin kolooniad, mida soovisin analüüsida ning kasvasin neid 20ml-s YPD vedelsöötmes 12-14 tundi. Saadud kultuuri kasutasin nii 20% glütserooli sisaldusega *stock*-kultuuride (säilituskultuurid, mida säilitasin -80°C juures) valmistamiseks, kui ka DNA eralduseks (nii LiOAc meetodil, mida kasutasin transformatsiooni deletsioonide õigsuse kontrollimiseks, kui ka genoomse DNA eralduse puhul, mida kasutasin *Southern blot* meetodi abil DNA analüüsimiseks).

Deletsioonitüvede õigsust kontrollisin PCR-meetodiga: kuna nii metsiktüüpi kui ka mutantsete geenide suurused olid teada, sain kontrollida transformatsiooni õnnestumist, amplifitseerides vastavat geeni PCR-i abil ning analüüsides seejärel DNA fragmente agarosgeelelektroforeesil (kasutades 0,8% agarosgeeli) (vaata ka Joonis 4. Mutantide kontroll PCR-meetodil). Suuruste hindamiseks kasutasin DNA markerit (*Solis Biodyne*).

2.2.5 DNA eraldus LiOAc meetodil (Lõoke *et al.*, 2011)

Selleks, et kontrollida mutantide tõesust PCR- meetodiga, eraldas DNA LiOAc meetodil Lõoke *et al* poolt välja töötatud protokoll järgi (Lõoke *et al.*, 2011). See DNA eraldusmeetod on kiirem ja odavam, kui ensüümiga (Zymolyase) DNA puhastamine, kuid samas ei ole sellel meetodil saadud DNA sobilik *Southern blot* analüüsiks.

Võtsin eelnevalt mainitud (vaata 2.2.4 DNA transformatsioon *S. cerevisiae*'sse kasutades LiOAc meetodit) 20ml söötmest ~1ml kultuuri ning eraldas söötme, tsentrifugides lauatsentrifuugis 1 minut 8000rpm ning eemaldas söötme pipetiga, suspendeerides tekkinud rakusademe 100µl-s lüüsilahuses (200mM LiOAc, 1% SDS) ning inkubeerisin 70°C juures 10 minutit. Lisasin 300µl 96% etanooli ja tegin *vorteksi* ning lasin seista toatemperatuuril 2-3 minutit, peale mida tsentrifugisin 13400rpm 3 minutit ja eemaldas supernatandi. Sadet pesin 500µl 70% etanooliga ning tsentrifugisin 8000rpm 2 minutit. Seejärel eemaldas supernatandi ning kuivatasin sadet 37°C juures 4-5 minutit, hoides tuubil kaant avatuna, et vabaneda etanoolijääkidest. Sademe lahustasin 100µl-s T₁₀E_{0,1}-s ja säilitasin -20°C juures. Saadud lahusest kasutasin ~3,5µl PCR-reaktsioonis, kontrollimaks õigesse lookusesse insertsiooni õnnestumist.

2.2.6 *S. cerevisiae* genoomse DNA eraldamine

Selleks, et saada genoomset DNA-d *Southern blot* meetodil analüüsimiseks kasutasin DNA eraldamise meetodit, millega lõhutakse rakuseinad Zymolyase ensüümiga ning DNA puhastatakse proteinaas-K ja fenool-kloroformi töötlust kasutades. Zymolyase on ensüüm, mis lõhub β-glükanaaseid (β-1,3) sidemeid, mis asuvad pagaripärmi rakukestas. Protokoll on modifitseeritud *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2005 Edition* protokoll põhjal (Amberg *et al.*, 2005)

Rakke kasvasin 20ml-s YPD vedelsöötmes. Samast kultuurist tegin lisaks *stock*-säilituskultuurid ja eraldas DNA LiOAc meetodil, mida kasutasin tüvede õigsuse kontrolliks PCR meetodiga. Genoomse DNA eraldamiseks valasin ~18-19ml kultuuri 50ml tuubi ning tsentrifugisin 3 minutit pöoretel 3700rpm, kasutades selleks ''Hettich'' *Universal 32R* tsentrifuugi, rootoriga 1617 *Swing-out*. Seejärel valasin pealt söötme ning pesin rakke steriilse mQ-ga ning viisin üle 1,5ml tuubi (eelnevalt kaalutud), mille järel tsentrifugisin rakke 5000rpm lauatsentrifuugis ning eemaldas pealt nii palju vett, kui võimalik. Seejärel kaalusin rakud ning arvutasin vastavalt, kui palju Zymolyase ensüümi (Zymolyase 20T, *Nacalai Tesque*)

mul edaspidi rakkude jaoks vaja läheb. Rakkudele lisasin 0,5ml Sorbitool-Tris-EDTA [1M Sorbitool, 10mM Tris-HCl (pH=8), 10mM EDTA] lahust, segasin ning lisasin vastavalt Zymolyase lahust (20mg/ml Sorbitool-Tris-EDTA puhvril), nii, et 1g rakkude kohta oleks 4mg ensüümi. Seejärel inkubeerisin 30 minutit 37°C juures, vahepeal segades, peale mida tsentrifuugisin lauatsentrifuugis 1 minut 13400rpm ning eemaldas supernatandi. Sademele lisasin 0,5ml Tris-EDTA [50mM Tris-HCl (pH=7,5), 20mM EDTA] lahust ja 50µl 10% SDS-i, segasin õrnalt ja inkubeerisin 30 minutit 65°C juures, peale mida tõstsin tuubid jääle. Lisasin 200µl eelnevalt jääle jahutatud 5M kaaliumatsetaati (KOAc), segasin õrnalt ning lasin seista jääle 40 minutit. Peale jääle seismist tsentrifuugisin tuube 5 minutit 13400rpm 4°C juures, kasutades tsentrifuugi „Hettich“ Mikro 200R, rootoriga 2424. Seejärel tõstsin ettevaatlikult vedela faasi uude tuubi (~750µl), jälgides, et ei tuleks kaasa tekkinud valgu-ja orgaanikasadet. Lisasin lahusele võrdses mahus isopropanooli, segasin õrnalt ja lasin toatemperatuuril seista 5 minutit. Peale seda tsentrifuugisin 1 minut 8000rpm lauatsentrifuugis ja eemaldas supernatandi. Tekkinud DNA sadet pesin 200µl 80% etanooliga, tsentrifuugisin samadel tingimustel ning eemaldas supernatandi. Sademe lahustasin 100µl-s T₁₀E₁RNAasA-s [10mM Tris-HCl (pH=7), 1mM EDTA, 20µg/ml RNAasA] ja inkubeerisin 30 minutit 65°C juures. Üksikmutantide puhul piirdus DNA eraldamine selle protseduuriga, sest agarosgeeli analüüsist oli näha, et DNA on olemas. Peale esimest *Southern blot*'ga saadud pilti selgus, et DNA kvaliteet pole piisavalt hea ja seetõttu otsustati edaspidi kasutada lisaks proteinaas K töötlust. Töötlus proteinaas K-ga: lisasin võrdses mahus 2x proteinaas K puhvrit [1% SDS, 10mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH=8)] ja 1µl proteinaas K-d (20mg/ml)(*Thermo Scientific*) ning inkubeerisin 30 minutit 55°C juures. Seejärel lisasin lahusele 80µl fenoolkloroformi (pH=7,5), segasin õrnalt ja lasin toatemperatuuril seista 15 minutit. Peale seda tsentrifuugisin lahuseid 1 minut 13400rpm lauatsentrifuugis ning viisin ülemise vesilahuse uude tuubi. Lisasin 1/10 mahtu (20µl) 3M NaOAc-i pH 7,5 ning 2,5 mahtu (500µl) 96% etanooli, segasin korralikult ning setitasin DNA lauatsentrifuugis 1 minuti 8000rpm. Seejärel eemaldas supernatandi, pesin sadet 100-200µl 80% etanooliga ning kordasin tsentrifuugimist ja eemaldas supernatandijäägid. DNA sademe lahustasin 100µl-s T₁₀E_{0,1}-s, selleks lasin lahustuda üleöö 4°C juures, segasin õrnalt, kasutades nõrka *vorteksit* ning hindasin DNA kontsentratsiooni agarosgeelelektroforeesil, kandes geelile 2µl DNA lahust ning voolutades DNA fragmente 0,8% agarosgeelis 50V juures. Edaspidi säilitasin DNA-d -20°C juures.

2.2.7 DNA restriksioon

DNA restriksiooni teostas in ensüümiga DraI, mis lõikab a1184 mtDNA-d üks kord järjestusest 5'-TTT↓AAA-3'. Reaktsioonimahuks oli 25µl. See sisaldas: 2,5µl ensüümile vastavat puhvrit, 8U-d (*Unit*) ensüümi DraI (puhver ja ensüüm olid firma *Thermo Scientific* poolt). Selleks, et otsustada, kui palju DNA-d restriksioonilahusesse panen, teostas in agarosgeelelektroforeesi, mille abil saadud pildi järgi lisasin DNA-d nii, et igasse reaktsioonilahusesse saaks ~sama palju DNA-d. Seejärel lisasin lõpliku mahuni mQ vett. Lõikus kestis kaks tundi 37°C juures.

2.2.8 Southern blot

Selleks, et analüüsida lõigatud DNA-d *Southern blot* meetodil, tuli selleks kõigepealt DNA fragmendid lahutada agarosgeelelektroforeesil. Selleks valmistasin 1% agarosgeeli: 3g agarosi, 9µl etiidiumbromiidi (EtBr)(3ng/ml) ning 300ml-ni 1xTAE puhvrit [*Tris-acetate-EDTA*; 40mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 20mM etaanhape]. Lõigatud DNA proovide geelile kandmiseks lisasin tuubidesse, kus oli lõigatud proov (25 µl) , 5µl 6xTAE laadimispuhvrit [10mM Tris-HCl (pH=7,5), 5mM EDTA, 50% glütserool ning 0,25% BFB (*bromophenol blue*, broomfenool sinine)]. Seejärel kandsin 30µl proovi geelile ning voolutasin toatemperatuuril pingega 3V/cm geeli pikkuse kohta (75V). Fragmentide läbitud teepikkust hindasin laadimispuhvril oleva BFB järgi, mis jookseb 1% agarosgeelis umbes samal kaugusel nagu 300bp pikkune DNA fragment. Kui BFB oli jooksnud umbes 4-5cm kaugusele, tegin geelist pildi masinaga Uvitec Uvipro Gold ning peale pildistamist lõikasin geelist välja vasaku nurga, et hiljem selle järgi DNA geelil paiknemise orientatsioon ära tunda. Samuti lõikasin geeli väiksemaks kohtadest, kus DNA-d saadud pildi järgi ei olnud. Seejärel töötlesin geeli vastavalt: 30 minutit loksutil denatureerivas aluselises puhvril [SolA; 1,5M NaCl, 0,5M NaOH (pH≥12)] ning peale seda kaks korda 15 minutit neutraalse puhvriliga [SolB; 1M Tris-HCl (pH=7,5), 1,5M NaCl], pestes geeli peale iga puhvri vahetust mQ veega.

Seejärel oli vaja DNA fragmendid kanda üle agarosgeelist nailonfiltrile. Selleks tuli ette valmistada ülekande(*transfer*-)mehhanism, mis koosnes järgnevatest vahenditest: vann, klaasplaadid, 3M *Whatman* paberist ja filterpaberitest (2tk) sild üle klaasplaadi, nailonfilter (*AppliChem, ReprobeNylon Positively Charged Transfer membrane* 0,45µm), paberrätikud, parafilmiribad ja raskus. Enne kasutamist tegin kõik (välja arvatud pealmine *Whatman* paber ja paberrätikud) komponendid märjaks 10x SSC ülekandepuhvril (*saline-sodium citrate*; 1,5M NaCl, 150mM Na-tsitraat, pH viidud paika 7-ni HCl-ga). Kõige viimasena asetasin peale paberrätikud, mis võimaldasid kapillaarsuse mõjul ülekandel toimuda. Ülekanne kestis 10-12

tundi. Peale ülekannet tegin nailonfiltrile (mille küljes oli nüüd DNA) *UV-crosslink*'i (kiiritasin nailonfiltrit -DNA pool kiirguse poole- UV-kiirgusega) 24 sekundit ehk 120mJ.



Joonis 3. Southern blot. Vanni peale asetasin klaasplaadi, millele asetasin silla, mis koosnes kahest filterpaberist ning ühest *Whatman* paberist (*Whatman* paber oli kõige pealmine), mis olid eelnevalt märjaks tehtud ülekandepuhvris. Seejärel asetasin silla peale geeli ning geeli peale nailonfiltrit, vahetult klaaspiipetiga rullides ning ülekandepuhvrit lisades, et vältida õhumullide tekkimist. Nailonfiltrit peale asetasin sama suure märjaks tehtud *Whatman* paberi. Seejärel katsin kõik vanni avatud osad parafilmiribadega, et vältida aurustumist mujalt ning suunata ülekanne minu soovitud suunas (nailonfiltrit suunas). Viimaseks etapiks ja ühtlasi ülekande alustamise etapiks oli paberrätikute asetamine pealmise *Whatman* paberi peale. Paberrätikute peale asetasin ka klaasplaadi, et raskust ühtlasi jaotada ning selle peale raskuse, mis kaalus umbes 0,5 kg kilogrammi.

Peale *transfer*'it (ülekannet) ning *UV-crosslink*'i tegemist oli vaja teha radioaktiivne proov, mis seonduks spetsiifilise nailonfiltril oleva DNA-s, järjestusega. Selleks tegin radioaktiivse PCR-proovi, milleks nukleaarse proovi korral oli *DNA2* proov (radioaktiivne proov on komplementaarne geeni *DNA2* järjestusega) ning mitokondriaalse proovi korral *ori2* proov (radioaktiivne proov on komplementaarne *ori* järjestusega mtDNA-s). Nukleaarse proovi puhul oli amplifitseeritav fragment 359 nukleotiidi pikkune ning mitokondriaalse proovi korral 280 nukleotiidi pikkune. PCR proovi puhastasin peale reaktsiooni vastavalt eelnevalt kirjeldatud protokollile (vaata 2.2.3 PCR produktide puhastamine). Selleks, hinnata prooviradioaktiivsuse taset, kasutasin masinat *Tri-Carb 2800TR Liquid Scintillation Analyzer*, firmalt *PerkinElmer*.

Mõõtsin radioaktiivsust nii sadet sisaldavas TEN-puhvris üles võetud proovis kui ka mõlemas (96% ja 70%) etanooli lahuses. DNA proov oli sobilik kasutada sel juhul kui kõige tugevam signaal oli TEN-puhvris üles võetud proovis (vaata ka lisa 5. Masinaga *Tri-Carb 2800TR Liquid Scintillation Analyzer* mõõdetud radioaktiivsus).

Enne radioaktiivse proovi lisamist nailonfiltrile (hübridisatsioon) tuli eelnevalt teha nõ *pre-hybridization* ehk eelhübridisatsioon. Selleks panin nailonfiltri eelkuumutatud 65°C hübridiseerimistorru ning lisasin 30ml *Church* puhvrit [1mM EDTA, 7% SDS, 0,5% BSA, 0,25M NaPO₄ (pH=7,5)](eelkuumutatud 65°C). Eelhübridiseerimine kestis 30 minutit 65°C juures, toru pöörles 4-5rpm. Seejärel vahetasin puhvri välja uue, 20ml puhvri vastu ning lisasin eelnevalt denatureeritud radioaktiivse PCR proovi (5 minutit 95°C juures, peale mida jahutasin proovi jääl) otse torus olevasse lahusesse, nii, et proov ei puutuks otse kokku nailonfiltriga. Seejärel panin toru hübridisatsiooniahju 65°C juurde ning lasin hübridisatsioonil toimuda 8-10 tundi (üleöö) pööretel 4-5rpm. Hübridiseerimise viisin läbi hübridisatsiooniahjus *Techne Roller-Blot Hybridiser HB-3D*.

Peale hübridisatsiooni kogusin seundumata radioaktiivset proovi sisaldava *Church* puhvri 50ml tuubi ja viskasin radioaktiivsete jäätmete konteinerisse. Seejärel lisasin torru, kus oli nailonfilter, 50ml pesupuhvrit [1mM EDTA, 5% SDS, 40mM NaPO₄ (pH=7,5)](eelkuumutatud 65°C), loputasin ning valasin puhvri ära. Seejärel pesin nailonfiltrit hübridisatsiooniahjus 2x15 minutit 50ml pesupuhvriga 65°C juures, vahetades vahepeal puhvri välja. Peale viimast pesutsükli kuivatasin nailonfiltri filterpaberiga kuivemaks ja panin kilekaante vahele ning asetasin *Amersham Biosciences Storage Phosphor Screen* ilmutuskassetti. Peale vastava eksponeerimisaja (nukleaarse proovi puhul 3 päeva ning mitokondriaalse proovi puhul 12-16 tundi) skaneerisin pildi kasutades *Typhoon Phosphoimager* masinat. Kvantiteerimisel kasutasin programmi ImageQuant TL v2005.

