

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÜLDISE JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Vlad-Julian Piljukov

**Testsüsteem mitokondriaalse HMG-*box* valguga Gcf1 struktuuri analüüsiks**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Juhan Sedman, PhD

TARTU 2015

## SISUKORD

<b>KASUTATUD LÜHENDID.....</b>	<b>5</b>
<b>SISSEJUHATUS.....</b>	<b>6</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Mitokonder.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2. Bakteriaalne nukleoid.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3. Mitokondriaalne nukleoid.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4. HMG valgud.....</b>	<b>9</b>
<b>1.5. HMG-box motiivi omavad mitokondriaalsed valgud.....</b>	<b>10</b>
<b>1.5.1. Tfam.....</b>	<b>10</b>
<b>1.5.2. Abf2.....</b>	<b>12</b>
<b>1.5.3. Gcfl.....</b>	<b>13</b>
<b>2. EKSPERIMENTAALOSA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Töö eesmärgid .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2. Materjal ja meetodika .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.1 Töös kasutatud tüved ja kasvutingimused.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.2 Töös kasutatud plasmiidid ja oligonukleotiidid .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.3 Pärmide tüvede valmistamine homoloogilise rekombinatsiooniga.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.3.1 Preparatiivne ja analüütiline polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.3.2 Agarosgeelelektroforees.....</b>	<b>20</b>

2.2.3.3	<i>Lineaarse DNA fragmendi transformatsioon Li-atsetaat meetodil</i> .....	20
2.2.3.4	<i>Tetraadide analüüs</i> .....	21
2.2.3.5	<i>W303a/a abf2 Δ/ABF2 fenotüübi analüüs</i> .....	21
2.2.4	<i>2D mtDNA analüüs</i> .....	22
2.2.4.1	<i>Pärmi mitokondriaalse DNA eraldamine</i> .....	22
2.2.4.2	<i>DNA restriksioon ja kvantitatiivne Southern-blot</i> .....	23
2.2.4.3	<i>2D geelelektroforees</i> .....	25
2.2.4.4	<i>Radioaktiivse valmistamine PCR meetodiga</i> .....	25
2.2.5	<i>pRS315 ekspressioonikonstruktide valmistamine</i> .....	26
2.2.5.1	<i>Promootori, signaali ja terminaatori viimine pRS315/pRS316 konstrukti</i> .....	26
2.2.5.2	<i>Gcf1 ja selle fragmentide klonerimine konstrukti</i> .....	27
2.2.5.3	<i>E. coli rakkude transformatsioon</i> .....	29
2.2.5.4	<i>Plasmiidi eraldamine E. coli-st</i> .....	29
2.2.5.5	<i>Restriksioonanalüüs</i> .....	30
2.2.5.6	<i>Plasmiidide transformatsioon Li-atsetaat meetodil</i> .....	30
2.3.	<b>Tulemused ja arutelu</b> .....	31
2.3.1	<i>W303a abf2 Δ ja W303a/a abf2 Δ/ABF2 tüvede konstrueerimine</i> .....	31
2.3.2	<i>Tetraadide segregatsioon W303 abf2 Δ tüvede konstrueerimiseks</i> .....	34
2.3.3	<i>Respiratoorse funktsiooni kadumise kineetika kvantitatiivne analüüs W303 abf2 Δ, spoor2 tüves</i> .....	35
2.3.4	<i>mtDNA struktuuri muutused W303 abf2Δ tüves</i> .....	37
2.3.5	<i>Abf2Δ tüve kasutamine HMG-box valgusstruktuursete funktsioonide analüüsiks</i> .....	43

<b>KOKKUVÕTE.....</b>	<b>49</b>
<b>RESÜMEE.....</b>	<b>50</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU.....</b>	<b>51</b>
<b>LISAD.....</b>	<b>58</b>
<b>Lihtlitsents lõputöö elektrooniliseks avaldamiseks.....</b>	<b>61</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

EtBr – etiidumbromiid

mtDNA – mitokondriaalne DNA

NAP – nukleoidiga assotsieeritud valgud

LSP (light strand promotor) – inimese mtDNA kerge ahela promootor

HSP (heavy strand promotor) – inimese mtDNA raske ahela promootor

YPD (yeast extract, peptone, dextrose) – pärmis glükoosi sööde

YPG (yeast extract, peptone, glycerol) – pärmis glütserooli sööde

LB – Luria-Bertani sööde

dNTP – desoksüribonukleotiidtrifosfaat

EDTA – etüleendiamiintetraetaanhape

TAE – Tris-atsetaati ja EDTA-d sisaldav puhver

T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> – Trissi ja EDTA-d (suhtes 10 : 1) sisaldav lahusti

$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP – desoksütsütosiinrifosfaat, kus  $\alpha$  fosfor on radioaktiivne <sup>32</sup> isotoop

## SISSEJUHATUS

DNA molekul on üldiselt väga stabiilne ühend tänu suhkur-fosfaat sidemetele selgroos ja komplementaarsele paardumisele antiparalleelsete ahelate vahel vesiniksidemete abil. Aga elusas organismis on ohte, mille eest DNA kaitstud ei ole, nagu reaktiivsed hapnikuühendid ja ka DNA replikatsiooni ja hoolduse mehhanismid ise, mis teevad oma töö käigus vigu. Seetõttu ei esine DNA organismis kunagi puhtal kujul, vaid on tihedalt pakitud valkude poolt. Bakterite ja mitokondrite DNA ja valgu komplekse nimetatakse nukleoidideks.

Märksõnad: mitokondriaalne DNA, HMG-*box*, Abf2, Gcf1

## KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### Mitokonder

Mitokondrid on ääretult dünaamilised raku organellid, mis on tihedalt seotud endoplasmaatilise retiikulimiga ja omavahel teiste mitokondritega, läbi arvutamatu hulga pooldumiste ja kokkusulamise sündmuste (McBride jt, 2006). Mitokonder on ka eukarüootse raku "energiajaam". ATP süntees toimub kahe kataboolse protsessi tulemusena: esialgu tsütoplasmas saadakse glükolüüsi rajas glükoosist püruvaati, siis toimub püruvaadi import mitokondrisse, kus toimub hapnikust sõltuv oksüdatiivne fosforüülimine (Voet jt, 2006). Viimasel ajal hakatakse mõistma mitokondrite olulisust ka väljaspool energia tootmise vaatenurka. On leitud olulised mitokondri dünaamika ja metabolismi seosed kogu raku metabolismi, arengu, rakutsükli, antiviraalse vastuse ja ka apoptoosiga (McBride jt, 2006). Kuigi peamine osa raku DNA-st sisaldub tõe-poolest tuumas, omab ka mitokonder eraldi väikest genoomi, mis on huvitaval kombel väga sarnane alfa-proteobakterite genoomile (Andersson jt, 2003). Selle genoomi poolt on kodeeritud osa mitokondri elektroontransportahela valkude subühikuid, mille ebakorrekne funktsioneerimine võib põhjustada vabade radikaalide tekkimist. On arvatud, et need radikaalid võivad tekitada uusi mutatsioone mitokondri DNA-s ja see omakorda kahjustab kodeeritud subühikute funktsiooni

veelgi; samas saavad kannatada ka teised makromolekulid nagu lipiidid ja valgud (Harman, 1956; Jang ja Remmen, 2009). Kõik see võiks teoreetiliselt põhjustada organismi vananemist, aga katseliselt on näidatud, et seda alati ei toimu (Pérez jt, 2009; Fontana jt, 2010; Van Raamsdonk ja Hekimi, 2009). On võimalik, et tekkivad vabad radikaalid aktiveerivad mitmeid stress-indutseerivaid radasid, nagu erinevad DNA reparatsiooni süsteemid, mis proovivad taastada rakkudes homeostaasi, sellega hoopis pikendades organismi eluiga (Hekimi jt. 2011). Mitokondri ebakorrekse tööga on seotud ka mitmed haigused, nende seast umbes 15% on põhjustatud mitokondri DNA mutatsioonidest (Dimauro ja Davidzon, 2005). Mitokondri funktsioonide olulisusest on tingitud väga lai haiguste spekter, mis hõlmab paljusid inimese organeid ja süsteeme, nagu: kesknärvisüsteem, perifeerne närvisüsteem, lihased, vereloome, endokriinne süsteem, süda, seedesüsteem ja kõrv (Dimauro ja Davidzon, 2005).

### **Bakteriaalne nukleoid**

Alguses tekkis nukleoidi mõiste bakterite DNA-valk komplekside uurimisel, kui pandi tähele, et bakteritel puuduvad eukarüootidele sarnased tuuma membraanid, aga DNA on bakteri sees siiski lihtsasti eristatav elektronmikroskoobis ja isegi värvimisel valgusmikroskoobis (Kjell Kleppe jt, 1979). Samas ei toimu selles piirkonnas uute valkude translatsiooni (Robinow ja Kellenberger, 1994). DNA-ga seotud valke nukleoidis nimetatakse nukleoidiga assotsieeritud valkudeks (NAP), need on oma olemuses väga mitmekesised, aga üldjuhul omavad need kõik DNA-d sidumise aktiivsust ja võimekust muuta DNA molekuli ruumilist trajektoori. Tavaliselt tähendab see, et nad kas painutavad DNA-d, keeravad selle enda ümber või ühendavad kõrvuti paiknevaid DNA molekule. DNA-valk interaktsioonid on väga olulised geenide ekspressiooni regulatsioonis bakterites, kuna nad stabiliseerivad DNA superspiraliseerunud linge logaritmilises kasvufaasis ja hoiavad DNA-d tihedamalt kokkupakitud kujul, väheste mittespiraliseerunud lingudega, statsionaarses faasis (Drlica ja Rouvière-Yaniv, 1987; Dorman ja Deighan, 2003). Peale struktuurse funktsiooni ja sellega kaasneva ekspressiooni kontrolli on nukleoidi valgud olulised ka replikatsioonis, rekombinatsioonis ja transkriptsioonis, seekord juba nagu klassikalised transkriptsioonifaktorid. Mudelorganismi *Escherichia coli* nukleoidis on 12 peamist valku ja nende kontsentratsioonid muutuvad sõltuvalt kasvufaasist. Siinjuures kõige olulisem roll on Fis, HU ja Dps valkudel. Fis ja HU domineerivad eksponentsiaalses kasvufaasis, Fis on järjestusspetsiifilise aktiivsusega ja HU on ebaspetsiifiline. Dps valk domineerib statsionaarses kasvufaasis, kus ta vastutab DNA tihedama

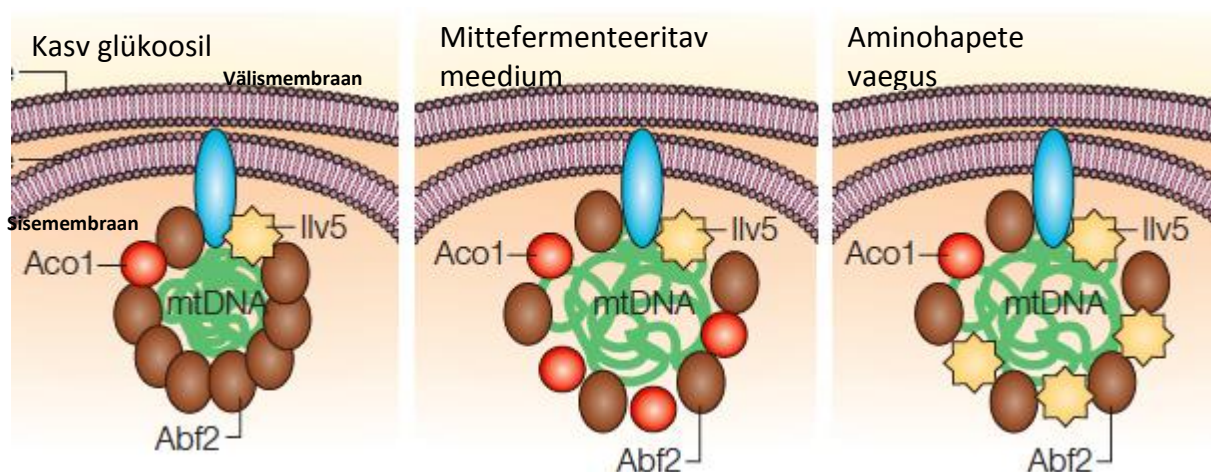
pakkimise eest ja kaitseb seda reaktiivsete hapnikuühendite eest (Azam jt, 1993; Azam ja Ishihama, 1999). Siinjuures on oluline mainida, et bakterite nukleoidi valgud ei ole struktuurselt homoloogsed mitokondri nukleoidi valkudega, aga on neile funktsionaalselt analoogsed.

### **Mitokondriaalne nukleoid**

Seoses endosümbioosi teooriaga ja sarnaste DNA struktuuride olemasoluga nimetati ka mitokondrites leiduvaid valgu ja DNA komplekse nukleoidideks (Wallin, 1927; Mereschkowsky, 1905; Margulis, 1993; Sotelo ja Porter, 1959), kuigi hiljem selgus, et mitokondriaalsed nukleoidi valgud ei oma homoloogiat bakteriaalsete nukleoidi valkudega ja on hoopis uuesti tekkinud mitokondriaalse DNA säilitamiseks, kui endosümbiondi natiivsed valgud kadusid ära (Kucej ja Butow, 2007). Nukleoidid on sfäärilise kujuga moodustised, mis on assotsieerunud mitokondri sisemembraaniga ja paiknevad sellel korrapäraselt ja ühtlaselt (Iborra jt, 2004; Legros jt, 2004). Pärmis nukleoidi diameeter on umbes 400 nm ja inimese oma 70 nm, mis on tingitud mtDNA molekuli erineva pikkusega, umbes 80kb (tuhat aluspaari) pärmis ja 16,5 kb inimesel. Inimese rakus on keskmiselt 500–800 nukleoidi, pärmis ainult 40–60 aeroobsel kasvul ja 8 anaeroobsel. Igas nukleoidis ei ole tavaliselt ainult üks mtDNA molekul vaid neid on 2–10 inimesel, 1–2 aeroobselt kasvavas pärmis ja kuni 20 anaeroobselt kasvavas pärmis (Chen ja Butow, 2005). Nukleoidi koostisesse kulub 25 või rohkem valku, millest enamiku rollid nukleoidis on ebaselged. Neid jagatakse viieks rühmaks: mtDNA replikatsiooniga, rekombinatsiooniga, transkriptsiooniga ja pakkimisega seotud valgud (tüüpesindajad on Abf2 pagaripärmis ja Tfam inimesel); kuumašoki valgud (Hsp60 pärmis ja Lon proteaas inimeses); metaboolsed ensüümid (tuntud on näiteks Aco1 ja Ilv5 pärmis); tsütoskeleti komponendid (aktiin, vimentiin) ning valgud, mis ei kuulu eelnevatesse kategooriatesse (Kucej ja Butow, 2007). Kuumašoki valkude rühma kuuluvad enamasti erinevad šaperonid, mille tüüpesindaja Hsp60 osaleb valkude impordis mitokondritesse ja ka nukleoidide jagunemisel (Kaufman jt, 2003). Lon proteaasi homoloog pärmis on vajalik introneid omavate geenide transkriptsiooniks, inimeses vastutab Lon proteaas aga valkude kvaliteedi kontrolli eest (van Dyck jt, 1998; Lu jt, 2007). Metaboolsed ensüümid nagu Ilv5 (osaleb Val, Ile ja Leu biosünteesis) ja Aco1 (tsitraadi tsükli akonitaas) on bifunktsionaalseid, osaledes nii biosünteesis, kui ka nukleoidi ülesehitamises tänu mtDNA sidumise aktiivsusele. Sellaga ühendavad need valgud metabolismi nukleoidi struktuuriga (Chen ja Butow, 2005). Mudeli järgi toimub see regulatsioon järgnevalt (Joonis 1). Akonitaasi ekspressioon suureneb, kui tsitraadi tsükkel on aktiivne. Juhul kui tegemist on mittefermenteeritava toiduallikaga, liitub



osa Aco1-st mtDNA-ga nukleoidi koostisesse ja lõdvendab seda, vähendamata kaitset oksüdatiivse stressi eest, ETA komponentide ekspressioon on soodustatud. Ilv5 ekspressioon suureneb, kui keskkonnas ei ole piisavalt aminohapeid ja oleks vaja neid sünteesima hakata, tulemusena suureneb nukleoidide hulk konstantse mtDNA koopiaarvu juures, mis võiks olla kasulik mtDNA hõlpsamaks pärandamiseks tütarakkudesse (Chen jt, 2005; MacAlpine jt 2000).



Joonis 1: Mudel, mis kujutab nukleoidi modifikatsiooni, vastuseks metabolismi muutusele (Chen ja Butow, 2005).

## HMG valgud

HMG ehk High Mobility Group valgud olid esmakordselt eraldatud ja kirjeldatud 1973 aastal, kasutades happelisi polüakrüülamiidi geele ja rakendades madalat soolakontsentratsiooni väljapuhastamisel vasika tüümuse ekstraktist. Nendel tingimustel on neile valkudele iseloomulik väga suur liikuvus geelis. (Goodwin ja Johns, 1973). Praegu jagatakse HMG valgud kolme superperekonda: HMGA, HMGB ja HMGN. Igaüks omab kindlat funktsionaalset järjestuse motiivi. HMGA puhul selleks motiiviks on "AT-konks", HMGB-1 "HMG-box" ja HMGN-1 "nukleosoomi siduv domeen" (Bustin, 2001). Nukleoidi pakkimises on esmase tähtsusega just HMGB (HMG-box motiivi omavad) valgud, mis ei ole struktuurselt tuuma histoonidele üldse sarnased, vaid on funktsionaalselt analoogsed bakteri nukleoidi valkudega (Kucej ja Butow, 2007; Timothy jt, 1993). HMG-box motiiviga valgud on evolutsiooniliselt palju nooremad, kui bakteri nukleoidi rakud – tekkisid juba eukarüootides, umbes 1 miljard aastat tagasi. Mitokondri nukleoidis ja ka raku tuumas võib esineda ühe ja kahe HMG-box motiiviga valke, mis seostuvad DNA molekuliga nii järjestusspetsiifiliselt (põhiliselt ühe konserveerunud HMG-box motiiviga valgud), kui ka mittespetsiifiliselt (kahe vähe

konserveerunud HMG-box motiiviga) ja seega nad täidavad sarnaseid rolle bakterite nukleoid-assotsieerunud valkudega (Kucej ja Butow, 2007). HMG valgud on nõrgemalt seotud mtDNA-ga, kui histoonid on seotud tuuma DNA-ga (Brewer jt, 2003). Selleks, et alustada transkriptsiooni tuuma DNA-l, peavad histoonid olema modifitseeritud ja nukleosoomid remodelleeritud, alles siis pääseb RNA polümeraas DNA-le ligi, mitokondris aga ei moodusta nukleoidi valgud füüslit barjääri RNA polümeraasile, vastastikune regulatsioon ikkagi toimub (Studitsky jt, 2004).

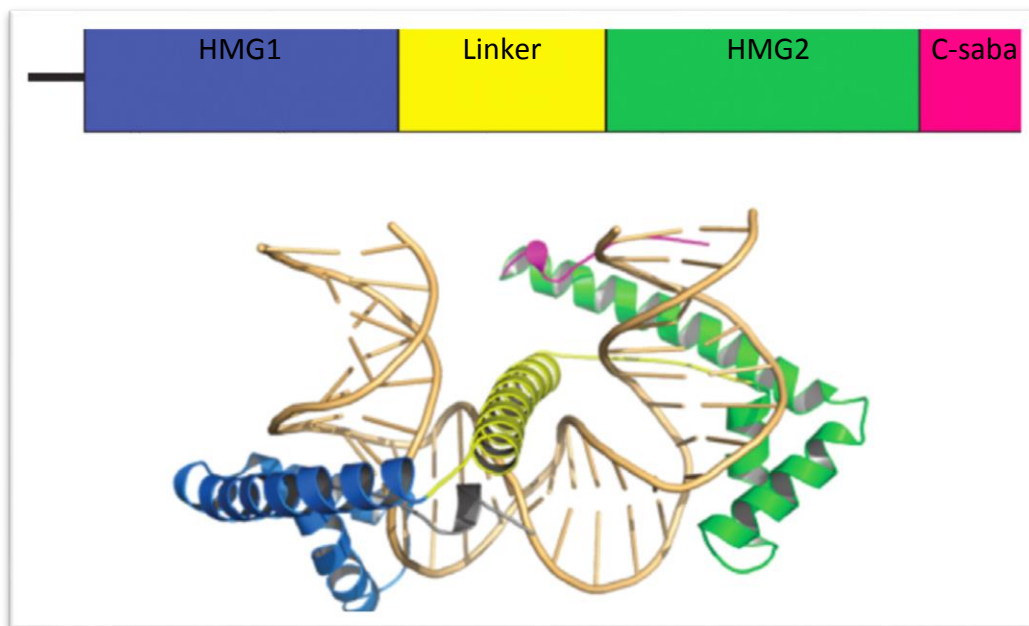
### **HMG-box motiivi omavad valgud**

HMG-*box* on umbes 75 aminohappe pikkune valgu domeen, mis võib põhjustada kas spetsiifilist või mittespetsiifilist DNA sidumist. Tavaliselt omavab tugevamat affiinsust painutatud või muul viisil moonutatud DNA suhtes, kui korrektse kaheaheelalisele struktuurile. Klassikaline HMG-*box* koosneb kolmest alfa-heeliksist, mis on omavahel ühendatud peptiidahela silmustega (Stros jt, 2007; Thomas 2001).

