

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
ÜLDISE JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Mari-Liis Süld

**Pärmi *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalse valgu Din7 deletsiooni  
mõju mitokondriaalsele DNA-le**

Bakalaureusetöö

Juhendaja PhD Tiina Sedman

TARTU  
2015

## Sisukord

Kasutatud lühendid .....	4
Sissejuhatus .....	5
1. Valdkonna/kirjanduse ülevaade .....	6
1.1. Pagaripärm <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kui mudelorganism.....	6
1.2. Mitokonder .....	6
1.3. mtDNA (mitokondriaalne DNA).....	7
1.4. <i>petite</i> fenotüüp .....	8
1.5. mtDNA stabiilsust mõjutavad faktorid.....	9
1.5.1. Reparatsioonivalgud pärimi mitokondris.....	10
1.5.2. Uuritava Din7 valgu roll mitokondris.....	12
2. Eksperimentaalosa.....	14
2.1. Töö eesmärgid .....	14
2.2. Materjal ja meetodika.....	14
2.2.1. Kasutatud plasmiidid, pärmitüved ja söötmed.....	14
2.2.2. Kasutatud praimerid ja PCR reaktsioonid .....	16
2.2.3. PCR produktide puhastamine .....	19
2.2.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tüvede tegemine Li-atsetaadi transformatsioonil.....	19
2.2.5. DNA eraldus Li-atsetaadi meetodil (Lõoke jt., 2011) .....	20
2.2.6. Pärimi genoomse DNA eraldamine .....	21
2.2.7. Pärimi mitokondriaalse DNA eraldamine.....	22
2.2.8. DNA restriksioon.....	23
2.2.9. Agaroosgeelelektroforees, Southern blot ja hübriidatsioon .....	23
2.3. Tulemused ja arutelu .....	25
2.3.1. w303 MAT $\alpha$ deletsioonitüve tegemine ja analüüs .....	26
2.3.2. Rho <sup>-</sup> deletsioonitüvede tegemine .....	28
2.3.2.1. Tüve a11 deletsioonimutantide mtDNA analüüs .....	30

2.3.2.2.	Tüve a1184 deletsioonimutantide mtDNA analüüs .....	32
2.3.2.3.	Tüve sk35 deletsioonimutantide mtDNA analüüs .....	34
2.3.2.4.	Tüve a1184 Din7 deletsioonimutandi analüüs 2D-agaroosgeelelektroforeesil .....	36
	Kokkuvõte .....	39
	Resume .....	40
	Kasutatud veebiaadressid .....	47
	Lisad .....	48
	Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks .....	51

## Kasutatud lühendid

2D – AGE – kahedimensionaalne agarosgeelelektroforees

BER – *base excision repair*, parandus lämmastikaluse väljalõikamisega

bp – *basepair*, aluspaar

DSB – *dual-strand break*, kaheaahelaline katke DNA ahelas

Hph – antibiootikum hügromütsiin B

HR – *homologous recombination*, homoloogiline rekombinatsioon

HS – hüpersupressiivne

HU – hüdroksüurea/ hüdroksükarbamiid

kb – *kilobasepair*, tuhat aluspaari

mtDNA – *mitochondrial DNA*, mitokondriaalne DNA, mitokondri genoom

N - neutraalne

NER – *nucleotide excision repair*, parandus nukleotiidi väljalõikamisega

NHEJ – *non-homologous end joining*, omavahel mittehomoloogiliste kaheaahelaliste katkete liitmine

ORF – *open reading frame*, avatud lugemisraam

*ori* – *replication origin*, replikatsiooni alguspunkt

*ori*<sup>0</sup> – *petite* mutant, mis ei sisalda *ori*-järjestusi

*ori*<sup>S</sup> – *surrogate ori sequence*, surrogaat *ori*-järjestus

*rep* – *replication origin*, aktiivne replikatsiooni alguspunkt

$\rho^-$  – pärmitüvi, mtDNA deletsioonide tõttu ei olda võimelised mitokondriaalseks geeniekspressiooniks

$\rho^+$  – pärmitüvi, mitokondri funktsioneerib normaalselt, fenotüübiliselt wt

$\rho^0$  – pärmitüvi, on kaotanud oma mtDNA

ROS – *reactive oxygen species*, reaktiivsed hapnikuühendid

S – supressiivne

SOD – *superoxide dismutase*, superoksiid dismutaas

wt – *wild type*, metsiktüüpi pärmitüvi

YPD – glükoosi sisaldav tardsööde

YPG – glütserooli sisaldav tardsööde

## Sissejuhatus

Funktsionaalne mitokondri varustab eukarüootset rakku eluks vajaliku energiaga. Selleks on vaja säilitada mitokondriaalse DNA (mtDNA) stabiilsus, sest see kodeerib hingamisahela toimimiseks vajalike valke. Pagaripärmil esineb 1% sagedusega *petite* fenotüübi nähtus, mille korral mitokondri DNA ümberkorralduste tõttu on kaotatud osa mitokondriaalsest genoomist ( $\rho^-$ ). Kaduma võib minna ka kogu mtDNA ( $\rho^0$ ). Säilinud fragment algsest mitokondriaalsest genoomist on stabiilsem kui wt (metsiktüüpi,  $\rho^+$ ) mtDNA, kuid ei suuda toetada mitokondriaalset funktsiooni. Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* suudab aga elada mitte-funktsioneeriva mitokondriga. See teeb pagaripärmi  $\rho^-$  tüvest ideaalse katsealuse uurimaks valke, mis on seotud mitokondriaalse genoomi ja selle stabiilsuse säilitamisega.

Mitokondris funktsioneerivate valkude mõju mitokondri DNA-le on erinev. Kui mitokondriaalse polümeraasi Mip1 deletsioon põhjustab mitokondriaalse genoomi kaotust (Fourey, 1989), siis näiteks mitokondriaalset helikaasi Hmi1 on vaja wt mtDNA säilitamiseks, aga mitte  $\rho^-$  mtDNA säilitamiseks (Sedman jt., 2000).

Pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* tuumas asuv geen DIN7 avastati, kui uuriti DNA kahjustuste poolt esile kutsutud geenide ekspressiooni. Mieczkowski jt näitasid 1997. aastal, et Din7 valgu tase tõuseb DNA kahjustuste korral, mis viitab Din7 valgu rollile mitokondriaalsete DNA vigastustega hakkama saamisel. Din7 valgu tase on rakus reguleeritud ning muutus valgutasemes toob kaasa mitokondriaalse genoomi ebastabiilsuse. Kuid Din7 valgu täpne roll mitokondriaalse genoomi stabiilsuse säilitamisel vajab veel selgitamist.

Minu bakalaureusetöö eesmärk oli uurida Din7 valgu mõju mitokondriaalse genoomi stabiilsusele.

Töö autor soovib tänada oma juhendajat, Tiina Sedmani, kogu osutatud abi ja juhendamise eest. Samuti väärivad tänu ülejäänud laborikaaslased, kelle osutatud abi eest töö autor väga tänulik on.

Märksõnad: mitokondriaalne genoom, Din7 valk, pärm *Saccharomyces cerevisiae*

## 1. Valdkonna/kirjanduse ülevaade

### 1.1. Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* kui mudelorganism

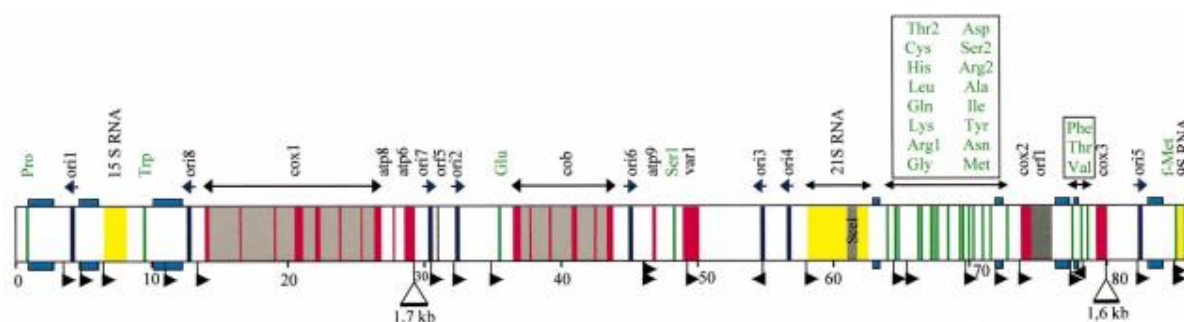
Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* on eukarüootne mikroorganism, mis kuulub seeneriigis (*Fungi*) kottseente (*Ascomycota*) hõimkonda. Ta paljuneb pungumise ja pooldumise teel ning elamiseks vajaliku energia saab suhkrute lagundamisest. Looduses leidub teda suhkrurikastes kohtades, näiteks viinamarjade peal. Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* on fakultatiivne anaeroob, st ta eelistab elada hapnikuga ehk aeroobses keskkonnas, kuid suudab elada ka ilma hapnikuta ehk anaeroobses keskkonnas (De Deken, 1966). Tolerantsus mutatsioonidele oma mitokondriaalses genoomis (Hyman jt., 1982) võimaldab tal elada ka ilma funktsionaalse hingamisahelata ning energiat elutegevuseks saab ta sel juhul glükolüüsist ja kääritamisest. Pagaripärm oli esimene eukarüoot, kelle genoom täielikult sekveneeriti. Tema genoom on 12 068 kilobaasi (kb) ning on jaotunud 16 kromosoomi vahel. Geene arvatakse tal olevat umbes 5885 (Goffeau jt., 1996). Pagaripärmil on omadusi, mis teevad temast teaduses laialdaselt ning kergelt kasutatava mudelorganismi: kiire kasv, rakkude hajutatud paigutus, mutantide kerge isoleeritavus, mittepatogeensus inimesele (laboris on temaga ohutu töötada), kerge ümberplaaditavus (ühelt söötmetassilt teisele viimine on lihtne) ning paindlik DNA transformatsiooni süsteem (ülevaade Sherman, 2002).

### 1.2. Mitokondrid

Mitokondrid on eukarüootides leiduvad kahe membraaniga organellid, millel on oma genoom ning mida leidub rakus mitmes korduses (Jensen jt., 2000). Mitokondri sisemembraani voltumisel moodustavad kristad, mille maatriksipoolsel küljel toimub oksüdatiivne fosforüleerimine ATP tootmiseks aeroobse hingamise käigus. Selleks on mitokondri sisemembraanil vajalikud kompleksid I, II, III ja IV ning kompleks V ( $F_1F_0$ -ATPaas). Neid hingamisahela subühikuid kodeerivad raku tuumagenoom ja mitokondriaalne genoom. Kuigi enamuse (95-98%) mitokondriaalsetest valkudest on kodeeritud tuuma poolt ning transporditud siis mitokondrisse (ülevaade Neupert, 1997), on vigastusteta mitokondriaalsel DNA-l asendamatu roll hingamisahela korrektsel töötamisel.

### 1.3.mtDNA (mitokondriaalne DNA)

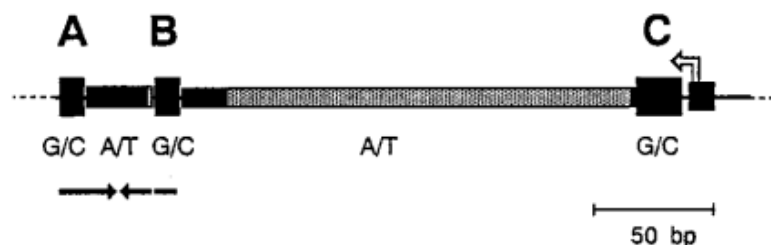
Mitokondri genoom on pakitud valkudega kompleksi (nukleoid), mida diploidsetes rakkudes leidub 50-70 (Miyakawa jt., 1984) ning haploidsetes 10-40 (Meeusen ja Nunnari, 2003). Mitokondri genoomis on geenitihedus madal ning gene iseloomustab ~30% G+C tihedus. Geenidevahelised alad sisaldavad mitmesaja aluspaari pikkuseid A+T järjestusi, nende vahel omakorda paiknevad umbes 10 kuni 80 aluspaari pikkused G+C rikkad järjestused (genoomi peale on neid umbes 150). Kogu genoomi keskmine G+C aluspaaride hulk on 17,1% (Foury jt., 1998). Mitokondri genoomi sekveneerimiseks kasutati tüve FY1679, mis on pärmi genoomi sekveneerimiseks kasutatud tüve S288C isogeenne derivaat (sisaldab samu gene). Sekveneerimise andmete põhjal saadi 85 779 aluspaari (bp) pikkune genoomikaart (joonis 1).



**Joonis 1. Tüve FY1679 sekveneerimisel saadud mtDNA lineaarsel kujul kujutatuna (Foury jt., 1998).** Punasega on märgitud eksonid ja valke kodeerivad geenid; halliga intronid ja intronitega seotud ORF-id; rohelisega tRNA-d; kollasega 9S, 15S ja 21S RNA-d; tumesinisega *ori*-elemendid; helesinisega lüngad, mis antud artiklis mtDNA kaardil täideti. Kolmnurgad tähistavad kaht suurt deletsiooni (võrreldud poolikult sekveneeritud tüvega D273-10B) (positsioonides 29 295 ja 80 030). Mustad lipud tähistavad transkriptsiooni initsiatsiooni saite (kokku leiti neid 19) ning lippude suund tähistab transkriptsiooni suunda. Näidatud on ka mtDNA poolt kodeeritavad hingamisahela komponendid: tsütokroom c oksüdaasi (kompleks IV) subühikuid I, II ja III (*cox1*, *cox2*, *cox3*);  $F_1F_0$ -ATPaasi (kompleks V) subühikuid 6, 8 ja 9 (*atp6*, *atp8*, *atp9*); apotsütokroom b (kompleks III) (*cytb*); ribosomaalne valk *var1*. Joonisel on näidatud 7 replikatsiooni *ori*-sarnast elementi ning 21S ja 15S ribosomaalsed RNA-d (15S RNA, 21S RNA). Veel on joonisel 24 tRNA-d ja RNAas P komponent 9S (9S RNA).

Kui pärmiraku tuumagenoomi replikatsioon on seotud rakutsükliga, toimudes S faasis (ettevalmistumine jagunemiseks), siis mtDNA replikatsioon toimub kogu rakutsükli jooksul (Sena jt., 1975). Mitokondriaalsed DNA molekulid on heterogeense suurusega, lineaarsed ning moodustavad hargnenud ahelaga võrgustiku, kuid leidub ka üheaahelisel ning tsirkulaarsel kujul DNA molekule. Tsirkulaarsete molekulide olemasolu tõttu arvati varasemalt, et mitokondriaalse genoomi replikatsioon toimub veereva ratta mudeli (RCR – *rolling-circle replication*; lineaarsed DNA molekulid kui RCR produkt) järgi (Maleszka jt., 1991). Hiljem lisandus sellele ka transkriptsiooni algatatud replikatsioon (Wang ja Shadel,

1999; Lecrenier ja Foury, 2000). Uuemate andmete põhjal peetakse replikatsiooni alternatiivseks algatajaks veel homoloogilist rekombinatsiooni (RDR – *recombination-driven replication*) (Gerhold jt., 2010, Bendich, 2010). Viimast toetab ka mtDNA võrgustiku moodustamine ja erinevate DNA topoloogiate esinemine (Gerhold jt., 2014).



**Joonis 2. *ori*-järjestuse ehitus (Lorimer jt., 1995).** Mustaga on märgitud 100% konserveerunud elemendid ning halliga vähem kui 100% konserveerunud elemendid. *Ori*-järjestused on umbes 300bp pikad järjestused, mis kattuvad omavahel umbes 80% ulatuses. Ehituselt sisaldab *ori*-järjestus A, B ja C blokki, need koosnevad 100% konserveerunud G+C rikastest järjestustest. A ja B bloki vahel asub 29bp pikkune A+T järjestus, B ja C bloki vahel aga umbes 200bp pikkune A+T järjestus (Baldacci jt., 1984). Bloki C kõrval ülesvoolu asub promootor (16bp pikkune A+T järjestus), joonisel C blokist paremal ning on tähistatud valge noolega, noole suund näitab transkriptsiooni suunda. Mustad nooled näitavad bloki A ja B ning nende vahel oleva A+T järjestuse poolt moodustatud ümberpööratud kordusi.

Metsiktüüpi pärmitüvedes ( $\rho^+$ ) leidub olenevalt tüvest 7-8 *ori*-järjestust (Foury jt., 1998). Aktiivseteks *ori*-järjestusteks peetakse *ori1*, *ori2*, *ori3* ja *ori5*; sest nad omavad transkriptsiooni promootorit (joonis 2). Neid arvatakse käituvat kui replikatsiooni alguspunktid ja seega kutsutakse ka *rep*-järjestusteks. Teised *ori*-järjestused sisaldavad katkestusi promootori järjestuses ning neid peetakse inaktiivseteks (Baldacci ja Bernardi, 1982; de Zamaroczy jt., 1979; MacAlpine jt., 2001). Ka ilma *ori*-järjestuseta mtDNA-d suudetakse säilitada. On leitud *ori<sup>S</sup>*-järjestusi („surrogaat“-järjestus), mis sisaldavad sarnasusi *ori*-järjestuste G+C klastritele (Goursot jt., 1982). Ka ainult A+T järjestustest koosnevat fragmenti suudetakse säilitada (Fangman jt., 1989).

### 1.4. *petite* fenotüüp

Akriflaviini poolt põhjustatud väikesed ning aeglaselt kasvavad *petite* mutandid avastati 1945.aastal Ehprussi ja tema kaastöötajate poolt. Nende poolt on ka näidatud, et *petite* mutantidel esinevad mitokondriaalses genoomis kas deletsioonid ( $\rho^-$ ) võib puudub neil mitokondriaalne genoom sootuks ( $\rho^0$ ) (ülevaade Ferguson ja von Borstel, 1992). Kuna *petite* mutantidel puudub funktsionaalne hingamisahel, suudavad nad kasvada vaid

fermenteeritavat süsinikuallikat (näiteks glükoosi) sisaldaval söötmel (Deken, 1966; Goldring jt., 1971).

Rekombinatsiooni suure sageduse tõttu võib suur hulk mtDNA-d deletsioonidega kaduma minna, sellised  $\rho^-$  mutandid tekivad  $\rho^+$  (funktsionaalne ja terve mtDNA) rakkudest jagunemise käigus sagedusega umbes 1% (Evans jt., 1985). Alles jäänud fragment  $\rho^+$  genoomist amplifitseeritakse normaalsele mtDNA tasemele (15-20% kogu rakus leiduvast DNA-st), need fragmendid esinevad mitokondriaalses genoomis tandeemsete järjestustena või palindroomsetelt (Locker jt., 1974). Samas võib mitokondri funktsiooni kaotuse põhjuseks olla ka mutatsioonid tuumegenoomi neis geenides (tähistatakse  $\text{pet}^-$ ), mis on seotud mitokondri metabolismiga (ülevaade Ferguson ja von Borstel, 1992).