Juhul, kui soovisin nailonfiltrile panna peale nii nukleaarse proovi kui ka mitokondriaalse proovi, tuli selleks kõigepealt nukleaarne prooviga pilt skaneerida ja siis vastav proov maha pesta. Selleks lisasin torus olevale nailonfiltrile 250ml 0,4M NaOH-d (eelkuumutatud 45°C) ning panin toru pöörlema 4-5rpm 45°C juures 15 minutit. Seejärel vahetasin puhvri välja ning kordasin sama. Seejärel neutraliseerisin nailonfiltri SolB-ga loksutades nailonfiltrit puhvris loksutil 10 minutit. Sellega oli nukleaarne proov maha pestud ning nailonfilter valmis mitokondriaalse proovi hübridisatsiooniks, mida teostasın sarnaselt nukleaarse proovi hübridisatsiooniga.

2.2.9 Pagaripärmi rakkude värvimine DAPI meetodil

DAPI-ga (4',5-diamidino-2-fenüülindool) värvimist kasutasin, et lokaliseerida rakusisest DNA-d, kuna DAPI seondub A/T-rikaste aladega DNA-s ning on ultravioletis fluorestseeruv. Ka on DAPI-l võime läbida rakumembraani.

Võtsin tassilt ühe koloonia jagu rakke või ~0,5ml üleöö (12-14h) kasvatatud kultuuri ning pesin mQ-veega kaks korda: selleks lisasin ~1ml mQ vett, tsentrifugeisin lauatsentrifuugis 1 minut 5000rpm ning eraldas supernatandi. Seejärel fikseerisin rakud, lisades 200µl 96% etanooli, segades rakke vorteksil ning hoides neid -20°C juures 10 minutit. Peale seda pesin rakke ühe korra mQ veega nagu eelnevalt mainitud. Järgnevalt teostasin kõik etapid võimalikult pimedas, kuna DAPI laguneb valge valgusega kokkupuutel. Lisasin rakkudele 50µl DAPI lahust (1ng/µl mQ vees), segasin rakke õrnalt ning hoidsin rakususpensiooni 1 minut toatemperatuuril. Seejärel tegin rakkudele mQ veega pesu neli korda. Peale viimast tsentrifugeerimist eraldas vee ära nii, et alles jääks 20-30µl vett. Suspendeerisin rakud, et tekiks ühtlane rakususpensioon ning kandsin ühe tilga rakususpensiooni alusplaadile ja ajasin suspensiooni võimalikult laiali. Seejärel kuivatasin alusplaadil olevaid rakke 1-2 minutit 37°C juures (pimedas). Kui alusplaat oli kuiv, lisasin alusplaadile 30µl AntiFade'i [1mg/ml p-fenüleendiamiin, 1/10 mahtu 1x PBS puhvrit (*phosphate-buffered saline*; 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄), 90% glütserool]. AntiFade'i peale panin katteklaasi ning mikroskopeerisin rakke immersioonõlis 1000x suurendusega U-filtriga fluorestsentsmikroskoobis *Olympus BX61*, kasutades programmi cellSens Standard (*Olympus*)(vaata Lisa 6. DAPI-ga värvitud pagaripärmi rakud).

2.3 Tulemused ja arutelu

Käesolevas bakalaureusetöös uuritakse valkude Rpo41, Mgm101 ja Mhr1 deletsiooni mõju pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalse DNA stabiilsusele ja hulgale. Selleks kasutati antud töös algtüvena pärmitüve W303 MATa HSp⁻ a1184, millest deleteeriti nimetatud valgud, kasutades selleks liitiumatsetaat-dimetüülsulfoksiid-transformatsioonimeetodit ning seejärel analüüsiti mutantidest eraldatud DNA-d *Southern blot* meetodil. Tüve HSp⁻ a1184 mtDNA fragmendi suuruseks on 1184bp ja see sisaldab funktsionaalset *ori2* järjestust.

Uuritavatel valkudel on järgnevad funktsioonid: Rpo41 on mitokondriaalne RNA polümeraas, mis osaleb mitokondriaalsel transkriptsioonil ja võimalik, et ka replikatsioonil, sest *in vitro* katsetega on näidatud, et Rpo41 on võimeline sünteesima praimereid mtDNA replikatsiooni *ori* promootorilt (Graves *et al.*, 1998; Ramachandran *et al.*, 2016; Sanchez-Sandoval *et al.*, 2015). Valk Mgm101 on Rad52-tüüpi valk, millel arvatakse olevat roll homoloogilisel rekombinatsioonil ja seeläbi potentsiaalselt roll nii reparatsioonil kui ka replikatsioonil (Mbantenkhu *et al.*, 2011; Pevala *et al.*, 2016; Zuo *et al.*, 2002). Valgu Mhr1 funktsioonid ei ole tänase seisuga veel selged, kuna varasemalt on näidatud, et tegu võiks olla samuti rekombinatsiooniga (Ling *et al.*, 2013), kuid uuemad andmed näitavad, et tegu on hoopis mitoribosoomi koosseisu kuuluva valguga (Amunts *et al.*, 2014; Woellhaf *et al.*, 2016).

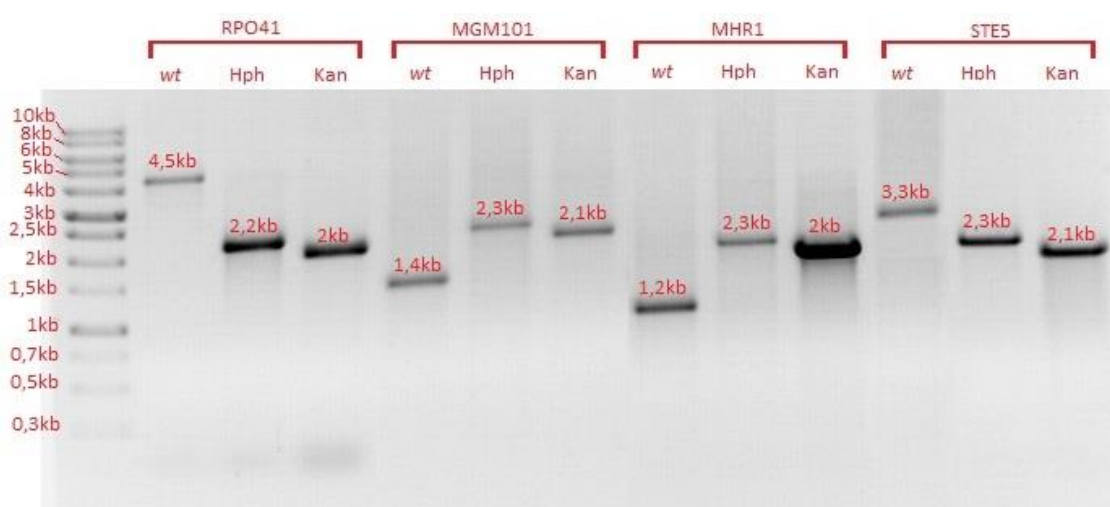
2.3.1 Töös kasutatud pärmitüvede valmistamine

Valkude Rpo41, Mgm101 ja Mhr1 deletsioonitüved tegin algtüvest a1184. Kontrollina deleteerisin valgu Ste5, mis osaleb MAP-kinaas kaskaadides proteiinkinaaside omavahelisel ühendamisel. Seega osaleb Ste5 signaaliülekanne, kaasaarvatud näiteks feromoon-aktiveeritud signaalirajas haploidsete pärmirakkude paardumisel. Samas ei põhjusta Ste5 deletsioon muutusi mtDNA stabiilsuses (Gustin *et al.*, 1998). STE5 deletsiooni kasutasin, vältimaks, et antibiootikumi kasseti transformatsiooni tulemusena tekitatud mõjutusi ei loetaks valgu deletsiooni poolt esile kutsutud fenotüübina. Tekkinud mutante uurisin *Southern blot* meetodiga ning kasutasin kvantiteerimiseks programmi ImageQuant TL v2005.

Mutante selekteerisin YPD tassidel, kasutades üksikmutantide selekteerimiseks hügromütsiin B-d ning topeltnutantide selekteerimiseks G418-t. Tänu sellele said tassidel kasvada vaid need rakud, millesse oli toimunud vastavalt Hyg^R geeni insertioon (üksikmutantide puhul) või Kan^R geeni insertioon (topeltnutantide puhul). Tüvede kontrollimiseks eraldas neist DNA LiOAc meetodiga (vaata 2.2.5 DNA eraldus LiOAc meetodil (Lööke *et al.*, 2011) ning kasutasin iga tüve puhul kahte praimerit (vaata Tabel 3. Töös kasutatud praimerid), et amplifitseerida vastavat fragmenti PCR-meetodiga (vaata ka Tabel 4. Töös kasutatud PCR reaktsioonid).

Tüvede kontrollimisel lähtusin sellest, et antibiootikumikasseti insertioonil jääb vastava geeni *ORF*-ist üles-ja allavoolu (promootorala ja terminaatorala) olev regioon muutumatuks. Antibiootikumi kassetide suuruste erinevused erinevate geenide deleteerimisel tulenesid nende tüvede kontrollimiseks disainitud praimeerite asukohtadest. Seetõttu oli PCR-ga amplifitseerimisel MHR1 lookuse kontrollil metsiktüüpi (ilma antibiootikumikasseti insertioonita) fragment 1249bp, hph-kasseti insertioonil 2313bp ning kan-kasseti insertioonil 2080bp. RPO41 puhul olid nendeks suurusteks 4547bp, 2236bp ja 2003bp, MGM101 puhul 1436bp, 2366bp ja 2133bp ning STE5 puhul 3335bp, 2326bp ning 2093bp.

Joonisel 4 on toodud PCR-produktide agarosegeelis voolutamise tulemusena saadud pilt. Mutantide tõesuse kontrollimisel lähtusin eelnevalt mainitud fragmentide suurustest.



Joonis 4. Mutantide kontroll PCR meetodiga. Pilt on saadud agaroselektroforeesil, milleks kasutasin 0,8% agarosegeeli. Vasakul on marker ning vastavad suurused kb (tuhat aluspaari). Joonisel on märgitud ka vastavate fragmentide suurused (punasega).

Üksikmutantide puhul pidi üles amplifitseeritav fragment olema vastavalt joonisel 4 toodud Hph fragmendi suurusega ning topeltmutantide puhul Kan fragmendi suurusega. Samuti kasutasin alati kontrollina metsiktüüpi fragmendi suurust (joonisel *wt*). Topeltmutantide puhul amplifitseerisin üles nii esmase –hph- fragmendi kui ka teise deletsiooniga –kan- tekkinud fragmendi, et kontrollida mõlema geeni deletsiooni. Kasutatud praimeerid on toodud Tabelis 3 ning kasutatud PCR reaktsioonid Tabelis 4.

Geenide RPO41 ja STE5 suhtes mutantsete tüvede kontrollimisel eeldasin, et metsiktüüpi geen on suurem, kui mutantne geen ning geenide MGM101 ja MHR1 puhul on metsiktüüpi geen väiksem, kui mutantne geen. Tüvede kontrollimisel selgus, et kõik mutandid on tõesed ning sisaldavad vastavalt kas Hyg^R resistentsusgeeni (üksikmutantide puhul) või Kan^R

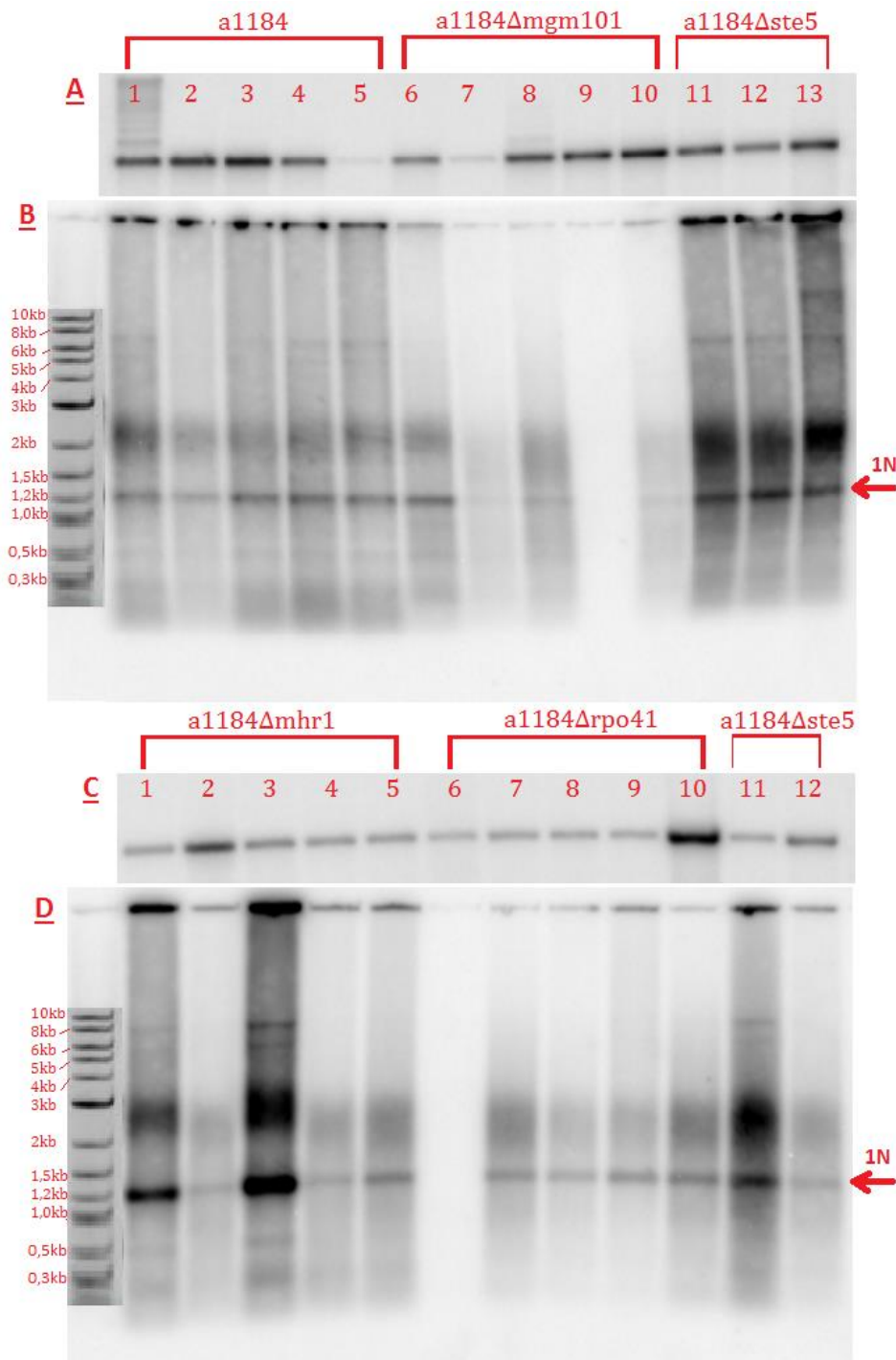
resistentsusgeeni (topelmutantide puhul). Seega oli transformatsioon edukalt õnnestunud ning tekkinud mtDNA fenotüüpi sai lugeda vastava valgu deletsioonist põhjustatuks.

2.3.2 a1184 tüvede Δ rpo41, Δ mgm101, Δ mhr1 ja Δ ste5 mtDNA analüüs

Selleks, et eraldada mtDNA analüüsiks DNA-d, valisin eelnevalt kontrollitud tüvede kasvatamiseks YPD tassilt (mis sisaldas hph-d) viis kolooniat ning kasvasin neid vedelsöötmes. Kasvatatud kultuurist eraldas DNA ning lõikasin seda restriктаasiga DraI, mis lõikab ainult ühe korra tüve a1184 mtDNA fragmenti (mis on 1184kb pikkune ning kordub) (vaata Joonis 2. Pagaripärmi tüve HSp⁻ a1184 mtDNA skeem). Restriksioonil tekkinud fragmendid lahutasin agarosgeelil (1%) ning kandsin seejärel fragmendid positiivselt laetud nailonfiltrile, peale mida tegin *UV-crosslink*'i, et DNA kinnituks permanentselt filtrile. Seejärel panin kõigepealt peale nukleaarse proovi, milleks oli radioaktiivselt märgistatud (α -³²P-dCTP) 359bp pikkune fragment, mis hübridiseerus geeni *DNA2* 3932bp pikkuse järjestusega (Joonis 5, paneelid A ja C). Peale nukleaarse radioaktiivse prooviga hübridiseerimist ning filtri skaneerimist sain pildi, mille põhjal selgus, et DNA on kõigis proovides olemas.

