

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

Valentina Rukins

***Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalse nukleaasi Din7 *in vivo*
analüüs ja rekombinantse valgu ekspressioon**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendajad professor Juhan Sedman
MSc Sirelin Sillamaa

TARTU 2020

Infoleht

***Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalse nukleaasi Din7 *in vivo* analüüs ja rekombinantse valgu ekspressioon**

Valentina Rukins

Kokkuvõte. Funktsionaalne mitokondriaalne genoom, mille metabolismis osalevad mitmed tuuma DNA-lt transleeritud valgud (k.a nukleasid), kodeerib mõningaid elektrontranspordiahelas osalevaid komponente ning on oluline rakkude respiratoorse võime säilitamiseks. Käesolevas töös analüüsiti transformatsiooni teel saadud mitokondriaalset eksonukleaasi kodeeriva DIN7 geeni deletsiooni mõju *S. cerevisiae* rakkudele ning võrreldi seda respireeriva metsiktüüpi tüvega. Lisaks konstrueeriti Din7 valgu ekspressioonivektor edaspidiseks puhastamiseks ning optimeeriti liitvalgu ekspressiooni tingimusi (kasvusööde ja ekspressioonitemperatuur). Töö tulemused kinnitavad, et Din7 valk ei ole hädavajalik funktsionaalse mtDNA säilitamisega seotud protsessides.

CERCS kood: P310 Proteiinid, ensümolooogia; P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

Märksõnad: Din7, nukleasid, mitokonder, *Saccharomyces cerevisiae*

***In vivo* analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial nuclease Din7 and expression of the recombinant protein**

Valentina Rukins

Abstract. Mitochondrial genome is required for the maintenance of respiratory activity and encodes few proteins that are involved in the electron transport chain. Several proteins (including nucleases) encoded by nuclear genome also participate in mtDNA metabolism helping to maintain its integrity. In this work the effect of DIN7 gene deletion obtained after transformation of baker's yeast was analyzed and compared to a wild-type strain. In addition, Din7 protein expression vector was constructed and its expression was optimized. The results of this work confirm that the Din7 protein is not essential for the processes involved in maintaining functional mtDNA.

CERCS code: P310 Proteins, enzymology; P320 Nucleic acids, protein synthesis

Keywords: Din7, nucleases, mitochondrion, *Saccharomyces cerevisiae*

Sisukord

Infoleht	2
Sissejuhatus	5
Kasutatud lühendid	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mudelorganismina	7
1.2. Mitokondrid	8
1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mitokondriaalne DNA	8
1.4. Nukleaaside üldiseloomustus	10
1.5. Pagaripärmi mitokondriaalsed DNA nukleaaasid	11
1.6. Din7 üldiseloomustus	13
2. Eksperimentaalne osa	16
2.1. Töö eesmärgid	16
2.2. Materjalid ja meetodika	17
2.2.1. Tüved	17
2.2.2. Lahused	18
2.2.3. Söötmed	19
2.2.4. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	19
2.2.5. DNA puhastamine fenool-kloroform töötusega	22
2.2.6. Pagaripärmi LiOAc transformatsioon	22
2.2.7. Pärmi DNA eraldamine (LiOAc puhastus)	23
2.2.8. Sporulatsioon ja tetraadide analüüs	23
2.2.9. Haplotüüpide määramine	24
2.2.10. Pärmi rakkude elumuse mõõtmine madala glükoosisisaldusega tardsöötme tassil ...	24
2.2.11. DNA restriksioon ja ligeerimine	25
2.2.12. Bakterirakkude transformatsioon	26
2.2.13. Plasmiidse DNA eraldamine väikesest mahust	26
2.2.14. Din7 valgu ekspressioon <i>E. coli</i> rakkudes	27

2.2.15. Din7 valgu puhastamine <i>E. coli</i> rakkudest afiinsuskromatograafia meetodil.....	27
3. Tulemused ja arutelu	29
3.1. Din7 deletsiooni kasseti transformatsioon haploidsetesse <i>S. cerevisiae</i> rakkudesse	29
3.2. Diploidsete W303a/ α DIN7/ <i>din7</i> Δ tüvede sporulatsioon ja Din7 deletsiooni mõju respiratsioonile	32
3.3. Pärmirakkude elumuse mõõtmine madala glükoosisisaldusega tardsöötme tassidel	35
3.4. Din7 valgu ekspressiooni tingimuste optimeerimine.....	38
Kokkuvõte	42
Summary.....	43
Tänuõnad.....	44
Kasutatud kirjandus	45
Lihtlitsents	52

Sissejuhatus

Mitokonder on rakuorganell, millele on iseloomulik iseseisev genoom. Mitokondri sisemembraanis leiab aset elektrontranspordiahel, mille käigus sünteesitakse ATP-d. *Saccharomyces cerevisiae* eeliseks on tema võime elada ilma respiratsioonita glükoosi sisaldaval söötmel, varustades ennast energiaga glükolüüsi rajas saadud ATP-ga. Elektrontranspordiahela komponente kodeerib osaliselt mitokondriaalne genoom, kuid suurt tähtsust respiratoorse võime säilimisel omavad ka rakutuumast pärit valgud.

Mitmed tuumas kodeeritud mitokondriaalsed nukleaaasid osalevad rakkude mitokondriaalse DNA terviklikkuse ja seekaudu ka respiratoorse aktiivsuse säilimisel. Näiteks põhjustab Rad27 valgu deleteerimine ümberkorraldusi mitokondriaalses DNA-s (Kalifa jt., 2009).

Käesoleva töö uurimisobjektiks on mitokondriaalne nukleaaas Din7, mille ekspressioon tõuseb DNA kahjustuste korral ja meioosi ajal (Mieczkowski jt., 1997). Varasemalt on näidatud, et Din7 valgu hulk on pagaripärmis rangelt reguleeritud ning selle suurenemine või vähenemine avaldab mõju mitokondriaalse DNA stabiilsusele, mis väljendub mtDNA osalises kadumises ja kõrgeenenud hingamisvõimetute *petite* mutantide tekkesageduses (Fikus jt., 2000; Ling jt., 2013; Yoshitani jt., 2008 a). Ehkki Din7 nukleaaas avastati üle 30 aasta tagasi, pole siiani suudetud seda täielikult puhastada, mis raskendab valgu ensümaatilise aktiivsuse korrektset analüüsi.

Antud uurimistöö raames valmistati *S. cerevisiae* W303 *din7* Δ deletsioonitüved ja analüüsiti nende respiratoorse aktiivsuse muutumist ajas. Samuti võrreldi *din7* Δ mutantide ja metsiktüüpi rakkude mtDNA säilimist pidevas ja statsionaarses rakukultuuris. Lisaks konstrueeriti Din7 valgu ekspressioonivektor ning kontrolliti selle ekspressiooni *Escherichia coli* BL21 DE3 RIL tüve rakkudes erinevates kasvusöötmes ja ekspressioonitemperatuuridel.

Kasutatud lühendid

-AA – aminohappete vaba sööde (*amino acid free meedium*)

BSA – veise seerumi albumiin (*bovine serum albumin*)

DSB – kaksikahelalised katked (*double-strand breaks*)

dsDNA – kaheahelaline DNA (*double-stranded DNA*)

G418 – genetsiin

HS – hüpersupressiivsed ρ^+ hingamismutandid

HU – hüdroksüurea

IPTG – isopropüül β -D-1-tiogalaktopüranosiid (*isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*)

kb – tuhat aluspaari (*kilobase pair*)

LB – lüsogeenne sööde (*lysogeny broth medium*)

LRR – leutsiinirikad kordused (*leucine-rich repeat*)

M9 – M9 minimaalsööde kasaminohapetega

MMS – metüülmetaansulfonaat

MQ – Milli-Q vesi

mtDNA – mitokondriaalne DNA

N – neutraalsed ρ^+ hingamismutandid

OD₆₀₀ – optiline tihedus valguse lainepikkusel 600 nm (*optical density*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

SDS – naatrium dodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfate*)

ssDNA – üheahelaline DNA (*single-stranded DNA*)

U – ühik (*unit*)

wt – metsiktüüp (*wild type*)

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

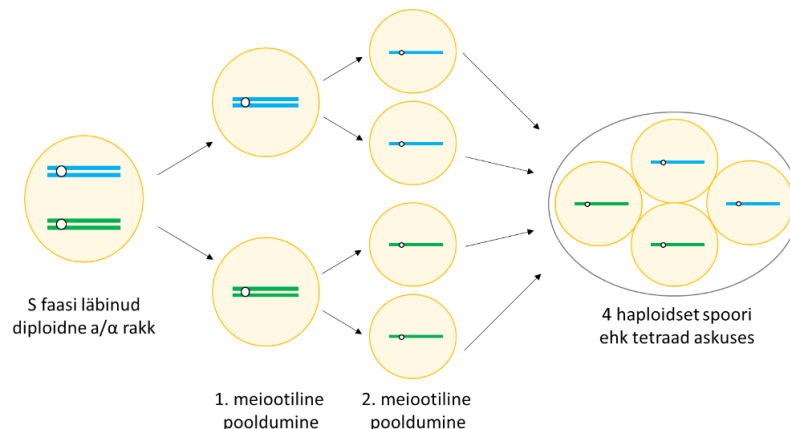
YPG – glütserooli sisaldav sööde (*yeast extract, peptone, glycerol*)

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. *Saccharomyces cerevisiae* mudelorganismina

Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* on ainurakne eukarüoot. *S. cerevisiae* (referentstüvi S288C) 12 Mb (*Megabase pair*, miljon aluspaari) pikkune DNA on jaotatud 16 kromosoomi vahel ning sisaldab üle 6000 avatud lugemisraami (*open reading frame*, ORF). Ühtlasi oli *S. cerevisiae* ka esimene päristuumne organism, kelle genoom täielikult sekveneeriti (Goffeau jt., 1996; Engel jt., 2014). Erinevalt teistest eukarüootsetest organismidest (sh teised pärmiliigid) on *S. cerevisiae* tuuma genoomile iseloomulik kõrge geenitihedus ja peaaegu täielik intronite puudumine (Goffeau jt., 1996).

S. cerevisiae’l esineb kaks paardumistüüpi (a ja α), mille paardumisel saadakse diploidne a/α sügoot. Paardumistüübi määrab MAT (*mating type*) lookus, mis asub pärmi III kromosoomis. MAT lookuse poolt kodeeritud valgud aktiveerivad paardumiseks vajalikke geene. Sealhulgas on geen, mis kodeerib sugufaktorit – hormoonilaadset ainet (feromoon), mis põhjustab rakutsükli peatumist G1 faasis ja initsieerib erineva paardumistüübiga raku kuju muutust, millele järgneb rakkude konjugatsioon (Duntze jt., 1970; ülevaade Haber, 2012). Tähelepanuväärne on pärmi α -feromooni polüpeptiidi järjestuse sarnasus inimese gonadotropiini-vabastajahormooniga (GnRH) ning võime seda komplementeerida (Loumaye jt., 1982). Haploidsete rakkude paardumist diploidsetega ei ole täheldatud (Duntze jt., 1970). Samuti on limiteeritud samasugust MAT lookust omavate haploidsete rakkude paardumine (Lindegren ja Lindgren, 1943). Nii *S. cerevisiae* haploidsed kui diploidsed rakud jagunevad mitootilise pungumise teel. Lämmastiku- ja dekstroosivaestes tingimustes ning atsetaadi olemasolul läbivad a/α diploidid meioosi ja sporuleeruvad. Selle tagajärjel moodustub askus, mis sisaldab neli (2 MATa ja 2 MAT α) spoori (vt. Joonis 1) (ülevaade Haber, 2012).



Joonis 1. Diploidse *S. cerevisiae* raku sporulatsioon ebasoodsates tingimustes, mille tulemusena tekib tetraad.

Kuigi laborites kasutatavate tüvede paardumistüübid on reeglina stabiilsed ja ei muutu aja jooksul, on enamuse *S. cerevisiae* metsikutest tüvedest võimelised oma paardumistüüpi ümber programmeerima (Tanaka jt., 1984). Diploidsete *S. cerevisiae* rakkude sporulatsioonivõimet kasutatakse teadustöös, et viia läbi tetraadide analüüsi, millega saab uurida näiteks geenide koopiaarvu mõju rakule ning tuvastada rakule hädavajalikke geene (ülevaade Duina jt., 2014).

1.2. Mitokondrid

Enamikke eukarüootseid organisme varustab energiaga mitokonder. Mitokonder on ümbritsetud kahe membraaniga, mistõttu jaotatakse mitokonder kaheks kompartmendiks: välis- ja sisemembraaniga eraldatud membraanivaheline ruum ja maatriks (Palade, 1953). Mitokondri sisemembraanis leiab aset ADP oksüdatiivne fosforüülimine, mille käigus sünteesitakse ATP-d. Lisaks raku hingamisele ja ATP sünteesile seostatakse mitokondreid muude oluliste ülesannetega nagu aminohapete, lipiidide ja heemi süntees, signaliseerimine, Fe-S klastrite kokkupanemine, rakukasvu ja -tsükli regulatsioon ning apoptoos (ülevaade Malina jt., 2018; ülevaade McBride jt., 2006).

Arvatakse, et mitokonder on tekkinud endosümbioosi teel. Seda teooriat toetab asjaolu, et mitokondril on iseseisev genoom ja omapärane geneetiline kood ning 16S rRNA järjestuse analüüsi tulemusena on selgunud, et mitokondri eellane võib olla alfa-proteobakter (Himeno jt., 1987; Nass ja Nass, 1963; Yang jt., 1985).

S. cerevisiae on hea mudelorganism mitokondri funktsiooni uurimiseks. Pagaripärm on fakultatiivne anaeroob, mis ei vaja elus püsimiseks funktsionaalset mitokondrit, kui fermenteeritav süsinikuallikas (näiteks glükoos) on kättesaadav (de Deken, 1965). Kolooniade puna-valge värvitesti kasutades saab eristada glükoosi sisaldaval söötmel hingamisvõimelisi ja -võimetuid kolooniaid. *ade2* geeni mutatsiooni tõttu on *S. cerevisiae* laboritüvedel häiritud adeniini biosüntees, mistõttu rakkudes kuhjub vaheprodukt, mis respiratsiooni korral oksüdeerub ning rakud moodustavad punaseid kolooniaid. Hingamisdefektiga rakkudes punast pigmenti ei teki ja nende kolooniad jäävad valgeteks (Kim jt., 2002). Seega jälgides pärmikolooniade värvi on võimalik identifitseerida protsesse ja valke, mis tagavad funktsionaalse mitokondri säilitamise.

1.3. *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalne DNA

S. cerevisiae mitokondriaalne DNA koosneb umbes 85 kb-st (*kilobase pair*, tuhat aluspaari), mis on tihedalt pakitud DNA-valk kompleksi ehk nukleoidi (Foury jt., 1998; Miyakawa jt., 1987). Pagaripärmi mtDNA-le on iseloomulik kõrge adeniini ja tümiini sisaldus ning madal

guaniini ja tsütosiini sisaldus, mis on peamiselt koondatud lühikestesse G+C-klaastritesse. *S. cerevisiae* (referentstüvi FY1679) mitokondriaalset genoomi peetakse geenivaeseks, kuna ta kodeerib ainult 8-t valku. Nendest 7 valku kuulub hingamisahelas osalevate valgukompleksite subühikute koosseisu (tsütokroom c oksüdaas, apotsütokroom b, ATPsüntaas). Lisaks kodeerib mtDNA ühte ribosomaalset valku (*var1*), kahte rRNA-d (15S ja 21S) ning 24 tRNA-d (Foury jt., 1998). Mitokondriaalse genoomi poolt kodeeritud valkude transleerimiseks on mitokondritel oma ribosoomid (Schmitt, 1969).

Pagaripärmi mtDNA sisaldab ka 8-t lühikest *ori*-järjestust, mille sees paiknevad 3 G+C-rikast plokki. Transkriptsioonis osalevateks ehk aktiivseteks järjestusteks peetakse *ori*-1, -2, -3 ja -5, sest nad sisaldavad transkriptsiooni initsiatsiooniks vajalikku promootorit (de Zamaroczy jt., 1984; Foury jt., 1998).

S. cerevisiae petite hingamismutante, mis tekivad mtDNA ümberkorralduste tagajärjena, kutsutakse tsütoplasmaatilisteks. Nad moodustavad väikseid kolooniaid glükoosi sisaldaval söötmel ning ei suuda kasvada mittefermenteeritaval süsinikuallikal. Funktsionaalset mtDNA-d tähistatakse ρ^+ ; mitokondriaalse genoomi osalisel kadumisel on tegemist ρ^- ning täielikul kadumisel – ρ^0 mutantidega (Tzagaloff ja Dieckmann, 1990; ülevaade Westermann, 2014). Metsiktüübi tüvede ristamisel ρ^- mutantidega mutantne genotüüp järglaskonnas võib kas kaduda ära, ilmuda pooltel või peaaegu kõikidel järglastel. Vastavalt sellele on tegemist kas neutraalsete (N), supressiivsete (S) või hüpersupressiivsete (HS) ρ^- tüvedega. Hüpersupressiivsuse tekkeks on oluline, et ρ^- mutandi mtDNA-s oleks säilinud aktiivne *ori*-järjestus (Blanc ja Dujon, 1980).

