

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÜLDISE JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Paula Salme Sandrak

Termotolerantse mikroorganismi mitokondriaalse DNA polümeraasi puhastamine

Bakalaureusetöö

Juhendaja PhD Juhan Sedman

TARTU 2014

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. VALDKONNA ÜLEVAADE	6
1.1 Mitokonder.....	6
1.2 Mitokondriaalne DNA	6
1.2.1 Mitokondriaalse DNA mutatsioonid ja reparatsioon.....	8
1.3 Mitokondriaalse DNA replikatsioon.....	10
1.3.1 Imetajate mtDNA replikatsioon	10
1.3.2 Pärmide mtDNA replikatsioon	12
1.3.3 MtDNA replikatsioonis osalevad valgud	13
1.4 Mitokondriaalne DNA polümeraas γ	14
1.4.1 DNA polümeraas γ ehitus ja homoloogsus	15
1.4.2 DNA polümeraas γ ensümaatilised aktiivsused	17
1.4.3 DNA polümeraas γ -ga seotud haigused ja vananemine	19
1.5 <i>Hansenula polymorpha</i> uurimisobjektina.....	21
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	23
2.1 Töö eesmärgid.....	23
2.2 Materjalid ja meetodika	23
2.2.1 Töös kasutatud tüved ja kasvutingimused.....	23
2.2.2 Töös kasutatud plasmiidne ekspressioonivektor ja oligonukleotiidid.....	24
2.2.3 Agaroosgeelelektroforees (AGE)	25
2.2.4 Totaalse DNA eraldamine pärmist	25
2.2.5 Ekspressioonikonstrukti koostamine	26
2.2.5.1 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	26
2.2.5.2 DNA modifikatsioonid: restriksioon ja ligatsioon	26
2.2.5.3 DNA puhastamine	26
2.2.6 <i>E. coli</i> transformatsioon ja plasmidi eraldamine bakterirakkudest	27
2.2.6.1 <i>E. coli</i> rakkude transformatsioon	27
2.2.6.2 Plasmidi eraldamine <i>E. coli</i> -st	27
2.2.7 Sekveneerimine	28
2.2.8 Restriksioonanalüüs.....	28

2.2.9 Ekspressioonitüve kompetentsete rakkude valmistamine, transformatsioon ja säilitus.....	29
2.2.10 Rosetta(DE3) Mip1 tüve kasvatamine ja Mip1 ekspressioon	29
2.2.11 Mip1 valgu eraldamine.....	29
2.2.11.1 Rakkude kogumine ja lüüs	29
2.2.11.2 Ni-NTA afiinsuskromatograafia	30
2.2.11.2.1 Puhastamine väikeses mahus	30
2.2.11.2.2 Puhastamine suures mahus	30
2.2.11.3 Väljasoolamine.....	31
2.2.11.4 S-Sepharose kationvahetuskromatograafia	31
2.2.11.5 Geelfiltratsioon.....	31
2.2.12 Sedimentatsioon glütserooligradiendis.....	32
2.2.13 DNA polümeraase aktiivsuse määramine vasika tuumuse aktiveeritud DNA-I...	32
2.2.14 Valgualanüüsi meetodid	32
2.2.14.1 SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforees (SDS-PAGE)	32
2.2.14.2 Valgukontsentratsiooni määramine.....	33
2.3 Tulemused ja arutelu.....	34
2.3.1 <i>Mip1</i> ekspressioonikonstrukti valmistamine	34
2.3.2 Mip1 ekspressioon.....	35
2.3.2.1 H. polymorpha Mip1 ekspressioonitingimuste optimiseerimine	37
2.3.3 Mip1 puhastamine ja selle optimiseerimine	39
KOKKUVÕTE	47
SUMMARY	48
TÄNUSÕNAD	50
KIRJANDUSE LOETELU.....	51
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	63
LISAD	64
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	69

KASUTATUD LÜHENDID

2xYT – bakteri rikas sööde (*2x yeast extract, tryptone*)

AGE - agarosgeelelektroforees

BER – aluse väljalõike reparatsioon (ingl k *base excision repair*)

Cam - klooramfenikool

CTE – C-terminaalne pikendus (ingl k *C-terminal extension*)

dRP – desoksüriboosfosfaat

EtBr - etiidiumbromiid

ETA – elektrontranspordiahel

IPTG - isopropüül-1-tio-β-D-galaktopüranosiid

Kan – kanamütsiin

LB – Luria-Bertani sööde, lüsogeensuspuld (ingl k *lysogeny broth*)

M9 CA – M9 minimaalsööde kasaminohapetega

mtDNA – mitokondriaalne DNA

NTA – nitrilotriatseethape (ingl k *nitrilotriacetic acid*)

Poly – mitokondriaalne DNA polümeraas γ

RITOLS – terve mahajääva ahela ulatuses sisselülitunud RNA (*RNA incorporated through-out lagging strand*)

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid (ingl k *reactive oxygen species*)

SDS-PAGE – naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiidgeelelektroforees

ssDNA – üheaheelaline DNA (ingl k *single-stranded DNA*)

YPD – pärmri rikas sööde (*yeast extract, peptone, dextrose*)

SISSEJUHATUS

Eukarüootse raku tuumagenoomi alalhoiu eest vastutab suur hulk DNA polümeraase (ülevaate saamiseks Hübscher jt, 2002). Mitokondriaalne DNA polümeraas Poly ehk Mip1 täidab aga mitokondriaalse genoomi säilitamiseks vajalikke rolle enamasti üksinda. Poly viib mitokondris läbi nii mitokondriaalse DNA replikatsiooni (Genga jt, 1986; Hance jt, 2005), rekombinatsiooni (Dujon, 1981; Gerhold jt, 2010) kui ka reparatsiooni (Longley jt, 1998a). Paljudes eukarüootsetes organismides on Poly mitmesubühikuline (Gray ja Wong, 1992; Insdorf ja Bogenhagen, 1989), koosnedes katalüütilisest subühikust, millel on nii polümeraasne kui ka eksonukleasne aktiivsus, ja väiksemast protsessiivsust tõstvast β -subühikust. *Saccharomyces cerevisiae*-l ehk pungival pärmil on ühest subühikust koosnev Poly (Lucas jt, 2004).