Selleks, et uurida, milline on mõju mitokondriaalse DNA stabiilsusele nende valkude deleteerimisel, eemaldas filtrilt nukleaarse proovi ning panin peale mitokondriaalse proovi, mille puhul oli hübridiseeruva fragmendi pikkuseks 280bp pikkune *ori*-järjestusega komplementaarne fragment (Joonis 5, paneelid B ja D).

Joonisel 5 on toodud üksikmutantide (a1184 Δ rpo41, Δ mgm101, Δ mhr1 ja Δ ste5 tüvede) mtDNA analüüs *Southern blot* meetodil saadud pildina.



Joonis 5. a1184 Δ rpo41, Δ mgm101, Δ mhr1 ja Δ ste5 tüvede mtDNA analüüs *Southern blot* meetodil. Vasakul ääres on marker, mis on mitokondriaalse proovi korral ka osaliselt hübridiseerinud ning annab signaali. Selle järgi sain tuletada ka ülejäänud markeri ribad (märgitud joonisel). Ülemisel peenemal ribal on mõlema pildi puhul (paneelid A ja C) nukleaarse prooviga saadud pilt. Ülemisel pildil (paneel B): radadel **1-5 on a1184 (*wt*) fragmendid, radadel **6-10** on a1184 Δ mgm101 ning radadel **11-13** on a1184 Δ ste5. Alumisel pildil (paneel D): radadel **1-5** on a1184 Δ mhr1, radadel **6-10** on a1184 Δ rpo41 ning radadel **10-12** on a1184 Δ ste5. Pildil on märgitud ka 1N fragment, mis tekib DNA restriteerimisel. Filtrit eksponeerisin 16 tundi mitokondriaalse proovi korral ning ~3 päeva nukleaarse proovi korral.**

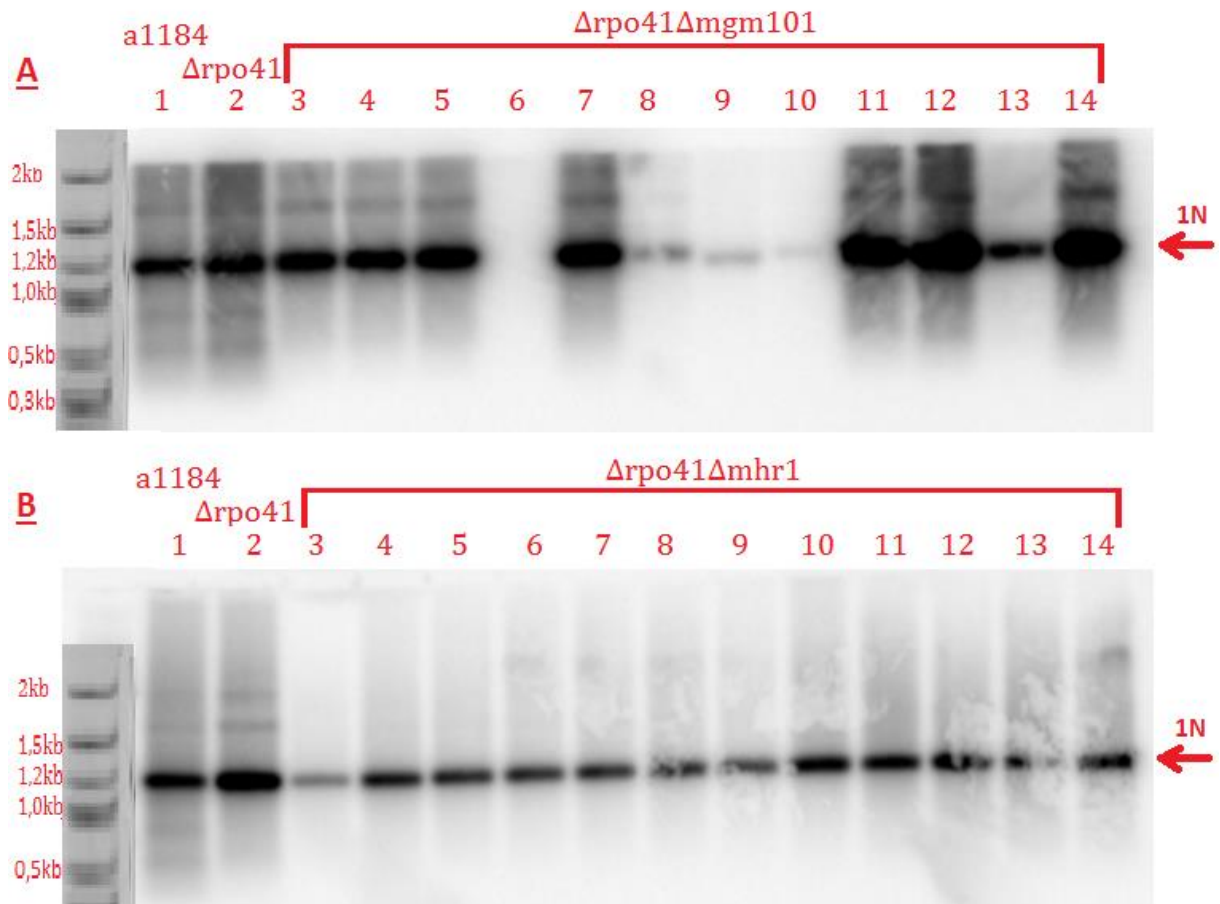
Joonise 5 analüüsimisel selgus, et nii MGM101 kui ka RPO41 deletsioon põhjustab mtDNA ebastabiilsust, põhjustades rho⁰ fenotüübi tekkimist ühes proovil viiest. Rho⁰ fenotüüp kujutab endast tühja rada mitokondriaalse prooviga pildil, juhul, kui nukleaarne signaal on olemas (paneel B, rada 9 ning paneel D, rada 6). Metsiktüübi (joonisel *wt*) puhul on mtDNA säilinud, sama ka STE5 deletsiooni korral. Paneelil D on näha, et MHR1 deletsioon rho⁰ fenotüüpi esile ei kutsu. Paneelidel B ja D on näha, et mtDNA hulk ei ole mutantides sama ja seda eriti võrreldes metsiktüübiga. Paneelidel A ja C on veel näha, et DNA-d ei ole piltidel sama palju (kuna nukleaarne signaal ei ole ühtlase tugevusega, nt rajad 5 ja 7 paneelil A on nõrgema signaaliga) ja üksikmutantide analüüsist selgus, et vastavate geenide deleteerimisel siiski mtDNA säilib ja seega toimub ka replikatsioon. Üksikmutantide puhul ei kasutanud ma DNA eraldamiseks proteinaas K ja fenoolkloroform töötlust, mistõttu ei olnud DNA ja ka saadud pilt kõige kvaliteetsemad.

Kuna polnud teada, milline on fenotüüp kahe replikatsioonis osaleva valgu deletsioonil, otsustasin edaspidi analüüsida topeltmutante. Topeltmutandid tegin kõigis võimalikes variatsioonides. Selleks eksperimendiks puhastasin DNA põhjalikumalt, kasutades proteinaas K töötlust järgneva fenoolkloroform töötluse ja sadestamisega.

2.3.3 a1184 topeltmutantide mtDNA analüüs

Topeltmutantide analüüsimiseks deleteerisin esmalt a1184 Δ rpo41 tüvest geenid MHR1, MGM101 ja STE5, a1184 Δ mgm101 tüvest geenid RPO41, MHR1 ja STE5, a1184 Δ mhr1 tüvest geenid RPO41, MGM101 ja STE5 ning a1184 Δ ste5 tüvedest geenid RPO41, MGM101 ja MHR1. Seejärel valisin YPD tassilt (mis sisaldas nii hph-d kui ka G418-t) 12 kolooniat, mida kasvasin edasi 20ml vedelsöötmes. Seejärel eraldasid kultuurist DNA ning lõikasin seda restriktasiga DraI ning talitlesin edasi sarnaselt sellele, nagu ka üksikmutantide puhul, kuid ei kasutanud sel korral nukleaarset proovi, kuna DNA olemasolu lahuses kontrollisin agaroselektroforeesil saadud pildiga (vaata lisad 2-4, kus on toodud vastavate tüvede analüüsimisel saadud etiidiumbromiidiga värvitud agaroselektroforeesi pilt).

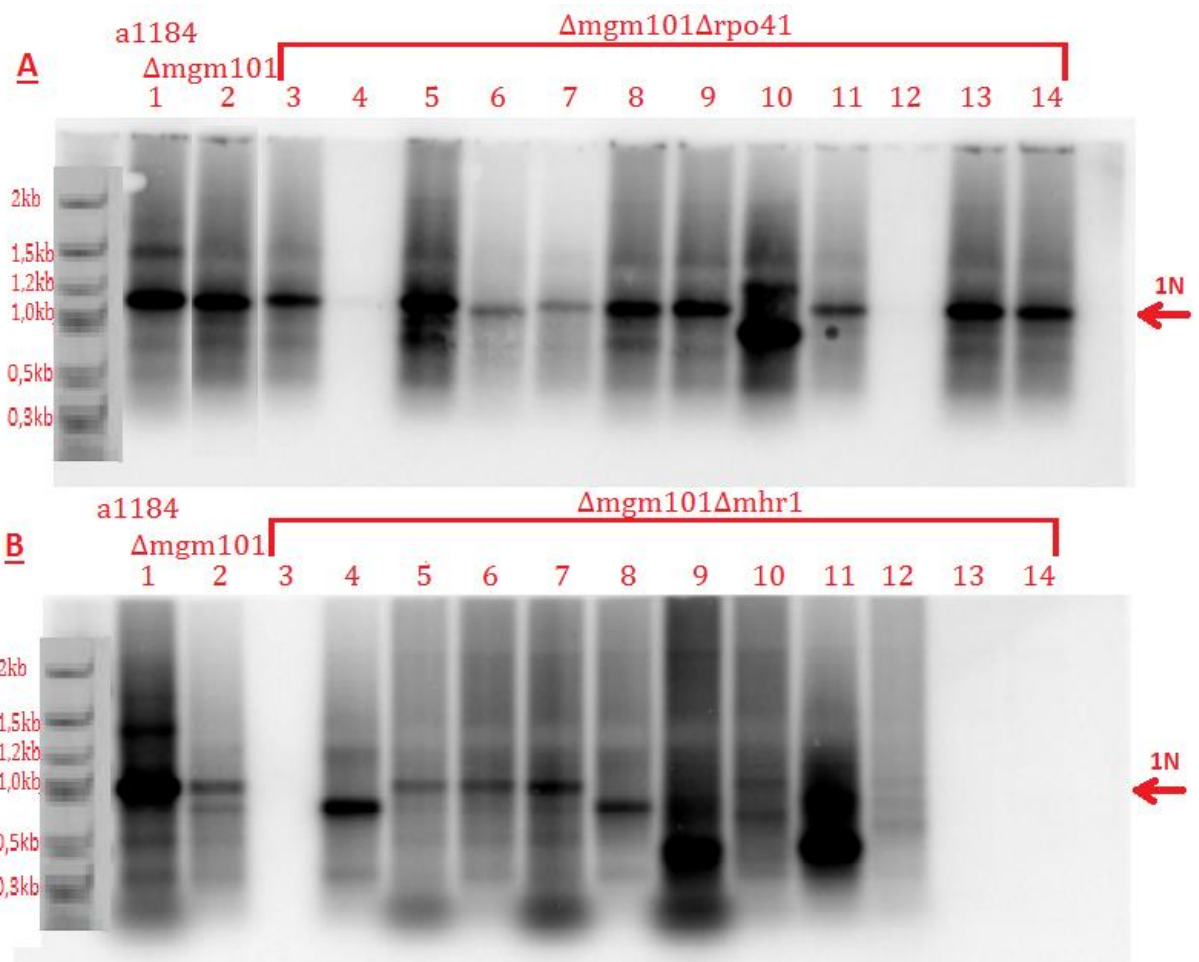
Järgnevalt on Joonisel 6 toodud a1184 tüvede Δ rpo41 Δ mgm101 ja Δ rpo41 Δ mhr1 mtDNA analüüs.



Joonis 6. a1184 $\Delta rpo41 \Delta mgm101$ ja $\Delta rpo41 \Delta mhr1$ tüvede mtDNA analüüs. Mõlemal pildil on vasakul ääres marker. Rajal 1 on mõlemal pildil a1184 (*wt*). Rajal 2 on mõlemal pildil a1184 $\Delta rpo41$ ning radadel 3-14 on ülemise pildi (paneel A) puhul a1184 $\Delta rpo41 \Delta mgm101$ ning alumise pildi (paneel B) puhul a1184 $\Delta rpo41 \Delta mhr1$. Pildil on märgitud ka lõikamisel tekkiv 1N fragment. Filtrit eksponeerisin 16 tundi.

Joonisel 6 paneelil A on näha, et MGM101 deleteerimine a1184 $\Delta rpo41$ tüvest põhjustab väikese sagedusega (1/12) ρ^0 fenotüübi teket (paneel A, rada 6) ning kolmel proovil 12-st (paneel A, rajad 8-10) on mtDNA hulk märkimisväärselt vähenenud. MHR1 deletsioon a1184 $\Delta rpo41$ tüvest ρ^0 fenotüüpi ei põhjusta (paneel B).

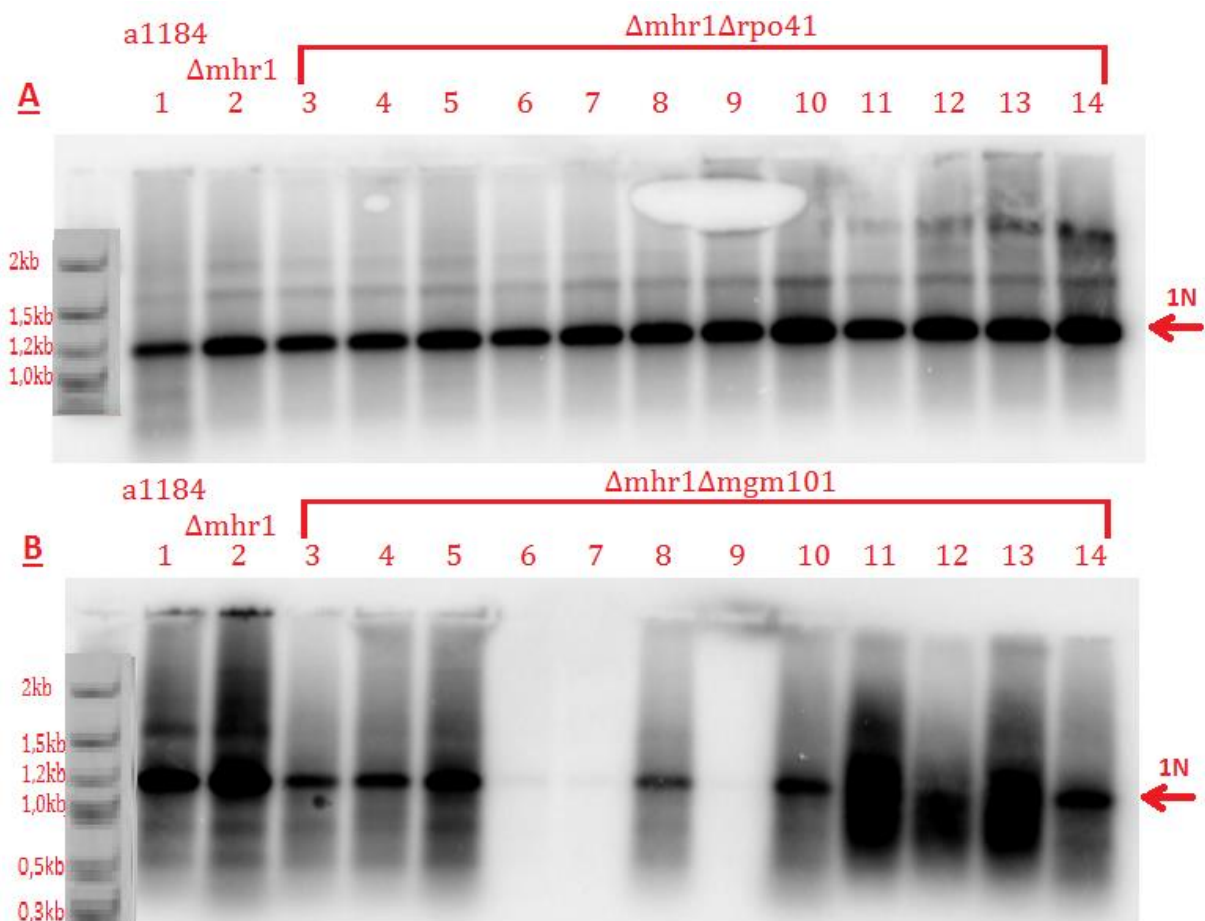
Joonisel 7 on toodud a1184 tüvede $\Delta mgm101 \Delta rpo41$ ja $\Delta mgm101 \Delta mhr1$ mtDNA analüüs.