Mitokondris toimuvate protsesside kulgemiseks ei piisa ainuüksi mtDNA poolt kodeeritud valkudest. Kahest eraldiseisvast *S. cerevisiae* mitokondriaalse proteoomi uuringust on leitud, et umbes 900–1000 tuuma poolt kodeeritud valku suunatakse pärast sünteesi mitokondritesse (Morgenstern jt., 2017; Vögtle jt., 2017). Paljude valkude transportimisel mitokondritesse on võtmeroll N-terminaalsetel sihtmärk signaalidel, mis valgu saabumisel õigesse kompartmenti lõigatakse peptidaaside poolt ära (Vögtle jt., 2009).

Ainult 12% mitokondriaalsetest valkudest on seotud energia sünteesiga, seevastu 26% vastutab mitokondriaalse DNA säilimise ja geenide ekspressiooni eest (Morgenstern jt., 2017). Mitokondriaalse DNA tervikliku säilimise eest vastutavad erinevad tuumas kodeeritud valgud, mis osalevad mtDNA metabolismis, näiteks mtDNA polümeraas Mip1, resolvaas Cce1 ning helikaasid Hmi1 ja Pif1 (Foury, 1989; Foury ja Kolodyncki, 1983; Kleff jt., 1992; Sedman jt., 2000).

1.4. Nukleaaside üldiseloostus

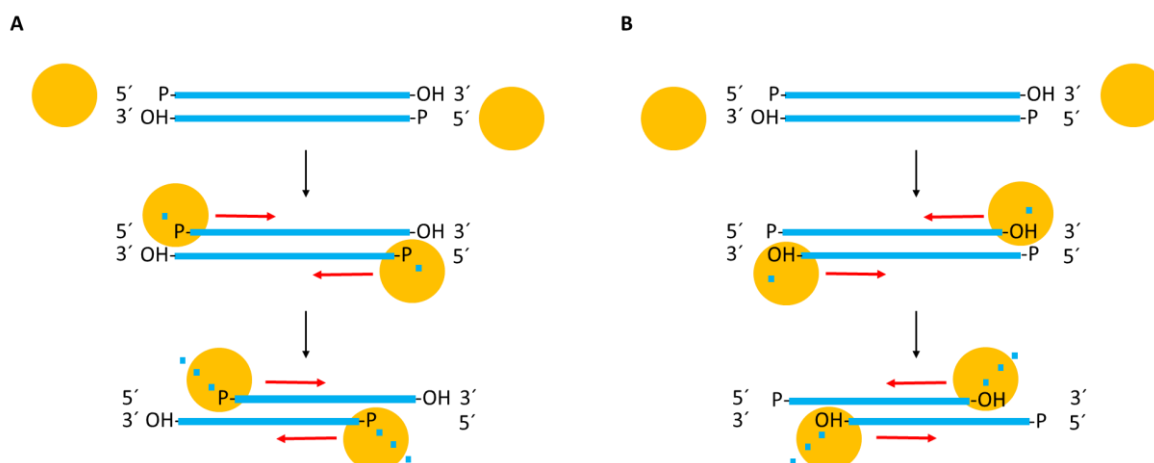
Nukleaasid on laialt levinud ensüümid, mis suudavad katalüüsida nukleiinhapete stabiilse fosfodiesterideme lõhkumist. Nagu paljud teised ensüümid, vajavad ka nukleaasid sageli ensümaatiliseks aktiivsuseks kofaktoreid kahevalentsete metallioonide kujul, millest kõige levinum on Mg^{2+} (ülevaade Yang, 2010). Nukleaase on kirjeldatud kõikides eluslooduse domeenides ja ka viirustes (Dake jt., 1988; Guy jt., 2004; Hickson jt., 1985; Kang ja McAuslan, 1972).

Nukleaaside mitmekesisus võimaldab neil osaleda paljudes DNA metabolismiga seotud protsessides. DNA replikatsiooni edukaks toimumiseks on vaja nukleaasid aktiivsust, et eemaldada RNA primereid ja DNA sünteesi käigus tekkinud paardumisvigu. Samuti on nukleaasid kaasatud lämmastikaluste või nukleotiidide väljalõikes ning DNA kaheahelaliste katkete parandamises rekombinatsiooni teel (ülevaade Mimitou ja Symington, 2009; ülevaade Yang, 2010). Lisaks osalevad nukleaasid DNA topoloogia muutmises, sait-spetsiifilises rekombinatsioonis, RNA töötlemises (ka splaissimise) ja interferentsis ning apoptoosis (Macrae jt., 2006; Büttner jt., 2007; ülevaade Yang, 2010; ülevaade Bruni jt., 2017).

Laskowski järgi võib nukleaase klassifitseerida järgmiselt (Laskowski, 1967):

1. Nukleaase jaotatakse substraadispetsiifilisuse alusel RNA ja DNA nukleaasideks, olenevalt sellest, millise nukleiinhappe fosfodiesteridemet suudab nukleaas lõhkuda (Laskowski, 1967). Tänapäeval on kirjeldatud üle 30 suhkru-mittespetsiifilist nukleaasi (ülevaade Rangarajan ja Shankar, 2001).
2. Nukleiinhappe lõikamisviisi järgi eristatakse endo- ja eksonukleaase. Endonukleaasid lõikavad fosfodiesteridest nukleiinhappe seest, mille tulemusena tekkivad oligonukleotiidid. Seevastu eksonukleaasid lagundavad nukleiinhappeid mono- või dinukleotiidideks alustades molekulide otstest (Laskowski, 1967). Ent leidub ensüüme, mis omavad mõlemat aktiivsust, nagu näiteks Flap endonukleaaside 1 (FEN1) perekonda kuuluvad nukleaasid (Harrington ja Lieber, 1994).
3. Eksonukleaasidele on omane polaarsus, mille määrab nukleotiidide eemaldamise suund ensüümi poolt: $5' \rightarrow 3'$ või $3' \rightarrow 5'$ suunas (vt. Joonis 2) (ülevaade Yang, 2010).
4. Oluliseks peetakse ka nukleaaside jaotamist nukleotiidide vahelise sideme ($3'$ -fosfaat ja fosfaat- $5'$) lõhkumise järgi. Vastavalt sellele paikneb monofosfaat nukleaasse aktiivsuse tagajärjena vabastatud nukleotiidi $5'$ või $3'$ otsas. (Laskowski, 1967).

5. Nukleiinhappe ahela spetsiifilisuse järgi on võimalik jagada nukleaasid ühe- ja kaheaahelaspetsiifilisteks, millest esimesed lagundavad üheaahelalisi nukleiinhappeid ja teised – kaheaahelalisi (Laskowski, 1967).
6. Mõned nukleaasid on saitspetsiifilised. Nad teevad katkeid nukleiinhappes, kui tunnevad ära spetsiifilisi nukleotiidseid järjestusi (restriktsioonisaite) (Laskowski, 1967). Looduses kasutavad mikroorganismid saitspetsiifilisi endonukleaase ehk restriктаase, et kaitsta ennast viiruste eest (Jinek jt., 2012).
7. Eristatakse struktuurispetsiifilisi nukleaase, mis teevad fosfodiestersidemes katkeid tundes ära kindlaid tertsiaarseid struktuure nukleiinhappetes (Laskowski, 1967).



Joonis 2. Joonisel on kujutatud eksonukleaaside polaarsus. (A) 5'→3' eksonukleas eemaldab mononukleotide DNA 5' otsast ning produtseerib 3' üleulatuvaid otsi. (B) 3'→5' eksonukleas eemaldab mononukleotide DNA 3' otsast ning produtseerib 5' üleulatuvaid otsi.

Tüüp II restriктаaside bioinformaatiline analüüs on näidanud, et erineva ruumilise struktuuri ja toimemehhanismiga nukleaasid võivad omada sarnast funktsiooni (Orlowski ja Bujnicki, 2008). Seevastu sarnase ehitusega nukleaasid võivad osaleda erinevates bioloogilistes protsessides nagu seda on näidatud HIV integraasi, RuvC ja RNase H puhul (Yang ja Steitz, 1995). Seetõttu on nende liigitamine aminohappelise järjestuse alusel raskendatud.

1.5. Pagaripärmi mitokondriaalsed DNA nukleaasid

Saccharomyces cerevisiae mitokondrisse lokaliseeruvad mitmed tuuma genoomi poolt kodeeritud nukleaasid aktiivsust omavad valgud (Morgenstern jt., 2017). Nende valkude biokeemilised tunnused ja funktsioonid on väga erinevad.

Nuc1 on tuntud kui põhiline mitokondriaalne nukleas, mis lokaliseerub mitokondri sisemembraani. Tegemist on hüdrofoobse eksonukleasiga, mis lõhub dsDNA fosfodietersidemeid 5'→3' suunas (vt. Joonis 2A). Lisaks omab Nuc1 endonukleasid aktiivsust nii ssDNA-l kui dsDNA-l ning on substraadina võimeline kasutama ka RNA

molekule. Olenevalt substraadist ja kontsentratsioonist vajab aktiivsuseks kas Mg^{2+} , Co^{2+} või Mn^{2+} . Katsed haploidsete nullmutantide ekstraktiga ja antikehade poolt valgu inhibeerimisega näitasid, et Nuc1 puudumisel kaob mitokondris peaaegu kogu nukleaaasne aktiivsus (Dake jt., 1988). Nuc1 on samuti tähelepanuväärne, kuna ta on inimese EndoG homoloog ning osaleb apoptoosis. Nimelt on *nuc1Δ* mutandid tuntud apoptoosiraja käivitava p53 valgu suhtes ning nende suremus on tunduvalt väiksem kui teistel programmeeritud rakusurmas osalevate valkude mutantidel (*yca1Δ*, *aif1Δ*) (Palermo jt., 2013). On välja pakutud, et stressi tingimustes vabaneb Nuc1 mitokondrist ning suundub karüoferiin KAP123 abil rakutuuma, kus lõikab DNA-d (Büttner jt., 2007).

Exo5 on *S. cerevisiae* 5'→3' eksonukleaaas, mis lokaliseerub mitokondrisse (Burgers jt., 1988; Vögel jt., 2017). Valgu aminohappeline järjestus on kõrgelt konserveerunud erinevates organismides ning see sisaldab tugevat mitokondrisse suunamise signaali, mis mitokondrisse jõudes lõigatakse ära Ser26/Leu27 positsioonis (Burgers jt., 2010).

Exo5 valk on ssDNA spetsiifiline ning vajab Mg^{2+} olemasolu, et viia läbi nukleiinhappe lagundamist dinukleotiidideks. Teoreetiliselt suudab Exo5 lagundada pürimidiini dimeere, mis tekivad UV-kiirguse toimele (Burgers jt., 1988). On näidatud, et Exo5 võib libiseda mööda dsDNA- ja RNA-d, et lõigata ssDNA-d kaks nukleotiidi allavoolu RNA-DNA või dsDNA-ssDNA ühinemiskohast (Burgers jt., 2010).

Cce1 (*cruciform cutting endonuclease*) on Holliday-ühenduste-sarnaseid struktuure lõikav mitokondriaalne endonukleaaas (resolvaas) (Kleff jt., 1992). Cce1 tunneb ära 5'-ACT↓A järjestust ja lõikab Holliday-ühenduse-sarnaseid struktuure selle koha pealt (Schofield jt., 1998). Cce1 valgu deletsioon ei ole pagaripärmile letaalne. *cce1Δ* deletsioonitüvedes on täheldatud suurenenud *petite* mutantide tekkesagedust, mis viitab Cce1 osalusele mtDNA stabiilsuse säilitamises. Tetraadide analüüsist selgus, et vaatamata Cce1 võimele lõigata X-struktuure, ei osale ta meioosis, kuna rakkude sporulatsioon selle valgu puudumisel ei ole häiritud (Kleff jt., 1992).

Ngl1 on kõrgelt konserveerunud valk, mille ortolooge leidub mitmetes eukarüootides ja mis omab motiive leutsiinirikaste kordustega (*leucine-rich repeat*, LRR) (Malvar jt., 1992). Ngl1 kuulub ExoIII/HAP1 (APE1) nukleaaaside perekonda, mille karakterseks tunnuseks on sõltuvus Mg^{2+} -st. Tegemist on 3'→5' eksonukleaaasiga, mis kasutab substraadina ssDNA-d, kuid eelistatult lagundab RNA-d ja polüadenülatsooniga (polü-A) substraate (Chen jt., 2002). Ngl1 kuulub CRR4-NOT kompleksi koosseisu ning osaleb mRNA metabolismis (Bai jt., 1999). Eelpool mainitud LRR-id on olulised Ngl1 seondumiseks ADH2 ja teiste geenide promootorile,

mis initsieerib nende transkriptsiooni (Draper jt., 1994). Samuti osaleb Ngl1 transkriptsiooni elongatsioonis ja mRNA deadenüleerimises (Denis jt., 2001; Tucker jt., 2001).

Rad27 on dsDNA spetsiifiline nukleaaas, mis lisaks 5'→3' eksonukleassele aktiivsusele omab 5' väljaulatuva otsa (*flap*) endonukleasset aktiivsust. Tema ensümaatilise aktiivsuse tulemusena tekivad nii mono- kui dinukleotiidid (Harrington ja Lieber, 1994). Rad27 lokaliseerumist mitokondrissse näidati aastaid hiljem pärast selle valgu avastamist ja tema mitokondriaalse lokaliseerumise signaali pole leitud. On välja pakutud, et see võiks asuda polüpeptiidi sees, mitte otsas (Kalifa jt., 2009; Nagarajan jt., 2017).

Rad27 kanti *rad* (*radiation sensitive*) valkude rühma, kuna *rad27Δ* haploidsed rakud on tundlikud MMS-ile (metüülmetaasulfonaat) ja UV-kiirgusele. Ioniseeriv kiirgus ei avalda märkimisväärset negatiivset mõju *rad27Δ* mutantidele. Epistaasi analüüsi järgi otsustati, et Rad27 kuulub *rad6* geenide rühma, mis osalevad DNA parandamise mehhanismides. Lisaks on põhjust arvata, et Rad27 osaleb DNA replikatsioonis, kuna *rad27Δ* mutantides toimub rakutsükli peatumine hilises S või G₂ faasis. Mutandid on temperatuuritundlikud ja 37°C on nende jaoks letaalne (Reagan jt., 1995). Rad27 deletsioon põhjustab kõrgeenenud punktmutatsioonide tekkesagedust mtDNA-s ja on tõestatud Rad27 osalus mtDNA DSB (kaksikahelalised katked) parandamises (Kalifa jt., 2009; Nagarajan jt., 2017).

Rad27 homoloog on inimese Fen1 nukleaaas, millega tema aminohappeline järjestus on peaaegu 60% ulatuses identne (Gary jt., 1999). Järgnevas peatükis on vaatluse alla võetud antud töös uuritav pärmi mitokondriaalne eksonukleaaas Din7, mis on samuti Rad27 lähedane homoloog (Mieczkowski jt., 1997).

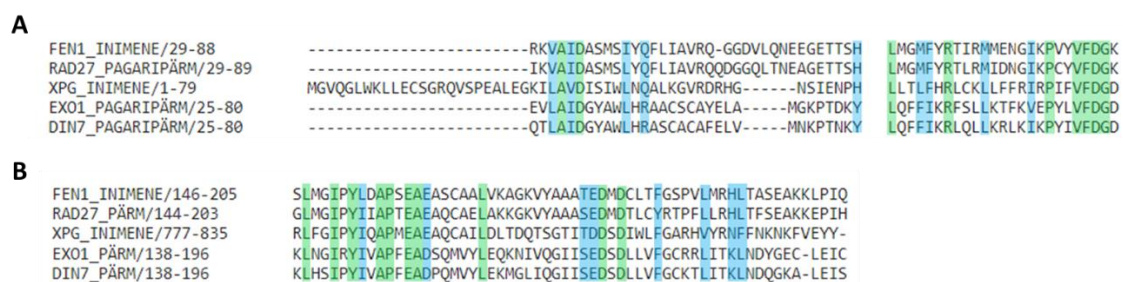
1.6. Din7 üldiseloostus

Din7 on tuuma genoomi poolt kodeeritud 49 kDa (430 aminohappe) suurune valk, mis lokaliseerub mitokondrissse (Koprowski jt., 2000; Mieczkowski jt., 1997). Din7 valku kodeeritakse DIN (*damage inducible*) geenide hulka kuuluva DIN7 geeni poolt. DIN geenid näitasid laialdases katses mõju, kui *S. cerevisiae* rakke töödeldi DNA kahjustusi tekitavate ühenditega (Ruby jt., 1985). Tegemist on dsDNA spetsiifilise 5'→3' eksonukleaaasiga. On teada, et Din7 lähedane struktuurne homoloog Rad27 omab 5' väljaulatuva otsa endonukleasset aktiivsust, kuid andmed selle aktiivsuse esinemise kohta Din7 valgul on vastuolulised (Koprowski jt., 2003; Ling jt., 2013). Din7 kuulub XPG nukleaaaside perekonna alla, kuid ta on ainuke XPG perekonna esindaja, mis lokaliseerub mitokondrissse (Koprowski jt., 2003; Mieczkowski jt., 1997). Siiani Din7 ensümaatilise aktiivsuse uurimise eesmärgil

läbiviidud katsetes kasutati mitokondriaalset ekstrakti Din7-t üleekspresserinud rakkudest ning Din7 valk on tänaseks päevaks ainult osaliselt puhastatud.