S. cerevisiae on olnud aastaid mitokondriaalse genoomi uuringute keskmes, sobides hästi eukarüootsete organismide mudeliks. Senini pole aga *S. cerevisiae* Poly-t suudetud biokeemiliselt piisavalt põhjalikul tasemel iseloomustada, sest antud valku on mitmel põhjusel raske uurida. Looduslikult on Poly kontsentratsioon rakus üsna madal (Biswas jt, 1995), see ensüüm on tundlik proteolüüsile ja oksüdatiivsetele kahjustustele (Graziewics jt, 2002). Pagaripärmi Poly-le on omane veel ka ebastabiilsus - ta kaotab kiiresti oma polümeraasne aktiivsuse (Biswas jt, 1995) ning senini pole õnnestunud saada antud valku piisavates kogustes struktuurseks analüüsiks. Samas on antud valgu uurimine oluline, mõistmaks täpsemalt mitokondriaalse genoomi säilitamise, replikatsiooni ja mitmete mitokondriaalsete haiguste tagamaid.

Hansenula polymorpha on üldtuntud pärmiliikide (näiteks *S. cerevisiae*) kõrval üks tähtsamaid tööstuslikult rakendatud pärme. *H. polymorpha* on rohkelt olnud kasutuses ka teaduslike tööde uurimisobjektina, tema abil on saadud näiteks teadmisi metanooli metabolismi, peroksüsoomide biogeneesi ja lagundamise ning raskemetallide resistentsuse kohta (Gellissen, 2002). Käesoleva uurimistöö baasorganismiks valiti antud pärmiliik, sest tegemist on termotolerantse mikroorganismiga (Sahm, 1977; Cabeça-Silva ja Madeira-Lopes, 1984; Ishchuk jt, 2009), mistõttu võib tema valkude uurimine olla lihtsam *S. cerevisiae* ensüümidest. Uurimuse eesmärgiks on välja töötada meetod rekombinantse, potentsiaalselt termostabiilse Poly saagiserohkeks eraldamiseks *E. coli*-st nii, et valgu aktiivsus säiliks, mis võimaldaks seeläbi edaspidistes uurimustes antud ensüümi põhjalikumat struktuurset ja biokeemilist analüüsi.

Märksõnad: Mip1, Poly, mitokondriaalne DNA polümeraas, *Hansenula polymorpha*.

1. VALDKONNA ÜLEVAADE

1.1 Mitokonder

Mitokondrid on eukarüootsete rakkude ühed suurimad organellid. Samas on neile omane kõrge dünaamilisus – sõltuvalt rakutüübist ja füsioloogilistest tingimustest võivad mitokondrid esineda arvukate, morfoloogiliselt eristatavate väikeste organellide või suure ühendatud võrgustikuna (Kuznetsov jt, 2009). Mitokondrid on ümbritsetud kahe erineva, kuid kontsentrilise membraani poolt, mis piiritlevad kahte olulist mitokondri kompartmenti: membraanidevahelist ruumi ja invaginatsioonirikka sisemembraani poolt ümbritsetud maatriksit. Maatriks on geeljas lahus, milles on erakordselt kõrge kontsentratsioon lahustuvaid ensüüme, samuti leidub seal nende substraate ja kofaktoreid, anorgaanilisi ioone ning mitokondri DNA, RNA ja ribosoomid.

Mitokondri põhiline funktsioon on rakule vajaliku energia tootmine ATP molekulide näol läbi protsessi, mida nimetatakse oksüdatiivseks fosforüülimiseks. Sellega seoses toimub mitokondris näiteks rasvhapete β -oksüdatsioon, tsitraaditsükkel ja elektrontranspordiahela mõjul maatriksist intermembraansesse ruumi pumbatud prootonite liikumine läbi ATP süntaasi tagasi maatriksisse, mille käigus sünteesitaksegi ATP. Lisaks on mitokondritel teisigi tähtsaid funktsioone, nagu kaltsiumivarude säilitamine ja vabastamine, rakusisene signalisatsioon, heemi, teatud fosfolipiidide ja teiste metaboliitide süntees ning osalemine apoptoosis.

Mitokondreid on uuritud juba pikka aega - eesmärgiga mõista nii raku metabolismi üksikasju kui ka mitokondriga seostuvaid haigusi ja vananemist. Kuna mitokonder vastutab rakus terve amplituuda oluliste protsesside toimumise eest, on mitokondriaalsete defektide tagajärjeks tõsised haigused, nagu näiteks diabeet, Leberi pärilik optiline neuropaatia, epilepsia, müopaatia, Alzheimeri ja Parkinsoni tõved. Samuti seostatakse vabade radikaalide ja muude tegurite mõjul tekkivaid mitokondriaalseid DNA mutatsioone vananemisega.

1.2 Mitokondriaalne DNA

Suur osa mitokondriaalsetest valkudest on kodeeritud tuumagenoomi poolt ja imporditud mitokondrisse (Neupert, 1997). Samas omab mitokonder ka oma genoomi, mille suurus eri organismides varieerub olulisel määral, vähem kui 6000-st aluspaarist *Plasmodium falciparum*-is (parasiit, kes põhjustab malaariat) kuni üle 300 000 aluspaarini mõnes maismaataimes (Conway jt, 2000; Ward jt, 1981). Eraldiseisva ja väheseid geene kodeeriva genoomi, mis vajab

alalhoiuks ulatuslikke ensümaatilisi masinavärke, tarvilikkuse võimalike põhjuste kohta on ilmunud mitmeid töid. Kuna mitmed mitokondriaalse DNA (mtDNA) poolt kodeeritavad valgud on mitokondris ühed kõige hüdrofoobsemad, võib nende transport tsütosoolist mitokondrisse olla liiga keeruline (Heijne, 1986; Claros jt, 1995) ja seetõttu on parem need valmis sünteesida mitokondris. Samuti arvatakse, et tuuma ja mitokondri genoomide erinev koodonikasutus võib olla takistanud evolutsiooni vältel mitokondriaalsete geenide ülekannet tuuma (Falkenberg jt, 2007). Veel ühe seletusena tuuakse välja võimalus, et mitokondriaalsete geenide ekspressiooni regulatsioon mitokondri sisetingimuste (näiteks redoksstaatus) poolt võib olla tähtis metabolismi kontrollimisel (Allen, 1993).

Inimese mtDNA on umbkaudu 16 600 aluspaari pikkune suure geenitihedusega introniteta tsirkulaarne molekul (Anderson jt, 1981; Bendich, 1993). Samuti on leitud tõendeid harunenud võrgustiku kujulisest mtDNA-st inimese südamekoos (Pohjoismäki, 2009). Inimese mitmest koopias koosnev mitokondriaalne genoom kodeerib 13 valgulist ETA koostisosa, kahte rRNA-d ja 22 tRNA-d (Anderson jt, 1981), mis on vajalikud mitokondriaalseks valgusünteesiks. Inimese mtDNA asub eraldiseisvates nukleoidides mitokondri sisemaatriksis ning igas nukleoidis on 1-2 mtDNA koopiat (Kukat jt, 2011). Inimese mitokondriaalne nukleoid koosneb peale DNA ka dünaamilisest valkude koosseisust (Hensen jt, 2014), milles esinevad ensüümid osalevad replikatsioonis ja transkriptsioonis, samuti on nende hulgas ka valke, mis teadaolevalt asuvad mitokondri sisemembraanis, viidates võimalusele, et mtDNA on membraaniga seotud (Wang ja Bogenhagen, 2006).