### ***Tfam***

Tfam, ehk mitokondri transkriptsiooni faktor A (Transcription Factor A, mitochondrial) on 204 aminohapet pikk 24,4 kDa suurune inimese valk, mis on kodeeritud tuuma DNA peal ja hiljem transporditakse mitokondri maatriksisse. Ei oma teisi sarnasusi DNA-d siduvate valkudega, peale kahe conserveerunud HMG-*box* motiivi (Parisi ja Clayton, 1991). Mitokondris on umbes 900 Tfam-i molekuli iga DNA molekuli kohta, millest piisab et täiesti katta mtDNA, see viitab Tfam-i olulisele struktuursele rollile. Lisaks omab Tfam suuremat affiinsust, kerge ja raske mtDNA ahelate transkriptsiooni promootorite, LSP ja HSP, suhtes, kui ülejäänud mtDNA-ga (Parisi jt, 1993; Fisher jt, 1991). Katseliselt on vähendatud Tfam ekspressiooni putukarakkudes ja see ei mõjutanud oluliselt fenotüüpi, ja ka transkriptsiooni tase jäi samaks (Goto jt, 2001). Tfam deletsiooniga hiire embrüod ei arene välja ja neis puudub täielikult mitokondriaalne DNA (Larsson jt, 1998). See on põhjustatud sellest, et inimesel mtDNA replikatsioon on praimereitud LSP promootorilt saadud RNA transkriptiga (Clayton, 1991). Seega antud valk on oluline mtDNA replikatsioonis ja omab teatud tähtsust ka transkriptsioonile. Tfam-i roll on pigem transkriptsiooni initsiatsiooni kaasaitamine, kui iseseisev aktiveerimine, kuna *in vitro* süsteemides tema üksi koos RNA polümeraasiga ei suuda transkribeerimist alustada, vaja on transkriptsiooni faktor B lisamist (Prieto-Martín jt, 2001; Garrido jt, 2003). Kriitilist rolli Tfam-

i transkriptsiooni initsieerimises mängib valgu C-terminaalne saba, mis puudub pärmil homologil Abf2-1 ja mille tõttu Abf2 ei osale transkriptsiooni aktiveerimises (Dairaghi jt, 1995; Fisher jt, 1992). Mitokondriaalse transkriptsioonifaktori A ekspressiooni kunstlik tõstmine põhjustab mtDNA koopiaarvu suurenemise, aga samas kui vähendada mtDNA koopiaarvu blokeerides mtDNA replikatsiooni, vähendab ka Tfam-i taset (Ekstrand jt, 2004; Leibowitz, 1971). Aatomjõumikroskoopia pildid on näidanud, et Tfam painutab, kompakteerib ja tekitab silmuseid mtDNA-l. Valgu kontsentratsiooni suurendades saavutab DNA üha enam ja enam sfäärile lähedast kuju, mis meenutab nukleoidi, sarnaseid omadusi omab ka pärmil Abf2. (Kaufman jt, 2007; Brewer jt, 2003). Hiljutistes kristallograafilistes uuringutes õnnestus teha kindlaks Tfam struktuuri DNA-l, pildil on näha, et kaks HMG-*box* motiivi painutavad DNA-d igaüks 90 kraadi võrra, tekitades koos DNA-l 180 kraadilise pöõret, ehk "U"-struktuuri, kusjuures motiividevaheline linker on oluline stabiilsuse faktor (Joonis 2) (Rubio-Cosials jt, 2011; Ngo jt, 2011). Praeguse arusaamisega kohaselt on Tfam üks olulisematest mtDNA hoidjatest nukleoidi koostises ja selle töö põhimõtete arusaamine omab perspektiive nii haiguste ravimiseks, kui ka tervete inimeste kvaliteetse eluea pikendamises (Park ja Larsson, 2011)

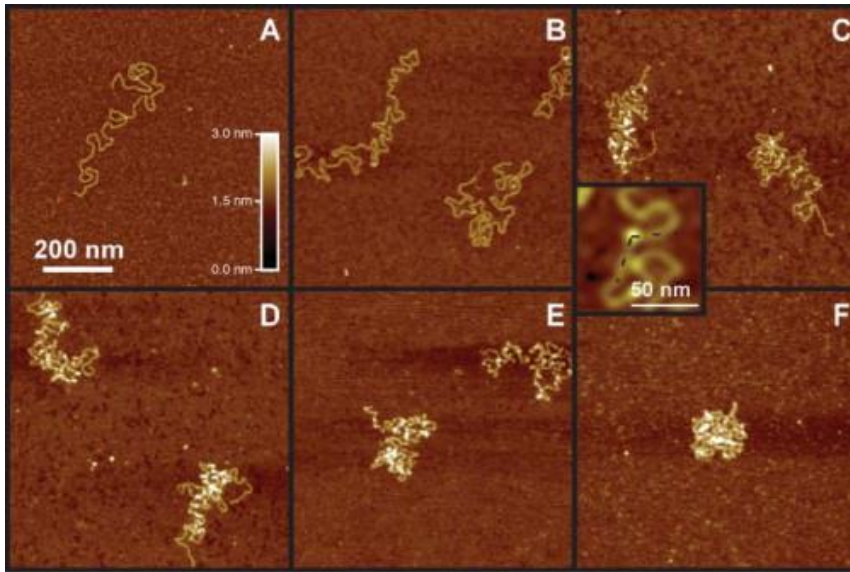


(Kukat ja Larsson 2013)

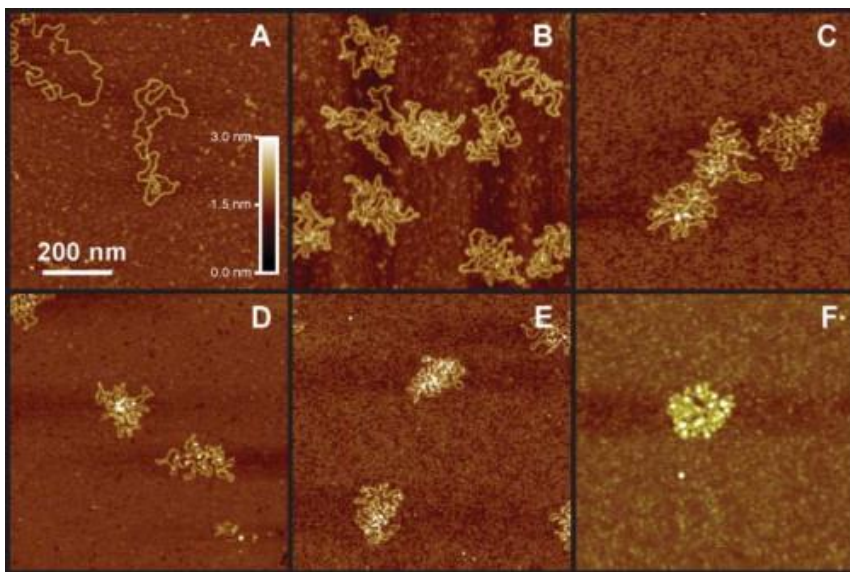
Joonis 2: Pildil on näha TFAM molekuli DNA-l, täpsemalt LSP 28bp piirkonnas, ja U-struktuuri moodustumine. Sinine ja roheline on HMG-*box* motiivid, kollane on nende vaheline linker ja roosa on C-terminaalne saba, mida molekuli kasutatakse transkriptsioonifaktori B haaramiseks (Rubio-Cosials jt, 2011; Ngo jt, 2011).

## *Abf2*

Peamiseks nukleoidi struktuuri määravaks valguks pärmis arvatakse olevat Abf2, mis on inimese Tfam-i homoloog (Brewer jt, 2003). See on väike 20 kDa suurune valk, mis omab spetsiifilist afiinsust ARS1 autonoomselt replitseeritavale järjestusele, millest ta sai ka oma nime (ARS binding factor 2). Valgul on kaks HMG-*box* domeeni, millest vähemalt üks on vajalik osalise funktsiooni säilitamiseks (Diffley ja Stillman, 1991; Kao jt, 1993). Huvitaval kombel omab valk ka mittespetsiifilist afiinsust DNA-le ja tekitab plasmiididel topoisomeraasi juuresolekul negatiivset superspiralisatsiooni (Diffley ja Stillman, 1991). Kuigi praeguste teadmiste alusel pole negatiivse superspirallisatsiooni tekitamine DNA mittespetsiifiliseks pakkimiseks oluline Abf2 roll, vaid oluline on DNA selgroo painutamine (Friddle jt, 2004) (Joonised 3 ja 4). Mitokondri nukleoidi valkude seast omab Abf2 kõige aluselisemat isoelektrilist punkti, mis nõrgalt aluselises mitokondri maatriksis annab valgule positiivse laengu (Miyakawa jt, 1987). Suur osa transleeritavast Abf2 valgust on imporditud mitokondrite maatriksisse, kus seda on üks valgu molekul iga 15-30 bp mtDNA kohta (Diffley ja Stillman, 1991; Newman jt, 1996). Abf2 täieliku deletsiooniga tüvede mtDNA on ebastabiilne, mis viib mtDNA kadumiseni fermenteeritaval toiduallikal. Mittefermenteeritaval toiduallikal kasv ei lõpe, mis viitab sellele, et Abf2 ei ole mtDNA replikatsiooniks ja RNA transkriptsiooniks hädavajalik (Diffley ja Stillman, 1991). Ebastabiilse mtDNA fenotüüpi saab supresseerida Ilv5 üleekspressiooniga (Zelenaya-Troitskaya jt, 1995). On näidatud, et Abf2 deletsiooniga mutantidel on mittefermenteeritavas meediumis umbes poole vähem mtDNA-d. Abf2 kahe-, kuni kolmekordse üleekspressiooni tüvedes aga esines 50%-150% rohkem nii rho+, kui ka rho-mtDNA-d. Kümnekordne üleekspressioon viib aga rho+ konversioonile rho- mutantiks ja üldisele mtDNA kaotamisele, kiiremini rho+ tüvedes ja aeglasemalt rho- tüvedes; samas tõuseb ka rekombinatsioonide sagedus. Arvatakse, et need nähtused on seotud valgu DNA sidumise aktiivsusega (Zelenaya-Troitskaya jt, 1998; MacAlpine jt, 1998). Abf2 mutantide ristamise diploidides tekib mtDNA-s vähem rekombinatsioone kui metsiktüves (Zelenaya-Troitskaya jt, 1998). Fluoristsentsmikroskoopia piltidel on näha, et Abf2 deletsiooniga tüvedes on nukleoidid diffuussemad kui metsiktüves (Newman jt, 1996). Valgu üheks oluliseimaks funktsiooniks on ilmselt DNA füüsiline pakkimine, sest teda saab osaliselt kompenseerida ebaspetsiifilise bakteri DNA-d pakkiva valguga HU-ga, mis tõstab Abf2 deletsiooniga mutantide mtDNA stabiilsuse kasvu fermenteeritaval meediumil (Megraw ja Chae, 1993).



Joonis 3: Aatomjõumikroskoopia pilt, mis näitab lineaarse DNA molekuli kompakteerimist Abf2 valgu toimel. Valgu kontsentratsioon kasvab A-F suunas.  
(Brewer jt, 2003)

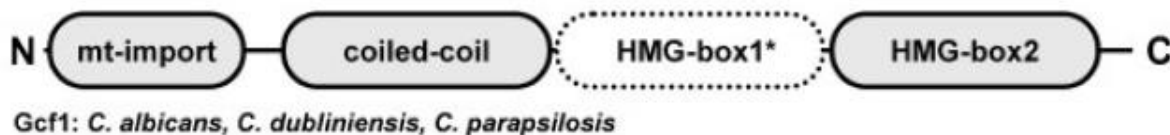


Joonis 4: Aatomjõumikroskoopia pilt, mis näitab tsirkulaarse DNA molekuli kompakteerimist Abf2 valgu toimel. Valgu kontsentratsioon kasvab A-F suunas.  
(Brewer jt, 2003)

### ***Gcf1***

Abf2 ja Tfam-i homoloog patogeenses pärmis *Candida albicans* on valk Gcf1 (Glom-like Condensation Factor) (Visacka jt, 2009). Oma nime sai ta valgule Gloom(*Physarum polycephalum*) sarnasuse pärast (Sasaki jt, 2003). Erinevalt homoloogidest omab valk ainult

ühte C-terminaalset HMG-*box* motiivi ja N-terminaalselt struktuuri, mida nimetatakse coiled-coil motiiviks ja mida arvatakse on vaja dimeeride moodustumiseks (Joonis 5). Biokeemilised katsed viidavad sellele, et Gcf1 sarnaselt Abf2-le seob DNA-d mittespetsiifiliselt ja võib seega omada olulist struktuurset rolli. (Visacka jt, 2009).



Joonis 5: (Visacka jt, 2009)

Pildil on kujutatud Gcf1 ORF, kus N-terminusest C-terminuse poole asuvad: mitokondri impordisignaali, coiled-coil motiiv, siis asub ala kus evolutsiooniliselt varem arvatakse oli esimene HMG-*box* motiiv, mis praeguseks on täiesti degenerereerunud, ja viimane struktuur on konserveerunud C-terminaalne HMG-*box*.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

1. Konstrueerida Abf2 deletsioonitüvi ja kontrollida selle fenotüübi vastavust teiste autorite töödega.
2. Analüüsida Abf2 deletsioonitüve mitokondriaalse DNA topoloogia sarnasusi ja erinevusi metsiktüüpi mtDNA-ga ja *irc3Δ* mutandiga, mis kaotab funktsionaalse mtDNA fermenteeritava süsinikuallikaga söötmel.
3. Planeerida komplementatsioonanalüüsi eksperimendid *Candida albicansi* Gcf1 valgu ja Gcf1 deletsioonimutantidega.

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Töös kasutatud tüved ja kasvutingimused

1. ABF2 deletsioonitüve valmistamiseks kasutati tüve *Saccharomyces cerevisiae* tüve W303α(*leu2-3, -112 his 3-11,-15 trp1-1 ura3-1 ade2-1 can1-100*) haploidi ja W303α/α diploidi (Fan jt, 1996).
2. Kahedimensionaalse geelelektroforeesi töös kasutatud tüved: W303α, W303α *irc3Δ*, spoor32 (saadud Ilja Gaidutšiku käest) ja W303 *abf2 Δ*, spoor2, konstrueeritud selle töö käigus.



- Plasmiidi paljundamiseks kasutati transformeerimiseks kompetentset *E. Coli* tüve DH5 $\alpha$ (*fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44  $\Phi$ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*). Ekspressioonikonstruktide analüüsiks transformeeriti plasmiidid haploidsesse pärmis tüvesse W303 *abf2  $\Delta$* , *spoor2*.

Kui ei ole kirjutatud teisiti, siis kõik pärmitüved kasvati 30 °C juures termostaadis või 30 °C 180 p/min loksutis. Kõik bakteritüved kasvatati 37 °C juures termostaadis või 37 °C 180 p/min loksutis.

Töös kasutatud söötmed:

Sööde	Koostis
YPD	1% pärmiekstrakt; 2% peptoon; 2% glükoos; (1,7% agar)
YPG	1% pärmiekstrakt; 2% peptoon; 3% glütserool; (1,7% agar)
LB	1% trüptoon; 0,5% pärmiekstrakt; 1% NaCl; (1,7% agar)
-LEU minimaalsööde	YNB 0,67%; 2% glükoos/3% glütserool; 2% aminohapete üldsegu; 0,1% Trp; 0,05% Ura; 0,1% His; 0,1% Lys; 0,02% Ade; 1,7% agar

## 2.2.2 Töös kasutatud plasmiidid ja oligonukleotiidid

- KanMX6 kasseti amplifikatsiooniks koos Abf2 homoloogiliste järjestustega kasutati PCRi pFA6a kanMX6 plasmiidil (Bähler jt, 1998).
- Kahedimensionaalse geelelektroforeesi töös kasutati radioaktiivse hübriidatsiooni proovi tegemiseks plasmiidi pGEM-5Zf(+) (Promega Corporation) kuhu oli lisatud COX2 geeni fragment, *S.cerevisiae* YJM1615 mitokondriaalne DNA 73104bp – 72753bp, konstrukti oli saadud Tiina Sedmani käest.
- Ekspressioonikonstrukti konstrueerimise töös kasutati: pRS315 ja pRS316 pärmis süstikvektoreid (Sikorski ja Hieter, 1989); *E. Coli* vahekonstrukti pBluescript II KS(-) (Short jt, 1988), kuhu oli sisseviidud SacI ja Esp3I restriksioonisaite vahele CYC1(tsütokroom c-1) promootor *Saccharomyces cerevisiae* YJM1402 kromosoom 10 508536bp – 508825bp, HindIII ja SalI vahele CYC1 terminaator järjestus *S.cerevisiae* YJM1402 kromosoom 10 509164bp – 509433bp, Esp3I ja BamHI vahele

CIT1(tsitraadi süntaas) mitokondri impordi signaal *S.cerevisiae* YJM1402 kromosoom  
14 603647bp – 603531bp , valmis vahekonstrukti oli saadud Tiina Sedmani käest.

Töös kasutatud praimerid (oligonukleotiidid):

	<b>Praimeri nimi</b>	<b>Järjestus 5' -&gt; 3'</b>	<b>Eesmärk</b>
1	Abf2 up-kan	TAAACAAGTAAACAGATTAACAAAGAAGCC AATCAATTACAACAACAAATAAATGCGTAC <b>GCTGCAGGTCGAC</b>	KanMX6 kasseti amplifikatsioon Abf2 lookusesse integratsiooniks
2	Abf2 down-kan	GATAGGAACGGAAAGAATAAAGGCATAAAA AACATTGTGAGAGTACCGCGGTCTAGAATT <b>CGAGCTCGTTTTTCGACAC</b>	KanMX6 kasseti amplifikatsioon Abf2 lookusesse integratsiooniks
3	abf2 up forward	GAAACAACGTAGCAAGAAAG	Abf2 lookuse kontroll
4	abf2 rev. down	CACTACACACTTGCTTGGTT	Abf2 lookuse kontroll
5	COX23	TGGTGAAATAACTTCATCACA	Radioaktiivse proovi süntees
6	COX25	AAGATTTATTAATAATGTTAGA	Radioaktiivse proovi süntees
7	CYC1 F SacI	TAGAGCTCCGAGCGTTGGTTGGTGGATC	Promootori, signaali ja terminaatori integreerumise kontroll
8	CYC1 TR SalI	CGATGTCGACAGCTTGCAAATTAAGCCTTC G	Promootori, signaali ja terminaatori integreerumise kontroll

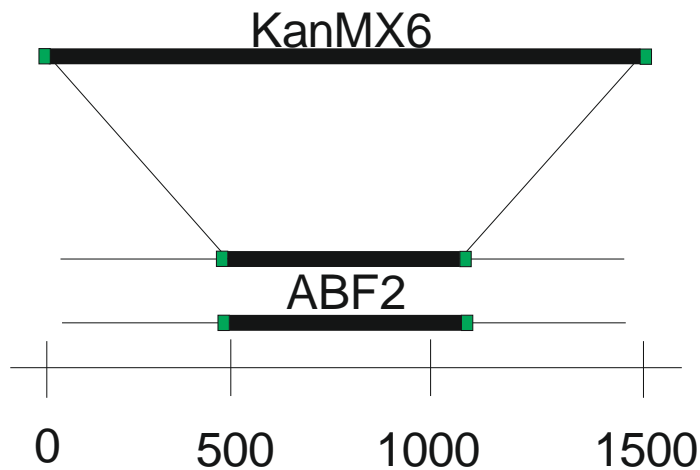


9	Abf2 SacI up forw	CCGAGCTCCATCTACCATATACGCTAA	Integreeritava fragmendi süntees
10	Abf2 SalI down rev	CCCGTCGACTGAAGAACCAATTGCTTGT	Integreeritava fragmendi süntees
11	Abf2 5 BamHI	CCGGATCCATGAACAGTTACAGCCTATTAAC T	Integreeritava fragmendi süntees
12	Abf2p PstI Rev	CCCCTGCAGTTATCTATCACGAAAGTCTGAT GA	Integreeritava fragmendi süntees
13	3GCFXHO	AGCCTCGAGTCAAAGTCATCCTCCACTTTG	Integreeritava fragmendi süntees
14	5GCFBAM25	CAGGATCCTTGGCAACAAAAGCTGCAACC	Integreeritava fragmendi süntees
15	GCF1T33 5'	CAAGGATCCACAACATAAAAAATCCACAACC	Integreeritava fragmendi süntees
16	GCF1I224 3'	AGCTCGAGTCAAAGTTCTTTCCATTTTTCAA G	Integreeritava fragmendi süntees
17	GCF1K61 5'	CAAGGATCCAAGGCTATCAGACTTCAGAAG	Integreeritava fragmendi süntees
18	GCF1A41 5'	CAAGGATCCGCATCACCAAAAACCAAAAAG	Integreeritava fragmendi süntees

19	GCF1S155 5'	CAAGGATCCAGCTATTTTACTCCTAAACCA	Integreeritava fragmendi süntees
20	GCF1E151 5'	CAAGGATCCGAAAAGGCCAAAAGCTATTTT	Integreeritava fragmendi süntees
21	GCF1S155 3'	AGCTCGAGTCAGCTTTTGGCCTTTTCCCAAT A	Integreeritava fragmendi süntees
22	GCF1P161 3'	AGCTCGAGTCATGGTTTAGGAGTAAAATAGC T	Integreeritava fragmendi süntees
23	USP	GTTTTCCCAGTCACGAC	Lõpliku konstrukti kontroll
24	RSP	CAGGAAACAGCTATGAC	Lõpliku konstrukti kontroll

### 2.2.3 Pärimi tüvede valmistamine homoloogilise rekombinatsiooniga

Pärimi tüvede valmistamine homoloogilise rekombinatsiooniga põhineb pärimi natiivse DNA reparatsiooni süsteemi ärakasutamist uurija kasuks. Nimelt, kui pärimi transformeeritud lineaarsel DNA fragmendil otsad on homoloogilised mõne kromosoomi piirkonnaga, toimub väikese tõenäosusega selle piirkonna asendamine sisseviidud DNA-ga (Joonis 6). Antud töös saadakse need DNA fragmendid kasutades PCR praimereid, mille 3' ots on homoloogiline KanMX6-ga ja 5' ots ABF2 geeniga.



## ■ Homoloogilised piirkonnad

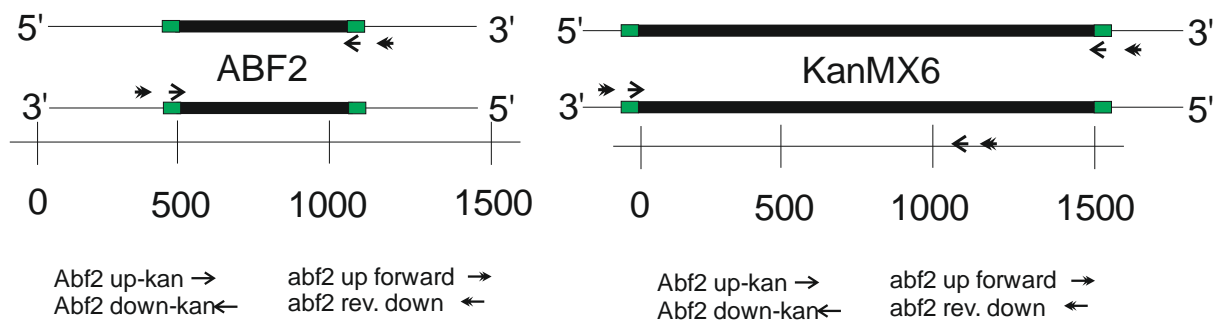
Joonis 6: Pärmis transformeeritud lineaarne DNA fragment, mille otsad on homoloogilised Abf2 geeni otstega kromosoomil.

### 2.2.3.1 Preparatiivne ja analüütiline polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Kõik selles töös tehtud PCR reaktsioonid on viidud läbi kas Eppendorf PCR'i masinas "Mastercycler personal" või Biometra PCR'i masinas "T1 Thermocycler".

Preparatiivse PCR-i tegemiseks kasutati pFA6a kanMX6 plasmidi matriitsina ning praimeritena oligonukleotide Abf2 up-kan ja Abf2 down-kan, mille 3' otsad on homoloogilised plasmiidiga, 5' otsad aga Abf2 geeniga pärmis. Viidi läbi kolm 30 µl reaktsiooni, mis sisaldasid PCR puhvrit (75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1% Tween 20), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 10 pmol kumbagi praimerit, 100 ng matriits-DNA-d ja 2,5 U Taq või Pfu/Taq, või Pfu DNA polümeraasi/polümeraaside segu. PCR-i tsükkel koosnes järgmistest etappidest: esmane denaturatsioon (3 minutit) 95 °C juures, denaturatsioon (30 sekundit) 95 °C juures, praimerite seondumine (30 sekundit) 55 °C juures, DNA süntees (2 minutit) 72 °C juures ja lõplik elongatsioon samal temperatuuril (4 minutit). Esimest ja viimast etappi viidi läbi üks kord, kolme keskmist korrati aga 25 korda.