Din7 ekspressioon on indutseeritud DNA kahjustuste poolt, mida kutsuvad esile MMS, HU (hüdrosüüurea) ja UV-kiirgus, kuid mitte H₂O₂ (vesinikperoksiid) (Ling jt., 2013; Mieczkowski jt., 1997). Lisaks tõuseb Din7 ekspressioonitase meioosi ajal, viidates valgu osalusele rekombinatsiooniga seotud protsessides (Mieczkowski jt., 1997). Suurenenud *petite* mutantide ja punktmutatsioonide tekkesagedus ning mtDNA mikrosatelliitide destabiliseerimine Din7 üleekspressiooni korral samuti toetab teooriat, et Din7 osaleb mtDNA rekombinatsioonis (Koprowski jt., 2003). Epistaasikatse metsiktüüpi HS *rho*⁻ rakkudes näitas, et Din7 ja rekombinaas Mhr1 võivad osaleda ühistes mtDNA metabolismi radades, mis arvatavasti algavad endonukleaasi Ntg1 poolt tekitatud kaheaahelalistest DNA katketest *ori*-5 järjestuses. Artiklis väljapakutud teooria kohaselt määrab Din7 ja Mhr1 suhe DSB parandamise raja. Din7 üleekspressiooni korral toodetakse pikki 3' üleulatuvaid üheaahelalisi otsi, mis võivad käituda praimeritena, võimaldades mtDNA replikatsiooni. MHR1 samaaegne üleekspressioon surub maha antud nähtust ning soodustab mtDNA rekombinatsiooni (Ling jt., 2013).

Din7 aminohappelises järjestuses esinevad konserveerunud asparaadid ja glutamaadid, mis on iseloomulikud XPG perekonna nukleaaside aktiivtsentritele (vt. Joonis 3). Asparaatide asendaminealaniinidega positsioonides 78 ja 173 viib Din7 nukleaasse aktiivsuse kaoni (Koprowski jt., 2003).



Joonis 3. (A) XPG perekonda kuuluvate valkude N-terminuse regiooni joondus. **(B)** XPG perekonna kuuluvate valkude keskregiooni joondus. Joondused tehtud Koprowski jt., 2003 artikli põhjal *CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment* programmipaketi abil (01.05.2020) (Madeira jt., 2019). Valkude järjestused on võetud Uniprot andmebaasist (01.05.2020). Identsed ja sarnased piirkonnad on märgistatud vastavalt rohelse ja sinise värviga. Numbrid tähistavad aminohappelise järjestuse vahemikku.

Praeguseks on teada kaks DIN7 geeni ekspressiooni mõjutavat faktorit. Esiteks, on näidatud, et tavatingimustes reguleerib alla DIN7 geeni ekspressiooni kinaas Dun1, seondudes geeni promootorala järjestusele (nn repressiooni regioon) vahemikus -352 kuni -201 (Fikus jt., 2000; Mieczkowski jt., 1997; Yoshitani jt., 2008 a). Teiseks, paikneb DIN7 geeni

promootorpiirkonnas kõrgelt konserveerunud 19 aluspaari pikkune cis-element, millele oksüdatiivse stressi tingimustes seondub senini tundmatu positiivne regulaator ja indutseerib DIN7 ekspressiooni. Identset järjestust omab DNA kahjustuste korral ekspresseeritud geen NTG1 (Yoshitani jt., 2008 b).

Din7 paraloo on Exo1, millega Din7 aminohappeline järjestus on 56% ulatuses identne. Vaatamata valkude aminohappelise järjestuse sarnasusele on Din7 tunduvalt lühem (Mieczkowski jt., 1997). Erinevalt oma paralooigist, vastutab Exo1 tuuma DNA valepaardumisreparatsiooni (*mismatch repair*, MMR) ja mitootilise rekombinatsiooni eest (Fiorentini jt., 1997; Tishkoff jt., 1997). Din7 ei suuda komplementeerida Exo1 kuna tal puudub Msh2 valguga seondumiskompleksi (Fikus jt., 2000). EXO1 geeni üleekspressioon surub maha temperatuuritundlikkust, mis väljendub rakkude nõrgas kasvus ja selle peatumises 37°C juures, ja mutantset fenotüüpi *rad27Δ* tüvedes ning mõlema geeni samaaegne deletsioon (*exo1Δrad27Δ*) on *S. cerevisiae* jaoks letaalne. Selle põhjuseks võib olla Rad27 ja Exo1 sarnane funktsioon mõnes pärmirakkudele elutähtsas DNA metabolismirajas, mis ei ole nukleaside puhul haruldane nähtus. Samuti ei ole välistatud, et ühe valgu deletsiooni korral aktiveeritakse DNA parandamise rada, milles osaleb teine valk (Tishkoff jt., 1997).

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärkideks oli:

- 1) kontrollida DIN7 geeni deletsiooni mõju haploidsetele *S. cerevisiae* rakkudele ning uurida diploidse *S. cerevisiae* genoomi integreeritud DIN7 geeni deletsiooni mõju haploidses tüves, mis on saadud läbi meioosi ja sporulatsiooni;
- 2) analüüsida DIN7 deletsiooni mõju hingamise ja mtDNA säilimisele pidevas ja statsionaarses rakukultuuris;
- 3) konstrueerida ekspressioonivektor Din7 valgu puhastamiseks ja optimeerida ekspressiooni tingimused.

2.2. Materjalid ja metoodika

2.2.1. Tüved

Tabel 1. Töös kasutatud ja konstrueeritud tüved.

Tüvi	Kirjeldus	Päritolu
<i>S. cerevisiae</i> tüved		
W303a	<i>Mat-a ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100</i> ρ^+	Rothstein, 1989
W303 α	<i>Mat-α ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100</i> ρ^+	Rothstein, 1989
W303a/ α	<i>MAT-a/MAT-α ade2-1/ade2-1 ura3-1/ura3-1 his3-11,15/his3-11,15 trp-1/trp-1 leu2-3,112/leu2-3,112 can1-100/ can1-100</i> ρ^+	Rothstein, 1989
W303a <i>pif1::ura3-1</i>	<i>Mat-a ade2-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100; pif1::ura3-1</i> ρ^+	Valmistatud Tiina Sedmani poolt
W303 α <i>irc3::HphMX6</i>	<i>Mat-α ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100; irc3::HphMX6</i> ρ^+	Valmistatud Tiina Sedmani poolt
DC 14	<i>Mat-a his-1</i>	Labori kollektsoonist
DC 17	<i>Mat-α his-1</i>	Labori kollektsoonist
Töö käigus autori poolt konstrueeritud <i>S. cerevisiae</i> tüved		
W303a <i>din7::KanMX4</i>	<i>Mat-a ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100; din7::KanMX4</i> ρ^+	
W303 α <i>din7::KanMX4</i>	<i>Mat-α ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100; din7::KanMX4</i> ρ^+	

W303a/ α <i>din7::KanMX4</i>	<i>MAT-a/MAT-α ade2-1/ade2-1 ura3-1/ ura3-1 his3-11,15/his3-11,15 trp-1/ trp-1 leu23,112/leu2-3,112 can1-100/ can1-100;</i> <i>din7::KanMx4</i> ρ^+
W303a <i>ste5::KanMX4</i>	<i>Mat-a ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100;</i> <i>ste5::KanMx4</i> ρ^+
W303 α <i>ste5::KanMX4</i>	<i>Mat-α ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100;</i> <i>ste5::KanMx4</i> ρ^+
Plasmiidid	
pFA6a-kanMX4	Kodeerib apmitsilliini resistentsusgeeni, sisaldab G418 genetsiini resistentsust kodeerivat geenijärjestust (<i>Euroscarf</i>)
pBluescript SK(+)	Kodeerib ampitsilliini resistentsusgeeni (<i>Stratagen</i>)
pET SUMO 24	Kodeerib kanamütsiini resistentsusgeeni, 6x His Tag, T7 ja <i>lacO</i> promootor (Murina jt., 2018)
Töö käigus autori poolt konstrueeritud plasmiidid	
pBLUESCRIPT SK(+)-DIN7	pBluescript SK(+) DIN7 geeni järjestusega, geen integreeritud polülinkerisse XbaI ja SacII järjestuste vahele
pET SUMO-DIN7	pET SUMO 24 DIN7 geeni järjestusega, geen integreeritud polülinkerisse Eco31I ja SacI järjestuste vahele

2.2.2. Lahused

Tabel 2. Töös kasutatud lahused

Lahus	Koostis
T ₁₀ E _{0,1}	10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1 mM EDTA, pH 8,0
T ₁₀ E ₁	10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0
T ₁₀ E ₁ +Rnaas A	10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0; RNaas A 20 mg/ml
10x LiOAc/T ₁₀ E ₁	1M LiOAc; 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA, pH 8,0
40% PEG 1x LiOAc/T ₁₀ E ₁	50% PEG 4000; 100 mM LiOAc; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0
Sol I	50 mM glükoos; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0
Sol II	200 mM NaOH; 1% SDS

Sol III	3 M KOAc; 5 M CH ₃ COOH
S ₁₀₀ T ₁₀ E ₁	100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0
Lüüsi puhver A	50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl; 10% glütserool

2.2.3. Söötmed

Tabel 3. Töös kasutatud söötmed

Sööde	Koostis	Viide
YPD	1% pärmiekstrakt; 2% bakteopeptoon; 2% glükoos; (1,7% agar)	Sherman, 1991
YPG	1% pärmiekstrakt; 2% bakteopeptoon; 3% glütserool; (1,7% agar)	Sherman, 1991
YPDG	1% pärmiekstrakt; 2% bakteopeptoon; 0,1% glükoos; 3% glütserool; (1,7% agar)	Sherman, 1991
-AA	2% glükoos; 0,67% pärmi lämmastiku alus; (2% agar)	Sherman, 1991
Sporulatsiooni tarsöötmetassid	0,1% pärmiekstrakt; 1% KOAc; 2% agar	Sherman, 1991
M9 minimaalsööde kasaminohapetega	1,28% Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O; 0,3% KH ₂ PO ₄ ; 0,05% NaCl; 0,01% NH ₄ Cl; 0,5% kasaminohapet; 2 µM MgSO ₄ ; 0,4% glükoosi; 100 mM CaCl ₂	Sambrook ja Russel, 2001
LB	1% trüptoon; 0,5% pärmiekstrakt; 1% NaCl; (1,7% agar)	Sambrook ja Russel, 2001

Selektsiooniks kasutati antibiootikume: G418 (genetsiin) (175 µg/ml), ampitsilliin (100 µg/ml), kloramfenikool (50 µg/ml), kanamütsiin (25 µg/ml) ja hügromütsiin B (300 µg/ml)

2.2.4. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Tabel 4. Töös kasutatud praimerid

Praimeri nimi	5' → 3' järjestus
Antibiootikumiresistentsuse (G418) geenikasseti valmistamine valgudeletsiooni jaoks	
Din7 S1	GAG AAA ACG ATC ATC AAA ATT AAC AAC AAG AAC ATT ATT ATT CGA TAG GAC GTA CGC TGC AGG TCG AC

Din7 S2	ACA ACT ATG AAA ATA TTA CAA CAA TAC CTT CGA ACA TAT ATA TAC ACC ACA TCG ATG AAT TCG AGC TCG
STE5 KanMx4N1	CTA AAA AAG GAA GAT ACA GGA TAC AGC GGA AAC AAC TTA TAA ATG CGT ACG CTG CAG GTC GAC
STE5 KanMx4(C-term)2	GGG ATG CTT TCT TTT TAT TAT TGC ATA AAA TTT AGT GTA TAC TCT AGA ATT CGA GCT CGT TTT CGA CAC
<i>S. cerevisiae</i> transformantide kontrollpraimerid	
Din7 up forward	GCC TCA AGC TGC AGT GCT TC
Din7 down reverse	CTT CCT CCA GAG ACG AGA AA
Ste5 prom	TAT TTC GAG TGA AGA AGA AGC GTT AAA
KanMx3	GAA TTC GAG CTC GTT TTC GAC AC
DIN7 geenivektori konstrueerimine	
Din7 Forw99158 XbaI	CGT CTA GAG CTT TGC TCA ACG GGA TAG AAG
Din7 101335 SacII rev	TAC CGC GGC TGG GTC CTT AGT TAT GTG
DIN7 ekspressioonivektori konstrueerimine	
Din7+Eco31I SUMO For	TAC GGT CTC TGG TGG GAT GGG AAT ACC TGG CTT ACT GC
Din7+SacI SUMO Rev	GCG CGA GCT CTT AGA AAA TTG ATG GTA CGG TGC C

Tabel 5. Töös kasutatud PCR-i programmid

1. DNA algne denaturatsioon	2. DNA denaturatsioon	3. Praimerite seondumine	4. DNA süntees	Tsüklite arv (2.-4.)	Eesmärk
95° C 5 min	95° C 30 sek	57° C 30 sek	72° C 2 min	30	DIN7 ja STE5 antibiootikumi-kasseti valmistamine pFA6a-kanMX4 plasmiidilt
95° C 3 min	95° C 30 sek	53° C 30 sek	72° C 2 min 40 sek	30	<i>din7Δ</i> ja <i>ste5Δ</i> transformatsiooni kontroll

95° C 3 min	95° C 30 sek	57° C 30 sek	72° C 2 min 20 sek	30	<i>din7Δ</i> transformsiooni kontroll
98° C 30 sek	98° C 10 sek	58° C 30 sek	72° C 1 min	30	DIN7 fragmendi valmistamine XbaI ja SacII restriksioonisaiti- dega DIN7 geenivektori konstrueerimiseks
98° C 30 sek	98° C 10 sek	57° C 30 sek	72° C 50 sek	30	DIN7 fragmendi valmistamine Eco31I ja SacI restriksioonisaiti- dega pBluescript SK(+)-DIN7 plasmiidilt DIN7 ekspressioonivekt ori konstrueerimiseks

Töös kasutatud PCR-i reaktsioonisegud:

1. PCR-i reaktsioonisegu antibiootikumiresistentsuse geenikasseti valmistamiseks sisaldas: 1x PCR-i puhvrit (75 mM Tris-HCl puhver, pH 8,8; 20mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20); 0,2 mM dNTP; 2,5 mM MgCl₂; umbes 40 ng pFA6a kanMX6 plasmidi (matriits); 10 pmol päri- ja 10 pmol vastassuunalisi PCR-i praimereid (vt. Tabel 4); 2 U (*Unit*, ühik) Pfu+Taq (suhe 4:1) DNA polümeraaside segu; Milli-Q (edaspidi MQ) H₂O (lõppmahuni).
Pärmi- ja bakterirakkude transformsiooni kontrollimiseks kasutati sama reaktsioonisegu järgmiste muudatustega: 1) reaktsiooniks võeti 1,5–2 U Taq DNA polümeraasi; 2) matriitsina kasutati 3 µl puhastatud pärmi DNA-d (vt. Peatükk 2.2.7) või ühte bakterikolooniat.
2. PCR-i reaktsioonisegu DIN7 geeni sisaldava geenivektori valmistamiseks sisaldas: 1x Phusion HF puhvrit (*Thermo Fisher Scientific*); 0,2 mM dNTP; umbes 50 ng W303α

tuuma DNA-d või umbes 20 ng pBluescript SK(+)-DIN7 plasmidi (matriits); 10 pmol päri- ja 10 pmol vastassuunalisi PCR-i praimereid (vt. Tabel 4); 0,6 U Phusion DNA polümeraasi (*Thermo Fischer Scientific*); MQ (lõppmahuni).

PCR reaktsioonide läbiviimiseks kasutati *Biometra T1 Thermocycler* PCR-i masinat.

Kõik PCR produktid kontrolliti 0,8%-lise agarosgeeli (0,8% agaros, 1xTAE puhvis (40 mM Tris, 20 mM etaanhape, 1 mM EDTA), etiidiumbromiid (0,5 µg/ml)) elektroforeesiga.

2.2.5. DNA puhastamine fenool-kloroform töötlusega

PCR reaktsioonis saadud DNA puhastamiseks kasutati optimeeritud fenool-kloroformi töötluse protokoll (Sambrook ja Russel, 2001). DNA-d sisaldava lahuse maht viidi $T_{10}E_{0,1}$ puhvriga 100 µl-ni ning lisati 20 µg dekstraani, NaCl lõppkontsentratsiooniga 100 mM ja ½ mahtu fenool/kloroformi lahust (pH 7,5) ning inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril, vahepeal segades. Lahus tsentrifuugiti (*Eppendorf Minispin*, rootor F-45-12-11) 1 minut 12100 g juures. Ülemine vesifaas viidi uude tuubi, lisati 1/10 mahtu 3 M NaOAc ja 2,5 mahtu 96% etanooli ning inkubeeriti 20 minutit -20°C juures. Seejärel tsentrifuugiti lahust 5 minutit 12100 g juures ning eemaldati supernatant. DNA sadet pesti 150–200 µl 70% etanooliga ja inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Tsentrifugimist korrati samadel tingimustel ja supernatant eemaldati. Saadud DNA sade lahustati seejärel sobivas mahus $T_{10}E_{0,1}$ puhvis ning säilitati -20°C juures.

2.2.6. Pagaripärmi LiOAc transformatsioon

Pagaripärmi deletsioonitüvede valmistamiseks kasutati modifitseeritud LiOAc transformatsiooni meetodit (Rose jt., 1990). Antibiootikumi resistentsusgeeni, mille otstes oli homoloogiline DIN7 või STE5 geeni regiooni järjestus, transformeeriti W303a, W303α ja W303a/α tüvedesse, et saada deletsioonitüved.