$\rho^-$  mutandid on kas neutraalsed, supressiivsed või hüpersupressiivsed. Neutraalsed *petite* mutandid on sellised  $\rho^-$  või  $\rho^0$  mutandid, mis wt (metsiktüüpi) tüvega ristates annavad ainult wt ( $\rho^+$ ) rakke. 1965.aastal ristasid Ephrussi ja Grandchamp  $\rho^-$  mutante  $\rho^+$  tüvega ning suurem osa (S - supressiivsed) või kõik (~99%, HS - hüpersupressiivsed) järglastest olid  $\rho^-$  mutandid. Hüpersupressiivsete  $\rho^-$  mutantide korral on  $\rho^+$  genoomist säilinud fragmentidest leitud aktiivseid *ori*-järjestusi ning arvatakse, et *ori*-järjestuste suur tihedus annab HS  $\rho^-$  mutantidele (transkriptsiooni poolt algatatud) replikatsioonil eelise (Blanc ja Dujon, 1980; MacAlpine jt., 2001).

### **1.5.mtDNA stabiilsust mõjutavad faktorid**

Pärmi mitokondridites on rekombinatsioon väga aktiivne (Dujon jt., 1974). Üheaahelaliste ja kaheaahelaliste katkete parandamiseks on vaja homoloogilist rekombinatsiooni (HR). Kui HR toimub mitte-alleelsete järjestuste vahel, siis võib see tekitada ümberkorraldusi ning deletsioone, mis viivad mitokondri funktsionaalsuse kaotuseni (Kaniak jt., 2009). On täheldatud, et mtDNA rekombinatsioon toimub eelistatult G+C rikaste kordusjärjestuste juures ning kuna rekombinatsioonis osalevad ka mittekodeeriva ala G+C klastrid, siis võib spontaansete *petite* mutantide tekkepõhjuseks olla rekombinatsioon erinevate G+C klastripaaride vahel (Dieckmann ja Gandy, 1987; Zinn jt., 1988; ülevaade Bernardi, 2005).

Mutatsioonid (näiteks punktmutatsioonid) võivad mõjutada hoopis mtDNA neid osi, mis osalevad valkude sünteesis (tähistatakse ka  $\text{mit}^-$ ). Võib juhtuda, et muutused genoomi primaarstruktuuris ilmnevad alles interaktsioonides keskkonnaga, näiteks valkude madalam termostabiilsus kõrgematel temperatuuridel ning sellest tulenev madalam replikatiivsus/transkriptiivsus (Slonimski ja Tzagoloff, 1976; ülevaade Bernardi, 2005).

Kuna mtDNA asub mitokondris sisemise membraani külge seotud nukleoididena (mtDNA kompleksis valkudega), siis on suureks mtDNA kahjustajaks oksüdatiivse fosforüleerimise käigus tekkivad reaktiivsed hapnikuühendid (*ROS – reactive oxygen species*) (Friedberg jt., 1995). ROS ehk reaktiivsed hapnikuühendid võivad tekkida ka tsütosoolis oksüdatiivsete protsesside käigus, kuid enamik ROS-e tekib mitokondri hingamisahelas: superoksiid ( $O_2^-$ ), vesinikperoksiid ( $H_2O_2$ ), hüdroksüülradikaal ( $\cdot OH$ ). Nagu enamikel eukarüootidel, on ka pärmil vahendid ROS toime tulemiseks; näiteks nii tsütosoolis kui mitokondris on ensüüm superoksiid dismutaas (SOD), geenide SOD1 ja SOD2 produktid (ülevaade Contamine ja Picard, 2000).

Pärmi mtDNA organiseeritus vastab aktiivsele ning reguleeritud replikatsiooni-, transkriptsiooni- ja rekombinatsiooniprotsessidele. Selle hinnaks on aga genoomi ebastabiilsus (ülevaade Bernardi, 2005).

### **1.5.1. Reparatsioonivalgud pärmi mitokondris**

Protsessid nagu replikatsioon, reparatsioon ning mtDNA üldine hooldus on mitokondris üksteisega seotud. Arvatakse, et tuumas ja mitokondris esinevad sarnased rajad ning selle toetuseks on leitud nii tuumast kui mitokondrist homoloogilisi valke (näiteks on mitokondriaalse Msh1 valgu homoloogid tuumas Msh2, Msh3 ja Msh6). Samas ei pruugi mitokondri valgud mõjutada mtDNA stabiilsust samamoodi, nagu nende homoloogid tuumas (Moorkerjee jt., 2006). Sarnaselt tuumale arvatakse mitokondris esinevat BER (*base excision repair*, vigane lämmastikalus lõigatakse ahelast välja), valepaardumiste parandamist (*mismatch repair*), ning kaheaahelaliste katkete parandamist HR (*homologous recombination*, homoloogilise rekombinatsiooni) ja NHEJ (*non-homologous end joining*, omavahel liidetakse mittehomoloogilised kaheaahelalised otsad) meetodil (ülevaade Svilar jt., 2011; Kalifa jt., 2012).

Kaheaahelaliste katkete parandamisel tuumas homoloogilise rekombinatsiooni teel osaleb MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) kompleks, mis tekitab 3' üleulatuva otsa. See vaba ots omakorda moodustab homoloogilises piirkonnas dupleksi ning on nõnda praimeriks DNA sünteesil. Yku70 ja Yku80 valgud moodustavad heterodimeeri, mis seondub kaheaahelalise katkega ning takistab 5' otsa lagundamist vaba 3' otsa tekitamiseks. Nad soodustavad kaheaahelaliste katkete omavahel ligeerimist (NHEJ). DNA parandused nii HR kui NHEJ meetodil panustavad DNA korrashoidu, kuid viivad ümberkorraldusteni, kui toimuvad mitte-alleelsete järjestuste vahel. Tüves, kus puudusid MRX kompleks ning Ku valgud, täheldati vähesel

määril *petite* mutantide tekkesageduse suurenemist. Arvatakse, et mitokondris esinevad samad või sarnase funktsiooniga valgud (Kalifa jt., 2012).

BER (*base excision repair*) käigus lõigatakse kahjustatud lämmastikalus DNA ahelast välja. Ntg1, Ogg1 ja Ung1 on mitokondri N-glükosülaasid, mis tunnevad ära spetsiifilisi DNA vigastusi (Ogg1 oksüdatiivseid kahjustusi, Ung1 uratsiili ning Ntg1 oksüdeeritud pürimidiine) ning eemaldavad N-glükosülaasse aktiivsuse abil vale või vigastatud lämmastikaluse, tekitades seega DNA ahelasse lämmastikalust mittesisaldava (*abasic*) koha. Selle tunneb ära endonukleas Apn1, mis lõigates DNA 5' otsa, loob DNA polümeraasile täitmiseks sobiva augu. Fosfodietersideme taastab ligaas (ülevaade Foury jt., 2004; O'Rourke jt., 2002).

Msh1 valk vahendab valepaardumiste (*mismatch*) parandamist, ta seondub valesti paardunud lämmastikaluseid sisaldava DNA-ga kasutades selleks ATP-d. Msh1 on vajalik mtDNA punktmutatsioonide kuhjumise vältimiseks. Arvatakse, et Msh1 täidab mitokondris ka teisi ülesandeid, näiteks supresseerib rekombinatsiooni (ülevaade Lipinski jt., 2010; Moorkerjee jt., 2006).

Rekombinaas Mhr1 osaleb nii rekombinatsioonis kui reparatsioonis, soodustades üheaahelalise DNA seondumist homoloogilise kaheaahelalise DNA-ga (Ling jt., 2000; Ling ja Shibata, 2002).

Rad27, mida teatakse funktsioneerivat tuumas, on leitud ka mitokondrist. RAD27 geeni deletsiooniga pärimitüvedel on täheldatud suuremal määral mtDNA punktmutatsioonide kuhjumist ning arvatakse, et antud endonukleas mängib mtDNA parandustes otsest rolli lämmastikaluste väljalõikamises. Kuid samas on Rad27 puudusel mtDNA ümberkorraldused inhibeeritud (Wu ja Wang, 1999; Kalifa jt., 2009).

Mgm101 on üheaahelalise DNA-ga seonduv nukleiodi valk, mis osaleb oksüdatiivselt kahjustatud mtDNA rekombinatsioonilises parandamises ja replikatsioonis. Ta soodustab üheaahelalise DNA seondumist komplementaarse üheaahelalise DNA-ga. Mgm101 puudulikkus teeb rakud mutageenide (UV-kiirgus,  $\gamma$ -kiirgus,  $H_2O_2$  - vesinikperoksiid) suhtes tundlikumaks, funktsionaalsuse kaotus viib aga mtDNA fragmenteerumiseni (Meeusen jt., 1999; Mbantekhu jt., 2011).

Replikatsioonil tekkivate vigade vähendamiseks on mitokondriaalsel DNA polümeraasil (kodeeritud geeni MIP1 poolt) ka 3'→5' eksonukleasne korrigeeriv (*proof-reading*) aktiivsus. MIP1 geeni esinemine ainult ühes korduses (heterosügootsus) põhjustab *petite*

fenotüüpi (ülevaade Contamine ja Picard, 2000), MIP1 geenita haploidid on aga  $\rho^0$  (Foury, 1989). 216 aluspaarine deletsioon MIP1 geenis muudab ensüümi vigadealtimaks ning glükoosi sisaldaval söötmel kaotatakse haploidses tüves mtDNA replikatsiooni defektsuse tõttu kiiresti. Glütserooli sisaldaval söötmel mtDNA küll säilib, kuid kasv on väga aeglane (arvatakse, et väiksema mtDNA taseme tõttu rakus) (Young jt., 2006).

### 1.5.2. Uuritava Din7 valgu roll mitokondris

Pärmi IV kromosoomis asuv 1293 bp suurune geen DIN7 kodeerib 430 aminohappes koosnevat valku Din7, mis lokaliseerub mitokondris ning funktsioneerib seal nukleaasina (Fikus jt., 2000). DIN7 avastati, kui uuriti DNA mutageenide (UV-kiirgus, HU - hüdrosüüurea, MMS – metüülmetaansulfonaat, aga mitte  $H_2O_2$ ) poolt indutseeritud (*DIN - damage inducible*) geenide ekspressiooni. Ka tõuseb Din7 valgu tase meiosis seoses rekombinatsiooniga (Mieczkowski jt., 1997; Ling jt., 2013).

Aminohappelise järjestuse alusel paigutatakse Din7 samasse perekonda valkudega, mis osalevad DNA parandamises ning replikatsioonis, üheks neist on *Saccharomyces cerevisiae* Rad2, mis koos Rad27 on ka Din7 valgu struktuurne homoloog. Din7 jagab perekonda valkudega, millele omistatakse DNA endo- ja 5'→3' eksonukleaasne aktiivsus (Mieczkowski jt., 1997; Fikus jt., 2000).

Exo1 on Din7 paraloog tuumas (need valgus on aminohappeliselt järjestuselt 56% identsed). Exo1 on 5'→3' suunaline eksonukleaas, mis küll osaleb mitmes DNA metabolismirajas, kuid pole neis üheski elutähtis. Teada on Exo1 osalemine valepaardumiste parandamisel, kus ta interakteerub valguga Msh2 ja Mlh1. EXO1 geeni deletsioon tekitab ainult 2-4 kordse mutatsioonisageduse suurenemise tuumas (Goellner jt., 2015) ning nõrga UV-kiirguse tundlikkuse (Qiu jt., 1998). Din7 valk aga ei suuda EXO1 deletsioonimutantides Exo1 funktsiooni täita, kuna tal puudub domään, mis interakteeruks Msh2 valguga (Fikus jt., 2000).

Kinaasi Dun1 puudusel tõuseb DIN7 ekspressioonitase (Mieczkowski jt., 1997). Dun1 on efektorkinaas Mec1/Rad53 DNA kahjustuste signaalirajas ning fosforüleerides transkriptsioonilise repressori Crt1 tõstab ta mitmete DNA vigastuste poolt indutseeritud geenide ekspressioonitaset. Dun1 on DIN7 negatiivne regulaator, ta seondub Dun1-spetsiifilisele repressorilale DIN7 promootoris. DIN7 ja NTG1 promootoralas esineb mõlemal 19 bp konserveerunud järjestus, kuid sinna seonduv transkriptsioonifaktor pole teada (Yoshitani jt., 2008). Kuna nii DIN7 geeni üleekspressioon, promootorist repressorala deleteerimine kui ka DIN7 geeni deletsioon (haploididel) suurendab *petite* mutantide

tekkesagedust, siis tähendab see, et DIN7 ekspressioon on rakus väga kindlalt reguleeritud ning normaalsest kõrgem või madalam tase toob kaasa mitokondriaalse genoomi ebastabiilsuse (Fikus jt., 2000; Koprowski jt., 2003; Yoshitani jt., 2008).

Varasemalt on Din7 valku seostatud DNA paranduse ja rekombinatsiooniga mitokondris, sest vegetatiivse kasvu juures on DIN7 ekspressioonitase madal, ekspressioonitase suureneb vastusena kokkupuutele DNA mutageenidega ning DIN7 üleekspressiooniga kaasnevad mtDNA ümberkorraldused (Koprowski jt., 2003). Tänapäevaks on teada Mhr1 (ekspresseeritakse pidevalt) ja Din7 (ekspressioon indutseeritud kahjustatud DNA poolt) omavahelise tasakaalu tähtsust mtDNA terviklikkuse ja stabiilsuse säilitamisel. Din7 omab kaheaheelise DNA substraadil 5'→3' eksonukleaset aktiivsust, tootes 3' üheaheelise üleulatava otsaga DNA molekule (Ling jt., 2013). Arvatakse, et Din7 tekitab kaheaheelise katkele (*DSB – dual-stranded break*) 3' üleulatava otsa ning Mhr1 suunab homoloogilise rekombinatsiooni toimumist. Din7 üleproduksioon soodustab kaheaheeliste katkete tekkimist ja üheaheelise DNA hulga suurenemist, sest Din7 liigse nukleaase aktiivsuse tõttu on DSB parandamine koormatud. Ka soodustab ta Mhr1-st mittesõltuva rekombinatsiooni toimumist mitte-homoloogiliste järjestuste vahel, mis omakorda soodustab *petite* mutantide tekkesagedust. DIN7 üleproduksiooni tasakaalustab Mhr1 üleproduksioon, mis pigem soodustab kaheaheeliste katkete rekombinatsioonilist parandamist ning vähendab mtDNA koopiaarvu suurenemist. Koos üleprodutseerituna soodustavad mõlemad homoloogilise rekombinatsiooni toimumist (Ling jt., 2013).

## 2. Eksperimentaalosa

### 2.1. Töö eesmärgid

Minu bakalaureusetöö oli osa suuremast projektist, millega uuritakse *Saccharomyces cerevisiae* erinevate mitokondriaalsete valkude mõju mitokondriaalse genoomi stabiilsusele.

- Minu töö eesmärk oli uurida DIN7 geeni deletsiooni mõju rho<sup>-</sup> tüvede mtDNA-le. Täpsemalt uuriti, kas Din7 puudus põhjustab eri mtDNA suurustega rho<sup>-</sup> tüvedel mtDNA fragmenteerumist.
- Lisaks vaadati, kas Din7 puudus mõjutab mtDNA topoloogiat.
- Teostati ka DIN7 geeni deletsioon haploidsele w303 MAT $\alpha$  pärmitüvele ja jälgiti mutantide fenotüüpi.

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. Kasutatud plasmiidid, pärmitüved ja söötmed

Plasmidi pFA6a HphMX6 kasutati antibiootikumi Hph (hügromütsiin B) resistantsusgeeni sisaldava PCR produkti saamiseks (Hentges jt., 2005). Silja Kuuse tehtud pBluescript II KS+ plasmidi, mis sisaldab rho<sup>-</sup> sk35 tüve mtDNA järjestust, kasutati sk35 tüve radioaktiivse mitokondriaalse proovi tegemiseks.

Kasutatud *Saccharomyces cerevisiae* tüved:

**Tabel 1.** Töös kasutatud pärmitüved

Tüve nimi	Kirjeldus	Autor
w303 MAT $\alpha$	Genotüüp: <i>MAT<math>\alpha</math> ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i> Haploid, rho <sup>+</sup> , <i>ade2</i> mutatsiooni tõttu hingavad kolooniad glükoosisöötmel punaka värvusega	Laborist saadud
w303 MAT $\alpha$ <i>din7::HphMX6</i>	Genotüüp: <i>MAT<math>\alpha</math> ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100, din7::HphMX6</i> Haploid, rho <sup>-</sup> , geen DIN7 asendatud Hph antibiootikumi resistantsusgeeniga	Valmistatud autori poolt
w303 MAT $\alpha$ Sa11 *edasipidi a11 S - supressiivne	Genotüüp: <i>MAT<math>\alpha</math> ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i> Haploid, rho <sup>-</sup> , sisaldab <i>ori3</i> , mtDNA fragmendi suurus on 1790 bp	Valmistatud Tiina Sedmani poolt

w303 MATa Sa11 <i>din7::HphMX6</i>	Genotüüp: <i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100, din7::HphMX6</i> Haploid, rho <sup>-</sup> , sisaldab <i>ori3</i> , mtDNA fragmendi suurus on 1790 bp, DIN7 geen asendatud Hph antibiootikumi resistantsusgeeniga	Valmistatud autori poolt
w303 MATa Sa11 <i>ste5::HphMX6</i>	Genotüüp: <i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100, ste5::HphMX6</i> Haploid, rho <sup>-</sup> , sisaldab <i>ori3</i> , mtDNA fragmendi suurus on 1790 bp, STE5 geen asendatud Hph antibiootikumi resistantsusgeeniga	Valmistatud autori poolt
w303 Sa1184 *edaspidi a1184 S - supressiivne	Genotüüp: <i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i> Haploid, rho <sup>-</sup> , sisaldab <i>ori2</i> ning <i>ori7</i> B ja A blokki, mtDNA fragmendi suurus 1184 bp	Valmistatud Karin Villemsoni poolt
w303 Sa1184 <i>din7::HphMX6</i>	Genotüüp: <i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 din7::HphMX6</i> Haploid, rho <sup>-</sup> , sisaldab <i>ori2</i> ning <i>ori7</i> B ja A blokki, mtDNA fragmendi suurus 1184 bp	Valmistatud autori poolt
w303 Sa1184 <i>ste5::HphMX6</i>	Genotüüp: <i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 ste5::HphMX6</i> Haploid, rho <sup>-</sup> , sisaldab <i>ori2</i> ning <i>ori7</i> B ja A G+C blokki, mtDNA fragmendi suurus 1184 bp	Valmistatud autori poolt
W303-1 Nsk35 *edaspidi sk35 N- neutraalne	Genotüüp: <i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 hmi1::TRP1 HMI1-KanMX4</i> Haploid, neutraalne rho <sup>-</sup> , sisaldab fragmenti 21S RNA geenist, mtDNA fragmendi suurus 469 bp	Valmistatud Silja Kuuse poolt (Sedman jt., 2000)
sk35 <i>din7::HphMX6</i>	Genotüüp: <i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 hmi1::TRP1 HMI1-KanMX4 din7::HphMX6</i> Haploid, neutraalne rho <sup>-</sup> , sisaldab fragmenti 21S RNA geenist, mtDNA fragmendi suurus 469 bp	Valmistatud autori poolt

sk35 <i>ste5::HphMX6</i>	Genotüüp: <i>MAT<math>\alpha</math> ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 hml1::TRP1 HMI1-KanMX4 ste5::HphMX6</i> Haploid, neutraalne rho <sup>-</sup> , sisaldab fragmenti 21S RNA geenist, mtDNA fragmendi suurus 469 bp	Valmistatud autori poolt
-----------------------------	---	--------------------------

Kasutatud söötmed:

YPD: 1% pärmiekstrakt, 2% baktotrüpton, 2% glükoos (vedelsööde); tardsöötme korral lisati vedelsöötmele 1,7% agarit.