W303 *abf2* Δ ja W303a/α *abf2* Δ/ABF2 rakkude transformatsiooni korrektsust kontrolliti analüütilise koloonia PCR-ga, kasutades 2 min mikrolaineahjus maksimaalsel võimsusel soojendatud koloonia materjali matriitsiks ja Abf2 up forward ja Abf2 rev. down primereid (Joonised 7 ja 8), termotsükleris praimerite seondumise temperatuur oli alandatud 53 °C-ni ja tehtud 30 tsükli. Muud PCR-i tingimused jäid samadeks, kui kirjeldatud preparatiivses PCR reaktsioonis. Tulemuse analüüsimiseks kasutati agarosgeelelektroforeesi.



Joonised 7 ja 8: W303 *abf2*  $\Delta$  rakkude transformatsiooni korrektsuse kontrolli skeem. Skeemil on näidatud Abf2 up-kan ja Abf2 down-kan asukoht, võrreldes Abf2 up forward ja Abf2 rev. down kontrolliks kasutatavate praimeritega. Vasakul ebaõnnestunud insertiooniga ja paremal õnnestunud insertiooniga proov.

### 2.2.3.2 Agaroosgeelelektroforees

Käesolevas töös läbiviidud PCR produktide kontrolliks ja hilisemates DNA eraldamis- ja klonerimistöodes kasutati DNA analüüsiks agaroosgeelelektroforeesi. Sõltuvalt uuritava DNA nukleotiidjärjestuse pikkusest kasutati 0,8-2% agaroosgeeli, mille valmistamiseks lisati TAE puhvrile (40 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8) vastav kogus agaroosi ning etiidumbromiidi (EtBr) 4-6  $\mu$ l 10mg/ml lahust 100 ml geeli kohta lõppkontsentratsiooniga 40 - 60  $\mu$ g/ml. DNA proovidele lisati enne geelile kandmist suhtes 1:6 TAE 6X laadimispuhvit (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 50% glütserool; 0,25% broomfenoolsinine). Elektroforees viidi läbi toatemperatuuril, rakendades geelile pinget 2-4 V/cm kohta. Fragmendide suuruse määramiseks kasutati markerit MIX5, mis on valmistatud üldise ja mikroobibiokeemia laboris. Lahutunud DNA visualiseeriti 305 nm juures (Uvipro Gold) kasutades 100% lambi võimsust ja tulemused jäädvustati Uvi Pro v12.4 tarkvara abil.

### 2.2.3.3 Lineaarse DNA fragmendi transformatsioon Li-atsetaat meetodil

Transformatsiooniks kasutati *S. cerevisiae* tüve W303 $\alpha$  ja W303a/ $\alpha$ . Pärmirakke kasvatati YPG söötmes 30 °C loksutil umbes OD<sub>600</sub> 0,4-0,5. Arvestati umbes 10ml kultuuri ühe transformatsiooni kohta. Seejärel tsentrifugeeriti rakud 5 min 3200 p/min Hettich Universal 32R (rootor 1617 swing out) tsentrifugeeriga põhja. Rakkudelt eemaldati sööde ja sadet pesti 20ml autoklaavitud MQ-H<sub>2</sub>O-ga ning tehti vortex. Seejärel tsentrifugeeriti rakke uuesti 5 min 3200 p/min ning eemaldati supernatant. Järgnevalt võeti rakud üles 1 ml 1x 0,1M LiOAc/ T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> pH 7,5 tsentrifugeeriti 3500 p/min Eppendorf Mini Spin (rootor F-45-12-11). Supernatant eemaldati ja rakud resuspendeeriti 100  $\mu$ l-s 0,1M LiOAc/ T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>-s ning inkubeeriti rakukesta

permeabiliseerimiseks 20 min 30 °C juures, aeg-ajalt loksutades. Seejärel lisati 20 µl carrier (lõhe sperma) DNA-d (10 µg/µl), mida oli eelnevalt denatureeritud 5 min 95 °C juures ja 5 min jääl hoitud ning 4 µl PCR fragmenti. Tehti segule nõrk vortex ja siis inkubeeriti 20 min 30 °C juures, järgnevalt lisati 300 µl 40% PEG 4000; 0,1M LiOAc; 10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA lahust. Tehti vortex ning inkubeeriti 30 °C juures 30 minutit. Seejärel lisati 35 µl 100% DMSO-d ja tehti kuumašokk 10 min 42 °C. Pärast seda tsentrifugeeriti rakke 2 min 5000 p/min (Eppendorf Mini Spin; rootor F45 12-11) ja eemaldati supernatant. Selleks, et eemaldada võimalikult palju supernatanti, teostati tsentrifugeerimist kaks korda. Rakud resuspendeeriti 3 ml YPD vedelas söötmes ja pandi loksutisse 25 °C juures ööks kasvama. Järgmine päev tsentrifugeeriti rakud põhja 2 min 5000 p/min (Eppendorf Mini Spin; rootor F45 12-11) ja eemaldati suur osa supernatandist. Rakud resuspendeeriti supernatandi jäägis ja külvati YPD ja YPG tassidele, kuhu selektsiooniks oli lisatud antibiootikum G418 kontsentratsiooniga 0,3 µg/ml.

#### **2.2.3.4 Tetraadide analüüs**

Eelnevalt YPD või YPG tassidel kasvanud *S. cerevisiae* W303a/*abf2* Δ/*ABF2* diploidseid rakke inkubeeriti 3 päeva 30°C juures sporulatsioonisöötmes (100mM K-atsetaat; 0,025 mg/ml His; 0,025 mg/ml Trp; 0,0125 mg/ml Ura; 0,0625 mg/ml Leu; 0,005 mg/ml Ade). Seejärel tsentrifugeeriti 500 µl rakususpensiooni 1 minut 13 400 p/min. Siis eemaldati supernatant ja spoorid resuspendeeriti 50 µl-s zümolaasi lahuses (0,5 mg/ml Zymolase 20T, 1M sorbitool). Spore inkubeeriti 10 min 30°C juures, seejärel asetati jääle ja lisati aeglaselt 800 µl MQ-H<sub>2</sub>O. YPD tardsöötmega Petri tassile tilgutati 10 µl rakususpensiooni ja lasti sellel "pisarana" voolata tassi teise serva, mööda selleks ettenähtud sektorit. Edasi jätkati tetraadide laialiajamist Singer MSM mikroskoobi abil. Saadud kolooniaid tempeldati YPD-st YPG-le ja vastupidi, kuhu oli või ei olnud lisatud G418, et jälgida fenotüüpi.

#### **2.2.3.5 W303a/*abf2* Δ/*ABF2* fenotüübi analüüs**

W303a/*abf2* Δ/*ABF2* diploidide fenotüüpi analüüsiti tetraadide analüüsi töö raames, haploide analüüsiti eraldi, teostades sektorkülve YPG + G418 ja YPD + G418 söötmetele, jälgiti kasvuintensiivsust ja roosakate kolooniate tekkimist, mis viitab respiratoorse funktsiooni säilimisele. Edaspidiseks tööks valiti diploidi sporulatsioonist saadud haploid W303 *abf2* Δ, spoor2. Süvendatult analüüsiti respiratoorse funktsiooni kadumise fenotüüpi järgmise katsega. W303 *abf2* Δ, spoor2 ja W303a (wt) külvati 2 ml YPG vedelasse söötmesse

ja pandi loksutisse 30 °C ööks kasvama, kuni OD<sub>600</sub> tõusis väärtuseni 0,6-0,8. Järgmisel päeval tehti lahjendus YPD-sse OD<sub>600</sub> tiheduseni 0,1 ja võeti sellest 1 ml proov pärmi kultuuri, tihedustabelite järgi vaadati proovi kontsentratsiooni rakke/ml ja tehti täiendav lahjendus nii, et külvata tassile umbes 300 rakku, sama hulk rakke külvati paralleelselt YPG ja YPD tassidele neljas korduses. Protseduuri korrati veel kolme pooldumise järel tihedustel 0,2; 0,4; 0,8. Tasse hoiti 2-3 päeva termostaadis 30 °C juures ja seejärel loendati üleskasvanud kolooniaid. Tulemused analüüsiti Microsoft Exel-iga.

#### **2.2.4 2D mtDNA analüüs**

Selleks et võrrelda mtDNA-d mutandis ja metsiktüüpi pärmis, kasutati kahedimensionaalset geelelektroforeesi, mis lahutab DNA-d nii suuruse, kui ka kuju alusel. ABF2 deletsiooni mõju analüüsiti võrrelduna mitokondriaalset DNA-d wt W303 ja IRC3 deletsioonimutandiga. Meie laboris on analüüsitud IRC3 deletsiooniga tüvi tekitab nagu ABF2 deletsioon sarnase respiratoorse võimekuse kadumise fermenteeritaval süsinikuallikal kasvatades.

##### **2.2.4.1 Pärmis mitokondriaalse DNA eraldamine**

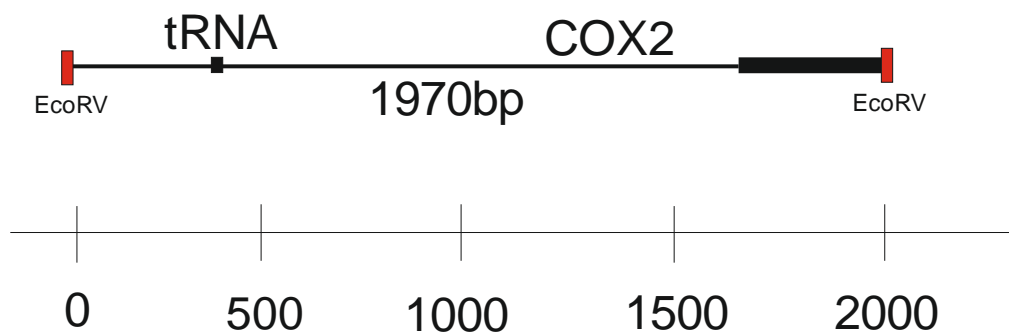
Mitokondrite puhastamiseks kasvatati loksutil 30 °C-l 0,5 l vedelas YPG söötmes W303α(wt) OD<sub>600</sub> 1,0, 0,5 l vedelas YPG söötmes W303α *irc3Δ*, spoor32 OD<sub>600</sub> 0,6 ja 2l vedelas YPG-s W303 *abf2 Δ*, spoor2 OD<sub>600</sub> 0,5. Tsentrifugiti (Sornwall RC5B plus, GS3) rakud põhja 10 min, 6000 p/min, 4°C ja eemaldati supernatant. Rakusadet pesti kokku 50 ml MQ-H<sub>2</sub>O veega, korjati kolme 50 ml Falcon katseklaasi, ning tsentrifugiti 5 min, 3200 p/min Hettich Universal 32R (rootor 1617 swing out) toatemperatuuril. Supernatant valati ära ja sade pesti 1,2 M sorbitooli lahusega, tsentrifugiti 5 min, 3200 p/min Hettich Universal 32R (rootor 1617 swing out) toatemperatuuril. 4,4 g, 1,57 g ja 2,42 g rakusadet, mis suspendeeriti üles soojas lahuses (1,2 M sorbitool, 20 mM KPi pH 7,5) arvestades 1ml lahust iga 0,15g rakkude kohta. Lisati 8mg zümolaasi (Zymolase 20T) 0,15g rakkude kohta. Inkubeeriti 30 °C loksutil, 100 p/min, 30 min. Jahutati rakud jääl ja tsentrifugiti 5 min, 3200 p/min Hettich Universal 32R (rootor 1617 swing out) 4 °C, seejärel eemaldati supernatant. Sferoblastid lahustati üles homogeniseerimispuhvis (10mM Tris-HCl pH7,5; 1mM EDTA; 0,6M sorbitool; 0,1% BSA; 1mM PMSF) ja lõhuti Dounce homogenisaatoris tehes 18 tõmmet. Tsentrifugiti 5 min, 3200 p/min Hettich Universal 32R (rootor 1617 swing out) 4 °C ja supernatant valati uude tuubi. Mitokondrite sadestamiseks tsentrifugiti rakulüsaat 10 min, 9000 p/min, 4 °C Hettich 1620A fikseeritud nurgaga rootoris. Mitokondrite sade lahustati üles 10ml homogeniseerimispuhvis

ilma PMSF-i ja BSA-ta (10mM Tris-HCl pH7,5; 1mM EDTA; 0,6M sorbitool) ja tsentrifuugiti samuti põhja. Järgnevalt lahustati mitokondrite sade üles 2ml lüüsi puhvris (75mM NaCl; 50mM EDTA 1% SDS; 0,5mg/ml proteinaas K). Inkubeeriti 37 °C juures 30 minutit ja siis lahjendati 1 ruumala T10E1-ga (100mM Tris-HCl pH7,5; 10mM EDTA) ja lisati 1 ruumala fenool-kloroformi (pH 7,5). Segati proove käsitsi 5 minutit ja seejärel tsentrifuugiti 3 min, 3200 p/min Hettich Universal 32R (rootor 1617 swing out) toatemperatuuril. Ülemine faas kanti üle uude tuubi. Fenool-kloroformi lisamisest alates korrati antud protseduuri veel 3 korda ja seejärel lisati naatriumatsetaati (lõppkontsentratsioonini 0,3 M, pH 7) ja 2,5 ruumala 96% etanooli. Lahuseid segati käsitsi ja hoiti -20 °C juures 15 minutit. Proove tsentrifuugiti järgnevalt 15 min, 4500 p/min Hettich Universal 32R (rootor 1617 swing out) ja eemaldati supernatant. Sadet pesti 5 ml 80% etanooliga, tsentrifuugiti samadel tingimustel ja lasti pärast supernatandi eemaldamist kuivada. DNA sade lahustati järgnevalt: W303 $\alpha$ (wt) 200  $\mu$ l T<sub>10</sub>E<sub>0,1</sub>-s(100mM Tris-HCl pH7,5; 1mM EDTA); W303 $\alpha$  *irc3* $\Delta$ , *spoor32* 100  $\mu$ l T<sub>10</sub>E<sub>0,1</sub>-s ja W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* 200  $\mu$ l T<sub>10</sub>E<sub>0,1</sub>-s; lahuseid jagati 20  $\mu$ l osadeks ja säilitati -20 °C juures.

#### **2.2.4.2 DNA restriksioon ja kvantitatiivne Southern-blot**

Selleks et edaspidist tööd läbi viia oli vaja kvantiteerida palju mtDNA-d tegelikult on eraldatud preparaates, sest proovis sisaldub ka RNAd, sellel eesmärgil tehti poolkvantitatiivne Southern-blot. Töö alguses restrikteeriti eraldatud pärmi mtDNA W303 $\alpha$ (wt), W303 $\alpha$  *irc3* $\Delta$ , *spoor32* ja W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* Eco32I-ga (Thermo Scientific), võttes restriksiooniks erinevaid mtDNA proovi ruumalaid. Restriksiooni käigus tekkiv fragment COX2 geeni piirkonnast (Joonis 9) detekteeriti radioaktiivse proovi abil. Restriksioon tehti 25  $\mu$ l-s ja viidi läbi vastavalt Thermo Scientific firma tootja protokollile. Restriksioon toimus 37°C termostaadis 2 tundi. Lõigatud proovidele lisati enne geelile kandmist 4  $\mu$ l TAE 6X laadimispuhvrit (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 50% glütserool; 0,25% broomfenoolsinine) ning lahutati fragmendid 0,8% TBE (90 mM Tris-boraat; 2 mM EDTA; pH 8) agarosgeelil, kuhu oli lisatud 7,5  $\mu$ l EtBr 75  $\mu$ g/ml. Fragmendide suuruse määramiseks kasutati markerit MIX5. Geelelektroforees viidi läbi pingel 3 V/cm umbes 6 tundi. Peale elektroforeesi hoiti geeli 10 min aluselises ülekandepuhvris (0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl), mille järel geelis lahutunud DNA kanti üle positiivselt laetud nailonfiltrile (Appllichem), kasutades Southern blot'i protseduuri. Ülekandeks kasutati vanni, kuhu sisse oli valatud aluseline ülekandepuhver, vanni oli

servadega uputatud kolmekordne filtripaber, mille peal asusid geel, nailonfilter, kaitsev filtripaber ja viimasena - paks kiht paberkätterätikuid koos raskusega. Ülekanne toimus üleöö kapillaarjõu põhimõttel. Selle käigus jääb DNA geeli peal asuvale nailonfiltrile külge. Järgmine päev eemaldati filter, neutraliseeriti 10 min Sol B-s (1,5 M NaCl; 1M Tris-HCl pH 7,4). Nailonfilter pre-hübridiseeriti hübridiseerimistorus 1 tund 65 °C juures 30 ml Church puhvriga (0,5% BSA; 1 mM EDTA; 0,5 M NaHPO<sub>4</sub> pH 7,5; 7% SDS). Hübridiseerimiseks kasutati 20 ml Church puhvrit kuhu oli lisatud radioaktiivne PCR-iga (peatükk 2.2.4.4) tehtud COX2 piirkonna denatureeritud DNA proov. Denatureerimiseks kasutati 5 min kuumutamist 95 °C juures ja järgnevat jahutamist jääl. Proove hübridiseeriti üleöö ja seejärel tehti üks kiire loputus Church pesupuhvriga (1mM EDTA pH 8; 40 mM NaHPO<sub>4</sub> pH 7,5; 1% SDS) ja veel kaks 15 min pesu sama lahusega otse hübridiseerimistorus. Pestud nailonfilter kuivatati, kuni ta oli veel niiske ja pakiti kile sisse. Seejärel valmistati ette (valgustati 15 min) ekraan (Amersham Biosciences Storage Phosphor Screen), mida siis kasutati proovide radioaktiivse signaali detekteerimiseks. Üleöö eksponeeritud ekraan skaneeriti Typhoon TRIO Phosphoimager masinaga. mtDNA hulga kvantiteerimiseks kasutati ImageQuant TL programmi, mis võimaldas analüüsida restriктаasidega lõikunud fragmentide signaali intensiivsusi. Microsoft Exeli abil arvutati erinevate proovide signaalide suhete alusel, kui suuri ruumalaid mtDNA proove peab kasutama kahedimensionaalsel geelelektroforeesil, et signaalid oleksid selged ja omavahel võrreldavad.



Joonis 9: Tüvede W303 $\alpha$ (wt), W303 $\alpha$  *irc3* $\Delta$ , *spoor32* ja W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* Eco32I-ga restriksiooni käigus tekkiv fragment COX2 geeni piirkonnast.

### 2.2.4.3 2D geelelektroforees

Teades kvantitatiivse Southern bloti alusel erinevate proovide mtDNA suhtelisi kontsentratsioone, sai valitud restriksiooniks 20  $\mu$ l W303 $\alpha$ (wt), 40  $\mu$ l W303 $\alpha$  *irc3* $\Delta$ , *spoor32* ja 100  $\mu$ l W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* mtDNA-d, restriksioon viidi läbi 120  $\mu$ l-s. Edaspidine töö



viidi läbi nagu eelmises peatükis (2.2.4.2) järgmiste väikeste erinevustega: suurte ruumalate tõttu peale restriksiooni läbiviimist lisati proovidesse EDTA-d (lõppkontsentratsioon 11 mM), tehti DNA-le fenool-kloroformi (pH 7,5) töötlus ja sadestati ümber 2,5 ruumalaga 96% etanooli abil (nagu töös 2.2.4.1), DNA võeti üles 30 µl-s MQ-H<sub>2</sub>O-s. Esimese dimensiooni geelina kasutati 0,5% TBE (90 mM Tris-boraat; 2 mM EDTA; pH 8) agarosgeeli, kuhu ei lisatud EtBr; geeli jooksutati pingel 1 V/cm 17 tundi. Kui geel oli jooksnud, lõigati lahutunud mtDNA sirgete ribadena välja, loputati 100ml-s TBE-s, kuhu oli lisatud 6 µl EtBr 60 µg/ml ja paigutati ribad 1,2% TBE (90 mM Tris-boraat; 2 mM EDTA; pH 8) agarosgeelidesse, kuhu samuti oli lisatud 6 µl EtBr iga 100ml geeli kohta (60 µg/ml), iga proovi jaoks eraldi geel. Sulatati ribad hoolega agarososi, et vältida mulle. Uued geelid jooksutati ribadega risti asuvas elektriväljas külmas (4 °C) pingel 6 V/cm täpselt 6 tundi. Valminud geelid pildistati Uvipro Gold kasutades ja tulemused jäädvustati Uvi Pro v12.4 tarkvara abil. Edasi tehti Southern-blot ja hübriidiseerimisi prooviga täpselt nagu peatükis 2.2.4.2.

#### **2.2.4.4 Radioaktiivse valmistamine PCR meetodiga**

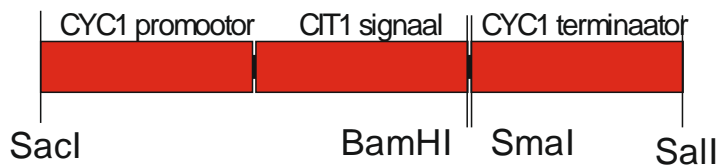
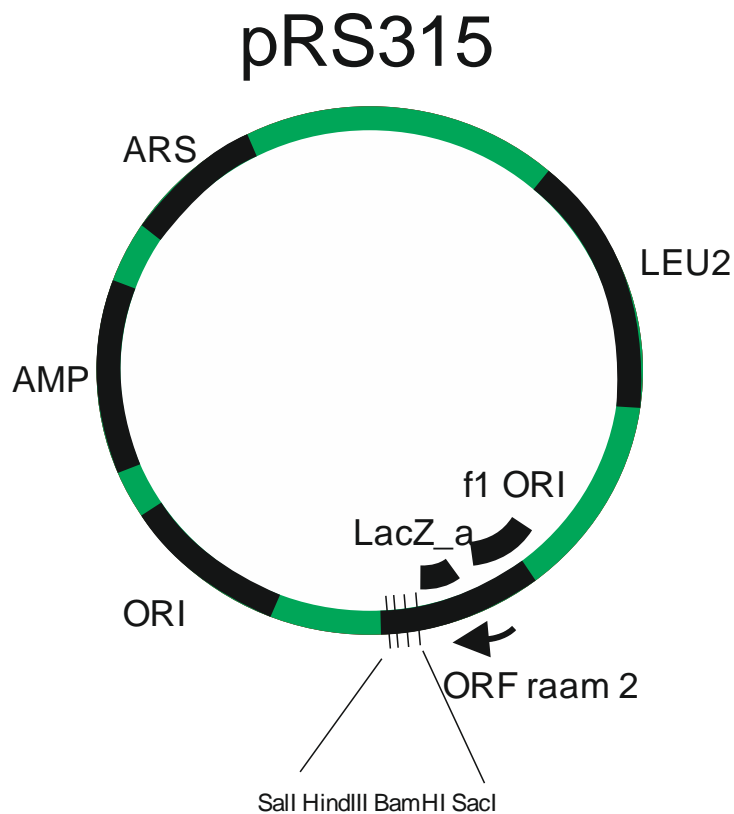
Hübriidiseerimiseks vajaliku radioaktiivse proovi sünteesimiseks kasutati PCR meetodit. Selleks segati jääl PCR segu mis sisaldas PCR puhvrit (75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1% Tween 20), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP -dCTP, 9 pmol α<sup>32</sup>P-dCTP, 10 pmol kumbagi praimerit, 100 ng matriits-DNA-d (COX2 piirkonnast DNA fragment) ja 2,5 U Taq polümeraasi. Viimasena lisati kaitseekraani taga radioaktiivse märgisega nukleotiid. Valmis segu toimetati PCR-i masinasse tinakonteineris jää peal. PCR-i tsüklil koosnes järgmistest etappidest: esmane denaturatsioon (1 minut) 95 °C juures, denaturatsioon (30 sekundit) 95 °C juures, praimerite seondumine (30 sekundit) 53 °C juures, DNA süntees (30 sekundit) 72 °C juures ja lõplik elongatsioon samal temperatuuril (1 minut). Esimest ja viimast etappi viidi läbi üks kord, kolme keskmist korrati aga 25 korda. Valminud proovi toimetati kõikide ohtusenõuetega tagasi kaitseekraani taha ja lahjendati 224 µl-ni lahuses, mis sisaldas 80mM Tris-HCl pH7,5, 8mM EDTA, 270 mM naatriumatsetaat ja 0,36 mg/ml dekstraani. Seejärel lisati 80 µl fenool-kloroformi (pH 7,5). Segati proovi vorteksil ja tsentrifuugiti 2 min, 14000 p/min (Eppendorf tsentrifuug 5415 C) toatemperatuuril. Ülemine faas kanti uude tuubi ja lisati 550 µl 96% etanooli. Lahused segati vorteksil ja hoiti -20 °C juures 15 minutit. Järgnevalt tsentrifuugiti proovi 5 min 14000 p/min (Eppendorf tsentrifuug 5415 C) ja eemaldati supernatant. Sadet pesti 100 µl 80% etanooliga 5 min, tsentrifuugiti 1 min, 14000 p/min (Eppendorf tsentrifuug 5415 C) eemaldati supernatant ja võrreldi

radioaktiivse signaali tugevust kahes supernatandis ja sademes Geigeri sondiga. Sade võeti üles 100 µl T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>N<sub>100</sub> puhvrts (100mM NaCl; 10mM Tris-HCl pH7,5; 1mM EDTA) ja sellisel kujul, peale denaturatsiooni, kasutati hübriidiseerimisel.

