

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

Carolin Falten

**Irc valkude mõju *Saccharomyces cerevisiae* spooride elumusele ja  
mitokondriaalse DNA stabiilsusele**

Bakalaureusetöö

Juhendaja PhD Tiina Sedman

TARTU 2014

# SISUKORD

SISUKORD .....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mudelorganismina.....	6
1.2 Mitokonder ja mitokondriaalne genoom.....	6
1.3 <i>Rho</i> mutandid .....	8
1.4 Meioos ja sporulatsioon .....	9
1.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IRC geenid .....	10
1.5.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Irc valgud .....	13
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	15
2.1 Töö eesmärgid.....	15
2.2 Materjal ja meetodika .....	16
2.2.1 Kasutatud pärmitüved ja söötmed .....	16
2.2.2 Kasutatud praimerid ja restriктаasid.....	19
2.2.3 Polümeraasi ahelreaktsioon.....	20
2.2.4 Geelelektroforees .....	21
2.2.5 DNA fenooltöötlus .....	22
2.2.6 Transformatsioon LiAc meetodil .....	22
2.2.7 Spooride laialiajamise meetodi välja töötamine .....	23
2.2.8 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> totaalse DNA eraldamine .....	24
2.2.9 <i>Southern blot</i> .....	24
2.3 Tulemused ja arutelu.....	27
2.3.1 Irc valkude mõju <i>S. cerevisiae</i> mitokondriaalsele genoomile.....	28
2.3.2 Irc valkude deleteerimine W303a/ $\alpha$ diploidsest tüvest .....	30
2.3.2.1 Sobivaima spooride laialiajamise meetodi leidmine .....	30
2.3.2.2 <i>Irc</i> deletsioonitüvede sporulatsioon.....	32
2.3.2.2.1 <i>Irc3</i> deletsioonitüve sporulatsioon.....	32
2.3.2.2.2 <i>Mrp11</i> deletsioonitüve sporulatsioon .....	33
2.3.2.2.3 <i>Irc20</i> deletsioonitüve sporulatsioon.....	34
2.3.2.2.4 <i>Mrps16</i> ja <i>mrp17</i> deletsioonitüvede sporulatsioon.....	35
2.3.2.2.5 <i>Mdm20</i> deletsioonitüve sporulatsioon .....	37
2.3.2.3 <i>Irc</i> deletsioonitüvede spooride elumus .....	37

2.3.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mtDNA analüüs.....	39
KOKKUVÕTE .....	45
RESUME .....	46
TÄNUSÕNAD .....	47
KASUTATUD KIRJANDUS.....	48
LISAD .....	53
LIHTLITSENTS.....	54

## KASUTATUD LÜHENDID

AIR – P-ribosüülaminoimidasool

bp – *base pair*, aluspaar

DMSO - dimetüülsulfoksiid

dsDNA – *double stranded* DNA, kaheaheelaline DNA

EtBr – etiidiumbromiid

EtOH – etanool

G418 - genetitsiin

Hph – hügromütsiin

HR – homoloogiline rekombinatsioon

IRC – *Increased Recombination Center*

kb – *kilobasepair*, tuhat aluspaari

kDa – kilo dalton

KAc – kaaliumatsetaat

LiAc - liitiumatsetaat

mtDNA - mitokondriaalne DNA

NaAc – naatriumatsetaat

ORF – *Open Reading Frame*, avatud lugemisraam

ori – *origin of replication*, replikatsiooni alguspunkt

p/min – pööret minutis

wt – *wild type*, metsiktüüp

YFP – *yellow flourescent protein*

## SISSEJUHATUS

Mitokonder on eukarüootse raku organell, mille funktsiooniks on raku varustamine energiaga, seal viiakse lõpuni glükoosi lagundamine ja toodetakse ATP-d oksüdatiivse fosforüleerimise teel. Mitokondritel on oma genoom, mille funktsioneerumiseks on vaja tuuma poolt kodeeritud valke. Mitokondriaalne DNA (mtDNA) moodustab kogu raku genoomsest DNA-st ligikaudu 10%.

*Saccharomyces cerevisiae* on võimeline ellu jääma ka mtDNA-s olevate mutatsioonide korral. MtDNA täielikul deleteerumisel tekivad tsütoplasmaatilised *petite* ehk  $\rho^0$  rakud ning mtDNA osalisel deleteerumisel tekivad hingamisdefektiga *petite* ehk  $\rho^-$  rakud.

Irc (*Increased Rekombination Centre*) valgud avastati 2007. aastal Alvaro ja kaasautorite poolt tehtud *Saccharomyces cerevisiae* ülegenoomi uuringus. Avastati 86 uut geeni, mille deleteerimine põhjustab Rad52 fookuste arvu tõusu tuumas. Rad52 fookused on suured valgukompleksid, mis vastutavad homoloogilise rekombinatsiooni mehhanismide eest rakus.

Käesoleva töö kirjanduse osas antakse ülevaade Irc valkude funktsioonidest. Nendeks valkudeks olid Irc3, Mrp11, Mrps16, Mrp17, Mdm20 ja Irc20. Samuti selgitatakse sporulatsiooni mehhanismi ning mitokondriaalse DNA olulisust.

Töö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli uurida mitokondriaalsete Irc valkude põhjustatud fenotüüpe *Saccharomyces cerevisiae* W303 tüvedes. Eksperimentaalselt tehti *irc* deletsioonitüved metsiktüüpi W303 $\alpha$  haploidsetesse ja W303 $\alpha/\alpha$  diploidsetesse ning hingamisdefektiga supressiivsetesse  $\rho^-$  A11 ja A1184 tüvedesse. Töö teise osa eesmärgiks oli hinnata *S. cerevisiae* *irc* deletsioonitüvede spooride elumust ning analüüsida Irc valkude deleteerimisest põhjustatud muutusi  $\rho^-$  tüvede mitokondriaalses DNA-s.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 *Saccharomyces cerevisiae* mudelorganismina

*Saccharomyces cerevisiae* ehk pagaripärm on üherakuliste eukarüootide mudelorganism, kes suudab kasvada erinevates keskkonnatingimustes. Aeroobses keskkonnas kasutab ta hingamiseks hapnikku ning anaeroobses keskkonnas toodab elutegevuseks vajalikku energiat etanoolkäärimisega. Ta on fakultatiivne anaeroob, kes on võimeline ellu jääma ka mitokondriaalse genoomi mutatsioonide korral (Hyman jt., 1982). *S. cerevisiae* on esimene eukarüoot, kelle genoom sekveneeriti 1996. aastal. Pagaripärmi genoom koosneb  $12 \times 10^6$  aluspaarist ning sisaldab üle 6000 geeni (Goffeau jt., 1996).

*Saccharomyces cerevisiae* on laialt kasutatav mudelorganism raku bioloogia, raku metabolismi, rakutsükli ja signaalide ülekande uurimisel (Petranovic jt, 2010). Samuti kujutab pagaripärm endast hinnatud mudelorganismi ebasoodsatest, stressi esilekutsuvatest keskkonnatingimustest põhjustatud rakkude vastuse mehhanismide uurimisel (Giannattasio jt, 2013).

## 1.2 Mitokonder ja mitokondriaalne genoom

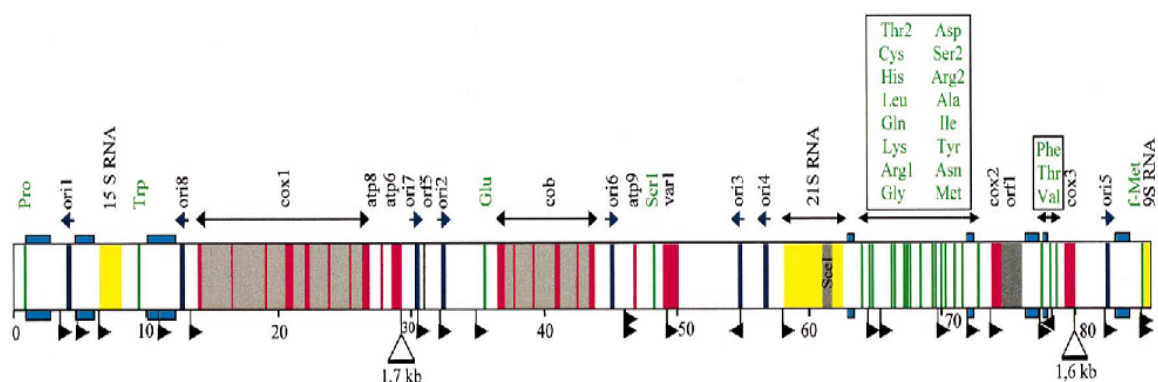
Mitokonder on 0,5 – 1,0  $\mu\text{m}$  diameetriga eukarüootse raku kahe membraaniga ümbritsetud organell. Mitokondrid on väga plastilised organellid, milles viiakse lõpuni glükoosi lagundamine ja sünteesitakse makroergilisi ühendeid. Kahe membraani tõttu on mitokondrites mitu kompartmenti: välismembraan, membraanidevaheline ruum, sisemembraan, sisemembraani sissesopistused ehk kristad ja maatriks. Mitokondri peamiseks funktsiooniks on ATP tootmine oksüdatiivse fosforüleerimise teel mitokondri sisemembraanil. Oksüdatiivse fosforüleerimise metabolismirada sisaldab mitokondriaalset hingamisahelat ja ATP süntaasi kompleksi.

Mitokondril on oma genoom, mis kodeerib väiksel hulgal mitokondri genoomile vajalikke valke. Mitokondriaalse genoomi poolt kodeeritud valgud transleeritakse mitokondriaalsete ribosoomide poolt (Attradi ja Schatzi, 1988; Gan jt., 2002). 95-98% mitokondri valkudest on kodeeritud tuuma geenide poolt, mis sünteesitakse tsütosoolis olevatelt ribosoomidelt ja transporditakse mitokondrisse (Neupert, 1997). Tuuma geenide poolt kodeeritud valgud osalevad mtDNA replikatsioonis, transkriptsioonis ja translatsioonis (McCammon, 1996). Võrreldes tuuma genoomiga on mitokondriaalne genoom tundlikum, mistõttu on ta

kahjustustele palju vastuvõtlikum (Brown jt., 1979; Ballard ja Whitlock, 2004; Tatarenkov ja Avise, 2007). *S. cerevisiae* genoomi iseloomustab madal geenitihedus ja suur A+T nukleotiidide sisaldus (Foury jt., 1998).

*Saccharomyces cerevisiae* 75 - 80 kb suurune mitokondriaalne genoom on lineariseeritud kujul ~25 µm pikkune (Chen ja Butow, 2005). Mitokondri genoom on pakitud DNA-valk kompleksi ehk mitokondri nukleoidi (Miyakawa jt., 1987). Pagaripärmi mitokondriaalne DNA moodustab kogu genoomi DNA-st umbes 10% (Goldring jt., 1971). *Saccharomyces cerevisiae rho<sup>+</sup>* mitokondriaalne genoom sisaldab 7 - 8 replikatsiooni alguspunkti (ori). Homoloogsed ori järjestused sisaldavad kolme G+C nukleotiidide rohket A, B ja C *box*'i ning nelja A+T nukleotiididerikast ala (de Zamaroczy jt., 1986).

Pärmi mitokondriaalne genoom sisaldab tsütokroom c oksüdaasi alaühikuid I, II ja III (cox1, cox2 ja cox3), ATP süntaasi alaühikuid 6, 8 ja 9 (atp6, atp8, atp9), apotsütokroomi b (cytb), ribosomaalset valku (var1) ja mitmeid intronitega seotud avatud lugemisraame (ORF) (de Zamaroczy ja Bernardi, 1986). Mitokondriaalne genoom kodeerib 21S ja 15S ribosomaalset RNA-d ja 24 tRNA-d, mis tunnevad ära kõiki koodoneid ning RNAas P komponeti 9S RNA-d (de Zamaroczy ja Bernardi, 1986; Foury jt., 1998).



**Joonis 1. Mitokondri genoomi lineariseeritud kaart *S. cerevisiae* tüvest FY1679.** *S. cerevisiae* tüve FY1679 mtDNA järjestus on 85 779 bp pikkune. Punased: eksonid, valke kodeerivad geenid; hallid: intronid ja intronitega seotud ORF-id; rohelised: tRNA-d; kollased: 9S, 15S ja 21S RNA-d; tumesinised: ori elemendid; helesinised: FY1679 sekveneerimisel täidetud tühimikud. Lipukesed tähistavad transkriptsiooni initsiatsiooni kohti ja nende positsioonide orientatsiooni. Võrreldes D273-10B tüvega on FY1679 tüve mitokondriaalses DNA-s kaks üle 1,5 kb suurust deletsiooni, mis asuvad allpool cox3 ja atp6 stopkoodoneid (tähistatud kolmnurkadega). Need deletsioonid on tingitud ORF2 ja ORF4 puudumisest mtDNA-s (Foury jt., 1998).

### 1.3 *Rho* mutandid

Pärmi mitokondriaalset DNA-d tuntakse *rho* faktorina. Normaalselt hingavaid metsiktüüpi pärmi rakke nimetatakse  $rho^+$  rakkudeks. Hingamisdefektiga rakkudel võib olla kogu mtDNA deleteeritud ( $rho^0$ ) või koosneda metsiktüüpi genoomi fragmentidest ( $rho^-$ ).  $Rho^0$  ja  $rho^-$  mutandid ei ole võimelised kasvama mittefermenteeriva süsinikuallikaga söötmetel. *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalse DNA kõikidel aktiivsetel DNA replikatsiooni ori järjestustel esineb 280 nukleotiidi pikkune homoloogiline konserveerunud ala ja promootor. *S. cerevisiae* aktiivsed ori järjestused 1, 2, 3 ja 5 on vajalikud efektiivse DNA replikatsiooni toimumiseks (Faugeron-Fonty jt., 1984). Ülejäänud ori järjestustes on toimunud insertioonid promootoris, mis muudab nad inaktiivseks.

Suur osa  $rho^-$  rakkudest on retsessiivsed – ristamisel metsiktüüpi rakkudega säilib järglaskonnas metsiktüüpi  $rho^+$  genoom. Supressiivsete  $rho^-$  rakkude ristamisel  $rho^+$  rakkudega tekivad järgmises põlvkonnas 95-98% ulatuses  $rho^-$  genoomiga rakud (Blanc ja Dujon, 1980). Hüpersupressiivsus on pärmi omadus  $rho^-$  mutantide ristamisel  $rho^+$  rakkudega pärandada  $rho^-$  genoom edasi 100% efektiivsusega (Graves jt., 1998; Blanc ja Dujon, 1980). Supressiivsus sõltub pärmi mitokondriaalses genoomis olevatest aktiivsetest ori järjestustest ning mtDNA suurusest. Väiksema mitokondriaalse genoomiga  $rho^-$  rakud on supressiivsemad.

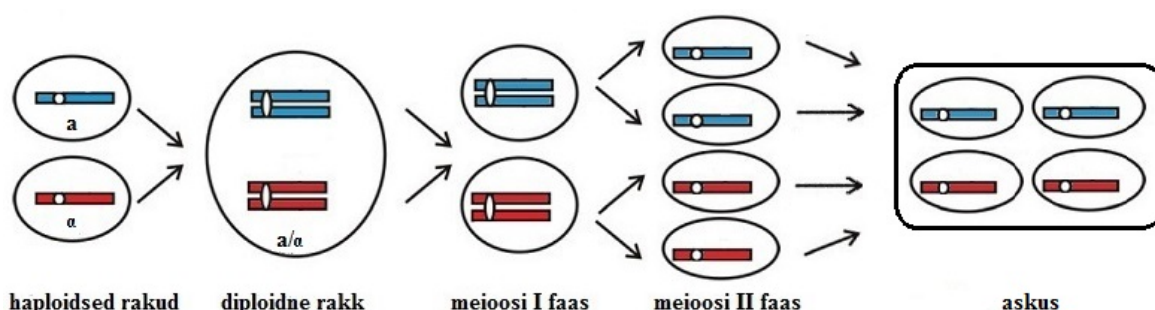
$Rho^-$  mutandid on  $rho^+$  rakkudest palju väiksemad, seetõttu nimetatakse neid *petite* rakkudeks.  $Rho^-$  mutantide aeglasem kasv on tingitud sellest, et neil puudub oksüdatiivse fosforüleerimise metabolismirada. *Petite* mutandid toodavad ATP-d glükolüüsi ja etanoolkääritamisega (Dujon, 1981). *Saccharomyces cerevisiae* tüve W303  $rho^+$  rakud erinevad mutantsetest  $rho^-$  rakkudest ka koloonia värvuse poolest. ADE2 geeni produkt vastutab rakus adeniini biosünteesi eest. Mutatsiooni korral selles geenis akumulereerub korrektse hingamisahelaga rakkudes biosünteesiraja intermediaatormolekul P-ribosüülaminoimidiasool (AIR), mis põhjustab punase pigmendi ilmumise oksüdeerivates rakkudes (Ugolini ja Bruschi, 1996). Puuduliku mitokondriaalse genoomiga rakkudes ( $rho^0$  või  $rho^-$ ) ei teki punast pigmenti seetõttu, et nendes rakkudes puudub oksüdatiivse fosforüleerimise rada.

*Petite* mutantide tegemise peamise meetodina kasutatakse EtBr töötlust. Goldring ja kaasautorite tööst selgus, et rakkude EtBr-ga töötlemise aja pikenedes vähenes järsult mtDNA hulk (Goldring jt., 1971).