YPG: 1% pärmiekstrakt, 2% baktotrüpton, 3% glütserool (vedelsööde); tardsöötme korral lisati vedelsöötmele 1,7% agarit.

Tardsöötmetassidele lisati vajadusel antibiootikumi Hph-d (hügramütsiin B) (0,3mg/ml) ja G418 sulfaati (0,3mg/ml).

Pärmitüvesid kasvatati 25°C või 30°C juures.

## 2.2.2. Kasutatud praimerid ja PCR reaktsioonid

Kasutatud praimerid:

**Tabel 2.** Töös kasutatud praimerid

Praimeri nimetus	Järjestus 5'→3'	Kirjeldus
Din7 up forward	GCC TCA AGC TGC AGT GCT TC	Praimer seondub geenist DIN7 ülesvoolu (pärisuunaline)
Din7 down reverse	CTT CCT CCA GAG ACG AGA AA	Praimer seondub geenist DIN7 allavoolu (vastassuunaline)
Din7 S1	GAG AAA ACG ATC ATC AAA ATT AAC AAC AAG AAC ATT ATT ATT CGA TAG GAC <u>GTA CGC TGC</u> <u>AGG TCG AC</u>	Praimer sisaldab komplementaarset ala DIN7 <i>ORF</i> -st ülesvoolu paikneva järjestusega (pärisuunaline). Lisaks sisaldab plasmidi pFA6a HphMX6 spetsiifilist järjestust (allajoonitud).
Din7 S2	ACA ACT ATG AAA ATA TTA CAA CAA TAC CTT CGA ACA TAT ATA TAC ACC ACA <u>TCG ATG AAT</u> <u>TCG AGC TCG</u>	Praimer sisaldab komplementaarset ala DIN7 <i>ORF</i> -st või allavoolu paikneva järjestusega (vastassuunaline). Lisaks sisaldab plasmidi pFA6a HphMX6 spetsiifilist järjestust (allajoonitud).

Ste5 KANMX4N	CTA AAA AAG GAA GAT ACA GGA TAC AGC GGA AAC AAC TTA TAA ATG <u>CGT ACG CTG CAG GTC</u> <u>GAC</u>	Praimer sisaldab komplementaarset ala STE5 <i>ORF</i> -st ülesvoolu paikneva järjestusega (pärisuunaline). Lisaks sisaldab plasmidi pFA6a HphMX6 spetsiifilist järjestust (allajoonitud).
Ste5 KANMX4C	GGG ATG CTT TCT TTT TAT TAT TGC ATA AAA TTT AGT GTA TAC <u>TCT</u> <u>AGA ATT CGA GCT CGT</u> <u>TTT CGA CAC</u>	Praimer sisaldab komplementaarset ala STE5 <i>ORF</i> -ist allavoolu paikneva järjestusega (vastassuunaline). Lisaks sisaldab plasmidi pFA6a HphMX6 spetsiifilist järjestust (allajoonitud).
Ste5 prom	TAT TTC GAG TGA AGA AGA AGC GTT AAA	Praimer sondu STE5 promotori (pärisuunaline).
rev Hph 5 out	ACA TGG GGA TGT ATG GGC TA	Praimer seondub Hph resistantsusgeenile (vastassuunaline)
ORI5 in	GGG GGT CCC AAT TAT TAT TTT C	Praimer seondub mtDNA <i>ori</i> järjestusele (pärisuunaline)
ORI3 in	TAG GGG GAG GGG GTG GGT	Praimer seondub mtDNA <i>ori</i> järjestusele (vastassuunaline)
21R1	ACC AGA TTT GTC TTT CAC TAC	Praimer seondub tüve sk35 mtDNA fragmendile (vastatssuunaline)
21F1	TAC CGT AAG GGA AAG TAT GAA	Praimer seondub tüve sk35 mtDNA fragmendile (pärisuunaline)
pYM_check reverse	GCG CAC GTC AAG ACT GTC AAG G	Praimer seondub Hph või Kan resistantsusgeeni promotori (vastassuunaline)
DNR3834	CCG AAT TCG CTA AAA TTG GTA TCT CCG TA	Praimer seondub DNA2 geenile (2752 bp)
DNR4193	CCG GAT CCT ATT GCT TCT TTT TGA TTC AA	Praimer seondub DNA2 geenile (3188 bp)
Sec6 forward	CTT TAG GCC TAA TCA CAT TGA TGT TCG A	Praimer seondub SEC6 geenile (pärisuunaline)
Sec6 reverse	AAC AGC ACA GAA TTC ATC TGA GGT TTG	Praimer seondub SEC6 geenile (vastassuunaline)

**Tabel 3.** Töös kasutatud PCR reaktsioonid

1. DNA denaturatsioon	95°C 5 minutit	95°C 5 minutit	95°C 3 minutit	95°C 3 minutit
2. DNA denaturatsioon	95°C 30 sekundit	95°C 30 sekundit	95°C 30 sekundit	95°C 30 sekundit
3. Praimerite seondumine	57°C 30 sekundit	53°C 30 sekundit	54°C 30 sekundit	54°C 30 sekundit
4. DNA süntees	72°C 2 minutit	72°C 30 sekundit	72°C 20 sekundit	72°C 30 sekundit
Tsükleid (kordub 2.-4.)	30	30	15	16
Milleks kasutati?	DIN7 ja STE5 antibiootikumi-kassetti valmistamine	$\Delta$ din7 ja $\Delta$ ste5 transformatsiooni kontroll	sk35 mitokondriaalse ja nukleaarse radioaktiivse proovi valmistamine	nukleaarse ja <i>ori</i> järjestuse radioaktiivse proovi valmistamine

**Tabel 4.** Töös kasutatud PCR reaktsioonisegud

Milleks kasutati	Reaktsioonisegu
DIN7 ja STE5 antibiootikumi-kassetti valmistamine transformatsiooniks	30 $\mu$ l reaktsiooni-segu: 1xPCR puhver (75mM Tris-HCl pH8,8; 20mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 0,01% Tween 20; tehtud Maie Loorits poolt); 0,25mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,02mM dNTP; ~100ng pFA6a Hph plasmidi; päri- ja vastassuunalised praimerid (10pmol; Din7 S1 ja Din7 S2 või STE5KANMX4N ja STE5KANMX4C); 0,4 $\mu$ l ensüümi Taq+Pfu (1:5 suhtes, 0,25U/ $\mu$ l); mQ H <sub>2</sub> O (30 $\mu$ l mahuni)
Transformatsiooni kontroll	10 $\mu$ l reaktsiooni-segu: PCR yellow puhver (75mM Tris-HCl pH 8,8; 20mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 0,01% Triton X-100; 0,5% Ficoll400; 1mM Tartazine; tehtud Maie Loorits poolt); 0,25mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,02mM dNTP; päri- ja vastassuunalised praimerid (10pmol; Din7 up forward ja Din7 down reverse, Din7 up forward ja pYM_check reverse või Ste5 prom ja hph rev 5 out); 0,4 $\mu$ l ensüümi Taq (5U/ $\mu$ l); lüüsitud rakke või 2 $\mu$ l eraldatud DNA-d; mQ H <sub>2</sub> O (10 $\mu$ l mahuni)

Radioaktiivse proovi valmistamine	20µl reaktsiooni-segu: 1xPCR puhver; 0,25mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,02mM dNTP( - dATP); 2µl <sup>32</sup> P-dATP; 0,5µl eelnevalt samade praimeritega amplifitseeritud fragment (sk35, sec6, dna2, ORI); päri- ja vastassuunalised praimerid (21R1+21F1, sec6 oligod, dna2 oligod, ORI5in+ORI3in); 0,4µl ensüümi Taq (5U/µl); mQ H <sub>2</sub> O (20µl mahuni)
2D-AGE radioaktiivse mitokondriaalse proovi valmistamine	Kasutati Thermo Scientific DecaLabel™ DNA Labelling Kit-i. Kasutati laboris olemasolevat a1184 puhastatud mtDNA-d (eelnevalt puhastatud Karin Villemsoni poolt) ~100ng. DNA sünteesiks kasutati komplekti kuuluvat ensüümi Klenow-i fragment.
PCR reaktsioonides kasutati Eppendorfi või Biometra Thermocycler T1 PCR masinaid.	

### 2.2.3. PCR produktide puhastamine

Radioaktiivsete proovide ja transformatsiooni jaoks puhastati PCR produkt järgmiselt: PCR produktile (30µl) lisati 170µl T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (pH 7,5), 4µl dekstraani (10mg/ml) ning 80µl fenoolkloroformi pH 7,5. Segule tehti vorteks 30 sekundit ning lasti 1 minut seista seejärel korrati vorteksit ja lasti taas seista 1 minut. Segu tsentrifugeeriti (Eppendorf Centrifuge 5415 C) 5 minutit pöoretel 13400/min ning ülemine vesifaas kanti uude 1,5ml tuubi. Vesifaasile lisati 1/10 mahu väärtuses 3M Na-atsetaati (pH 7,0) ning 2,5 ml 96% etanooli, segati vorteksil ning pandi -20°C juurde sadenema (minimaalselt 15 minutit). Edasi fuugiti sadestatud segu 5 minutit pöoretel 13400/min, sademelt eraldati supernatant ning sademele lisati 100µl 80% etanooli. Peale paar minutit tsentrifugeeriti segu 5 minutit pöoretel 13400/min ning eemaldati sademelt supernatant. Transformatsiooni PCR produktid lahustati 30µl T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> lahuses ning radioaktiivsed proovid 100µl TEN (10mM Tris; 1mM EDTA; 100mM NaCl) lahuses. Sk35 mtDNA amplifitseeriti seda järjestust sisaldavalt plasmiidilt PCR reaktsiooniga. Saadud sk35 mtDNA fragment puhastati Favorgen GEL/PCR Purification Kit-i kasutades.

### 2.2.4. *Saccharomyces cerevisiae* tüvede tegemine Li-atsetaadi transformatsioonil

PCR produkt, mis sisaldab Hph resistantsusgeeni ja otstes geeni DIN7 või STE5 regiooniga homoloogilist järjestust, transformeeriti w303 MAT $\alpha$  ning rho<sup>-</sup> (a11, a1184, sk35) tüvedesse. Transformatsiooni toimumist kontrolliti hügomütsiini B sisaldavatel YPD söötmetassidel, w303 MAT $\alpha$  korral ka hügomütsiini B sisaldaval YPG tardsöötmel. Resistantsusgeeni õiget integratsiooni kontrolliti PCR meetodil.

Rakud kasvatati 30°C (või 25°C) loksutil (pöördeid 180 minutis) 20ml YPD vedelsöötmes tiheduseni ( $OD_{600}$  – mõõdetakse rakke sisaldava vedelsöötme optiline tihedus lainepikkusel 600nm rakke mitte-sisaldava vedelsöötme vastu) 0,4-0,5 (logaritmiline kasvufaas). Seejärel rakukultuur valati 50ml tuubidesse ning tsentrifugeeriti („Hettich“ Universal 32R tsentrifugeer, rootor 1617 Swing-out) 4 minutit pööretel 3200/min. Sööde valati pealt, rakkude sade resuspendeeriti 20ml steriliseeritud (deioniseeritud) vees ning segati läbi, edasi tsentrifugeeriti taas 4 minutit pööretel 3200/min. Saadud sademelt valati ära supernatant ja rakkude sade resuspendeeriti 1ml 0,1M Li-atsetaat  $T_{10}E_1$  (10mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA pH 8,0) lahuses ning kanti pipetiga uude steriilsesse 1,5ml tuubi. Seejärel tsentrifugeeriti (Eppendorf „Minispin“ lauatsentrifugeer, rootor F-45-12-11) rakususpensiooni 1 minut pööretel 4000/min ning eemaldatakse supernatant. Rakusade suspendeeriti 50µl 0,1M Li-atsetaat  $T_{10}E_1$  lahuses ja inkubeeriti 30°C juures 20 minutit. Selle aja jooksul denatureeriti 95°C juures 5 minutit 20µl *carrier*-DNA-d (100µg Amresco DNA Sodium Salt, Herring Sperm) ning jahutati jääl 5 minutit. Rakususpensioonile lisati 4µl (~1 µg) PCR produkti (mis sisaldab soovitud antibiootikumi resistantsusgeeni ning asendatava geeniga homoloogset järjestust) ning 20µl (100µg) eelnevalt denatureeritud ja jääl jahutatud *carrier*-DNA-d. DNA segati rakususpensiooniga ning inkubeeriti 30°C juures 20 minutit, vahepeal segades. Seejärel lisati 300µl 40% PEG Li-atsetaat  $T_{10}E_1$  lahust ning segati. Segu inkubeeriti 30°C juures 30 minutit. Edasi lisati 35µl 100% DMSO ning segati. Seejärel viidi läbi kuumašokk, selleks hoiti segu 42°C juures 10 minutit. Rakud tsentrifugeeriti 1 minut pööretel 4000/min ja segu eemaldati, rakusade võeti üles 500µl YPD vedelsöötmes ning kanti katseklaasi, lisati 2500µl YPD vedelsöödet. Rakke kasvatati katseklaasis 30°C juures loksutil (pöördeid 180 minutis) üleöö. Järgneval hommikul rakkud tsentrifugeeriti (Eppendorf „Minispin“ lauatsentrifugeeriga) kokku (1 minut 4000 pööret/min), jaotati kaheks ning kanti YPD Hph (w303 MAT $\alpha$  puhul ka YPG Hph) tardsöötmele (edasi kasvatati 30°C juures 3 päeva). Sk35 puhul toimus topeltseleksioon (tardsöötmetassid sisaldasid ka lisaks G418 sulfaati).

### **2.2.5. DNA eraldus Li-atsetaadi meetodil (Lõoke jt., 2011)**

1,5ml tuubi viidi tardsöötmetelt 2-3 keskmise suurusega kolooniat. Rakud resuspendeeriti 100µl 200mM Li-atsetaadi 1% SDS lahuses. Segu inkubeeriti 70°C juures 10 minutit. Edasi lisati segule 300µl 96% etanooli ning lasti toatemperatuuril seista 2 minutit. Seejärel tsentrifugeeriti (Eppendorf „Minispin“ lauatsentrifugeer, rootor F-45-12-11) segu 2 minutit pööretel 13400/min ning supernatant eemaldati. Sademele lisati 500µl 70% etanooli ning lasti seista 2 minutit. Seejärel segu tsentrifugeeriti 2 minutit pööretel 13400/min ja supernatant eemaldati. Sadet

kuiivatati avatud kaanega topsis 37°C juures termoblokis 4 minutit. Edasi sade lahustati 100µl T<sub>10</sub>E<sub>0,1</sub> (10mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1mM EDTA pH 8,0). Enne DNA lahuse kasutamist segu tsentrifuugiti 1 minut pööretel 13400/min. DNA lahusest kasutati 1-2µl PCR analüüsideks.

### **2.2.6. Pärmigeenoomse DNA eraldamine**

YPD vedelsöötmes (20ml, 30°C) kasvatatud rakud (OD<sub>600</sub> umbes 0,8) tsentrifuugiti („Hettich“ Universal 32R tsentrifuug, rootor 1617 Swing-out) kokku 5 minutit pööretel 4000 pööret/min 4°C juures. Sööde kallati pealt, lisati vett 1ml ning rakuksuspensioon tõsteti üle 2ml Eppendorfi tuubi (eelnevalt kaalutud), tsentrifuugiti (Eppendorf „Minispin“ lauatsentrifuug) 1 minut pööretel 14000/min. Vesi valati pealt ning Eppendorfi tuub koos rakkudega kaaluti. Rakkudega tuubi kaalust lahutati tühja tuubi kaal, nii saadi rakkude kaal. Rakud resuspendeeriti 1ml sorbitooli lahuses (1M sorbitool; 10mM Tris pH 8; 10mM EDTA) ning lisati Zymolase 20T 4mg/1g rakkude kohta ning segati õrnalt vorteksiga. Edasi inkubeeriti rakusegu 37°C juures 30 minutit, vahepeal segades, ning siis tsentrifuugiti 1 minut pööretel 13400/min. Supernatant eemaldati ja sade resuspendeeriti 0,5ml 50mM Tris pH 7,5 20mM EDTA lahuses. Lisati 50µl 10% SDS, segati õrnalt. Edasi inkubeeriti 65°C juures 30 minutit ning jahutati seejärel jääl. Peale seda lisati 200µl 5M K-atsetaati (eelnevalt jääl jahutatud) ning ning hoiti jääl 40 minutit. Tsentrifuugiti („Hettich“ Mikro 200R tsentrifuug, rootor 2424) 4°C juures 5 minutit pööretel 13400/min ning supernatant kanti uude 1,5ml tuubi. Lisati võrdses mahus isopropanooli (toatemperatuuril), segati ning lasti 5 minutit seista. Edasi tsentrifuugiti (Eppendorf „Minispin“ lauatsentrifuug) 1 minut pööretel 13400/min ning supernatant eemaldati. Lisati 100µl 80% etanooli ning hoiti laual paar minutit. Tsentrifuugiti uuesti 1 minut pööretel 13400/min ja etanool eemaldati sademelt. Edasi lisati 100µl T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> RNAas A lahust (10 mM Tris pH 7; 1 mM EDTA pH 8; 20 µg/ml RNAasA) ning inkubeeriti 65°C juures 15 minutit, peale seda lisati võrdne maht 2X Proteinaas K puhvrit (2X Proteinaas K puhver: 1% SDS; 10 mM Tris pH8; 10 mM EDTA pH 8,0) ning 20µg Proteinaas K-d ning inkubeeriti 55°C juures 30 minutit, vahepeal segades. Peale seda lisati 80µl fenool/kloroformi (pH 7,5), segati õrnalt ning lasti seista 15 minutit. Segu tsentrifuugiti 1 minut pööretel 13400/min ja ülemine vesifaas viidi uude 1,5ml tuubi, lisati 1/10 mahtu 3M Na-atsetaati pH 7 ning 2,5 mahtu 96% etanooli ning segati. Saadud segu hoiti -20°C juures 15 minutit, tsentrifuugiti 1 minut pööretel 13400/min ning sademelt eemaldati supernatant. Sadet pesti 100µl 80% etanooliga ning lahustati 30µl T<sub>10</sub>E<sub>0,1</sub>.

Transformantide analüüsimiseks PCR meetodil võeti sektoritega tardsöötmetl kolooniast natuke rakke, pandi need PCR tuubi ja kuumutati mikrolaineahjus rakkude lüüsimiseks. Seejärel teostati PCR reaktsioon nagu kirjeldatud eespool.