Joonis 7. a1184 $\Delta mgm101\Delta rpo41$ ja $\Delta mgm101\Delta mhr1$ tüvede mtDNA analüüs. Mõlemal pildil on vasakul ääres marker. Mõlemal pildil on rajal 1 a1184 (*wt*), rajal 2 a1184 $\Delta mgm101$ ning radadel 3-14 vastavalt ülemise pildi (paneel A) puhul a1184 $\Delta mgm101\Delta rpo41$ ning alumise pildi (paneel B) puhul a1184 $\Delta mgm101\Delta mhr1$. Pildil on märgitud ka lõikamisel tekkiv 1N fragment. Filtrit eksponeerisin 16 tundi.

Joonisel 7 on näha, et RPO41 deletsioon tüvest a1184 $\Delta mgm101$ põhjustab väikese sagedusega (2/12) ρ^0 fenotüübi teket (paneel A, rajad 4 ja 12). Ka on näha, et MHR1 deletsioon tüvest a1184 $\Delta mgm101$ põhjustab sagedusega 3/12-st ρ^0 fenotüübi (paneel B, rajad 3, 13 ja 14) teket. Paneeli B puhul on näha ka, et mitmes proovis (näiteks rajad 4, 8 ja 10) on toimunud mtDNA fragmenteerumine (esineb 1N-ist väiksemaid – allpool olevaid – ribasid).

Järgnevalt on Joonisel 8 toodud a1184 tüvede $\Delta mhr1\Delta rpo41$ ja $\Delta mhr1\Delta mgm101$ mtDNA analüüs.



Joonis 8. a1184 $\Delta mhr1\Delta rpo41$ ja $\Delta mhr1\Delta mgm101$ tüvede mtDNA analüüs. Mõlemal pildil on vasakul ääres marker. Mõlemal pildil on rajal 1 a1184 (*wt*) ning rajal 2 a1184 $\Delta mhr1$. Radadel 3-14 on vastavalt ülemise pildi (paneel A) puhul a1184 $\Delta mhr1\Delta rpo41$ ning alumise pildi (paneel B) puhul a1184 $\Delta mhr1\Delta mgm101$. Pildil on märgitud ka lõikamisel tekkiv 1N fragment. Filtrit eksponeerisin 16 tundi.

Joonise 8 paneeli A analüüsil selgub, et RPO41 deletsioon 1184 $\Delta mhr1$ tüvest ei põhjusta rho⁰ fenotüüpi. Samas on alumisel pildil (paneel B) näha, et MGM101 deletsioon tüvest a1184 $\Delta mhr1$ põhjustab sagedusega 3/12-st rho⁰ fenotüübi teket (rajad 6, 7 ja 9).

Saadud piltidest selgus, et teatud deletsioonid põhjustavad teatud sagedusega rho⁰ fenotüübi teket (a1184 $\Delta rpo41\Delta mgm101$ Joonisel 6, a1184 $\Delta mgm101\Delta rpo41$ ja a1184 $\Delta mgm101\Delta mhr1$ Joonisel 7 ning a1184 $\Delta mhr1\Delta mgm101$ Joonisel 8) ja tõenäoliselt mtDNA hulga vähenemist (Joonis 6, paneel A, rajad 8, 9 ja 10 ning Joonis 7, paneel A, rajad 6 ja 7).

RPO41 deletsioonist tingitud rho⁰ fenotüübi tekke põhjuse osas võib spekuloida, et kuna RPO41 puudumisel pole takistatud mtDNA süntees transkriptsiooni poolt ning mtDNA süntees on seetõttu efektiivne, mis omakorda põhjustab konkatemeeride pikenemise (Sedman *et al.*, 2014). Seetõttu võib esineda olukord, kus mtDNA on liiga mahukas, et punga ära mahtuda ning

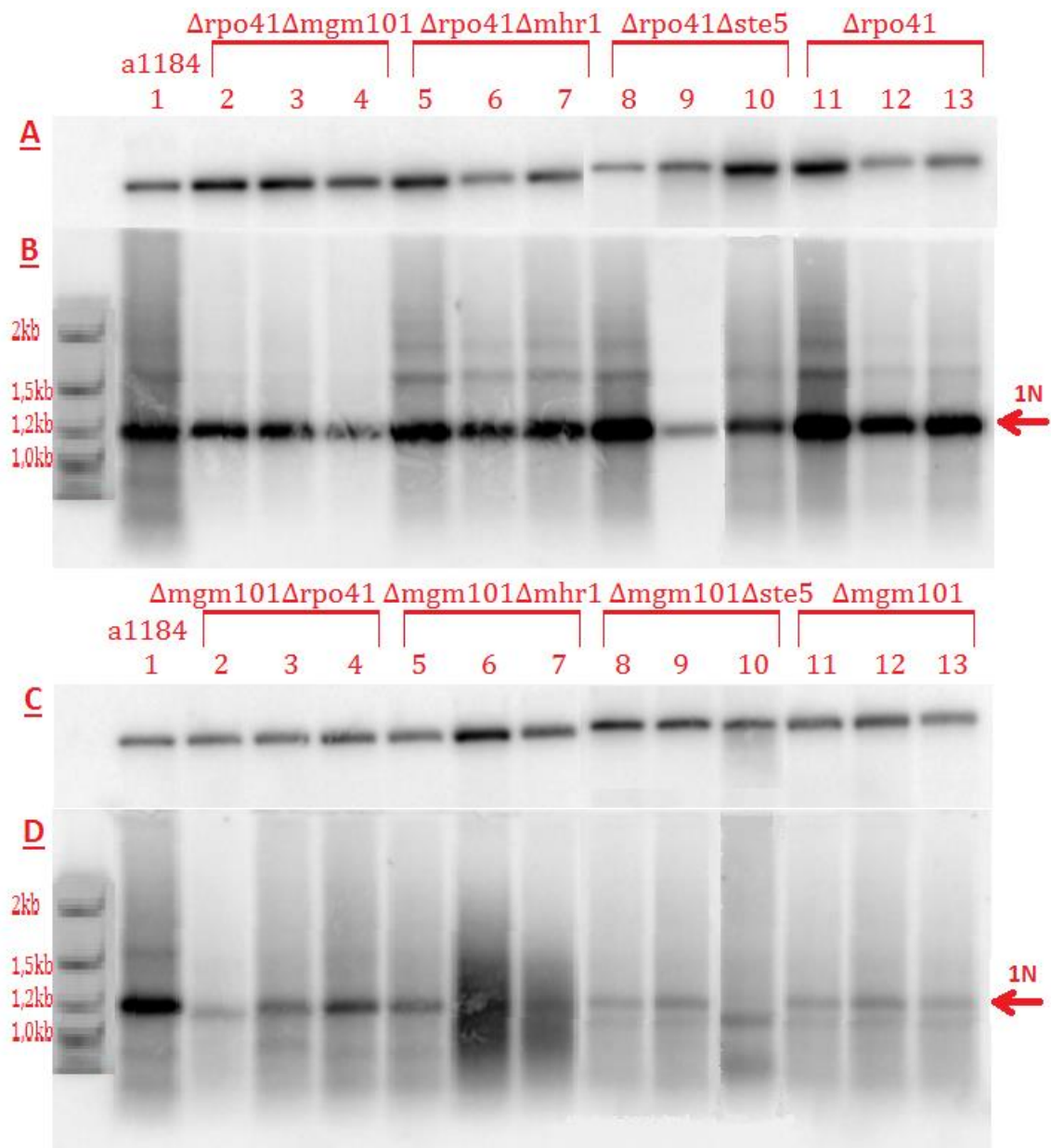
ei pärandu järglastele ja nii tekib rho⁰ järglaskond. Mina oma analüüsis sellist DNA pikenemist ei näinud, kuid see arvatavasti tulenes erinevast DNA eraldamismeetodist, minu puhul oli selleks genoomse DNA eraldus aga nimetatud artiklis analüüsiti puhastatud mtDNA-d. MGM101 deletsioonist tingitud rho⁰ fenotüüp tekkib tõenäoliselt seetõttu, et mtDNA reparatsiooni –ja replikatsioonirajad on häiritud. Samuti on ilmselt a1184Δmgm101Δmhr1 tüve puhul rho⁰ fenotüüp tekitatud MGM101 deletsioonist ja mitte MHR1 deletsioonist, kuna a1184Δrpo41Δmhr1 (Joonis 6, paneel B) tüve puhul rho⁰ fenotüübi teket ei märganud ning a1184Δmhr1 üksikmutant oli stabiilsem, kui a1184Δrpo41 või a1184Δmgm101 üksikmutant (vaata Joonis 5, paneelid B ja D).

Kuna topeltmutantide puhul ma esialgu nukleaarset proovi ei kasutanud aga analüüsil selgus, et suure tõenäosusega on muutused ka pärandatavas mtDNA hulgas, otsustasin edaspidi analüüsida mtDNA hulka topeltmutantides, kasutades kvantitatiivset analüüsimeetodit.

2.3.4 a1184 topeltmutantide mtDNA hulga kvantitatiivne analüüs

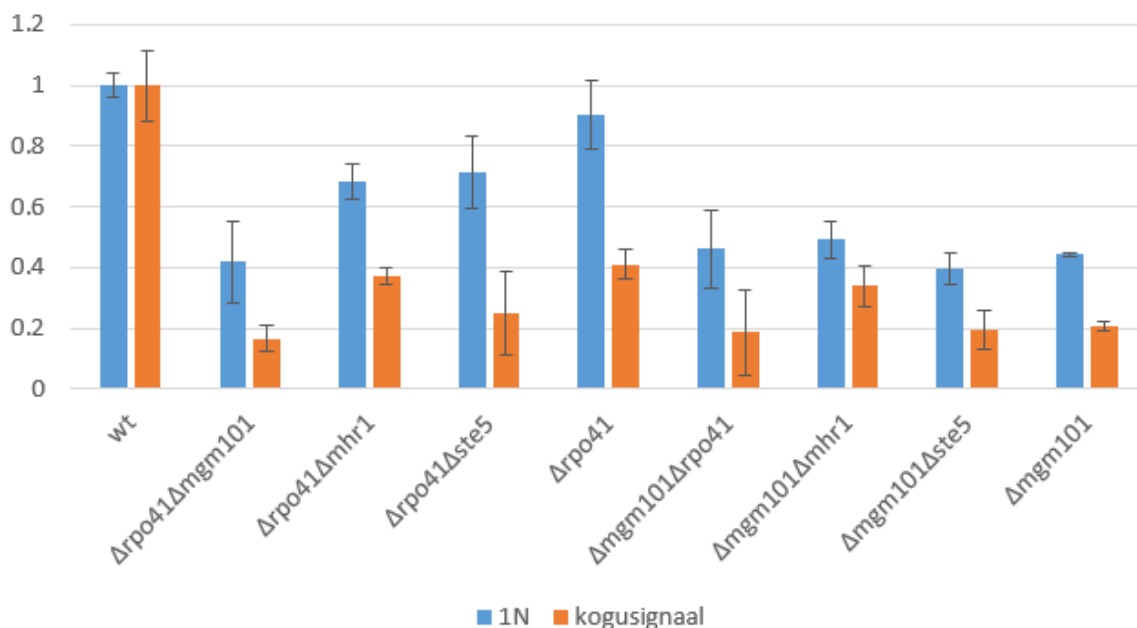
Kvantiteerimiseks valisin igast mutandi variatsioonist kolm kolooniat, mille kasvasin 20ml vedelsöötmes. Selleks, et olla kindel, et tegemist ei ole rho⁰ kolooniaga, kasutasin 0,5ml kultuurist selleks, et kontrollida mtDNA olemasolu eelnevalt DAPI-meetodiga (vaata 2.2.9 Pagaripärmi rakkude värvimine DAPI meetodil ja Lisa 6. DAPI-ga värvitud pagaripärmi rakud). Kui olin DAPI-ga värvitud rakkude mikroskopeerimisel veendunud, et tegemist ei ole rho⁰ kultuuriga, eraldasid ülejäänud kultuurist DNA, lõikasin seda restriktasiga DraI ning analüüsisin *Southern blot* meetodiga, kasutades nii nukleaarset proovi kui ka mitokondriaalset proovi. Saadud nukleaarse (Joonised 9 ja 11, paneelid A ja C) ja mitokondriaalse (Joonised 9 ja 11, paneelid B ja D) proovi pilte kasutasin kvantitatiivanalüüsil, võrreldes mtDNA signaali tugevust nukleaarse signaali tugevusega (vastavalt Joonised 10 ja 12). Ka võrdlesin saadud andmeid metsiktüübi vastu, et näha, millised muutused on toimunud minu uuritava rho⁻ pärmitüve mtDNA-s peale vastavate valkude deletsiooni (*wt* Joonistel 10 ja 12).

Joonisel 9 on toodud a1184 Δrpo41Δmgm101, Δrpo41Δmhr1, Δrpo41Δste5, Δrpo41, Δmgm101Δrpo41, Δmgm101Δmhr1, Δmgm101Δste5 ja Δmgm101 tüvedest eraldatud DNA *Southern blot* meetodiga analüüsimisel saadud pilt. Paneelidel A ja C on vastavate tüvede nukleaarsed signaalid ning paneelidel B ja D vastavate tüvede mtDNA signaalid.



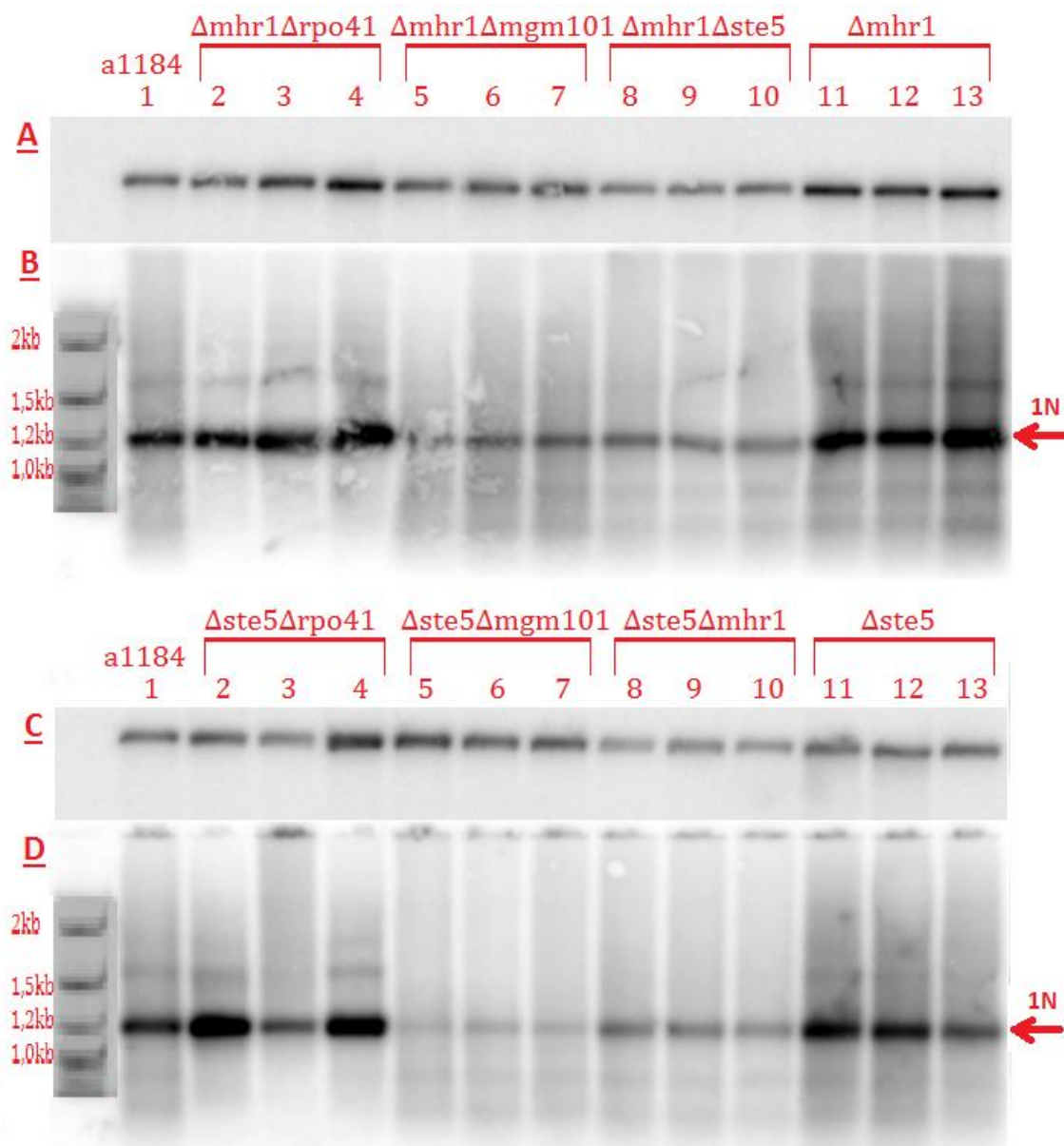
Joonis 9. a1184 $\Delta rpo41\Delta mgm101$, $\Delta rpo41\Delta mhr1$, $\Delta rpo41\Delta ste5$, $\Delta rpo41$, $\Delta mgm101\Delta rpo41$, $\Delta mgm101\Delta mhr1$, $\Delta mgm101\Delta ste5$ ja $\Delta mgm101$ tüvede nukleaarse ja mtDNA analüüs. Mõlemal pildil on vasakul ääres marker. Mõlemal pildil on ka ülemine peenem riba (paneelid A ja C), millel on vastavad nuklearsed signaalid. Ülemine pilt (paneel B): rajal 1 on a1184 (*wt*), radadel 2-4 on a1184 $\Delta rpo41\Delta mgm101$, radadel 5-7 on a1184 $\Delta rpo41\Delta mhr1$, radadel 8-10 on a1184 $\Delta rpo41\Delta ste5$ ning radadel 11-13 on a1184 $\Delta rpo41$. Alumine pilt (paneel D): rajal 1 on a1184 (*wt*), radadel 2-4 on a1184 $\Delta mgm101\Delta rpo41$, radadel 5-7 on a1184 $\Delta mgm101\Delta mhr1$, radadel 8-10 on a1184 $\Delta mgm101\Delta ste5$ ning radadel 11-13 on a1184 $\Delta mgm101$. Joonisel on märgitud ka 1N fragment, mis tekib lõikamisel. Filtrit eksponeerisin nukleaarse proovi korral ~3 päeva ning mitokondriaalse proovi korral 16 tundi.