## **2.2.5 pRS315 ekspressioonikonstruktid valmistamine**

### **2.2.5.1 Promootori, signaali ja terminaatori viimine pRS315/pRS316 konstrukti**

CYC1 geeni promootor ja terminaator ning CIT1 mitokondri impordisignaali viidi pRS315 ja pRS316 vektoritesse kassetina, mis saadi bakteriaalsest lähtekonstruktist (Joonis 10). Selleks lõigati DNA järjestusi (nii vahekonstrukti plasmidi, kui ka mõlemat vektorit) restriksiooniliste endonukleaasidega SacI ja Sall 30 µl-s, vastavalt tootja protokollile (Thermo Scientific). Restriksioonipuhvrite sobimatuse pärast teostati restriksioonid eraldi ja vahepeal sadestati DNA ümber koos fenooltötlusega (nagu 2.2.4.4 töös). Lõigatud fragmentid isoleeriti 0,7% TAE agarosgeelli ja puhastati FavorGen kittga tootja protokollile järgi. Järgnevalt segati kokku kaks 10 µl-st ligeerimisegu, mis sisaldasid T4 DNA ligaasi puhvrit (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 25 µg/ml veise seerumalbumiini), 44 ng pRS315 või pRS316, 13 ng promootor-signaali-terminaator fragmenti, 1 U T4 DNA ligaasi. Reaktsioon kestis 30 min toatemperatuuril ja üleöö 4 °C juures. Ligeerimisprodukti kasutati kompetentsete *E. Coli* rakkude transformatsiooniks (2.2.5.3). Transformeerunud bakterirakud olid võimelised kasvama ampitsiliini sisaldavatel (100 µg/ml) LB selektiivtassidel. Mõlema vektori tassilt valiti 8 kolooniat ja tehti nendega analüütiline koloonia PCR, sarnaselt pärmi koloonia PCR-ile (2.2.3.1) kuid ilma rakke eelnevalt mikrolaineahjus kuumutamata. PCR-il kasutati praimereid CYC1 F SacI ja CYC1 TR Sall, tsükkel koosnes järgmistest etappidest: esmane denaturatsioon (5 minutit) 95 °C juures, denaturatsioon (30 sekundit) 95 °C juures, praimerite seondumine (30 sekundit) 54 °C juures, DNA süntees (50 sekundit) 72 °C juures ja lõplik elongatsioon samal temperatuuril (2 minutit). Esimest ja viimast etappi viidi läbi üks kord, kolme keskmi korral aga 30 korda. Reaktsioon viidi läbi 2,5 U Taq DNA polümeraasiga. Leitud õigeid konstrukte sisaldavad kolooniad kasvatati 3 ml-s LB + AMP(100 µg/ml) vedelsöötmes ja eraldati nendest plasmiidid (töö 2.2.5.4). Saadud konstrukte kasutati järgnevalt Gef1 ja Abf2 kloneerimise töös.

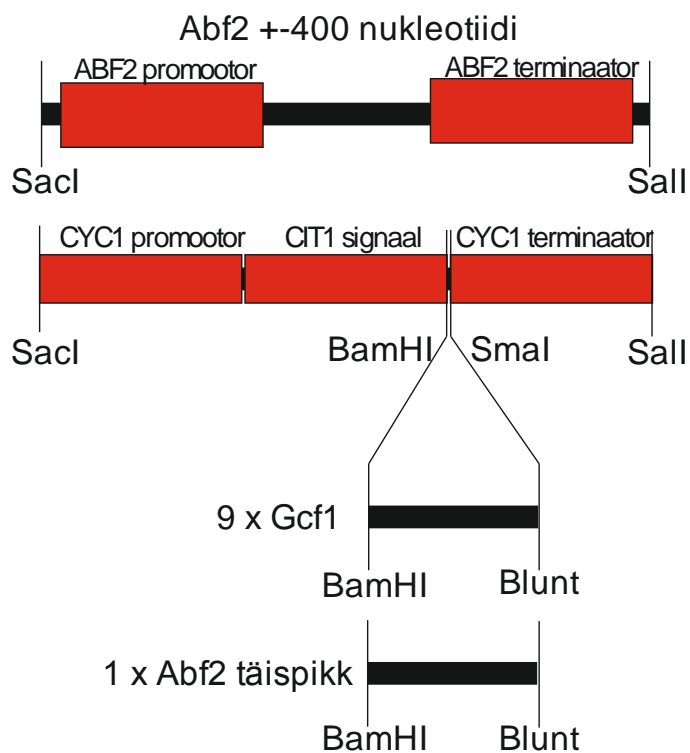


Joonis 10: pRS315 pärmi süstikvektori skeem ja olulised restriksioonisaidid. CYC1 geeni promootor ja terminaator ning CIT1 mitokondri impordisignaali koos oluliste restriksioonisaitidega.

### 2.2.5.2 *Gcf1* ja selle fragmentide klonimine konstrukti

Kasutades 11 erinevat praimeritepaari ja 2,5 U Pfu DNA polümeraasi paljundati PCR-iga 30 µl segus täispikk *Gcf1* järjestus ilma signaalita, 8 erineva pikkusega *Gcf1* fragmenti, täispikk *Abf2* ORF ja *Abf2* koos sellele eelnevate ja järgnevate 400 nukleotiidiga (Joonis 11). 3 µl igast proovist analüüsiti 0,8% TAE agarosgeelil ja seejärel ülejäänud osa puhastati FavorGen kittiga tootja protokoll järgi, et saada lahti allesjäänud praimeritest. Eelmises töös (2.2.5.1) tehtud pRS315 konstrukti lõigati alguses 1 tund *SmaI*-ga 20 µl-s ühekordses Tango puhvril ja siis veel 1 tund *BamHI*-ga 30 µl-s, kahekordses Tango puhvril, vastavalt tootja protokollile (Thermo Scientific). Samal ajal lõigati kõik selles töös puhastatud PCR proovid, peale *Abf2* +-400 nukleotiidiga fragmenti, *BamHI* restriksiooniliste endonukleasiga 1 tund 30 µl-s,

vastavalt tootja protokollile (Thermo Scientific). Abf2 +-400 nukleotiidi fragmenti lõigati nagu eelmises töös (2.2.5.1) ja ligeeriti SacI, Sall avatud pRS315 vektorisse (samuti kui osas 2.2.5.1). BamHI lõigatud fragmendidega segati kokku 10 µl ligeerimissegu, mis sisaldas T4 DNA ligaasi puhvrit (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 125 µg/ml veise seerumalbumiin), 5% PEG 4000, 1750 ng pRS315, umbes 272 ng geeni fragmenti, 1 U T4 DNA ligaasi. Reaktsioon kestis 30 min toatemperatuuril ja üleöö 4 °C juures. Ligeerimisprodukti kasutati kompetentsete *E. Coli* rakkude transformatsiooniks (2.2.5.3). Transformeerunud bakterirakud olid võimelised kasvama ampitsiliini sisaldavatel (100 µg/ml) LB selektiivtassidel. Iga tassi pealt valiti 6 kolooniat ja tehti nendega analüütiline koloonia PCR, kasutades polülinkeri universaalseid primereid USP ja RSP. PCR produktid analüüsiti 0,7% TAE agarosgeelil koos MIX5 markeriga. Õige pikkusega fragmenti sisaldavaid kolooniaid kasvatati 3 ml-s LB + AMP(100 µg/ml) vedelsöötmes ja eraldati nendest plasmiidne DNA (töö 2.2.5.4).



Joonis 11: CYC1 geeni promootor ja terminaator ning CIT1 mitokondri impordisignaali koos eksperimendis kasutatud restriktioonisaitidega. Gcf1-e ja Abf2-e fragmendid koos eksperimendis kasutatud restriktioonisaitidega.

### **2.2.5.3 *E. coli* rakkude transformatsioon**

Eelnevates töödes valminud konstruktidel paljundamiseks, kasutati nende transformeerimist kompetentsetesse *E. coli* DH5 $\alpha$  rakkudesse, sellele järgneva rakkumassi paljundamisega ja plasmidi väljapuhastamisega. Selleks võeti 50  $\mu$ l kompetentseid DH5 $\alpha$  rakke, lisati 3  $\mu$ l ligeerimisseguga ja hoiti 30 minutit jääl. Seejärel viidi läbi 2 min kuumašokk 37 °C juures ja lisati 700  $\mu$ l LB vedelsöödet, millesse oli lisatud 40  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (lõppkontsentratsioonini 51 mM) ja 40  $\mu$ l glükoosi (lõppkontsentratsioonini 114 mM) segati käsitsi ning hoiti 1 tund temperatuuril 37 °C. Rakud suspendeeriti pipettiga, ning 200  $\mu$ l lahust külvati ampitsiliini sisaldavale (100  $\mu$ g/ml) LB selektiivtassile, inkubeeriti 37 °C juures üleöö.

### **2.2.5.4 Plasmidi eraldamine *E. coli*-st**

Koloonia PCR-iga kontrollitud, õige pikkusega fragmenti sisaldavaid kolooniaid (2.2.5.2) kasvatati 3 ml-s LB-s + AMP(100  $\mu$ g/ml) üleöö loksutis (180 rpm) temperatuuril 37 °C. Järgmisel päeval tsentrifuugiti rakud põhja 1 min 13400 p/min (Eppendorf Mini Spin; rootor F45 12-11) ning eemaldati supernatant. Rakud resuspendeeriti 100  $\mu$ l-s Sol I-s (50 mM glükoos; 25 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA, pH 8), tehti kerge vorteks. Lisati 200  $\mu$ l Sol II-te (0,2 M NaOH; 1% SDS), segati pöörates käsitsi 5 korda. Inkubeeriti lahust 5 minutit toatemperatuuril ja lisati 100  $\mu$ l jääkülma Sol III-e (3 M kaaliumatsetaat; 2 M äädikhape). Tehti vorteks, kuni sade purunes väikesteks helbeteks ja seejärel hoiti 30 min jääl, tsentrifuugiti 5 minutit toatemperatuuril 13400 p/min (Eppendorf Mini Spin; rootor F45 12-11). Supernatant kanti üle uude tuubi ja lisati sellele 0,6 ruumalat isopropanooli, tehti vorteks ja hoiti 5 minutit toatemperatuuril. Tsentrifuugiti 5 minutit toatemperatuuril 13400 p/min (Eppendorf Mini Spin; rootor F45 12-11) ning eemaldati taas supernatant. Sadet pesti 100  $\mu$ l 80% etanooliga ja tsentrifuugiti RPM min, eemaldati supernatant. Sade lahustati 100  $\mu$ l T<sub>10</sub>E<sub>0,1</sub>-s (100mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA), millesse oli eelnevalt lisatud RNAasA (lõppkontsentratsioonini 20  $\mu$ g/ml), inkubeeriti 30 minutit temperatuuril 55 °C. Sellel etapil peatati ajutiselt puhastamine ja hoiustati plasmiidipreparaadid -20 °C juures. Proovidele teostati restriksioonanalüüsi(2.2.5.5), ainult positiivseid proove puhastati edasi. Lisati 2  $\mu$ l 5M NaCl-di (lõppkontsentratsioonini 98 mM), 50  $\mu$ l fenool-kloroformi (pH 7,5). Segati vorteksil 1 minut ja seejärel tsentrifuugiti 3 min, 13400 p/min (Eppendorf Mini Spin; rootor F45 12-11), toatemperatuuril. Ülemine faas kanti uude tuubi. Fenool-kloroformist lisamisest

alates, korrati antud protseduuri veel üks kord ja seejärel lisati naatriumatsetaati (lõppkontsentratsioonini 0,3 M, pH 7) ja 2,5 ruumalat 96% etanooli. Lahused segati vorteksil ja hoiti 15 minutit toatemperatuuril. Järgnevalt tsentrifugeeriti 5 min 13400 p/min (Eppendorf Mini Spin; rootor F45 12-11) ja eemaldati supernatant. Sadet pesti 200 µl-ga 80% etanooliga, tsentrifugeeriti samadel tingimustel ja lasti pärast supernatandi eemaldamist kuivada. DNA sade lahustati 50-100 µl-s T10E0,1 (100mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA), ja säilitati -20 °C juures.

#### **2.2.5.5 Restriksioonanalüüs**

Gcf1 ja Abf2 konstruktsioonide korrektsuse kontrollimiseks kasutati restriksioonanalüüsi. Selleks lõigati enamuse konstruktsioonilise endonukleasiga Eco130I(StyI) vastavalt tootja protokollile (Thermo Scientific). Neid konstruktsioone, mis ei sisaldanud antud restriksiooni poolt arvatud järjestust või kus tekkis liiga lühike restriksioonifragment, lõigati BamHI ja HindIII-ga, samuti vastavalt tootja protokollile (Thermo Scientific). Tulemusi kontrolliti 0,8% TAE agarosgeelelektroforeesiga Eco130I(StyI) fragmendid või 1,2% TAE agarosgeelelektroforeesiga BamHI, HindIII fragmendid.

#### **2.2.5.6 Plasmiidide transformatsioon Li-atsetaat meetodil**

Transformatsiooniks kasutati *S. cerevisiae* tüve W303 *abf2* Δ, *spoor2* haploidi. Antud tüve kasvatati üleöö YPG söötmes 30 °C loksutil OD<sub>600</sub> 0,2-0,3. Arvestati umbes 10ml kultuuri ühe transformatsiooni kohta. Seejärel tsentrifugeeriti rakud 1 min 3700 p/min Hettich Universal 32R (rootor 1617 swing out) tsentrifugeeriga põhja. Rakkudel eemaldati sööde ja sadet pesti 20ml autoklaavitud MQ-H<sub>2</sub>O-ga ning tehti vortex. Seejärel tsentrifugeeriti rakke uuesti 1 min 3700 p/min ning eemaldati supernatant. Järgnevalt võeti rakud üles 4 ml 1x 0,1M LiOAc/T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> pH 7,5, jaotati laiali nelja 1,5 ml tuubi ja tsentrifugeeriti 1 min 3700 p/min Eppendorf Mini Spin (rootor F45 12-11). Supernatant eemaldati ja rakud resuspendeeriti 50 µl-s 0,1M LiOAc/T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>-s ning inkubeeriti 5 min 30 °C juures. Seejärel lisati 10 µl carrier (lõhe sperma) DNA-d (10 µg/µl), mida oli eelnevalt denatureeritud 5 min 95 °C juures ja 5 min jääl ning 4 µl konstrueeritud plasmidi. Selles töös transformeeriti ainult neli konstruktsiooni: Abf2 +-400 nukleotiidi; täispikk Abf2 CYC1 promootoriga ja terminaatoriga ning CIT1 signaaliga; täispikk Gcf1 CYC1 promootoriga ja terminaatoriga ning CIT1 signaaliga ja pRS315 tühivektori negatiivse kontrollina. Peale plasmidi lisamist tehti segule nõrk vortex ja inkubeeriti 10 min 30 °C juures, aeg-ajalt raputades. Peale selle lisati 300 µl (40% PEG 4000;

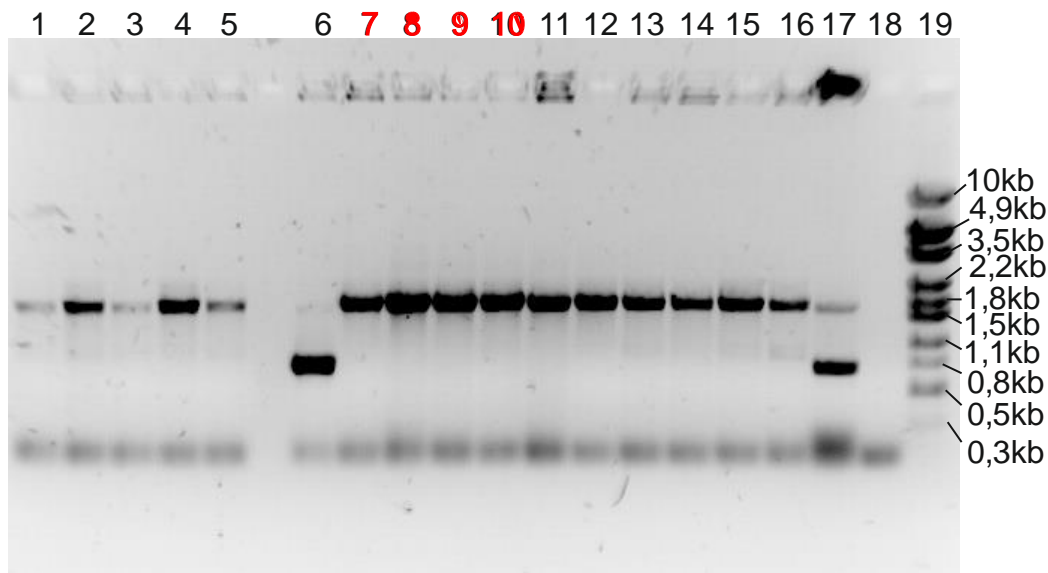
0,1M LiOAc; 10 mM Tris pH7,5; 1 mM EDTA) lahust. Tehti vortex ning inkubeeriti 30 °C juures 20 minutit. Seejärel tehti kuumašokk 10 min 42 °C. Pärast seda tsentrifuugiti rakke 1 min 3700 p/min (Eppendorf Mini Spin; rootor F45 12-11) ja eemaldati supernatant. Selleks, et eemaldada võimalikult palju supernatanti, teostati tsentrifuugimist kaks korda. Rakud resuspendeeriti 200 µl-s MQ-H<sub>2</sub>O-s ja 80 µl külvati glütserooliga -Leu minimaalsöötmega tassile, teised 80 µl aga glükoosiga -Leu minimaalsöötmega tassile.

## 2.3 Tulemused ja arutelu

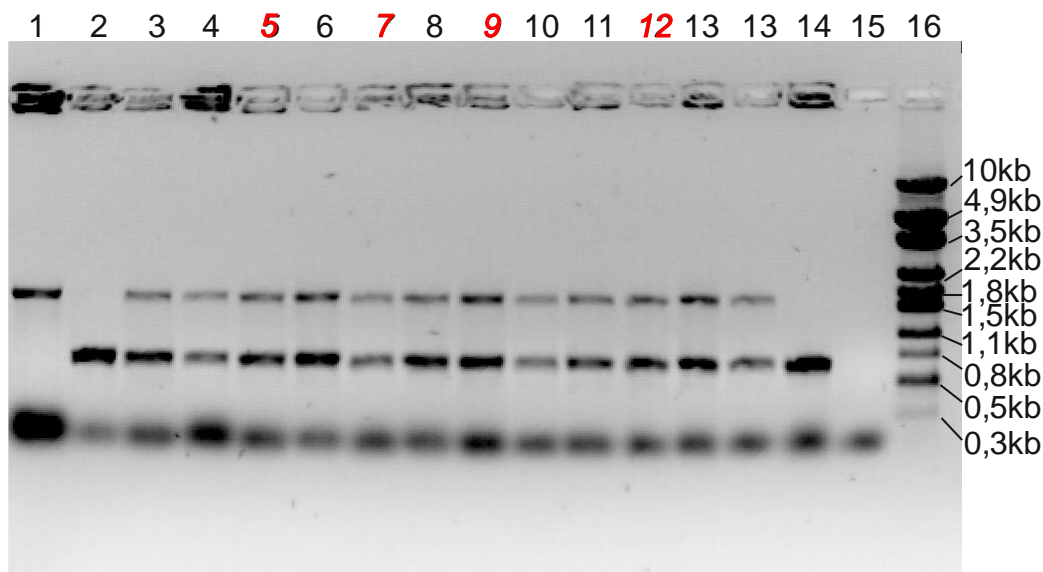
### 2.3.1 W303α *abf2* Δ ja W303α/α *abf2* Δ/ABF2 tüvede konstrueerimine

Gcf1 valgu domeenide funktsiooni uurimiseks ja tausttestsüsteemi püstitamiseks oli vaja konstrueerida tüved W303 *abf2* Δ ja W303α/α *abf2* Δ/ABF2. Selleks, et valmistada tüve, kus puudub ABF2 geen amplifitseerisin PCR-iga pFA6a kanMX6 plasmiidilt gentamütsiini resistentsuse geeni lisades sellele ABF2 homoloogilised järjestused, kasutades praimereid Abf2 up-kan ja Abf2 down-kan. Seejärel transformeeriti gentamütsiini resistentsuse geeni pärmi W303α ja W303α/α tüvedesse rakkudesse ning külvati rakud G418 antibiootikumi sisaldavatele YPG tassidele, et selekteerida antibiootikumi resistentsuse saanud respireerivaid kloone. Abf2 deletsioonitüved saadi pärmi natiivse homoloogilise rekombinatsioonisüsteemi kasutades, sest praimerid omasid 5' otsi, mis on homoloogilised ABF2 geeni piirkonnaga kromosoomil. Kolme päeva pärast sain G418 sisaldavatel YPG tassidel W303 *abf2* Δ ja W303α/α *abf2* Δ/ABF2 transformantide kolooniad, milles kontrollisin homoloogilise rekombinatsiooni edukust PCR-iga praimeritega *abf2* up forward ja *abf2* rev. down, mis on homoloogilised ABF2 geeni kõrval asuvate järjestustega ja mis amplifitseerivad 1,5 kb produkti eduka KanMX6 asenduse puhul ja 0,7 kb produkti intaktse ABF2 geenikoopia puhul. Joonisel 12 on kujutatud haploidse W303α tüve transformantide koloonia PCR-i analüüs. Valisin tassi pealt juhuslikult 16 kolooniad. Radadel 1 kuni 16 on *abf2* up forward ja *abf2* rev. down praimeritega tehtud koloonia PCR-i tulemused. Rajal 17 on positiivse kontrollina produkt, mille sain W303α/α *abf2* Δ/ABF2 koloonia PCR-i tulemusel. Rajal 18 on negatiivne kontroll, kus puudub amplifitseeritav DNA. Rajal 19 on MIX5 marker. Joonisel 13 on kujutatud PCR-i produktid, mis saadi diploidsete W303α/α *abf2* Δ/ABF2 transformantide koloonia PCR-i tulemusel praimeritega *abf2* up forward ja *abf2* rev. down. Radadel 1 kuni 15 on 15 juhuslikult tassi pealt väljavalitud kloonide *abf2* up forward ja *abf2* rev. down praimeritega tehtud koloonia PCR-i tulemused. Rajal 16 on negatiivne kontroll, milles

täielikult puudus PCR-iga paljundatav DNA. Rajal 17 on MIX5 marker. 1.5 kb suurune produkt vastab amplifikatsioonile, mis saadakse KanMX6 kasseti sisaldaval ABF2 lookusel. Seega kloonid, kus tekib 1,5kb suurune PCR produkt, sisaldavad KanMX6 kasseti ABF2 lookuses. Väiksemad, umbes 0,7kb suurused produktid vastavad ilma insertioonita ABF2 geenile. Joonisel 12 on näha, et kloonides 1 kuni 5 ja 7 kuni 16 on õnnestunud ABF2 geen väljavahetada KanMX6 kasseti vastu. Joonisel 13 on näha, et kloonides 2 kuni 13 on üks kahest ABF2 geenikoopiast väljavahetatud KanMX6 kasseti vastu. Teine ABF2 geenikoopia säilis natiivsel kujul. Rajal 1 asuval kloonil on mõlemad ABF2 geenikoopiad väljavahetatud KanMX6 kaseti vastu. Rajal 15 on negatiivne kontroll, milles puudus amplifitseeritav DNA. Kloonid W303 *abf2*  $\Delta$  7, 8, 9, 10 ja W303a/ $\alpha$  *abf2*  $\Delta$ /ABF2 5, 7, 9, 12 külmutasin vedelas lämmastikus säilitamiseks -80 °C juures.