Saccharomyces cerevisiae mtDNA olemasolu identifitseeriti 1960-ndatel (Clark-Walker ja Linnane, 1966) ning hiljem on pagaripärm pikalt olnud põhiliseks uurimisobjektiks mitokondriaalse genoomi üksikasjade väljaselgitamisel. Tema mtDNA pikkuseks on umbes 85 800 aluspaari ja sellele on omane kõrge AT sisaldus, intronid ja madal geenitihedus. Pagaripärmi mtDNA kodeerib seitset valku, mis kuuluvad kas ETA või tsitraaditsükli ensüümide nimistikku, ühte ribosoomivalku, kahte rRNA-d ja 24 tRNA-d (Foury jt, 1998). *S. cerevisiae* suudab erinevalt vabas looduses elavatest mitmerakulistest organismidest (Bratic jt, 2009) mtDNA puudumisel anaeroobselt kasvades ellu jääda (Goldring jt, 1970), kusjuures just selle omaduse abil tõestati esmakordselt tsütoplasmaatilise pärilikkuse olemasolu (Ephrussi, 1949).

Aastakümneid oldi arvamisel, et pärmide mtDNA molekulid on tsirkulaarsed nagu inimeselgi (Lecrenier ja Foury, 2000), kuid nüüdseks on tõsiseltvõetav hulk tõendeid selle vigase teooria ümber lükanud. Maleszka ja kaastöötajad on leidnud, et enamik pagaripärmi mtDNA-st

koosneb konkatemeeridest - erineva suurusega lineaarsetest multimeeridest, harunenud molekulidest ja osaliselt tsirkulaarsetest molekulidest (Maleszka jt, 1991). Ka hiljem kogutud andmed viitavad, et erinevate pärmide (*S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*) mtDNA on üldiselt lineaarne ning tsirkulaarseid vorme leidub väga vähe (Bendich, 1996). Lõplikult on kinnitanud mtDNA lineaarse topoloogia olemasolu Gerholdi ja kolleegide töötulemused *Candida albicans*-i replikatsiooni uurimisel (Gerhold jt, 2010), kusjuures lisaks lineaarsusele nähti, et mtDNA moodustab keeruka harunenud võrgustiku. Harvaesinevate tsirkulaarsete vormide põhjuseks pakutakse olevat oksüdatiivne stress ja sellega kaasaskäivad reaktiivsed hapnikuühendid (ROS), mis võivad põhjustada DNA katkestusi ja deletsioone (Bendich, 2010).

Ka *S. cerevisiae* mtDNA koopiad on organiseerunud nukleoidideks. DNA sisaldus individuaalses nukleoidis sõltub rakkude füsioloogilisest seisundist ja keskkonnatingimustest: statsionaarsesse faasi jõudnud aeroobselt kasvanud kultuuri rakkudel on igas nukleoidis keskmiselt 1,5 genoomiekvivalenti, samas kui anaeroobselt kasvanud rakud sisaldavad hiiglaslikke nukleoide, milles võib olla umbes 20 genoomikoopiat (Miyakawa jt 1987, 2004). Andmed mitmetelt teadlastelt näitavad, et nukleoidide näol on tegemist põhiliste mtDNA segregeerumisühikutega (Okamoto jt, 1998; Zelenaya-Troitskaya jt, 1998; MacAlpine jt, 2000; Zuo jt, 2002; Meeusen ja Nunnari, 2003).

Käesoleva töö uurimisobjektiks olev valk on pärit pärmist *Hansenula polymorpha*, kelle mtDNA on samuti sekveneeritud ja saadud järjestuse põhjal kirjeldatud. *H. polymorpha* DL-1 tüve mitokondriaalse genoomi suuruseks on 41 719 bp ning see sisaldab 43 geeni kolme tsütokroomi oksüdaasi, kolme ATP süntaasi subühiku, seitsme NADH dehüdrogenaasi subühiku, apotsütokroom b, nelja endonukleaasi/maturaasi homoloogi, ühe ribosoomivalgu, kahe rRNA ja 24 tRNA jaoks. Tegemist on AT-rikka introneid ja teisi mittekodeerivaid regioone sisaldava genoomiga, mille geenid jaotuvad kahte suure geenitihedusega piirkonda (Eldarov jt, 2011).

1.2.1 Mitokondriaalse DNA mutatsioonid ja reparatsioon

MtDNA mutatsioonid põhjustavad hingamisahela töös tekkinud vigade tõttu mitmesuguseid haruldasi haigusi, mida on kirjeldatud nii inimestel kui taimedel (Levings ja Pring, 1976; Newton ja Coe, 1986; Holt jt, 1988). Samuti on leitud kõrgenenud mtDNA punktmutatsioonide tase teatud kasvajatest (Bianchi jt, 2001; Penta jt 2001). Patogeenne mutatsioon võib esineda kõikides (homoplasmia) või vaid osades (heteroplasmia) raku mtDNA koopiates (Smeitink jt,

2001), kusjuures heteroplasmilisi mtDNA mutatsioone arvatakse segregeeruvat rakujagunemisel, sest ühtki mehhanismi, mis tagaks mtDNA ühekordse replitseerumise igas rakutsükklis, ei tunta (Clayton, 1982).

Mitokondriaalse vananemise teooria järgi on vananemine otseselt seotud elu jooksul kogunevate somaatiliste mtDNA mutatsioonidega (Jacobs, 2003). Selle kinnituseks on märgatud selget seost hiirte enneaegse vananemise ja mtDNA mutatsioonide akumulatsioonide vahel (Trifunović jt, 2004). Samuti on kõrgemas vanuses näha somaatiliste mtDNA mutatsioonide hulga suurenemist (Mecocci jt, 1993).