## 1.4 Meioos ja sporulatsioon

Sobivates kasvutingimustes jaguneb *S. cerevisiae* diploidne rakk mitootilise pungumise teel. Meiootiline jagunemine sõltub diploidsete rakkude paardumistüübist ja toiteainete sisaldusest keskkonnas (Kassir jt., 2003). Meioosi käigus läbivad pärmi rakud ühe replikatsiooni ning kaks segregatsiooni etappi, moodustades 4 haploidset tuuma (Esposito ja Klapholz, 1981). *S. cerevisiae* heterosügootsed MATa ja MAT $\alpha$  lookusega rakud läbivad meioosi, mittefermenteeriva süsinikuallika olemasolul ja lämmastikuallika puudusel keskkonnas (Freese jt., 1982; Kassir jt., 2003). Sporulatsiooni käigus moodustub askus ehk eoskott, mis sisaldab nelja haploidse tuumaga askospori (Joonis 2). Pagaripärmi homosügootsed a/a või  $\alpha/\alpha$  diploidsed rakud, mis omavad kahte MATa või MAT $\alpha$  lookust, ei ole võimelised spoore moodustama (Roman jt., 1955).

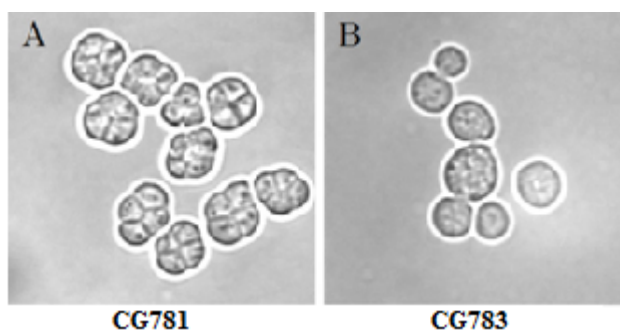
Sporulatsiooni käigus toimub kahe uue rakustruktuuri *de novo* areng – spoori plasmamembraan, mis areneb diploidse raku tsütoplastmast ja spoori kest, mis kaitseb väliskeskkonna eest (Neiman, 2011). *S. cerevisiae* heterosügootse paardumistüübiga rakud võivad vastuseks toiteallika muutusele keskkonnas käituda väga erinevalt. Mõnede toitainete puuduse tõttu võivad rakud siseneda statsionaarsesse faasi (Hartwell, 1974) või muuta oma morfoloogia filamentseks (Gimeno jt., 1992).



**Joonis 2. Pärmi sporuleerumise skeem.** W303a ja W303 $\alpha$  haploidse kromosoomistikuga rakkude paardumisel tekib diploidse kromosoomistikuga rakk W303a/ $\alpha$ , mis paljuneb mitootiliselt, kuid ebasoodsates keskkonnatingimustes läbib meioosi. Meioosijärgsel sporulatsioonil moodustub neli haploidse kromosoomistikuga askospori, mis paiknevad ühises askuses ehk eoskotis. Iga spoor on võimeline andma eraldi järglaskonna sobivates keskkonnatingimustes.

Sporulatsioon jaguneb kolmeks põhiliseks faasiks. Varajase faasi alguses põhjustavad lämmastiku ja glükoosi puudus keskkonnas rakkude diferentseerumist spoorideks. Rakud läbivad mitootilise G1-faasi ja sisenevad meioosi-eelsesesse S-faasi, kus toimub DNA replikatsioon (Neiman, 2011; Mitchell, 1994). Sporulatsiooni varajase faasi lõpuks on

toimunud rakutsükli mehhanismis muutused (Shuster ja Byers, 1989). Keskmises faasis toimuvad rakus tsütoloogilised muutused, mille tulemusel saadakse meiootilisel jagunemisel neli haploidse tuumaga tütarrakku. Selline pakkimisviis nõuab suuri muutusi raku tsütoplasmas. Hilises faasis toimub prospoori membraani sulgumine, millele järgneb spoori teke (Neiman, 2011). Iga spoori ümber koguneb paks kiht ehk spoori sein, mis on vajalik nende valmimiseks (Briza jt., 1990; Coluccio ja Neiman, 2004). Kromatiini pakkimine spoori tuuma ja uute organellide teke algab peale spoori seina sulgumist (Roeder ja Shaw, 1996; Krishnamoorthy jt., 2006; Suda jt., 2007), mille järel moodustab emarakk spooride ümber tetraeedrilise kujuga askuse (Neiman, 2011) (joonis 3).



**Joonis 3.** *Saccharomyces cerevisiae* tüvede sporulatsiooni morfogenees. A: *S. cerevisiae* tüve CG781 4 haploidset spoori on pakitud tetraeedrilisse askusesse. B: sporulatiooni-defektiga *S. cerevisiae* tüvi CG783 (Heider jt., 2008).

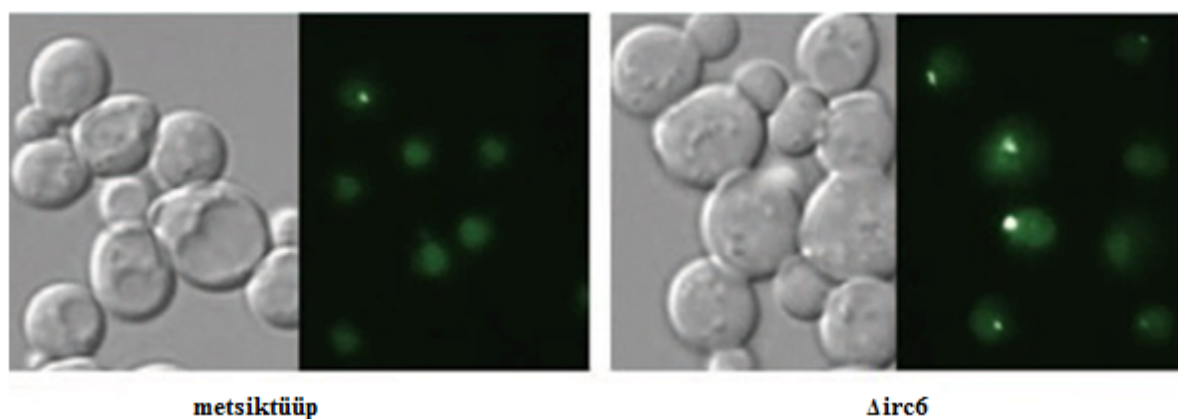
### 1.5 *Saccharomyces cerevisiae* IRC geenid

*Saccharomyces cerevisiae*'s blokeeritakse replikatsioonikahvlid vastusena DNA kahjustustele. Tekkinud DNA kahjustused parandatakse homoloogilisel rekombinatsioonil (HR) Rad52 epistaasi grupi valkude poolt, mis moodustavad tuumas selgelt eristatava subnukleaarse Rad52-YFP (*yellow fluorescent protein*) fookuse (joonis 4) (Lisby ja Rothstein, 2005; Alvaro jt., 2007). Rad52-YFP fookused näitavad ära homoloogilise rekombinatsiooni toimumispaigad, sest initsieerivad HR valkude lokaliseerimise vigasesse piirkonda (Lisby ja Rothstein, 2005). Rad52 epistaasi grupi kuuluvad Rad51 (*E. coli* RecA homoloog), Rad55, Rad57 ja Dmc1, oletatav SWI/SNF perekonna ATPaas Rad54, Rad52 homoloog Rad59, Mre11, Xrs2 ning Rad50. Rad52 seondub üheaheelalisele DNA-le *in vitro*, stimuleerib DNA ahelate seandumist ning suurendab Rad51 poolt katalüüsitud ahelate invasiooni (Lisby jt., 2001). Reparatsiooni valgud Mre11/Rad50/Xrs2 tuvastavad kahjustunud kohad, seonduvad sinna ja peatavad rakutsükli kuni reparatsiooni lõpuni. Peale väliste DNA-d kahjustavate

tegurite (dsDNA kahjustamine  $\gamma$ - kiirgusega) kutsub Rad52 fookuste moodustumine esile ka raku sisenemise S-faasi (Lisby jt., 2001).

DNA kahjustuste uurimiseks tegid Alvaro ja kaasautorid 2007. aastal *Saccharomyces cerevisiae* ülegenoomi uuringu. Selle käigus avastati geenid, mille deleteerimisel tõuseb tuumas Rad52 fookuste arv. Homoloogiline rekombinatsioon on DNA järjestuse homoloogiast sõltuv reparatsiooni mehhanism, mille käigus toimub kas ühe molekuli piires või kahes erinevas DNA molekulis sarnase järjestusega DNA regioonide vahetumine. Seda protsessi katalüüsib *E. coli* RecA valk, mis on konserveerunud nii prokarüootsetes kui ka eukarüootsetes organismides. Pagaripärmi RecA valgu homoloog on Rad51.

Ülegenoomse analüüsi tulemusel identifitseeriti 86 geeni, mille deleteerimisel tõusis Rad52-YFP fookuste esinemissagedus. Nende geenide poolt kodeeritud valgud osalevad replikatsiooni, reparatsiooni, vaigistamise ja kromosoomide segregatsiooni regulatsioonis. Lisaks leiti 22 varem kirjeldamata ORF-i, mis tähistati IRC 2 – 11, IRC 13 – 16 ja IRC 18 – 25 (Alvaro jt., 2007).



**Joonis 4. Spontaansed Rad52-YFP fookused metsiktüüpi ja  $\Delta$ irc6 deletsiooniga tüves.** Mutantne tüvi  $\Delta$ irc6 avastati Rad52 spontaansete fookuste arvu tõusu jälgimisel ülegenoomi uuringus (Alvaro jt., 2007).

Alvaro ja kaasautorid grupeerisid IRC geenid nelja alamklassi sõltuvalt nende mõjust homoloogilisele rekombinatsioonile:

- Klass I. Geenide deletsioonid tõstsid Rad52-YFP fookuste arvu, kuid põhjustasid Rad51 sõltuva homoloogilise rekombinatsiooni vähenemist (Alvaro jt., 2007; Lisby jt., 2003). Sellesse klassi ei kuulu ükski käesolevas töös uuritud IRC geenidest.

- Klass II: Geenide deletsioonid tõstsid homoloogilise rekombinatsiooni taset. Sellesse klassi kuuluvad varem kirjeldatud geenid, mis osalevad genoomi stabiilsuse säilitamisel ja spontaansete DNA kahjustuste piiramisel. Käesolevas töös uuritud geenidest kuulub siia MRP17 (tabel 1).
- Klass III. Geenide deletsioonid põhjustasid homoloogiliste kromosoomide vahelise rekombinatsiooni tõusu diploidsetes rakkudes võrreldes tütarchromatiidide vahelise rekombinatsiooniga haploidsetes rakkudes. III klassi kuuluvad mutandid vastutavad DNA replikatsiooni, reparatsiooni ja kromatiini dünaamika eest. Ülegenoomi uuringus avastatud IRC4, IRC5, IRC7, IRC9, IRC14 ja IRC19 kuuluvad sellesse gruppi.
- Klass IV. Geenide deletsioonid mõjutavad homoloogilist rekombinatsiooni vaid spetsiifilistes regioonides. Sellesse klassi kuuluvad kromatiini ümbermodelleerimise ja rakutsükli kontrollpunktide mitokondriaalsed geenid. Käesolevas bakalaureusetöös uuritud geenidest kuuluvad sellesse klassi MRPL1, MRPS16, MDM20, IRC20 ja IRC3 (tabel 1) (Alvaro jt., 2007).

**Tabel 1.** Käesolevas töös uuritud geenid, mille deleteerimisel tõusis Rad52-YFP fookuste arv. Metsiktüüpi tüves on Rad52-YFP fookuseid 5% (Alvaro jt., 2007).

<b>Deleteeritud geen</b>	<b>Fookuste arvu tõusu protsent</b>	<b>Asukoht rakus</b>	<b>Klass</b>
MRPL1	22%	mitokondris	IV
MRPS16	23%	mitokondris	IV
MRP17	21%	mitokondris	II
MDM20	32%	mitokondris	IV
IRC20	21%	määramata	IV
IRC3	31%	mitokondris	IV

### 1.5.1 *Saccharomyces cerevisiae* Irc valgud

- Mrp11 on 31 kDa suurune mitokondri ribosoomi suure subühiku valk, mille deleteerimine põhjustab rakkudes respiratoorse kasvu vähenemist. Mrp11 puudumine põhjustab märgatavalt rakkude kasvu vähenemist YPG söötmel 23°C juures, kuid samas ei ole Mrp11 hädavajalik mitokondriaalse translatsioonimehhanismi jaoks (Gan jt., 2002).
- Mrps16 on 13,6 kDa suurune mitokondri ribosoomi väikese subühiku valk, mis on vajalik hingamisahela funktsioneerimiseks. Lisaks on teada, et Mrps16 on vajalik ka sporulatsiooni efektiivsuse säilitamiseks diploidsetes rakkudes (Deutschbauer jt., 2002). Mrps16 valgu puudumisel on rakkude kasv YPD söötmel aeglane ning nad ei ole võimelised kasvama YPG söötmel (Gan jt., 2002). Mutatsioonid Mrps16 valgus põhjustavad mitokondriaalse mRNA vigast translatsiooni, millega kaasnevad ebatäpsused hingamisahelas (Haque jt., 2008).
- Mrp17 on 15 kDa suurune mitokondri ribosoomi väikese subühiku valk (Kitakawa jt., 1997), mis on vajalik hingamisahela funktsioneerimiseks. Mrp17 põhjustab mõne teise mitokondriaalse ribosoomi valgu puudumisel rakkude defekset fenotüüpi (Haffter ja Fox, 1992). Mrp17 deleteerimisel suudavad rakud säilitada normaalse rakutsükli mehhanismi (Heeren jt., 2009).
- Mdm20 on 92,8 kDa suurune mitokondriaalne valk, mille deleteerimine põhjustab rakkudes respiratoorse kasvu vähenemist. Mdm20 katalüüsib N-terminaalset atsetülatsiooni kindla aminoterminaalsete järjestusega valkudele. Mdm20 valk kuulub NatB N-terminaalsete atsetül-transferaasi mitte-katalüütilisse subühikusse, täites seal abivalgu funktsiooni (Polevoda jt., 2009). Evolutsiooniliselt konserveerunud Mdm20 valk osaleb tropomüosiin-F-aktiini interaktsioonides, tekitades aktiini filamente (Singer ja Shaw, 2003). Mdm20 valgu puuduses tekivad mitokondri defektid, mis kanduvad edasi järglastele, rakkude kasv muutub temperatuuritundlikuks ning kaob rakkude võime transportida mitokondreid uutesse pungadesse (Hermann jt., 1997).

- Irc20 on 180,3 kDa suurune nii tuumas kui ka mitokondris lokaliseeruv valk. Irc20 sisaldab RING domääni, mis võimaldab valgul otseselt DNA-ga seonduda (Shiratori jt., 1999) ja Snf/Swi perekonna ATP-aasi domääni. Irc20 valk on seotud DNA reparatsiooniga (Richardson jt., 2013). Irc20 osaleb koos Srs2 valguga DNA sünteesist sõltuvas ahelate seondumises ning täidab oma funktsiooni enne *D-loop* struktuuri teket (Miura jt., 2012). Lisaks on teada, et Irc20 üleekspressioon põhjustab valgu RING domäänil ka ubikvitiin E3 aktiivsust *in vitro* (Richardson jt., 2013).
- Irc3 on 78,5 kDa suurune valk, mis vajalik hingamisahela funktsioneerimiseks. Irc3 on DEAD/H *box* perekonna oletatav RNA helikaas, mis kuulub helikaaside superperekonda II (de la Cruz jt., 1999). Irc3 puudumine põhjustab rakkude aeglasemat kasvu 30°C ja 37°C juures (Shiratori jt., 1999). Valgu funktsiooni uuritatakse Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi Biokeemia laboris.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Käesolev töö on osa suuremast projektist, mille käigus uuritakse *Saccharomyces cerevisiae* erinevaid mitokondriaalseid valke, mis on olulised nii genoomse kui ka mitokondriaalse DNA stabiilsuse säilitamisel. Samuti soovitakse uurida mitokondriaalse DNA säilitamises osalevate valkude funktsioone.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärkideks oli:

- uurida mitokondriaalsete Irc valkude deleteerimisest põhjustatud fenotüüpe *S. cerevisiae* W303 tüvedes;
- analüüsida Irc valkude deleteerimise mõju W303a/ $\alpha$  tüve spooride elumusele;
- analüüsida Irc valkude deleteerimise mõju mitokondriaalse DNA stabiilsusele W303 supressiivsetes *rho<sup>-</sup>* tüvedes A11 ja A1184.

## 2.2 Materjal ja metoodika

### 2.2.1 Kasutatud pärmitüved ja söötmed

Tabelis 2 on välja toodud töös kasutatud *S. cerevisiae* tüved.