### **2.2.7. Pärmil mitokondriaalse DNA eraldamine**

Rakud kasvatati algul 50ml YPD vedelsöötmes, seejärel mõõdeti OD<sub>600</sub> ning tehti lahendus (OD<sub>600</sub> 0,1) 1 liitrise YPD vedelsöötmesse. Rakke kasvatati 30°C juures loksutil ning eksponentsiaalses kasvufaasis (OD<sub>600</sub> 0,8-1) olnud rakud koguti kokku tsentrifuugides („Sorvall“ RC5 tsentrifuug, rootor GS3) 4°C juures 10 minutit pööretel 6000/min. Sööde kallati pealt, rakud suspendeeriti 30 ml mQ H<sub>2</sub>O-s ning kanti üle 50ml tuubidesse (eelnevalt kaalutud). Edasi tsentrifuugiti („Hettich“ Universal 32R tsentrifuug, rootor 1617 Swing-out) 4°C juures 5 minutit pööretel 3500/min. Vesi kallati pealt ning rakud kaaluti. Rakusade resuspendeeriti 30ml 1,2M sorbitooli lahuses, tsentrifuugiti 4°C juures 5 minutit pööretel 3500/min. Rakud suspendeeriti 1,2M sorbitooli 20mM KHPO<sub>4</sub> pH 7,5 (37°C eelsoojendatud) lahuses vastavalt 1ml 0,15g rakkude kohta. Lisati Zymolase 20T 7mg/1g rakkude kohta (rakke oli 2,8-3,0g). Hoiti loksutil (kergelt loksutades) 30°C juures 15 minutit. Tsentrifuugiti 4°C juures 5 minutit pööretel 3200/min ning supernatant valati pealt. Sade resuspendeeriti 20ml (1ml/0,15g rakkude kohta) (külmas) homogenisatsiooni puhvril (0,6M sorbitool; 10mM Tris pH 7,5; 0,1% BSA; 1mM PMSF) ning rakud lõhuti Dounce homogenisaatoriga (20 korda), homogenisaat kallati uude 50ml topsi. Dounce homogenisaatorit loputati homogenisatsiooni puhvriga ja ka see kallati 50ml topsi. Edasi tsentrifuugiti homogenisaati 4°C juures 5 minutit pööretel 3200/min ja saadud supernatant kallati (proovides sadet mitte häirida) uude 30ml topsi. Tsentrifuugiti („Hettich“ Universal 32R tsentrifuug, rootor 1620A) 4°C juures 12 minutit pööretel 9000/min, supernatant kallati pealt ning mitokondreid sisaldav sademe pesti külma homogenisatsiooni puhvriga (ilma BSA ja PMSF-ita). Tsentrifuugiti uuesti 4°C juures 12 minutit pööretel 9000/min ning supernatant kallati pealt, sade võeti üles 1,4ml lüüsi puhvril (75mM NaCl; 50mM EDTA; 1% SDS; 0,5mg/ml Proteaas K). Inkubeeriti 37°C juures 30 minutit, seejärel segu kanti üle 15ml topsi ning lisati 4ml-ni T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> ja 2ml fenool/kloroformi pH 7,5, vahepeal segades lasti laual seista 5 minutit. Edasi tsentrifuugiti („Hettich“ Universal 32R tsentrifuug, rootor 1617) 28°C juures 2 minutit pööretel 4000/min, misjärel vesifaas kanti uude topsi ning lisati uuesti 2ml fenool/kloroformi pH 7,5. Fenool/kloroformi puhastust korrati veel 2 korda. Seejärel lisati 2ml kloroformi ning tsentrifuugiti 28°C juures 2 minutit pööretel 4000/min. Supernatant kallati pealt ning sademele lisati 2 mahtu 96% etanooli ning sadestati -20°C juures 1 tund. Seejärel

tsentrifuugiti 2 minutit pöõretel 4000/min, supernatant eemaldati ning sadet pesti 2ml 80% etanooliga. DNA sade lahustati 200µl T<sub>10</sub>E<sub>0,1</sub> lahuses 4°C juures 12h, peale seda jaotati 20µl kaupa topsidesse ning säilitati -80°C juures.

### 2.2.8. DNA restriksioon

30µl reaktsiooniseгу kohta võeti umbes 0,8µg puhastatud DNA-d. Iga reaktsiooniseгу sisaldas 0,5µl restriктаasi (kasutati Thermo Scientific puhvreid ja restriктаase: XbaI, DraI, HphI ning BspTI), 3µl puhvrit (vastavalt restriктаasile) ning 30µl mahuni vett. Lõikus toimus 37°C juures 2 tundi, vahepeal segati. Peale seda säilitati lõigatud DNA-d -20°C juures.

### 2.2.9. Agarosgeelelektroforees, Southern blot ja hübridisatsioon

1D (ühedimensioonaalne, DNA fragmendid eraldatakse suuruse järgi): Eraldatud ja restriктеeritud totaalne DNA voolutati 0,7% TAE agarosgeelis 3V/cm kohta 20°C juures. Kasutatud TAE puhver ja agarosgeel sisaldasid mõlemad etiidiumbromiidi 300ng/ml. Fragmendisuuruste võrdlemiseks kasutati markerit ThermoScientific 1 kb DNA Ladder.

2D-AGE (2D-agarosgeelelektroforees): Lõikamata mtDNA voolutati kõigepealt 1D jaoks 0,5% TAE agarosgeelis ilma etiidiubromiidita 16 tundi 1V/cm (25V) 20°C juures. Edasi lõigati DNA-d sisaldav rada koos hambaga välja ning paigutati horisontaalselt elektrivoolu suunaga uue 1% TAE agarosgeeli (etiidiumbromiidi 300ng/ml) sisse. 2D (teine dimensioon, suuruse järgi eraldatud DNA molekulid eraldatakse ka kuju järgi) voolutati 5V/cm (125V) 4°C juures 5 tundi.

Nii 1D kui 2D geelis olev DNA kanti positiivselt laetud nailonfiltrile (AppliChem, Reprobe Nylon Positively Charged Transfer membrane 0,45µm). DNA ülekandmiseks filtrile kasutati aluselist puhvrit (0,4M NaOH; 0,6M NaCl) (AppliChem protokoll järgi). Ülekande aeg oli 24 tundi. Seejärel filter neutraliseeriti neutraliseerimispuhvris (1M Tris; 1,5M NaCl) 15 minutit.

Radioaktiivse proovi jaoks amplifitseeriti radioaktiivse märgisega kaheaheelaline DNA proov PCR meetodil. Nukleaarse proovi jaoks amplifitseeriti geenidelt SEC6 ja DNA2 vastavalt 157 ja 436 aluspaari pikkune fragment. Mitokondriaalse proovi jaoks amplifitseeriti mtDNA *ori2* järjestuselt 280 aluspaari pikkune fragment. 2D-AGE tegemiseks kasutati mtDNA märgistamiseks DecaLabel™ DNA Labelling Kit-i koos radioaktiivse dATP-ga. *Random priming* põhimõttel toimiv kompleks amplifitseerib a1184 mtDNA-st lühikesi radioaktiivselt märgistatud fragmente, mis hübridiseerides seonduvad filtrile kantud mtDNA-ga.

Filtrile kandunud DNA hübridiseeriti radioaktiivse prooviga 5 (1D) või 15 tundi (2D). Selleks pesti filtrit 30 ml hübridisatsiooni (Church) puhvriga (1mM EDTA; 7% SDS; 0,5% BSA; 0,5M NaPO<sub>4</sub> pH 7,5) 65°C juures 30 minutit, seejärel valati puhver hübridisatsioonitorust minema ning lisati 25ml hübridisatsiooni uut puhvrit ning puhastatud ja 95°C juures 5 minutit denatureeritud radioaktiivne proov. Filtrit lasti hübridiseerida vastavalt 5-15 tundi. Peale seda valati radioaktiivset proovi sisaldav hübridisatsiooni puhver 50ml topsi ning visati radioaktiivsete jäätmete konteinerisse. Torus olevale filtrile lisati pesu puhvrit (1mM EDTA; 5% SDS; 40 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7,5) ning filtrit pesti 2 korda 65°C juures 15 minutit. Seejärel filter kuivatati, pandi kilekaante vahele ning edasi ilmutuskaante (Amersham Biosciences Storage Phosphor Screen) vahele. Analüüsiks kasutati Typhoon Phosphoimager masinat.

Nukleaarse proovi mahavõtmiseks pesti filtrit ~100ml 0,4M NaOH lahuses 45°C juures 15 minutit. Peale seda valati lahus torust minema ning lisati taas ~100ml 0,4M NaOH lahust ja korrati pesemist. Peale lahuse äravalamist neutraliseeriti filter neutraliseerimispuhvriga 7 minutit loksutil. Neutraliseerimispuhver valati ära ja korrati neutraliseerimist. Pestud filtrile kanti peale radioaktiivne mitokondriaalne proov nagu kirjeldatud eespool.

### 2.3. Tulemused ja arutelu

Minu bakalaureusetöö eesmärk oli uurida geeni DIN7 deletsiooni mõju nii eri suurusega  $\rho^-$  tüvede kui haploidse wt w303 tüve mitokondriaalse genoomi stabiilsusele.

Din7 mõjust funktsioneeriva hingamisahelaga ( $\rho^+$ ) tüvedele on teada, et DIN7 geeni deletsioon suurendab *petite* mutantide tekkesagedust (Fikus jt., 2000; Yoshitani jt., 2008). Din7 mõju *petite* mutantide  $\rho^-$  mitokondriaalsele genoomile on vähe uuritud, Ling jt. leidsid 2013. aastal tehtud uurimistöös, et DIN7 geeni deletsioon põhjustab hüpersupressiivsel  $\rho^-$  tüvel (mtDNA fragment 1,1 kb) kaheaahelaliste katkete kogunemist mitokondriaalses genoomis *ori5* järjestuse juures. Samuti vähendas DIN7 deletsioon antud tüvel mtDNA koopiaarvu.

Et uurida täpsemalt Din7 mõju wt tüvele ja  $\rho^-$  tüvede mitokondriaalsele genoomile, valmistasin haploidsest wt w303 tüvest ja mitmest erinevast  $\rho^-$  tüvest geeni DIN7 deletsioonimutandid.  $\rho^-$  tüvede mtDNA (enamasti suurusega <1 kb – 3 kb) on stabiilsem kui wt ( $\rho^+$ ) (~85 kb) oma. Seetõttu on erinevate mitokondriaalsete valkude mõju mitokondriaalsele genoomi stabiilsusele parem uurida  $\rho^-$  tüvedes. Töös kasutasin supressiivsed  $\rho^-$  tüvesid a11 ja a1184 ning neutraalset  $\rho^-$  tüve sk35. Nende tüvedega on Tartu Ülikooli Üldise- ja mikrobibiokeemia laboris varem töötatud ning tüvedel a11, a1184 ja sk35 on mitokondriaalne genoom sekveneeritud (vt Lisades joonis 18, 19, 20). Tüvel a11 ja a1184 on aktiivsed *ori*-järjestused, mida peetakse ka replikatsiooni alguspunktideks (on struktuurilt sarnased imetajate mitokondri replikatsiooni alguspunktidele) (Baldacci ja Bernardi, 1982).

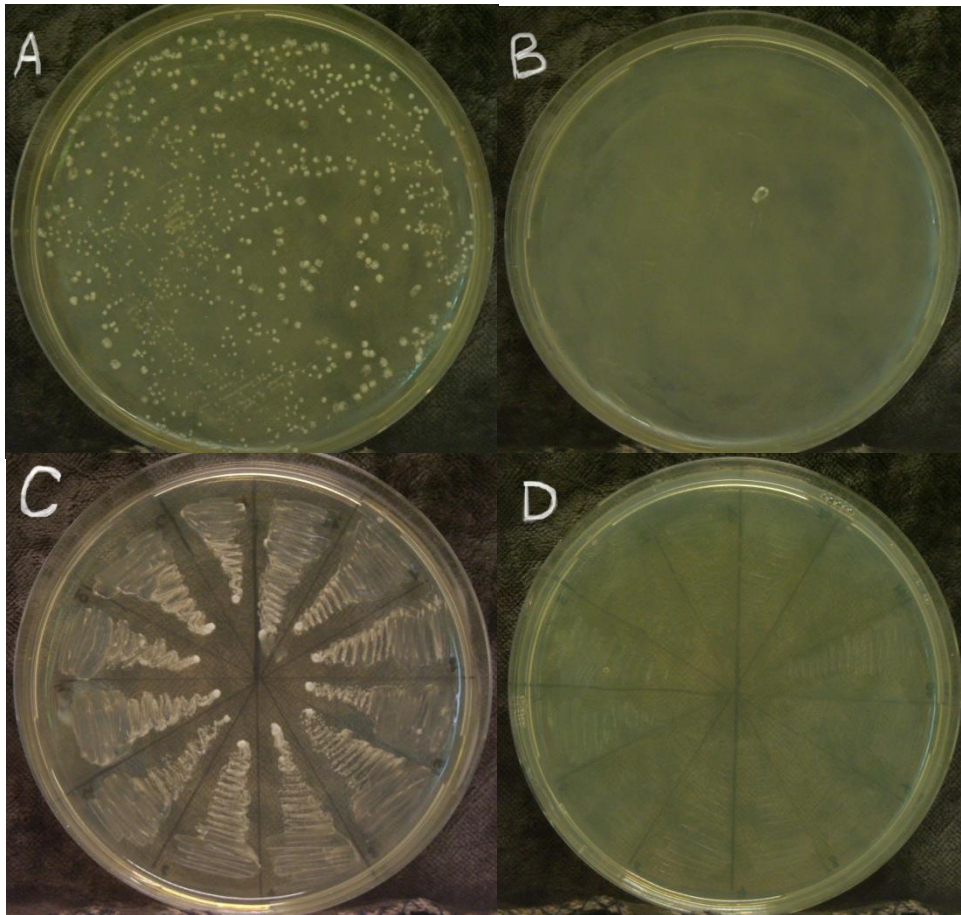
### 2.3.1. w303 MAT $\alpha$ deletsioonitüve tegemine ja analüüs

Selleks, et uurida Din7 valgu puudusest põhjustatud fenotüüpi, deleteerisin selle valgu haploidsest w303 MAT $\alpha$  tüvest. Tüvel w303 MAT $\alpha$  (laialt kasutusel laboritüvi, loodud Rodney Rothstein-i poolt) on funktsioneeriv mitokondriaalne hingamisahel ning *ade2* mutatsiooni tõttu koguneb rakkudesse vaheühend, mis hapniku käes oksüdeerudes omastab punase värvuse. Seega on hingavad kolooniad glükoosi sisaldaval söötmel punase värvusega. Glütserooli sisaldaval söötmel seevastu saavad kasvada vaid hingavad kolooniad, kuid *ade2* mutatsioonist hoolimata punast värvust ei omandata (Dorfman, 1969). Selle töö üheks eesmärgiks oli võrrelda Din7 valgu deletsioonist põhjustatud fenotüüpi laboris eelnevalt uuritud valkude deletsioonimutantide fenotüüpidega. Näiteks laboris uuritud Irc3 valgu deletsioon põhjustab glükoosiga söötmel aeglast mtDNA kadu, kuid glütserooliga söötmel suudetakse funktsionaalset mtDNA-d säilitada (Sedman jt., 2014). Mitokondriaalse helikaasi Hmi1 deletsioon aga põhjustab rho<sup>0</sup> ja rho<sup>-</sup> mutantide teket (Sedman jt., 2000). DIN7 geeni deletsiooni kohta oli varasemalt teada, et see suurendab rho<sup>+</sup> tüvedel *petite* mutantide tekkesagedust (Fikus jt., 2000; Yoshitani jt., 2008).

DIN7 geeni deletsioonimutantide tegemiseks valisin transformatsiooniks (glükoosiga) YPD tardsöötmelt tüve w303 MAT $\alpha$  roosaka värvusega kolooniad. Need olid noored kolooniad, mille värvus aja jooksul intensiivsemaks muutub. Transformatsiooni käigus asendus tuumas asuv DIN7 geen homoloogilise rekombinatsiooni teel Hph resistantsusgeeniga (Hph, hügroümüsiin B resistantsusgeen). Transformeeritud rakke külvasin võrdsel hulgal nii glükoosi sisaldavale YPD Hph kui glütserooli sisaldavale YPG Hph tardsöötmele.

Kui enne omasid hingavad rakud YPD tardsöötmel punaka värvuse, siis peale transformatsiooni olid YPD Hph tardsöötmel üles kasvanud kolooniad valge värvusega (joonis 3). Tekkinud transformantide lähemaks analüüsimiseks ja massi suurendamiseks kandsin 12 valitud kolooniat sektoritesse uuele YPD Hph ja YPG Hph tardsöötmele (joonis 3)

Kõik valitud 12 transformanti moodustasid kolooniaid YPD Hph (joonis 3, C), kuid mitte YPG Hph tardsöötmel (joonis 3, D). Kasvu esinemine glükoosisöötmel, kuid puudumine glütseroolisöötmel tõestas, et transformandid on kaotanud funktsionaalse hingamisahela. Sellised *petite* rakud saavad kasvades glükoosiga söötmel oma energia glükolüüsist.

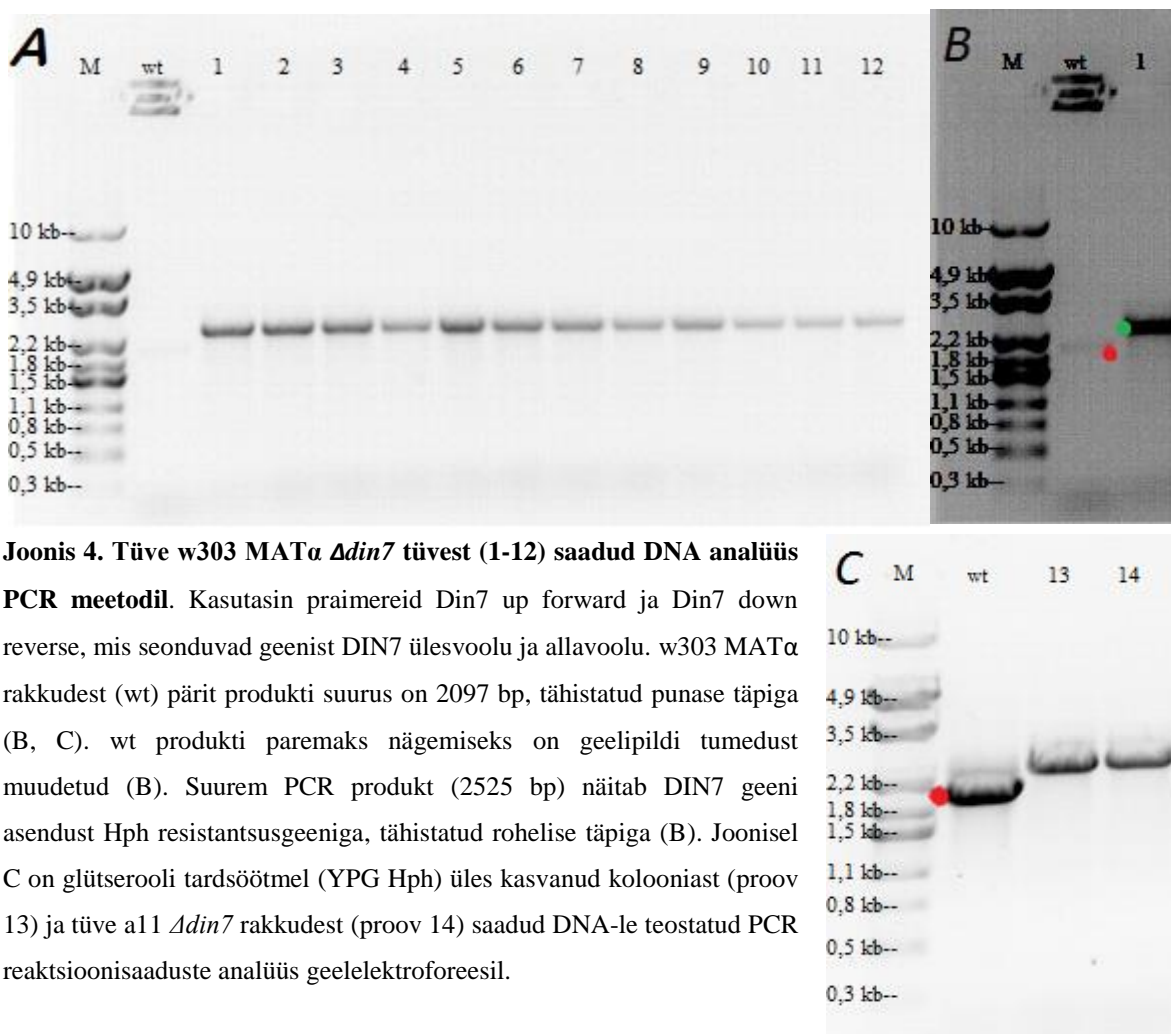


**Joonis 3.** w303 MAT $\alpha$  tüve  $\Delta din7$  transformandid. Kujutatud on YPD Hph tardsöötmel tärganud Hph resistantsusgeeni omavad kolooniad (A) ja YPG Hph tardsöötmel tärganud Hph resistantsusgeeni omavad kolooniad (B). YPD Hph tardsöötmel üles kasvanud kolooniatest valiti 12, mis kanti analüüsimiseks ning rakumassi suurendamiseks sektoritesse nii YPD Hph tardsöötmel (C) kui YPG Hph tardsöötmel (D). Kuna pildid söötmetassidest tehti peale rakkude võtmist analüüsiks, siis on kolooniad (A, B, C) natuke segamini aetud.