MtDNA on tuuma DNA-st palju haavatavam. Viimasega võrreldes on mtDNA pidevalt palju suurema oksüdatiivse stressi all (Beckman ja Ames, 1996), sest 1-5% mitokondriaalselt tarbitud hapnikust muutub hingamisahelas ROS-ideks (Papa, 1996). Peale selle mõjutavad mtDNA-d keemilised kahjustused enam kui tuumagenoomi, sest mitokondri maatriksipoolne negatiivne membraanipotentsiaal põhjustab mitmesuguste bioloogiliselt toksiliste kemikaalide kuhjumist põhjusel, et paljud neist on ehituselt lipofiilsed katioonid (Bandy ja Davison, 1990). Lisaks nendele faktoritele on oluliseks mtDNA mutatsioonisagedust mõjutavaks faktoriks mitokondriaalse DNA polümeraasi *proofreading* aktiivsus ja kahjustustejärgne reparatiivne efektiivsus (loe täpsemalt peatükist 1.4.2). Seetõttu on mitokondriaalse DNA polümeraasi töö täpsust mõjutavate tegurite, nagu näiteks mutatsioonid polümeraasi geenis, uurimine üheks oluliseks verstepostiks mitmesuguste haiguste ja vananemise mõistmisel.

Pikalt arvati, et mitokondris puuduvad reparatsioonisüsteemid, kuid nüüdseks on juba mõnda aega teada, et see pole nii. MtDNA mutatsioonide peamiseks parandusviisiks on aluse väljalõike reparatsioon (BER – *base excision repair*). BER rajavad aitavad mtDNA vigu parandada DNA glükosülaas, AP endonukleaas, DNA polümeraas γ ja mtDNA ligaas (Pinz ja Bogenhagen, 1998). Lisaks BER-ile on mtDNA alalhoiuks oluline mitokondriaalne *mismatch* süsteem. Valepaardumist äratundva valguna on identifitseeritud pärmist valk Msh1 (Chi ja Kolodner, 1994), mis on *E. coli* MutS homoloog. On näidatud, et Msh1 ja mitokondriaalse DNA polümeraasi *proofreading* funktsiooni üheaegne puudumine viib mtDNA kadumiseni, mis viitab sellele, et *mismatch* reparatsioon ja *proofreading* on ülekattuva funktsiooniga (Vanderstraeten jt, 1998).

1.3 Mitokondriaalse DNA replikatsioon

Mitokondrites toimuv mtDNA replikatsioon toimub sõltumatult rakutsüklist ja tuuma DNA replikatsioonist (Bogenhagen ja Clayton, 1977). MtDNA replikatsiooni mehhanism on nii inimeses kui ka pärmis endiselt hüpoteetiline. Kuna võimalikke viise mitokondriaalse genoomi replitseerimiseks on mitu ning ühte kindlat pole õigeks tunnistatud, tasub pilk peale visata nii imetajates kui pärmides väljapakutud replikatsioonimudelitele. Samuti peatun vastavates organismides mtDNA replikatsiooni läbiviivatel valkudel, sest tegemist on veel palju uurimist nõudva teemaga: mtDNA replikatsioonis osalevad valgud on imetajates ja pärmides erinevad ning paljud neist on veel välja selgitamata.

1.3.1 Imetajate mtDNA replikatsioon

Võimalusi, kuidas võib toimuda mtDNA replikatsioon imetajates ja sealhulgas inimeses, on välja pakutud terve hulk. Põhilisi mudeleid on kaks: Θ mudel ja rekombinatsioonist sõltuv replikatsioon. Θ -tüüpi replikatsiooni täpsem mehhanism põhjustab endiselt elavaid arutelusid ning pakutud on välja 2-3 erinevat võimalust, kuidas see võiks toimuda: asünkroonne ahela väljatõrjumise mudel, kahesuunaline ahelate seostatud sünteesi mudel ja selle alternatiivne variant, mis on tuntud nime all RITOLS (*RNA incorporated through-out lagging strand*). Kõikides mudelites viib DNA polümerisatsiooni etappi läbi mitokondriaalne DNA polümeraas (Hance jt, 2005).

Asünkroonses ahela väljatõrjumise mudelis saadakse replikatsiooni initsiatsiooniks vajalik praimer transkriptsiooni abil (Chang ja Clayton, 1985). Esmalt praimereeritakse kerge ahela promootorilt transkribeeritud ja protsessitud RNA praimeril raske ahela ori-järjestusel (Xu ja Clayton, 1995). Inimese raske ahela ori on ehituselt küllaltki sarnane *S. cerevisiae* ori-järjestustega (loe peatükist 1.3.2). Rasket ahelat replitseeritakse RNA praimeril pikendamise teel (Lee ja Clayton 1996; Xu ja Clayton 1996), mis toimub vanemahela väljatõrjumise teel, kusjuures viimane kaetakse selle mudeli järgi üksikahelalise DNA-ga seonduva (mtSSB) valguga. Kui umbes 2/3 uuest raskest ahelast on sünteesitud, paljastab replikatsioonikahvel väljatõrjutud rasket ahelal kerge ahela replikatsiooniks vajaliku ori-järjestuse. Nagu raske ahela süntees, on ka kerge ahela replikatsioon inimeses initsieeritud mitokondriaalse RNA polümeraasi sünteesitud praimeriga (Fuste jt, 2010). Kerge ahela süntees toimub vastupidises suunas väljatõrjutud rasket ahelal (Tapper ja Clayton, 1981). Kui uued mtDNA molekulid on saavutanud täispikkuse, ligeeritakse need suletud rõngasteks.

Esimeste 2D-AGE-i (kahedimensionaalse geelelektroforeesi) abil läbiviidud imetajate mtDNA replikatsiooni uuringute tulemusel nähti, et osa replikatsiooni vaheühenditest on tervenisti kaheaheelised DNA-d. See pani aluse uue, sümmeetrilise mtDNA replikatsiooni mudeli loomisele: pakuti välja, et need on juhtiva ja mahajääva ahela replikatsiooniproduktid (Holt jt, 2000). Kahesuunalise ahelate seostatud sünteesi mudelis on replikatsioon initsieeritud raske ahela ori lähedal asuvast piirkonnast ning toimub läbi kahe replikatsioonikahvli vastassuunalise liikumise mööda DNA rõngast, kuni üks kahvel peatub raske ahela ori-järjestusel, samas kui teine liigub jätkuvalt edasi (Bowmaker jt, 2003). Replikatsiooni initsiatsiooni alast on leitud uus kahesuunaline ori, mis toetab seda mudelit (Yasukawa jt, 2005). RNA praimerid sünteesib ka selles mudeli järgi mitokondriaalne RNA polümeraas.