**Tabel 2.** Töös kasutatud *Saccharomyces cerevisiae* tüved.

Tüvi	Genotüüp	Päritolu
W303-1B	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100</i>	Rodney Rothstein
W303a/ $\alpha$	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> ade2-1/ade2-1, ura3-1/ura3-1, his3-11,-15/his 3-11,-15, trp1-1/trp1-1, leu2-3,-112/leu2-3,-112, can1-100 /can 1-100,</i>	Rodney Rothstein
W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A11	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100</i>	Tiina Sedman
W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A1184	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1 leu2-3, -112, can1-100</i>	Karin Villemson
W303 $\alpha$ $\Delta$ mrp11	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, mrp11::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 $\alpha$ $\Delta$ mrps16	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1 leu2-3, -112, can1-100, mrps16::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 $\alpha$ $\Delta$ mrp17	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, mrp17::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 $\alpha$ $\Delta$ mdm20	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, mdm20::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 $\alpha$ $\Delta$ irc20	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, irc20::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 $\alpha$ $\Delta$ irc3	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, irc3::Hph</i>	Tiina Sedman

<b>Supressiivsed <i>rho</i><sup>-</sup> tüved</b>	<b>Genotüüp</b>	<b>Päritolu</b>
W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A11 Δmrp11	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, mrp11::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A11 Δmrps16	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, mrps16::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A11 Δmrp17	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, mrp17::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A11 Δmdm20	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, mdm20::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A11 Δirc20	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, irc20::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A11 Δirc3	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, irc3::Hph</i>	Käesolev töö
W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A1184 Δmrp11	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, mrp11::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A1184 Δmrps16	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, mrps16::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A1184 Δmrp17	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, mrp17::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A1184 Δmdm20	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, mdm20::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A1184 Δirc20	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, irc20::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A1184 Δirc3	<i>ade2-1, ura3-1, his3-11, -15, trp1-1, leu2-3, -112, can1-100, irc3::Hph</i>	Käesolev töö

<b>Tüvi</b>	<b>Genotüüp</b>	<b>Päritolu</b>
W303 a/α Δmrp11	<i>ade2-1/ade2-1, ura3-1/ura3-1, his3-11,-15/his3-11,-15, trp1-1/trp1-1, leu2-3,-112/leu2-3,-112, can1-100/can 1-100, mrp11::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 a/α Δmrps16	<i>ade2-1/ade2-1, ura3-1/ura3-1, his3-11,-15/his3-11,-15, trp1-1/trp1-1, leu2-3,-112/leu2-3,-112, can1-100/can 1-100, mrps16::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 a/α Δmrp17	<i>ade2-1/ade2-1, ura3-1/ura3-1, his3-11,-15/his3-11,-15, trp1-1/trp1-1, leu2-3,-112/leu2-3,-112, can1-10 /can 1-100, mrp17::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 a/α Δmdm20	<i>ade2-1/ade2-1, ura3-1/ura3-1, his3-11,-15/his3-11,-15, trp1-1/trp1-1, leu2-3,-112/leu2-3,-112, can1-100/can 1-100, mdm20::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 a/α Δirc20	<i>ade2-1/ade2-1, ura3-1/ura3-1, his3-11,-15/his3-11,-15, trp1-1/trp1-1, leu2-3,-112/leu2-3,-112, can1-100/can 1-100, irc20::KanMX</i>	Käesolev töö
W303 a/α Δirc3	<i>ade2-1/ade2-1, ura3-1/ura3-1, his3-11,-15/his3-11,-15, trp1-1/trp1-1, leu2-3,-112/leu2-3,-112, can1-100/can 1-100, irc3::Hph</i>	Käesolev töö

***S. cerevisiae* tüved kasvatati 30°C juures kasutades järgmisi söötmeid:**

- YPD: 1% pärmiekstrakt; 2% baktopeptoon; 2% glükoos
- YPG: 1% pärmiekstrakt; 2% baktopeptoon; 3% glütserool
- 1x sporulatsioonisööde: 0,2 mg/ml KAc; 0,1 µg/ml Ade; 1,25 µg/ml Leu; 0,5 µg/ml His; 0,5 µg/ml Trp; 0,25 µg/ml Ura.

YPD ja YPG tardsöötmetele lisati 1,7% agarit. Seleksiooniks kasutati antibiootikume genetitsiini (G418) ja hügmütsiini (Hph) lõppkontsentratsiooniga 300µg/ml.

## 2.2.2 Kasutatud praimerid ja restriктаasid

Integratsioonifragmentide amplifitseerimiseks, integratsiooni kontrollimiseks ja radioaktiivsete proovide amplifitseerimiseks kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR). Tabelis 3 on toodud PCR reaktsioonides kasutatud praimerite nimetused ja järjestused.

**Tabel 3.** Töös kasutatud PCR-i praimerid.

<b>Praimer</b>	<b>5' → 3' järjestus</b>
<b>Integratsioonifragmentide amplifitseerimine ja integratsiooni kontrollimine</b>	
pYM_check_rev	GCGCACGTCAAGACTGTCAAGG
KanFow	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT
revHph5out	ACATGGGGATGTATGGGCTA
IRC3P_3_BamHI	GCCGGATCCCTTGGGAGACTTACCGCAAAAACAAT
MRPL1_5_del	GAACGAAATGTTTTCAACAGCGG
MRPL1_3_del	TGTCTCATTGAAATTCACATACTATT
MRPS16_5_del	AATTGCGCGATGAGATGAGATG
MRPS16_3_del	TGACCTATAATGACACTATCTTAATG
MRP17_5_del	GCTTCAACTGAATACGCATAATTCG
MRP17_3_del	CTTAGTCAGGATTGTCGTTTAGC
MDM20_5_del	AGGTGATAGATTCTTTGAGAACCATCG
MDM20_3_del	CTTATAGACCTGTAAATTAACGGGAGG
IRC20_5_del	GATAGCTTCACTCCTATGAGAGCTC
IRC20_3_del	CAAGAGTTCGAATCTCTTAGCAACC

Praimer	5' → 3' järjestus
<b>Nukleaarse Dna2 proovi amplifitseerimine</b>	
DNA3834	CCGAATTCGCTAAAATTGGTATCTCCGTA
DNA4193	CCGATCCTATTGCTTCTTTTTGATTCAA
<b>Mitokondriaalse ori2 proovi amplifitseerimine</b>	
ORI3IN	AGGGGGAGGGGGTGGGT
ORI5IN	GGGGGTCCCAATTATTATTTTC

*Rho*<sup>-</sup> supressiivsete tüvede A11 ja A1184 genoomse DNA lõikamiseks kasutati tabelis 4 olevaid restriktase.

**Tabel 4.** DNA lõikamiseks kasutatud restriktasid.

Restriktaas	Lõikesaidid	Funktsioon	Tootja
EcoRV	5'...GAT↓ATC...3' 3'...CTA↑TAG...5'	W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A11 tüvede genoomse DNA lõikamine	<i>Thermo Scientific</i>
Dra I	5'...TTT↓AAA...3' 3'...AAA↑TTT...5'	W303 <i>rho</i> <sup>-</sup> A1184 tüvede genoomse DNA lõikamine	<i>Thermo Scientific</i>

### 2.2.3 Polümeraasi ahelreaktsioon

Integratsioonifragmentide tegemiseks kasutati Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudis olevast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 tüvede kollektioonist pärinevaid *irc* deletsioonitüvesid, millest eraldati DNA LiAc meetodil (Lõoke jt., 2011). Integratsioonifragmentide amplifitseerimiseks tehti PCR reaktsioonisegu (tabel 5), millele lisati 1 µl LiAc meetodil eraldatud DNA-d.

Lisaks integratsioonifragmentide amplifitseerimisele tehti PCR reaktsioonisegu (tabel 5) ka metsiktüüpi W303 tüvedesse *irc* mutantide saamise eesmärgil viidud resistentsusgeenide integratsiooni kontrollimiseks. Selleks lisati PCR reaktsioonisegule pipetiotsaga transformeeritud pärmikoloonia materjali, mida keedeti eelnevalt rakukestade lõhkumiseks

mikrolaineahjus 800 W juures 2 minutit. Kõik PCR-i reaktsioonid viidi läbi *Biometra* PCR'i T1 *Thermocycler* või *Eppendorfi* PCR'i masinates, kasutades tabelis 6 toodud programmi. PCR reaktsioonides kasutati tabelis 3 olevaid praimereid.

**Tabel 5.** PCR-i reaktsioonisegu.

PCR-i reaktsioonisegu (lõppmaht 10 µl)	Lõppkogus
10x PCR-i puhver (750 mM Tris-HCl, 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,1% TritonX, pH 8,8)	1 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1 µl
2mM dNTP-de segu	1 µl
Praimer (10 pmol/µl)	1 µl
Praimer (10 pmol/µl)	1 µl
Termostabiilne DNA polümeraas (5U/µl)	0,4 µl
Deioniseeritud vesi (MQ-H <sub>2</sub> O)	4,6 µl

**Tabel 6.** PCR-i programm tabelis 5 toodud reaktsioonisegule

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsükli- arv
Algne DNA denaturatsioon	95°C	3 min	1
Denaturatsioon	95°C	0,5 min	30
Praimerite seondumine	56°C	0,5 min	
Elongatsioon	72°C	1 min	
Lõplik elongatsioon	72°C	10 min	1
DNA jahutamine	10°C	∞	

## 2.2.4 Geelelektroforees

Restriktsiooni ja PCR produktide kontrolliks voolutati neid 0,8% agaros – TAE geelis (0,8% agarosi; 40 mM Tris – atsetaati; 2 mM EDTA pH 8,5). DNA tuvastamiseks UV valguses lisati geelile EtBr lõppkontsentratsiooniga 1µg/ml. DNA geelile kandmiseks kasutati TAE laadimispuhvrit (10 mM Tris – HCl pH 7,6; 0,3% broomfenool sinine; 60% glütserool; 60 mM EDTA). Suurusmarkerina kasutati Tiina Sedmani poolt valmistatud mix5.

### 2.2.5 DNA fenooltöötlus

DNA-d sisaldavale lahusele lisati 40 µg dekstraani, mis muudab nukleiinhapete sademe nähtavaks. Seejärel lisati proovile 200 µl T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> ja fenoolkloroformi segu (pH 7,5). Tehti vortex ja tsentrifuugiti *Eppendorf MiniSpin* fuugiga (rootor F45 12-11) 5 minutit kiirusel 13 400 p/min. Tsentrifugimisel tekkinud vesifaas tõsteti uude tuubi, lisati <sup>1</sup>/<sub>10</sub> mahust 3M NaAc (pH 7) ja 2,5 mahtu 96% EtOH. DNA sadestati -20°C juures, seejärel fuugiti ja eemaldati supernatant. DNA pesemiseks lisati sademele 80% EtOH-d ning korrati fuugimisprotseduuri. Peale sademe kuivamist lahtustati DNA 30 µl-s T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>-s.

### 2.2.6 Transformatsioon LiAc meetodil

Irc valkude deleteerimisest põhjustatud mõjude uurimiseks *Saccharomyces cerevisiae* W303 tüvedes valmistati *Δirc3*, *Δmrp11*, *Δmrps16*, *Δmrp17*, *Δmdm20* ja *Δirc20* deletsioonitüved. Selleks transformeeriti PCR abil amplifitseeritud integratsioonikassetid W303 tüvedesse. Kassetid integreeruvad vajalikku piirkonda genoomis homoloogilise rekombinatsiooni teel ning insertioon deleteerib uuritava geeni. IRC3 geeni deleteerimiseks kasutati hügroümüsiini resistentsusgeeni HphMX6 ning MRPL1, MRPS16, MRP17, MDM20 ja IRC20 geenide korral kasutati genetiisin resistentsusgeeni kasseti KanMX6. Antibiootikumi resistentsusgeenide abil on võimalik hiljem soovitud deletsiooni omavaid rakke selekteerida. Soovitud geenide deletsiooni kontrollimiseks kasutati praaimerite paare, millest üks seondub kontrollitava geeni promootor- või terminaatorpiirkonda ja teine integratsioonikassetile. Õige integratsiooni korral amplifitseerub kindla suurusega fragment.

W303 tüvesid kasvatati glükoosi rikastussöötmes 30°C juures tiheduseni OD<sub>600</sub> = 0,4. Seejärel, sõltuvalt pärmikultuuri ruumalast, tsentrifuugiti rakke 3 min 3200 p/m *Hettich Universal 32R* (rootor 1617 *Swing-out*). Rakkudelt eemaldati sööde, sadet pesti autoklaavitud MQ-H<sub>2</sub>O-ga ning fuugiti *Eppendorf Mini Spin* tsentrifuugiga 1 min 4000 p/m. Järgnevates fuugimistes kasutati sama tsentrifuugi. Protseduuri korrati 1ml 1x 0,1M LiAc-T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (pH 7,5) lahusega. Rakud resuspendeeriti 50 µl-s 0,1M LiAc-T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>-s (pH 7,5) ja inkubeeriti rakukesta permeabiliseerimiseks 20 min 30°C juures. Seejärel lisati 10 µg kandja (*carrier*) DNA-d (10 mg/ml), mis oli eelnevalt denatureeritud 5 min 95°C juures ja jääl jahutatud, ning 4 µl transformeeritavat PCR fragmenti. Segu inkubeeriti 20 min 30°C juures ning seejärel lisati 300 µl 40% PEG 4000 (0,1M LiAc; 10mM Tris pH 7,5; 1mM EDTA pH 8) lahust. Tehti

vortex ja inkubeeriti 40 min 30°C juures vahepeal segades. Seejärel lisati 35 µl 100% DMSO-d (dimetüülsulfoksiid) ja tehti kuumašokk 10 min 42°C. Rakud tsentrifuugiti 1 min 4000 p/min, eemaldati supernatant ja korrati fuugimise protseduuri. Rakud resuspendeeriti YPD vedelsöötmes ja kasvatati üleöö 30°C. Järgmisel päeval fuugiti rakud kokku 1 min 4000 p/min ja plaaditi YPD selektiivsöötmega tassidele. Tasse inkubeeriti 30°C termostaadis transformantide tekkimiseni.

### 2.2.7 Spooride laialiajamise meetodi välja töötamine

*Saccharomyces cerevisiae* W303 tüve jaoks parima spooride laialiajamise meetodi leidmiseks katsetati nelja erinevat meetodit. Tetraadid eraldati spoorideks YPD tardsöötmega tassidele *Singer MSM* mikroskoobi abil.

- Meetod 1. *S. cerevisiae* W303 a/a diploidseid rakke inkubeeriti 2 – 3 päeva 30 °C juures 1x sporulatsioonisöötmes. Seejärel fuugiti 500 µl rakususpensiooni *Eppendorf Mini Spin* tsentrifuugiga 1 min 13 400 p/min. Peale supernatandi eemaldamist pesti rakke MQ-H<sub>2</sub>O-ga ja korrati protseduuri. Spoorid resuspendeeriti 250 µl-s MQ-H<sub>2</sub>O-s, 50 µl-le spooride vesilahusele lisati 1,6 µl *zymolyase*'i (20 mg/ml, 20T) (*Seikagaku*) ning suspendeeriti. Seejärel inkubeeriti spoore 4 min 37°C juures. Peale inkubeerimist voolutati 10 µl suspensiooni YPD tardsöötmega Petri tassile tetraadide laialiajamiseks.
- Meetod 2 ja 3 erinevad 1. meetodist ainult *zymolyase*'iga inkubeerimise aja ja temperatuuri poolest. Meetodi 2 puhul viidi inkubeerimine läbi 10 minuti vältel toatemperatuuril ja meetodi 3 puhul tehti ensüümtötlus 10 min 30°C termostaadis. Peale inkubeerimist voolutati 10 µl mõlema meetodiga töödeldud spooride suspensiooni YPD tardsöötmega Petri tassidele tetraadide laialiajamiseks.
- Meetod 4. *S. cerevisiae* W303 a/a diploidseid rakke inkubeeriti 2 – 3 päeva 30°C juures 1x sporulatsioonisöötmes. Seejärel fuugiti 500 µl rakususpensiooni 1 minuti jooksul 13 400 p/min. Eemaldati supernatant ja spoorid resuspendeeriti 50 µl-s *zymolyase*'i lahuses (0,5 mg/ml 20T, 1M sorbitoolis). Spore inkubeeriti 10 min 30°C juures, seejärel asetati jääle ja lisati aeglaselt 800 µl MQ-H<sub>2</sub>O. YPD tardsöötmega Petri tassile voolutati 10 µl rakususpensiooni tetraadide laialiajamiseks.

### 2.2.8 *Saccharomyces cerevisiae* totaalse DNA eraldamine

15 ml rakukultuuri kasvatati vedelsöötmes üleöö kuni  $OD_{600} > 1$ . Rakud fuugiti 1 min 14 000 p/min Hettich Universal 32R (rootor 1617 *swing out*) tsentrifuugiga. Sööde eemaldati ning sade lahustati 0,5 ml sorbitooli puhvril (1M sorbitool; 10 mM Tris pH 8; 0,5 M EDTA pH 8), rakukestade lüüsimiseks lisati *zymolyase*'i 20T (*Seikagaku*) 4mg/1 grammi rakkude kohta. Lahusele tehti vortex ja inkubeeriti 37°C juures 30 min. Seejärel fuugiti *Eppendorf Mini Spin* tsentrifuugiga 1 min 5000 p/m, eemaldati supernatant ja sade lahustati 0,5 ml T<sub>50E20</sub>-s (50 mM Tris pH 7,5; 20 mM EDTA pH 8). Kõik järgmised tsentrifuugimised tehti sama tsentrifuugiga. Rakkudele lisati 50 µl 10% SDS-i lahust, segati õrnalt ja inkubeeriti 30 min 65°C juures. Seejärel tõsteti rakud jääle, lisati 200 µl 5M KAc ning inkubeeriti jääl 40 minutit. Peale inkubeerimist fuugiti lüsaati 4°C juures 5 min.