Et kontrollida, kas Hph resistantsusgeen on asendanud DIN7 geeni, teostasid  $\Delta din7$  transformantidest ja wt tüvest eraldatud DNA-le PCR meetodil analüüsi. Selleks võtsid nii sektoritesse kantud 12 kolooniast (joonis 3, C) kui ka transformeerimata (wt) w303 MAT $\alpha$  tüvest rakke ning eraldasid nende DNA Li-atsetaadi meetodil (Lõoke jt., 2011). Edasi kasutasid eraldatud DNA-d ja praimereid Din7 up forward ja Din7 down reverse PCR reaktsioonil. Kui oli toimunud geeni DIN7 asendus Hph resistantsusgeeniga, siis oli see näha erineva suurusega PCR produktidena (joonis 4). DIN7 geeniga on PCR produkti suurus 2097 bp ja Hph resistantsusgeeniga 2525 bp.

Glütserooliga YPG Hph tardsöötmel (joonis 3, D) kasvas üles üks koloonia, mis PCR analüüsi järgi oli geeni DIN7 deletsioonimutant. Antud koloonia kandis ka YPD Hph glükoosisöötmel (Vt Lisades joonis 23), kus ta omandas punaka värvuse. Võimalik seletus sellise nähtuse kohta oleks revertantsus. Sellisel juhul on tüves toimunud sekundaarsed

mutatsioonid, mis on DIN7 kaotusest tekkinud fenotüübi (mtDNA ebastabiilsuse) alla surunud. Tänu sellele suudeti mtDNA stabiilsust ning hingamisvõimet säilitada. Kõik Din7-ga interakteeruvad valgud pole teada, seega on revertantsuse põhjustanud muteerunud geeni raske identifitseerida.



**Joonis 4. Tüve w303 MAT $\alpha$   $\Delta$ *din7* tüvest (1-12) saadud DNA analüüs PCR meetodil.** Kasutasin primereid Din7 up forward ja Din7 down reverse, mis seonduvad geenist DIN7 ülesvoolu ja allavoolu. w303 MAT $\alpha$  rakkudest (wt) pärit produkti suurus on 2097 bp, tähistatud punase täpiga (B, C). wt produkti paremaks nägemiseks on geelipildi tumedust muudetud (B). Suurem PCR produkt (2525 bp) näitab DIN7 geeni asendust Hph resistantsusgeeniga, tähistatud rohelise täpiga (B). Joonisel C on glütserooli tardsöötmel (YPG Hph) üles kasvanud kolooniast (proov 13) ja tüve a11 *Adin7* rakkudest (proov 14) saadud DNA-le teostatud PCR reaktsioonisaaduste analüüs geelelektrofooresil.

Kuna PCR reaktsioonil saadud produkt (2525 bp) oli *Adin7* puhul suurem kui w303 tüve oma (2097 bp) (joonis 4), siis oli DIN7 geeni asendus olnud edukas. YPD Hph glükoosiga tardsöötmel saadud kolooniate fenotüüp vastas olemasolevatele teadmistele DIN7 deletsiooni kohta. Teada on, et Din7 valgutase on rakus reguleeritud ning madalam või kõrgem tase põhjustab mtDNA ebastabiilsust (Yoshitani jt., 2008) ja *petite* mutantide tekkesageduse suurenemist (Fikus jt., 2000). Minu tulemused w303 MAT $\alpha$  tüve DIN7 geeni deletsiooni kohta kinnitavad seda.

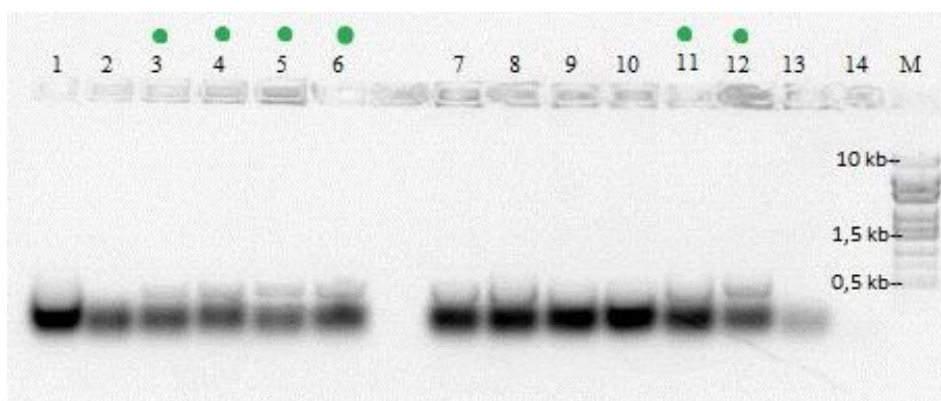
### 2.3.2. Rho<sup>-</sup> deletsioonitüvede tegemine

Geeni DIN7 deletsioon põhjustas rho<sup>+</sup> tüvel w303 MAT $\alpha$  *petite* fenotüüpi. Kuna rho<sup>-</sup> tüvede mtDNA on stabiilsem kui wt (rho<sup>+</sup>) oma, otsustasime Din7 deleteerida biokeemia laboris

varem teadustöös kasutatud rho<sup>-</sup> tüvedest. Avaldatud kirjandusest on teada, et varem on Din7 deletsiooni mõju uuritud vaid ühel rho<sup>-</sup> tüvel (HS, 1,1 kb) (Ling jt., 2013). Katse läbiviimiseks tegin kolmest erineva mtDNA suurusega rho<sup>-</sup> tüvest, milleks olid a11 (1790 bp), a1184 (1184 bp) ja sk35 (469 bp), DIN7 geeni deletsioonimutandid. Et kontrollida, ega transformatsioon või Hph resistantsusgeen mtDNA stabiilsust mõjuta, tegin nendest tüvedest nukleaarse STE5 geeni deletsioonimutandid.

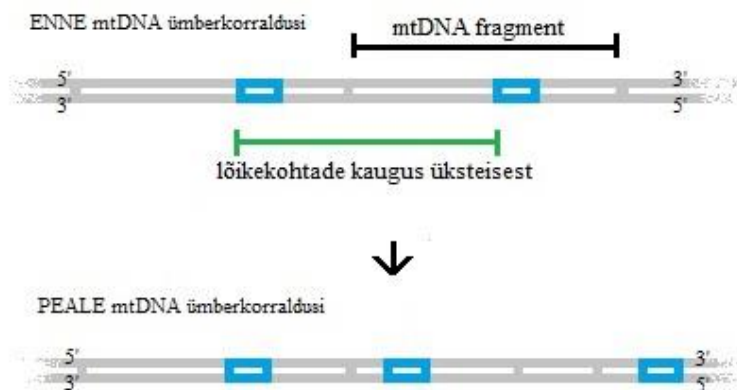
Transformeeritud rakud kandsin YPD Hph tardsöötmele, kus moodustasid kolooniaid vaid resistentsusgeeni omavad rakud. Resistentsuse kontrollimiseks ja rakumassi suurendamiseks analüüside jaoks valisin YPD Hph tardsöötmele 6 kolooniat, mis kandsin sektoritesse uuele YPD Hph tardsöötmele, kus kasvasin neid 3 päeva 30°C juures.

Hph resistentsusgeeni õige integratsiooni kontrollimiseks teostasin sektoritest võetud rakkudele PCR meetodil analüüsi. Selleks kasutasin pärisuunalisi praimereid, mis seonduvad deleteeritava geeni promootori piirkonda ning vastassuunalisi praimereid, mis seonduvad Hph resistentsusgeeni mittekodeerivale alale. Selliste praimerite kasutamine annab PCR reaktsioonil produkti vaid juhul, kui Hph resistentsusgeen on asendanud meid huvitava geeni. Din7 deletsioonimutantide kontrollimiseks kasutasin praimereid Din7 up forward ja pYM\_check reverse, mis annavad PCR reaktsioonil produkti suurusega 576 bp (joonis 5). Ste5 deletsioonimutantide kontrollimiseks kasutasin praimereid Ste5 prom ja rev Hph 5 out, mille PCR reaktsiooni produkti on 505 bp (vt Lisas joonised 21, 22). PCR saadusi voolutasin agarosgeelelektroforeesil, suuruste võrdlemiseks kasutasin markerit mix5.



**Joonis 5. a11, a1184 ja sk35 tüvede DIN7 deletsioonimutantide analüüs agarosgeel-elektroforeesil.** Edasisteks analüüsideks valisin proovid 3, 4, 5, 6, 11, 12 (rohelistega täpiga märgitud), mille puhul oli PCR produkt (576 bp) selgemalt näha. Proovid on 1-4 a11, proovid 5-9 on a1184 ja proovid 10-13 on sk35 Din7 deletsioonimutantidest. Proov 13 on a1184 transformeerimata rakkudest ja proov 14 oli nullproov (PCR reaktsioonisegu ilma DNA-ta).

Edasisteks analüüsideks valisin rakud neist kolooniatest, mis kasvasid YPD Hph tardsöötmele ning andsid PCR analüüsil produkti ( $\Delta din7$  puhul 576 bp ja  $\Delta ste5$  puhul 505 bp) (joonis 5, vt Lisas joonised 18, 19). Mitokondriaalse DNA uurimiseks eraldasid eksponentsiaalses kasvufaasis olevatest  $\rho^-$  tüvede (a11, a1184 ja sk35) transformeerimata rakkudest ning  $\Delta ste5$  (STE5 geeni deletsiooniga) ja  $\Delta din7$  (DIN7 geeni deletsiooniga) mutantide rakkudest totaalse DNA.

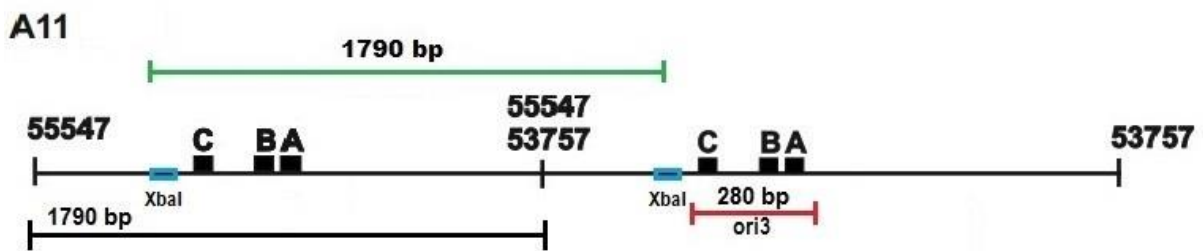


**Joonis 6.  $\rho^-$  mtDNA skeem.**  $\rho^+$  mtDNA-st järele jäänud fragment esineb tihti tandemsete kordustena (fragment on joonisel tähistatud musta joonena). Sellisel juhul on mtDNA fragmendis üks kord esineva restriктаasi löikekoha (tähistatud sinisega) kaugus järgmise fragmendi löikekohast võrdne mtDNA fragmendi pikkusega (tähistatud rohelise joonena). Enne mtDNA ümberkorraldusi paiknevad löikekohad üksteiste suhtes regulaarselt ning restriksioonil saadakse ühtlase suurusega restriksioonifragmendid (nende suurus vastab mtDNA fragmendi suurusele). Peale mtDNA ümberkorraldusi ei paikne löikekohad enam üksteise suhtes regulaarselt ning restriksioonil saadakse erineva suurusega restriksioonifragmendid.

Mitokondriaalse DNA analüüsimise eelduseks oli see, et stabiilse mtDNA korral ei toimu ümberkorraldusi, mis muudaks löikekohtade kaugust üksteisest (kujutatud joonisel 6). Ebastabiilse mtDNA-ga aga toimuvad ümberkorraldused, mis muudavad restriksioonikohtade asukohta üksteise suhtes. Seega väljendub muudetud restriksioonikohtade kaugus üksteisest eri suurusega restriksioonifragmentides, mis peale radioaktiivse prooviga hübridiseerimist oleksid jälgitavad.

### 2.3.2.1. Tüve a11 deletsioonimutantide mtDNA analüüs

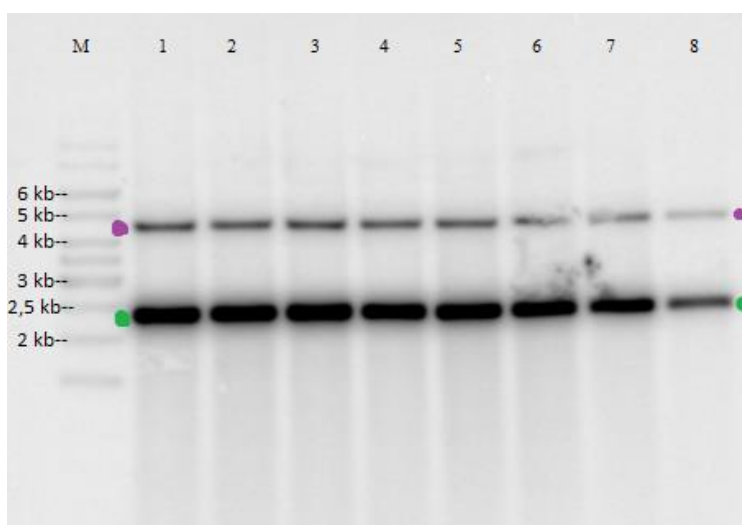
Esimesena uurisin valitud tüvedest kõige suurema mtDNA-ga (1790 bp) supressiivset  $\rho^-$  a11 tüve. Selle tüve mtDNA sisaldab aktiivset *ori3* (joonis 7). a11 tüvi on tehtud minu juhendaja Tiina Sedmani poolt, kes on seda varem analüüsinud (vt Lisades joonis 18).



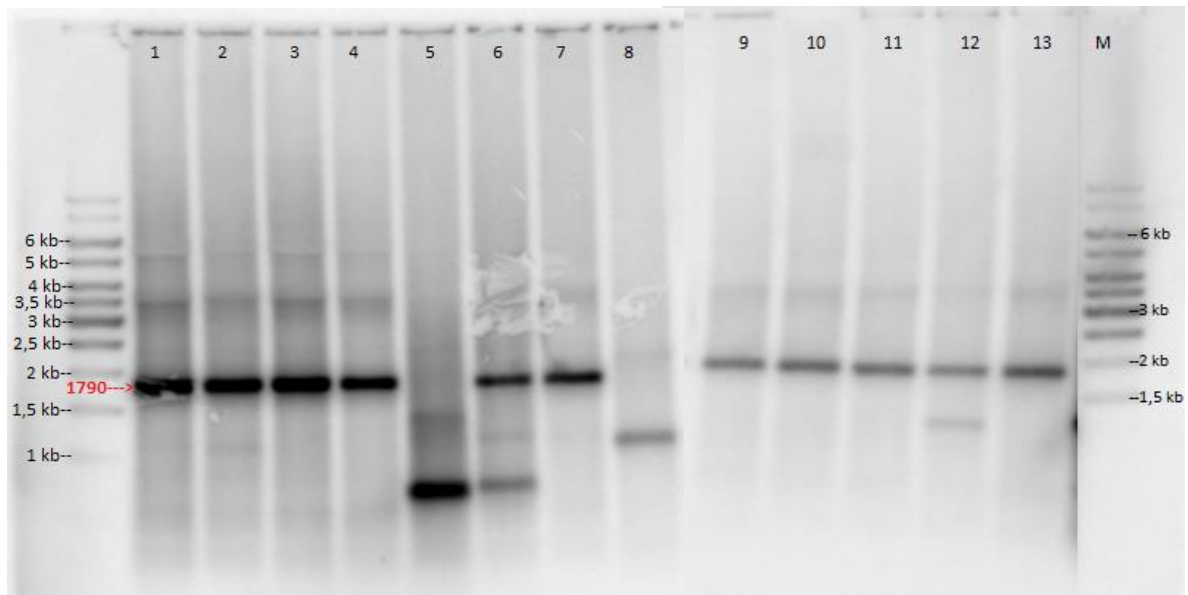
**Joonis 7. a11 tüve mtDNA fragmendi skeem.** Restriktaasi XbaI lõikekoht on märgitud sinisega. Punasega on märgitud *ori3* ja rohelisega mtDNA restriksioonil tekkiv fragment. a11 mtDNA pikkus on märgitud musta joonena. Autori poolt modifitseeritud joonis pärineb Tiina Sedmanilt.

a11,  $\Delta ste5$  ja  $\Delta din7$  rakkudest eraldatud totaalselt DNA-d lõikasin restriktasiga XbaI, see lõikab mtDNA fragmenti ühest kohast (joonis 7). Voolutasin lõigatud DNA-d restriksioonifragmentide eraldamiseks 0,7% TAE agarosgeelis ning kandsin positiivselt laetud nailonfiltrile. Nukleaarse prooviga (radioaktiivselt märgistatud 436 bp pikkune fragment DNA2 geenist) hübridiseeritud filtri ilmutamine näitas, et DNA on olemas (4601 bp, joonisel 8 tähistatud lilla täpiga). Pildil on näha ka mittespetsiifiline hübridiseerumine (~2,2 kb, joonisel 8 rohelise täpiga märgitud). Töös näidatud vaid osa nukleaarse prooviga hübridiseerimisel saadud pildid, ülejäänud viiel a11 tüve  $\Delta din7$  proovide hübridiseerimisel saadi samasugused pildid.

Edasi pesin radioaktiivse nukleaarse proovi filtrilt maha ja hübridiseerisin sama filtrit radioaktiivselt märgistatud mitokondriaalse prooviga, milleks oli 280 bp fragment *ori3* järjestuselt. See proov hübridiseerus a11 mtDNA *ori3* järjestusega (joonis 9) ning näitas restriksioonil saadud fragmendi suurust.