Kuna uuringutulemused on näidanud, et ahelate seostatud replikatsiooni vaheühendid omavad RNAasH-tundlikke saite (RNA-DNA hübriidregioone), on pakutud välja ka eelmise mudeli alternatiivne mehhanism, mille järgi kaetakse mahajääv ahel esmalt RNA transkripti(de)ga ja alles hiljem konverteeritakse see taas DNA-ks. See mudel on nimeks saanud RITOLS (*RNA incorporated through-out lagging strand*) (Bowmaker jt, 2003; Yang jt, 2002; Holt jt, 2000). Mis on aga RITOLS-i funktsioon, on senini ebaselge. Üks potentsiaalne RITOLS-i eelis asünkroonse ahela väljatõrjumise mudeli ees on üksikahelaliste korduste paljastamise vältimine, mis tekitab näiteks bakteri plasmiidides deletsioone (Bron jt, 1991).

Pakutakse välja, et tõenäoliselt asub tõde RITOLS-i ja asünkroonse ahela väljatõrjumise mudeli keskel – mahajääva ahela teatud osad võivad olla hübriidiseerunud RNA-ga ja teised osad kaetud mtSSB valguga (Wanrooij ja Falkenberg, 2010).

Lisaks on andmeid ka inimese südamerakkudes toimuva rekombinatsioonsõltuva mtDNA replikatsiooni kohta (Pohjoismäki jt, 2009). Analüüsitud mtDNA ei sisaldanud ühtegi Θ mehhanismi alusel replitseeruvat vaheühendit, vaid hoopis keerukat ja hargnenud võrgustikku. Sarnaseid mtDNA vorme nähti ka inimese ja hiire ajurakkudes, kuid samas mitte hiire, jänese ja sea südamerakkudes. Kuna vaheühendid, mille olemasolu võiks eelpool kirjeldatud replikatsioonimudelitel alusel eeldada, puudusid, ning samas leidis rekombinatsiooni abil toimuvale replikatsioonile iseloomulikke molekule, peetakse rekombinatsioonsõltuva mehhanismi olemasolu imetajate mtDNA replikatsioonis võimalikuks.

1.3.2 Pärmide mtDNA replikatsioon

S. cerevisiae mtDNA-s asuvad replikatsiooni alguspunktiden funktsioneerivaid *ori*-järjestusi leidub sõltuvalt analüüsitud tüvest 7-8, neist aga aktiivsed on vaid 3-4. Kahesuunalistes *ori*-järjestustes on äratuntavad mustrid, mille seas leidub mõningate variatsioonidega alati kolm GC-klastrit, mille vahele jäävad AT-lõigud (Baldacci jt, 1984).

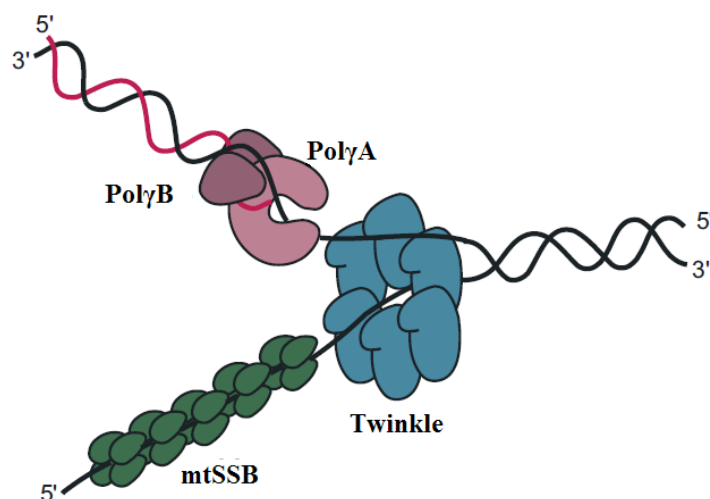
Kuna *S. cerevisiae* replikatsiooniks on tarvilik promootorit sisaldav DNA segment ja pärmi *ori*-järjestuselt on transkriptsioonikatsetes leitud stabiilseid RNA-DNA duplekse, arvatakse, et pagaripärmi replikatsiooni initsiatsioon kasutatakse sarnaselt imetajatele mitokondriaalse RNA polümeraasi poolt sünteesitud RNA praimerit (Baldacci jt, 1984; Greenleaf jt, 1986; Xu ja Clayton, 1995). Mahajääval ahelal toimuv replikatsiooni initsiatsioon on senini ebaselge – juba mõnda aega on seisnud postulaadina, et selleks vajalikku RNA praimerit sünteesib primaas (Baldacci jt, 1984), ning on ka leitud andmeid mitokondrites esineva primaasse aktiivsuse kohta (Desai jt, 1989), kuid selgemat informatsiooni ei leidu.

Üheks pärmide mtDNA replikatsioonimehhanismiks on pakutud veereva ratta mudelit (Maleszka jt, 1991). Maleszka ja kolleegide poolt elektronmikroskoobiga uuritud *Candida glabrata* mtDNA-st esines küll suur osa erineva pikkusega lineaarsete molekulidena, kuid detekteeriti ka tsirkulaarseid molekule, millest osa omasid ka ühe- või kaheaahelalisi sabasid. Taoliste lassokujuliste struktuuride ja 2-7 genoomiekvivalendi pikkuste lineaarsete molekulide nägemine viis teadlased arvamusele, et tegemist võib olla veereva ratta mehhanismiga toimuva replikatsiooni eri etappidest pärit ühenditega. Julgelt laiendati avastuste põhjal tekkinud seisukohta kõikidele pärmiliikidele.

Veereva ratta mudeli võimalikkuse paneb kahtluse alla tõsiasi, et rohkem vastavasisulisid töid avaldatud pole. Küll aga on hiljem avaldatud omajagu andmeid rekombinatsioonsõltuva mtDNA replikatsioonimehhanismi võimalikkuse kohta, mida toetab fakt, et pärmi mitokondriaalsele genoomile on omane väga kõrge rekombinatsioonisagedus (Dujon, 1981). Rekombinatsioonist sõltuva replikatsiooni toetuseks on nähtud *C. albicans*-i mtDNA-d uurides, et see ei sisalda detekteeritavas koguses tsirkulaarseid molekule ning on üles ehitatud keerulise võrgustikuna, mille analüüsimisel võib leida topoloogilisi tõendeid rekombinatsioonsõltuva replikatsiooni initsiatsiooni kohta (Gerhold jt, 2010).