DNA sadestamiseks lisati võrdne ruumala isopropanooli, tehti vortex ja inkubeeriti 5 min toatemperatuuril. DNA fuugiti tuubi põhja *Eppendorf*'i *Mini Spin* tsentrifuugiga 1 min 13 400 p/min, järgnevalt eemaldati supernatant ja sadet pesti 80% EtOH-ga, seejärel korrati fuugimist ning eemaldati supernatant. RNA-st vabanemiseks lisati sademele 100 µl T<sub>10E1</sub> RnaasA-d (10 mM Tris pH 7; 1 mM EDTA pH 8; 20 µg/ml RnaasA) ja inkubeeriti 65°C juures 15 minutit. Valkude lõhkumiseks lisati 100 µl 2x Proteinaas K puhvrit (40mM Tris pH 8; 0,2M NaCl; 20mM EDTA pH 8; 0,4% SDS) ja 20 µg Proteinaas K ensüümi ning inkubeeriti 65°C juures 30 minutit aeg-ajalt segades. Seejärel tehti DNA-le fenoolkloroformi ekstraktatsioon (peatükk 2.2.5). DNA sadestamiseks -20°C juures lisati 2,5 mahtu 96% EtOH-d, seejärel fuugiti 1 min 13 400 p/min, sadet pesti 80% EtOH-ga ja korrati fuugimist. DNA lahustati 25 µl T<sub>10E0,1</sub>-s.

### 2.2.9 *Southern blot*

*Southern blot* meetodiga analüüsiti tabelis 2 toodud supressiivsete *rho*<sup>-</sup> tüvede A11 ja A1184 mitokondriaalse DNA stabiilsust. A11 ja A1184 tüvede skeemid on esitatud joonisel 5. A11 ja A1184 ning nende deletsioonitüvede analüüsimiseks restrikteeriti totaalne DNA eelnevalt vastavalt EcoRV või DraI restriiktaasidega (tabel 4) (*Thermo Scientific*).

Restriksioon tehti 25 µl-s, mis viidi läbi vastavalt *Thermo Scientific* firma tootja protokollile. Restriksioon toimus 37°C termostaadis 2 tundi. Lõigatud DNA proovidele lisati 5 µl broomfenoolsinist värvi ning fragmendid lahutati 0,7% agarosgeelil, kuhu oli lisatud EtBr 30

ng/ml. Suurusmarkerina kasutati 4 $\mu$ g 1kb DNA markerit (*Thermo Scientific*). Geelektroforees viidi läbi pingel 3 V/cm.

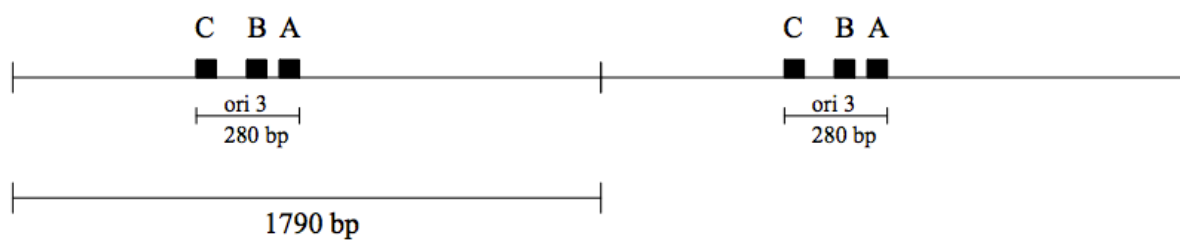
Geelis lahustunud DNA kanti positiivselt laetud nailonfiltrile (*Applichem*) kasutades *Southern blot*'i aluselist ülekandepuhvrit (0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl). Ülekanne tehti *Southern blot* meetodil (Sambrook ja Russell, 2001) ja kinnitati filtrile 2,1 J UV valgusega (*Herolab CL-1*). Nailonfiltrile kandunud DNA hübridiseeriti 20 ml Church puhvriga (0,5% BSA; 1 mM EDTA; 0,5 M NaHPO<sub>4</sub> pH 7,5; 7% SDS) (Church ja Gilbert, 1984) 12 tunni vältel 65°C juures. Mittehübridiseerunud proovi eemaldamiseks pesti filtreid Church pesupuhvriga (1mM EDTA pH 8; 40 mM NaHPO<sub>4</sub> pH 7,5; 1% SDS) 65°C juures 3x15 minutit. Esmalt hübridiseeriti DNA radioaktiivselt märgistatud nukleaarse Dna2 prooviga. Seejärel eemaldati nukleaarne proov ning filtril olev DNA hübridiseeriti radioaktiivselt märgistatud mitokondriaalse ori prooviga. Nukleaarse ja mitokondriaalse proovi eemaldamiseks nailonfiltrilt loksutati filtrit 0,4 M NaOH lahusega 45°C juures 15 min, seda protseduuri tehti 2 korda. Seejärel neutraliseeriti filter neutraliseerimislahusega (1,5 M NaCl; 1M Tris-HCl pH 7,4) 15 min toatemperatuuril.

Radioaktiivse proovi tegemiseks amplifitseeriti dsDNA proov PCR abil (Sambrook ja Russell, 2001). Nukleaarse proovi jaoks amplifitseeriti geenilt Dna2 436 bp pikkune radioaktiivselt märgistatud fragment ja mitokondriaalse proovi jaoks amplifitseeriti mtDNA-lt ori2 280 bp suurune radioaktiivselt märgistatud fragment. Nukleaarse proovi amplifitseerimiseks kasutati DNA3834 ja DNA4193 praimereid ning mitokondriaalse ori proovi korral ORI3IN ja ORI5IN praimereid (tabel 3).

Nailonfiltril olevad nukleaarse ja mitokondriaalse DNA signaalid detekteeriti *Amersham Biosciences Storage Phosphor Screen*'i abil ning skaneeriti arvutisse *Typhoon TRIO Phosphoimager* masinaga. DNA hulga kvantitatiivseks määramiseks mõõdeti *ImageQuant TL* programmiga restriктаasidega lõikunud fragmentide värvuse intensiivust. Kõigepealt kvantiteeriti nukleaarse proovi DNA hulk ning seejärel mitokondriaalse proovi DNA hulk. Mida tumedamad olid tekkinud fragmendid, seda rohkem oli seal nukleaarset või mitokondriaalset DNA-d.

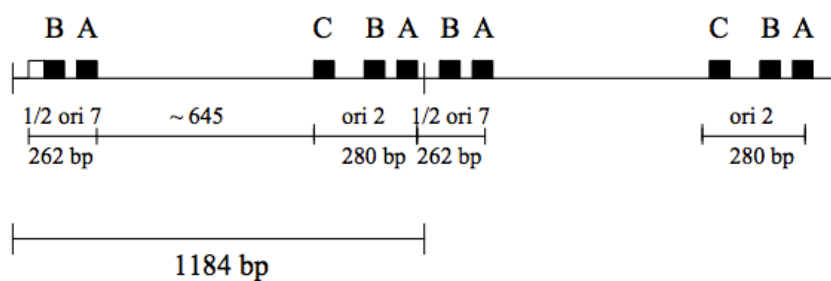
A

A11



B

A1184



**Joonis 5. W303a *rho*<sup>-</sup> supressiivsete A11 ja A1184 skeemid.** Joonisel A on kujutatud A11 tüvi, mis sisaldab 280 nt pikkust aktiivset ori 3 järjestust. Kogu genoomi ulatuses korduva fragmendi pikkus on 1790 nt. Joonisel B on A1184 tüvi, mis sisaldab 280 nt pikkust aktiivset ori 2 ja 262 nt pikkust 1/2 ori 7 järjestust. Mõlemal joonisel tähistatud A, B ja C alad on kõrgelt konserveerunud GC nukleotiidide rikkad piirkonnad (Tiina Sedmani skeem).

## 2.3 Tulemused ja arutelu

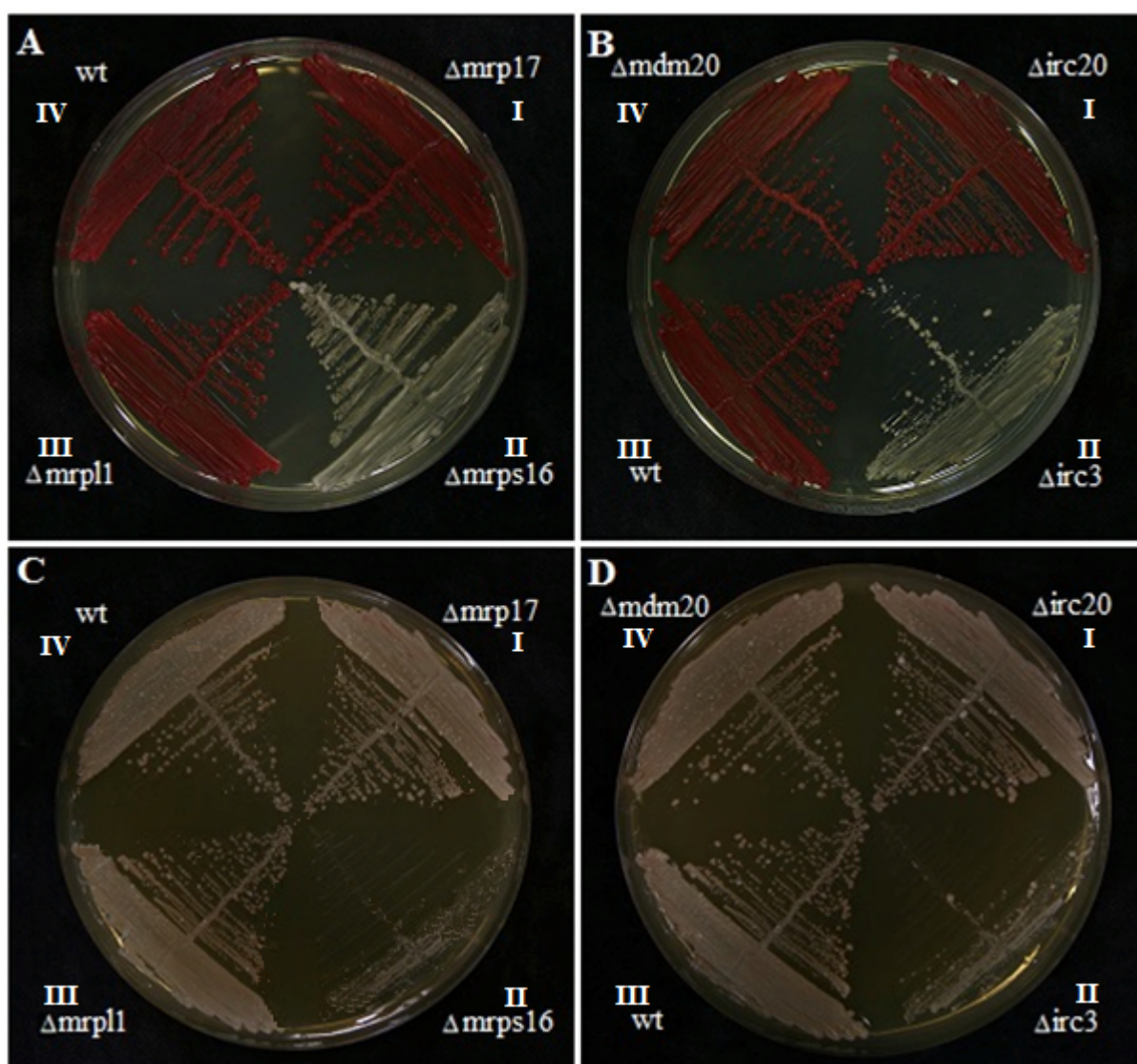
Käesolevas bakalaureusetöös uuriti *Saccharomyces cerevisiae* W303 tüve Irc3, Mrp11, Mrps16, Mrp17, Mdm20 ja Irc20 valkude deleteerimisest põhjustatud fenotüüpe. Nende IRC geenide deleteerimisel tekivad kahjustused tuuma genoomis (Alvaro jt., 2007), mis parandatakse Rad52 epistaasi grupi valkude poolt homoloogilise rekombinatsiooniga.

Ühena töös uuritud *Saccharomyces cerevisiae* Irc3 valgu funktsiooni uurimisega tegeleb Tartu Ülikooli Molekulaar ja Rakubioloogia Instituudi Biokeemia labor. Irc3 on 78,5 kDa suurune DEAD/H *box* perekonna oletatav RNA helikaas, mis kuulub helikaaside superperekonda II (de la Cruz jt., 1999). Biokeemia laboris tehtud katsed näitavad, et glükoosi sisaldaval söötmel kasvades kaotavad W303  $\Delta$ *irc3* rakud 20 tunni möödudes enamuse funktsionaalsest mtDNA-st, kuid glütserooli sisaldaval söötmel on nad võimelised seda säilitama. Irc20 on Snf/Swi perekonna ATPaasi domääni sisaldav valk, mis on seotud DNA reparatsiooniga (Richardson jt., 2013). Koos Srs2 valguga osaleb Irc20 DNA sünteesist sõltuvas ahelate seodumises ning täidab oma funktsiooni enne *D-loop* struktuuri teket (Miura jt., 2012). Ribosoomi suure subühiku valkude hulka kuuluva Mrp11 puudumine põhjustab rakkude kasvu vähenemist YPG söötmel 23°C juures (Gan jt., 2002). Seevastu ribosoomi väikese subühiku valgu Mrps16 deleteerimisel ei ole rakud võimelised enam hingama ning kasvama YPG söötmel (Gan jt., 2002). Mrp17 puudumine põhjustab koos mõne teise mitokondriaalse ribosoomi valgu puudumisega rakkude defektset fenotüüpi (Haffter ja Fox, 1992). Mdm20 valk kuulub NatB N-terminaalse atsetüül-transferaasi mittekatalüütilisse subühikusse, täites seal abivalgu funktsiooni (Polevoda jt., 2009).

Irc valkudel on mitokondris erinev funktsioon, kuid ometi andis nende deleteerimine sarnase fenotüübi, põhjustades Rad52 fookuste arvu tõusu tuumas. Käesolevas töös sooviti uurida Irc valkude deleteerimise mõju W303 tüvede spooride elumusele ja mtDNA stabiilsusele. See uurimus on osa suuremast projektist, millega soovitakse selgitada, kuidas mõjutavad mitokondriaalsed protsessid tuuma genoomi stabiilsust. Kuna Biokeemia laboris uuritakse Irc3 valku, siis otsustati selgitada, kas mtDNA kadumine glükoosi sisaldavatel YPD söötmel on põhjustatud Irc valkudele omasest üldisest käitumisest või põhjustab seda ainult Irc3 valgu deleteerimine.

### 2.3.1 Irc valkude mõju *S. cerevisiae* mitokondriaalsele genoomile

Selleks, et teada saada, kuidas mõjutavad erinevad Irc valgud *Saccharomyces cerevisiae* mitokondri metabolismi, deleteeriti töös uuritavad valgud haploidset W303 $\alpha$  tüvest (peatükk 2.2.6). Katses kasutati ka Tiina Sedmani poolt varem valmistatud W303 $\alpha$  tüve, millest oli deleteeritud IRC3 geen. Irc valkude deletsioonidega tüved külvati glükoosi sisaldavale YPD ning glütserooli sisaldavale YPG söötmega tassidele. YPD söötmes kasvasid nii  $rho^+$  kui ka  $rho^-$  rakud, kuid YPG söötmel olid võimelised kasvama ainult hingavad  $rho^+$  rakud. Kontrollina kasutati W303 $\alpha$  metsiktüpi tüve.



**Joonis 6.** W303 $\alpha$  metsiktüpi ja mutantsete tüvede fenotüüp. Paneelidel A ja B on tüved külvatud fermenteeriva süsinikuallikaga YPD söötmetele ning paneelidel C ja D mittefermenteeriva süsinikuallikaga YPG söötmetele. Punaseid kolooniaid moodustavad fermenteerival süsinikuallikal ainult funktsionaalse mitokondriaalse genoomiga rakud.

Rakkude respiratsioonivõime W303 tüvedes oli vaadeldav tänu ADE2 mutatsioonile. ADE2 geeni produkt vastutab rakus adeniini biosünteesi eest. Mutatsiooni korral selle geenis akumulereb korrektse hingamisahelaga rakkudes biosünteesiraja intermediaatormolekul P-ribosüülaminoimidiasool (AIR), mis konverteeritakse punaseks pigmendiks. Selle mutatsiooni tõttu on funktsionaalse mitokondriaalse DNA-ga respireerivad rakud võimelised moodustama fermenteeriva süsinikuallikaga söötmel suuri punaseid kolooniaid (Ugolini ja Bruschi, 1996). Puuduliku mitokondriaalse genoomiga rakud ( $\rho^0$  või  $\rho^-$ ) kaotavad respiratsioonivõime ning nad moodustavad YPD fermenteeriva süsinikuallikaga söötmel väikseid valgeid kolooniaid. Seega on värvuse põhjal võimalik eristada töös uuritud Irc valkude mõju pärmi rakkude mitokondriaalsele genoomile.

Mdm20 valgu deleteerimisel saadi wt tüvega sarnane fenotüüp (joonis 6; paneel B IV sektor; paneel D IV sektor), seega ei põhjusta Mdm20 puudumine olulisi muutusi mitokondriaalses DNA-s. Varem on näidatud, et Mdm20 valgu deleteerimisel tekivad pärmi tüves JSY999 mitokondri defektid, mis kanduvad edasi järglastele, rakkude kasv muutub temperatuuritundlikuks ning kaob rakkude võime transportida mitokondreid uutesse pungadesse (Hermann jt., 1997). Lisaks mitokondrite pärandumisele osaleb Mdm20 valk ka aktiini filamentide moodustumisel (Singer ja Shaw, 2003). Seega võib arvata, et Mdm20 valk ei osale otseselt mtDNA metabolismis.