Pärmi säilituskultuurist üles võetud rakke kasvatati YPD tardsöötmele 2–3 päeva 30°C juures. 1–3 kolooniat inokuleeriti 20 ml YPD vedelsöötmesse ja kasvatati loksutis üleöö 30°C juures 180 pööret/minutis. Hommikul mõõdeti rakukultuuri optilist tihedust (OD_{600}) (siin ja edaspidi kasutati *Ultraspec 2000* spektrofotomeeterit), mis ei tohtinud ületada $OD_{600}=1$, ja kultuur lahjendati $OD_{600}=0,1$ ning kasvatati samadel tingimustel veel 2 rakupoollestust. Seejärel tsentrifuugiti rakukultuuri toatemperatuuril (*Hettich Universal 320R*, rootor 1617 swing out) 3 minutit 1600 g juures ja sööde eemaldati. Rakud pesti läbi autoklaavitud MQ veega ning korrati tsentrifuugimist samadel tingimustel. Supernatant eemaldati ja rakkude sade resuspendeeriti 1 ml-s 0,1 M LiOAc $T_{10}E_1$ lahuses ning rakususpensioon viidi uude tuubi. Rakud tsentrifuugiti

(Eppendorf Minispin, rootor F-45-12-11) 1 minut 700 g juures ja supernatant eemaldati. Rakud resuspendeeriti 50 µl-s 0,1 M LiOAc T₁₀E₁ lahuses ja inkubeeriti 20 minutit 30°C juures. Seejärel lisati rakkudele 100 µg eelnevalt 5 minuti jooksul 95°C juures denatureeritud ja jääl jahutatud carrier-DNA-d ja 500–900 ng PCR-i produkti. Rakusegu segati õrnalt ja inkubeeriti 20 minutit 30°C juures 2–3 korda õrnalt segades. Seejärel lisati 300 µl 40% PEG 1x LiOAc/T₁₀E₁ lahust ning segati vortexiga (siin ja edaspidi kasutati *Scientific Industries Vortex-Genie 2 Mixer* vortexit). Segu inkubeeriti 45–60 minutit 30°C juures. Seejärel lisati 35 µl DMSO-t ning segati vortexiga. Rakkudele tehti kuumašokk 10 minuti jooksul 42°C juures. Rakud tsentrifuugiti 1 minut 700 g juures ja supernatant eemaldati. Seejärel resuspendeeriti rakud 2,5 ml-s YPD vedelsöötmes. Rakukultuuri kasvatati loksutis üleöö (8–10 tundi) 30°C juures 180 pööret/minutis. Rakud tsentrifuugiti kokku 1 minut 700 g juures ning sööde eemaldati. Rakud resuspendeeriti 200 µl-s autoklaavitud MQ vees ning külvati välja 100 µl G418 sisaldavatele YPD ja YPG tardsöötmetele. Transformatsioonitasse inkubeeriti 30°C juures 3–5 päeva.

Transformatsioonitassid tembeldati eraldi kolooniate saamiseks genetsiini sisaldavatele YPD ja YPG tardsöötmetele. Antibiootikumiresistentsuse geenikasseti õiget integratsiooni kontrolliti PCR meetodiga (vt. Peatükk 2.2.4).

2.2.7. Pärm DNA eraldamine (LiOAc puhastus)

Pärmi DNA-d eraldati Lööke jt., 2011 protokoll järgi. Pärmirakke kasvatati YPD tardsöötmele 2–3 päeva 30°C juures. Kaheksa keskmise suurusega pärmikolooniat suspendeeriti 100 µl-s 200 mM LiOAc 1% SDS lahuses. Seejärel inkubeeriti rakususpensioon 15 minutit 70°C juures. Segu jahutati ja DNA sadestati lisades 3 mahtu 96% etanooli. Segu tsentrifuugiti (*Eppendorf Minispin*, rootor F-45-12-11) 3 minutit 12100 g juures ning etanool eemaldati. Sadet pesti 500 µl 70% etanooliga, tsentrifuugiti 2 minutit 12100 g juures, etanool eemaldati ja sade lahustati 100 µl T₁₀E_{0,1} puhvris. PCR-i analüüside läbiviimiseks tsentrifuugiti DNA lahust 1 minut 1200 g ning PCR-i segusse (vt. Peatükk 2.2.4) lisati 3 µl produkti.

2.2.8. Sporulatsioon ja tetraadide analüüs

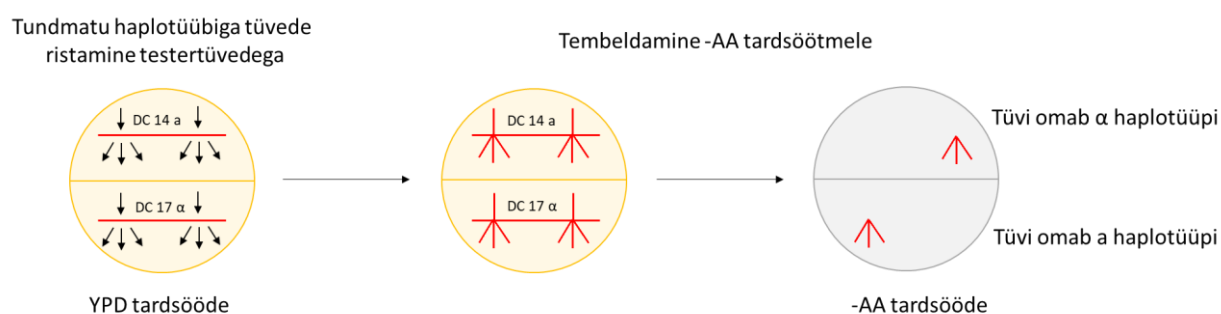
Kaks erinevast *S. cerevisiae* *din7Δ a/a* tüvest pärit kolooniat inokuleeriti sporulatsiooni tardsöötmele ja inkubeeriti 2–3 päeva 30°C juures. Sporuleeruvad rakud suspendeeriti 30 µl-s autoklaavitud MQ vees, millele lisati 20 µl-i *zymolase*´i lahust (0,5 mg/ml) ning inkubeeriti 3 minutit toatemperatuuril. Seejärel kanti 10 µl rakususpensiooni YPD või YPG tardsöötmele. Spoorid eraldati mikromanipulaatoriga (*Singer Instruments MSM Tetrad Dissection Microscope*) ning kasvatati 3–5 päeva 30°C juures.

Üleskasvanud tetraadid tembeldati edasi YPD, YPG, YPD+G418 ja YPG+G418 tardsöötmetele edasiseks analüüsiks. Mõlemast tüvest valiti 2 YPD ja 2 YPG tardsöötmetel üles kasvanud tetraadi, DNA puhastati (vt. Peatükk 2.2.7), teostati PCRi kontroll (vt. Peatükk 2.2.4) ning määrati haplotüüp (vt. Peatükk 2.2.9). Tetraadide mtDNA stabiilsuse säilitamist jälgiti viie nädala jooksul.

2.2.9. Haplotüüpide määramine

Tundmatu haplotüübiga tüved ristati DC 14 ja DC 17 testertüvedega nagu on kujutatud ristamisskeemil (vt. Joonis 4). Rakke inkubeeriti üks päev 30°C juures, tembeldati -AA tardsöötmele ja kasvatati veel 2–3 päeva 30°C juures.

W303 ja testertüvedesse on vastavalt sisse viidud *his3-11* ja *his1* mutatsioonid, mis ei võimalda antud tüvedel kasvada -AA tardsöötmetel. Kahe tüve ristamisel saadud diploid omab mõlemat funktsionaalset geeni ühes koopias ja saab kasvada -AA tardsöötmetel.



Joonis 4. *S. cerevisiae* tüvede ristamise ja haplotüüpide määramise illustratiivne skeem.

2.2.10. Pärmirakkude elumuse mõõtmine madala glükoosisisaldusega tardsöötme tassil

Säilituskultuurist pärit W303α, W303α *din7Δ* ja W303a *pif1Δ* tüvesid kasvatati 4 päeva ning W303α *irc3Δ* tüve 6 päeva 30°C juures YPG tardsöötmetel.

Umbes 45 tundi enne katse algust pandi W303α *irc3Δ* rakumass 20 ml hügromütsiin B (300 µg/ml) sisaldavasse YPG vedelsöötmesse kasvama kolmes korduses. W303α, W303α *din7Δ* ja W303a *pif1Δ* kolooniad inokuleeriti kolmes korduses YPG vedelsöötmesse (10 ml) umbes 18 tundi enne katse algust. W303 α *din7Δ* YPG söötmesse lisati G418 (175 µg/ml) antibiootikumi. Kõik kultuurid kasvasid katse jooksul loksutis 30°C juures 180 pööret/minutis.

Katse alguspunktis (t=0) rakukultuuride OD₆₀₀ mõõdeti ning lahjendati 40 ml-sse YPD vedelsöötmesse OD₆₀₀=0,05-ni. 6 tunni möödudes korrati mõõtmist ja lahjendati W303α ja W303α *din7Δ* kultuurid OD₆₀₀=0,1-ni. 10 tunni ajapunktis mõõdeti kultuuride tihedust, lahjendati W303α ja W303α *din7Δ* kultuurid OD₆₀₀=0,05-ni ning W303a *pif1Δ* ja W303α *irc3Δ*

kultuurid $OD_{600}=0,1$ -ni. 15 tunni ajapunktis korraldati mõõtmist ning lahjendati kõik kultuurid $OD_{600}=0,1$ -ni.

Ajapunktides 0, 10 ja 20 tundi tehti väljakülvid YPDG tardsöötmel, arvestades rakukultuuride optilist tihedust. Igast kultuurist tehti kaks järjestikust lahjendust autoklaavitud MQ vette (100- ja 50-kordne), mis lõpptulemusena andis umbes 130 rakku väljakülvi kohta.

Ajapunktis 0 tehtud lahjendusest eraldati osa söödet ning jäeti lahjendusi tegemata kasvama (statsionaarne kultuur). Tunnil 120 tehti neist väljakülvi, kontrollimaks rakkude elumust statsionaarses faasis. $OD_{600}>1$ juures on keeruline elusate rakkude osakaalu arvutada, mistõttu kultuuride optilist tihedust enam arvesse ei võetud. Lahjenduste tegemiseks võeti 4 μ l-i igast rakukultuurist, mis andis umbes 200 pärmikolooniat väljakülvi kohta.

Kõik väljakülvidega tassid kasvasid 3 päeva 30°C juures ning seejärel 3 päeva toatemperatuuril. Kuue päeva möödudes oli võimalik eristada suuri ja väikseid kolooniaid.

2.2.11. DNA restriksioon ja ligeerimine

Restriksioon ja ligeerimine viidi läbi vastavalt restriksioonil ja ligeerimisel kasutatud ensüümide ja puhvrite tootja soovitudele (*Thermo Fisher Scientific*).

Vektorite konstrueerimiseks viidi läbi PCR produktide (fenool-kloroform töötlusel) (vt. Peatükk 2.2.5) puhastatud DIN7XbaISacII või DIN7Eco31ISacI produktid; PCR reaktsioonisegud ja programmid toodud välja peatükis 2.2.4) ja plasmiidide (pBluescript SK(+)) või pET SUMO 24) restriksiooni.

Restriksioonisegu maht oli 25 μ l ja restriksioonireaktsiooniks kasutati 8–9 U restriksiooniensüüme. Tuubi võeti 1 μ g amplifitseeritud või plasmiidset DNA-d ning selle maht viidi $T_{10}E_{0,1}$ lahusega 20 μ l-ni, seejärel lisati Tango puhvrit lõppkontsentratsiooniga 1x, XbaI ja SacII ensüüme geenivektori tegemiseks või Eco31I ja SacI ensüüme ekspressioonivektori tegemiseks. Restriksioon viidi läbi 1–1,5 tundi 37°C juures.

Restriksiooni produktid lahutati 0,8% agarosgeelil, lõigati geelist välja UV-lambi all ning puhastati *Favorgen Gel/PCR Purification & Clean-up Kit* ga, tootja protokoll järgi.

Ligeerimiseks segati kokku 30 ng puhastatud ja restrikteeritud DNA fragmenti ning 10 ng sellele vastavat puhastatud ja restrikteeritud plasmidi, 1,5 U T4 DNA ligaasi, T4 DNA ligaasi puhvrit lõppkontsentratsiooniga 1x ning viidi maht MQ veega 10 μ l-ni. Ligeerimisreaktsioon viidi läbi toatemperatuuril 1 tunni jooksul.

2.2.12. Bakterirakkude transformatsioon

Bakterirakkude transformatsiooni viidi läbi kahel eesmärgil:

- 1) DIN7 geeni- ja ekspressioonivektorit saamiseks kompetentsetest DH5 α rakkudes (*E. coli* F⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA -argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1),
- 2) ekspresseerida pET SUMO-DIN7 plasmiidilt Din7 valku kompetentsetest BL21 DE3 RIL rakkudes (*E. coli* B F⁻ ompT hsdS (rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tet^r gal endA Hte (argU ileY leuW Cam^r)).

1 μ l ligeerimisprodukti (geenivektori paljundamine) või 0,3 μ l-i puhastatud pET SUMO-DIN7 plasmidi (ekspressiooni katse) lisati 25 μ l-e rakkudele, segati vortexiga ja inkubeeriti 20 minutit jääl. Seejärel tehti rakkudele kuumašokk 37°C juures 2 minutit. Peale kuumašokki lisati rakkudele 300 μ l LB söödet, mis sisaldas MgSO₄ lõppkontsentratsiooniga 20 mM. Lahus segati vortexiga ja inkubeeriti 45–60 minutit 37°C juures. Ampitsilliini (100 μ g/ml; geenivektori paljundamine) või kanamütsiini (25 μ g/ml; ekspressiooni katse) ja kloramfenikooli (50 μ g/ml; ekspressiooni katse) sisaldavale LB tardsöötmale külvati 100 μ l rakkude suspensiooni ning kasvatati 37°C juures üleöö.

2.2.13. Plasmiidse DNA eraldamine väikesest mahust

Plasmiidse DNA eraldamiseks väiksest mahust (Sambrook ja Russell, 2001) inokuleeriti üksikkoloonia 2,5 ml LB vedelsöötmesse, mis sisaldas 100 μ g/ml ampitsilliini. Rakke kasvatati 37°C juures üleöö. Rakud tsentrifuugiti (*Eppendorf Minispin*, rootor F-45-12-11) 1 minut 4300 g juures ning supernatant eemaldati. Rakumass lahustati 100 μ l-s Sol I lahuses segati vortexiga ning tõsteti jääle. Rakkudele lisati 200 μ l-i Sol II lahust, segati õrnalt ja inkubeeriti 10 minutit jääl. Lisati 150 μ l-it Sol III lahust ja segati õrnalt, kuni tekkis sade. Rakke tsentrifuugiti 5 minutit 12100 g juures. Supernatant viidi üle uude tuubi, lisati 0,7 mahtu isopropanooli ning segati õrnalt vortexil. Segu inkubeeriti toatemperatuuril 10 minutit, tsentrifuugiti samadel tingimustel ning supernatant eemaldati. Sademele lisati 200 μ l-it 70% etanooli, segati õrnalt ja inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Segu tsentrifuugiti samadel tingimustel ning seejärel eemaldati supernatant. Sade lahustati 100 μ l-s T₁₀E₁ + RnaasA (20 mg/ml) lahuses ja inkubeeriti 30 minutit 65°C juures.

Lahusele tehti fenool-kloroformi töötlus (vt. Peatükk 2.2.5) ning DNA-d säilitati -20°C juures.

2.2.14. Din7 valgu ekspressioon *E. coli* rakkudes

Din7 valgu ekspressiooniks *E. coli* BL21 DE3 RIL rakkudes pET SUMO-DIN7 sisaldava plasmidi üksikkolooniad inokuleeriti 20 ml LB või M9 vedelsöötmetesse, mis sisaldasid kloramfenikooli (50 µg/ml) ja kanamütsiini (25 µg/ml). Rakukultuurid kasvasid loksutis 37°C juures 180 pööret/minutis.

Rakukultuuri OD₆₀₀ kontrolliti ning kultuur lahjendati 80 ml-sse värskesse LB või M9 vedelsöötmesse OD₆₀₀=0,1-ni. Rakukultuurid jagati neljaks ning inkubeeriti 18°C, 25°C, 30°C ja 37°C juures OD₆₀₀=0,4-ni ja indutseeriti valgu ekspressioon.

4 tundi pärast IPTG lõppkontsentratsiooniga 0,5 mM indutseerimist tsentrifuugiti (*Hettich Universal 320R*, rootor 1617 swing out) 10 ml rakukultuuri kokku 10 minutit 4°C juures 3130 g-ga. Sööde eemaldati ja rakud resuspendeeriti 1 ml-s S₁₀₀T₁₀E₁ lahuses. Tsentrifuugimist korrati samadel tingimustel ja supernatant eemaldati, rakkude sade külmutati vedelas lämmastikus ning hoiustati -80°C juures. Enne külmutamist kaaluti rakkude massi.

Enne ja pärast 0,5 mM IPTG-ga indutseerimist võeti rakukultuurist välja proov, mis standardiseeriti optilise tiheduse järgi, et igas proovis oleks sama arv rakke. Kultuur tsentrifuugiti (*Eppendorf Minispin*, rootor F-45-12-11) 1 minut 12100 g juures, supernatant eemaldati ja sade resuspendeeriti 8 µl-s MQ vees ning lisati ½ mahtu 5x SDS-i. Proove keedeti 5 minutit 95°C juures. Valgu ekspressiooni kontrolliti 10% AA-SDS geelil.