Joonisel 10 on toodud Joonisel 9 esitatud nukleaarsete (paneelid A ja C) ning mtDNA (paneelid B ja D) signaalide analüüsimisel saadud tulpdiagramm vastavate tüvede kohta.



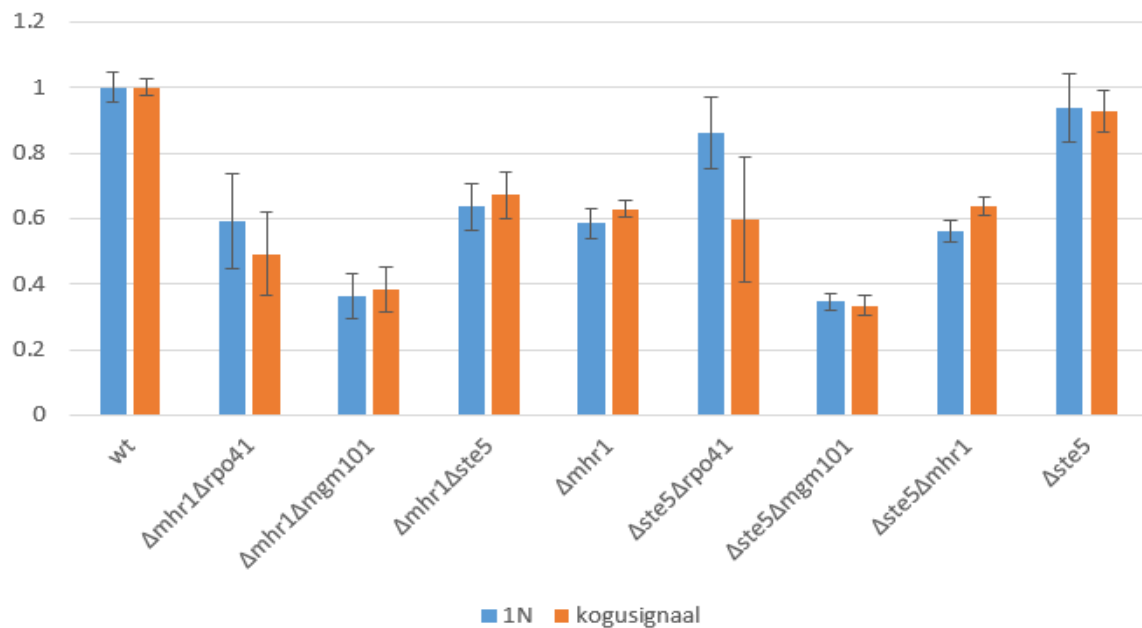
Joonis 10. a1184 Δrpo41Δmgm101, Δrpo41Δmhr1, Δrpo41Δste5, Δrpo41, Δmgm101Δrpo41, Δmgm101Δmhr1, Δmgm101Δste5 ja Δmgm101 tüvede nukleaarse ja mtDNA kvantitatiivsel analüüsil saadud tulpdiagramm. Tulpdiagrammis on analüüsitud vastavate tüvede kolme proovi (Vaata Joonis 9. a1184 Δrpo41Δmgm101, Δrpo41Δmhr1, Δrpo41Δste5, Δrpo41, Δmgm101Δrpo41, Δmgm101Δmhr1, Δmgm101Δste5 ja Δmgm101 tüvede nukleaarse ja mtDNA analüüs) keskmist signaali. Vearivad näitavad kolme proovi standardhälvet. Proove on võrreldud metsiktüübi (*wt*) kahe proovi keskmise signaali vastu. Metsiktüübi signaal on võrdne ühega (100%). Tehe, mida kasutasin arvutamiseks, oli: vastavalt mitokondriaalne 1N signaal või kogusignaali jagatud läbi vastava proovi nukleaarse signaaliga. Saadud arvu jagasin läbi vastavalt metsiktüübi 1N/nukleaarse või mtDNA kogusignaali/nukleaarse teitel saadud arvuga. 1N esindab restriktasiga lõikamisel tekkivat fragmenti (vaata ka Joonis 2. Pagaripärmi tüve HSP^r a1184 mtDNA skeem) ning kogusignaali esindab kogu mtDNA signaali tugevust.

Järgnevalt on Joonisel 11 toodud a1184 Δmhr1Δrpo41, Δmhr1Δmgm101, Δmhr1Δste5, Δmhr1, Δste5Δrpo41, Δste5Δmgm101, Δste5Δmhr1 ja Δste5 tüvedest eraldatud DNA *Southern blot* meetodiga analüüsimisel saadud pilt. Paneelidel A ja C on vastavate tüvede nukleaarsed signaalid ning paneelidel B ja D vastavate tüvede mtDNA signaalid.



Joonis 11. a1184 Δ mhr1 Δ rpo41, Δ mhr1 Δ mgm101, Δ mhr1 Δ ste5, Δ mhr1, Δ ste5 Δ rpo41, Δ ste5 Δ mgm101, Δ ste5 Δ mhr1 ja Δ ste5 tüvede nukleaarse ja mtDNA analüüs. Mõlemal pildil on vasakul ääres marker ning ülemine peenem riba (paneelid A ja C), millel on vastavad nukleaarsed signaalid. Ülemine pilt (paneel B): rajal **1 on a1184 (*wt*), radadel **2-4** on a1184 Δ mhr1 Δ rpo41, radadel **5-7** on a1184 Δ mhr1 Δ mgm101, radadel **8-10** on a1184 Δ mhr1 Δ ste5 ning radadel **11-13** on a1184 Δ mhr1. Alumine pilt (paneel D): rajal **1** on a1184 (*wt*), radadel **2-4** on a1184 Δ ste5 Δ rpo41, radadel **5-7** on a1184 Δ ste5 Δ mgm101, radadel **8-10** on a1184 Δ ste5 Δ mhr1 ning radadel **11-13** on a1184 Δ ste5. Joonisel on märgitud ka 1N fragment, mis tekib lõikamisel. Filtrit eksponeerisin nukleaarse proovi korral ~3 päeva ning mitokondriaalse proovi korral 16 tundi.**

Joonisel 12 on toodud Joonisel 11 esitatud nukleaarsete (paneelid A ja C) ning mtDNA (paneelid B ja D) signaalide analüüsimisel saadud tulpdiaagramm vastavate tüvede kohta.



Joonis 12. a1184 $\Delta mhr1\Delta rpo41$, $\Delta mhr1\Delta mgm101$, $\Delta mhr1\Delta ste5$, $\Delta mhr1$, $\Delta ste5\Delta rpo41$, $\Delta ste5\Delta mgm101$, $\Delta ste5\Delta mhr1$ ja $\Delta ste5$ tüvede nukleaarse ja mtDNA kvantitatiivsel analüüsil saadud tulpdiaagramm. Tulpdiaagrammis on analüüsitud vastava tüve kolme proovi (vaata Joonis 11. a1184 $\Delta mhr1\Delta rpo41$, $\Delta mhr1\Delta mgm101$, $\Delta mhr1\Delta ste5$, $\Delta mhr1$, $\Delta ste5\Delta rpo41$, $\Delta ste5\Delta mgm101$, $\Delta ste5\Delta mhr1$ ja $\Delta ste5$ tüvede nukleaarse ja mtDNA analüüs) keskmist signaali. Vearibad näitavad kolme proovi standardhälvet. Proove on võrreldud metsiktüübi (*wt*) kahe proovi keskmise signaali vastu. Metsiktüübi signaal on võrdne ühega (100%). 1N esindab restriктаasiga lõikamisel tekkivat fragmenti ning kogusignaal esindab kogu mtDNA signaali tugevust.

Joonistel 10 ja 12 toodud 1N ja kogusignaali intentsiivsuse põhjal saab järeldada järgmist:

- 1) 1N signaali tugevus näitab, kui palju on mtDNA-s toimunud muutusi peale vastava geeni deleteerimist, kuna 1N fragmendi esinemine on sõltuvuses DraI lõikesaidi (AAA↓TTT) esinemissagedusest. Seega mida nõrgem on 1N signaal, seda suurema sagedusega on toimunud vead/muutused mtDNA-s. Samuti on see sõltuv replikatsiooniefektiivsusest, kuna DraI lõikesaiti esineb seda enam, mida rohkem esineb 1184kb pikkuseid korduseid mtDNA konkateemeriis. Seega on 1N signaali tugevus võrdeline mtDNA reparatsiooni-ja replikatsiooniefektiivsusega.
- 2) Kogusignaali tugevus näitab, kui palju mtDNA-d on rakkudes võrreldes metsiktüübiga peale vastava geeni deleteerimist. Väiksem kogusignaal näitab üldiselt madalamat mtDNA hulka ning on võrdeline mtDNA replikatsiooni efektiivsusega. Ka võib kogusignaali seondada rekombinatsiooni efektiivsusega, kuna ülal-ja allpool 1N riba

olev ebaselge signaal võiks olla põhjustatud hargnenud DNA molekulide poolt tekitatud signaalist, mida põhjustab rekombinatsioon (Sedman *et al.*, 2014).

Võttes arvesse neid kahte näitajat, saab Joonisel 10 toodud tulpdiaagrammi põhjal järeldada järgmist: RPO41 geeni üksik deletsioon ei põhjusta drastilisi muutusi mtDNA järjestuses ega ka replikatsiooni efektiivsuses, vastupidi, 1N signaal on peaaegu sama tugev sellega, nagu seda on *wt* mtDNA 1N signaal (Joonis 10, tulbad *wt* ja Δ rpo41). See võib tuleneda sellest, et transkriptsioon ei blokeeri replikatsiooni ning soodustab seega replikatsiooni toimumist (Sedman *et al.*, 2014). Ühtlasi viitab kõrge 1N ja kogusignaal sellele, et see valk ei oma rho⁻ tüvedes mtDNA säilitamisel nii tähtsat rolli, kui valgud, mille suhtes defektsetel mutantidel on nõrgem 1N ja kogusignaal.

Kõigist deletsioonidest suurima fenotüübi (kõige väiksema 1N ja kogusignaali) andis MGM101 puudumine, kusjuures RPO41 puudumine ei andnud enam täiendavat fenotüüpi (vaata tüvesid a1184 Δ mgm101, a1184 Δ rpo41 Δ mgm101 ja a1184 Δ mgm101 Δ rpo41 Joonisel 10). Sarnastele tulemustele jõuti ka Zuo ja kaasautorite 2002. aastal avaldatud artiklis, kus leiti, et Δ mgm101 tüvest RPO41 deleteerimine ei põhjustanud täiendavat mtDNA ebastabiilsust (Zuo *et al.*, 2002). Samuti on a1184 Δ rpo41 Δ mhr1 1N ja kogusignaal tugevam, kui seda on a1184 Δ mgm101 Δ mhr1 1N ja kogusignaal, viidates sellele, et valgul Mgm101 on suurem tähtsus rho⁻ mtDNA stabiilsuse tagamisel, kas replikatsioonis või reparatsioonis osalemise kaudu, kui seda on valgul Rpo41.

MGM101 puudumise tõttu põhjustatud mtDNA hulga vähenemine (Joonis 10, tulbad Δ mgm101 Δ rpo41, Δ rpo41 Δ mgm101, Δ mgm101 Δ mhr1, Δ mgm101 Δ ste5 ja Δ mgm101) võib olla seotud Mgm101 osalemisega reparatsiooniradades ning selle häiritusel Mgm101 puudumisel.

Joonisel 12 on näha, et STE5 deletsioon ei põhjusta muutusi a1184 mtDNA stabiilsuses (vaata diagrammil Δ ste5), seega antibiootikumi kasseti integratsioon ning muud manipulatsioonid (nt transformeerimine) ei ole mõjutanud mtDNA stabiilsust. Samuti on ka siin pildil näha, et MGM101 deletsioon on kõige drastilisema fenotüübiga (Joonis 12 Δ mhr1 Δ mgm101 ja Δ ste5 Δ mgm101), kuna kõige vähem mtDNA-d on säilinud tüvedes, kus puudus lisaks ka MGM101. Kuna MHR1 deletsioon rho⁻ tüvest põhjustab siiski märgatavat mtDNA hulga vähenemist (Joonis 12, tulp Δ mhr1), võib arvata, et valgul Mhr1 on roll rekombinatsioonis.

Kokkuvõttes saab nende kahe tulpdiagrammi (Joonised 10 ja 12) põhjal väita, et kuna nukleaarne signaal on kõigil proovidel ~sama tugevusega kuid mitokondriaalne signaal erinevatel mutantidel erinev, võib säilinud mtDNA hulga põhjal järeldada nende valkude tähtsust mtDNA säilitamisel.

2.3.5 Arutelu

Ajalooliselt on välja pakutud kaks mtDNA replikatsioonimehhanismi pagaripärmis: transkriptsioon-sõltuv (Maleszka *et al.*, 1991) ning rekombinatsioon-sõltuv (Ling *et al.*, 2007). Kuna on välja pakutud, et valgud Mhr1 ja Mgm101 omavad rekombinaasset aktiivsust (Ling *et al.*, 2013; Pevala *et al.*, 2016), võiksid need valgud osaleda rekombinatsioon-sõltuval replikatsioonil. Samuti on valgu Rpo41 kohta spekulatsioonid, et tegu võib olla mitokondriaalse RNA primaasiga (Graves *et al.*, 1998; Sanchez-Sandoval *et al.*, 2015) ning seetõttu võiks see valk osaleda transkriptsioon-sõltuval replikatsioonil.

Kirjandusest lähtudes võis eeldada, et valku Rpo41 on vaja mitokondriaalseks transkriptsiooniks ja *in vitro* katse põhjal praimeris sünteesiks transkriptsioon-sõltuval mtDNA replikatsioonil (Graves *et al.*, 1998; Ramachandran *et al.*, 2016; Sanchez-Sandoval *et al.*, 2015).

Valgu Rpo41 deletsioon avaldas suurt mõju mtDNA stabiilsusele, põhjustades üksikmutandi puhul küll suurt kadu (~60% kadu) kogusignaal, kuid samas oli 1N signaal peaaegu võrdne sellega nagu metsiktüübis (vaata Joonis 10 tulbad $\Delta rpo41$, $\Delta rpo41\Delta ste5$ ja *wt*). Samuti põhjustas RPO41 deletsioon madala sagedusega rho⁰ fenotüübi teket, seda nii deletsioonil algtüvest a1184 (Joonis 5, paneel D), kui ka deletsioonil $\Delta mgm101$ tüvest (Joonis 7, paneel A). Tugeva 1N signaali esinemise osas võib spekulatsioonid, et RPO41 deletsioon ei põhjusta muutusi mtDNA järjestuses, küll aga põhjustab RPO41 deletsioon mingil põhjusel mtDNA replikatsiooni häirumist, mida väljendab madalam kogusignaalitase. Siiski ei ole tänase seisuga veel selge, mil moel ja miks võiks RPO41 deletsioon põhjustada madalamat kogusignaalitaset.