Mrps16 valgu deleteerimisel saadi erinev fenotüüp võrreldes metsiktüüpi W303 haploidse tüvega (joonis 6; paneel A II sektor; paneel C II sektor). Mrps16 valgu puudumisel olid kolooniad valget värvi, sest ei olnud enam võimelised hingama ning *ade2* mutatsiooni tagajärjel tekkinud AIR vaheühendit punaseks oksüdeerima. Seega on Mrps16 valgu olemasolu vajalik mtDNA funktsionaalseks säilimiseks rakus. Mrps16 on *Saccharomyces cerevisiae* ribosoomi väikese subühiku valk (Gan jt., 2002), mille deleteerimisel kaotavad rakud hingamisvõime. Ka inimesel tekib mitokondri ribosoomi väikse subühiku S16 valgu mutatsiooni korral hingamisahela defektsus mitokondriaalse mRNA kahjustuste tagajärjel (Haque jt., 2008). Seega on minu saadud tulemus kooskõlas varasemate uuringute tulemustega. Lisaks mtDNA replikatsioonis ja reparatsioonis osalevatele valkudele on vaja mtDNA stabiilsuse tagamiseks ka funktsionaalseid mitokondriaalseid ribosome.

Irc3 deleteerimisel tekkisid valge värvusega kolooniad (joonis 6; paneel B II sektor), mis sarnanesid *Δmrps16* tüve fenotüübiga. YPG söötmel tekkisid Irc3 valgu deleteerimisel aeglase kasvuga väikesed valged rakud (joonis 6; paneel D II sektor). Biokeemia laboris tehtud katsed näitavad, et *Δirc3* mutantidel säilib funktsionaalne mtDNA metaboolse pressi all YPG

söötmes ~ 20 tundi, kuid YPD fermenteerival süsinikuallikal tekivad tsütoplasmaatilised *petite* rakud. Samas 1-5% rakkudest on võimelised säilitama funktsionaalse mtDNA ka fermenteerival söötmel teatud aja jooksul (Karin Villemson magistritöö, 2013). *Irc3* valgu deleteerimisest tingitud mtDNA ebastabiilsuse tõttu puudus *Δirc3* tüves funktsioneeriv hingamisahel. Seega on *IRC3* geeni poolt kodeeritav valk vajalik mitokondriaalse genoomi stabiilsuse tagamiseks.

Haploidsetes tüvedes võivad geenide deleteerimise tulemusel tekkida sekundaarsed mutatsioonid teistes valkudes, mis võivad omakorda mõjutada *Irc* valkude deletsioonist põhjustatud fenotüüpi. Seega otsustati tulemuste objektiivsemaks hindamiseks deleteerida *IRC* geenid ka W303a/ $\alpha$  diploidsest tüvest. Diploidse tüves võidakse ära parandada teiste valkude poolt põhjustatud sekundaarsed mutatsioonid. Seal esineb metsiktüüpi alleel, mis võimaldab tekkinud kahjustusi parandada homoloogilise rekombinatsiooniga.

## **2.3.2 *Irc* valkude deleteerimine W303a/ $\alpha$ diploidsest tüvest**

### **2.3.2.1 Sobivaima spooride laialiajamise meetodi leidmine**

Diploidsetes W303a/ $\alpha$  tüvedes vaadeldi *Irc* valkude mõju spooride elumusele ning tetraadidest üles kasvanud haploidsete spooride fenotüüpi. Saadud tulemuste põhjal hinnati *irc* mutantide spooride elumust protsentuaalselt võrreldes metsiktüüpi tüvega.

Kuna ei olnud teada, milline meetod on W303a/ $\alpha$  spooride laialiajamiseks sobivaim, siis otsustati katsetada nelja erinevat meetodit (peatükk 2.2.7). *Saccharomyces cerevisiae* W303 a/ $\alpha$  diploidseid rakke inkubeeriti 2 – 3 päeva 30°C juures 1x sporulatsioonisöötmes. Seejärel fuugiti rakud kokku ja pesti MQ-H<sub>2</sub>O-ga. Rakukestade lõhkumiseks tehti ensüümtöötlus *zymolyase*'ga. Esimesed kolm meetodit erinesid vaid *zymolyase*'ga töötlemise aja ja temperatuuri poolest. Neljanda meetodiga rakkude töötlemisel kasutati eelnevast kolmest meetodist erinevat *zymolyase*'i kontsentratsiooni ja hulka.

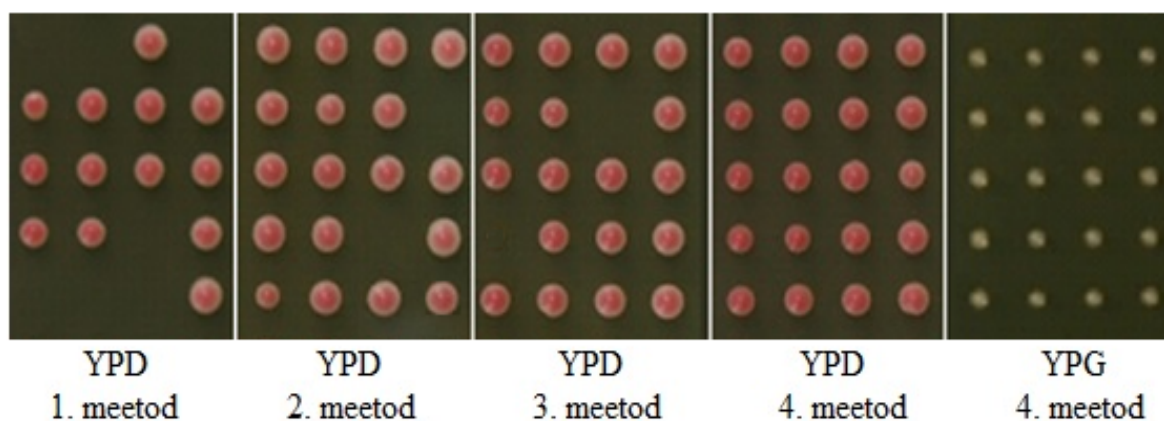
Esimese meetodiga kasvas üles 16,7% laiali aetud wt tetraadidest (tabel 5, joonis 7) ning see osutus W303 tüve puhul kõige ebaefektiivsemaks. Meetodite 2 ja 3 katsetamisel saadi spooride elumuseks mõlemal juhul 38,9%. Kuna viimati mainitud meetodid erinesid üksteisest vaid askuste *zymolyase*'ga inkubeerimise temperatuuri poolest, siis järelikult ei andnud tetraadide töötlemine toatemperatuuril (meetod 2) või 30°C juures (meetod 3) erinevat

efekti spooride elumusele. W303 diploidse tüve puhul osutus efektiivseimaks 4. meetod. Rakkude töötlemisel 4. meetodiga kasvas üles 83,3% kõikidest spooridest.

Spooride eraldamiseks tetraadanalüüsi meetodil kasutati spetsiaalset mikromanipulaatoriga varustatud Singer MSM mikroskoopi. Neli spoori eraldati tetraadist peenikese klaasfiibrist nõela abil. Spoorid külvati söötmetassidele nii, et iga tetraadi 4 spoori asetati ühele reale. Kokku eraldati ühele söötmetassile 18 tetraadi spoorid, mis tõsteti 9 reas üksteise alla kõrvuti 2 tulpa.

**Tabel 5.** Metsiktüüpi W303 a/a askosporidest üles kasvanud spooride elumuse protsendid, mis saadi spooride töötlemise erinevate meetoditega. Spooride elumuse all mõistetakse ühest askosporist pärineva nelja haploidse spoori kasvu.

Kirjeldatud meetodid	wt spooride elumus
1. meetod	16,7%
2. meetod	38,9%
3. meetod	38,9%
4. meetod	83,3%



**Joonis 7.** Metsiktüüpi W303a/a diploisete rakkude tetraadanalüüsi erinevate katsetatud meetodite tulemused YPD ja YPG söötmetel.

Kuna nelja erineva spooride laialiajamise meetodi analüüsimisel osutus W303a/a tüve jaoks sobivaimaks 4. meetod, siis kasutati edasises töös Irc valkude deleteerimisest põhjustatud fenotüübi määramisel seda meetodit.

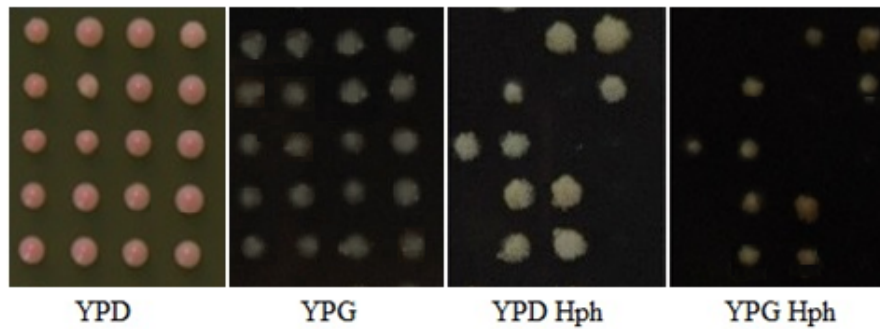
### 2.3.2.2 *Irc* deletsioonitüvede sporulatsioon

Kõigi töös uuritud *irc* deletsioonitüvede sporulatsioonikatsed viidi läbi nii, et esimeses katses eraldati spoorid fermenteeriva süsinikuallikaga YPD söötmetassidele ning teises katses eraldati spoorid mittefermenteeriva süsinikuallikaga YPG söötmetassidele. *Irc* mutantide tuvastamiseks tembeldati spooridest üles kasvanud kolooniad velvetriiet kasutades antibiootikumiga selektiivsöötmetele. Käesolevas töös esitatud *irc* mutantide spooridest kasvanud kolooniate pildid on tehtud YPD söötmetassidele eraldatud spooridest.

*Irc* valkude deleteerimisel esinenud kolooniate värvuse põhjal saab analüüsida nende valkude mõju mitokondriaalsele genoomile. Kui mutantsed kolooniad värvuvad YPD söötmel punakalt ning kasvavad ka YPG söötmel, siis on nendes mutantides säilinud funktsionaalne mitokondriaalne DNA. *Irc* valkude deleteerimisel tekkinud valge värvus YPD söötmel viitab sellele, et nendest mutantides on mitokondriaalne DNA kahjustunud.

#### 2.3.2.2.1 *Irc3* deletsioonitüve sporulatsioon

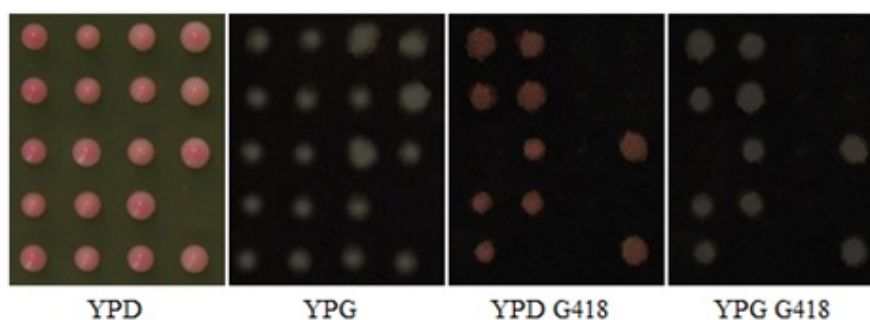
*Irc3* valgu deleteerimisel kasvas YPD söötmel üles 4 suurt punaselt pigmenteerunud kolooniat. Sarnane fenotüüp esines ka YPG söötmel, kus nii wt kui ka *Irc3* deletsiooniga tüvi moodustasid ühesuguseid valgeid kolooniaid. Selleks, et eristada mutantseid kolooniaid metsiktüüpi kolooniatest, tembeldati need YPD Hph ja YPG Hph selektiivsöötmetele (joonis 8), kus suudavad kasvada ainult vastava antibiootikumi resistentsusgeeni sisaldavad mutantsed kolooniad. *Irc3* deletsiooniga spoorid, mis kasvasid üles YPD Hph tassil olid valged ja seega pole nad võimelised enam hingama.  $\Delta irc3$  spooridest pärinevad kolooniad kasvasid ka mittefermenteerival glütserooli sisaldaval selektiivsöötmel, kuid olid seal väiksemad võrreldes  $\Delta mrpl$ ,  $\Delta irc20$ , ja  $\Delta mdm20$  deletsioonitüvede kolooniatega (joonised 9; 10 ja 13). Teadaolevalt põhjustab *Irc3* puudumine rakkude aeglasemat kasvu 30°C juures (Shiratori jt., 1999). *Irc3* deletsioonitüve sporulatsioonikatse tulemus näitab samuti, et  $\Delta irc3$  kolooniad kasvavad glütserooli söötmes teistest hingamisvõimega *irc* mutantidest aeglasemalt.



**Joonis 8.** W303a/ $\alpha$   $\Delta irc3$  tetraadanalüüsi tulemusel laiali aetud spooride kasv fermenteeriva YPD ja mittefermenteeriva YPG süsinikuallikaga söötmel. Selektiivsöötmel kasvasid ainult  $\Delta irc3$  mutandid.

### 2.3.2.2.2 *Mrp11* deletsioonitüve sporulatsioon

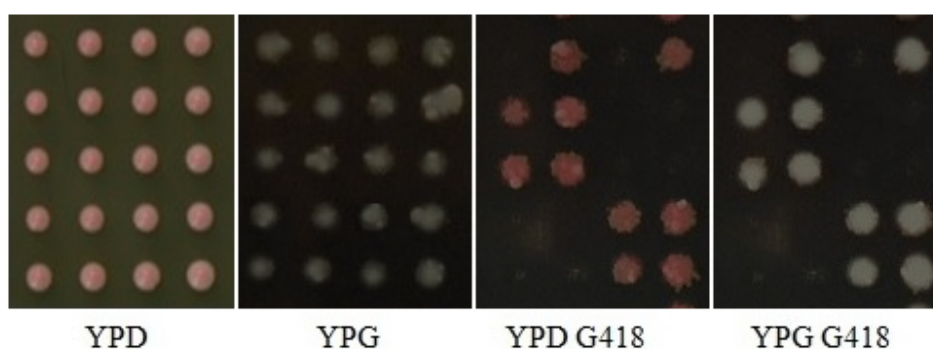
*Mrp11* on 31 kDa suurune ribosoomi suure subühiku valk, mille puudumine põhjustab rakkude kasvu vähenemist YPG söötmel 23°C juures, kuid samas ei ole *Mrp11* hädavajalik mitokondriaalse translatsioonimehhanismi jaoks (Gan jt., 2002). *Mrp11* valgu deleteerimisel saadi sarnane fenotüüp metsiktüüpi tüvega. YPD söötmel kasvasid suured punaselt pigmenteerunud spooridest moodustunud kolooniad ning YPG söötmel olid kolooniad valget värvi (joonis 9). Mutantsete kolooniate tuvastamiseks tembeldati nad YPD G418 ja YPG G418 selektiivsöötmetele. Võrreldes  $\Delta irc3$  tüve spooridest üles kasvanud kolooniatega oli  $\Delta mrp11$  kolooniatel erinev fenotüüp nii YPD kui ka YPG selektiivsöötmel. YPD G418 tassil olid kolooniad erinevalt  $\Delta irc3$  tüvest punaselt pigmenteerunud ning YPG G418 tassil moodustasid suuri valgeid kolooniaid. *Mrp11* valgu deleteerimisel säilib wt tüvega sarnane fenotüüp, mtDNA pärandub selles tüves intaktsena ning ei teki kahjustusi ka hingamisahelas. Seega saab katse tulemustest järeldada, et *Mrp11* valgu deleteerimisel W303 tüvest säilis mitokondriaalne geeniekspressioon.



**Joonis 9.** W303a/α *Δmrp11* tetraadanalüüsi tulemusel laiali aetud spooride kasv fermenteeriva YPD ja mittefermenteeriva YPG süsinikuallikaga söötmetel. Selektiivsöötmetel kasvasid ainult *Δmrp11* mutandid.

### 2.3.2.2.3 *Irc20* deletsioonitüve sporulatsioon

*Irc20* on nii tuumas kui ka mitokondris lokaliseeruv 180,3 kDa suurune Snf/Swi perekonna ATPaasi ja RING domääni sisaldav valk, mis on seotud DNA reparatsiooniga (Richardson jt., 2013). *Irc20* deleteerimisel saadi YPD ja YPG söötmetel wt tüvega sarnane fenotüüp. Mutantsete kolooniate tuvastamiseks tembeldati nad YPD G418 ja YPG G418 selektiivsöötmetele. *Δirc20* tüve YPD G418 tassil oli näha valgete sektorite teke (joonis 10). Sektorite teke näitab, et need rakud kaotavad aja jooksul wt mtDNA. Samas on *Δirc20* spoorid võimelised kasvama ka YPG söötmetel, moodustades seal suuri valgeid kolooniaid. Seega on *Δirc20* spoorid võimelised säilitama funktsionaalse mtDNA glütserooli söötmes.