2.2.15. Din7 valgu puhastamine *E. coli* rakkudest aafiinsuskromatograafia meetodil

Valgu puhastamisel läheneti aafiinsuskromatograafi Ni maatriksi tootja soovitustest (*GE Healthcare*, juhend 11-0012-38 AD).

Eelmises etapis külmutatud rakud, mis kasvasid M9 minimaalsöötmes 18°C, 25°C ja 30°C juures ning LB söötmes 25°C juures (vt. Peatükk 2.2.14) sulatati jääl, lisati 1 ml lüüsipuhvrit A (valmistatud juhendi järgi 10%-lise glütserooli lisamisega) beeta-merkaptotetanooli lõppkontsentratsiooniga 2 mM, lüsotsüümi (*AppliChem GmbH*) lõppkontsentratsiooniga 1 mg/ml, CaCl₂ lõppkontsentratsiooniga 5 mM, MgCl₂ lõppkontsentratsiooniga 25 mM ja 1 U DNAas I ning inkubeeriti 40 minutit jääl. Rakulüsaati sonikeeriti 3x 20 sekundit 50% võimsusega. Rakke tsentrifuugiti (*Hettich Universal Micro 200R*, rootor 2424) 10 minutit 4°C juures 18700 g-ga. Supernatant viidi uude tuubi, kuhu oli lisatud 100 µl aafiinsuskromatograafia Ni maatriksit (edaspidi Ni maatriks; *GE Healthcare Ni Sepharose 6 Fast Flow*) ning segati 1 tund 4°C juures *end-over-end* loksutil.

Seejärel tsentrifuugiti segu 1 minut 4°C juures 80 g-ga ja supernatant eemaldati. Ni maatriksile lisati 5 mahut lüüsi puhvrit A, millele oli lisatud imidasool lõppkontsentratsioonis 15 mM ja segati 1 minut 4°C juures *end-over-end* segajaga ja tsentrifuugiti samadel tingimustel ja sama protsessi korrati veel 2 korda. Samadel tingimustel korrati pesu 3 korda 2 mahu lüüsi puhvriga A (50 mM imidasool) ja elueeriti 3 korda 1 mahu lüüsi puhvriga A (500 mM imidasool; edaspidi elueerimispuhver).

Peale igat tsentrifuugimist korjati saadud fraktsioone. Paralleelselt igas etapis võeti välja 20 µl proovi, millele lisati 5 µl 5x SDS-i ning keedeti 5 minutit 95°C juures. Tiiterplaadile kanti 50 µl kommertsiaalselt Bradfordin reaktiivi (*Thermo Fisher Scientific*) ja 5 µl kogutud fraktsioonist, tänu millele otsistati millistest fraktsioonidest pärit valmistatud proovid analüüsida 10% AA-SDS geelil.

Lisaks määrati iga puhastuse parimal 500 mM imidasooli puhvriga elueerimisel korjatud fraktsioonist totaalne valgukontsentratsioon. Tiiterplaadile kanti 100 µl Bradfordin reaktiivi iga reaktsiooni kohta ja valmistati võrdluseks BSA valgu kontsentratsioonirida (1–5 mg/ml). Lõpuks kanti tiiterplaadile 10 µl igast korjatud fraktsioonist ning Bradford-fraktsioon lahuse värvi muutuse järgi hinnati ligikaudset totaalset valgukontsentratsiooni.

3. Tulemused ja arutelu

Käesoleva töö eesmärk oli kontrollida ja analüüsida DIN7 geeni deletsiooni mõju haploidsetele *S. cerevisiae* rakkudele. Juhul kui antud transformatsioon osutub edukaks, plaaniti uurida diploidsetes rakkudes ühe DIN7 geenikoopia deletsiooni mõju meioosile ja järglastele läbi sporulatsiooni. Lisaks taheti analüüsida *din7Δ* deletsioonitüve funktsionaalse mtDNA säilimist. Kuni praeguseni ei ole avaldatud ühtegi Din7 täieliku puhastuse protokoll. Uurimaks tulevikus valgu ensümaatilist aktiivsust võeti eesmärgiks konstrueerida ekspressioonivektor, mis võimaldaks puhastada Din7 valku.

Din7 puhul on tegemist DNA kahjustuste korral ekspresseeritud valguga, mille ekspressioonitase tavatingimustes on väga madal (Mieczkowski jt., 1997; Ruby jt., 1985). Varasemalt on näidatud, et Din7 valgu tase rakkudes on rangelt reguleeritud ning selle üleekspressioon põhjustab mtDNA stabiilsuse kadu ja selle kaudu kõrgeenenud *petite* mutantide tekkesagedust (Fikus jt., 2003; Yoshitani jt., 2008 a). 2015. aastal valminud Mari-Liisi Sülle lõputööst selgus, et Din7 valgu deletsioon põhjustab respiratoorse aktiivsuse kadu, kuna saadud *din7Δ* mutandid ei suutnud elada mittefermenteeritaval süsinikuallikal.

3.1. Din7 deletsiooni kasseti transformatsioon haploidsetesse *S. cerevisiae* rakkudesse

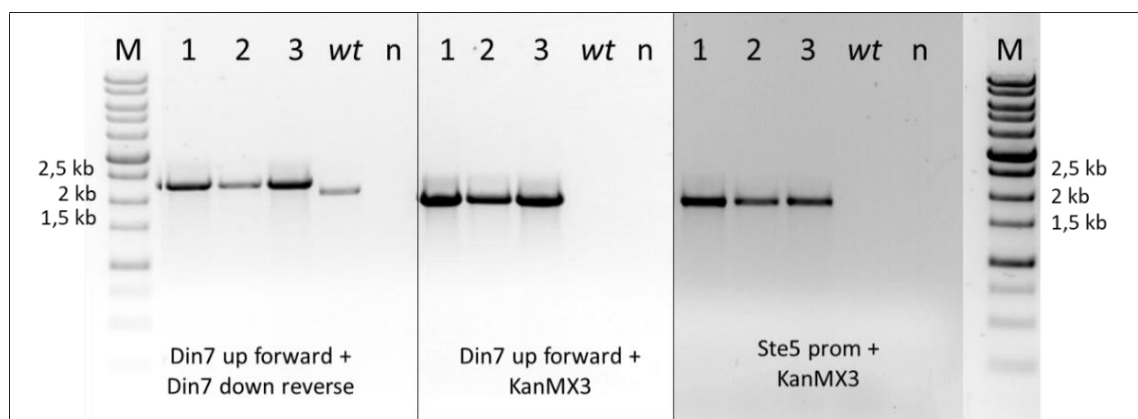
Üldise- ja mikroobibiokeemia labori tudengi Mari-Liis Sülle bakalaureusetöös on kirjeldatud tulemus, mille põhjal ei kasvanud *din7Δ* deletsioonitüved glütserooli sisaldaval tardsöötmele, viitab sellele, et Din7 valk on vajalik hingamise säilitamiseks. Kuigi Din7 hulk pagaripärmis on rangelt reguleeritud ja saadud tulemus ei ole välistatud, on see vastuolus 2000. aastal publitseeritud andmetega, mis kirjeldavad vaid kergelt kõrgeenenud *petite* mutantide tekkesagedust tavatingimustes DIN7 geeni deletsiooni korral (Fikus jt., 2000). DIN7 geeni deletsioonist põhjustatud mõjude ülekontrollimiseks konstrueeriti antud töö raames W303a ja W303a *din7Δ* deletsioonitüved kasutades G418 sulfaadi antibiootikumiresistentsust kodeerivat geeni ning võrreldi nende fenotüüpi ajas *ste5Δ* deletsioonitüvedega glükoosi sisaldaval tardsöötmele.

DIN7 geen asendati G418 sulfaadi antibiootikumiresistentsuse geenikassetiga pärmis LiOAc transformatsiooni meetodil (vt. Peatükk 2.2.6), et hinnata DIN7 geeni deletsiooni sisseviimise mõju *S. cerevisiae* W303a ja W303a rakkude hingamisele. Kontrolliks teostati identne protseduur valgu kinaasi kodeeriva STE5 geeniga, mis üldise- ja mikroobibiokeemia labori varasemate katsete põhjal ei mõjuta respiratsiooni ja mtDNA stabiilsust. Kõik transformatsioonid viidi läbi kolmes korduses ning rakud külvati välja nii glükoosi kui glütserooli sisaldavatele tardsöötmetele.

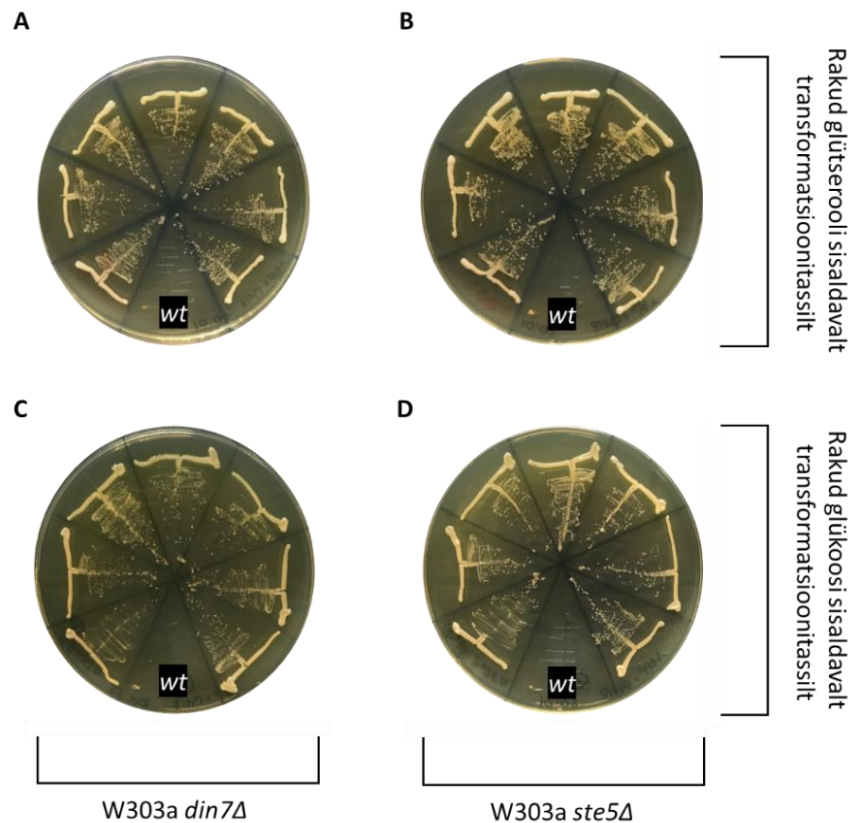
Üleskasvanud rakkudest valiti edaspidiseks uurimiseks 4–5 erineva suurusega W303a *din7Δ* ja *ste5Δ* kolooniat igalt glütserooli sisaldavalt transformatsioonitassilt ning 7 kolooniat igalt glükoosi sisaldavalt transformatsioonitassilt (kokku 68 W303a transformanti). W303a puhul kõigilt kolmelt glükoosi ja glütserooli sisaldavalt transformatsioonitassilt 7 kolooniat (kokku 84 W303a transformanti).

Transformante kontrolliti PCR-i meetodi (vt. Joonis 5) ja G418 sulfaati sisaldava selektsioonisöötme abil. Lisaks kontrolliti glükoosi sisaldaval transformatsioonitassil üleskasvanud transformantide kasvuvõimet glütseroolil, kus kõik *din7Δ* ja *ste5Δ* transformandid näitasid normaalset kasvu (vt. Joonis 6).

din7Δ transformante kontrolliti kahe PCR-ga (vt. Joonis 5), kasutades erinevaid praimerite kombinatsioone. 1) Din7 up forward ja Din7 down reverse praimerite paar, mis võib anda kahe erineva pikkusega produkti: 2096 bp pikk produkt, kui DIN7 geen on alles ja 2307 pikk produkt juhul, kui genoomi on integreerunud antibiootikumiresistentsust kodeeriv geen ja toimunud on DIN7 geeni deletsioon. 2) Din7 up forward ja KanMX3 praimerite kasutamisel tekib 1896 bp pikkune produkt ainult juhul, kui G418 sulfaadi antibiootikumiresistentsust kodeeriv geen on integreerunud genoomi ja asendanud DIN7 geeni. *ste5Δ* transformantide tuvastamiseks (vt. Joonis 5) kasutati Ste5 prom ja KanMX3 praimerite paari, mis annab 1931 bp pikkuse produkti antibiootikumiresistentsust kodeeriva geeni integreerumisel genoomi STE5 geeni lookusesse. PCR-i tulemuste põhjal olid kõik edaspidiseks uurimiseks võetud rakud transformandid.



Joonis 5. Näide transformantide PCR-i kontrollist. *wt* (*wild type*) tähistab W303a metsiktüüpi tüvest eraldatud DNA-st saadud PCR-i produkti, *n* – negatiivne kontroll (DNA puudub). *M* tähistab markerit (*Solis BioDyne 1 kb DNA ladder*). Joonisel on ära toodud ka kasutatud praimerite paarid.



Joonis 6. Näide W303a *din7Δ* ja *ste5Δ* lahjenduskülvist YPG+G418 tardsöötmele. Joonisel on näidatud paralleelsest transformatsioonist saadud W303a *din7Δ* (A – YPG transformatsioonitassilt ja C – YPD transformatsioonitassilt) ja *ste5Δ* (B – YPG transformatsioonitassilt ja D – YPD transformatsioonitassilt) transformantide kasv glütserooli ja G418 sulfaati sisaldaval tardsöötmel. wt tähistab W303a metsiktüüpi tüve rakke.

DIN7 deletsiooni pikaajalisema mõju uurimiseks pärmirakkudele otsustati jälgida viie nädala jooksul transformantide fenotüüpi YPD tardsöötmel, mis võimaldab kaudselt teha järeldusi rakkude respiratoorse aktiivsuse kohta. *ade2* geeni mutatsiooni tõttu moodustavad hingamisvõimelised *S. cerevisiae* laboritüvede rakud punaseid kolooniaid ning hingamisdefektiga rakkude kolooniad jäävad valgeteks (Kim jt., 2002). Paralleelselt jälgiti *din7Δ* ja *ste5Δ* transformante, mis olid pärit nii glükoosi kui glütserooli sisaldavalt transformatsioonitassidelt (vt. Tabel 6).

Katsest selgub, et punast pigmenti tootvate YPD ja YPG transformatsioonitassidelt pärit W303a *din7Δ* ja W303a *din7Δ* tüvede keskmine protsent viie nädala jooksul ei muutu (vt. Tabel 6). Samuti ei muutu see YPG transformatsioonitassilt võetud W303a *ste5Δ* ning YPD transformatsioonitassilt võetud W303a *ste5Δ* ja W303a *ste5Δ* tüvedel (vt. Tabel 6). Erandina langes YPG transformatsioonitassilt pärit punaseid kolooniaid moodustavate W303a *ste5Δ* tüvede protsent 100%-st 90,5%-le (2 tüve 21-st).

Tabel 6. W303a ja W303 α transformantide punase fenotüübiga tüvede protsendi muutus ajas.

	YPD transformatsioonitassilt võetud transformandid				YPG transformatsioonitassilt võetud transformandid			
	Punase fenotüübiga tüvede keskmine % 1. nädalal		Punase fenotüübiga tüvede keskmine % 5. nädalal		Punase fenotüübiga tüvede keskmine % 1. nädalal		Punase fenotüübiga tüvede keskmine % 5. nädalal	
Tüvi	<i>din7</i> Δ	<i>ste5</i> Δ	<i>din7</i> Δ	<i>ste5</i> Δ	<i>din7</i> Δ	<i>ste5</i> Δ	<i>din7</i> Δ	<i>ste5</i> Δ
W303α	90,5	95,2	90,5	95,2	100	91,7	100	91,7
W303a	100	100	100	100	95,2	100	95,2	90,5

Saadud tulemused näitavad, et DIN7 ja kontrolliks võetud STE5 geeni deletsiooni pikaajaline mõju avaldub *S. cerevisiae* tüvede fenotüübis sarnaselt. Kuna puna-valge test võimaldab tuvastada hingamisvõimelisi rakke, saab järeldada, et Din7 valgu deletsioon ei põhjusta respiratoorse aktiivsuse kadu tardsöötmel kasvades.

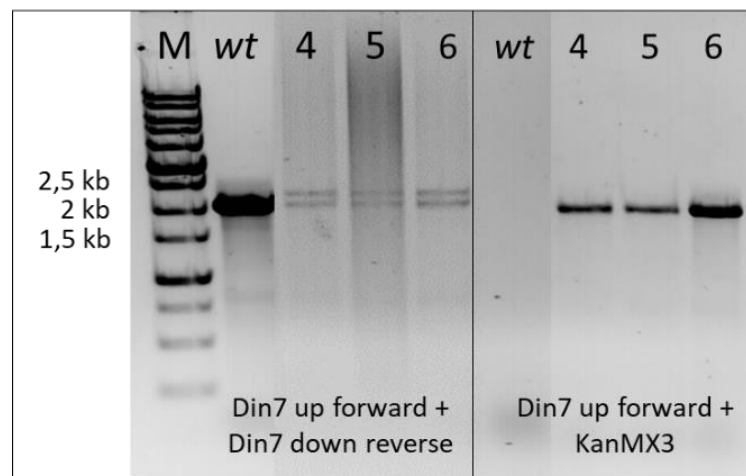
Antud katsete tulemused ei ole kooskõlas varasemalt meie uurimisgrupis läbiviidud *S. cerevisiae* rakkude transformatsioonil *din7* Δ deletsioonitüvede konstrueerimise eesmärgil saadud tulemusega, kus rakkudel puudus respiratsiooni võime. Võimalik, et tegemist oli meetoodilise veaga. Arvesse tuleb ka võtta, et varasemalt läbiviidud transformatsioonil kasutati teist (hügromütsiin B) antibiootikumiresistentsuse geenikasseti ja seega ei saa välistada ka antibiootikumi mõju transformatsioonile.