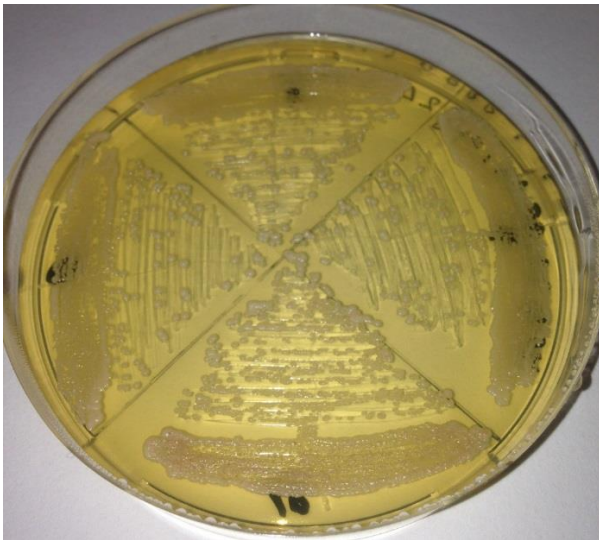
Joonis 12: ABF2 geeni asendus W303 $\alpha$  haploidis KanMX6 kassetiga.



Joonis 13: Abf2 geeni asendus W303a/ $\alpha$  diploidis KanMX6 kassetiga.



W303 $\alpha$  *abf2*  $\Delta$  tüve esmaseks lihtsamaks ja näitlikumaks fenotüüpi kontrolliks, külvati väljavalitud haploid tüved YPD söötmele (Joonis 14). Võrdluseks külvati samaaegselt teisele tassile ka W303 $\alpha$  metsiktüüpi tüvi (Joonis 15). W303 $\alpha$  tüvi sisaldab *ade2-1* mutatsiooni, seetõttu värvuvad respireerivad kolooniad punasteks. Võrreldes W303 $\alpha$  *Abf2* deletsiooniga ja metsiktüüpi W303 $\alpha$  tüvedepilte (Joonised 14 ja 15) on lihtne märgata, et tüvel W303 *abf2*  $\Delta$  on respireerimisega tekkinud probleemid, kuigi on märgata natuke roosa värvi tekkimist, see on oluliselt nõrgem, kui kontrolltassil.



Joonis 14: *Abf2* deletsiooniga W303 $\alpha$  haploidsed tüved YPD söötmel



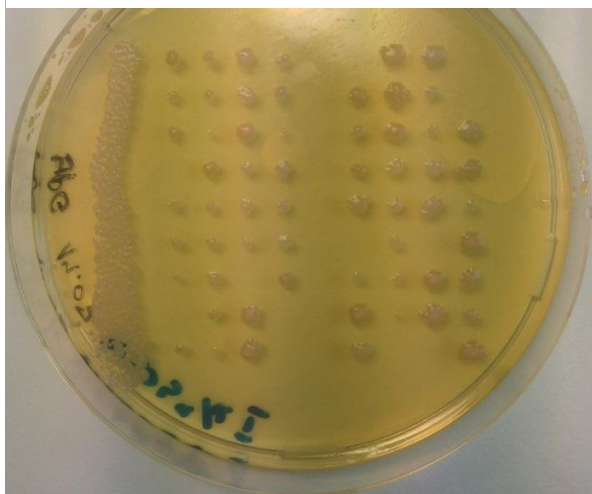
Joonis 15: Metsiktüüpi W303 $\alpha$  YPD söötmel

Enne YPD söötmele külvamist hoiti mutantseid tüvesid YPG söötmel, selleks et hoida ära rho- rakkude tekkimist, kus suurem osa mtDNA-st on kaotatud ja kasv mittefermenteeritaval meediumil on võimatu. Kasv fermenteeritaval söötmel ei sõltu pärmil *S. cerevisiae* aga mtDNA olemasolust. *Petite* kolooniate (väikeste valgete kolooniate tekkimine fermenteeritaval söötmel) tekkimise pagaripärmis on tuntud fenomen ka *ABF2* deletsiooni tagajärjena, aga seni ei ole täpset vastust miks ja kuidas see toimub. Stillmani rühma töös näidati, et *abf2*  $\Delta$  tüves, kasvul fermenteeritaval söötmel, mtDNA on ebastabiilne ja tekkivad rho- kolooniad. Kuigi pole selge, miks mtDNA on *abf2*  $\Delta$  tüves ebastabiilne, võib selle põhjuseks olla nukleoidi muutus suuremaks ja difuussemaks (Newman jt, 1996).

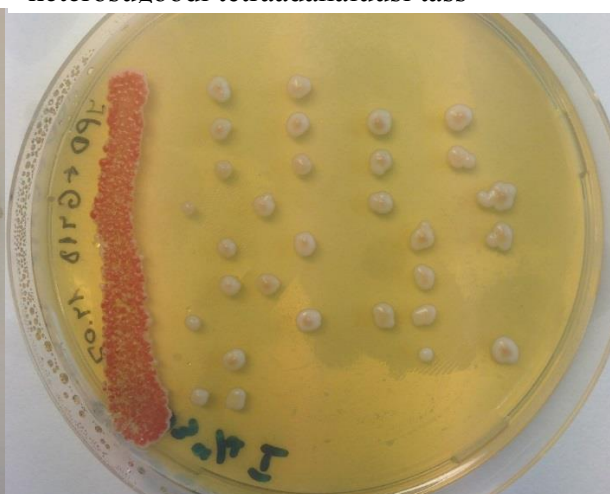
### 2.3.2 Tetraadide segregatsioon W303 *abf2* $\Delta$ tüvede konstrueerimiseks

W303a/ $\alpha$  transformeerimisel, millele järgneb pärmi sporuleerumine ja saadud spooride segregatsioon, on võrreldes otsese W303a transformatsiooniga madalam risk sekundaarsete kõrvalmutatsioonide saamiseks, sest sporuleeruvad rakud on võimelised edukalt läbima meioosi. Edaspidises töös sporuleerisin W303a/ $\alpha$  *abf2*  $\Delta$ /ABF2 klooni 9 (Joonisel 13, rada 9), mille genotüüp oli eelnevalt kontrollitud (Joonis 13). YPG tassil kasvanud koloonia suspendeeriti sporulatsioonisöötmes ja kasvatati kolm päeva, kuni suurem osa rakkudest oli sporuleerunud. Järgnevalt teostasin tetraadide segregatsioonise YPG tassil. Rakud olid kogu aeg kasvatatud YPG-l, et vältida rho- mutantide osakaalu tõusu kultuuris, segregatsioonil saadud kolooniad tempeldati ümber järgmistele söötmetele: YPD, YPD + G418, YPG ja YPG + G418 (Joonised 16-19). YPD-l kasvasid kõik W303a/ $\alpha$  *abf2*  $\Delta$ /ABF2 tetraadide segregatsioonil saadud kolooniad. Igast tetraadist sain kaks suuremat erepunast värvi kolooniat ja kaks väiksemat valget või kahvatu roosat värvi kolooniat. Mõlemal, nii YPD + G418, kui ka YPG + G418 tassil, kasvasid üles samad kolooniad ja need omakorda vastasid nendele, mis olid YPD tassil valged või kahvatu roosad. Sellest järeldub, et YPD tassi erepunased kolooniad on metsiktüüpi ABF2 alleeliga. Valged või kahvatu roosad kolooniad *abf2*  $\Delta$  alleeliga, sest metsiktüüpi ABF2 alleeliga rakud ei ole võimelised kasvama G418 juuresolekul ja *abf2*  $\Delta$  alleeliga rakkudel oli probleeme respiratoorse funktsiooni säilitamisega.

Pilt 16: YPG W303a/ $\alpha$  *abf2*  $\Delta$ /ABF2 heterosügooti tetraadanalüüsi tass



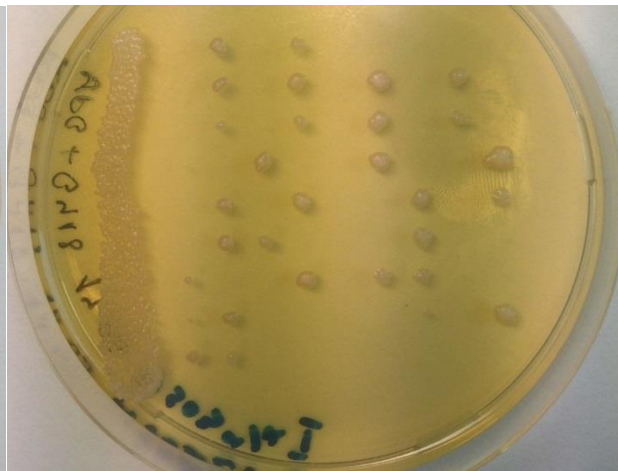
Pilt 17: YPD+G418 W303a/ $\alpha$  *abf2*  $\Delta$ /ABF2 heterosügooti tetraadanalüüsi tass



Pilt 18: YPD W303a/ $\alpha$  *abf2*  $\Delta$ /ABF2 heterosügoidi tetraadanalüüsi tass



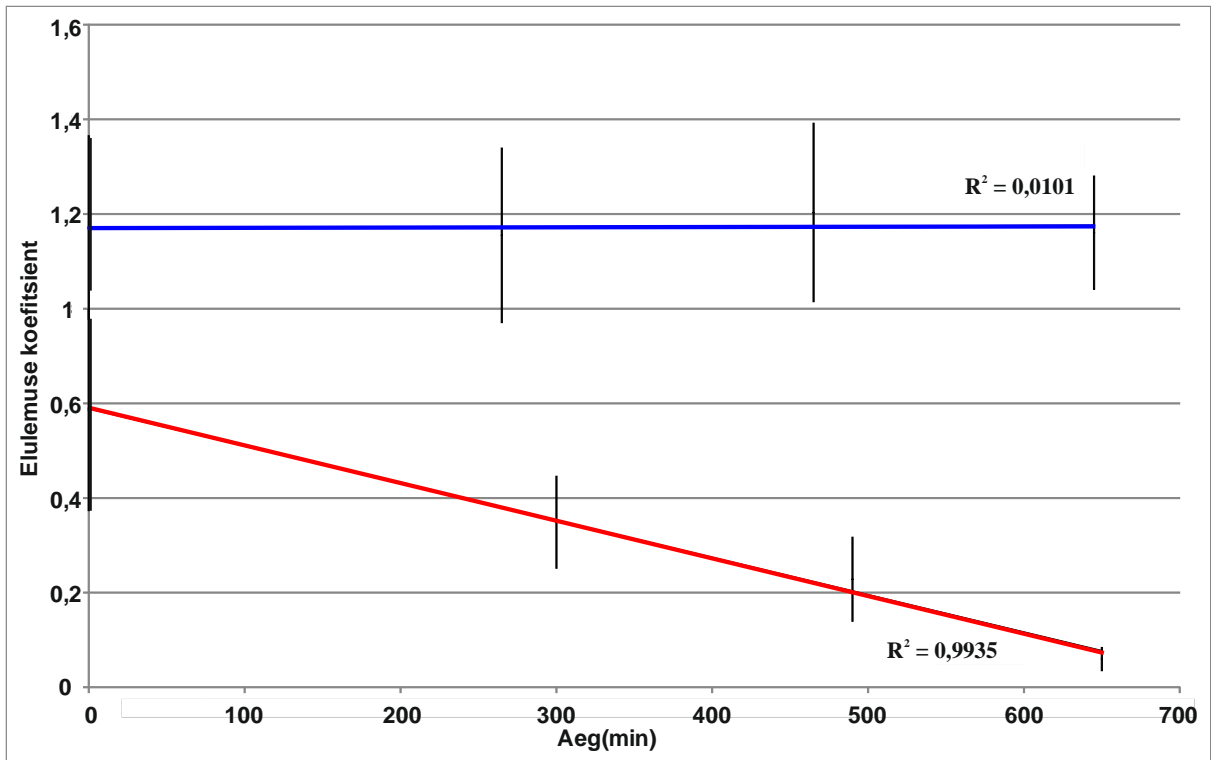
Pilt 19: YPG+G418 W303a/ $\alpha$  *abf2*  $\Delta$ /ABF2 heterosügoidi tetraadanalüüsi tass



Saadud tassidelt valisin neli kloonid *abf2*  $\Delta$  genotüübiga, mis külmutasin vedelas lämmastikus ja säilitasin  $-80$  °C juures. Hiljem tein külmutatud *abf2*  $\Delta$  kloonidele lisaks PCR kontrolli *abf2* up forward ja *abf2* rev. down praimeritega, nagu kirjeldatud peatükis 2.2.3.1. *abf2*  $\Delta$  *spoor2* oli edaspidi kasutatud kõikides katsetes.

### 2.3.3 Respiratoorse funktsiooni kadumise kineetika kvantitatiivne analüüs W303 *abf2* $\Delta$ , *spoor2* tüves

Selleks, et analüüsida kui kiiresti toimub respiratoorse funktsiooni kadumine W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* tüves glükoosil kasvatamise käigus, võrreldi W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* ja metsiktüüpi W303 $\alpha$  tüve järgmises katses. Kasvatati W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* ning kontroll W303 $\alpha$ (wt) üleöö vedelas YPG söötmes. Hommikul lahjendati rakud vedelasse YPD söötmesse ja kasvatati edasi. Vedelast YPD söötimest võeti proovid, mõõdeti optilist tihedust spektrofotomeetriga ( $OD_{600}$ ), lahjendati ja külvati 300 rakku paralleelselt YPG ja YPD tassidele neljas korduses (kirjeldatud peatükis 2.2.3.5). Kolooniad, mis tekkisid YPG ja YPD tassidel loendasin kolme päeva pärast ja andmete alusel leidsin YPG-l üleskasvanud kolooniade arvu ja YPD tassidel üleskasvanud kolooniade arvu suhte, ehk elulemuse koefitsiendi (Joonis 20 ja Lisa 8).



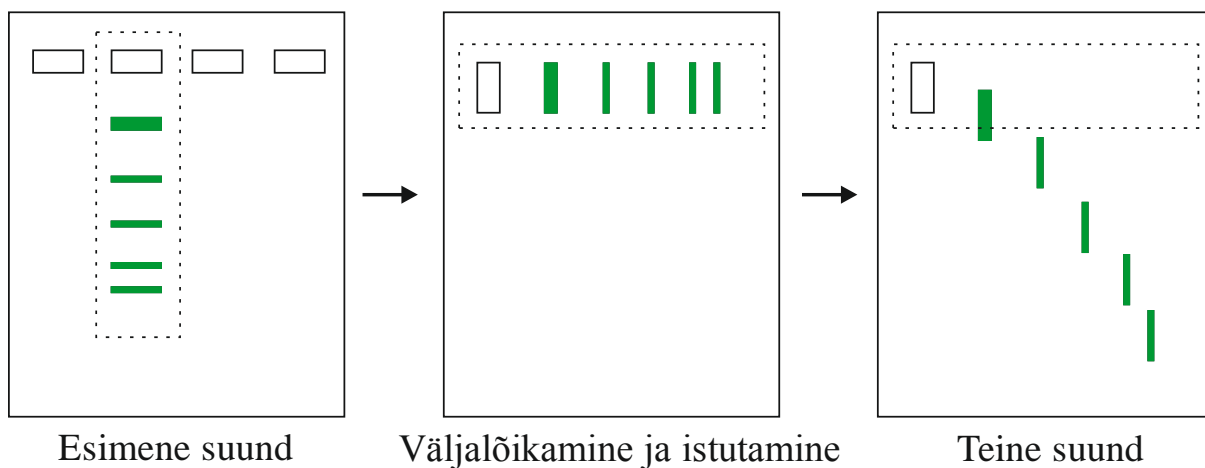
Joonis 20: *abf2* Δ mutatsiooniga (punane joon) ja W303a metsiktüüpi (sinine joon) pärmide elulemuse koefitsiendi muutus mittefermenteeritaval söötmel.

Joonisel 20 on näha, et W303a elulemise koefitsient ei sõltunud sellest, kui kaua rakud viibisid enne väljakülvi respireeritavas YPD söötmes. Samal ajal on graafikul (Joonis 20) selgelt näha, et mida kauem kasvas W303 *abf2* Δ, *spoor2* tüvi (punane joon) vedelas YPD söötmes enne YPG tassile tagasikülvamist, seda vähem kolooniaid kasvas üles glütseroolil. Nii näiteks vähenes 8 tunniga W303 *abf2* Δ tüve elumus 3 korda.

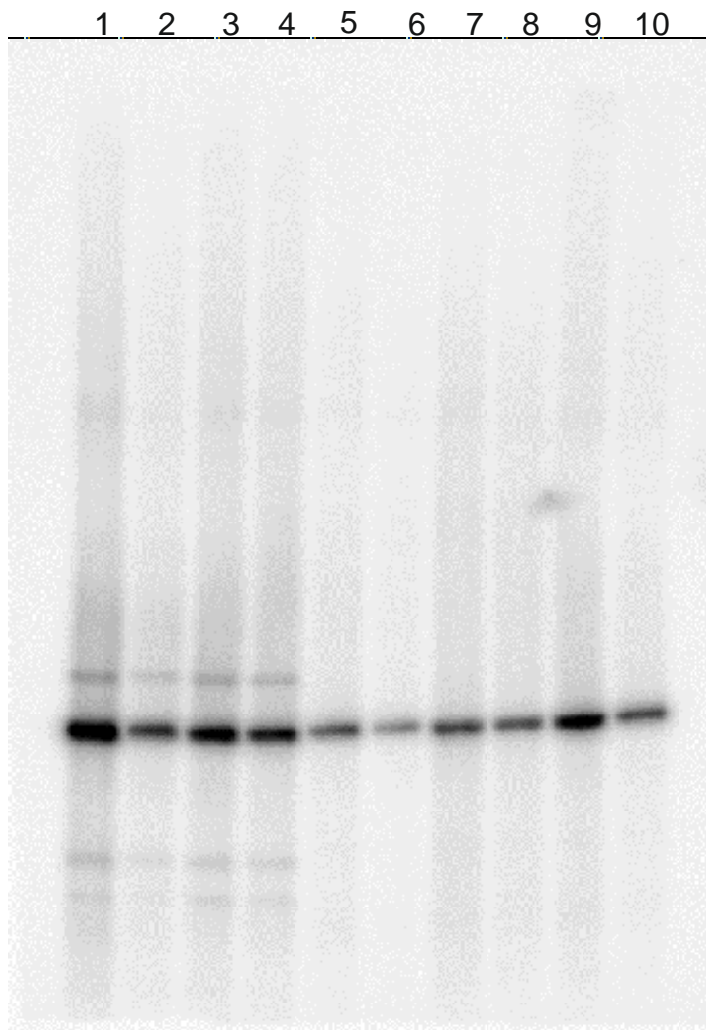
Antud töö raames konstrueerisin *Abf2* deletsioonitüvesid otsesel PCR-i fragmendi transformeerimisel W303a ja W303a/α tüvedesse ja saadud W303a/α *abf2* Δ/*ABF2* tetraadide segregatsioonil. W303 *abf2* Δ, *spoor2* tüve fenotüüp vastas eelnevalt publitseeritud andmetele, mille kohaselt kaotavad *Abf2* deletsioonitüved funktsionaalse mtDNA kasvades fermenteeritaval toiduallikal ja sellega ka respiratoorse võimekuse (Diffley ja Stillman, 1991). Selles katses väljaaretatud testsüsteem võimaldab hiljem testida *Gcf1* valguga kompenseerimist ja ka *Gcf1* deletsioonimutantide funktsionaalsust transformatsioonil W303 *abf2* Δ tüvesse.

### 2.3.4 mtDNA struktuuri muutused W303 abf2Δ tüves

Mitokondriaalse DNA topoloogia uurimiseks kasutati kahedimensionaalset geelelektroforeesi, millel lahutatakse DNA molekulid nii massi, kui ka kuju järgi (Joonis 21). Eelnevalt hinnati mtDNA kogust erinevates preparaatides ühedimensionaalse geelelektroforeesiga (2.2.4.2) (Joonis 22).