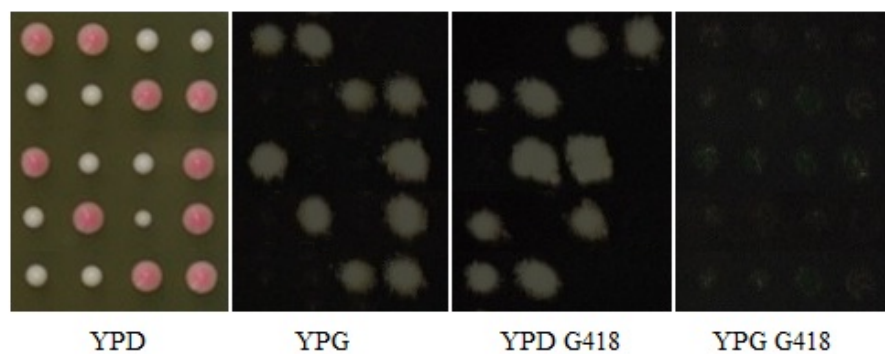


**Joonis 10.** W303a/α *Δirc20* tetraadanalüüsi tulemusel laiali aetud spooride kasv fermenteeriva YPD ja mittefermenteeriva YPG süsinikuallikaga söötmetel. Selektiivsöötmetega tassidel kasvasid ainult *Δirc20* mutandid.

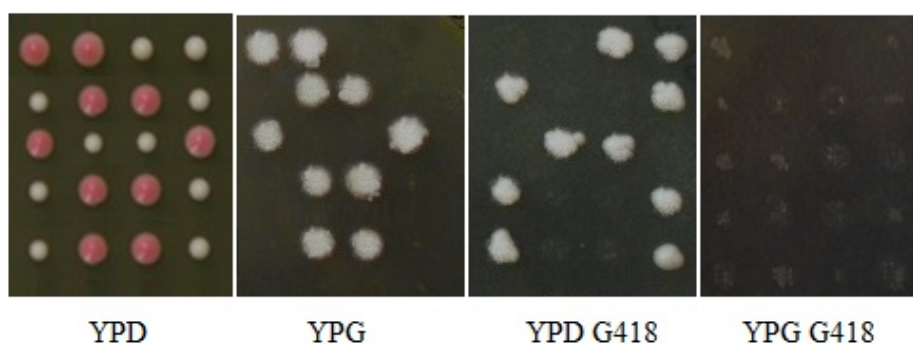
#### 2.3.2.2.4 *Mrps16* ja *mrp17* deletsioonitüvede sporulatsioon

Enamik pärimi ribosoomi väikese subühiku valkudest on vajalikud mitokondri normaalseks funktsioneerimiseks ning rakkude kasvuks mittefermenteeriva süsinikuallikaga söötmel (Gan jt., 2002). *Mrps16* on 13,6 kDa suurune ribosoomi väikese subühiku valk, mis on vajalik sporulatsiooni efektiivsuse säilitamiseks diploidsetes rakkudes (Deutschbauer jt., 2002). Mutatsioonid *Mrps16* valgus põhjustavad mitokondriaalse mRNA vigast translatsiooni, millega kaasnevad ebatäpsused hingamisahelas (Haque jt., 2008). Kuid käesolevas töös tehtud katse tulemustes ei esinenud *Mrps16* valgu deleteerimisel W303 tüves sporulatsioonidefekt. Tetraadanalüüsi tulemustest selgus, et ka teine töös uuritud ribosoomi väikese subühiku valk *Mrp17* on vajalik hingamisahela funktsioneerimiseks ning rakkude kasvuks YPG söötmel. *Mrp17* on 15 kDa suurune valk, mille deleteerimisel suudavad rakud säilitada normaalse rakutsükli mehhanismi (Heeren jt., 2009). *Mrps16* ja *Mrp17* valkude deleteerimisel saadud fenotüüp erines nii metsiktüüpi kui ka *Δirc3*, *Δirc20* ja *Δmdm20* tüvede fenotüübist. *Δmrps16* ja *Δmrp17* tüvede YPD tassidel kasvasid tetraadidest üles kaks suurt punaselt pigmenteerunud wt kolooniat ja kaks väikest valget värvi mutantset kolooniat (joonis 11; joonis 12). Puuduliku hingamisahela tõttu ei ole *Δmrps16* ja *Δmrp17* tüved võimelised kasvama glütserooli sisaldaval söötmel. Seetõttu puudusid mutantsetest spooridest üles kasvanud kolooniad YPG G418 tassidelt.

10 päeva möödudes tekkisid *Δmrp17* tüve YPG tassil väikesed mutantset mikrokolooniad (ei ole joonisel nähtavad). Tekkinud mutantsete mikrokolooniate elumuse määramiseks tembeldati *Δmrp17* tassi uuesti YPD ja YPG selektiivsöötmetele. Mutantset mikrokolooniad kasvasid ainult YPD söötmega tassidel, YPG söötmel mutantsete kolooniate kasvu ei esinenud. See näitas, et *Mrp17* valgu puudumisel olid kolooniad võimelised tegema vaid mõne pooldumise. Järelikult on ribosoomi väikese subühiku valkudel *Mrps16* ja *Mrp17* oluline roll ribosoomi funktsionaalsuse tagamisel. Nende valkude deleteerimise tagajärjel puudub mitokondriaalne valgusüntees, mis on omakorda vajalik mtDNA metabolismiks.



**Joonis 11.** W303a/α *Δmrp16* tetraadanalüüsi tulemusel laiali aetud spooride kasv fermenteeriva YPD ja mittefermenteeriva YPG süsinikuallikaga söötmel. YPD selektiivsöötmel kasvasid ainult *Δmrp16* mutantsed kolooniad ning YPG söötmel ainult metsiktüüpi kolooniad.

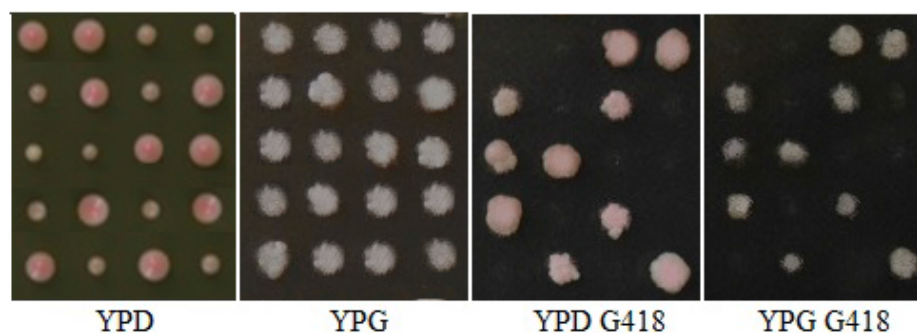


**Joonis 12.** W303a/α *Δmrp17* tetraadanalüüsi tulemusel laiali aetud spooride kasv fermenteeriva YPD ja mittefermenteeriva YPG süsinikuallikaga söötmel. YPD selektiivsöötmel kasvasid ainult *Δmrp17* mutantsed kolooniad ning YPG söötmel ainult metsiktüüpi kolooniad.

W303a/α *Δmrp17* tüve spooridest üles kasvanud kolooniate fenotüüp erines haploidsetest rakkudest deleteeritud *Δmrp17* tüve fenotüübist (joonis 6; paneel A I sektor ; joonis 6; paneel C I sektor; joonis 12). W303α *Δmrp17* tüvel oli *rho*<sup>+</sup> genoom, kuid sporulatsiooni teel saadud kolooniad ei olnud võimelised enam *rho*<sup>+</sup> rakkudele omaselt kasvama glütserooli sisadaval YPG söötmel. W303α *Δmrp17* rakud olid fermenteerival süsinikuallikal punaselt pigmenteerunud ning võimelised kasvama ka mittefermenteerival süsinikuallikal. Saadud tulemustele tuginedes võib järeldada, et *Δmrp17* tüvi kaotab meiosis või sporulatsiooni käigus funktsionaalse mtDNA ja ei ole võimeline enam efektiivselt kasvama glütserooli sisaldavad YPG söötmel.

### 2.3.2.2.5 *Mdm20* deletsioonitüve sporulatsioon

*Mdm20* on 92,8 kDa suurune mitokondriaalne valk, mille deleteerimine põhjustab rakkudes respiratoorse kasvu vähenemist. *Mdm20* valgu puuduses tekivad mitokondri defektid, mis kanduvad edasi järglastele, rakkude kasv muutub temperatuuritundlikuks (Hermann jt., 1997). *Mdm20* mutantsed kolooniad on sarnaselt wt kolooniatega punaselt pigmenteerunud, kuid erinevad wt tüvest koloonia suuruse poolest (joonis 13). YPD söötmel kasvasid üles kaks väiksemat mutantset spoori ja kaks suuremat wt spoori. Seega põhjustas *Mdm20* valgu deleteerimine rakkude aeglasemat kasvu YPD söötmel. Spooride tembeldamisel YPG söötmel sarnanes  $\Delta mdm20$  tüve fenotüüp nii wt kui ka  $\Delta irc3$ ,  $\Delta irc20$  ja  $\Delta mrp11$  spooridest kasvanud kolooniate fenotüübiga.  $\Delta mdm20$  spooride tembeldamisel YPD G418 tassile olid seal kasvanud kolooniad roosaka värvusega. Roosakas värvus näitab, et sarnaselt metsiktüübile suudavad  $\Delta mdm20$  mutandid ADE2 mutatsiooni tagajärjel akumulereeruvat AIR vaheühendit punaseks oksüdeerida, kuigi oluliselt ebaefektiivsemalt. Seega on  $\Delta mdm20$  tüve rakud võimelised hingama.



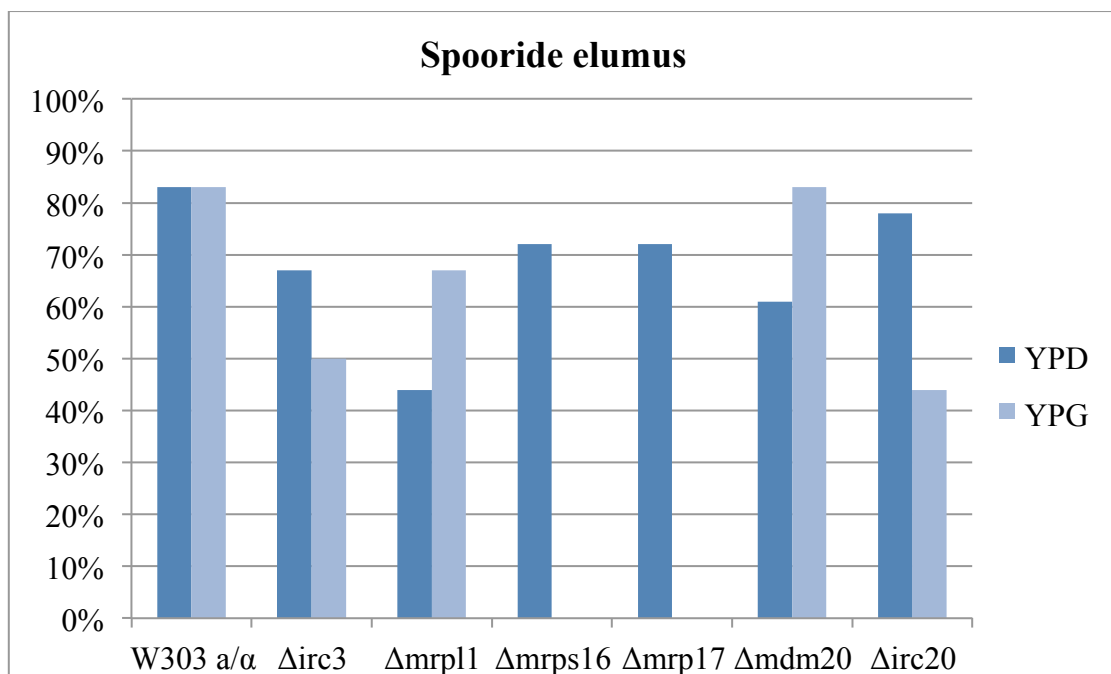
**Joonis 13.** W303a/ $\alpha$   $\Delta mdm20$  tetraadanalüüsi tulemusel laiali aetud spooride kasv fermenteerival ja mittefermenteerival söötmel. Selektiivsöötmel kasvasid ainult  $\Delta mdm20$  mutandid.

### 2.3.2.3 *Irc* deletsioonitüvede spooride elumus

Selleks, et analüüsida erinevate *Irc* valkude deletsiooniga tüvede spooride elumust võrreldi neid W303a/ $\alpha$  tüve spooride elumusega. Esimesel korral eraldati 18 tetraadi YPD söötmel ja teisel korral sama palju tetraade YPG tassile. Spooride elumuse all mõistetakse tetraadidest eraldatud nelja spoori kolooniaks kasvamist. Kasutades 4. meetodit saadi W303a/ $\alpha$  tüve spooride elumuseks 83,3% (tabel 5; joonis 7). Spooride elumuse arvutamisel lähtuti sellest, et kui suur osa 18 spoorideks eraldatud tetraadidest suutsid

moodustada 4 elujõulist kolooniat. Spooride elumus arvutati eraldi nii YPD kui ka YPG söötmele laiali aetud spooridest.

*Irc3* mutantse tüve tetraadide eraldamisel kasvas YPD katses 4 kolooniat 66,7% laiali aetud tetraadidest ning YPG katses kasvas 50% (joonis 14). Sarnaselt  $\Delta irc3$  mutantidele vähenes spooride elumus ka  $\Delta mrp11$  mutantides. YPD katses saadi spooride elumuseks 44,4% ning YPG katses 66,7% (joonis 14). Kuid erinevalt *Irc3* tüvest tekkisid  $\Delta mrp11$  tüves YPD G418 tassil funktsionaalse mtDNA-ga punaselt pigmenteerunud rakud. Nii  $\Delta mrps16$  kui ka  $\Delta mrp17$  mutantide spooride elumust analüüsiti ainult glükoosi sisaldaval YPD söötmel. Mõlema tüve korral moodustasid 4 kolooniat 72,2% laiali aetud tetraadidest (joonis 14). Mittefermenteeriva süsinikuallikaga YPG söötmel ei kasvanud rakud puuduliku mtDNA tõttu, seega on mõlemad ribosoomi väikese subühiku valgud olulised mtDNA funktsionaalseks säilimiseks. Varem on näidatud, et *S. cerevisiae* BY4743  $\Delta mrps16$  tüvel esineb sporulatsioonidefekt (Deutschbauer jt., 2002), kuid selles katses W303  $\Delta mrps16$  tüvel seda ei esinenud. Seevastu  $\Delta mdm20$  mutantse tüve tetraadide eraldamisel moodustas YPD söötmel 4 elujõulist kolooniat 61,1% laiali aetud tetraadidest ning YPG söötmel saadi spooride elumuseks 83,3%.  $\Delta irc20$  mutantse tüve tetraadide eraldamisel moodustas glükoosi sisaldaval YPD söötmel 4 elujõulist kolooniat 77,8% laiali aetud tetraadidest ning YPG katses saadi spooride elumuseks 44,4% (joonis 14).



**Joonis 14.** Metsiktüüpi W303a/α ja mutantsete *Irc* tüvede YPD ja YPG tassidele eraldatud spooride elumus. Protsendi väärtus näitab kui suurel osal laiali aetud 18. tetraadist kasvas üles 4 haploidset spoori. Tulemused on saadud ühe katse põhjal.

*Saccharomyces cerevisiae irc* mutantide spooride elumuse määramisel tehtud katsete tulemustest selgus, et kõik uuritud valgud mõjutasid osaliselt spooride elumust. Minu töös tehtud *S. cerevisiae* sporulatsiooni analüüsi katsed annavad küll teatud informatsiooni *irc* mutantide spooride elumuse kohta ning lõplike järelduse tegemiseks on plaanis teha kordusanalüüsi.

### 2.3.3 *Saccharomyces cerevisiae* mtDNA analüüs

Mrps16 ja Mrp17 valkude deleteerimisel W303a/ $\alpha$  tüvest ei olnud rakud võimelised kasvama enam YPG tassidel ning Irc3 valgu deleteerimisel esines rakkudel glütserooli söötmes aeglasem kasv. Need muutused on võrreldes wt tüvega põhjustatud mtDNA ebastabiilsusest  $\Delta mrps16$ ,  $\Delta mrp17$  ja  $\Delta irc3$  tüvedes. Seega tekkis küsimus, kas Irc valgud mõjutavad ka  $rho^-$  rakkude mtDNA stabiilsust.  $Rho^-$  tüvedes on võrreldes wt tüvega stabiilsem genoom. See katse võimaldas kvantitatiivselt jälgida erinevate Irc valkude deletsioonidest tulenevaid muutusi mitokondriaalses genoomis.

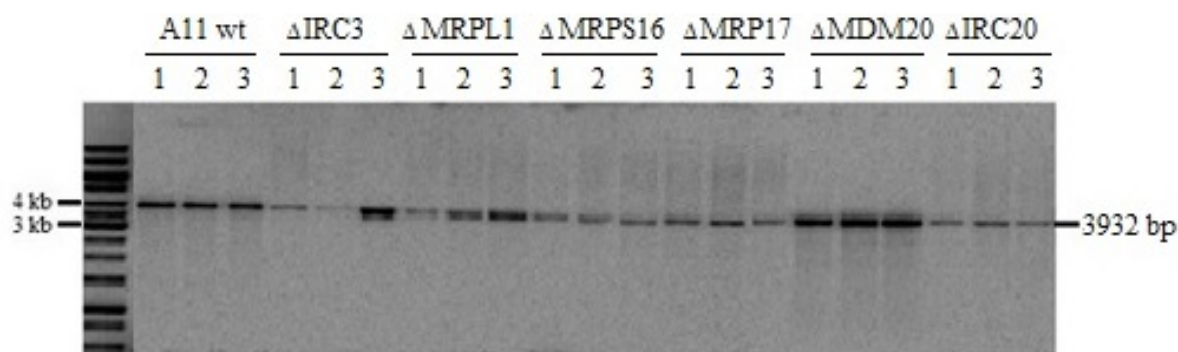
Katses kasutati Biokeemia labori pärimistüvede kollektsioonis olevaid  $rho^-$  genotüübiga A11 (mtDNA fragmendi pikkus 1790 bp) ja A1184 (mtDNA fragmendi pikkus 1184 bp) tüvesid (joonis 5). Need  $rho^-$  tüved on suppressiivsed, sest nende genoom pärandub järglastele vähemalt 95% ulatuses.  $Rho^-$  tüvede mtDNA koosneb lühikestest kogu genoomi ulatuses korduvatest järjestustest. Seega on nendes tüvedes olemas mtDNA, kuid puudub funktsioneeriv hingamisahel.  $Rho^-$  mutandid on  $rho^+$  rakkudest ka palju väiksemad, seetõttu nimetatakse neid *petite* rakkudeks. Nende mutantide aeglasem kasv on tingitud sellest, et neil puudub oksüdatiivse fosforüleerimise metabolismirada. *Petite* mutandid toodavad ATP-d glükolüüsi ja etanoolkääritamisega (Dujon, 1981).