3.2. Diploidsete W303a/ α DIN7/*din7* Δ tüvede sporulatsioon ja Din7 deletsiooni mõju respiratsioonile

Din7 valgu kohta on teada, et tema ekspressioonitase tõuseb meioosi ajal üheaegselt rekombinatsiooni toimumisega (Mieczkowski jt., 1997), ent diploidsest deletsioonitüvest saadud haploidsetest *din7* Δ mutantidest pole katseid avaldatud. Uurimaks Din7 deletsiooni mõju meioosi läbinud transformantidele transformeeriti G418 sulfaadi antibiootikumiresistentsust kodeeriv geen DIN7 geeni asendamiseks diploidsetesse W303a/ α rakkudesse ning analüüsiti sporulatsiooni läbi tekkinud rakkude järglasi.

Tetraadide analüüsiks teostati W303a/ α pärmirakkude transformatsioon LiOAc meetodil (vt. Peatükk 2.2.6). 7 transformanti kontrolliti PCR-i (vt. Joonis 7) ja G418 sulfaadi sisaldava

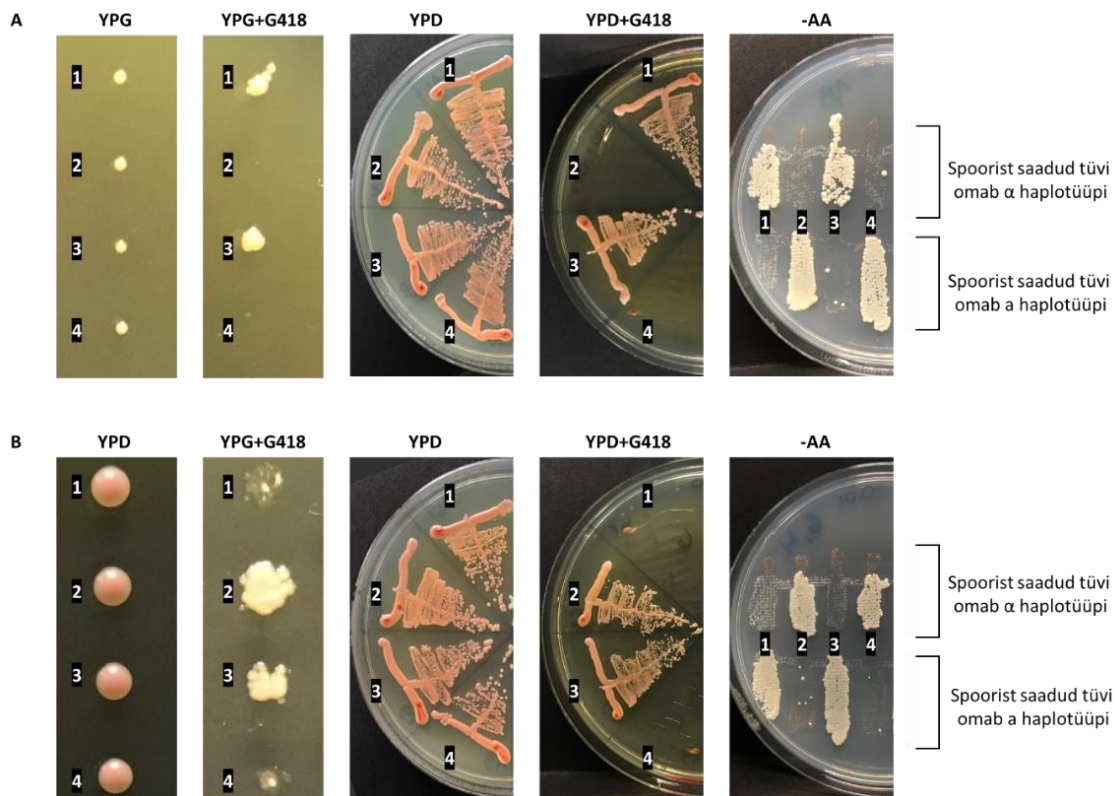
selektisioonisöötme abil. Tüved nr 4 ja 6 valiti edaspidiseks uurimiseks ja neid sporuleeriti toitainete vaesel tardsöötmel ning saadud neljased tetraadid eraldati üksteisest mikromanipulaatoriga YPD ja YPG tardsöötmetel.



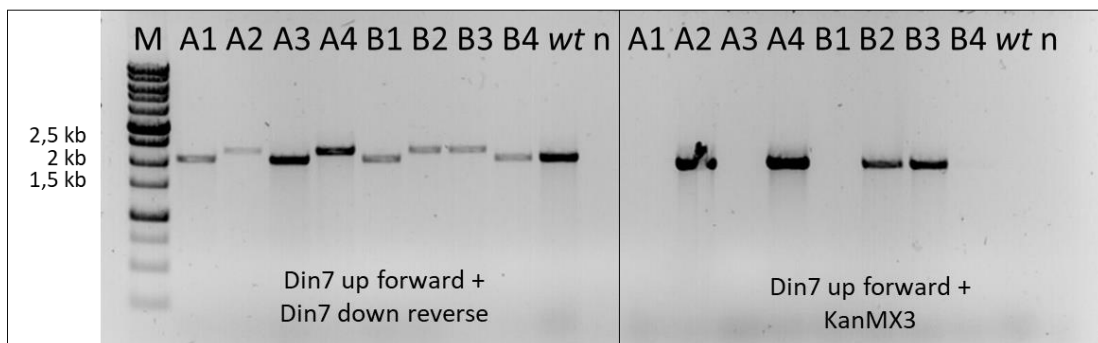
Joonis 7. Näide W303 a/a transformantide PCR-i kontrollist. M tähistab markerit (*Solis BioDyne, 1 kb DNA ladder*). Kõrvalkontrolliks võeti W303a/a tüvest eraldatud DNA (tähistatud kui wt). Joonisel on näidatud kasutatud praimerite paarid.

Edaspidiseks analüüsiks tembeldati kõik 4 eraldatud tetraadidega tassi G418 sulfaadi sisaldavatele YPD ja YPG tardsöötmetele (vt. Joonis 8). Tüvedest (W303a/a *din7Δ* nr 4 ja 6) pärit eraldatud tetraadidest valiti 2 YPD ja 2 YPG tardsöötmel kasvavat tetraadi (kokku uuriti 8 tetraadi ehk 32 spoori) analüüsiks. 32 saadud tüve kontrolliti PCR-i (vt. Joonis 9) ja G418 sulfaati sisaldava selektisioonisöötme abil (vt. Joonis 8). Lisaks sellele määrati tüvede haplotüübid ning samal ajal võimaldas see kontrollida tetraadide korrektset laiali ajamist ja tunnuste geneetilist jagunemist (vt. Joonis 8).

Viie nädala jooksul jälgiti spooridest saadud tüvede kasvu ja fenotüüpi glükoosi sisaldaval söötmel. Katses täheldati 2 (8-st) YPD ja 1 (8-st) YPG tardsöötmel eraldatud metsiktüübi spooridest saadud tüvede valgeks muutumine. Transformantsetest tüvedest muutusid 2 (8-st) YPD tardsöötmel eraldatud tüve valgeteks ning kõik YPG tardsöötmel eraldatud tetraadidest pärit tüved jäid punasteks.



Joonis 8. Paneelil on näidatud W303 a/α *din7* Δ tüve tetraadide eraldamine YPG (**A**) ja YPD (**B**) tardsöötmele, spooride tembeldamine G418 sulfaati sisaldavale YPG tardsöötmele, spooride külvamine YPD ja G418 sulfaati sisaldavale YPD tardsöötmetele ning haplotüüpide määramise tulemused -AA tardsöötmel. -AA tassil ülemisel real üleskasvanud tüved paardusid edukalt DC14 a testertüvega ja omavad α haplotüüpi ning alumisel real üleskasvanud tüved paardusid DC17 a testertüvega ja omavad a haplotüüpi.



Joonis 9. Tetraadide eraldamisel saadud tüvede PCR-i kontroll. Tähtedega on tähistatud tetraadid ja numbrita – spoorid, wt – W303 α metsiktüüp, n – negatiivne kontroll (DNA puudub). M tähistab markerit (*Solis BioDyne*, 1 kb DNA ladder).

Diploidsete *S. cerevisiae* tüvede sporulatsiooni käigus (vt. Peatükk 1.1) läbivad rakud ühe DNA replikatsiooni, millele järgneb 2 meiootilist jagunemist. Tänu sellele saadakse lähterakust 2 metsiktüüpi ja 2 mutatsiooniga spoori. Diploidsetest rakkudest saadud DNA PCR-iga näidati saadud transformantide Din7 deletsiooni heterosügootset olekut. Spooridest saadud tüvede PCR-i ja selektsioonisöötme abil ning haplotüüpide määramisega tõestati, et diploidsete

rakkude jagunemine toimus seaduspäraselt ja igast tetraadist saadi 2 metsiktüüpi ja 2 *din7Δ* tüve. Kuna puna-valge testi raames muutusid 3 metsiküüpi ja 2 deletsioonitüve valgeks, võib järeldada, et pikaajaline mõju hingamisele tardsöötmele ei ole Din7 deletsiooni korral nähtavalt avaldunud ja on võrreldav metsiktüüpi tüvega. Lisaks annab diploidide reeglitepärane sporulatsioon põhjust arvata, et ühe DIN7 geenikoopia puudumine ei avalda mõju meiosisile.

Saadud tulemuste kinnitamiseks otsustati viia läbi lisakontroll vedelas kasvusöötmes statsionaarses ja eksponentsiaalses kasvufaasis olevate rakkudega.

3.3. Pärmirakkude elumuse mõõtmine madala glükoosisisaldusega tardsöötme tassidel

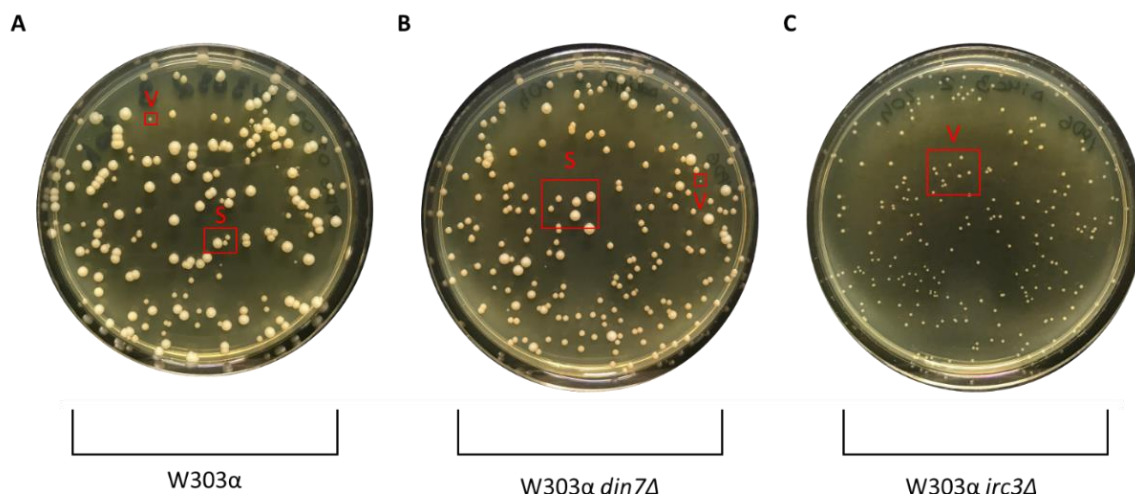
Haploidsete W303 deletsioonitüvede analüüsi tulemused ei näidanud *din7Δ* tüvedes valgu deletsioonist põhjustatud tugevat negatiivset mõju rakkude respireerimisele glükoosisaldaval tardsöötmele. Järgnevalt otsustati kontrollida, kas antud töös konstrueeritud meiosis läbinud tüvi säilitab enda respiratsiooni võime ja mtDNA stabiilsuse ka vedelsöötmes eksponentsiaalselt kasvades ja statsionaarfaasi jõudes.

Katse raames kontrolliti meiosis läbinud *din7Δ* deletsioonitüve rakkude respiratoorse aktiivsuse säilimist üleminekul mittefermenteeritavalt süsinikuallikalt fermenteeritavale süsinikuallikale. Glütseroolil kasvavad *S. cerevisiae* rakud asuvad kasvukeskkonna surve all ja peavad säilitama funktsionaalse mtDNA, et elus püsida. Üleminekul glükoosi sisaldavale söötmele muutub võimalikuks eluksvajaliku ATP süntees ka ainuüksi glükolüüsi rajas ning mtDNA säilitamine ei ole hädavajalik, mistõttu mõnel deletsioonitüvel võib kaduda respiratoorne aktiivsus.

Katses kasutati kontrolliks W303a *pif1Δ* ja W303a *irc3Δ* deletsiooni tüvesid. Üldise- ja mikroobibiokeemia labori varasemate katsete põhjal, ei ole mtDNA metabolismis osalev Pif1 normaalsete kasvutingimuste korral funktsionaalse mtDNA säilimiseks hädavajalik. Seevastu mitokondriaalse helikaasi Irc3 deletsiooni korral muutub mtDNA glükoosi sisaldaval söötmele ebastabiilseks ja üleminekul mittefermenteeritavale süsinikuallikale ei ole võimalised seal kasvama (Sedman jt., 2014).

Rakkude hingamise kao hindamiseks W303a, W303a *din7Δ*, W303a *pif1Δ* ja W303a *irc3Δ* pidevast rakukultuurist tehti väljakülve YPDG tardsöötmele ajapunktides 0, 10 ja 20 tundi pärast katse algust ja statsionaarsest kultuurist ajapunktis 120 tundi (vt. Peatükk 2.2.10). YPDG tardsöötmele, mille glükoosisisaldus on 0,1%, saab eristada suuri hingamisvõimelisi ja väikseid hingamisdefektiga kolooniaid. Rakkude elumuse mõõtmiseks jagatakse suurte kolooniate arv kõigi kolooniate arvu summaga.

Kuus päeva pärast väljakülvi tegemist YPDG tardsöötmetel sai eristada suuri ja väikseid kolooniaid (vt. Joonis 10), mis loeti kokku ning arvutati kolme korduse keskmine hingamisvõimeliste kolooniate protsent igas ajapunktis (v.a W303a *pif1*Δ ajapunktis 0 tundi, kus väljakülvi vea tõttu kasutati arvutamiseks kahte kordust) (vt. Tabel 7) ning tehti selle alusel graafik (vt. Joonis 11).



Joonis 10. Näide rakkude elumusest madala glükoosisisaldusega tardsöötmetel. Joonisel näidatud W303α (A), W303α *din7*Δ (B) ja W303α *irc3*Δ (C) pidevast rakukultuurist tehtud väljakülvid ajapunktis 20 tundi pärast katse algust YPDG tardsöötmele. S tähistab suuri kolooniaid ja V tähistab väikeseid kolooniaid.

Tabel 7. Hingamisvõime muutus ajas pidevas ja statsionaarses kultuuris.