Samuti tuleks täheldada, et kuna 1N fragmendi esinemine eeldab muutumata kaksikahelalist DNA-d, mida on DraI võimeline lõikama, on 1N signaali tugevus sõltub ds(mt)DNA hulgast proovis. Kogusignaalitugevus näitab kogu proovis olnud mtDNA hulka. Samuti võib 1N-st üleval ja allpool olev ebaselge signaal esindada hargnenud ahelaga, võimalik et ka osaliselt üksikahelalisi DNA molekule, mille lõikus pole olnud täielik või mida restriktiaas DraI ei ole üldse lõiganud. Tõenäoliselt põhjustab neid DNA molekule ahelasse tungimine (rekombinatsioon). Hargnenud molekulide olemasolu on näidatud Sedman *et al.* 2014. aasta artiklis, kus analüüsiti rho⁻ tüvede mtDNA-d 2D-AGE geelelektroforeesil (Sedman *et al.*, 2014).

Katsetest *S. cerevisiae* ja *C. parapsilosis*'ega on järeldatud, et valk Mgm101 on Rad52-tüüpi valk, millel on nii ssDNA-d sidumisvõime kui ka ahelasse tungimise võime, mis viitab selle valgu osalemisele homoloogilises rekombinatsioonis (Mbantekhu *et al.*, 2011; Pevala *et al.*, 2016; Zuo *et al.*, 2002).

Ka antud katsetes nähti, et MGM101 deletsioonil oli oluline mõju mtDNA stabiilsusele. Üksikmutandi puhul oli nii kogusignaal kui 1N signaal ~60-80% nõrgem võrreldes metsiktüübiga, viidates madalamale reparatsiooni-ja replikatsiooni efektiivsusele (vaata Joonis 10, tulp Δmgm101). Samuti oli topeltmutantide puhul MGM101 deletsioon kõige suurema fenotüübiga, sarnanedes sellega, mis on üksikmutandis, kusjuures nii RPO41 kui ka MHR1 deletsioonil a1184 Δmgm101 tüvedest ei muutunud mtDNA ebastabiilsemaks, kuna säilis ~20-40% mtDNA-st (vaata Joonis 10, tulbad Δmgm101 , $\Delta\text{mgm101}\Delta\text{rpo41}$ ning Joonis 12, tulp $\Delta\text{mgm101}\Delta\text{mhr1}$). RPO41 deleteerimisel rho⁻ Δmgm101 tüvest said sarnased tulemused ka Zuo ja kaasautorid (Zuo *et al.*, 2002). Ka põhjustas MGM101 deletsioon kõige suurema sagedusega rho⁰ fenotüübi tekkimist (vaata Joonis 5, paneel B, joonis 6, paneel A ning joonis 8, paneel B).

Võttes arvesse antud bakalaureusetöö tulemusi ning kirjandust, kus valku Mgm101 seostatakse homoloogilise rekombinatsiooniga, annab see alust arvata, et *in vivo* toimub pagaripärmi mtDNA replikatsioon rekombinatsioon-sõltuvalt, kusjuures selles mängib olulist rolli valk Mgm101 (Mbantenkhu *et al.*, 2011).

Valgu Mhr1 roll, mis püsis muutumatuna peaaegu 10 aastat, on viimastel aastatel olnud küsitav. Varasemalt on näidatud, et valgul Mhr1 võiks olla roll konkatemeeride moodustamises, mis moodustuvad veereva ratta mudeli põhjal toimuval mtDNA replikatsioonil (Ling *et al.*, 2004). Ka on näidatud, et sellel valgu deletsioonil on märkimisväärne mõju mtDNA stabiilsusele ning on leitud ka Mhr1 ssDNA-d siduv omadus (Ling *et al.*, 2013; Ling *et al.*, 1995). Samas on viimastel aastatel ilmunud artiklites näidatud, et Mhr1 mõju mtDNA stabiilsusele võib olla hoopis kaudne, kuna on leitud, et Mhr1 kuulub mitoribosoomi koosseisu ning selle puudumine viib märkimisväärsele mitokondriaalse translatsiooni inhibitsioonile ja võiks seeläbi põhjustada mtDNA ebastabiilsust (Amunts *et al.*, 2014; Woellhaf *et al.*, 2016).

Antud töös põhjustas valgu Mhr1 puudumine üksikmutandi puhul ~40% mtDNA hulga kaotuse võrreldes metsiktüübiga (vaata Joonis 12, tulbad Δmhr1 ja $\Delta\text{mhr1}\Delta\text{ste5}$). Samas selgus, et MHR1 deletsioon ei põhjusta nii deletsioonil tüvest a1184 kui ka deletsioonil Δrpo41 või Δmgm101 tüvest rho⁰ fenotüüpi (vaata Joonis 5 paneel D, Joonis 6 paneel B ja Joonis 7 paneel B). Kuna MHR1 deletsioon vähendab mtDNA hulka ka deletsioonil rho⁻ tüvest, ei ole välistatud ka variant, et Mhr1 on siiski rekombinaas ning mõjutab mitokondriaalse genoomi stabiilsust otseselt.

Tulemustest, selgus, et ka kahe mtDNA stabiilsuse tagamise eest vastutava valgu – näiteks Mgm101 ja Rpo41 – puudumisel mtDNA enamasti säilib, mis tähendab, et mtDNA polümeraas Mip1 suudab hoolimata nende valkude puudumisest sünteesida mtDNA-d. Kuigi tänase seisuga

on tõestamata Rpo41 *in vivo* roll primaasina, on siiski spekuleeritud, et antud valk võiks sünteesida praimereid mahajääva ahela sünteesil (Wanrooij *et al.*, 2010), kuna ei ole ka ilmunud artiklit, et valgul Mip1 oleks primaasne aktiivsus. Seega võib Mip1 vajada replikatsiooni initsiatsiooniks valku, mis on tänase seisuga meile tundmatu. Samuti võib ρ^- rakkudes olla kasutusel alternatiivne replikatsioonirada, mida metsiktüüpi rakkudes (ρ^+) ei kasutata ning mis on meile tänase seisuga tundmatu.

KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös uuriti valkude Rpo41, Mgm101 ja Mhr1 deletsiooni mõju pagari pärmi mtDNA stabiilsusele ja hulgale. Valk Rpo41 on mitokondriaalne RNA polümeraas, millel on RNA polümeraasne (Greenleaf *et al.*, 1986) ning potentsiaalselt DNA sünteesil primaarne aktiivsus (Ramachandran *et al.*, 2016). Mgm101 on Rad52-tüüpi valk, millel on ssDNA-d siduv võime ning ka ahelasse tungimise võime (Pevala *et al.*, 2016). Valgul Mhr1 on rekombinaasne ning ssDNA-d siduv aktiivsus (Masuda *et al.*, 2009).

Ajalooliselt on välja pakutud kaks mitokondriaalse DNA replikatsioonimehhanismi pagari pärmis: transkriptsioon-sõltuv (Maleszka *et al.*, 1991) ning rekombinatsioon-sõltuv replikatsioon (Ling *et al.*, 2007), milles arvatakse initsiatsiooniosalevat vastavalt esimesel juhul valk Rpo41 ning teisel juhul Mgm101 ja/või Mhr1.

Töös teostatud katseteks kasutati pagari pärmi tüve W303 MATa HS ρ^- a1184. Selle tüve mtDNA sisaldab funktsionaalset *ori2*-järjestust ning fragmenti pikkusega 1184bp. Et analüüsida uuritavate valkude deletsioonidest tingitud fenotüüpi, valmistasin uuritavate valkude suhtes defektsed tüved ning analüüsisin mtDNA-d *Southern blot* meetodiga.

Saadud tulemustest selgus, et kõigi kolme uuritava valgu deletsioonid põhjustavad antud rho⁻ tüves mtDNA ebastabiilsust, kus uuritud valkude seast kõige suuremat mõju avaldas MGM101 deletsioon ning kõige väiksemat MHR1 deletsioon. Üksikmutantidest põhjustasid RPO41 ja MGM101 deletsioonid vähese sagedusega rho⁰ fenotüübi teket. Kahe geeni deletsioonil olid kõige stabiilsemad tüved, kus puudus MHR1 geen – ei esinenud rho⁰ fenotüüpi – ning kõige ebastabiilsemad olid tüved, kus puudus MGM101 geen, kuna MGM101 puudumine viis kõige suurema sagedusega rho⁰ fenotüübi tekkeni ja ka kõige suurema mtDNA hulga kaotuseni.

Käesoleval hetkel on pagari pärmi mtDNA replikatsiooni täpne toimumine endiselt küsimärgi all. Näiteks võivad selles osaleda valgud, mida me veel ei tunne. Samuti võib olla, et replikatsioonimehhanismid ρ^- ja ρ^+ tüvedes on erinevad, sest antud töös selgus, et ka kahe replikatsiooniosaleva valgu deletsioonil mtDNA rho⁻ tüves säilib. Võttes arvesse ka viimasel ajal ilmunud artikleid Mgm101 funktsioonide kohta, võib eeldada, et pagari pärmis toimub mtDNA replikatsioon rekombinatsioon-sõltuvalt, kusjuures selles mängib olulist rolli valk Mgm101.

Edaspidised uuringud nende valkude mõjust mtDNA replikatsioonile võiksid olla vastavate deletsioonitüvede mtDNA analüüsimised 2D-agaroosgelelektroforeesil (2D-AGE), kuna see võimaldab uurida nende mutantide mtDNA topoloogiat ja seega uuritavate valkude poolt põhjustatud muutusi mtDNA struktuuris.

RESUME

Effects on maintenance and volume of mitochondrial DNA caused by the deletion of potential replicational proteins

Aivar Meldre

S. cerevisiae (baker's yeast) is a unique organism for it can live without a functional mitochondrial DNA, unlike most other organisms. This characteristic makes it a perfect model organism to study mechanisms involved in mitochondrial genome maintenance, including given thesis.

Based on the content of mtDNA in yeast cells, baker's yeast is divided into ρ^+ , ρ^- and ρ^0 cells, having either a normally functioning mtDNA, a disfunctional and usually fragmented mtDNA or the complete loss of mtDNA, accordingly.

Historically, there has been a debate over how the mtDNA replication in baker's yeast is initiated. Transcription-dependent replication (Maleszka *et al.*, 1991) and recombination-dependent replication (Ling *et al.*, 2007) have been suggested, the second hypothesis claiming more credit due to recent data.

This study includes the analysis of phenotypes caused by three proteins studied in given thesis. These proteins are mitochondrial RNA polymerase Rpo41 (***RNA polymerase***), which is involved in DNA priming in DNA replication (Ramachandran *et al.*, 2016) and Mgm101 (***mitochondria genome maintenance***), which is potentially involved in recombination processes via binding single stranded DNA and/or strand invasion, therefore initiating the hypothetical recombination-dependent DNA replication (Pevala *et al.*, 2016). The role of the third protein, Mhr1 (***Mitochondrial homologous recombination***), has been somewhat controversial in the past few years, whereas some data suggests its role in recombination by binding single stranded DNA (Ling *et al.*, 2013), while more recent data suggests that the protein is simply a structural protein of the mitoribosome (Amunts *et al.*, 2014). The structural role has been proven, for the deletion of MHR1 leads to translation inhibition in yeast (Woellhaf *et al.*, 2016). This could explain the effect on mtDNA maintenance via translation and not by recombination.

In given thesis, the effects on mtDNA maintenance caused by the three proteins are studied, using hypersuppressive ρ^- strain, a1184. Hypersuppressiveness is a phenotype, in which by mating with wild-type (ρ^+) strain, nearly all (~99%) of the offsprings are ρ^- .

Analysing both single-deletion mutants and double-deletion mutants, the given thesis found that the most drastic effect on the maintenance of mtDNA was caused by the deletion of

MGM101, having the least amount of mtDNA preserved after deletion, as concluded from quantitative analysis. Also, in a1184 Δ mgm101 strains, mtDNA fragmentation was observed, which did not occur in a1184 Δ rpo41 nor a1184 Δ mhr1 strains. It is also important to note that neither RPO41 nor MHR1 deletion from a1184 Δ mgm101 strains had cumulative negative effects on the maintenance of mtDNA. Quantitative analysis concluded that the deletion of MGM101 decreased the amount of mtDNA by 60-80%, relative to the original strain, a1184. The deletion of RPO41 and MHR1 lead to a ~40% decrease, a1184 Δ rpo41 strains having significantly stronger 1N signal, showing that mtDNA replication is not inhibited by the deletion of RPO41. RPO41 deletion from Δ mhr1 strains or vice versa had little to no effect, whereas MGM101 deletion from either strain had a drastic effect.

Taking in consideration given data, we can determine that Mgm101 is indeed important for the maintenance of the mitochondrial genome and considering the described biological roles for Mgm101, we can infer that the replication of baker's yeast's mtDNA is initiated in a recombination-dependent manner, where Mgm101 has a crucial role. The exact necessity of Rpo41 remains unclear, for it is unknown whether it acts as a primase in the initiation of mtDNA replication and/or is involved in lagging strand synthesis via Okazaki fragments. The roles for Mhr1 stay controversial, with given study finding strong influence on the remaining volume of mtDNA, despite recent data not associating it with replication/recombination.

TÄNUSÕNAD

Lõputöö valmimise eest sooviksin tänada oma lõputöö juhendajat PhD Tiina Sedmani, kes oli mulle toeks sel palju tagasilööke omaval projektil ning juhendas oskuslikult ja professionaalselt. Samuti sooviksin tänada TUMRI Üldise-ja mikroobibiokeemia labori inimesi, eriti vanemlaboranti Maie Looritsat, kes oli alati abiks igapäevaste laborimurede lahendamisel. Lisaks sooviksin tänada oma tüdruksõpra Birgit Uuenit, kes minuga hoolimata mitteõnnestunud katsetest tingitud meelepahast vastu pidas ning mulle alati toeks oli.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Amberg, D. C., Burke, D. J., & Strathern, J. N. (2005). *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2005 Edition* (Cold Spring). Lk 115-117.
- Amunts, A., Brown, A., Bai, X.-c., *et al.* (2014). Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit. *Science*, *343*(6178), 1485-1489.
- Barrientos, A., Fontanesi, F., & Díaz, F. (2009). Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. *Current Protocols in Human Genetics*, *19*.13. 11-19.13. 14.
- Blanc, H., & Dujon, B. (1980). Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA responsible for suppressiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *77*(7), 3942-3946.
- Boulé, J.-B., Vega, L. R., & Zakian, V. A. (2005). The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. *Nature*, *438*(7064), 57-61.
- Burgers, P. M., Stith, C. M., Yoder, B. L., & Sparks, J. L. (2010). Yeast exonuclease 5 is essential for mitochondrial genome maintenance. *Molecular and cellular biology*, *30*(6), 1457-1466.
- Chakraborty, A., Lyonnais, S., Battistini, F., Medici, G., Prohens, R., Orozco, M., Vilardell, J., & Solà, M. (2016). DNA structure directs positioning of the mitochondrial genome packaging protein Abf2p. *Nucleic Acids Research*, gkw1147.
- Chen, X.-J., Guan, M.-X., & Clark-Walker, G. D. (1993). MGM101, a nuclear gene involved in maintenance of the mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, *21*(15), 3473-3477.
- Chen, X. J., Wang, X., & Butow, R. A. (2007). Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(34), 13738-13743.
- Cho, J. H., Lee, Y. K., & Chae, C. B. (2001). The modulation of the biological activities of mitochondrial histone Abf2p by yeast PKA and its possible role in the regulation of mitochondrial DNA content during glucose repression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, *1522*(3), 175-186.
- Elledge, S. J., & Davis, R. W. (1987). Identification and isolation of the gene encoding the small subunit of ribonucleotide reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: DNA damage-inducible gene required for mitotic viability. *Molecular and cellular biology*, *7*(8), 2783-2793.