Irc valkude analüüsimiseks *S.cerevisiae* mitokondriaalse genoomi stabiilsusele, deleteeriti  $rho^-$  A11 ja A1184 tüvedest uuritavad IRC geenid. Kontrollina kasutati A11 ja A1184 metsiktüüpi isolaate.

Kõigepealt puhastati  $rho^-$  A11 tüvest totaalne DNA. Samuti eraldati totaalne DNA Irc valkude deletsioonidega tüvedest (peatükk 2.2.8). Saadud DNA-d lõigati EcoRV restriktiaasiga, mis lõikab nende tüvede genoomi fragmenti 1 kord. Saadud fragmendid lahutati EtBr-ga värvitud agarosgeelil ja pildistati (LISAD; joonis 20) ning kanti üle nailonfiltrile. Kõikidest tüvedest analüüsiti kolmest erinevast kolooniast eraldatud DNA-d.

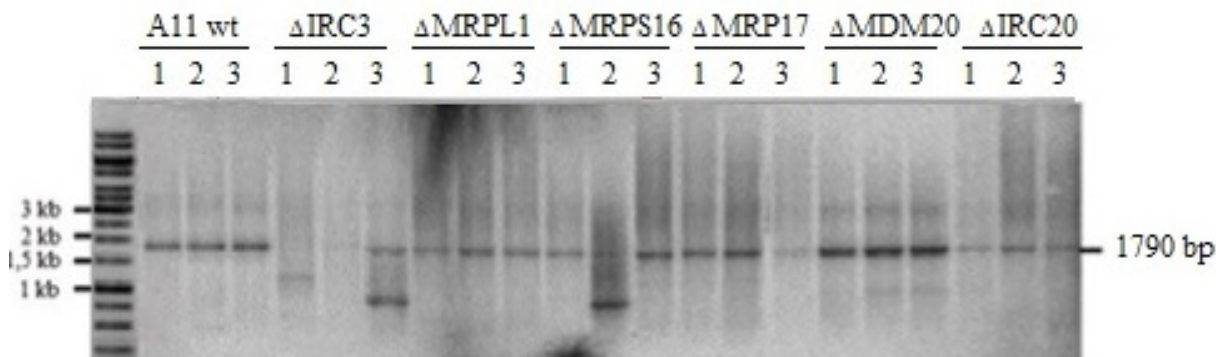
Kuna kõik rakud ei olnud DNA eraldamise ajaks saavutanud ühesugust kultuuritihedust, oli ka eraldatud DNA hulk erinev.

Filtreid hübridiseeriti esmalt nukleaarse ja seejärel mitokondriaalse prooviga. See võimaldas võtta arvesse DNA eraldamisest tulenevaid komplikatsioone ja hinnata mtDNA kogust võrreldes nukleaarse DNA hulgaga. Filtrid skaneeriti *Typhoon TRIO Phosphoimager* masinaga. Nukleaarse DNA radioaktiivselt märgistatud prooviga hübridiseerus Dna2 geenist 3932 bp suurune fragment (joonis 15). Selle fragmendi signaali intensiivsust mõõdeti *ImageQuant TL* programmi abil. DNA hulka nailonfiltril kvantiteeriti tekkinud DNA fragmentide värvuse intensiivsuse alusel.



**Joonis 15.** A11 ning selle tüve mutantide totaalne DNA hübridiseeritud radioaktiivselt märgistatud nukleaarse prooviga. Hübridiseerus 3932 bp suurune fragment Dna2 geenist.

Nukleaarse DNA hulk Irc valkude deletsioonidega tüvedes oli ebaühtlane, kuid kõikides proovides oli signaal siiski olemas. Nukleaarne proov eemaldati ja sama filtrit hübridiseeriti radioaktiivselt märgistatud mitokondriaalse ori prooviga (joonis 16). Mitokondriaalse prooviga hübridiseerimine võimaldas hinnata mtDNA kogust võrreldes nukleaarse DNA-ga.



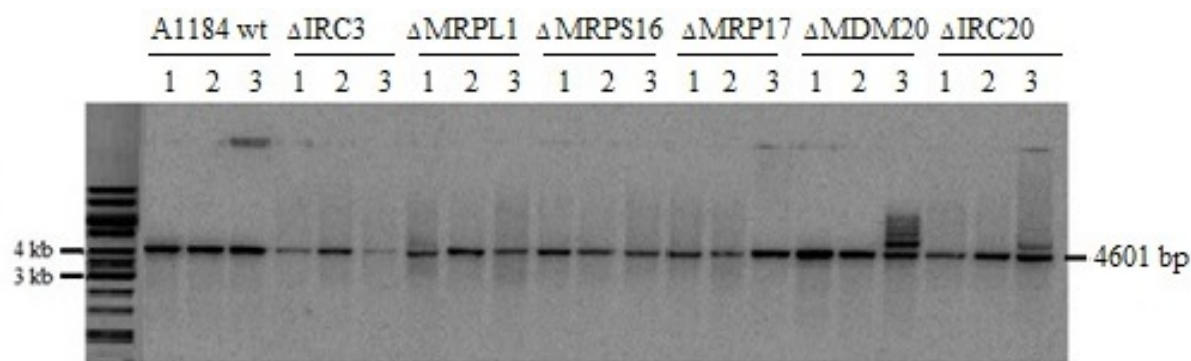
**Joonis 16.** A11 ning selle tüve mutantide EcoRV-ga lõigatud totaalne DNA hübridiseeritud radioaktiivselt märgistatud mitokondriaalse ori2 prooviga. Hübridiseerus 1790 bp suurune fragment.

A11 ja *irc* mutantide *rho*<sup>-</sup> tüvede radioaktiivselt märgistatud mitokondriaalse proovi pildil (joonis 16) oli näha mitmes tüves mtDNA fragmenteerumist.  $\Delta irc3$  mutantides fragmenteerusid 1. ja 3. kolooniast eraldatud DNA ning 2. oli DNA osakaal väiksem võrreldes teiste *irc* mutantidega. MtDNA fragmenteerumist esines ka  $\Delta mrps16$  2. kolooniast eraldatud DNA-s. Mutatsioonid Mrps16 valgus põhjustavad vigu mitokondriaalse mRNA translatsioonil, mille tõttu esineb nendes tüvedes respiratsioonidefekt (Heeren jt., 2008). Mrps16 valgu deleteerimisel W303 haploidsest (joonis 6; paneel A II sektor; joonis 6; paneel C II sektor) ja diploidsest tüvest (joonis 11) saadi respiratsioonidefektiga  $\Delta mrps16$  mutandid. Seega on Mrps16 valku vaja ka *rho*<sup>-</sup> tüvede mtDNA stabiilsuse tagamiseks. Nii IRC3 kui ka MRPS16 geenid on Alvaro ja kaasautorite poolt määratud klass IV geenide hulka, mis kuuluvad kromatiini ümbermodelleerimise ja rakutsükli kontrollpunktide mitokondriaalsete geenide hulka (Alvaro jt., 2007). Samasse IRC geenide klassi kuulub ka MDM20, mille deleteerimine ei mõjutanud oluliselt mitokondriaalse DNA stabiilsust (joonis 16).

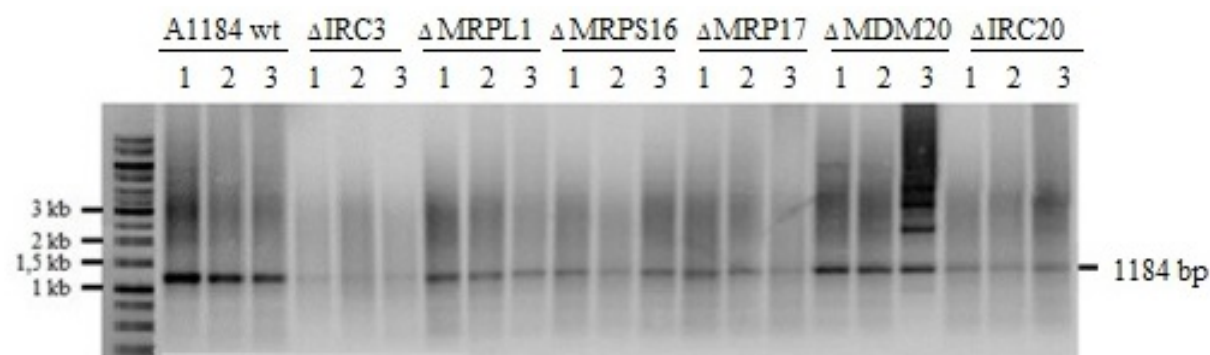
Sarnaselt  $\Delta mdm20$  tüvele ei mõjutanud oluliselt *rho*<sup>-</sup> A11 tüvede mtDNA stabiilsust ka Mrp11, Mrp17 ja Irc20 valkude deleteerimine. MRPL1 ning IRC20 kuuluvad Alvaro ja kaasautorite poolt määratud klass IV geenide hulka. Nende geenide deletsioonid mõjutavad homoloogilist rekombinatsiooni vaid spetsiifilistes regioonides. MRP17 kuulub aga klass II geenide hulka, mille deletsioonid tõstavad homoloogilise rekombinatsiooni taset, sinna klassi kuuluvad geenid osalevad genoomi stabiilsuse säilitamisel ja spontaansete DNA kahjustuste piiramisel (Alvaro jt., 2007). Kuid käesoleva katse tulemused näitasid, et W303 *rho*<sup>-</sup> A11 tüve puhul ei sõltu mtDNA stabiilsus oluliselt Mrp17 valgu deleteerimisest. Analüüsi tulemustest selgus, et W303 *rho*<sup>-</sup> A11 tüve mtDNA oli kõige ebastabiilsem IRC3 geeni deleteerimisel.

Järgmisena analüüsiti *rho*<sup>-</sup> supressiivset A1184 tüve ja selles tüve *irc* mutante. A1184 tüvedest eraldatud DNA-d lõigati DraI restriктаasiga, mis lõikab nende tüvede mtDNA fragmenti 1 kord. *Rho*<sup>-</sup> A1184 tüve mtDNA fragment on väikesem kui *rho*<sup>-</sup> A11 mtDNA fragment ja seega võiks A1184 mtDNA olla stabiilsem.

Restriktsioonil saadud fragmendid lahutati agarosgeelil (LISAD; joonis 21). Seejärel kanti DNA üle nailonfiltrile ja märgistati radioaktiivsete Dna2 ja ori proovidega. Nukleaarse Dna2 prooviga hübridiseerus 4601 bp fragment (joonis 17) ning mitokondriaalse ori prooviga 1184 bp pikkune fragment (Joonis 18).



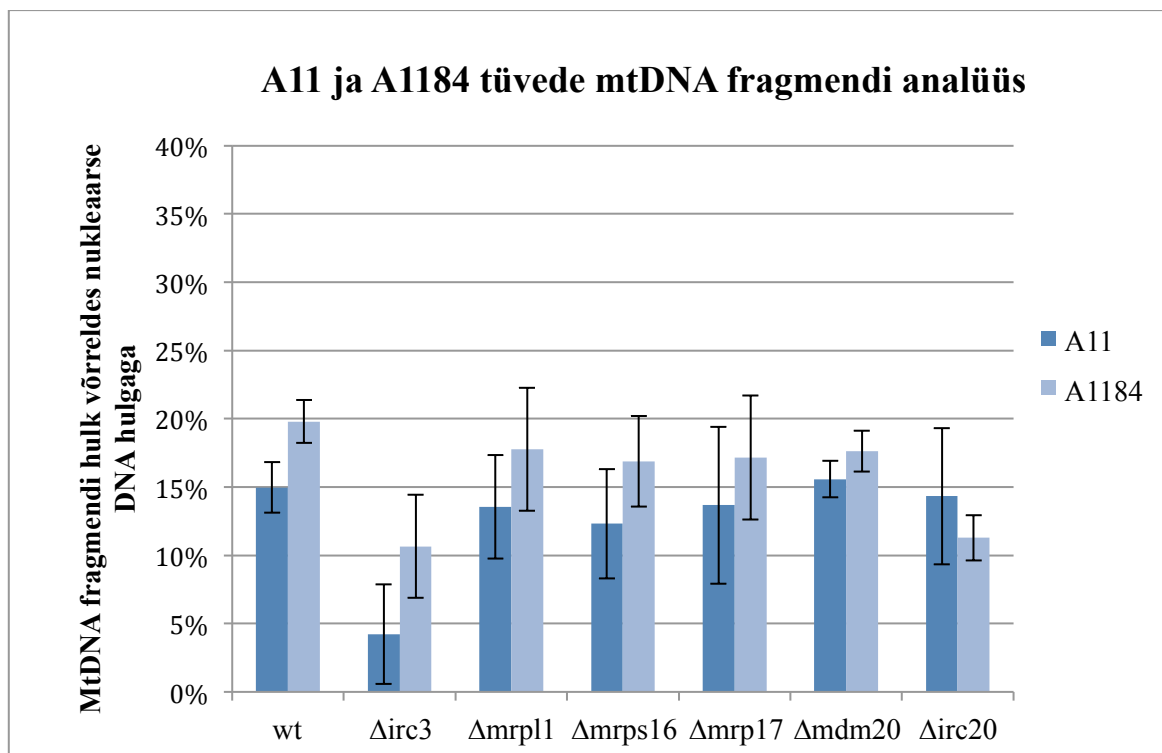
**Joonis 17.** *Rho*<sup>-</sup> A1184 ning selle tüve *irc* mutantide totaalne DNA hübridiseeritud radioaktiivselt märgistatud nukleaarse prooviga. Hübridiseerus 4601 bp suurune fragment Dna2 geenist.



**Joonis 18.** *Rho*<sup>-</sup> A1184 ning selle tüve mutantide DraI-ga lõigatud totaalne DNA hübridiseeritud radioaktiivselt märgistatud mitokondriaalse prooviga. Hübridiseerus 1184 bp suurune fragment.

Sarnaselt A11 tüvele oli A1184 tüve mtDNA kõige ebastabiilsem *Irc3* valgu deleteerimisel (joonis 16; joonis 18). Ühegi töös uuritud *Irc* valgu deleteerimine ei põhjustanud A1184 tüve mtDNA-s fragmenteerumisi. *Δmdm20* kolmandast kolooniast eraldatud totaalse DNA hulk oli suurem võrreldes teiste mutantsetest tüvedest eraldatud DNA hulgaga. Seega võib selles tüves olla DraI restriктаasi mittetäielik lõikus, kuna on näha ka analüüsitud fragmentist suuremaid fragmente.

Kahe erineva *rho*<sup>-</sup> tüve ja nendest tüvedest tehtud *irc* mutantide analüüs võimaldas kvantitatiivselt jälgida IRC geenide deletsioonidest tulenevaid muutusi mitokondriaalses genoomis. *Rho*<sup>-</sup> tüvede mtDNA analüüsi tulemustest saadi informatsiooni *irc* mutantide mtDNA hulga ja stabiilsuse kohta (joonis 19).



**Joonis 19.** W303a *rho*<sup>-</sup> tüvede A11 ja A1184 ning nende *irc* mutantide mitokondriaalse DNA fragmendi hulk võrreldes nukleaarse DNA hulga. Graafikul on esitatud ühe eksperimendi kolmest tüvest arvatud keskmine tulemus koos standardveaga.

*Irc* mutantide mtDNA fragmendi hulga võrdlemisel nukleaarse fragmendi hulga selgus, et väiksema *rho*<sup>-</sup> tüve A1184 ja selle *irc* mutantide restriksioonil tekkinud fragment oli stabiilsem kui suurema *rho*<sup>-</sup> tüve A11 ja selle *irc* mutantide restriksioonil tekkinud fragment (joonis 19). Seda näitavad ka A11 ja A1184 mitokondriaalse ori prooviga hübriidiseerunud fragmentide pildid. Suurema *rho*<sup>-</sup> tüve A11 *Δirc3* 1. ja 3. kolooniast eraldatud DNA-s oli näha mtDNA fragmenteerumist ning *Δmrps16* puhul ilmnis samuti mtDNA fragmenteerumine 2. kolooniast eraldatud DNA-s (joonis 16). Väiksema *rho*<sup>-</sup> tüve A1184 puhul mtDNA fragmenteerumist ei esinenud (joonis 18). *Irc* deletsioonitüvede mtDNA fragmentide signaali intensiivsuse omavahelisel võrdlemisel selgus, A11 tüves on signaal kõige nõrgem *Irc3* ja *Mrps16* valkude deleteerimisel (joonis 19). A1184 tüves oli signaal kõige nõrgem *Irc3* ja *Irc20* valkude deleteerimisel. MtDNA analüüsi tulemuste põhjal näidati, et peaaegu kõigi töös uuritud *Irc* valude deleteerimisel muutub mtDNA ebastabiilsemaks, kuid nende mõju mitokondriaalse DNA stabiilsusele on valguspetsiifiline. Erandiks oli *Mdm20* valk, mille deleteerimine *rho*<sup>-</sup> A11 tüvest ei põhjustanud mtDNA ebastabiilsust. Samas on ka teada, et *Mdm20* täidab oma funktsiooni aktiini filamentide moodustumisel (Singer ja Shaw, 2003), seega ei osale see valk suure tõenäosusega mtDNA metabolismis. MtDNA stabiilsuse

analüüsi objektiivsemaks hindamiseks ning lõplike järelduste tegemiseks on plaanis teha kordusanalüüse.