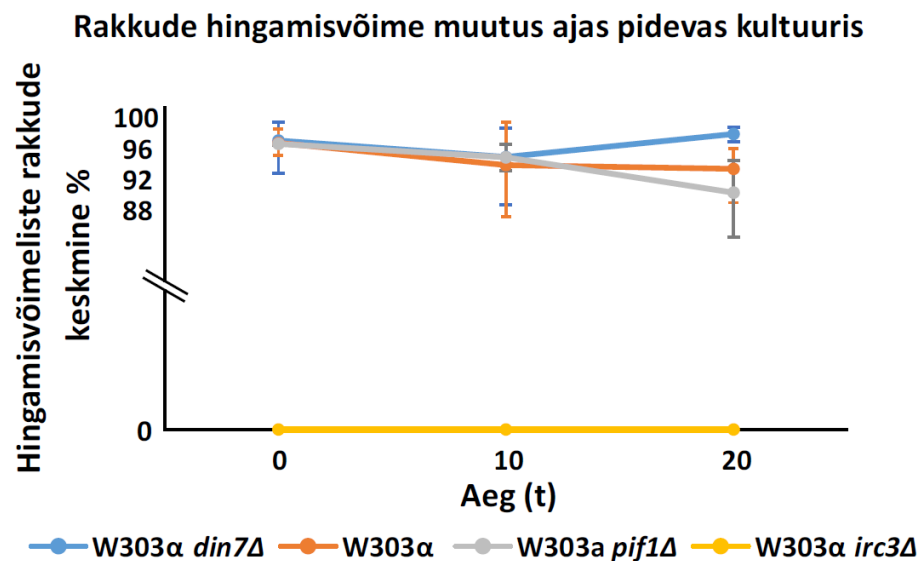
Kultuur	Aeg (tundides)	Hingamisvõimeliste rakkude keskmine %			
		W303α <i>din7</i> Δ	W303α	W303α <i>pif1</i> Δ	W303α <i>irc3</i> Δ
Algkultuur	0	97,6	97,3	97,2	0
Pidev kultuur	10	95,5	94,4	95,5	0
	20	98,5	93,9	90,8	0
Statsionaarne kultuur	120	97	96	95,1	0

Metsiktüüpi W303α tüve rakkude elumus langes 97,3%-st 93,9%-ni pidevas ja 96%-ni statsionaarses kultuuris, kusjuures pidevas kultuuris olevate rakkude respiratoorse aktiivsuse kadu aeglustus pärast 10 tundi. W303α *pif1*Δ deletsioonitüve respereerivate rakkude protsent (97,2%) langes pidevas kultuuris (90,8%-ni) samamoodi rohkem, kui statsionaarses kultuuris (96%-ni). W303α *din7*Δ tüve suurte kolooniate keskmine protsent YPDG tardsöötmetel oli ajapunktis 0 tundi 97,6%. Statsionaarses kultuuris see praktiliselt ei langenud – arvutatud rakkude elumus oli 97%. Pidevas kultuuris ajapunktide 10 ja 20 tundi vahel oli märgata tõusu

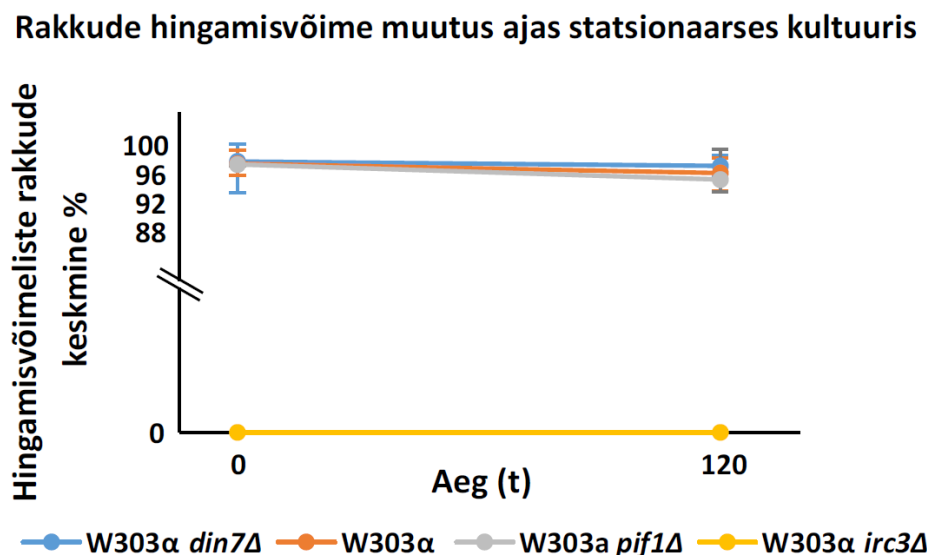
95,5%-st 98,5%-ni. W303α *irc3Δ* respireerivate rakkude keskmine protsent mõlemas kultuuris oli 0%.

Katses täheldatud *din7Δ* hingamisvõimeliste rakkude keskmise protsendi tõus 20ndaks tunniks on võrdlemisi väike ning on raske hinnata, kas tegemist on katseveaga või Din7 valgu deletsioonist põhjustatud efektiga. Tulevikus võiks korrata antud katset pikema ajaperioodi vältel.

A



B



Joonis 11. Hingamisvõime muutus ajas pidevas (A) ja statsionaarses (B) kultuuris. Joonisel on toodud YPDG tardsöötmel üleskasvanud hingamisvõimeliste kolooniate keskmise protsendi muutus ajas W303α *din7Δ*, W303α, W303α *pif1Δ* ja W303α *irc3Δ* tüvedele. Veapiiridena on näidatud katses saadud maksimaalsed ja minimaalsed väärtused.

Katse tulemused peegeldavad eeldatud rakkude elumust YPDG tardsöötmel Pif1 ja Irc3 valkude deletsiooni korral. Kuigi pidevas kultuuris ajapunktis 20 tundi on näha kerget tõusu *din7Δ* deletsioonitüve elumuses, võib saadud tulemuste põhjal järeldada, et Din7 valk ei ole hingamise säilimisel hädavajalik.

Kokkuvõttes läbiviidud katsed näitasid, et Din7 valgu deletsioon ei põhjusta otse haploidsetesse rakkudes deletsiooni sisseviimisel saadud tüvedes ega meioosi läbinud deletsioonitüvedes respiratoorse aktiivsuse kadu ei statsionaarses ega eksponentsiaalses kasvufaasis olevates rakkudes. Sellest saab omakorda järeldada, et Din7 ei oma nähtavat rolli funktsionaalse mtDNA stabiilsuse säilimisel või juhul, kui omab, on olemas teine mitokondriaalne nukleaas, mis suudab Din7 ensümaatilist aktiivsust komplementeerida. Sellise valgu väljaselgitamiseks saaks konstrueerida topeltmutante, deleteerides tuuma genoomist DIN7 ja teisi mitokondriaalseid nukleaase kodeerivaid geene kahekaupa.

Siiski on Ling'i jt. (2013) poolt näidatud, et Din7 hulk rakus mõjutab HS *rho*⁻ mutantides säilinud mtDNA stabiilsust. Nende väljapakutud teooria kohaselt osalevad Din7 ja Mhr1 ühises mtDNA parandamise rajas ning kahe valgu suhe rakus määrab mis teed pidi hakkab DNA parandamine toimuma: kas replikatsiooni või rekombinatsiooni teel. Idee, et Din7 valk võiks osaleda mtDNA replikatsiooni rajas tekitab suurt huvi ning tulevikus võiks kontrollida, kas ja mis mehhanismiga osaleb Din7 mtDNA replikatsioonis.

Mari-Liis Sülla läbiviidud katsed a11 HS *rho*⁻ mutantidega näitasid Din7 puudumisest tingitud mtDNA fragmenteerumist. Sellest tulenevalt annab Din7 valgu hulgaga manipuleerimine *rho*⁺ (näidatud käesolevas töös) ja *rho*⁻ tüvedes erinevaid efekte. Edaspidises töös võiks võtta uurimise alla N *rho*⁻ tüved, kellel erinevalt HS tüvedest puuduvad aktiivsed *ori*-järjestused ja vaadata, millist mõju nende mtDNA stabiilsuse säilimisele omab Din7.

3.4. Din7 valgu ekspressiooni tingimuste optimeerimine

Tänase päevani ei ole suudetud Din7 funktsionaalset valku täielikult puhastada ning varasemad valgu aktiivsuse uuringud põhinesid katsetel osaliselt puhastatud Din7 valguga ja rakuvaba mitokondriaalse ekstrakti kasutamisega (Fikus jt., 2000; Ling jt., 2013). Selline lähenemine takistab valgu aktiivsuse korrektset analüüsi. Võimaldamaks uurida Din7 valgu ensümaatilist aktiivsust konstrueeriti valgu ekspressioonivektor ja prooviti puhastada *E. coli* rakkudest välja liitvalku.

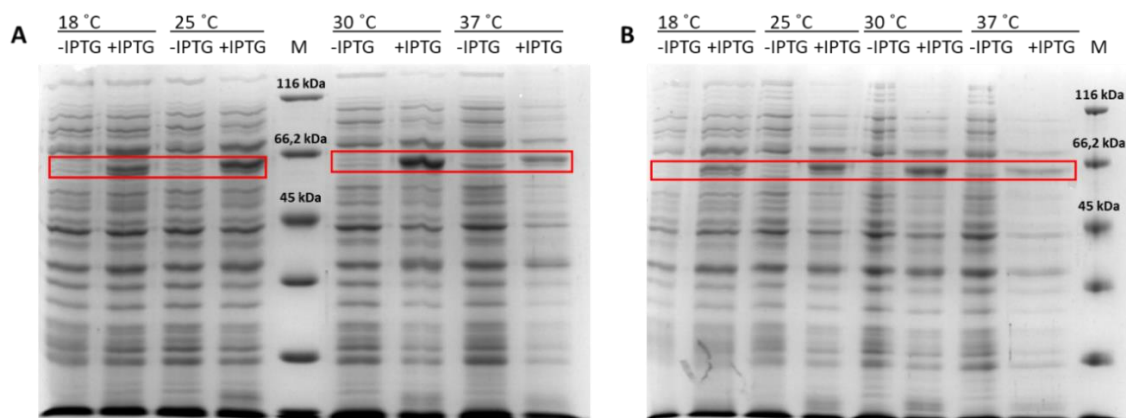
Din7 ekspressiooni optimaalsete tingimuste leidmiseks transformeeriti pET SUMO-DIN7 plasmiid *E. coli* BL21 DE3 RIL rakkudesse ning indutseeriti valguekspressiooni 0,5 mM IPTG-

ga (vt. Peatükk 2.2.14). Enne ja pärast valgu ekspressiooni indutseerimist võeti kultuuridest välja proovid ja analüüsiti neid 10% AA-SDS geelil (vt. Joonis 12).

Din7 valgu ekspressiooni optimaalsete tingimuste leidmiseks uuriti paralleelselt kahte parameetrit:

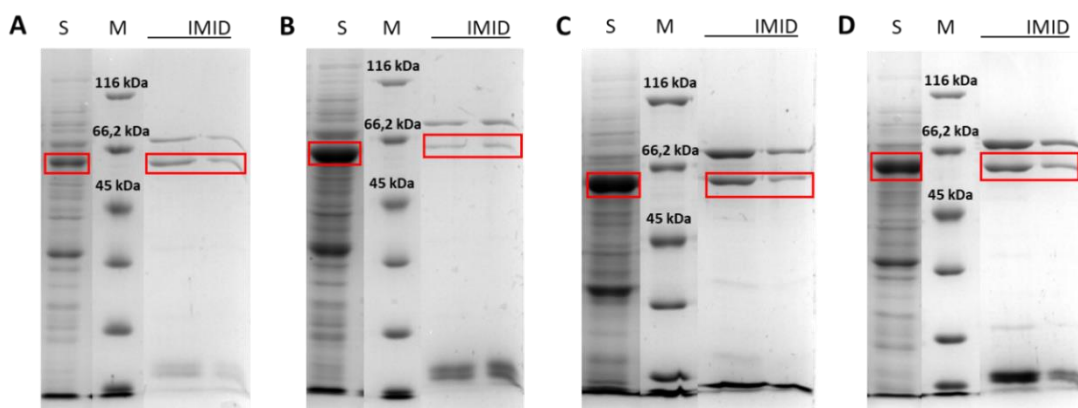
- a) kasvusööde (M9 minimaalsööde kasaminohapetega ja LB);
- b) ekspressioonitemperatuur (18°C, 25°C, 30°C ja 37°C).

Antud eksperimendi tingimustes täheldati nii M9 minimaalsöötmes kui LB-s liitvalgu (SUMO fragment – 12 kDa, Din7 valk – 49 kDa) ekspressiooni suurimat tõusu 30°C juures.



Joonis 12. Din7-SUMO liitvalgu ekspressioon erinevate kasvusöötmete ja ekspressioonitemperatuuride puhul. Geelile on kantud proovid rakudest, mis kasvasid LB (**A**) ja M9 minimaalsöötmes kasaminohapetega (**B**) 18°C, 25°C, 30°C ja 37°C juures enne ja pärast 0,5 mM IPTG-ga indutseerimist. M tähistab markerit (*Thermo Fisher Scientific, Unstained Protein MW Marker*). Punases kastis on Din7-SUMO valgu suurusele (61 kDa) vastav fragment.

LB-s 25°C juures ja M9 minimaalsöötmes 18°C, 25°C, 30°C juures kasvavatest rakkudest otsustati puhastada afiinsuskromatograafia meetodil (vt. Peatükk 2.2.15) Din7-SUMO liitvalk (vt. Joonis 13).



Joonis 13. Din7-SUMO liitvalgu puhastamine afiinsuskromatograafia meetodil. Geelile on kantud proovid rakudest, mis kasvasid M9 minimaalsöötmes 18°C (**A**), 30°C (**B**) ja 25°C (**C**) juures ning LB-s 25°C (**D**) juures. S tähistab rakulüsaadi tsentrifuugimisel saadud sadet, M – markerit (*Thermo Fisher Scientific, Unstained Protein MW Marker*) ja IMID – 500 mM imidasooli sisaldava puhvriga elueeritud fraktsioone. Punases kastis on Din7-SUMO liitvalgu suurusele (61 kDa) vastav fragment.

Jooniselt 13 on näha, et suurem osa Din7-SUMO liitvalgust jääb rakkude sademesse. Samuti on näha, et 500 mM imidasooli sisaldava elueerimispuhvri fraktsioonis leidub lisaks liitvalgule ka üle 66,2 kDa suurune tundmatu valk. Bradfordi reaktiivi ja kindla kontsentratsiooniga BSA-d kasutades määrati ligikaudne valgukontsentratsioon. 18°C ja 30°C kraadi juures M9 minimaalsöötmes kasvavatest rakkudest saadi lahus valgukontsentratsiooniga 0,1 mg/ml ning 25°C M9 minimaalsöötmes ja LB-s kasvanud rakkudest puhastatud valkudelahuse kontsentratsioon on umbes 0,2 mg/ml. Kuigi erinevatel ekspressioonitemperatuuridel saadud valkude hulk erineb kahekordselt, ei olnud korjatud rakkude massid märkimisväärselt erinevad (M9 18°C – 29,1 mg, 25°C – 31,6 mg, 30°C – 28,8 mg; LB 25°C – 36,2 mg). Saadud tulemusest selgub, et konstrueeritud ekspressioonivektorilt on võimalik ekspresseerida Din7-SUMO liitvalku ning liitvalgu ekspressiooniks optimaalseim ekspressioonitemperatuur on 25°C ja kasvusööde M9 minimaalsööde.

Siiski näitavad katse tulemused, et Din7-SUMO liitvalgu puhastamiseks on vaja töös kasutatud protokollil rohkem optimeerida, kuna suur osa liitvalgust jäi rakulüsaadi sisse. Selleks saab katsetada läbi erinevaid puhvrite pH väärtusi, soolasid ja imidasooli kontsentratsiooni ning lisada puhvrissi detergendi, nt Tween'i.

Teiselt poolt võiks täheldatud valgu sadenemine olla põhjustatud valesst valgu konformatsioonist. Sageli omavad mitokondriaalsed valgud mitokondrisse suunamise signaali, mida valgu saabumisel mitokondrisse lõigatakse ära (Vögtle jt., 2009). Antud signaal võib segada valgul õiget konformatsiooni võtta. Din7 valgul pole lokaliseerimise signaal kirjeldatud ning juhul, kui Din7 omab sellist signaali, ekspresseeritakse konstrueeritud ekspressioonivektorilt liitvalku koos suunamise signaaliga. See omakorda võib takistada

funktsionaalse valgu pakkumist. Seega oleks vaja selgeks teha kas Din7 omab ära lõigatavat lokalisatsiooni signaali ning vajadusel konstrueerida ekspressioonivektor ilma signaali järjestuseta.

On teada, et Din7 valk omab 5'→3' eksonukleaasset aktiivsust, kuid siiani pole kindlaks tehtud, kas antud valk omab 5' väljaulatuva otsa endonukleaasset aktiivsust, mis on omane tema lähedasele struktuursele homoloogile Rad27-le (Harrington ja Lieber, 1994; Koprowski jt., 2003). Kui Din7 valk saab täielikult puhastatud, tuleks endonukleaasne aktiivsus üle kontrollida. Näiteks võiks proovida töödelda 5' otstest märgistatud Y-kujulisi struktuure ning võtta välja proovid erinevates ajahetketes. Pärast lahutada saadud proovid geelil ning saadud mustri järgi hinnata valgu ensümaatilist aktiivsust. Samuti saaks uurida Din7 üldisemat substraadispetsiifikat ja nukleaasset aktiivsust.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärkideks oli uurida Din7 valgu deletsiooni mõju *S. cerevisiae* respiratoorsele aktiivsusele ning konstrueerida Din7 valgu ekspressioonivektor valgu puhastamiseks ja optimeerida selle ekspressioonitingimusi. Töö kirjanduse osas anti ülevaade mudelorganismist *S. cerevisiae*, mitokondrist ja selle genoomist ning mitokondrisse lokaliseeruvatest nukleaasidest. Põhjalikumalt kirjeldati töö uurimisobjekti – Din7 valku.

Eksperimentaalses osas võrreldi *din7Δ* ja *ste5Δ* haploidsete W303a ja W303α deletsioonitüvede fenotüübi muutust ajas ja kasvu mittefermenteeritaval süsinikuallikal. Töös kirjeldatud tulemused näitavad, et mitokondriaalne eksonukleas Din7 ei ole vajalik *S. cerevisiae* rakkude respiratoorse võime säilitamiseks.

Samuti analüüsiti meioosi läbinud W303a ja W303α *din7Δ* deletsioonitüvede fenotüübi muutust ajas ja kasvuvõimet mittefermenteeritaval süsinikuallikal ning võrreldi seda metsiktüüpi tüvedega tardsöötmele. Tulemustest ei selgunud nähtavat erinevust respiratoorses aktiivsuses deletsiooni- ja metsiktüüpi tüvede vahel. Lisakontrolliks vaadeldi eksponentsiaalses ja statsionaarses kasvufaasis kasvavate meioosi läbinud W303α *din7Δ* rakkude elumust madala glükoosisisaldusega tardsöötme tassil pärast üleminekut mittefermenteeritavalt süsinikuallikalt fermenteeritavale süsinikuallikale, mis võib põhjustada mtDNA kadu. Katsest selgub, et Din7 deletsiooni korral on pagaripärmi rakkude elumus sarnane metsiktüüpi rakkudele. Saadud tulemuste põhjal võib öelda, et Din7 valk ei osale funktsionaalse mtDNA säilitamises.