**Joonis 8. a11 ja mutantide totaalse DNA restriksioonifragmentide analüüs nukleaarse prooviga hübridiseerimisel.** Proovid 1-2 on a11 tüve rakkudest. Proovid 3-4 on a11  $\Delta ste5$  rakkudest ja proovid 5-6 on a11  $\Delta din7$  rakkudest. Hübridiseeriti radioaktiivselt märgistatud fragmendiga DNA2 geenist, mis seondus nukleaarse DNA-ga (lilla täpiga märgitud). Toimunud mittespetsiifiline hübridiseerumine on märgitud rohelise täpiga. Filtri ilmutusaeg 24 tundi.



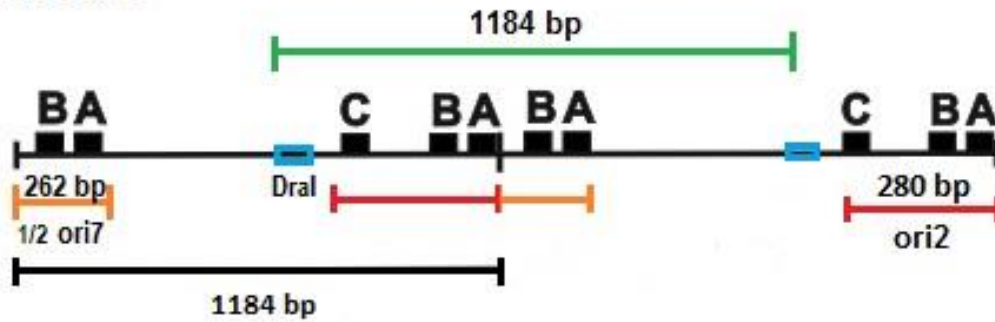
**Joonis 9. a11 ja mutantide totaalse DNA restriksioonifragmentide analüüs mitokondriaalse prooviga hübridiseerimisel.** Proovid 1-2 on a11 tüve rakkudest. Proovid 3-4 on a11 *Δste5* rakkudest ja proovid 5-13 a11 *Δdin7* rakkudest. Proovid 9-13 asusid teisel filtril, neid hübridiseeriti sama moodi. Hübridiseeriti radioaktiivselt märgistatud fragmendiga *ori*-järjestuselt. Punasega on toodud ära a11 mtDNA suurus 1790 bp. Ilmutusaeg 17,5 tundi (filter proovidega 1-8) ja 25,5 tundi (filter proovidega 9-13). Pildi kontrastsus oleneb ilmutusajast ning radioaktiivse proovi tugevusest, proovi 6 ja 7 juures ei ole DNA tehnilise vea tõttu korralikult filtrile kandunud.

Mitokondriaalse prooviga hübridiseerimine näitas, et nii a11 kui *Δste5* rakkudest eraldatud totaalse DNA puhul oli mtDNA restriksioonifragmenti suurus ~1790 bp, mis tähendab, et nende tüvede mtDNA ei olnud fragmenteerunud. See näitas, et antibiootikumikassetti kasutamine transformatsiooniks ning STE5 geeni kaotus ei mõjutanud mtDNA stabiilsust. Üheksast uuritud *Δdin7* proovist neljal esinesid väiksema suurusega mtDNA restriksioonifragmendid (joonis 9). See viitab mitokondriaalses genoomis toimunud ümberkorraldustele, mis on liigutanud XbaI lõikekohta ja seega muutnud restriksioonifragmentide suurust (joonis 6). Minu juhendaja Tiina Sedmani tehtud varasemad katsed a11 tüvega näitavad, et tegu on stabiilse rho<sup>-</sup> tüvega. Seega on mtDNA stabiilsust ja sellest tulenevalt mtDNA fragmendi suurust mõjutanud Din7 deletsioon.

### 2.3.2.2. Tüve a1184 deletsioonimutantide mtDNA analüüs

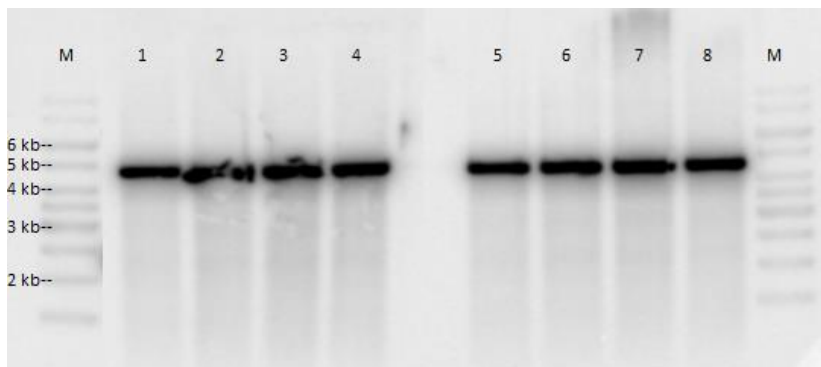
Järgmisena uurisin Din7 deletsiooni mõju väiksema, kuid stabiilsema mtDNA-ga rho<sup>-</sup> tüvele. Supressiivne rho<sup>-</sup> tüvi a1184 sisaldab aktiivset *ori2* ja osa *ori7* järjestusest. 1184 bp suuruse mtDNA-ga a1184 tüvi on tehtud Karin Villemsoni poolt (vt Lisades jooni 19).

## A1184



**Joonis 10. a1184 tüve mtDNA fragmendi skeem.** Restriktaasi DraI lõikekoht on märgitud sinisega. Punasega on märgitud *ori2* ja poolik *ori7* oranžiga, mtDNA restriksioonil tekkiv fragment aga rohelisega. a1184 mtDNA pikkus on märgitud musta joonena. Autori poolt modifitseeritud joonis pärineb Tiina Sedmanilt.

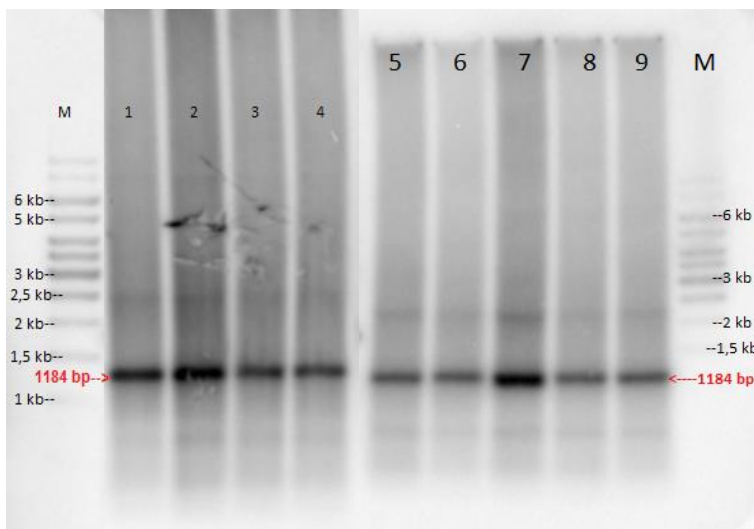
a1184, *Δste5* ja *Δdin7* rakkudest eraldatud totaalset DNA-d lõikasin restriktasiga DraI, see lõikab mtDNA fragmenti ühest kohast (joonis 10). Eraldasini restriksioonifragmendid 0,7% TAE agarosgeelis ning kandsin DNA nailonfiltrile. Nukleaarse proovina kasutasin ka a1184 puhul radioaktiivselt märgistatud fragmenti DNA2 geenist. Hübridiseerimisel nukleaarse prooviga eristus kõigil a1184, *Δste5* ja *Δdin7* proovidel ühtlase suurusega restriksioonifragment, mis näitas, et DNA oli olemas ning polnud eraldamisel katki läinud (joonis 11). Uuritud kolmeteistkümnest proovist on joonisel 11 toodud kaheksa.



**Joonis 11. a1184 ja mutantide totaalse DNA restriksiooni-fragmentide analüüs nukleaarse prooviga hübridiseerimisel.** Proovid 1-2 on a1184 tüve rakkudest. Proovid 3-4 on a1184 *Δste5* rakkudest ja proovid 5-6 a1184 *Δdin7* rakkudest.

Hübridiseeriti radioaktiivselt märgistatud fragmendiga DNA2 geenist, mis seondub nukleaarse DNA-ga fragmendile, mis on 4601bp. Ilmutusaeg 24 tundi.

Peale nukleaarse proovi mahapesemist hübridiseerisin samu filtreid radioaktiivse mitokondriaalse *ori*-järjestuse prooviga ning selgus, et mtDNA restriksioonifragmendid olid a1184, *Δste5* ja *Δdin7* puhul ühtlase suurusega (joonis 12). Kui suurema mtDNA-ga a11 tüvel põhjustas *Din7* deletsioon mtDNA fragmenteerumist, siis väiksema ja stabiilsema mtDNA-ga a1184 tüvel ei mõjutanud *Din7* deletsioon mtDNA stabiilsust.



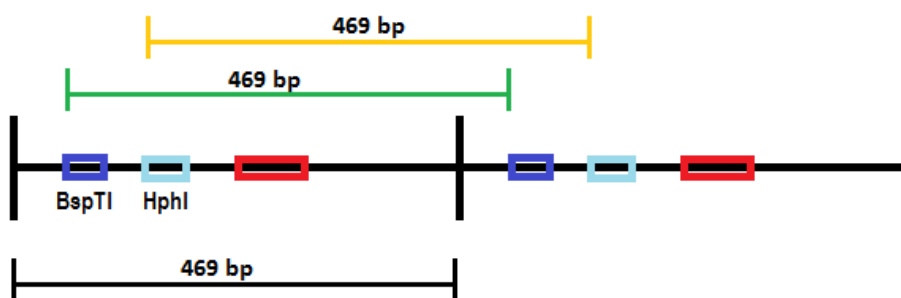
**Joonis 12. a1184 ja mutantide** **totaalse DNA restriksiooni** **fragmentide analüüs mitokondriaalse** **prooviga hübriidiseerimisel.** Proovid 1-2 on a1184 tüve rakkudest. Proovid 3-4 on a1184 *Aste5* rakkudest ja proovid 5-9 on a1184 *Adin7* rakkudest pärit. Proovid 5-9 asusid teisel filtril, kuid neid hübriidiseeriti sama moodi. Hübriidiseeriti radioaktiivselt märgistatud fragmendiga *ori*-järjestuselt. Punasega on toodud ära

a1184 mtDNA suurus. Ilmutusaeg 7 tundi (filter proovidega 1-4) ja 15 tundi (filter proovidega 5-9). Pildi kontrastsus oleneb ilmutusajast ning radioaktiivse proovi tugevusest, proovide 2 ja 3 juures on defekt tehnilise vea tõttu.

### 2.3.2.3. Tüve sk35 deletsioonimutantide mtDNA analüüs

Viimasena uurisin Din7 deletsiooni mõju kõige väiksema mtDNA-ga rho<sup>-</sup> tüvele. Neutraalne rho<sup>-</sup> sk35 tüvi on tehtud Silja Kuuse poolt. Selle mtDNA on 469 bp ja sisaldab fragmenti 21S rRNA geenist ning transkriptsiooni promootorit (joonis 13). Erinevalt teistest uuritud rho<sup>-</sup> tüvedest ei sisalda sk35 mtDNA *ori* järjestust (vt Lisades joonis 20).

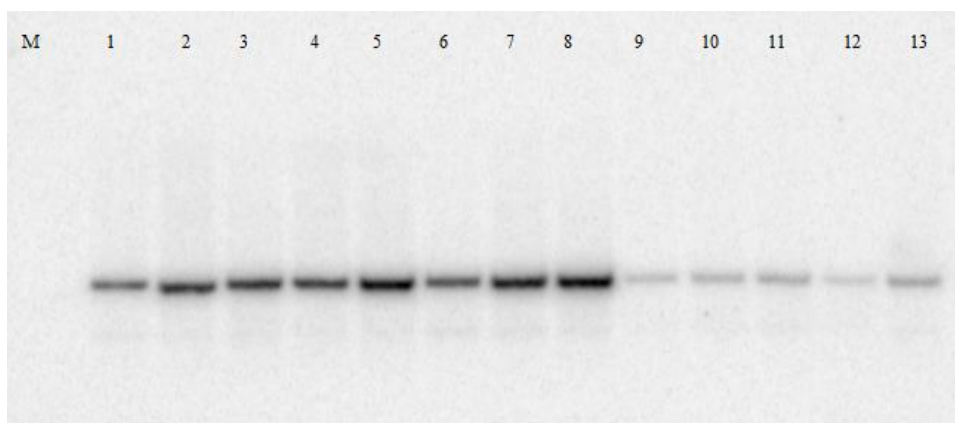
#### SK35



**Joonis 13. sk35 tüve mtDNA fragmendi skeem.** Restriktaaside HphI ja BspTI lõikekohad on märgitud vastavalt helesinisega ja tumesinisega. Punasega on märgitud transkriptsiooni promootor sk35 tüve mtDNA fragmendis. mtDNA fragmentide suurused (469 bp) restriktaasidega BspTI ja HphI-ga lõikamisel on märgitud vastavalt rohelise ja kollasega. Musta joonega on märgitud sk35 tüve mtDNA pikkus.

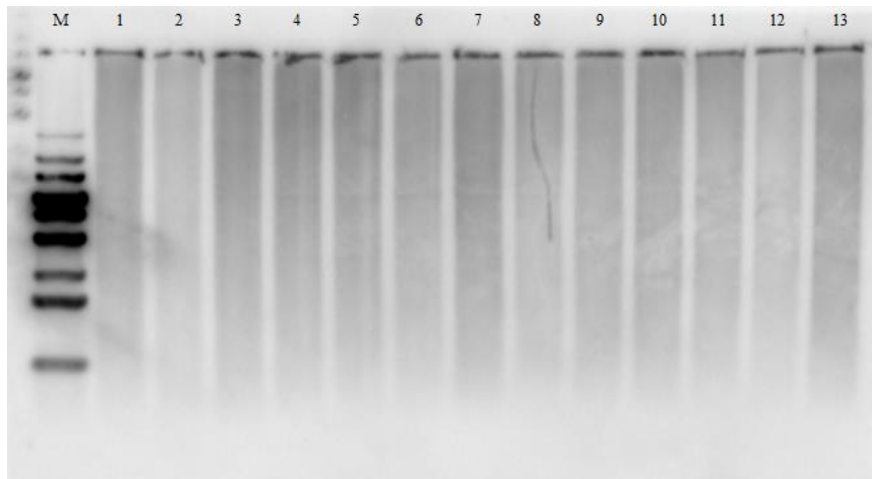
sk35, *Aste5* ja *Adin7* rakkudest eraldatud totaalset DNA-d lõikasin restriktaasiga HphI, see lõikab mtDNA fragmenti ühest kohast (joonis 13). Peale restriksioonifragmentide eraldamist, filtrile kandmist ja nukleaarse prooviga (radioaktiivselt märgitud fragment DNA2 geenist) hübriidiseerimist selgus, et toimunud oli palju ebaspetsiifilist hübriidiseerumist (pole näidatud).

Seega kordasin HphI-ga restrikteeritud DNA filtrile kandmist. Seekord hübridiseerisin teistsuguse nukleaarse prooviga (radioaktiivselt märgitud 157 bp fragment nukleaarsest SEC6 geenist) ning selgus, et kõik analüüsitud restriksioonifragmendid olid ühtlase suurusega (joonis 14).



**Joonis 14. sk35 ja mutantide totaalse DNA restriksiooni-fragmentide analüüs nukleaarse prooviga hübridiseerimisel.** Proovid 1-2 on sk35 tüve rakkudest. Proovid 3-4 on sk35  $\Delta ste5$  rakkudest ja proovid 5-13 sk35  $\Delta din7$  rakkudest. Hübridiseeriti radioaktiivselt märgistatud fragmendiga SEC6 geenist, mis seondub nukleaarse DNA-ga. Antud DNA-d lõigati restriksionaasiga HphI. Ilmutusaeg 16 tundi.

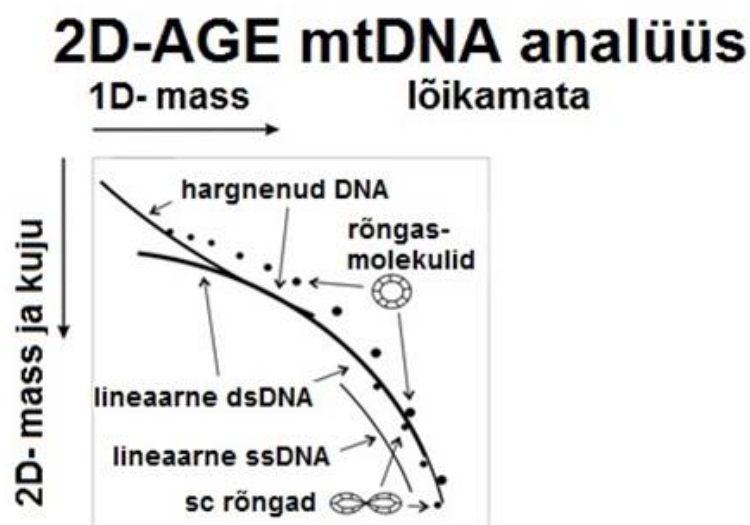
Mitokondriaalseks prooviks amplifitseerisin sk35 mtDNA järjestust sisaldavalt plasmiidilt sk35 mtDNA järjestuse. Hübridiseerides filtrit mitokondriaalse prooviga jaotus see ühtlase pilvena üle proovide, see näitas, et kõigil radadel oli mtDNA olemas, kuid ühtlast 469 bp fragmenti ei tekkinud (pole näidatud). Selle põhjuseks võis olla viga mtDNA järjestuses, mistõttu sk35 mtDNA-s ei esine HphI restriksiooni lõikamiskohta. Seega restrikteerisin sk35 totaalselt DNA-d uuesti, seekord restriksionaasiga BspTI, mis peaks sk35 mtDNA fragmenti üks kord lõikama. Kandsin restrikteeritud DNA uuesti filtrile ning hübridiseerisin otse mitokondriaalse prooviga. Ka seekord jaotus mitokondriaalne proov filtril proovireale ühtlaselt (joonis 15). Ka võib selline mtDNA jaotus sk35 tüvele iseloomulik olla. Seega Din7 deletsiooni mõju rho<sup>-</sup> sk35 tüve mtDNA-le ei õnnestunud nende katsetega kindlaks teha, ning vajab tulevikus täiendavaid katseid.



**Joonis 15.** sk35 ja mutantide totaalse DNA restriksiooni-fragmentide analüüs mitokondriaalse prooviga hübridiseerimisel. Proovid 1-2 on sk35 tüve rakkudest, proovid 3-4 sk35  $\Delta ste5$  rakkudest ja proovid 5-13 sk35  $\Delta din7$  rakkudest. Hübridiseeritud radioaktiivse fragmendiga sk35 mtDNA järjestuselt. DNA-d lõigati restriктаasiga BspTI. Ilmutusaeg 21,5 tundi.