## KOKKUVÕTE

Mitokondrid on eukarüootse raku organellid, mille peamiseks funktsiooniks on oksüdatiivse fosforüleerimise teel raku elutegevuseks vajaliku energia tootmine. Mitokondril on oma genoom, mille funktsioneerimiseks on vaja tuuma genoomi poolt kodeeritud valke.

Käesolevas bakalaureusetöös uuriti *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalseid Irc valke. Varasemalt on näidatud, et mitokondriaalsete Irc valkude deleteerimisel tekivad kahjustused tuuma genoomis, mis parandatakse ära homoloogilise rekombinatsiooniga. Antud töö eesmärgiks oli uurida mitokondriaalsete Irc3, Mrp11, Mrps16, Mrp17, Mdm20 ja Irc20 valkude deleteerimisest põhjustatud fenotüüpe *S. cerevisiae* W303 haploidsetes, diploidsetes ja *rho*<sup>-</sup> A11 ning A1184 tüvedes. Uuriti ka *irc* mutantide mõju W303 diploidset tüvest saadud spooride elumusele. Töö teises osas analüüsiti W303 *rho*<sup>-</sup> tüvede A11 ja A1184 Irc valkude deleteerimise mõju mtDNA stabiilsusele.

Tulemustest selgus, et Mrp11, Mdm20 ja Irc20 valkude deleteerimine W303 tüvest ei mõjutanud haploidse tüve fenotüüpi, kuid põhjustas diploidsetes tüves spooride elumuse vähenemist. Seevastu Mrps16 valgu deleteerimisel tekkisid nii haploidsetes kui ka diploidsetes tüves puuduliku hingamishaelaga *petite* rakud. Erandiks oli Mrp17 valk, mille deleteerimisel säilis haploidsetes tüves funktsionaalne mtDNA, kuid diploidsetes tüves tekkisid puuduliku hingamisahelaga rakud. Irc3 valgu deleteerimisel nii haploidsetest kui diploidsetest W303 tüvest tekkisid YPD söötmel puuduliku hingamisahelaga rakud, mis olid aga suutelised kasvama glütseroolil.

*Rho*<sup>-</sup> tüvede mitokondriaalse DNA analüüsi tulemustest selgus, et Irc valkude deleteerimisel vähenes mitokondriaalse DNA stabiilsus. Kõige vähem mõjutas seda Mdm20 valk ning kõige rohkem Irc3 valgu deleteerimine. Tulemuste analüüsimisel ilmnas ka see, et väiksema mtDNA fragmendiga *rho*<sup>-</sup> tüve A1184 mtDNA-s esines vähem fragmenteerumisi võrreldes A11 *rho*<sup>-</sup> tüvega.

Saadud tulemused andsid uut informatsiooni Irc valkude mõju kohta *Saccharomyces cerevisiae* W303 tüvele. Käesoleva bakalaureusetöö katsetest selgus, et mitokondriaalsete Irc valkude deleteerimisel ei ole ühtset *irc* fenotüüpi. Avaldatud tulemusi on plaanis täiendada edaspidiste eksperimentidega.

# Irc phenotype caused by mitochondrial proteins

Carolyn Falten

## RESUME

Mitochondrion is a membrane-enclosed organelle found in most eucaryotic cells and it's main function is to produce ATP by oxidative phosphorylation, which is needed for the normal cell's maintenance. Mitochondrion possesses it's own genetic system which requires nuclear proteins to function. Mitochondrial DNA (mtDNA) is also known as a *rho* factor. Mitochondrial mutants are called either *rho*<sup>0</sup> (without DNA) or *rho*<sup>-</sup> (fragmented mtDNA). The cells with wild type mitochondrial genome are called *rho*<sup>+</sup>. The linear form of mtDNA is 75-80 kb long, which contains 7-8 replication origins (ori). In the ori sequence, there are 4 GC-rich clusters localized between mainly AT-rich region.

In this study I examined *Saccharomyces cerevisiae* nucleus-encoded Irc proteins that are translocated to mitochondrion. In the earlier reports it has been shown that the number of Rad52 foci are increased in strains with mutant Irc proteins. The aim of this research was to investigate the phenotypes caused by deletion of IRC3, MRPL1, MRPS16, MRP17, MDM20 and IRC20 genes from *S. cerevisiae* W303 strain. In this study I show how the sporulation efficiency is affected in cells carrying different mutated Irc proteins. I also analysed mtDNA stability of *irc* mutants.

The analysis provided with the results, which showed that the *Δmrps16* mutant strains have defective respiratory machinery. Sporulation efficiency analysis showed that the *irc* mutant strains are not able to form as much viable spores than wild type strain. The results of DNA stability study demonstrate that the strain with Irc3 protein deletion has the most unstable DNA.

In conclusion the research data provided with information, how the deletion of Irc proteins influence mitochondrial DNA metabolism.

## **TÄNUSÕNAD**

Soovin tänada oma juhendajat Dr. Tiina Sedmani põhjaliku juhendamise eest ja Prof. Juhan Sedmani väärt nõuannete eest. Samuti tänan Ilja Gaidutšikut minule kulutatud aja ja abivalmiduse eest ning Kadi Lõhmussaart ja Sten Karrot igakülgse toetuse eest.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Alvaro D, Lisby M, Rothstein R (2007) Genome-wide analysis of Rad52 foci reveals diverse mechanisms impacting recombination. *PLoS Genet* 3: e228.

Ballard J.W ja Whitlock M.C (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol.* 13: 729-44

Baruffini E, Ferrero I, Foury F (2010) In vivo analysis on mtDNA replication defects in yeast. *Methods* 51: 426-36

Blanc H ja Dujon B (1980) Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA responsible for suppressiveness. *Proc. Natl. Acad* 7: 3942-3946

Briza P, Breitenbach M, Ellinger A, Segall J (1990) Isolation of two developmentally regulated genes involved in spore wall maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 4: 1775-1789

Brown W. M, George M Jr., Wilson A. C (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1967-1971

Chen X. J, Butow R. A (2005) The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet* 6: 815-825

Coluccio A ja Neiman A (2004) Interspore bridges: a new feature of the *Saccharomyces cerevisiae* spore wall. *Microbiol.* 150: 3189-3196

de la Cruz J, Kressler D, Linder P (1999) Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* 24: 192–198

de Zamaroczy M ja Bernardi G (1986) The primary structure of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae* - a review. *Gene* 47: 155-77

de Zamaroczy M, Faugeron-Founty G, Baldacci G, Goursot R ja Bernardi G (1986) The ori sequences of the mitochondrial genome of a wild-type yeast strain: number, location, orientation and structure. *Gene* 32: 439-457

Deutschbauer A. M, Williams R.M, [...], Davis R. W (2002) Parallel phenotypic analysis of sporulation and postgermination growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci* 99(24): 15530-15535

Esposito, R.E, and Klapholz, S (1981). Meiosis and ascospore development. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, ed. J.N. Strathern, E.W. Jones, and J.R. Broach, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 211-287.

Faugeron-Fonty G, Le van Kim C, de Zamaroczy M, Goursot R and Bernardi G (1984) A comparative study of the ori sequences from the mitochondrial genomes of twenty wild-type yeast strains. *Gene* 32: 459-473

Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B (1998) The complete sequence of mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 440: 325-331

Freese E. B, Chu M. I, Freese E (1982) Initiation of yeast sporulation of partial carbon, nitrogen, or phosphate deprivation. *J. Bacteriol.* 149: 840-851

Gan X, Kitakawa M, Yoshino K, Oshiro N, Yonezawa K, Isono K (2002) Tag-mediated isolation of yeast mitochondrial ribosome and mass spectrometric identification of its new components. *Eur. J. Biochem.* 269: 5203-14

Gedvilaite A ja Sasnauskas K (1994) Control of the expression of the ADE2 gene of the *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 25(6): 475-9

Giannattasio S, Guaragnella N, Zdravlević M, Marra E (2013) Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. *Front Microbiol.* 4: 33.

Goffeau A, Barrell B.G, Bussey H jt. (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 563-7

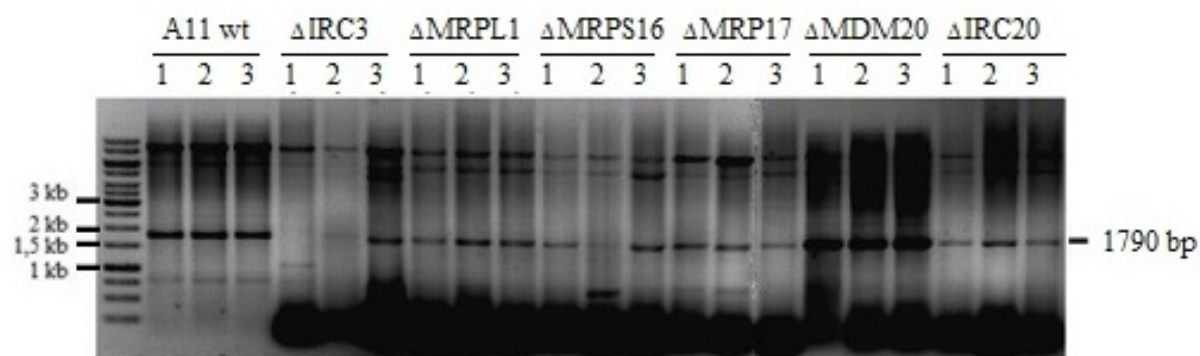
Graves T, Dante M, Eisenhour L ja Christianson T. W (1998) Precise mapping and characterization of the RNA primers of DNA replication for a yeast hypersuppressive petite by *in vitro* capping with guanylyltransferase. *Nucleic Acids Res* 26: 1309-1316

- Haffter P, Fox TD (1992) Suppression of carboxy-terminal truncations of the yeast mitochondrial mRNA-specific translational activator PET122 by mutations in two new genes, MRP17 and PET127. *Mol Gen Genet* 235: 64-73
- Hartwell L. H (1974) *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol. Rev.* 38: 164-198
- Haque Md. E, Grasso D, Miller C, Spremulli L. L, Saada A (2008) The effect of mutated mitochondrial ribosomal proteins S16 and S22 on the assembly of the small and large ribosomal subunits in human mitochondria. *Mitochondrion* Jun 2008; 8(3): 254–261
- Heeren G, Rinnerthaler M, Breitenbach M jt (2009) The mitochondrial ribosomal protein of the large subunit, Afo1p, determines cellular longevity through mitochondrial back-signaling via TOR1. *Aging* 1: 622-636
- Heider D, Barnekow A (2008) DNA watermarks: A proof of concept. *BMC Mol Biol.* 9: 40
- Hermann G. J, King E. J, Shaw J. M (1997) The yeast gene, *mdm20*, is necessary for mitochondrial inheritance and organization on the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 137: 141-153
- Hyman B. C, Cramer J. H, Rownd R. H (1982) Properties of a *Saccharomyces cerevisiae* mtDNA segment conferring high-frequency yeast transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 1578-82.
- Kassir Y, Adir N, Boger-Nadjar E, Raviv N. G, Rubin-Bejerano I, Sagee S, Shenhar G (2003) Transcriptional regulation of meiosis in budding yeast. *Int Rev Cytol* 224: 111-71
- Kitakawa M, Graack H. R, Grohmann L, Goldschmidt-Reisin S, Herfurth E, Wittmann-Liebold B, Nishimura T, Isono K (1997) Identification and characterization of the genes for mitochondrial ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 245(2): 449-56
- Krishnamoorthy T, Chen X, Govin J, Cheung W. L, Dorsey J. jt. (2006) Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes Dev.* 20: 2580-2592

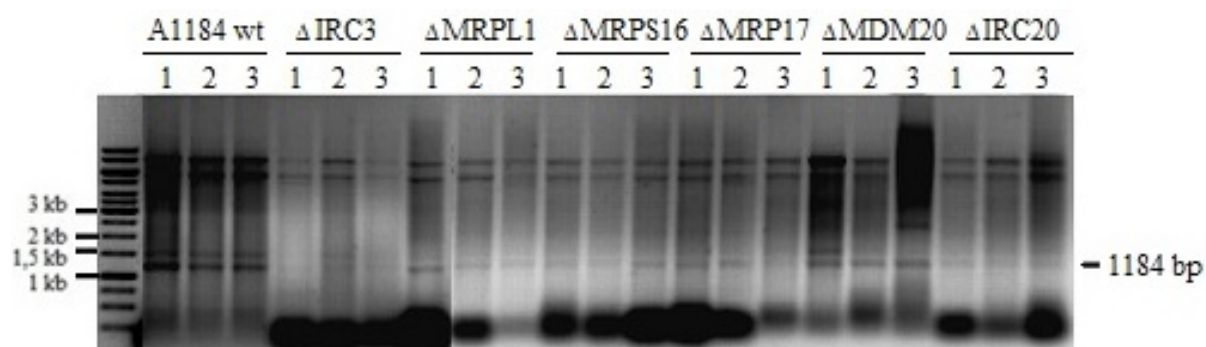
- Lisby M, Mortensen U.H, Rothstein R (2003) Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat. Cell Biol.* 5: 572-577
- Lisby M, Rothstein R (2005) Localization of checkpoint and repair proteins in eukaryotes. *Biochimie* 87(7): 579-589
- Lisby M, Rothstein R, Mortensen U.H (2001) Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 8276–8282
- Lööke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A (2011) Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques* 50(5): 325-328
- McCammon M. T (1996) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defects in acetate metabolism: isolation and characterization and *acn<sup>-</sup>* mutants. *Genetics* 144: 57-69
- Mitchell A. P (1994) Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 58: 56-70
- Miura T, Yamana Y, Usui T, Ogawa H. I, Yamamoto M. T Kusano K (2012) Homologous recombination via synthesis-dependent strand annealing in yeast requires the Irc20 and Srs2 DNA helicases. *Genetics* 191: 65-78
- Miyakawa I, Sando N, Kawano S, Nakamura S, Kuroiwa T (1987) Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 88: 431-439
- Neiman A. M (2011) Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 189: 737–765.
- Neupert W (1997) Protein import into mitochondria *Annual Rev. Biochem.* 66: 863-917
- Polevoda B, Arnesen T, Sherman F (2009) A synopsis on eukaryotic N $\alpha$ -terminal acetyltransferases: nomenclature, subunits and substrates. *BMC Proc.* 3: S2
- Richardson A, Gardner R. G, Prelich G (2013) Physical and Genetic Associations of the Irc20 Ubiquitin Ligase with Cdc48 and SUMO. *PLoS One* 8(10): e76424
- Roeder A. D, Shaw J. M (1996) Vacuole partitioning during meiotic division in yeast. *Genetics* 144: 445-458

- Roman H, Phillips M. M, Sands S. M (1955) Studies of polyploid *Saccharomyces*. I tetraploid segregation. *Genetics* 40: 546-561
- Sherman F (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 350: 3-41
- Shiratori A, Shibata T, Arisawa M, Hanaoka F, Murakami Y, Eki T (1999) Systematic identification, classification, and characterization of the open reading frames which encode novel helicase-related proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by gene disruption and Northern analysis. *Yeast* 15(3): 219-53
- Shuster E. O, Byers B (1989) Pachytene arrest and other meiotic effects of the start mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 123: 29-43
- Singer J. M, Shaw J. M (2003) Mdm20 protein functions with Nat3 protein to acetylate Tpm1 protein and regulate tropomyosin – actin interactions in budding yeast. *Department on Biol* 13: 7644-7649
- Suda Y, Nakanishi E, Mathieson E. M, Neiman A. M (2007) Alternative modes of organellar segregation during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 6: 2009-2017
- Tatarenkov A ja Avise J. C (2007) Rapid concerted evolution in animal mitochondrial DNA. *Proc Biol Sci.* 274: 1795-1798
- Ugolini S, Bruschi C. V (1996) The red/white colony color assay in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: epistatic growth advantage of white *ade8 – 18, ade2* cells over red *ade2* cells. *Curr Genet.* 30: 485-92.

## LISAD



**Joonis 20.** *Rho*<sup>-</sup> A11 tüve ja selle *irc* mutantide totaalse DNA hulka EtBr-ga värvitud agarosgeelil.



**Joonis 21.** *Rho*<sup>-</sup> A1184 tüve ja selle *irc* mutantide totaalse DNA hulka EtBr-ga värvitud agarosgeelil.

## LIHTLITSENTS

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

Mina Carolin Falten

(sünnikuupäev: 22.12.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “Irc valkude mõju *Saccharomyces cerevisiae* spooride elumusele ja mitokondriaalse DNA stabiilsusele”, 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, 26.05.2014