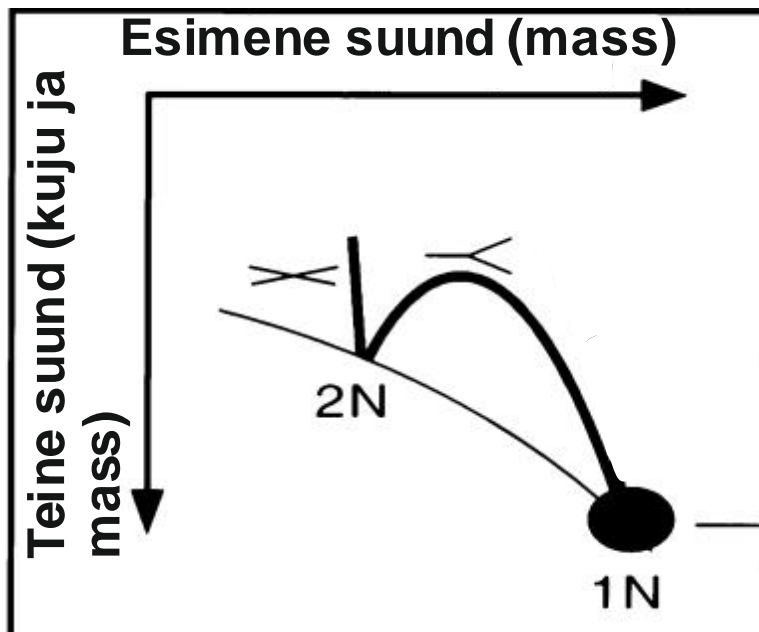


Joonis 21: Kahedimensionaalse geelelektroforeesi läbiviimise skeem.



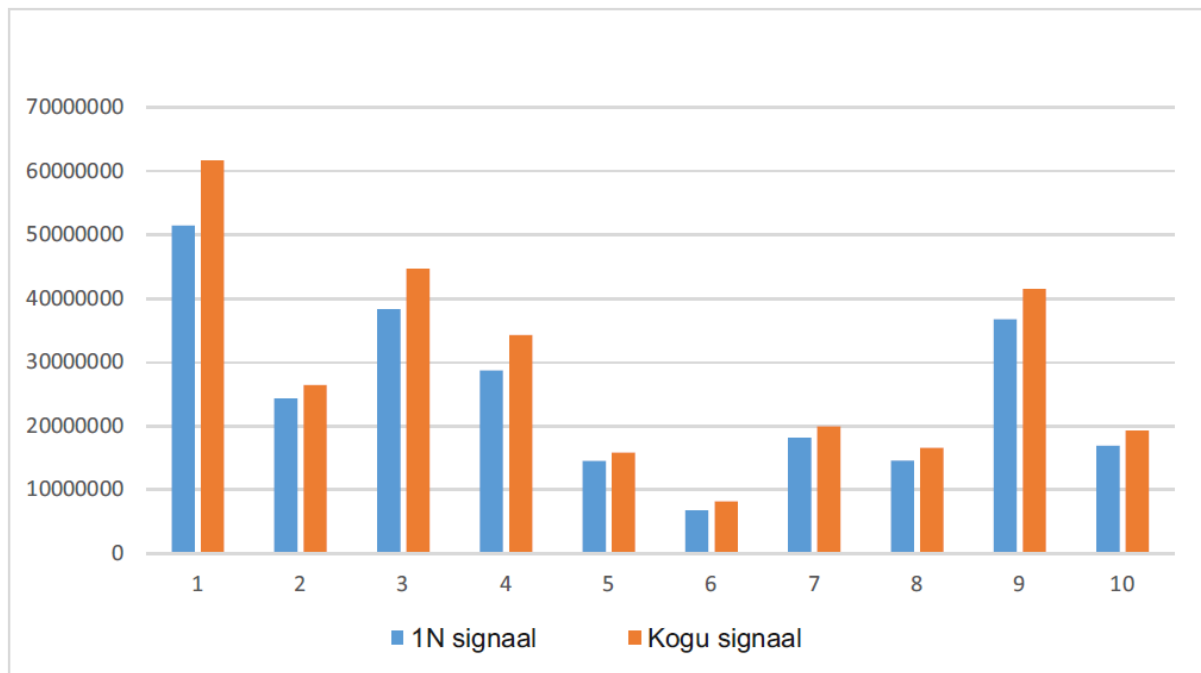
Joonis 22: Eco32I poolt restrikteeritud mtDNA preparaadid. 1 ja 2 rada 16  $\mu$ l ja 8  $\mu$ l W303 $\alpha$  *irc3* $\Delta$ , spoor32 esimese eralduse mtDNA. 3 ja 4 rada 12  $\mu$ l ja 8  $\mu$ l W303 $\alpha$  *irc3* $\Delta$ , spoor32 teise eralduse mtDNA. 5 ja 6 rada 10  $\mu$ l ja 5  $\mu$ l W303 *abf2*  $\Delta$ , spoor2 esimese eralduse mtDNA. 7 ja 8 rada 20  $\mu$ l ja 15  $\mu$ l W303 *abf2*  $\Delta$ , spoor2 teise eralduse mtDNA. 9 ja 10 rada 8  $\mu$ l ja 4  $\mu$ l W303 $\alpha$  metsiktüüpi mtDNA.





Joonis 23: (MacAlpine jt, 1998) Kahedimensionaalse geelelektroforeesi tulemuste skeem. Pildil kujutatud 1N on täpp, mis vastab restriктаasiga lõigatud lineaarsele 2-ahelalisele DNA fragmendile; 1N täpist ulatub välja kaar, mida nimetatakse Y-kaareks ja mis vastab klassikalise replikatsioonikahvli lõikamisel restriктаasiga tekkivale struktuurile; Y-kaar ulatub 2N täppi, kus replikatsioonikahvel on liikunud juba peaaegu väljalõigatava fragmendi lõppu; Y-kaare lõpust tuleb välja nn. X-kaar, mis tähistab vastastiku liikuvate replikatsioonikahvlite või Holliday struktuuri lõikamisel tekkivatele struktuuridele.

ImageQuant TL programmiga võrreldi erinevate mtDNA preparaatide radioaktiivse signaali suhtelist tugevust kogu rajal ja eraldi 1N täpil, see on täpp, mis vastab lineaarsele 2-ahelalisele DNA fragmendile, mis tekib mtDNA lõikamisel Eco32I poolt detekteerides blotti meetodite osas kirjeldatud COX2 prooviga (2.2.4.2). Ülejäänud produktid tekivad siis, kui restriksioon ei ole mingil põhjusel ühte saiti lõiganud, tänu sisemistele DNA katketele, ribonukleotiididele või alternatiivina, kui DNA molekul on hargnenud (näiteks liikuva replikatsioonikahvli väljalõikamise puhul) (Joonis 23). Saadud signaalide suhtelist tugevust on kirjeldatud tulpdiaagrammidega (Joonis 24). Vastavalt saadud tulemustele arvutati, kui palju erinevaid mtDNA preparaate peab võtma, kui W303 $\alpha$  metsiktüüpi mtDNA-d võtta 20  $\mu$ l. Nii nagu joonisel kujutatud andmetest selgub, tuleb teise eralduse W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* mtDNA-d võtta viiekordse ruumala, ehk 100  $\mu$ l ja W303 $\alpha$  *irc3* $\Delta$ , *spoor32* teise eralduse mtDNA-d umbes kahekordse ruumala, ehk 40  $\mu$ l.



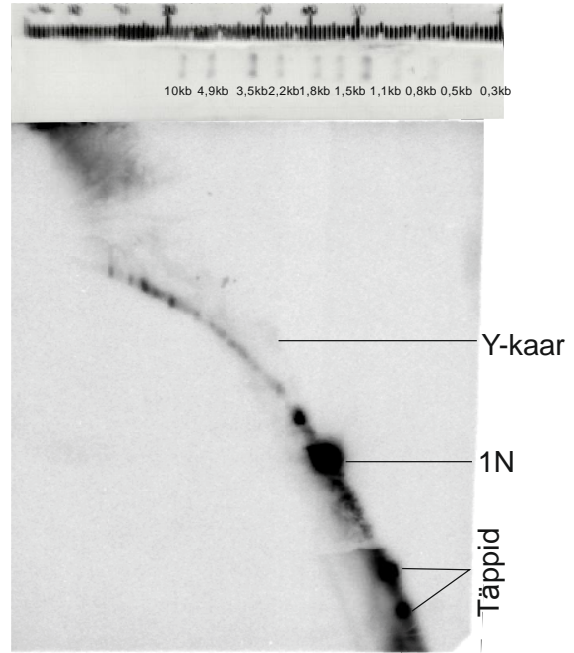
Joonis 24: X-teljel Eco32I poolt restrikteeritud mtDNA-d. 1 ja 2 rada 16  $\mu$ l ja 8  $\mu$ l W303 $\alpha$  *irc3* $\Delta$ , *spoor32* esimese eralduse mtDNA. 3 ja 4 rada 12  $\mu$ l ja 8  $\mu$ l W303 $\alpha$  *irc3* $\Delta$ , *spoor32* teise eralduse mtDNA. 5 ja 6 rada 10  $\mu$ l ja 5  $\mu$ l W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* esimese eralduse mtDNA. 7 ja 8 rada 20  $\mu$ l ja 15  $\mu$ l W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* teise eralduse mtDNA. 9 ja 10 rada 8  $\mu$ l ja 4  $\mu$ l W303 $\alpha$  metsiktüüpi mtDNA. Y-teljel radioaktiivse signaali suhteline tugevus.

Selleks, et saada pikki mtDNA genoomi proove korralikult geelis lahutada, restrikteerisin W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2*; W303 $\alpha$  *irc3* $\Delta$ , *spoor32* ja W303 $\alpha$ (wt) mtDNA proovid Eco32I-ga, lahutasin agarosgeelil esimeses dimensioonis 0,5% geelis, teises suunas 1,2% geelis. Järgnevalt tegin Southern ülekande nailonfiltrile ja hübridiseerisin filtreid prooviga, mille sain pGEM-5Zf COX2 plasmiidilt PCR-i abil kasutades  $\alpha^{32}$ P-dCTP radioaktiivset nukleotiidi ja praimereid COX23 ja COX25. Hübridisatsioonisignaali autoradiograafia pildid on toodud järgmistel joonistel: W303 $\alpha$ (wt) (Joonis 25), W303 $\alpha$  *irc3* $\Delta$ , *spoor32* (Joonis 26), W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* (Joonised 27 ja 28). W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* DNA analüüsi korrati kaks korda, sest esimesel pildil (Joonis 27), ebaõnnestus ülekanne geeli ülemises osas. Võrreldes kahedimensionaalse geelelektroforeesi pilte, on kõigil preparaatidel näha 1N täpid, mis vastavad Eco32I poolt lõigatud lineaarsele mtDNA-le, mis on COX2 piirkonna radioaktiivse prooviga detekteeritud (Joonised 25-28 1N tähis). 1N täpist ulatub välja kaar, mida nimetatakse Y-kaareks (Joonistel 25, 26, 28 Y-kaar tähistus) ja mis vastab klassikalise replikatsioonikahveli lõikamisel restriktasiga tekkivale struktuurile, Y-kaar ulatub 2N täppi (Joonis 25 2N tähistus), kus replikatsioonikahvel on liikunud juba peaaegu väljalõigatava fragmendi lõppu, antud hetkel tegemist on suures osas neljaahelalise struktuuriga, sellest tuleb

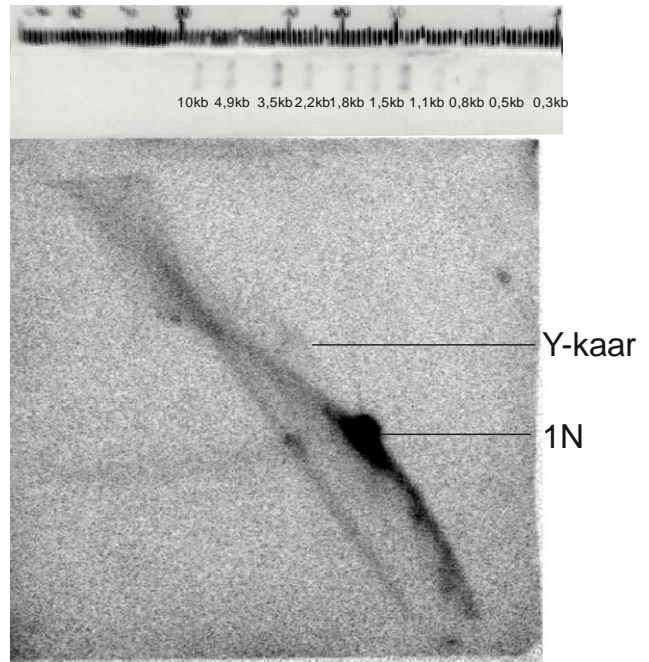
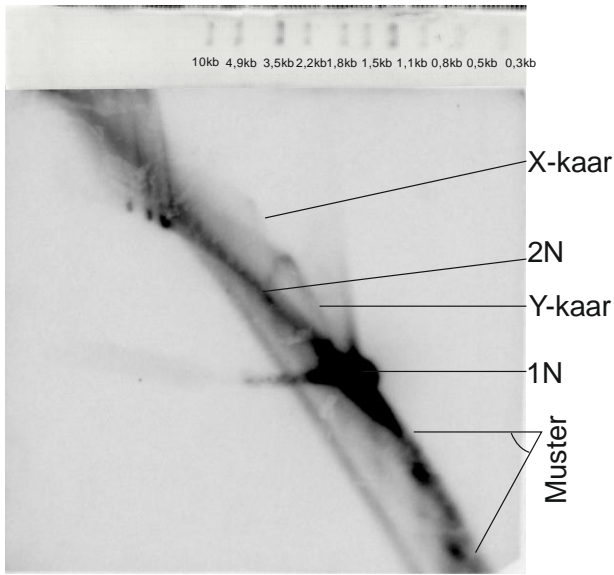


ka kahekordne suurus. Y-kaare lõpust tuleb välja nn. X-kaar (Joonis 25 X-kaar tähistus), mis tähistab vastastiku liikuvate replikatsioonikahvlite või Holliday struktuuri lõikamisel tekkivat struktuuri. 1N täpi all võib täheldada diskreetsete täppide mustrit, iga täpp 1N punkti all võib tähistada spetsiifilist katket antud restriктаasiga väljalõigatava fragmendi sees (Joonised 25 ja 27, tähis Muster; Joonis 26 tähis Täppid). Vaadeldavad 1N all asuvad täpid on restriктаasiga väljalõigatava oodatava pikkusega 1N fragmendist väiksemad. Kui analüüsida saadud pilte, siis kohe võib näha olulisi erinevusi tüvede vahel. Võrreldes W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* mt DNA 2D pilti (Joonis 27) W303 $\alpha$  *irc3* $\Delta$ , *spoor32* pildiga (Joonis 26) näeme olulist erinevust 1N täppi all tekkivate täppide mustris, nimelt omab W303 $\alpha$  *irc3* $\Delta$ , *spoor32* tüvi kaks väga tumedat täppi, mis ei esine W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* tüves, need täpid ei esine ka W303 $\alpha$  metsiktüüpi tüves (Joonis 25). W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* ja W303 $\alpha$  metsiktüüpi tüves sub-1N täppide muster on identne (Joonised 25 ja 27). Sellest võib järeldada, et W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* tüvi on mtDNA topoloogia poolest oluliselt erinev W303 $\alpha$  *irc3* $\Delta$ , *spoor32* tüvest ja arvatavasti nende respiratoorse võime kadumine ja seda põhjustav mtDNA ebastabiilsus on põhjustatud erinevate mehhanismide poolest ja ühes tüves saadud eksperimentaalseid tulemusi ei see ekstrapoleerida teisele. Teine oluline erinevus nende piltide vahel on Y-kaare ja X-kaare intensiivsus. W303 $\alpha$  metsiktüüpi tüves (Joonis 25) Y-kaar on intensiivne ja hästi märgatav ja ka X-kaar nähtav. W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* ja W303 $\alpha$  *irc3* $\Delta$ , *spoor32* tüvedes (Joonis 28 ja Joonis 26) on Y-kaar väga nõrk ja X-kaar pole üldse detekteeritav. See näitab, et mutantides on takistatud replikatsioonikahvli tekkimine ja sellega ka klassikalise mudeli alusel toimuv DNA replitseerumine, ka rekombinatsiooni intermediaatide hulk on madalam kui metsiktüves. Sarnasele järelduse on eelnevalt teinud ka teised teadlased kasutades 14WW  $\Delta$ *abf2* MGT1, 14WW  $\Delta$ *abf2*  $\Delta$ *mgt1* ja 14WW ABF2  $\Delta$ *mgt1* (MGT1 geen kodeerib mitokondriaalset endonukleaasi CCE1) tüvesid, kes leidsid et  $\Delta$ *abf2* mutantidel tekib vähem rekombinatsiooni intermediaate (Y- ja X-kaare intensiivsus madalam) ja CCE1 endonukleaasi deleteerimine takistab rekombinatsiooni intermediaatide lagundamist, mis hõlbustas 14WW ABF2  $\Delta$ *mgt1* ja 14WW  $\Delta$ *abf2*  $\Delta$ *mgt1* tüvede Y- ja X-kaare intensiivsuse erinevuse leidmist (MacAlpine jt, 1998).

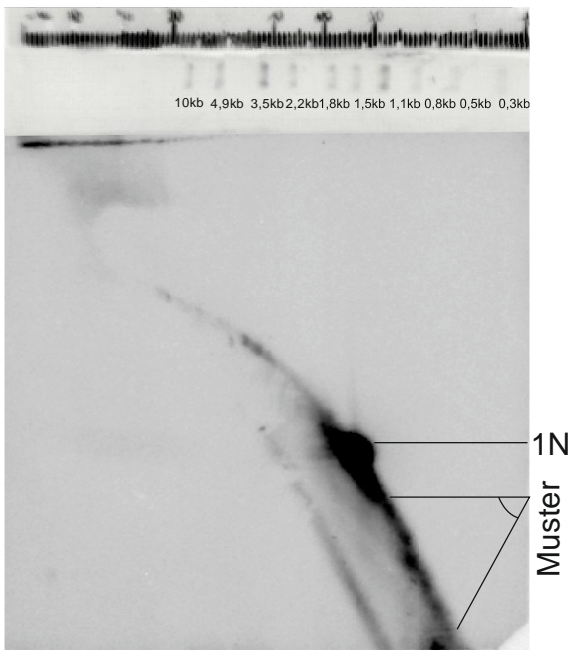
Joonis 26: W303a *irc3*Δ, spoor32 pärimi 2D geelelektroforeesi pilt



Joonis 25: w303a metsiktüüpi pärimi 2D geelelektroforeesi pilt



Joonis 28: W303 *abf2* Δ, spoor2 pärimi 2D geelelektroforeesi pilt

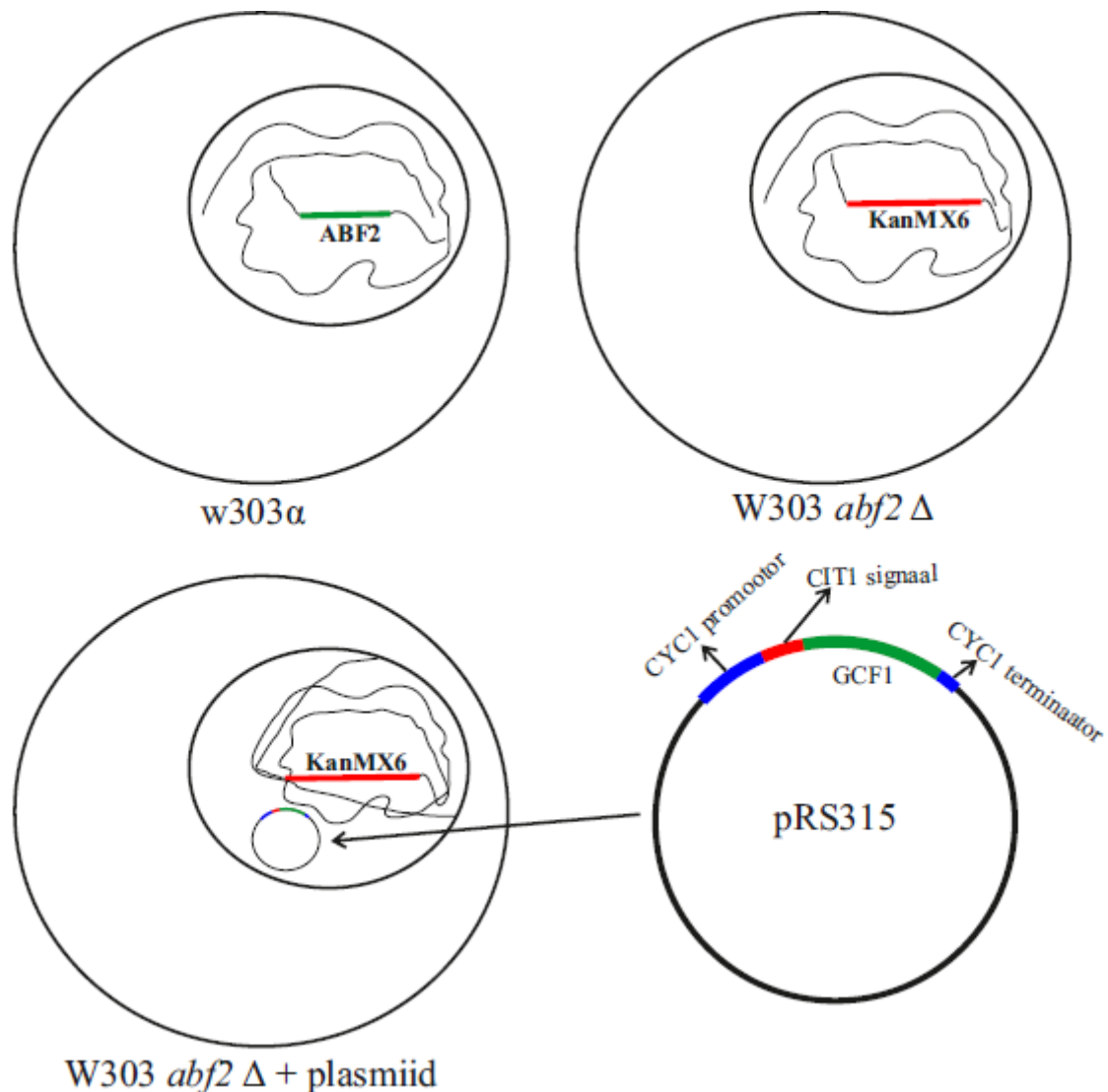


Joonis 27: W303 *abf2* Δ, spoor2 pärimi 2D geelelektroforeesi pilt

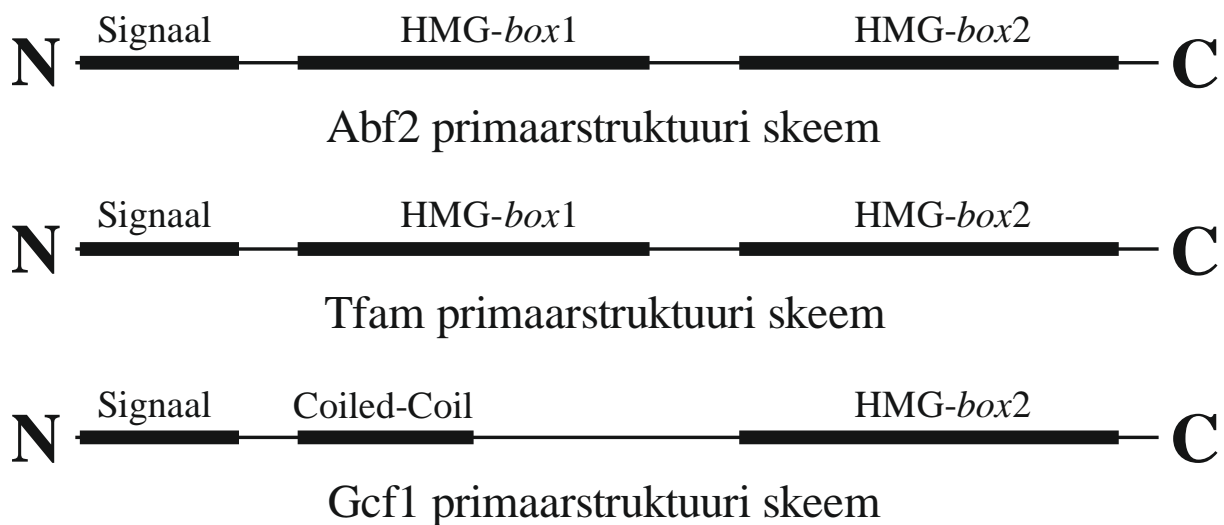
Kokkuvõttes näitab meie analüüs, et mtDNA topoloogia *abf2* Δ tüves on oluliselt erinev nii metsiktüüpi mtDNA-st, kui ka W303a *irc3* Δ mutandist. Topoloogia vastab eelnevalt kirjeldatule (MacAlpine jt, 1998): Y-kaar on *abf2* Δ tüvedes väiksema intensiivsusega ja X-kaar pole üldse detekteeritav.