### 2.3.2.4. Tüve a1184 $\Delta din7$ deletsioonimutandi analüüs 2D-agarosgeelelektroforeesil

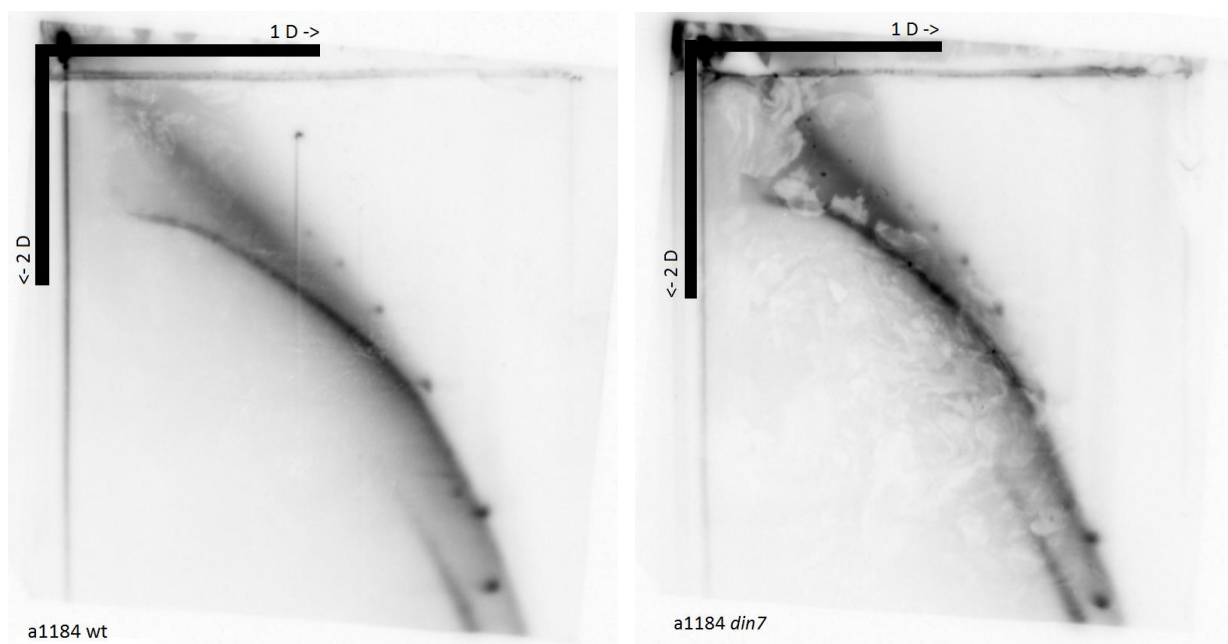
Rho<sup>-</sup> a1184  $\Delta din7$  tüve mtDNA hübridiseerimisel selgus, et  $\Delta din7$  deletsioon ei mõjutanud mtDNA fragmendi stabiilsust. Otsustasime uurida, kas a1184 ja a1184  $\Delta din7$  mtDNA topoloogia sarnaneb või erineb. Töös eelnevalt tehtud 1D geelidel (joonis 12) ei olnud võimalik DNA topoloogiat uurida, seega tuli kasutada 2D-AGE (2D-agarosgeelelektroforees) meetodit. See meetod võimaldab DNA molekule lahutada nii suuruse kui kuju järgi (joonis 16).



**Joonis 16.** mitokondriaalse DNA analüüs 2D-AGE meetodil. mtDNA analüüsimine 2D-AGE meetodil võimaldab mtDNA molekule lahutada nii suuruse kui kuju järgi. (sc rõngad – *supercoiled*) (Irc3 valgumõju mitokondriaalse genoomi stabiilsusele, Karin Villemson, 2013).

Eraldasin mtDNA nii a1184 kui a184  $\Delta din7$  rakkudest. Saadud mtDNA-le teostatud esimese dimensiooni (1D) elektroforeesil lahutusid DNA molekulid lahjas geelis (0,5% TAE agarosgeel) vaid oma suuruse järgi. mtDNA-d sisaldava raja lõikasin peale 1D elektroforeesi geelist välja ning asetasin uue kangema geeli (1% TAE agarosgeel, etiidiumbromiidi 300ng/ml) sisse nii, et see paikneks horisontaalselt geeli läbiva voolu suunaga. Teise dimensiooni (2D) elektroforeesil lahutusid juba suuruse järgi eraldatud mtDNA molekulid ka oma kuju järgi. Suuruse ja kuju järgi lahutatud mtDNA molekulid kandsin positiivselt laetud nailonfiltrile. Mitokondriaalse proovi tegemiseks kasutasin radioaktiivset dATP-d, a1184 mtDNA-d ja DecaLabel™ DNA Labelling komplekti. *Random priming* põhimõttel töötav DecaLabel™ DNA Labelling komplekt sisaldab erinevate järjestustega lühikeste praimerite segu, mis seonduvad a1184 mtDNA-le ning amplifitseerivad sealt lühikesi radioaktiivseid DNA fragmente.

Mitokondriaalse prooviga hübridiseerides selgus, et a1184 ja  $\Delta din7$  mtDNA topoloogias ei esinenud suuri erinevusi (joonis 17). Seega ei mõjutanud valgu Din7 deletsioon tüve a1184 mtDNA stabiilsust ega topoloogiat.



**Joonis 17. a1184 ja  $\Delta din7$  rakkudest eraldatud mtDNA analüüs 2D-AGE meetodil.** Tehniliste vigade tõttu ei ole a1184 tüve  $\Delta din7$  mtDNA täielikult filtrile kandunud.

Minu tehtud katsed haploidse rho<sup>+</sup> w303 MAT $\alpha$  tüvega näitasid, et Din7 deletsioon põhjustas rho<sup>+</sup> tüvel *petite* fenotüüpi, see tulemus on kooskõlas Fikus jt. poolt 2000. aastal avaldatud artikliga, kus nad näitasid, et DIN7 geeni deletsioon põhjustab *petite* mutantide tekkesageduse suurenemist. Seega, Din7 valk on vajalik rho<sup>+</sup> mtDNA stabiilsuse säilitamiseks.

Din7 valgu mõju rho<sup>-</sup> mtDNA-le on uuritud vaid ühes teadustöös (Ling jt., 2013), milles autorid näitasid, et DIN7 geeni deletsioon põhjustas 1,1 kb suuruse mtDNA-ga hüpersupressiivsel rho<sup>-</sup> tüvel mitokondriaalses DNA-s kaheahelaliste katkete hulga suurenemist ning koopiaarvu vähenemist. Minu uurimistöö tulemused näitasid, et DIN7 deletsioon põhjustas 1,79 kb suuruse mtDNA-ga supressiivsel a11 rho<sup>-</sup> tüvel üheksast uuritud Din7 deletsioonimutandist neljal mtDNA fragmenteerumise. 1,184 kb suuruse mtDNA-ga supressiivsel a1184 rho<sup>-</sup> tüve mtDNA stabiilsust ega topoloogiat DIN7 deletsioon aga ei mõjutanud. a11 ja a1184 tüved erinevad üksteisest mtDNA fragmendi pikkuse ja neis sisalduvate *ori*-järjestuste poolest. Seega Din7 deletsiooni mõju on erineva mtDNA suurusega rho<sup>-</sup> tüvedele erinev. Minu uurimustöö tulemused lisavad täiendavat informatsiooni Din7 valgu mõjust rho<sup>-</sup> tüvede mitokondriaalsele genoomile.

Minu töös kasutatud meetoditega ei õnnestunud Din7 deletsiooni mõju 0,469 kb suuruse mtDNA-ga neutraalse sk35 rho<sup>-</sup> tüvele kindlaks teha. Edasiseks Din7 deletsiooni mõju uurimiseks selle rho<sup>-</sup> tüve mtDNA-le tuleks kasutada teistsuguseid meetodeid. Näiteks võiks üle kontrollida töös kasutatud neutraalse rho<sup>-</sup> sk35 tüve mitokondriaalse DNA järjestuse. Ka võiks uurida, kas saadud tulemused sk35 tüve kohta on iseloomulikud neutraalsetele rho<sup>-</sup> tüvedele.

Din7 valk on varem deleteeritud haploididest pärmitüvedest, see tõi kaasa *petite* fenotüübi esinemissageduse suurenemise. Edaspidi võiks lisaks uurida, missuguse fenotüübi põhjustab diploidisel tüvel ühe DIN7 geenikoopia kaotus, sest on teada, et Din7 tase on rakus reguleeritud (Ling jt., 2013).

## Kokkuvõte

Din7 tase on rakus oluliselt reguleeritud, nii deletsioon kui üleekspressioon põhjustab mtDNA ebastabiilsust (Koprowski jt., 2003). Rho<sup>+</sup> tüvedel tekitab DIN7 geeni deletsioon suurenenud *petite* mutantide tekkesagedust ning rho<sup>-</sup> tüvel on näidatud DIN7 geeni deletsioonist põhjustatud mtDNA kaheahelaliste katkete hulga suurenemist ja mtDNA koopiaarvu vähenemist. (Fikus jt., 2000; Yoshitani jt., 2008; Ling jt., 2013).

Minu uurimistöö oli osa suuremast projektist, millega uuritakse mitokondriaalsete valkude mõju mtDNA stabiilsusele.

Minu tehtud katsed haploidse rho<sup>+</sup> w303 MAT $\alpha$  tüvega näitasid, et Din7 deletsioon põhjustas rho<sup>+</sup> tüvel *petite* fenotüüpi, mis lasi neil kasvada vaid glükoosi sisaldaval söötmel.

Din7 mõju selgitamiseks rho<sup>-</sup> tüve mtDNA-le tegin mitmest erineva mtDNA suurusega rho<sup>-</sup> tüvest Din7 deletsioonimutandid. Uurimistöö tulemused näitasid, et DIN7 deletsioon põhjustas a11 tüvel üheksast uuritud deletsioonimutandist neljal 1790 aluspaari suuruse mtDNA fragmenteerumise. a1184 tüve 1184 aluspaari suuruse mtDNA stabiilsust ega topoloogiat DIN7 deletsioon aga ei mõjutanud. a11 ja a1184 tüved erinevad üksteisest mtDNA fragmendi pikkuse ja neis sisalduvate *ori*-järjestuste poolest. Din7 deletsiooni mõju neutraalsele rho<sup>-</sup> sk35 tüvele ei õnnestunud töös kasutatud meetoditega kindlaks teha. Seega Din7 puudus võib mõjutada mtDNA stabiilsust, kuid mõju erineva mtDNA suurusega rho<sup>-</sup> tüvedele on erinev.

## Resume

### Effect of yeast *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial protein Din7 deletion on the stability of mitochondrial DNA

Mari-Liis Süld

Mitochondrial function is needed for respiration in yeast cells. Even though many proteins take part in maintaining normal mitochondrial functioning, very few of them are coded by the mitochondrial genome and majority of them are coded by the nuclear genome.

Din7p is coded by the nuclear genome, and is thought to play a part in reparation and recombination in mitochondria. Loss of gene DIN7 causes instability of mitochondrial genome in strains with functional mitochondria (Fikus et al., 2000; Yoshitani et al., 2008). However, there has been only one study on the role of Din7p in strains with defective rho<sup>-</sup> mitochondrial genome, where the authors showed that the loss of gene DIN7 causes an increase of dual-stranded breaks in the mitochondrial DNA (Ling et al., 2013).

Deletion of gene DIN7 in rho<sup>+</sup> strain w303 MAT $\alpha$  caused *petite* mutation, which is in accordance with known data about Din7. To further clarify the role of Din7p in rho<sup>-</sup> strains, deletion mutants of DIN7 in rho<sup>-</sup> strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* were constructed. Mitochondrial DNA from those mutants was hybridised with radioactive probes to study the effect of Din7p loss on rho<sup>-</sup> mtDNA. While loss of Din7p resulted in mtDNA instability in a rho<sup>-</sup> strain with genomic repeat size 1790 bp, mtDNA stability and topology in a rho<sup>-</sup> strain with shorter repeat (1184 bp) was not influenced. This suggests that role of Din7p might depend on the size of the rho<sup>-</sup> mitochondrial genome. However, the effect Din7 deletion in a neutral rho<sup>-</sup> strain with a small mtDNA (469 bp) could not be studied, because the results obtained by hybridising extracted total DNA with a radioactive mitochondrial probe proved to be inconclusive.

## **Kasutatud kirjandus**

Baldacci G, Bernardi G. Replication origins are associated with transcription initiation sequences in the mitochondrial genome of yeast. *The EMBO Journal* 1982, 1(8):987-994.

Baldacci G, Chérif-Zahar B, Bernardi G. The initiation of DNA replication in the mitochondrial genome of yeast. *The EMBO Journal* 1984; 3(9):2115-20.

Bendich AJ. The end of the circle for yeast mitochondrial DNA. *Molecular cell* 2010, 39(6):831-2.

Bernardi G. Lessons from a small, dispensable genome: The mitochondrial genome of yeast. *Gene* 2005, 354:189-200.

Blanc H, Dujon B. Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA responsible for suppressiveness. *PNAS* 1980; 77(7):3942-3946.

Burgers PM, Stith CM, Yoder BL, Spark JL. Yeast exonuclease 5 is essential for mitochondrial genome maintenance. *Molecular and cellular biology* 2010, 30(6):1457-66.

Contamine V, Picard M. Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiology and molecular biology reviews* 2000, 64(2):281-315.

De Deken, RH. The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *Microbiology* 1966, 44:149-156.

de Zamaroczy M, Baldacci G, Bernardi G. Putative origins of replication in the mitochondrial genome of yeast. *FEBS Letters* 1979, 108(2):429-432.

Dieckmann CL, Gandy B. Preferential recombination between GC clusters in yeast mitochondrial DNA. *The EMBO Journal* 1987, 6(13):4197-203.

Dorfman BZ. The isolation of adenylosuccinate synthetase mutants in yeast by selection for constitutive behavior in pigmented strains. *Genetics* 1969, 61(2):377-89.

Dujon B, Slonimski PP, Weill L. Mitochondrial genetics IX: A model for recombination and segregation of mitochondrial genomes in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1974, 78(1):415-37.

- Evans RJ, Oakley KM, Clark-Walker GD. Elevated Levels of Petite Formation in Strains of *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Restored to Respiratory Competence. I. Association of Both High and Moderate Frequencies of Petite Mutant Formation with the Presence of Aberrant Mitochondrial DNA. *Genetics* 1985, 111(3): 389–402.
- Fangman WL, Henly JW, Churchill G, Brewer BJ. Stable maintenance of a 35-base-pair yeast mitochondrial genome. *Molecular and cellular biology* 1989; 9(5):1917-21.
- Ferguson LR, von Borstel RC. Induction of the cytoplasmic 'petite' mutation by chemical and physical agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation research* 1992, 265(1):103-48.
- Fikus MU, Mieczkowski PA, Koprowski P, Rytka J, Sledziwska-Gójska E, Ciésła Z. The product of the DNA damage-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*, DIN7, specifically functions in mitochondria. *Genetics* 2000, 154(1):73-81.
- Foury F, Hu J, Vanderstraeten S. Mitochondrial DNA mutators. *Cellular and molecular life sciences* 2004, 61(22):2799-811.
- Foury F, Lahaye A. Cloning and sequencing of the PIF gene involved in repair and recombination of yeast mitochondrial DNA. *The EMBO Journal* 1987, 6(5):1441-9.
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* 1998; 440(3):325-31.
- Foury F. Cloning and sequencing of the nuclear gene MIP1 encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *The journal of biological chemistry* 1989, 264(34):20552-60.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W. *DNA Repair and Mutagenesis*, 1k 17. ASM Press, 1995.
- Gerhold JM, Aun A, Sedman T, Jöers P, Sedman J. Strand invasion structures in the inverted repeat of *Candida albicans* mitochondrial DNA reveal a role for homologous recombination in replication. *Molecular cell* 2010, 39(6):851-61.
- Gerhold JM, Sedman T, Visacka K, Slezakova J, Tomaska L, Nosek J, Sedman J. Replication intermediates of the linear mitochondrial DNA of *Candida parapsilopsis* suggest a common recombination based mechanism for yeast mitochondria. *The journal of biological chemistry* 2014, 289(33):22659-70.

- Goellner EM, Putnam CD, Kolodner RD. Exonuclease-1 dependant and independant mismatch repair. DNA repair 2015.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. Life with 6000 genes. Science 1996; 274(5287):546, 563-7.
- Goldring ES, Grossman LI, Marmur J. Petite mutation in yeast. II. Isolation of mutants containing mitochondrial deoxyribonucleic acid of reduced size. Journal of bacteriology 1971, 107(1):377-81.
- Goursot R, Mangin M, Bernardi G. Surrogate origins of replication in the mitochondrial genomes of ori-zero petite mutants of yeast. The EMBO Journal 1982, 1(6):705–711.
- Hentges P, Van Driessche B, Tafforeau L, Vandenhoute J, Carr AM. Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in *Schizosaccharomyces pombe*. Yeast 2005, 22(13):1013-9.
- Hyman BC, Cramer JH, Rownd RH. Properties of a *Saccharomyces cerevisiae* mtDNA segment conferring high-frequency yeast transformation. PNAS 1982; 79:1578-1582.
- Jensen RE, Hobbs AE, Cerveny KL, Sesaki H. Yeast mitochondrial Dynamics: fusion, segregation, and shape. Microscopy research and technique 2000, 51(6):573-83.
- Kalifa A, Quintana DF, Schiraldi LK, Phadnis N, Coles GL, Sia RA, Sia EA. Mitochondrial genome maintenance: roles for nuclear nonhomologous end-joining proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 2012, 190(3):951-64.
- Kalifa L, Beutner G, Phadnis N, Sheu SS, Sia EA. Evidence for a role of FEN1 in maintaining mitochondrial DNA integrity. DNA repair 2009, 8(10):1242-9.
- Kaniak A, Dzierzbicki P, Rogowska AT, Malc E, Fikus M, Ciesla Z. Msh1p counteracts oxidative lesion-induced instability of mtDNA and stimulates mitochondrial recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. DNA repair 2009, 8(3):318-29.
- Koprowski P, Fikus MU, Dzierzbicki P, Mieczkowski P, Lazowska J, Ciesla Z. Enhanced expression of the DNA damage-inducible gene DIN7 results in increased mutagenesis of mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular genetics and genomics 2003, 269(5):632-9.

- Lecrenier N, Foury F. New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene* 2000, 246(1-2):37-48.
- Ling F, Hori A, Yoshitani A, Niu R, Yoshida M, Shibata T. Din7 and Mhr1 expression levels regulate double-strand-break-induced replication and recombination of mtDNA at ori5 in yeast. *Nucleic acids research* 2013, 41(11):5799-816.
- Ling F, Morioka H, Ohtsuka E, Shibata T. A role for MHR1, a gene required for mitochondrial genetic recombination, in the repair of damage spontaneously introduced in yeast DNA. *Nucleic acids research* 2000, 28(24):4956-63.
- Ling F, Shibata T. Recombination-dependant mtDNA partitioning: *in vivo* role of Mhr1p to promote pairing of homologous DNA. *The EMBO journal* 2002, 21(17):4730-40.
- Lipinski KA, Kaniak-Golik A, Golik P. Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome--from genetics to evolution and systems biology. *Biochimica et biophysica acta* 2010, 1797(6-7):1086-98.
- Locker J, Rabinowitz M, Getz GS. Tandem Inverted Repeats in Mitochondrial DNA of Petite Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 1974, 71(4):1366-1370.
- Lorimer HE, Brewer BJ, Fangman WL. A test of the transcription model for biased inheritance of yeast mitochondrial DNA. *Molecular and cellular Biology* 1995, 15(9):4803-9.
- Lõoke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques* 2011, 50(5):325-8.
- MacAlpine DM, Kolesar J, Okamoto K, Butow RA, Perlman PS. Replication and preferential inheritance of hypersuppressive petite mitochondrial DNA. *The EMBO journal* 2001, 20(7):1807-17.
- Maleszka R, Skelly PJ, Clark-Walker GD. Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *The EMBO Journal* 1991; 10(12): 3923–3929.
- Mbantenkhu M, Wang X, Nardozi JD, Wilkens S, Hoffman E, Patel A, Cosgrove MS, Chen XJ. Mgm101 is a Rad52-related protein required for mitochondrial DNA recombination. *The journal of biological chemistry* 2011, 286(49):42360-70.