1.3.3 MtDNA replikatsioonis osalevad valgud

Kuigi mtDNA replikatsioonimehhanism pole veel üheselt mõistetav, on teada terve hulk valke, mis on selle toimimiseks väga tähtsad. Inimeses on sellisteks ensüümideks näiteks DNA polümeraas γ (Poly γ), mitokondriaalne üksikahelalist DNA-d siduv valk (mtSSB), mitokondriaalne DNA helikaas (Twinkle), topoisomeraasid (I, III α), DNA ligaas (III) ja RNaseH1 (Hance jt, 2005; Tynynmaa, 2004; Cerritelli jt, 2003, Simsek jt, 2010). Primaasi geeni pole identifitseeritud ja vastavat valku pole homogeensuse ni suudetud puhastada (Wong ja Clayton, 1986). On leitud, et mitmed inimese mtDNA replikatsioonis olevad valgud suudavad üksteise aktiivsusi stimuleerida (Korhonen jt, 2003), kuid protsessiivse, terve genoomi replikatsiooni läbiviiva masinavärgi ehk minimaalse replisoomi, mida illustreerib joonis 1, moodustavad Poly γ , Twinkle ja mtSSB (Korhonen jt, 2004).



Joonis 1. Inimese mitokondriaalse DNA replikatsiooniks vajalik minimaalne replisoom (kohandatult Falkenberg jt, 2007). Twinkle helikaas katalüüsib kaheaheelalise DNA lahtiharutamist 5'-3' suunas, mtSSB valk stabiliseerib paljastunud üksikut DNA ahelat ning Poly viib läbi DNA sünteesi. PolyA, PolyB tähistavad Poly subühikuid (täpsemalt peatükis 1.4.1). Vastsünteesitud DNA ahel on tähistatud punase ning vanemahelad musta värviga.

Pagaripärmis on mtDNA replikatsioonis osalevaid kindla rolliga valke vähem teada. Nende hulgast võiks nimetada näiteks üksikahelalise DNA-ga seonduvat valku mtSSB-d, mis on kodeeritud tuumageeni *RIMI* poolt (Van Dyck jt, 1992), ja mtDNA polümeraasi Poly-t. Samuti on teada replikatsioonis üliolulise rolliga RNA polümeraasi kompleksi kuuluvad valgud RPO41 ja Mtf1. Mitmed teised tüüpilised DNA replikatsioonifaktorid, nagu näiteks helikaasid ja topoisomeraasid, on pärimi mitokondris veel väljaselgitamisel.

Mitmed mitokondriaalse replisoomi komponendid võivad olla fundamentaalselt konserserveerunud, mida kinnitab see, et inimese mitokondriaalne DNA polümeraas

komplementeerib edukalt *S. cerevisiae*-s tema enda vastava valgu puudumise (loe täpsemalt peatükist 1.4.3) (Qian jt, 2014).

Paljud mtDNA replikatsioonis osalevad võtmevalgud on homoloogsed bakteriofaagide valkudega. Pärmi mitokondriaalse RNA polümeraasi homoloogsus on näidatud T7 ja T3 bakteriofaagi RNA polümeraasi aminohappelise järjestusega (Masters jt, 1987). Inimese Twinkle helikaasi järjestus omab tähelepanuväärset homoloogiat T7 helikaas-primaasi C-terminaalse osaga (Spelbrink jt, 2001). Samalaadseid tõendeid, mis kinnitavad, et mitokondriaalne replikatsiooniaparaat võib pärineda T-paaritu rea faagidelt, mitte α -proteobakteritelt, nagu eeldaks endosümbioosi hüpotees, leidub veelgi.

1.4 Mitokondriaalne DNA polümeraas γ

Mitokondriaalne DNA polümeraas on kodeeritud tuumagenoomi poolt (Ropp ja Copeland, 1996) ning transporditud mitokondrisse posttranslatoorselt mitokondriaalse signaaljärjestuse abil (Carrodegua jt, 1999). Erinevatest organismidest pärit mitokondriaalsed DNA polümeraasid koonduvad eraldiseisva perekonnana γ DNA polümeraaside hulka ja seetõttu kutsutakse neid lühidalt polümeraas γ -deks (Poly) (Lecrenier jt, 1997). Poly vastutusrikast rolli mtDNA replikatsioonis on näidatud mitmetes organismides (Genga jt, 1986; Hance jt, 2005), samuti seostatakse teda nii mtDNA rekombinatsiooni- kui reparatsioonimehhanismidega. Kuna on leitud, et Poly on stabiilselt ekspresseeritud ka rakus, kus mtDNA puudub, spekulatsioonid, et tal võib olla ka mõni seni defineerimata lisaroll (Davis jt, 1996).

Pikalt kehtis üldarvamus, et Poly on ainus imetajate ja pärmide mitokondrites tegutsev DNA polümeraas, kuid on tekkinud tõendeid, et see ei pruugi nii olla. *S. cerevisiae* mitokondrist on leitud DNA polümeraas ζ aktiivsust (Kalifa ja Sia, 2007; Zhang jt, 2006) ning väidetakse, et ka see DNA polümeraas võib osaleda mtDNA replikatsioonis ja reparatsioonis. Samuti on avastatud veise ja pagaripärmi mitokondritest β -tüüpi DNA polümeraase (Lucas jt, 1997; Nielsen-Preiss ja Low, 2000). Mitme erinevat tüüpi DNA polümeraasi esinemine imetajate ja pärmide mitokondrites poleks unikaalne, sest näiteks trüpanosoomidel on neid neli (Klingbeil jt, 2002).

Mitokondriaalse DNA polümeraasi katalüütilist subühikut kodeeriv geen klooniti ja sekveneeriti esmakordselt *S. cerevisiae*-st (Foury, 1989). Pagaripärmist pärinev geen *Mip1* kodeerib 1254 aminohappejärgist koosnevat polüpeptiidi, mis on saanud tuntuks ka kui Mip1 (mitokondriaalne DNA polümeraas I). Kirjeldada ja osaliselt eraldada suudeti seda valku juba

1970-ndatel (Wintersberger ja Wintersberger, 1970). Esimene homogeenuseni puhastatud Poly pärines *Drosophila melanogaster*-ist (Wernette ja Kaguni, 1986). Inimese Poly eraldati ja iseloomustati 1990-ndatel (Ropp ja Copeland, 1996) ning kuna selle valguga katalüütilise subühiku bakteriaalne üleekspressioon annab tulemuseks enamasti lahustumatu valguga koos polümeraaselt inaktiivse lahustuva valguga (Longley jt, 1998b), ekspresseeritakse seda tavaliselt eukarüootsetes peremeestes. Inimese rekombinantse PolyA ekspresseerimine bakuloviirusega nakatatud putukarakkudes on levinud meetodika (Korhonen jt, 2004; Lee jt, 2009). Mip1 on õnnestunud eraldada nii *S. cerevisiae* mitokondritest (Biswas jt, 1995) kui ka rekombinantsena *E. coli*-st (Viikov jt, 2010).