### 2.3.5 Abf2 $\Delta$ tüve kasutamine HMG-box valgu struktuursete funktsioonide analüüsiks

Minu poolt tehtud tüvi W303 *abf2*  $\Delta$ , *spoor2* võimaldab uurida Gcf1 valgu struktuurset funktsiooni *in vivo*. Gcf1 on petite negatiivse pärimi *C. albicansi* mitokondriaalne HMG valk, Abf2-e oletatav funktsionaalne homoloog. Tõenäoliselt on võimalik W303 *abf2*  $\Delta$  tüvesse viia sisse Gcf1 ekspresioonikonstruktsioon ja sellega kompenseerida Abf2 valgu puudumine, ehk respiratoorse funktsiooni kadumise ajaks fermenteeritava söötmel kasvatades (Joonis 29). Kui see õnnestub, saab transformeerida pärimi ka Gcf1 fragmendid, mis on tehtud *in silico* analüüsi abil (Visacka jt, 2009). Gcf1 valgu eripära, võrreldes teiste HMG-box motiivi omavate valkudega, nagu Abf2 ja Tfam, on ainult ühe HMG-box motiivi olemasolu ja lisaks Abf2-s ja Tfam-is puuduva *coiled-coil* struktuuri olemasolu (Joonis 30).



Joonis 29: Joonistel on skemaatiliselt kujutatud *W303 abf2*  $\Delta$  ja *W303 $\alpha$ (wt)* pärmirakud, tuumad, kromatiin koos antud töös huvitava geeniga; GCF1 geeniga ekspresiooniplasmiidi transformatsioon *W303 abf2*  $\Delta$  pärimi; GCF1 ekspresiooniplasmiidi struktuur



Joonis 30: Joonisel on skemaatiliselt kujutatud Abf2-e, Tfam-i ja Gcf1 primaarstruktuuri skeem. GCF1 eripära siinjuures on ainult ühe HMG-*box* domeeni olemasolu.

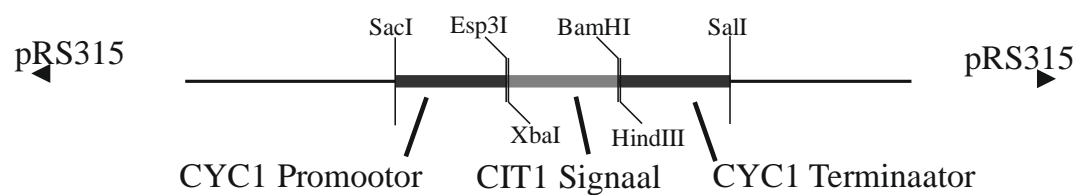
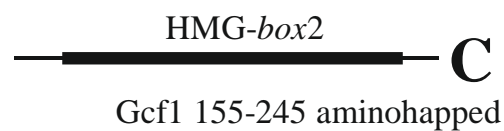
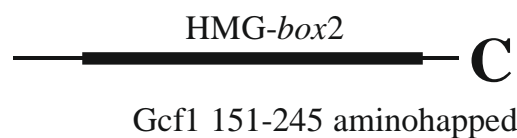
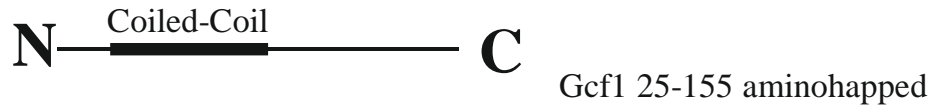
### 2.3.6 pRS315 ekspressioonikonstruktid valmistamine ja planeeritud funktsionaalse aktiivsuse katsed.

Konstrueeritud Gcf1 ekspressioonikonstrukt kujutab endast pRS315 pärmi vektorit, kuhu on sisseviidud SacI ja Esp3I restriktsoonisaitide vahele CYC1(tsütokroom c-1) promootor, HindIII ja SalI vahele CYC1 terminaator ja Esp3I ja BamHI vahele CIT1(tsitraadi süntaas) mitokondri impordisignaali ja Gcf1 või selle fragment (Tabel 1; Joonis 31) on sisestatud BamHI ja SmaI vahele. Samasuguselt on konstrueeritud ka täispika Abf2-e konstrukt. Abf2 +-400 nukleotiidi fragment on kloneeritud otse SacI ja SalI avatud pRS315 vektorisse, 400 nukleotiidi enne ja pärast ABF2 ORF-i on vajalikud natiivsete Abf2 reguleerivate elementide kloneerimiseks.

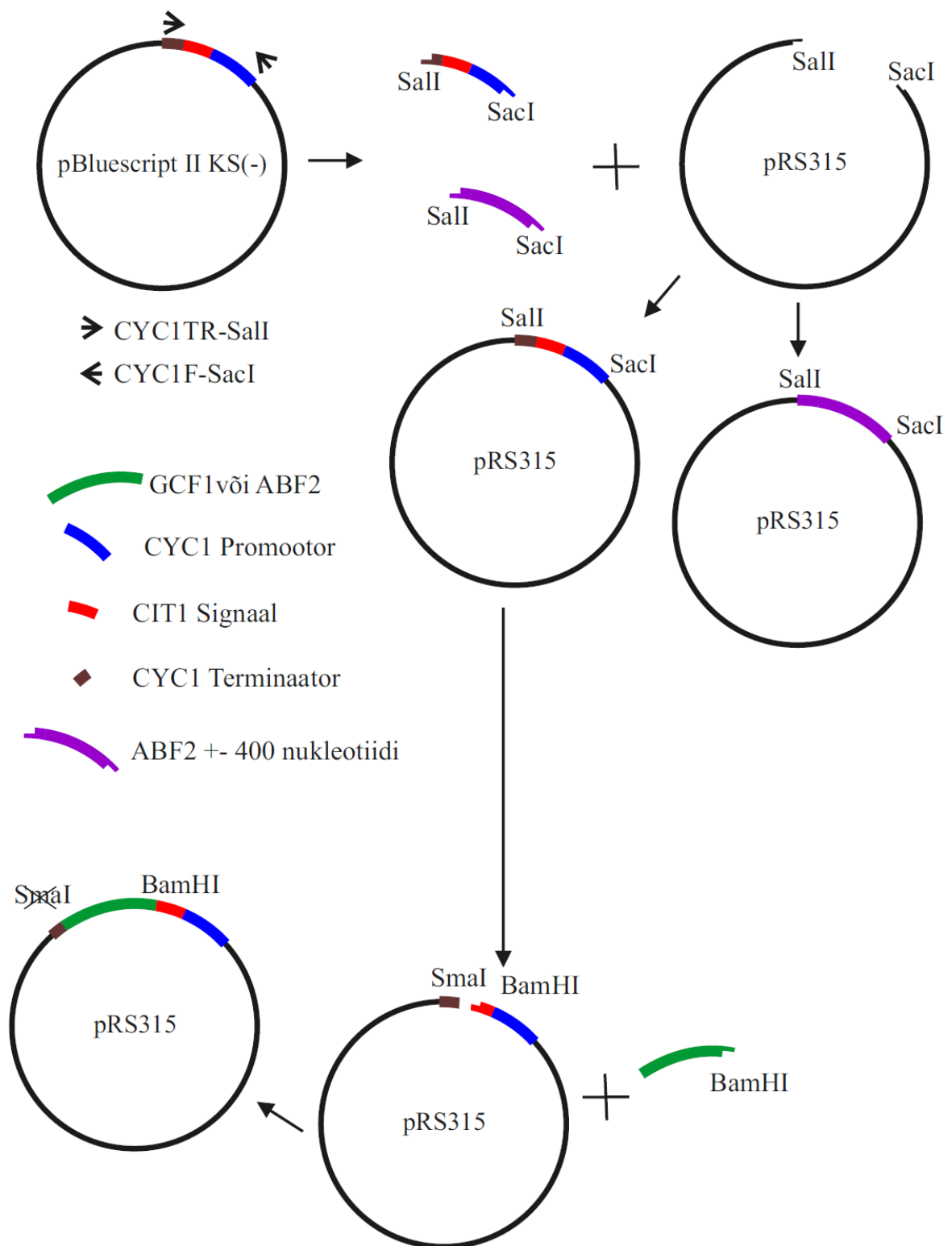
Alguses amplifitseeriti PCR-iga ja kloneeriti olemasolevast pBluescript II KS(-) vahekonstrukstist CYC1 promootor, CIT1 mitokondri impordisignaali ja CYC1 terminaator pärmi süstikvektorisse pRS315. Edasi, kloneeriti PCR-iga amplifitseeritud GCF1 geen saadud konstrukti ilma mitokondri impordisignaali, samasuguselt kloneeriti ka üheksa erinevat GCF1 deletsioonifragmenti ja ka ABF2 täispikk geen (koos mitokondri impordisignaali). Abf2 +-400 kloneeriti otse SacI ja SalI-ga avatud pRS315 vektorisse (Joonis 32). Saadud konstruktid transformeeriti bakterisse, kontrolliti kolooniaid PCR-iga, kasutades USP ja RSP universaalseid primereid ja siis puhastati välja need plasmiidid, milles kloonimine oli õnnestunud (Lisad 1 - 5).

**Tabel 1: pRS315 vektorisse kloneeritud fragmendid**

Kloneeritav valk	Praimerid	Kirjeldus
Abf2	Abf2 5 BamHI Abf2p PstI Rev	Täispikk Abf2 valgu järjestus
Abf2	Abf2 SacI up forw Abf2 SallI down rev	Abf2 koos 400 nukleotiidiga üles- ja allavoolu, sisaldab natiivseid regulaatorseid elemente.
Gcf1	5GCFBAM25 GCF1S155 3'	Gcf1 25–155 aminohapped
Gcf1	5GCFBAM25 GCF1P161 3'	Gcf1 25–161 aminohapped
Gcf1	5GCFBAM25 GCF1I224 3'	Gcf1 25–224 aminohapped
Gcf1	5GCFBAM25 3GCFXHO	Gcf1 täispikk järjestus (0-245 aminohapped)
Gcf1	GCF1T33 5' 3GCFXHO	Gcf1 33–245 aminohapped
Gcf1	GCF1A41 5' 3GCFXHO	Gcf1 41–245 aminohapped
Gcf1	GCF1K61 5' 3GCFXHO	Gcf1 61–245 aminohapped
Gcf1	GCF1E151 5' 3GCFXHO	Gcf1 151–245 aminohapped
Gcf1	GCF1E155 5' 3GCFXHO	Gcf1 155–245 aminohapped



Joonis 31: Joonisel on skemaatiliselt kujutatud: kõik pRS315 vektorisse klonereeritud Gcf1-e fragmendid ja nende üldstruktuur, konstrukti reguleerivad elemendid pRS315 vektoris.



Joonis 32: Kloneerimisstrateegia: amplifitseeriti PCR-iga ja kloneeriti olemasolevast pBluescript II KS(-) vahekonstrukstist CYC1 promootori, CIT1 mitokondri impordisignaali ja CYC1 terminaatori — pärmisüstikvektoris pRS315. Edasi, kloneeriti GCF1 geen saadud konstrukti, samasuguselt kloneeriti ka üheksa erinevat Gcf1 deletsioonifragmenti ja ka ABF2 täispikk geen. Abf2 +/-400 kloneeriti otse SacI ja SalI-ga avatud pRS315 vektorisse.

Konstrukte kontrolliti restriksioonanalüüsi abil. ABF2 ORF-i lõikas Eco130I restriктаas kaheks ligikaudu samasuureks fragmediks. Gcf1-s lõikas restriктаas 59 ja 60 aminohapete vahel, seega kõikides Gcf1 61–245, Gcf1 151–245 ja Gcf1 155–245 fragmentides antud restriksioonisait puudus ja neid fragmente kontrolliti BamHI ja HindIII-ga. BamHI restriksioonisaiti asus täpselt integreeritava fragmendi alguses. HindIII restriksioonisaiti asus vektori siseselt ja seda kloneerimisel ei kasutatud, see valiti, et olla kindlad et fragment on integreerunud õiges suunas ja õiges kohas (Lisad 6 ja 7).

Kloneeritud Gcf1 konstruktid on järgnevalt plaanis sekveneerida ja siis koos kontrollkonstruktidega transformeerida W303 *abf2*  $\Delta$  pärmis. Kui see kõik on tehtud, ma saan vastata küsimusele, missugused Gcf1 valgu domeenid on olulised valgu aktiivsuse säilitamiseks.



## KOKKUVÕTE

Mitokondriaalne DNA on pakitud HMG-valkude abil nukleoproteiidsesse kompleksi. Tavaliselt sisaldavad vastavad HMG-valgud, nagu Abf2 ja Tfam, kaks HMG-*box* domeeni, millega nad saavad siduda DNA-d. *C. albicans*-i valk Gcf1 ja mõnede teiste pärmidel homologid omavad ainult ühte HMG-*box* domeeni. Lisaks omab Gcf1 N-terminuses coiled-coil motiivi, mis puudub nii Abf2-l kui ka Tfam-il. Selleks, et analüüsida Gcf1 struktuurseid determinante *in vivo*, on vajalik testsüsteemi väljatöötamine, mis oli antud töö põhiliseks eesmärgiks. Selleks konstrueerisime ABF2 deletsiooniga *S. cerevisiae* tüve, mille fenotüübi defekte oleks võimalik komplementeerida GCF1 geeni sisaldava plasmiidiga.

Homoloogilise rekombinatsiooniga valmistatud *S. cerevisiae abf2*  $\Delta$  tüvi analüüsiti nii kvalitatiivselt, W303 tüvespetsiifilise punase-valge koloonia testiga, kui ka kvantitatiivselt — määrati respiratoorse funktsiooni kadumise kineetika. Näitasin, et *abf2*  $\Delta$  tüve mitokondriaalne DNA on ebastabiilne, millega kaasneb pärmkiire respiratoorse funktsiooni kadumine, kasvatades fermenteeritava söötmel. Analüüsisin *abf2*  $\Delta$  tüve spetsiifilisi DNA topoloogia muutusi kasutades kahedimensionaalset geelelektroforeesi. Kuigi GCF1 mutantide analüüsini ajanappusel ei jõutud, valmistasin komplementatsioonikatseteks Gcf1 konstruktid mis sisaldasid pärmis tsentromeerset tüüpi plasmiidides kas tervet GCF1 geeni ilma 25 aminohappelise impordisignaali või GCF1 geeni fragmente, kust osa aminohapetest oli deleteeritud.

Tulevikus on plaanis GCF1 geeni või deletsioonimutante sisaldavate konstruktidega läbi viia *in vivo* komplementatsioonikatsed, mis baseeruvad meie poolt konstrueeritud *S. cerevisiae abf2*  $\Delta$  tüve transformeerimisel ja transformantide respiratoorse aktiivsuse analüüsil, mis peaks võimaldama mõista Gcf1 struktuursete elementide funktsioone.

## RESÜMEE

### Test-system for the structural analysis of mitochondrial HMG-*box* protein Gcf1

Vlad-Julian Piljukov

Naturally, the mitochondrial DNA is packed by HMG-proteins into nucleoprotein complexes, also called mitochondrial nucleoids. Usually, those HMG-proteins contain two HMG-*box* domains, which are used to bind DNA, proteins like Abf2 and Tfam, but *C. albicans* Gcf1 and its homologs have only one. Additionally, Gcf1 contains an N-terminal coiled-coil motif, which is not found either in Abf2 or Tfam. To analyze *in vivo* the role of Gcf1 protein's structural domains and understand their functions a comprehensive test-system is required, construction of which was the main aim of this work. For this purpose we constructed an ABF2 deletion *S. cerevisiae* strain, where phenotypic defects can be complemented by GCF1 gene expressing plasmid.

*S. cerevisiae abf2*  $\Delta$  strain was generated by homologous recombination and analyzed qualitatively by W303 strain specific red-white colony test, and also quantitatively by studying respiratory function loss kinetics. *abf2*  $\Delta$  strain has unstable mitochondrial DNA, which results in rapid loss of respiratory function in yeast cells grown on fermentable medium. Moreover, we have studied *abf2*  $\Delta$  strain's mitochondrial DNA topology changes by two-dimensional gel electrophoresis. I have also constructed GCF1 expression constructs, based on centromere type yeast vector plasmid. Constructs had either full GCF1 gene with mitochondrial import signal of first 25 amino acids deleted or GCF1 gene fragments, which had some of its coding sequence amino acids deleted.

In the future, I plan to perform complementation experiments with entire GCF1 gene and also deletion mutants, complementation efficiency will be rated by the analysis of respiratory activity of transformed *S. cerevisiae abf2*  $\Delta$  strain, these experiments should help us to understand the functions of Gcf1 structural elements.

## KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Andersson SG, Karlberg O, Canbäck B, Kurland CG (2003) On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003 Jan 29;358(1429):165-77
- Azam TA, Iwata A, Nishimura A, Ueda S, Ishihama (1993) A Growth Phase-Dependent Variation in Protein Composition of the *Escherichia coli* Nucleoid<sup>†</sup>. *Nucleic Acids Research*, 1993, ol. 21, No. 10 2493 -2501
- Azam TA, Ishihama (1999) A Twelve Species of the Nucleoid-associated Protein from *Escherichia coli*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 274, No. 46, Issue of November 12, pp. 33105–33113, 1999
- Bähler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A 3rd, Steever AB, Wach A, Philippsen P, Pringle JR (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 1998 Jul;14(10):943-51.
- Brewer LR, Friddle R, Noy A, Baldwin E, Martin SS, Corzett M, Balhorn R, Baskin RJ (2003) Packaging of single DNA molecules by the yeast mitochondrial protein Abf2p. *Biophys. J.* 85, 2519–2524.
- Bustin M (2001) Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci.* 2001 Mar;26(3):152-3.
- Chen XJ ja Butow RA (2005) The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* 6, 815–825.
- Chen XJ, Wang X, Kaufman BA, Ronald AB (2005) Aconitase Couples Metabolic Regulation to Mitochondrial DNA Maintenance. *Science.* 2005 Feb 4;307(5710):714-7.
- Clayton DA (1991) Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 453–478
- Dairaghi DJ, Shadel GS, Clayton DA (1995) Addition of a 29 residue carboxyl-terminal tail converts a simple HMG box-containing protein into a transcriptional activator. *J Mol Biol.* 1995 May 26;249(1):11-28.
- Diffley JF ja Stillman B (1991) A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 1;88(17):7864-8.

- Dimauro S, Davidzon G (2005) Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med.* 2005;37(3):222-32.
- Dorman CJ ja Deighan P (2003) Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr. Opin. Genet.* 13, 179–184.
- Drlica K ja Rouvière-Yaniv J (1987) Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol. Rev.* 51, 301–319.
- Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, Park CB, Gaspari M, Hultenby K, Rustin P, Gustafsson CM, Larsson NG (2004) Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet.* 2004 May 1;13(9):935-44. Epub 2004 Mar 11.
- Fisher RP, Lisowsky T, Parisi MA, Clayton DA (1992) DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *Journal of Biological Chemistry* Volume 267, Issue 5, 15 February 1992, Pages 3358-3367
- Fontana L, Partridge L, Longo VD (2010) Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science.* 2010 Apr 16;328(5976):321-6.
- Garrido N, Griparic L, Jokitalo E, Wartiovaara J, van der Bliek AM, Spelbrink JN (2003) Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell.* 2003 Apr;14(4):1583-96.
- Goodwin GH, Johns EW (1973) Isolation and characterisation of two calf-thymus chromatin non-histone proteins with high contents of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem.* 1973 Dec 3;40(1):215-9.
- Goto A1, Matsushima Y, Kadowaki T, Kitagawa Y (2001) Drosophila mitochondrial transcription factor A (d-TFAM) is dispensable for the transcription of mitochondrial DNA in Kc167 cells. *Biochem J.* 2001 Mar 1;354(Pt 2):243-8.
- Fan HY, Cheng KK, Klein HL (1996) Mutations in the RNA polymerase II transcription machinery suppress the hyperrecombination mutant hpr1 delta of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1996 Mar;142(3):749-59.
- Fisher RP, Lisowsky T, Breen GA, Clayton DA (1991) A rapid, efficient method for purifying DNA-binding proteins. Denaturation-renaturation chromatography of human and yeast mitochondrial extracts. *J Biol Chem.* 1991 May 15;266(14):9153-60.
- Friddle RW, Klare JE, Martin SS, Corzett M, Balhorn R, Baldwin EP, Baskin RJ, Noy A (2004) Mechanism of DNA Compaction by Yeast Mitochondrial Protein Abf2p,

Biophysical Journal, Volume 86, Issue 3, March 2004, Pages 1632-1639, ISSN 0006-3495.

- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956 Jul;11(3):298-300.
- Hekimi S, Lapointe J, Wen Y (2011) Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 2011 Oct;21(10):569-76.
- Iborra FJ, Kimura H, Cook PR (2004) The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol.* 2, 9.
- Jang YC, Van Remmen H (2009) The mitochondrial theory of aging: insight from transgenic and knockout mouse models. *Exp Gerontol.* 2009 Apr;44(4):256-60.
- Kao LR, Megraw TL, Chae CB (1993) Essential role of the HMG domain in the function of yeast mitochondrial histone HM: functional complementation of HM by the nuclear nonhistone protein NHP6A. *PNAS* 1993 90 (12) 5598-5602
- Kaufman BA, Kolesar JE, Perlman PS, Butow RA (2003) A function for the mitochondrial chaperonin Hsp60 in the structure and transmission of mitochondrial DNA nucleoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 163, 457–461.
- Kaufman BA, Durisic N, Mativetsky JM, Costantino S, Hancock MA, Grutter P, Shoubridge EA (2007) The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol Biol Cell.* 2007 Sep;18(9):3225-36. Epub 2007 Jun 20.
- Kleppe K, Övrebö S, Lossius I (1979) The Bacterial Nucleoid. *Journal of General Microbiology*, 112, 1-13.
- Kucej M ja Butow RA (2007) Evolutionary tinkering with mitochondrial nucleoids. *TRENDS in Cell Biology* Vol.17 No.12
- Kukat C, Larsson NG (2013) mtDNA makes a U-turn for the mitochondrial nucleoid. *Trends Cell Biol.* 2013 Sep;23(9):457-63. doi: 10.1016/j.tcb.2013.04.009. Epub 2013 May 27.
- Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA (1998) Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet.* 1998 Mar;18(3):231-6.
- Legros F, Malka F, Frachon P, Lombès A, Rojo M (2004) Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J. Cell Sci.* 117, 2653–2662.