- Meeusen S, Nunnari J. Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *The journal of cell biology* 2003, 163(3):503-10.
- Meeusen S, Tieu Q, Wong E, Weiss E, Schieltz D, Yates JR, Nunnari J. Mgm101p is a novel component of the mitochondrial nucleoid that binds DNA and is required for the repair of oxidatively damaged mitochondrial DNA. *The journal of cell biology* 1999, 145(2):291-304.
- Mieczkowski PA, Fikus MU, Ciesla Z. Characterization of a novel DNA damage-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*, DIN7, which is a structural homolog of the RAD2 and RAD27 DNA repair genes. *Molecular and general genetics* 1997, 253(6):655-65.
- Miyakawa I, Aoi H, Sando N, Kuroiwa T. Fluorescence microscopic studies of mitochondrial nucleoids during meiosis and sporulation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science* 1984, 66:21-38.
- Moorkerjee SA, Sia EA. Overlapping contributions of Msh1p and putative recombination proteins Cce1p, Din7p, and Mhr1p in large-scale recombination and genome sorting events in the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation research* 2006, 595(1-2):91-106.
- Neupert W. Protein import into mitochondria. *Annual review of biochemistry* 1997; 66:863-917.
- O'Rourke TW, Doudican NA, Mackereth MD, Doetsch PW, Shadel GS. Mitochondrial dysfunction due to oxidative mitochondrial DNA damage is reduced through cooperative actions of diverse proteins. *Molecular and cellular biology* 2002, 22(12):4086-93.
- Qiu J, Guan MX, Bailis AM, Shen B. *Saccharomyces cerevisiae* exonuclease-1 plays a role in UV resistance that is distinct from nucleotide excision repair. *Nucleic acids research* 1998, 26(13):3077-3083.
- Sedman T, Jöers P, Kuusk S, Sedman J. Helicase Hmi1 stimulates the synthesis of concatemeric mitochondrial DNA molecules in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* 2005, 47(4):213-22.
- Sedman T, Kuusk S, Kivi S, Sedman J. A DNA helicase required for maintenance of the functional mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 2000, 20(5):1816-24.

Sedman T, Gaidutšik I, Villemson K, Hou Y, Sedman J. Double-stranded DNA-dependant ATPase Irc3p is directly involved in mitochondrial genome maintenance. *Nucleic acids research* 2014, 42(21):13214-27

Sena EP, Welch JW, Halvorson HO, Fogel S. 1975. Nuclear and mitochondrial deoxyribonucleic acid replication during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 1975; 123(2):497-504.

Sherman F. 2002. Getting Started with Yeast. *Methods in enzymology*, lk 2. 350:3-41.

Slonimski PP, Tzagoloff A. Localization in yeast mitochondrial DNA of mutations expressed in a deficiency of cytochrome oxidase and/or coenzyme QH<sub>2</sub>-cytochrome c reductase. *European journal of biochemistry* 1976, 61(1):27-41.

Svilar D, Goellner EM, Almeida KH, Sobol RW. Base excision and lesion-dependant subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxidants and redox signaling* 2011, 14(12):2491-507.

Zinn AR, Pohlman JK, Perlman PS, Butow RA. *In vivo* double-strand breaks occur at recombinogenic G+C rich sequences in the yeast mitochondrial genome. *PNAS* 1988, 85(8):2686-90.

Wang Y, Shadel GS. Stability of the mitochondrial genome requires an amino-terminal domain of the yeast mitochondrial RNA polymerase. *PNAS* 1999, 96(14):8046-51.

Williamson D. The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nature reviews. Genetics* 2002, 3(6):475-81.

Wu X, Wang Z. Relationships between yeast Rad27 and Apn1 in response to apurinic/aprimidinic (AP) sites in DNA. *Nucleic acids research* 1999, 27(4):956-62.

Yoshitani A, Ling F, Yoshida M. The yeast checkpoint kinase Dun1 downregulates DIN7 in the absence of DNA damage. *Bioscience, biotechnology and biochemistry* 2008, 72(6):1630-4.

Yoshitani A, Yoshida M, Ling F. A novel *cis*-acting element required for DNA damage-inducible expression of yeast DIN7. *Biochemical and biophysical research communications* 2008; 365(1):183-8.

Young MJ, Theriault SS, Li M, Court DA. The carboxyl-terminal extension on fungal mitochondrial DNA polymerases: identification of a critical region of the enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2006, 23(2):101-16.

### **Kasutatud veebiaadressid**

<https://instruct.uwo.ca/biology/3596a/startedyeast.pdf>

## Lisad

### Joonis 18. a11 fragmendi järjestus (saadud juhendajalt):

53757 TCTT

53761 TTTTCTATTT ATTAATAATA ACTATAAATT ATATTTAAAA TAATAATTTA CTTGTTATAA  
53821 TCTTAATGTT CCGGGGCCCG GCCACGGGAG CCGGAACCCC GAAAGGAGAA GTATATAAAT  
53881 ATTTACTTGT TATAATTTAT TATATATTTA TAACCTCCTT CTAAAAATTA TCTTTACTTT  
53941 ATAATAAAAA TTAATATAAT ATAATCTGAT AATAATCGAA TTTTATTATA TTAAATTTAA  
54001 TTAATAATAG ACAATTATTA TTATTATTTT ACTTATTAAT ATTAATTTAG ATTTATATAT  
54061 ATAAATATTA TTAATTTTAT ATTAATTTTT TATTAATTAT TTATTTTTAT ATTCATATTT  
54121 TTTATTAATA TTATTTTTAT TAATAACTTT TAAATAAATT ATAAACTATA TATTATTTAT  
54181 ATTTATATTT ATAATAAATG AAACAATTAT AATAAAAAATT ACAATTACAA TTATATTATA  
54241 ATTATGATTA CAATAGGGTT AAACATTACC TGTGAACAAC TGGTAATGTT TAACCCGTAT  
54301 TATTATTTAT TATATTATAT ATATATTTAA ATATTAATAT TAATATTAAT ATTATATTAT  
54361 ATTATATTAT ATTATATTAT ATTATATTAT ATTATATTTA TAATTATATT ATATTATATA  
54421 ATTTATATAC TTTTATAAATT CTTATTATTA TTTATTTTATT ATTTATTTAT TATTATTTAA  
54481 ATATATTATT ATTATATATT AATAATATAT ATATTATTTT ATATATTTTA TTTAATATAA  
54541 ATTATTTATA TTTTATATT TTATTA TGAG GGGGGTCCC AATTATTATT TTCAATAATA  
54601 ATTTATCATG GGACCCGGAT ATCTTCTTGT TTATCATTTA TTATCCTTAT TATTTGGTTT  
54661 TTATTTAATA TTTATAATTT ATTTTATACA ATTTATTATA TTGTTTATAC CTTATTATTA  
54721 TTATATAATA TATTATATTA TTATAATAAT TTAATTAATT ATATTATTAAT ATATTAACTA  
54781 ATGTGTGCTC TATATATATT ATTCATTCTA GTTTCTAATC ACCCACCCCTCCCTATT  
54841 ACTTATATA CTAGAAATAA AAATACATAA CATATATTTT AAATATATAT ATATAATTAT  
54901 ATAATAATTA TTATATATAA AATATATATA TATATAATAT ATATTTATAA AATAATAATA  
54961 ATAAATATTA TTAATCCATT AGAGGTTTTG GTCCCATATC AGGAACCGAA ACTATAATAA  
55021 TATATAATAT TATAATAAAG ATATTCTTAT TTATAATATA TTATTAAATA AATTAATAAT  
55081 AATTATAATA TATATATATA ATATATTATA ATATATTTAT TCGAGAACTT TTTATTTATT  
55141 ATAAAATAAA ATATTTTATT TATTATTTAG TTTTTTTTAA TAAACATTT TATAAAAATA  
55201 TAAATGTTAA TAATATTATG ATTAATAAGT AATAATAAAT TTATTTATTT TTATTAATTA  
55261 CTCTTCGAG GTATTAGTAT CAGTATCAGT ATCAGTATCG TAAAAAACGG GTGACTAAAA  
55321 TATATATATA TATAAAATTA TAAATAAAAA TATTATAATA ATTTTAAATA AATAAATATC  
55381 AATATATTAT TATTATTTAT ATTATAATAA ATATTATCTA ATAATAGTCC GGCCCGCCCC  
55441 CGCGGGGCGG ACCCCGAAGG AGTCCGAACC CCTTTTTTAT TTAATTTTAT TTAAGAAGG  
55501 AGTGAGGGAC CCCTCCCGTT AGGGAGGGG ACCGAACCCC GAAGGAG 55547

Antud fragment pärineb wt mtDNA piirkonnast 53757 – 55547. Fragmendi suurus on 1790 aluspaari. Punasega on tähistatud aktiivne *ori3*, allajoonitud on *ori*-regiooni A, B ja C blokk.

Esinev lõikesait, mida kasutati: **TCTAGA** mida lõikab ensüüm XbaI

### Joonis 19. a1184 fragmendi järjestus (saadud juhendajalt):

30305 **ATAAAA TAAATTTAAA ATAATTAATA TATATATATA AATATAATAA ATTATTATAT**  
30361 **ATAAATATAT ATAATTTTTA TAATAAATAT TATAATATTA TATAAATAAA TAATTATAAT**  
30421 **ATATAATAAA TATATAATAA TAATAAAAAAT ATTAACAATA TAATAAAAAAT TTATAATATA**  
30481 **AATATAAATT ATAAATAAGT TAAATTAATA AAATAATAAA TGATTAACAA GAA**GATATCT  
30541 **GGGGTCCCAT TAATAATTAT TATTTTCAAT AATAATTGGG ACCCCCCACC ATTA**TAAATAT  
30601 **CATATTAATT AATATAATAA TAATGTATAT AAAATAGAAA TAATAATTA TATAATAATA**  
30661 **ATAATATATA TAAAATAGAA ATAATAATTA AATATATATA TAAATAATTA TTTATATAAT**

30721 ATATTATAAA TAATAATAAT AATAAATATT TATTAATTA TAATGATTAT AAATATTTTA  
 30781 TTTAATATAA ATTTATAACT ATTTTATTAT ATATATATTT TTTATTCATA AAAATTCCTT  
 30841 TTGAGGATTT TTATTTTATA TAAATATCTT CTAATATTTA TAATAAATAA TAATATATTC  
 30901 ATTATATTTA TAATTATATA TAAT DELTA 1008 NT TATAATTATAAATAATTT ATATAAAAAA  
 AGTTTTATTA AAAAAATATTA  
 31981 TTAAAAATAT AATATTAATA ATAAAAATAA ATAATATTAT ACTCTTAATA GAATTTATAA  
 32041 TGATAAAAAAT TAAGATGAAG ACTTTTTTTT ATAATTATTA TAAATTTATA TAAAAATAAT  
 32101 ATATATATAT TTATATTTAT TTTATTAATA TATATAATAT ATTTATGTAT ATTA AAAAGA  
 32161 TATA **TTTAAA** TATTTTTATT TTTTTTTTAT AAGATAATTT TTGTAAATAT ATAAGTAATA  
 32221 **AATTAAGTTT TATAGGGGGA GGGGGTGGGT GATTAGAAAC TTAAGTGAAT AATATATATA**  
 32281 **AAGCATACAT TAGTTAATAT TTAATAATAT AATCAATATA TAATAATTAT AAAATAATTA**  
 32341 **ATTATATAAT AATAATAATG TATAAACAAT ATAATAAATT GTATAAATA AAATATAAAT**  
 32401 **CATAAATAAA GCTAAATTA TAAAATAATA AATGATAAAC AAGAA GATAT CCGGGTCCCA**  
 32461 **ATAATAATTA TTATTGAAAA TAATAATTGG GACCCC** 32498

Antud fragment pärineb wt mtDNA piirkonnast 30305 – 32498. Fragmendi suurus on 1184 aluspaari. Fragment sisaldab funktsionaalset *ori2* (tähistatud rohelisega; A, B ja C blokk on tähistatud allajoonitult) ja poolikut *ori7* (tähistatud punasega, A, B ja C blokk on tähistatud allajoonitult). Delta 1008 nt tähistab 1008 aluspaari suurust deletsiooni.

Esinev lõikesait, mida kasutati: **TTTAAA** mida lõikab ensüüm DraI

### Joonis 20. sk35 fragmendi järjestus (saadud juhendajalt):

58241 GAAACATCTAAGTAA **CTTAAG**GATAAGAAATCAACAGAGATATTATGAGTATT**GGTGA**GAGAAAATAATAAAGG  
 TCTAATAAGTATTATGTGAAAAAATGTAAGAAAATAGGATAACAAATTCTAAGACTAAATACTATTAATAAGTA  
 TAGTAAG**TACCGTAAGGAAAGTATGAA**AATGATTATTTATAAGCAATCATGAATATATTATATTATTAATG  
 ATGTACCTTTTGTATAATGGGTCAGCAAGT**AATTAATATTAGTAAAA**CAATAAGTTATAAATAAATAGAATAATA  
 TATATATATAAAAAAATATATTTAAAATATTTAATTAATATTAATTGACCCGAAAGCAAACGATCTAACTATGATA  
 AGATGGATAAACGATCGAACAGGTTGATGTTGCAATATCATCTGATTAATTGTGGTTA**GTAGTGAAAGACAAATC**  
**TGGT**TTGCAGATAGCTGGT 58709

21F1  
promootor  
21R1

Antud fragment pärineb wt mtDNA piirkonnast 58241 – 58709. Fragmendi suurus on 469 aluspaari, järjestus esitatud kaheaheelalisena. Fragment pärineb mitokondri 21S rRNA geenist (nukleotiidi 324 - 702). Fragment sisaldab transkriptsiooni promootorit.

**taccgtaagggaaagtatgaa** 21 F1 praimer

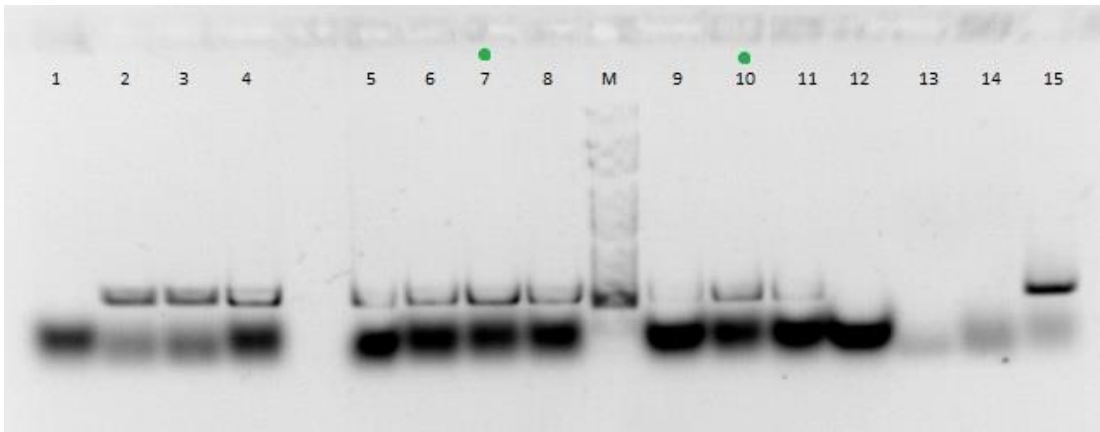
**accgatttgtctttcactac** 21 R1 praimer

**aattaatattagtaaaa** promootor

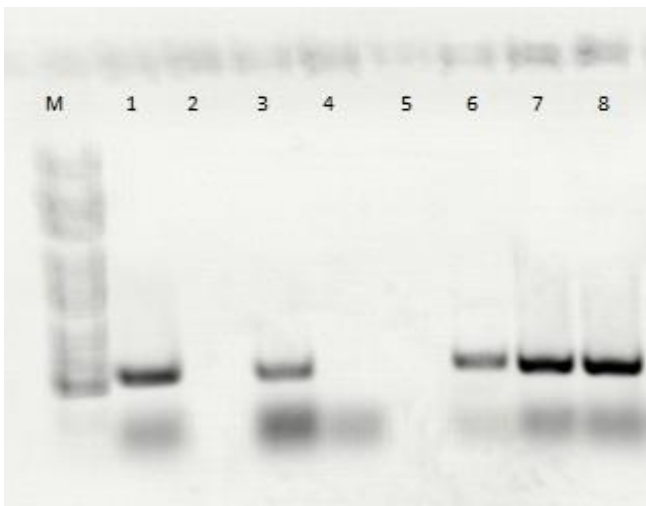
Esinevad lõikesaidid, mida kasutati: **CTTAAG** mida lõikab ensüüm BspTI

**GGTGA** mida lõikab ensüüm HphI

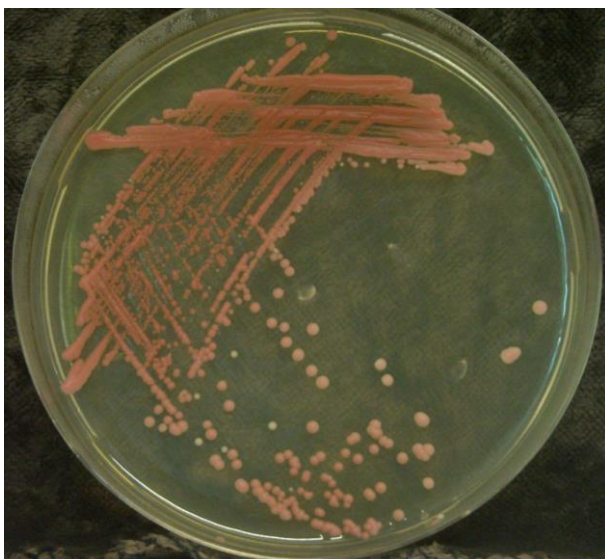
PCR produktid:



**Joonis 21. a11 ja sk35 tüve STE5 deletsioonimutantide analüüs agarosogeelektroforeesil.** Proovid 1-8 on a11 ja proovid 9-12 sk35 Ste5 deletsioonimutantidest. Proov 13 oli nullproov (PCR reaktsioonisegu ilma DNA-ta) ja proov 14 a1184 rakkudest. Proov 15 on positiivne proov (laboris olemasolev Ste5 deletsioonimutant). Edasisteks analüüsideks valisid proovid 7 ja 10 (roheliste täpiga märgitud). Nende puhul oli PCR produkt (505 bp) selgemalt näha.



**Joonis 22. a1184 tüve Ste5 deletsioonimutande analüüs geelektroforeesil.** Edasisteks analüüsideks valiti proov 8, sellel on PCR produkt (505 bp) selgelt näha.



**Joonis 23. w303 MAT $\alpha$   $\Delta$ din7 YPD Hph tardsöötmele.** Glütsrooliga YPG Hph tardsöötmele üles kasvanud kolooniast pärit rakud üle kantuna glükoosiga YPD Hph tardsöötmele, kus koloonid omandasid punaka värvuse.

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

Mina, Mari-Liis Süld (sünnikuupäev 12.02.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Pärmi *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalse valgu Din7 deletsiooni mõju mitokondriaalsele DNA-le”, mille juhendaja on Tiina Sedman (PhD)
  - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015