- Fangman, W., Henly, J., Churchill, G., & Brewer, B. J. (1989). Stable maintenance of a 35-base-pair yeast mitochondrial genome. *Molecular and cellular biology*, 9(5), 1917-1921.
- Fangman, W. L., Henly, J. W., & Brewer, B. J. (1990). RPO41-independent maintenance of [rho-] mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 10(1), 10-15.
- Foury, F. (1989). Cloning and sequencing of the nuclear gene MIP1 encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 264(34), 20552-20560.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., & Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 440(3), 325-331.
- Gangloff, S. P., Marguet, D., & Lauquin, G. (1990). Molecular cloning of the yeast mitochondrial aconitase gene (ACO1) and evidence of a synergistic regulation of expression by glucose plus glutamate. *Molecular and cellular biology*, 10(7), 3551-3561.
- Geissler, A., Krimmer, T., Bömer, U., Guiard, B., Rassow, J., & Pfanner, N. (2000). Membrane Potential-Driven Protein Import into Mitochondria The Sorting Sequence of Cytochrome b 2Modulates the $\Delta\psi$ -Dependence of Translocation of the Matrix-targeting Sequence. *Molecular biology of the cell*, 11(11), 3977-3991.
- Gerhold, J. M., Aun, A., Sedman, T., Jöers, P., & Sedman, J. (2010). Strand invasion structures in the inverted repeat of *Candida albicans* mitochondrial DNA reveal a role for homologous recombination in replication. *Molecular cell*, 39(6), 851-861.
- Gerhold, J. M., Sedman, T., Visacka, K., Slezakova, J., Tomaska, L., Nosek, J., & Sedman, J. (2014). Replication intermediates of the linear mitochondrial DNA of *Candida parapsilosis* suggest a common recombination based mechanism for yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 289(33), 22659-22670.
- Germaniuk, A., Liberek, K., & Marszalek, J. (2002). A bichaperone (Hsp70-Hsp78) system restores mitochondrial DNA synthesis following thermal inactivation of Mip1p polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(31), 27801-27808.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., & Davis, R. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546.
- Graves, T., Dante, M., Eisenhour, L., & Christianson, T. W. (1998). Precise mapping and characterization of the RNA primers of DNA replication for a yeast hypersuppressive petite by in vitro capping with guanylyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 26(5), 1309-1316.

- Greenleaf, A. L., Kelly, J. L., & Lehman, I. (1986). Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(10), 3391-3394.
- Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M., & Davenport, K. (1998). MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular biology reviews*, 62(4), 1264-1300.
- Hermann, G. J., & Shaw, J. M. (1998). Mitochondrial dynamics in yeast. *Annual review of cell and developmental biology*, 14(1), 265-303.
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews*, 52(4), 536.
- Heude, M., Fukuhara, H., & Moustacchi, E. (1979). Spontaneous and induced rho mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: patterns of loss of mitochondrial genetic markers. *Journal of Bacteriology*, 139(2), 460-467.
- Hill, J., Donald, K. I. G., & Griffiths, D. E. (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Research*, 19(20), 5791-5791.
- Hobbs, A. E. A., Srinivasan, M., McCaffery, J. M., & Jensen, R. E. (2001). Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *The Journal of cell biology*, 152(2), 401-410.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, 153(1), 163-168.
- Ivanov, E. L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J., & Haber, J. E. (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 142(3), 693-704.
- Kuusk, S., Sedman, T., Jõers, P., & Sedman, J. (2005). Hmi1p from *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is a structure-specific DNA helicase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 24322-24329.
- Lahaye, A., Leterme, S., & Foury, F. (1993). PIF1 DNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical characterization of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 268(35), 26155-26161.
- Ling, F., Hori, A., & Shibata, T. (2007). DNA recombination-initiation plays a role in the extremely biased inheritance of yeast [rho⁻] mitochondrial DNA that contains the replication origin ori5. *Molecular and cellular biology*, 27(3), 1133-1145.

- Ling, F., Hori, A., Yoshitani, A., Niu, R., Yoshida, M., & Shibata, T. (2013). Din7 and Mhr1 expression levels regulate double-strand-break–induced replication and recombination of mtDNA at ori5 in yeast. *Nucleic Acids Research*, gkt273.
- Ling, F., Makishima, F., Morishima, N., & Shibata, T. (1995). A nuclear mutation defective in mitochondrial recombination in yeast. *The EMBO journal*, 14(16), 4090.
- Ling, F., Morioka, H., Ohtsuka, E., & Shibata, T. (2000). A role for MHR1, a gene required for mitochondrial genetic recombination, in the repair of damage spontaneously introduced in yeast mtDNA. *Nucleic Acids Research*, 28(24), 4956-4963.
- Ling, F., & Shibata, T. (2002). Recombination-dependent mtDNA partitioning: in vivo role of Mhr1p to promote pairing of homologous DNA. *The EMBO journal*, 21(17), 4730-4740.
- Ling, F., & Shibata, T. (2004). Mhr1p-dependent concatemeric mitochondrial DNA formation for generating yeast mitochondrial homoplasmic cells. *Molecular biology of the cell*, 15(1), 310-322.
- Lööke, M., Kristjuhan, K., & Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, 50(5), 325.
- MacAlpine, D. M., Kolesar, J., Okamoto, K., Butow, R. A., & Perlman, P. S. (2001). Replication and preferential inheritance of hypersuppressive petite mitochondrial DNA. *The EMBO journal*, 20(7), 1807-1817.
- Maleszka, R., Skelly, P., & Clark-Walker, G. (1991). Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *The EMBO journal*, 10(12), 3923.
- Masuda, T., Ito, Y., Terada, T., Shibata, T., & Mikawa, T. (2009). A non-canonical DNA structure enables homologous recombination in various genetic systems. *Journal of Biological Chemistry*, 284(44), 30230-30239.
- Matsunaga, M., & Jaehning, J. A. (2004a). Intrinsic promoter recognition by a “core” RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44239-44242.
- Matsunaga, M., & Jaehning, J. A. (2004b). A mutation in the yeast mitochondrial core RNA polymerase, Rpo41, confers defects in both specificity factor interaction and promoter utilization. *Journal of Biological Chemistry*, 279(3), 2012-2019.
- Matsunaga, M., Jang, S.-H., & Jaehning, J. A. (2004). Expression and purification of wild type and mutant forms of the yeast mitochondrial core RNA polymerase, Rpo41. *Protein expression and purification*, 35(1), 126-130.
- Mbantenkhu, M., Wang, X., Nardozi, J. D., Wilkens, S., Hoffman, E., Patel, A., Cosgrove, M. S., & Chen, X. J. (2011). Mgm101 is a Rad52-related protein required for mitochondrial DNA recombination. *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 42360-42370.

- McBride, H. M., Neuspiel, M., & Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology*, *16*(14), R551-R560.
- Meadows, K. L., Song, B., & Doetsch, P. W. (2003). Characterization of AP lyase activities of *Saccharomyces cerevisiae* Ntg1p and Ntg2p: implications for biological function. *Nucleic Acids Research*, *31*(19), 5560-5567.
- Meeusen, S., Tieu, Q., Wong, E., Weiss, E., Schieltz, D., Yates, J. R., & Nunnari, J. (1999). Mgm101p is a novel component of the mitochondrial nucleoid that binds DNA and is required for the repair of oxidatively damaged mitochondrial DNA. *The Journal of cell biology*, *145*(2), 291-304.
- Meisinger, C., Pfannschmidt, S., Rissler, M., *et al.* (2007). The morphology proteins Mdm12/Mmm1 function in the major β -barrel assembly pathway of mitochondria. *The EMBO journal*, *26*(9), 2229-2239.
- Mieczkowski, P. A., Fikus, M., & Ciesla, Z. (1997). Characterization of a novel DNA damage-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*, DIN7, which is a structural homolog of the RAD2 and RAD27 DNA repair genes. *Molecular and General Genetics MGG*, *253*(6), 655-665.
- Miyakawa, I., Kanayama, M., Fujita, Y., & Sato, H. (2010). Morphology and protein composition of the mitochondrial nucleoids in yeast cells lacking Abf2p, a high mobility group protein. *The Journal of general and applied microbiology*, *56*(6), 455-464.
- Mookerjee, S. A., Lyon, H. D., & Sia, E. A. (2005). Analysis of the functional domains of the mismatch repair homologue Msh1p and its role in mitochondrial genome maintenance. *Current genetics*, *47*(2), 84-99.
- Mortensen, U. H., Bendixen, C., Sunjevaric, I., & Rothstein, R. (1996). DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(20), 10729-10734.
- Nardoizzi, J. D., Wang, X., Mbantekhu, M., Wilkens, S., & Chen, X. J. (2012). A properly configured ring structure is critical for the function of the mitochondrial DNA recombination protein, Mgm101. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(44), 37259-37268.
- Osman, C., Noriega, T. R., Okreglak, V., Fung, J. C., & Walter, P. (2015). Integrity of the yeast mitochondrial genome, but not its distribution and inheritance, relies on mitochondrial fission and fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(9), E947-E956.

- Paratkar, S., & Patel, S. S. (2010). Mitochondrial transcription factor Mtf1 traps the unwound non-template strand to facilitate open complex formation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(6), 3949-3956.
- Pevala, V., Truban, D., Bauer, J. A., *et al.* (2016). The structure and DNA-binding properties of Mgm101 from a yeast with a linear mitochondrial genome. *Nucleic Acids Research*, 44(5), 2227-2239.
- Ramachandran, A., Nandakumar, D., Deshpande, A. P., Lucas, T. P., Ramanagouda, R., Tang, G.-Q., Raney, K., Yin, Y. W., & Patel, S. S. (2016). The yeast mitochondrial RNA polymerase and transcription factor complex catalyzes efficient priming of DNA synthesis on single-stranded DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 291(32), 16828-16839.
- Ramanagoudr-Bhojappa, R., Chib, S., Byrd, A. K., Aarattuthodiyil, S., Pandey, M., Patel, S. S., & Raney, K. D. (2013). Yeast Pif1 helicase exhibits a one-base-pair stepping mechanism for unwinding duplex DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 288(22), 16185-16195.
- Reenan, R., & Kolodner, R. D. (1992). Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* MSH1 and MSH2 genes: evidence for separate mitochondrial and nuclear functions. *Genetics*, 132(4), 975-985.
- Rendeková, J., Ward, T. A., Šimoničová, L., Thomas, P. H., Nosek, J., Tomáška, L., McHugh, P. J., & Chovanec, M. (2016). Mgm101: A double-duty Rad52-like protein. *Cell Cycle*, 15(23), 3169-3176.
- Sanchez-Sandoval, E., Diaz-Quezada, C., Velazquez, G., Arroyo-Navarro, L. F., Almanza-Martinez, N., Trasviña-Arenas, C. H., & Briebe, L. G. (2015). Yeast mitochondrial RNA polymerase primes mitochondrial DNA polymerase at origins of replication and promoter sequences. *Mitochondrion*, 24, 22-31.
- Savkina, M., Temiakov, D., McAllister, W. T., & Anikin, M. (2010). Multiple functions of yeast mitochondrial transcription factor Mtf1p during initiation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(6), 3957-3964.
- Sedman, T., Gaidutšik, I., Villemson, K., Hou, Y., & Sedman, J. (2014). Double-stranded DNA-dependent ATPase Irc3p is directly involved in mitochondrial genome maintenance. *Nucleic Acids Research*, 42(21), 13214-13227.
- Sedman, T., Kuusk, S., Kivi, S., & Sedman, J. (2000). A DNA helicase required for maintenance of the functional mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 20(5), 1816-1824.

- Senbongi, H., Ling, F., & Shibata, T. (1999). A mutation in a mitochondrial ABC transporter results in mitochondrial dysfunction through oxidative damage of mitochondrial DNA. *Molecular and General Genetics MGG*, 262(3), 426-436.
- Sentürker, S., Dizdaroglu, M., van der Kemp, P. A., You, H. J., Doetsch, P. W., & Boiteux, S. (1998). Substrate specificities of the Ntg1 and Ntg2 proteins of *Saccharomyces cerevisiae* for oxidized DNA bases are not identical. *Nucleic Acids Research*, 26(23), 5270-5276.
- Shadel, G. S. (1999). Yeast as a model for human mtDNA replication. *The American Journal of Human Genetics*, 65(5), 1230-1237.
- Stehling, O., & Lill, R. (2013). The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(8), a011312.
- Szczepanowska, K., & Foury, F. (2010). A cluster of pathogenic mutations in the 3'–5' exonuclease domain of DNA polymerase gamma defines a novel module coupling DNA synthesis and degradation. *Human molecular genetics*, 19(18), 3516-3529.
- Thomas, B. J., & Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, 56(4), 619-630.
- Tomkinson, A. E., Tappe, N. J., & Friedberg, E. C. (1992). DNA ligase I from *Saccharomyces cerevisiae*: physical and biochemical characterization of the CDC9 gene product. *Biochemistry*, 31(47), 11762-11771.
- Van Dyck, E., Foury, F., Stillman, B., & Brill, S. (1992). A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB. *The EMBO journal*, 11(9), 3421.
- Villemson, K. (2013). *IRC3 valgu mõju mitokondriaalse genoomi stabiilsusele*. Tartu Ülikool.
- Waga, S., & Stillman, B. (1998). The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annual review of biochemistry*, 67(1), 721-751.
- Wanrooij, S., & Falkenberg, M. (2010). The human mitochondrial replication fork in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(8), 1378-1388.
- Ward, T. A., Dudášová, Z., Sarkar, S., Bhide, M. R., Vlasáková, D., Chovanec, M., & McHugh, P. J. (2012). Components of a Fanconi-like pathway control Pso2-independent DNA interstrand crosslink repair in yeast. *PLoS genetics*, 8(8), e1002884.
- Westermann, B. (2014). Mitochondrial inheritance in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837(7), 1039-1046.
- Williamson, D. (2002). The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nature Reviews Genetics*, 3(6), 475-481.

- Woellhaf, M. W., Sommer, F., Schroda, M., & Herrmann, J. M. (2016). Proteomic profiling of the mitochondrial ribosome identifies Atp25 as a composite mitochondrial precursor protein. *Molecular biology of the cell*, 27(20), 3031-3039.
- Yang, X., Chang, H. R., & Yin, Y. W. (2015). Yeast mitochondrial transcription factor Mtf1 determines the precision of promoter-directed initiation of RNA polymerase Rpo41. *PloS one*, 10(9), e0136879.
- Yogev, O., Yogev, O., Singer, E., Shaulian, E., Goldberg, M., Fox, T. D., & Pines, O. (2010). Fumarase: a mitochondrial metabolic enzyme and a cytosolic/nuclear component of the DNA damage response. *PLoS Biol*, 8(3), e1000328.
- Zuo, X., Xue, D., Li, N., & Clark-Walker, G. D. (2007). A functional core of the mitochondrial genome maintenance protein Mgm101p in *Saccharomyces cerevisiae* determined with a temperature-conditional allele. *FEMS yeast research*, 7(1), 131-140.
- Zuo, X. M., Clark-Walker, G. D., & Chen, X. J. (2002). The mitochondrial nucleoid protein, Mgm101p, of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the maintenance of ρ^+ and ori/rep-devoid petite genomes but is not required for hypersuppressive ρ^- mtDNA. *Genetics*, 160(4), 1389-1400.

Kasutatud veebiaadressid

<http://www.yeastgenome.org>

<https://www.hartmann-analytic.de>

<https://www.thermofisher.com>

<http://www.perkinelmer.com>

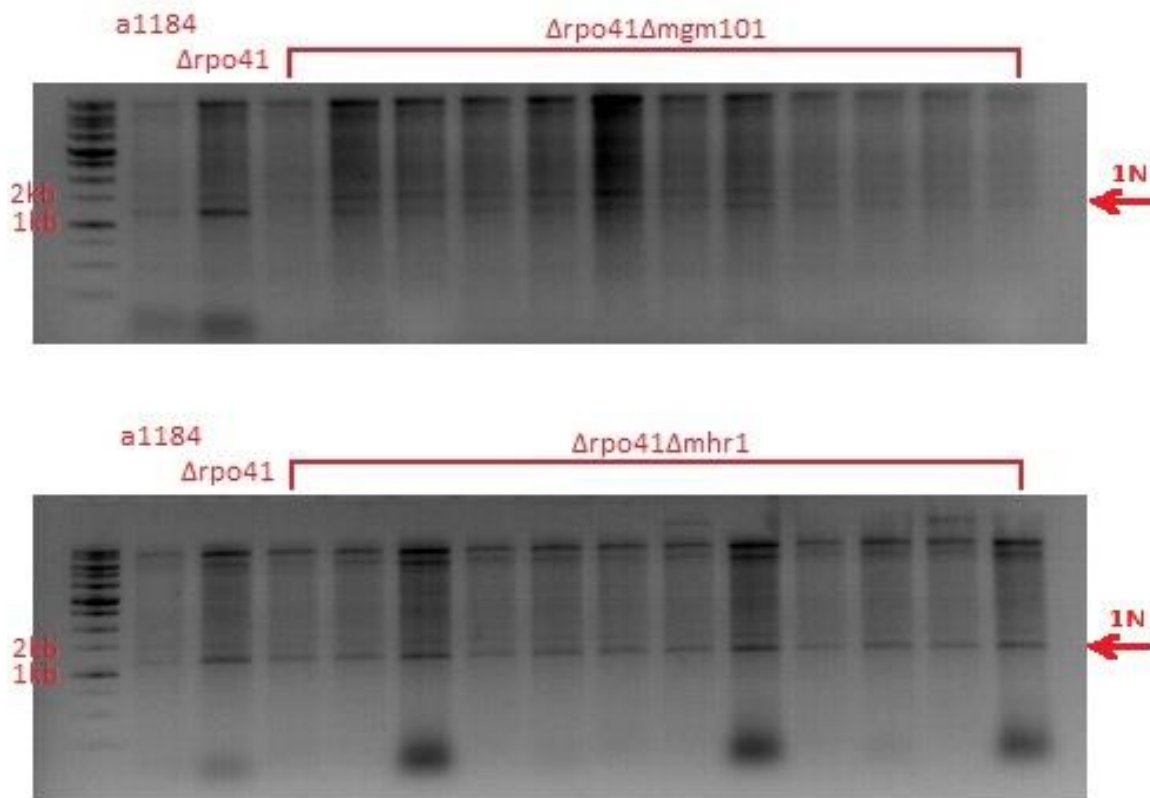
LISAD

Lisa 1. Tüve a1184 mtDNA järjestus.