Eksperimentaalses teises pooles konstrueeriti pET SUMO-DIN7 ekspressioonivektor ning kontrolliti Din7-SUMO liitvalgu ekspressiooni erinevatel temperatuuridel ja kasvusöötmetes. Liitvalgu puhastamisel selgus, et suurem osa liitvalgust jääb rakkude lüsaati. Seega vajab Din7 valgu puhastamisprotokoll edasist optimeerimist. Siiski on tulemustest näha, et liitvalgu ekspressiooni optimaalseks rakkude kasvukeskkonnaks on M9 minimaalsööde ja ekspressioonitemperatuuriks – 25 °C.

***In vivo* analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial nuclease Din7 and expression of the recombinant protein**

Valentina Rukins

Summary

Various proteins including nucleases encoded by nuclear DNA participate in the maintenance of mitochondrial DNA integrity. It has been previously shown that the amount of mitochondrial Din7 nuclease is strictly regulated and its level in the cell affects functional mtDNA stability (Fikus et al., 2000; Ling et al., 2013; Yoshitani et al., 2008 a). The expression of the DIN7 gene is also increased during meiosis simultaneously with recombination suggesting that the protein participates in mtDNA metabolism (Mieczkowski et al., 1997).

In this work, it is demonstrated that *Saccharomyces cerevisiae* W303a and W303a *din7*Δ strains are able to grow on non-fermentable carbon sources and do not lose their respiratory activity on fermentable carbon source over time. Moreover, the difference in growth and oxygen use of wild type and *din7*Δ spores isolated from 8 tetrads formed during sporulation of W303a/α DIN7/*din7*Δ strain cells was not detected. The analysis of mtDNA loss of W303a *din7*Δ strains was performed and compared to strains with stable functional mtDNA and strains prone to mtDNA stability loss. The negative effect of Din7 deletion on cells was observed in neither exponential nor stationary growth phase. All results combined confirm that Din7 nuclease is not required for maintaining functional mtDNA. It might be that some other nucleases are capable of complementing Din7 nuclease's enzymatic activity. Even though Din7 protein does not seem to have essential functions in respiratory competent cells, Din7 has been shown to participate in mtDNA stability maintenance of HS *rho*⁻ cells (Ling et al., 2013). It would be interesting to examine in the future Din7 functions in N *rho*⁻ strains lacking active *ori* sequences.

In the second part of this study pET SUMO-DIN7 expression vector was constructed and Din7-SUMO fusion protein was partially purified from *E. coli* BL21 DE3 RIL strain cells. Further optimization of the protein purification protocol is required to prevent protein deposition. Based on the collected data it was possible to determine optimal vector expression temperature (25°C) and cell culture media (M9 minimal media with amino acids).

Tänuõnad

Soovin siiralt tänada oma juhendajaid Juhan Sedmani ja Sirelin Sillamaad, kes olid suureks abiks nii katsete läbiviimisel kui lõputöö kirjutamisel. Lisaks edastan tänuõnad doktorandile Vlad Piljukovile ja laborandile Maie Looritsale, kelle poole sai nõuannete saamiseks alati pöörduda.

Kasutatud kirjandus

Publikatsioonid

1. Bai, Y., Salvatore, C., Chiang, Y. C., Collart, M.A., Liu, H. Y. and Denis, C. L. (1999). The CCR4 and CAF1 proteins of the CCR4-NOT complex are physically and functionally separated from NOT2, NOT4, and NOT5. *Molecular and Cellular Biology* 19: 6642-6651.
2. Blanc, H. and Dujon, B. (1980). Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA responsible for suppressiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 3942-3946.
3. Bruni, F., Lightowlers, R. N. and Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2017). Human mitochondrial nucleases. *The FEBS journal* 284: 1767-1777.
4. Burgers, P. M., Bauer, G. A. and Tam, L. (1988). Exonuclease V from *Saccharomyces cerevisiae*. A 5'----3'-deoxyribonuclease that produces dinucleotides in a sequential fashion. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 8099-8105.
5. Burgers, P. M., Stith, C. M., Yoder, B. L. and Sparks, J. L. (2010). Yeast exonuclease 5 is essential for mitochondrial genome maintenance. *Molecular and Cellular Biology* 30: 1457-1466.
6. Büttner, S., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, ... Madeo, F. (2007). Endonuclease G Regulates Budding Yeast Life and Death. *Molecular Cell* 25: 233-246.
7. Chen, J., Chiang, Y.-C. and Denis, C. L. (2002). CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *The EMBO Journal* 21: 1414-1426.
8. Dake, E., Hofmann, T. J., McIntire, S., Hudson, A. and Zassenhaus, H. P. (1988). Purification and properties of the major nuclease from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 7691-7702.
9. de Deken, R. H.(1966). The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *Microbiology*, 44: 149-156.
10. Denis, C. L., Chiang, Y. C., Cui, Y. and Chen, J. (2001). Genetic evidence supports a role for the yeast CCR4-NOT complex in transcriptional elongation. *Genetics* 158: 627-634.
11. Draper, M. P., Liu, H. Y., Nelsbach, A. H., Mosley, S. P. and Denis, C. L. (1994). CCR4 is a glucose-regulated transcription factor whose leucine-rich repeat binds several proteins important for placing CCR4 in its proper promoter context. *Molecular and Cellular Biology* 14: 4522-4531.

12. Duina, A. A., Miller, M. E. and Keeney, J. B. (2014). Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the *Saccharomyces cerevisiae* Model System. *Genetics* 197: 33-48.
13. Duntze, W., MacKay, V. and Manney, T. R. (1970). *Saccharomyces cerevisiae*: a diffusible sex factor. *Science* (New York, N.Y.) 168: 1472-1473.
14. Engel, S. R., Dietrich, F. S., Fisk, D. G., ... Cherry, J. M. (2013). The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now. *Genes|Genomes|Genetics* 4: 389-398.
15. Fangman, W. L. and Dujon, B. (1984). Yeast mitochondrial genomes consisting of only A.T base pairs replicate and exhibit suppressiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 7156-7160.
16. Fikus, M. U., Mieczkowski, P. A., Koprowski, P., Rytka, J., Sledziwska-Gójska, E. and Ciésła, Z. (2000). The product of the DNA damage-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*, DIN7, specifically functions in mitochondria. *Genetics* 154: 73-81.
17. Fiorentini, P., Huang, K. N., Tishkoff, D. X., Kolodner, R. D. and Symington, L. S. (1997). Exonuclease I of *Saccharomyces cerevisiae* functions in mitotic recombination *in vivo* and *in vitro*. *Molecular and Cellular Biology* 17: 2764-2773.
18. Foury, F. (1989). Cloning and sequencing of the nuclear gene MIP1 encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 20552-20560.
19. Foury, F. and Kolodnyski, J. (1983). Pif mutation blocks recombination between mitochondrial *rho*⁺ and *rho*⁻ genomes having tandemly arrayed repeat units in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 5345-5349.
20. Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. and Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 440: 325-331.
21. Gary, R., Park, M. S., Nolan, J. P., Cornelius, ... Gordenin, D. A. (1999). A novel role in DNA metabolism for the binding of Fen1/Rad27 to PCNA and implications for genetic risk. *Molecular and Cellular Biology* 19: 5373-5382.
22. Guy, C. P., Majerník, A. I., Chong, J. P. J. and Bolt, E. L. (2004). A novel nuclease-ATPase (Nar71) from archaea is part of a proposed thermophilic DNA repair system. *Nucleic Acids Research* 32: 6176-6186.
23. Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, ... Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* (New York, N.Y.) 274: 546, 563-567.

24. Haber, J. E. (2012). Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191: 33-64.
25. Harrington, J. J. and Lieber, M. R. (1994). Functional domains within FEN-1 and RAD2 define a family of structure-specific endonucleases: implications for nucleotide excision repair. *Genes & Development* 8: 1344-1355.
26. Hickson, I. D., Robson, C. N., Atkinson, K. E., Hutton, L. and Emmerson, P. T. (1985). Reconstitution of RecBC DNase activity from purified *Escherichia coli* RecB and RecC proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 1224-1229.
27. Himeno, H., Masaki, H., Kawai, T., Ohta, T., Kumagai, I., Miura, K. and Watanabe, K. (1987). Unusual genetic codes and a novel gene structure for tRNA(AGYSer) in starfish mitochondrial DNA. *Gene* 56: 219-230.
28. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. and Charpentier, E. (2012). A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)* 337: 816-821.
29. Kalifa, L., Beutner, G., Phadnis, N., Sheu, S.-S. and Sia, E. A. (2009). Evidence for a Role of FEN1 in Maintaining Mitochondrial DNA Integrity. *DNA repair* 8: 1242-1249.
30. Kang, H. S. and McAuslan, B. R. (1972). Virus-Associated Nucleases: Location and Properties of Deoxyribonucleases and Ribonucleases in Purified Frog Virus 3. *Journal of Virology* 10: 202-210.
31. Kim, G., Sikder, H. and Singh, K. K. (2002). A colony color method identifies the vulnerability of mitochondria to oxidative damage. *Mutagenesis* 17: 375-381.
32. Kleff, S., Kemper, B. and Sternglanz, R. (1992). Identification and characterization of yeast mutants and the gene for a cruciform cutting endonuclease. *The EMBO Journal* 11: 699-704.
33. Koprowski, P., Fikus, M. U., Dzierzbicki, P., Mieczkowski, P., Lazowska, J. and Ciesla, Z. (2003). Enhanced expression of the DNA damage-inducible gene DIN7 results in increased mutagenesis of mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics* 269: 632-639.
34. Lindegren, C. C. and Lindegren, G. (1943). A New Method for Hybridizing Yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 29: 306-308.
35. Ling, F., Hori, A., Yoshitani, A., Niu, R., Yoshida, M. and 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* 41: 5799-5816.

36. Loumaye, E., Thorner, J. and Catt, K. J. (1982). Yeast mating pheromone activates mammalian gonadotrophs: evolutionary conservation of a reproductive hormone? *Science* (New York, N.Y.) 218: 1323-1325.
37. Lõoke, M., Kristjuhan, K. and Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeast for PCR-based applications. *BioTechniques* 50: 325-328.
38. Macrae, I. J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A. N., Cande, W. Z., Adams, P. D. and Doudna, J. A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* (New York, N.Y.) 311: 195-198.
39. Madeira, F., Park, Y. M., Lee, Y., ... Loper, R. 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research* 47: W636-W641.
40. Malina, C., Larsson, C. and Nielsen, J. (2018). Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology. *FEMS Yeast Research* 18(5).
41. Malvar, T., Biron, R. W., Kaback, D. B. and Denis, C. L. 1992. The Ccr4 Protein from *Saccharomyces Cerevisiae* Contains a Leucine-Rich Repeat Region Which Is Required for Its Control of Adh2 Gene Expression. *Genetics* 132: 951-962.
42. McBride, H. M., Neuspiel, M. and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology* 16: 551-560.
43. Mieczkowski, P. A., Fikus, M. U. and 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 & General Genetics* 253: 655-665.
44. Mimitou, E. P. and Symington, L. S. (2009). Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends in Biochemical Sciences* 34: 264-272.
45. Miyakawa, I., Sando, N., Kawano, S., Nakamura, S. and Kuroiwa, T. (1987). Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science* 88: 431-439.
46. Morgenstern, M., Stiller, S. B., Lübbert, P., ... Warscheid, B. (2017). Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *Cell Reports* 19: 2836-2852.
47. Murina, V., Kasari, M., Hauryliuk, V. and Atkinson, G. C. (2018). Antibiotic resistance ABCF proteins reset the peptidyl transferase centre of the ribosome to counter translational arrest. *Nucleic Acids Research* 46: 3753-3763.
48. Nagarajan, P., Prevost, C. T., Stein, A., Kasimer, R., Kalifa, L. and Sia, E. A. (2017). Roles for the Rad27 Flap Endonuclease in Mitochondrial Mutagenesis and Double-Strand Break Repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 206: 843-857.

49. Nass, M. M. and Nass, S. (1963). Intramitochondrial fibres with DNA characteristics. I. Fixation and electron straining reactions. *The Journal of Cell Biology* 19: 593-611.
50. Orłowski, J. and Bujnicki, J. M. (2008). Structural and evolutionary classification of Type II restriction enzymes based on theoretical and experimental analyses. *Nucleic Acids Research* 36: 3552-3569.
51. Palade, G. E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 1: 188-211.
52. Palermo, V., Mangiapelo, E., Piloto, C., Pieri, L., Muscolini, M., Tuosto, L. and Mazzoni, C. (2013). p53 death signal is mainly mediated by Nuc1(EndoG) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 13: 682-688.
53. Rangarajan, E. S. and Shankar, V. (2001). Sugar non-specific endonucleases. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 583-613.
54. Reagan, M. S., Pittenger, C., Siede, W. and Friedberg, E. C. (1995). Characterization of a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* with a deletion of the RAD27 gene, a structural homolog of the RAD2 nucleotide excision repair gene. *Journal of Bacteriology* 177: 364-371.
55. Ruby, S. W. and Szostak, J. W. (1985). Specific *Saccharomyces cerevisiae* genes are expressed in response to DNA-damaging agents. *Molecular and Cellular Biology* 5: 75-84.
56. Schmitt, H. (1969). Characterization of mitochondrial ribosomes from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 4: 234-238.
57. Schofield, M. J., Lilley, D. M. and White, M. F. (1998). Dissection of the sequence specificity of the Holliday junction endonuclease CCE1. *Biochemistry* 37: 7733-7740.
58. Sedman, T., Gaidutšik, I., Villemson, K., Hou, Y. and Sedman, J. (2014). Double-stranded DNA-dependent ATPase Irc3p is directly involved in mitochondrial genome maintenance. *Nucleic Acids Research* 42: 13214-13227.
59. Sedman, T., Kuusk, S., Kivi, S. and Sedman, J. (2000). A DNA helicase required for maintenance of the functional mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 20: 1816-1824.
60. Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., ... Meisinger, C. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 13207-13212.
61. Stehling, O. and 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: a011312.

62. Tanaka, K., Oshima, T., Araki, H., Harashima, S. and Oshima, Y. (1984). Mating type control in *Saccharomyces cerevisiae*: a frameshift mutation at the common DNA sequence, X, of the HML alpha locus. *Molecular and Cellular Biology* 4: 203-211.
63. Tishkoff, D. X., Boerger, A. L., Bertrand, P., Filosi, N., Gaida, G. M., Kane, M. F. and Kolodner, R. D. (1997). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, a gene encoding an exonuclease that interacts with MSH2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 7487-7492.
64. Tucker, M., Valencia-Sanchez, M. A., Staples, R. R., Chen, J., Denis, C. L. and Parker, R. (2001). The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104: 377-386.
65. Tzagoloff, A. and Dieckmann, C. L. (1990). PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* 54: 211-225.
66. Vögtle, F.-N., Wortelkamp, S., Zahedi, R. P., ... Meisinger, C. (2009). Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* 139: 428-439.
67. Vögtle, F.-N., Burkhart, J. M., Gonczarowska-Jorge, H., ... Meisinger, C. (2017). Landscape of submitochondrial protein distribution. *Nature Communications* 8, article nr 290.
68. Westermann, B. (2014). Mitochondrial inheritance in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837: 1039-1046.
69. Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G. J. and Woese, C. R. (1985). Mitochondrial origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82: 4443-4447.
70. Yang, W., Steitz, T. A. (1995). Recombining the structures of HIV integrase, RuvC and RNase H. *Structure* 3: 131-134.
71. Yoshitani, A., Ling, F. and Yoshida, M. (2008). The yeast checkpoint kinase Dun1 downregulates DIN7 in the absence of DNA damage. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72: 1630-1634.
72. Yoshitani, A., Yoshida, M., Ling, F. (2008). A novel cis-acting element required for DNA damage-inducible expression of yeast DIN7. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 365: 183-188.
73. de Zamaroczy, M., Faugeron-Fonty, G., Baldacci, G., Goursot, R., Bernardi, G. (1984). The ori sequences of the mitochondrial genome of a wild-type yeast strain: number, location, orientation and structure. *Gene* 32: 439-457.

Käsikirjad

1. Süld, M.-L. 2015. Pärsi *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalse valgu Din7 deletsiooni mõju mitokondriaalsele DNA-le. Tartu Ülikool, üldise- ja mikroobibiokeemia õppetool.

Raamatud

1. Laskowski, M. 1967. DNases and their use in the studies of primary structure of nucleic acid, p. 166-168. In A. Meister (ed.), *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, vol. 29. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey.
2. Rose, M. D., Winston, F and Hieter, P. 1990. *Techniques and protocols* 28, p. 198. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
3. Sambrook, J. and Russell, D., W. 2001 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
4. Sherman, F. 1991. Getting started with yeast, p. 13-14, 17. In G. R. Fink and C. Guthrie (ed.), *Methods in Enzymology: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, vol. 194. Academic Press, San Diego, California.

Kasutatud veebiaadressid

1. Andmebaas Uniprot <http://www.uniprot.org/> (Külastatud 01.05.2020)

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Valentina Rukins,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „*Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalse nukleaasi Din7 *in vivo* analüüs ja rekombinantse valgu ekspressioon“, mille juhendajad on professor Juhan Sedman ja MSc Sirelin Sillamaa, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **08.06.2023** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Valentina Rukins

08.06.2020