1.4.1 DNA polümeraas γ ehitus ja homoloogsus

Erinevate liikide Poly-d klassifitseeruvad homoloogia alusel DNA polümeraaside A (Pol A) perekonda, kuhu kuulub ka näiteks *E. coli* DNA polümeraas I ja bakteriofaag T7 DNA polümeraas (Lecrenier jt, 1997; Braithwaite ja Ito, 1993). Pol A perekonna ensüümide polümeraasid domeeni võrreldakse parema käega, mille matriitsahelat hoidev pilu on ümbritsetud kolme subdomeeniga (Beese jt, 1993). Pilu põhjas oleval „peopesas“ toimub katalüütiline reaktsioon ja seal asuvad selleks vajalikud metalliioonid ja konserveerunud aspartaadi- ja glutamaadijäägid. Ensüümi „sõrmed“ interakteeruvad matriitsi ja sisselülitatavate dNTP-dega ning „pöial“ loob vajalikke kontakte kaheahelalise DNA-ga. Mip1 omab Pol A perekonda iseloomustavaid polümeraasid ja 3'-5'-eksonukleasid domeene (Ito ja Braithwaite, 1990) ning oli esimene eukarüootne DNA polümeraas, mis Pol A perekonda liigitati.

Inimese Poly holoensüümi katalüütiline subühik PolyA on umbes 140 kDa valk (Gray ja Wong, 1992) ning pagaripärmi Mip1 omab sarnast molekulmassi (Viikov jt, 2010). *Xenopus laevis*-e ja inimese rakkudest puhastatud Poly iseloomustamine on näidanud, et katalüütilise subühiku PolyA-ga on seotud ka väiksem valk, Poly lisasubühik PolyB (Gray ja Wong, 1992; Insdorf ja Bogenhagen, 1989). Pagaripärmis selline lisasubühik puudub (Lucas jt, 2004; Viikov jt, 2010), kuid teiste pärmseente kohta andmed puuduvad. Teadustöö on näidanud, et PolyB on DNA seondamist soodustav 55 kDa protsessiivsusfaktor (Lim jt, 1999; Carrodegua jt, 1999). PolyA ja PolyB on kodeeritud vastavalt tuumageenide *POLGA* ja *POLGB* poolt. PolyA ja PolyB moodustavad *D. melanogaster*-is ja *X. laevis*-es heterodimeeri (Wernette ja Kaguni, 1986; Insdorf ja Bogenhagen, 1989), kuid imetajates heterotrimeeri (PolyAB₂) (Yakubovskaya jt, 2006).

Pol A perekonna valkude järjestuste analüüs näitab, et mitokondriaalne DNA polümeraas pärineb kõige tõenäolisemalt T-paaritu rea faagi DNA polümeraasist, mitte *E. coli* DNA polümeraas I-st, nagu võiks jällegi endosümbioosi hüpoteesi põhjal oletada (Filée jt, 2002). Kõrgemate eukarüootide Poly holoensüümi kuuluv protsessiivsufaktor PolyB on homoloogiline aminoatsüül-tRNA süntetaasiga (Carrodeguas jt, 1999) ja ta omab sarnast kolmemõõtmelist kuju *E. coli* tioredoksiiniga, mis on kusjuures T7 faagi DNA polümeraasi protsessiivsufaktoriks (Fan, 1999).

Kõikidele Poly-dele on omane *S. cerevisiae* Mip1-ga analoogne ülesehitus: N-terminaalses osas asub 3'-5'- eksonukleaasne domeen, mis koosneb motiividest ExoI, ExoII ja ExoIII, ning C-terminaalses osas paikneb polümeraasne domeen, kuhu kuuluvad motiivid PolA, PolB ja PolC (Ito ja Braithwaite, 1990). Nimetatud motiivide aminohappelist koosseisu ja selle kõrget konserveerumisastet erinevates organismides illustreerib joonis 2. Näiteks inimese PolyA on Mip1-ga identne ainult 43% ulatuses (Lecrenier jt, 1997), kuid enamik polümeraasi ja eksonukleaasi domeeni kriitilistest motiividest on mõlemas valgus hästi konserveerunud (Ropp ja Copeland, 1996).

		Eksonukleaasne domeen																																							
		ExoI			ExoII			ExoIII																																	
<i>H. s.</i>	196 -	V	F	D	V	E	V	-	201	265	-	L	V	V	G	H	N	V	S	F	D	R	A	H	I	-	278	395	-	Y	C	A	Q	D	V	W	A	T	H	-	404
<i>R. n.</i>	179 -	V	F	D	V	E	V	-	184	248	-	L	V	V	G	H	N	V	S	F	D	R	A	H	I	-	261	377	-	Y	C	A	R	D	V	W	A	T	F	-	386
<i>M. m.</i>	179 -	V	F	D	V	E	V	-	184	248	-	L	V	V	G	H	N	V	S	F	D	R	A	H	I	-	261	377	-	Y	C	A	R	D	V	W	A	T	F	-	386
<i>X. l.</i>	170 -	V	F	D	V	E	V	-	175	239	-	L	V	V	G	H	N	V	S	F	D	R	A	H	I	-	252	369	-	Y	C	A	L	D	V	Q	A	T	H	-	378
<i>D. m.</i>	183 -	V	F	D	V	E	V	-	188	254	-	L	V	V	G	H	N	V	S	Y	D	R	A	R	L	-	267	363	-	Y	C	A	S	D	V	E	A	T	H	-	372
<i>N. c.</i>	187 -	C	F	D	V	E	V	-	192	240	-	I	I	V	G	H	N	I	G	Y	D	R	A	K	I	-	253	373	-	Y	C	A	A	D	V	Q	V	T	H	-	382
<i>S. p.</i>	169 -	V	F	D	V	E	V	-	174	220	-	L	F	V	G	H	N	V	S	F	D	R	Q	R	I	-	233	351	-	Y	C	A	H	D	T	Y	S	T	H	-	360
<i>S. c.</i>	169 -	V	F	D	V	E	V	-	174	221	-	V	I	I	G	H	N	V	A	Y	D	R	A	R	V	-	234	343	-	Y	C	A	T	D	V	T	A	T	S	-	352