30305 ATAAAA TAAAATTAAA ATAATTAATA TATATATATA AATATAATAA ATTATTATAT
30361 ATAAATATAT ATAATTTTTA TAATAAATAT TATAATATTA TATAAATAAA TAATTATAAT
30421 ATATAATAAA TATATAATAA TAATAAAAAT ATTAACAATA TAATAAAAAT TTATAATATA
30481 AATATAAATT ATAAATAAGT TAAATTAATA AAATAATAAA TGATTAACAA GAAGATATCT
30541 GGGGTCCCAT TAATAATTAT TATTTTCAAT AATAATTGGG ACCCCCACC ATTATAATAT
30601 CATATTAATT AATATAATAA TAATGTATAT AAAATAGAAA TAATAATTA TATAATAATA
30661 ATAATATATA TAAAATAGAA ATAATAATTA AATATATATA TAAATAATTA TTTATATAAT
4830721 ATATTATAAA TAATAATAAT AATAAATATT TATTAATTA TAATGATTAT AAATATTTTA
30781 TTTAATATAA ATTTATAACT ATTTTATTAT ATATATATTT TTTATTCATA AAAATTCCTT
30841 TTGAGGATTT TTATTTTATA TAAATATCTT CTAATATTTA TAATAATAA TAATATATTC
30901 ATTATATTTA TAATTATATA TAAT
DELTA 1008 NT TATAATTATAAATAATTT ATATAAAAAA AGTTTTATTA AAAAATATTA
31981 TTA AAAAATAT AATATTAATA ATAAATAAAA ATAATATTAT ACTCTTAATA GAATTTATAA
32041 TGATAAAAAT TAAGATGAAG ACTTTTTTTT ATAATTATTA TAAATTTATA TAAAAATAAT
32101 ATATATATAT TTATATTTAT TTTATTAATA TATATAATAT ATTTATGTAT ATTA AAAAGA
32161 TATA **TTTAAA** TATTTTTTATT TTTTTTTTAT AAGATAATTT TTGTAAATAT ATAAGTAATA
32221 AATTAAGTTT TATAGGGGGA GGGGGTGGGT GATTAGAAAC TAACTGAAT AATATATATA
32281 AAGCATACAT TAGTTAATAT TTAATAATAT AATCAATATA TAATAATTAT AAAATAATTA
32341 ATTATATAAT AATAATAATG TATAACAAT ATAATAAATT GTATAAAAATA AAATATAAAT
32401 CATAAATAAA GCTAAATTA TAAAATAATA AATGATAAAC AAGAAGATAT CCGGGTCCCA
32461 ATAATAATTA TTATTGAAAA TAATAATTGG GACCCC 32498

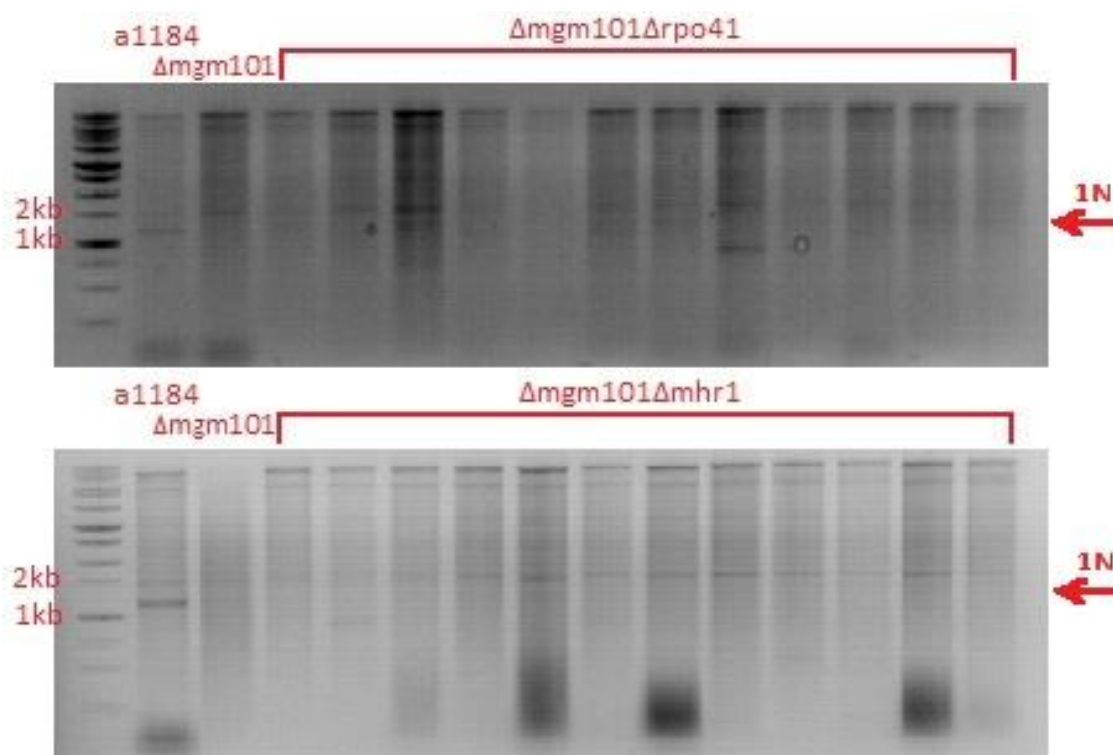
Tüve a1184 mtDNA fragment pärineb metsiktüüpi (W303) mtDNA piirkonnast 30305-32498bp, fragmendi suurusega 1184bp. Delta 1008 nt tähistab 1008 aluspaari suurust deletsiooni. Restriktaasi DraI lõigesait on tähistatud rohelisega paksus kirjas. Sinisega tähistatud *ori2* regioon ning allajoonitult selle A, B ja C G/C plokk. Punasega tähistatud poolik, inaktiivne *ori7* regioon ning allajoonitult selle A, B ja G/C plokk.

Lisa 2. Geelektroforeesil saadud EtBr-ga värvitud geelipilt a1184 Δ rpo41 Δ mgm101 ja a1184 Δ rpo41 Δ mhr1 tüvedest.



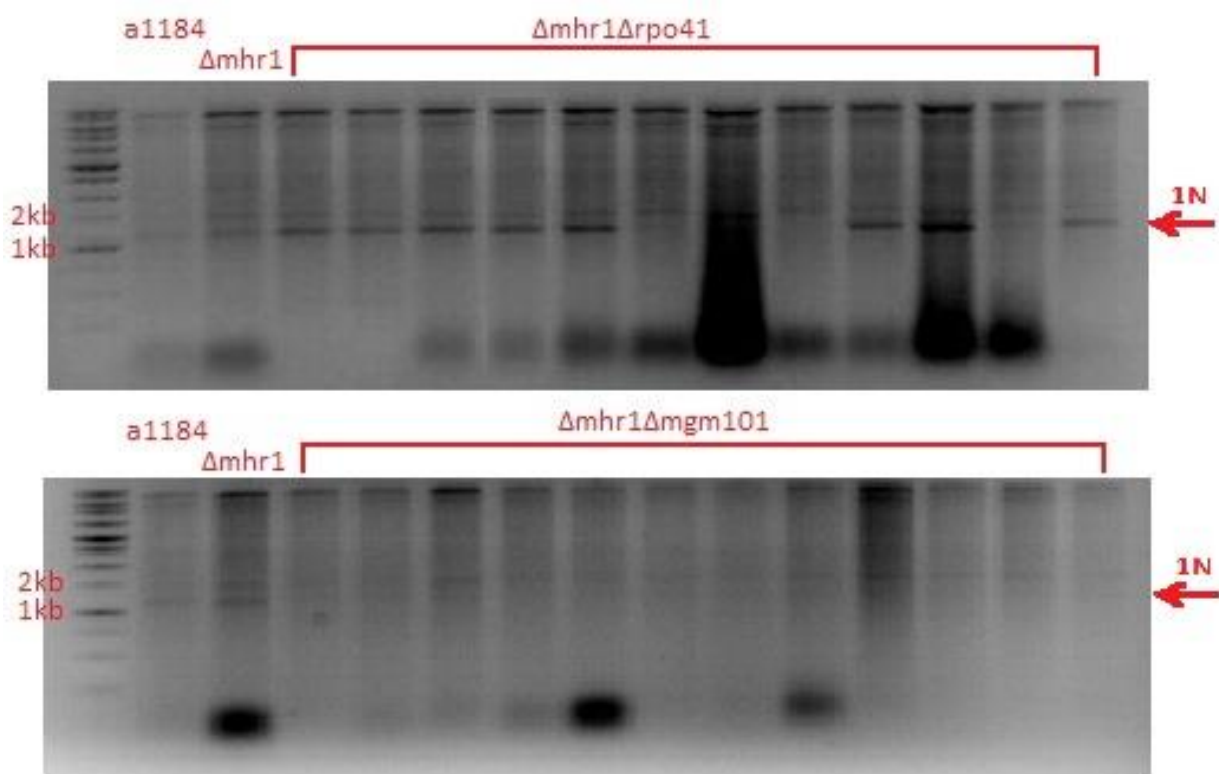
Vasakul ääres mõlemal juhul marker. Pildil on ka mõne proovi puhul näha restriksioonil tekkinud 1N fragment, suurusega 1184bp, mis on kõrguselt 1kb ja 2kb markeri fragmendi vahel. Joonisel on märgitud ka 1N fragment, mis tekib lõikamisel.

Lisa 3. Geelektroforeesil saadud EtBr-ga värvitud geelipilt a1184 Δ mgm101 Δ rpo41 ja a1184 Δ mgm101 Δ mhr1 tüvedest.



Vasakul ääres mõlemal juhul marker. Pildil on ka mõne proovi puhul näha restriksioonil tekkinud 1N fragment, suurusega 1184bp, mis on kõrguselt 1kb ja 2kb markeri fragmendi vahel. Joonisel on märgitud ka 1N fragment, mis tekib lõikamisel.

Lisa 4. Geelektrofooresil saadud EtBr-ga värvitud geelipilt a1184 Δ mhr1 Δ rpo41 ja a1184 Δ mhr1 Δ mgm101 tüvedest.



Vasakul ääres mõlemal juhul marker. Pildil on ka mõne proovi puhul näha restriktsoonil tekkiv 1N fragment, suurusega 1184bp, mis on kõrguselt 1kb ja 2kb markeri fragmendi vahel. Joonisel on märgitud ka 1N fragment, mis tekib lõikamisel.

Lisa 5. Masinaga Tri-Carb 2800TR Liquid Scintillation Analyzer mõõdetud radioaktiivsus.

Assay Definition-

Assay Description:

Direct DPM for any single label isotope !

Assay Type: Direct DPM

Report Name: Report1

Output Data Path: C:\Packard\Tricarb\Results\aiavar\direct_dpm\20161205_1909
Raw Results Path:
C:\Packard\Tricarb\Results\aiavar\direct_dpm\20161205_1909\20161205_1909.results

RTF File Name:

C:\Packard\Tricarb\Results\aiavar\direct_dpm\20161205_1909\Report1.rtf

Comma-Delimited File Name:

C:\Packard\Tricarb\Results\aiavar\direct_dpm\20161205_1909\Report1.csv

Assay File Name: C:\Packard\TriCarb\Assays\direct_dpm.lsa

Additional Data Files Generated with this Protocol:

Report1

[Excel] Report1.csv

[RTF] Report1.rtf

Count Conditions-

Nuclide: Direct DPM 3H

Quench Indicator: tSIE/AEC

External Std Terminator (sec): 0.5 2s%

Pre-Count Delay (min): 0.00

Quench Set:

Low Energy: 3H

Count Time (min): 3.00

Count Mode: Normal

Normalization Std DPM: 142500

Assay Count Cycles: 1

Repeat Sample Count: 1

#Vials/Sample: 1

Calculate % Reference: Off

Background Subtract: Off

Low CPM Threshold: Off

2 Sigma % Terminator: Off

Regions LL UL

A 0.0 2000.0

Count Corrections-

Static Controller: On

Luminescence Correction: Off

Colored Samples: n/a

Heterogeneity Monitor: n/a

Coincidence Time (nsec): 18

Delay Before Burst (nsec): 75

Half Life-

Half Life Correction: Off

Regions Half Life Units Reference Date Reference Time

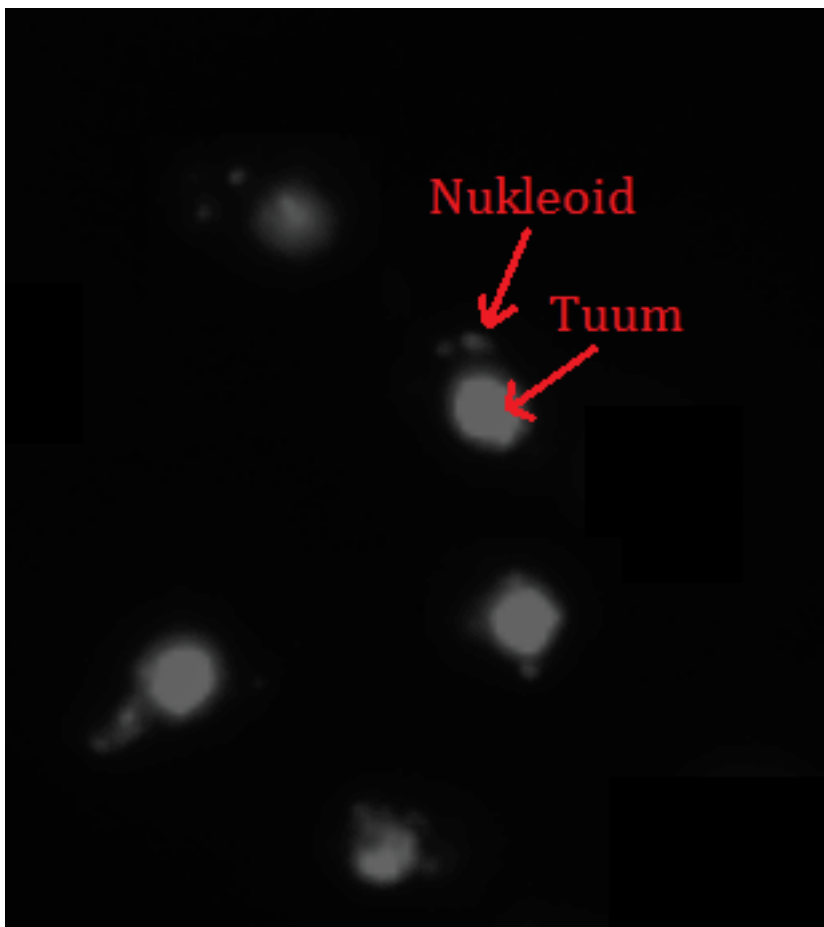
A

Cycle 1 Results

S#	Count	Time	CPMA	DPM1	SIS	tSIE	MESSAGES
1		3.00	2437	2734	1125.73	600.44	
2		3.00	6100	6129	1283.52	612.19	
3		3.00	397847	400672	1415.62	688.60	

Esimene proov on 70% pesuetanoolist võetud proov, teine 96% etanoolist võetud proov ning kolmas proov on sadet sisaldavast TEN-puhvrist võetud proov. Nagu näha, on TEN-puhvri signaal ~sada korda suurem, kui etanooli lahustel, seega oli enamus radioaktiivsusest sademes ning proov kasutamiseks sobilik. Masinaga mõõtmiseks võtsin 1 µl vastavat proovi ning lisan selle 5ml-sse Optiphase HiSafe 3 lahusesse (*PerkinElmer*).

Lisa 6. DAPI-ga värvitud pagaripärmi rakud.



Pildistatud programmiga cellSens Standard, kasutades 1000x suurendust ning mikroskopeerides õliimmersioonis. Pildil on näha, kuidas DAPI-ga värvunud tuum on suur, samas, kui nukleoid (mis on umbes 1/10 tuuma suurusest) paikneb enamasti tuumast eemal.

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Aivar Meldre (sünnikuupäev 04.02.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose „Potentsiaalsete replikatsioonis osalevate valkude deletsiooni mõju mitokondriaalse DNA stabiilsusele ja hulgale”, mille juhendaja on Tiina Sedman (PhD)

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

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace´i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Tartus, 29.05.17