- Leibowitz RD (1971) The effect of ethidium bromide on mitochondrial DNA synthesis and mitochondrial DNA structure in HeLa cells. *J. Cell Biol.* 51, 116–122
- Lu B, Yadav S, Shah PG, Liu T, Tian B, Puksza S, Villaluna N, Kutejová E, Newlon CS, Santos JH, Suzuki CK (2007) Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance. *J. Biol. Chem.* 282, 17363–17374.
- MacAlpine DM, Perlman PS, Butow RA (1998) The high mobility group protein Abf2p influences the level of yeast mitochondrial DNA recombination intermediates in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6739-6743.
- MacAlpine DM1, Perlman PS, Butow RA (2000) The number of individual mitochondrial DNA molecules and mitochondrial DNA nucleoids in yeast are co-regulated by the general amino acid control pathway. *EMBO J.* 19, 767–775.
- Margulis L (1993) Origins of species: acquired genomes and individuality. *Biosystems.* 1993;31(2-3):121-5.
- McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S (2006) Mitochondria: more than just a powerhouse *Curr Biol.* 2006 Jul 25;16(14):R551-60.
- Megraw TL ja Chae CB (1993) Functional Complementarity between the HMGI-like Yeast Mitochondrial Histone HM and the Bacterial Histone-like Protein HU\*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Inc.* Vol. 268, No. 17, Issue of June 15, pp. 12758-12763.
- Mereschkowsky C (1905) U<sup>ber</sup> Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol Centralbl* 1905,25:593-604 (English translation in Martin W, Kowallik KV, *Eur J Phycol* 1999, 34:287–295)
- Miyakawa I, Sando N, Kawano S, Nakamura S, Kuroiwa T (1987) Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.*, 8, 431-439.
- Newman SM, Zelenaya-Troitskaya O, Perlman PS, Butow RA (1996) Analysis of mitochondrial DNA nucleoids in wild-type and a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that lacks the mitochondrial HMG box protein Abf2p. *Nucleic Acids Res.*, 24, 386-393.
- Ngo HB, Kaiser JT, Chan DC (2011) The mitochondrial transcription and packaging factor Tfam imposes a U-turn on mitochondrial DNA. *Nat Struct Mol Biol.* 2011 Oct 30;18(11):1290-6. doi: 10.1038/nsmb.2159.

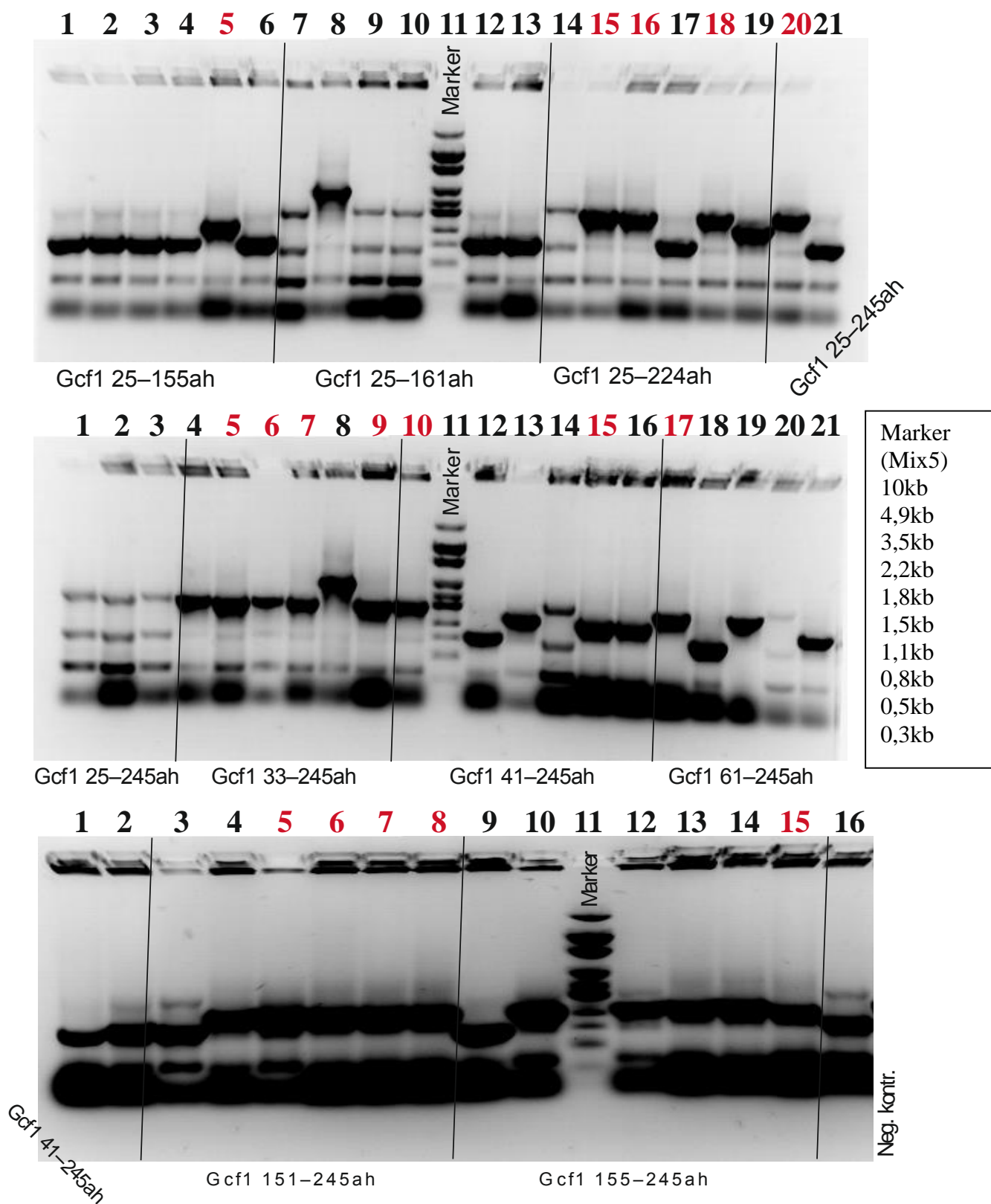
- Parisi MA, Clayton DA (1991) Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science*. 1991 May 17;252(5008):965-9.
- Parisi MA, Xu B, Clayton DA (1993) A human mitochondrial transcriptional activator can functionally replace a yeast mitochondrial HMG-box protein both in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol*. 1993 Mar;13(3):1951-61.
- Park CB, Larsson NG (2011) Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol*. 2011 May 30;193(5):809-18. doi: 10.1083/jcb.201010024. Epub 2011 May 23.
- Pérez VI, Bokov A, Van Remmen H, Mele J, Ran Q, Ikeno Y, Richardson A (2009) Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochim Biophys Acta*. 2009 Oct;1790(10):1005-14.
- Prieto-Martín A, Montoya J, Martínez-Azorín F (2001) A study on the human mitochondrial RNA polymerase activity points to existence of a transcription factor B-like protein. *FEBS Lett*. 2001 Aug 10;503(1):51-5.
- Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD (1988) Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res*. 1988 Aug 11;16(15):7583-600.
- Sikorski RS, Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1989 May;122(1):19-27.
- Van Raamsdonk JM, Hekimi S (2009) Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*. 2009 Feb;5(2):e1000361.
- Visacka K, Gerhold JM, Petrovicova J, Kinsky S, Jöers P, Nosek J, Sedman J, Tomaska L (2009) Novel subfamily of mitochondrial HMG box-containing proteins: functional analysis of Gcf1p from *Candida albicans*. *Microbiology*. 2009 Apr;155(Pt 4):1226-40. doi: 10.1099/mic.0.025759-0.
- Robinow C, Kellenberger E (1994) The bacterial nucleoid revisited. *Microbiol Rev* 58:211–232.
- Rubio-Cosials A, Sidow JF, Jiménez-Menéndez N, Fernández-Millán P, Montoya J, Jacobs HT, Coll M, Bernadó P, Solà M (2011) Human mitochondrial transcription factor A induces a U-turn structure in the light strand promoter. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Oct 30;18(11):1281-9. doi: 10.1038/nsmb.2160.
- Sasaki N, Kuroiwa H, Nishitani C, Takano H, Higashiyama T, Kobayashi T, Shirai Y, Sakai A, Kawano S, Murakami-Murofushi K, Kuroiwa T (2003) Glom is a novel

mitochondrial DNA packaging protein in *Physarum polycephalum* and causes intense chromatin condensation without suppressing DNA functions. *Mol Biol Cell* 14, 4758–4769.

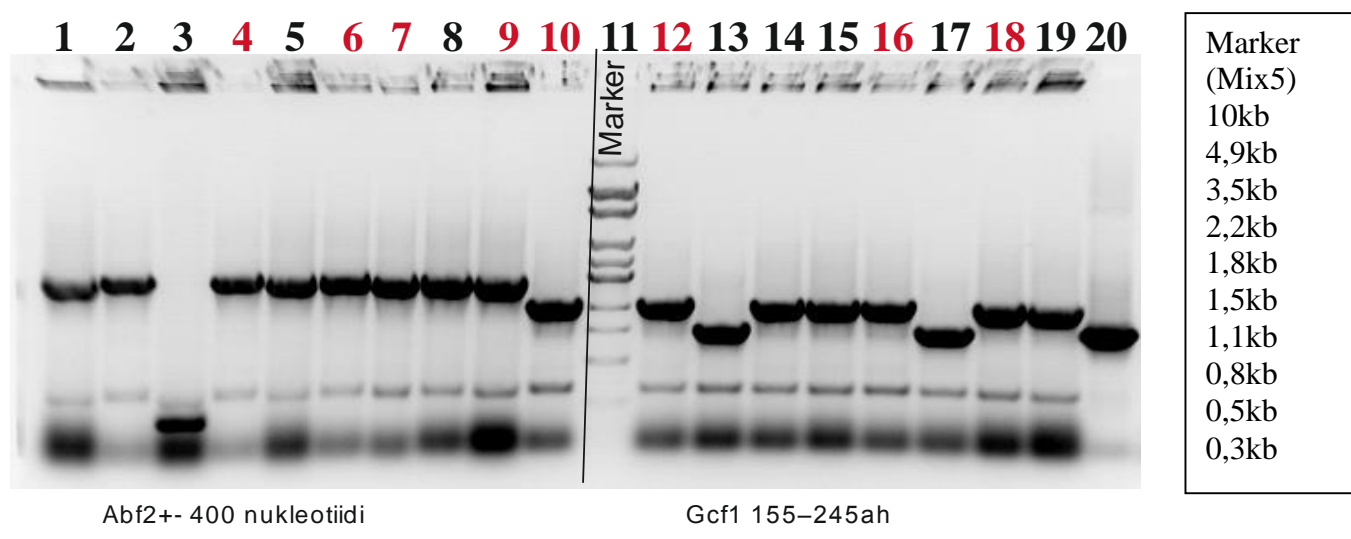
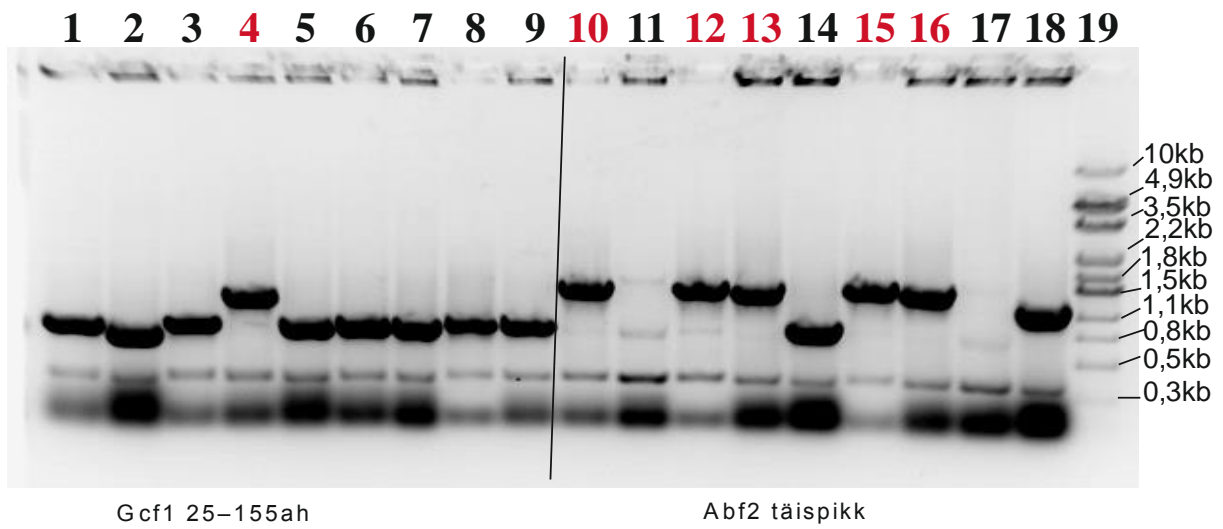
- Satoh M ja Kuroiwa T (1991) Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp. Cell Res.* 196: 137–140.
- Sotelo JR ja Porter KR (1959) An electron microscope study of the rat ovum, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5 327-342.
- Stros M, Launholt D, Grasser KD (2007) The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Oct;64(19-20):2590-606.
- Studitsky VM, Walter W, Kireeva M, Kashlev M, Felsenfeld G (2004) Chromatin remodeling by RNA polymerases. *Trends Biochem. Sci.* 29, 127–135.
- Thomas JO (2001) HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans.* 2001 Aug;29(Pt 4):395-401.
- van Dyck L, Neupert W, Langer T (1998) The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria. *Genes Dev.* 12, 1515–1524.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW (2006). *Fundamentals of Biochemistry*, 2nd Edition. John Wiley and Sons, Inc. lk. 547
- Wallin IE (1927) *Symbiogenesis and the Origin of Species*. London:Bailliere, Tindall and Cox; 1927, 171.
- Zelenaya-Troitskaya O, Perlman PS, Butow RA (1995) An enzyme in yeast mitochondria that catalyzes a step in branched-amino acid biosynthesis also functions in mitochondrial DNA stability. *EMBO J.*,14, 3268-3276.
- Zelenaya-Troitskaya O, Newman SM, Okamoto K, Perlman PS, Butow RA (1998) Functions of the high mobility group protein, Abf2p, in mitochondrial DNA segregation, recombination and copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 148, 1763-1776.



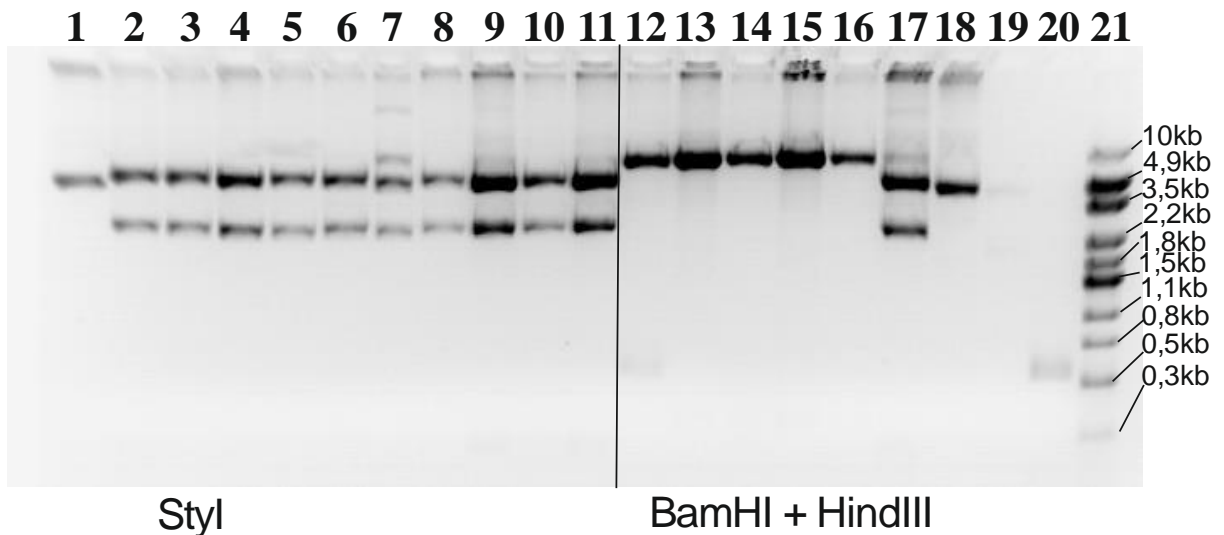
## LISAD



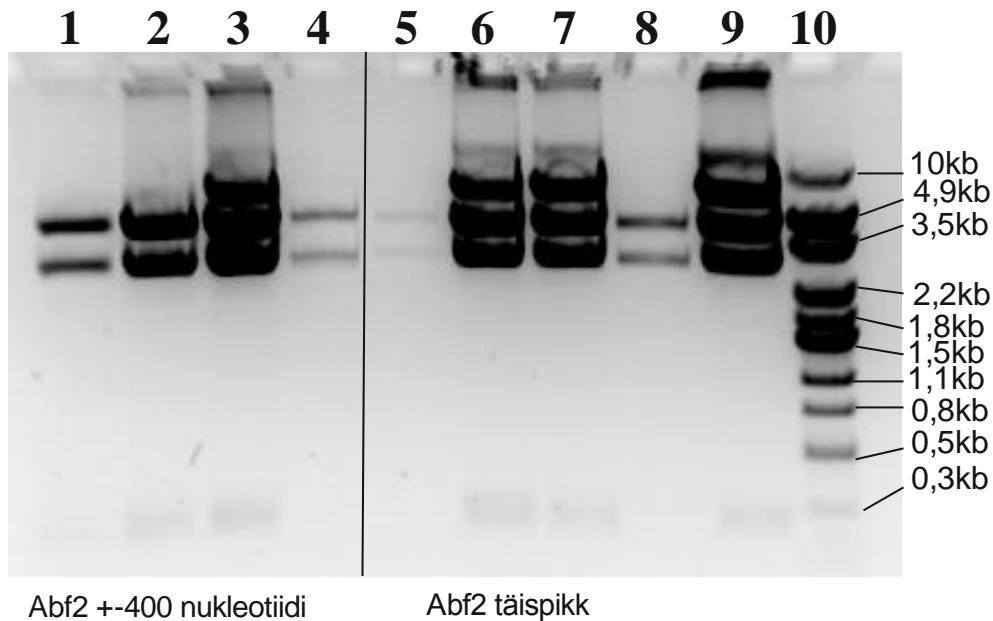
Lisad 1-3: Kõikidel radadel, peale markeri pealkirjaga radadel on, USP ja RSP universaalsete praimeritega amplifitseeritud Gcf1 fragmentide kloonid, erinevad kloonid on eraldatud üksteisest joonega ja allkirjutatud pildi all, restriksioonianalüüsiks valitud kloonid on märgitud punasega.



Lisad 4 ja 5: Kõikidel radadel, peale markeri pealkirjaga radadel on, USP ja RSP universaalsete praimeritega amplifitseeritud esimese katsega ebaõnnestunud Gcf1 fragmentide kloonid või Abf2 kloonid, erinevad kloonid on eraldatud üksteisest joonega ja allkirjutatud pildi all, restriksioonianalüüsiks valitud kloonid on märgitud punasega.



Lisa 6: Radadel 1 kuni 11 on StyI restriktasiga lõigatud erinevate Gcf1 fragmendiga kloonid, StyI-ga lõikamisel tekkis 2 selget triipu õnnestunud klonerimisel ja ainult 1 triip ebaõnnestunud klonerimisel; radadel 12-16 on BamHI + HindIII restriktasidega lõigatud Gcf1 fragmendid, restriksioonil tekkis 1 suur fragment ja üks väike, kahjuks pildil väikest fragmenti ei ole võimalik eristada, aga need kõik on õnnestunud proovid. Radadel 17 ja 19 on StyI positiivne kontroll. Rajal 18 on StyI negatiivne kontroll. Rajal 20 BamHI + HindIII restriksiooni positiivne kontroll. Rajal 21 MIX5 marker.



Lisa 7: Radadel 1 kuni 4 on Abf2 +-400 nukleotiidi fragmendid, mis olid lõigatud StyI restriksioonilise endonukleasiga. Radadel 5 kuni 9 on täispikka Abf2 fragmendid, mis olid lõigatud StyI restriksioonilise endonukleasiga. Rajal 10 on MIX5 marker. Positiivne tulemus on 2 triipu geelil, samasuguselt nagu eelmisel pildil. Kahjuks osa proovidest olid liiga kanged ja geelilaskmise hetkeks restriksioon oli toimunud neis vaid osaliselt, seetõttu tekkisid kolme või isegi nelja triibuga mustrid.

W303 <i>abf2</i> Δ, spoor2				
	Tassi nr.	Tassi nr.	Tassi nr.	Tassi nr.
YPG	1	2	3	4
0G	SAASTUNUD	109	83	75
2G	49	57	51	39
4G	26	32	54	62
6G	4	11	13	9
W303 <i>abf2</i> Δ, spoor2				
	Tassi nr.	Tassi nr.	Tassi nr.	Tassi nr.
YPD	1	2	3	4
0G	SAASTUNUD	82	104	201
2G	103	181	130	184
4G	171	178	153	134
6G	180	166	143	150
W303 <i>abf2</i> Δ, spoor2				
	Tassi nr.	Tassi nr.	Tassi nr.	Tassi nr.
YPG/YPD	1	2	3	4
0		1,32926829	0,79807692	0,37313433
300	0,47572816	0,31491713	0,39230769	0,21195652
490	0,15204678	0,17977528	0,35294118	0,46268657
650	0,02222222	0,06626506	0,09090909	0,06
W303 α (wt)				
	Tassi nr.	Tassi nr.	Tassi nr.	Tassi nr.
YPG	1	2	3	4
0G	133	163	174	204
2G	133	187	135	169
4G	193	124	197	179
6G	244	204	231	SAASTUNUD
W303 α (wt)				
	Tassi nr.	Tassi nr.	Tassi nr.	Tassi nr.
YPD	1	2	3	4
0G	181	175	184	160
2G	166	154	207	199
4G	166	170	165	193
6G	216	230	267	SAASTUNUD
W303 α (wt)				
	Tassi nr.	Tassi nr.	Tassi nr.	Tassi nr.
YPG/YPD	1	2	3	4
0	0,73480663	0,93142857	0,94565217	1,275
265	0,80120482	1,21428571	0,65217391	0,84924623
465	1,1626506	0,72941176	1,19393939	0,92746114
645	1,12962963	0,88695652	0,86516854	

Lisa 8: W303 *abf2* Δ, spoor2 ja W303α YPG tassidel üleskasvanud kolooniate arv ja YPD tassidel üleskasvanud kolooniate arv; YPG-l üleskasvanud kolooniate arvu ja YPD tassidel üleskasvanud kolooniate arvu suhe ehk elulemuse koefitsient.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Vlad-Julian Piljukov

(sünnikuupäev: 31.03.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
**Testsüsteem mitokondriaalse HMG-box valgu Gcf1 struktuuri analüüsiks,**

mille juhendaja on professor Juhan Sedman,

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015