		Polümeraasne domeen																																								
		PolA			PolB			PolC																																		
<i>H. s.</i>	886-	L	V	G	A	D	V	D	S	Q	E	L	W	I	A	-899	946-	A	K	I	F	N	Y	G	R	I	Y	G	A	G	-958	1132-	S	I	H	D	E	V	R	Y	L	-1140
<i>R. n.</i>	863-	L	V	G	A	D	V	D	S	Q	E	L	W	I	A	-876	924-	A	K	I	F	N	Y	G	R	I	Y	G	A	G	-936	1109-	S	I	H	D	E	V	R	Y	L	-1117
<i>M. m.</i>	863-	L	V	G	A	D	V	D	S	Q	E	L	W	I	A	-876	923-	A	K	V	F	N	Y	G	R	I	Y	G	A	G	-935	1110-	S	I	H	D	E	V	R	Y	L	-1118
<i>X. l.</i>	856-	L	I	G	A	D	V	D	S	Q	E	L	W	I	A	-869	916-	A	K	V	F	N	Y	G	R	I	Y	G	A	G	-928	1101-	S	I	H	D	E	V	R	Y	L	-1109
<i>D. m.</i>	804-	L	V	G	A	D	V	D	S	Q	E	L	W	I	A	-817	864-	A	K	V	I	N	Y	A	R	I	Y	G	A	G	-876	1036-	S	F	H	D	E	L	R	Y	L	-1044
<i>N. c.</i>	736-	F	V	G	A	D	V	D	S	E	E	L	W	I	A	-849	795-	A	K	V	F	N	Y	G	R	I	Y	G	A	G	-807	938-	T	V	H	D	E	I	R	Y	L	-946
<i>S. p.</i>	677-	F	V	G	A	D	V	D	S	E	E	L	W	I	V	-690	736-	A	K	V	F	N	Y	G	R	L	Y	G	A	G	-748	885-	T	V	H	D	E	V	R	Y	L	-893
<i>S. c.</i>	689-	F	V	G	A	D	V	D	S	E	E	L	W	I	A	-702	748-	A	K	I	F	N	Y	G	R	I	Y	G	A	G	-760	889-	S	I	H	D	E	I	R	F	L	-897

Joonis 2. Erinevate organismide Poly konserveerunud motiivide järjestuste joondus: (a) kolme 3'-5'-eksonukleaasse motiivi aminohappeline järjestus; (b) kolme polümeraasse motiivi aminohappeline järjestus. Hallides kastides näidatud järjestused on A perekonna polümeraasidel tugevalt konserveerunud. Kastide külgedel antud numbrid tähistavad aminohappe asukohta katalüütilise subühiku tervikjärjestuses. Punaselt toodud aminohapped on mittekonserveerunud. *H. s.* – *Homo sapiens*; *R. n.* – *Rattus norvegicus*; *M. m.* – *Mus musculus*; *X. laevis*; *D. m.* – *Drosophila melanogaster*; *N. c.* – *Neurospora crassa*; *S. p.* – *Schizosaccharomyces pombe*; *S. c.* – *Saccharomyces cerevisiae* (kohandatult Graziewicz jt, 2006).

Võrreldes prokariootsete Pol A perekonda kuuluvate polümeraasidega sisaldavad Poly-d eksonukleaasid ja polümeraasid domeeni ühendavat suurt lisadomeeni. Selle *spacer*-i kompleksus ja pikkus on evolutsiooni vältel kasvanud, olles inimesel suurem kui pagaripärmil (Lecrenier jt, 1997). 2009. aastal avaldati töö inimese Poly holoensüümi kristallstruktuurist (Lee jt, 2009). Kolmedimensionaalne struktuur kirjeldati 3,2 Å resolutsioonil ning see aitas näha, et katalüütilise subühiku *spacer*-domeeni N-terminaalses otsas asuv lühike järjestus osaleb „pöidla“ aladomeenis. Samuti nähti, et *spacer*-domeen koosneb sisemisest protsessiivsusdomeenist ja lisasubühikuga interakteeruvast determinandist, mis on mõlemad vajalikud PolyA ja PolyB₂ vaheliseks interaktsiooniks, et saaks moodustuda väga protsessiivne holoensüüm. Katalüütilise subühiku järjestuste joondus näitas, et organismidel, kel pole lisasubühikuga interakteeruvat determinanti, ei ole ka lisasubühikut (Kasiviswanathan ja Copeland, 2011).

Askomütsetide Poly-del, sealhulgas Mip1-l on erinevalt kõrgemate eukariootide Poly-dest unikaalne C-terminaalne pikendus (CTE), mis omab olulist rolli mtDNA alalhoiul. On leitud, et CTE on tarvilik eksonukleasse ja polümeraasse aktiivsuse vahelise tasakaalu säilitamiseks ja DNA sünteesiks kaheaahelisel substraadil (ahela väljatõrjumisega) (Viikov jt, 2012).

1.4.2 DNA polümeraas γ ensümaatilised aktiivsused

Poly-1 on polümeraasne, 3'-5'-eksonukleasne ja 5'-desoksüriboosfosfaadi lüaasne aktiivsus. Lisaks on tõendeid selle kohta, et see valk on võimeline ka pöördtranskribeerima. On selgunud, et tegemist on küllaltki temperatuuritundliku ensüümiga (Biswas jt, 1995), mille termostabiilsust tõstavad mitokondris tõenäoliselt tšaperonid. Selle tõestuseks on näidatud, et bitšaperoonne süsteem, kuhu kuuluvad kuumašokivalgud Hsp70 ja Hsp78, suudab Mip1-e mõõduka kuumašoki tingimustes (42 °C juures) aktiivsena hoida ning termaalselt inaktiveeritud Mip1-e taasaktiveerida (Germaniuk jt, 2002).

Poly ensümaatiliste omaduste täpsemaks iseloomustamiseks on tarvilik suurem valgukogus, kui on võimalik mitokondritest eraldada. Selle saavutamiseks on kasutatud rekombinantset ekspresseritud ensüüme. Inimese homogeensuseni puhastatud rekombinantne PolyA omab nii polümeraasid kui eksonukleasid aktiivsust ning on kineetiliselt kirjeldatud (Graves jt, 1998; Longley jt, 1998b). Poly holoensüüm sisaldab peale katalüütilise subühiku ka lisasubühikut, PolyB-d. Lisasubühiku lisamine PolyA-le tõstab polümeraasi protsessiivsust umbes 8 korda. Lisaks tugevdab see DNA sidumist 3,5 korda, mõjutamata märkimisväärselt DNA

dissotsiatsiooni. Peale selle stimuleerib PolyB dimeer katalüütilise subühiku nukleotiidide sidumise ja nende ahelasse lülitamise võimet (Johnson jt, 2000).

S. cerevisiae Mip1-e on iseloomustatud kui väga kõrge protsessiivsusega polümeraasi (Viikov jt, 2010), mis suudab enne DNA-lt dissotseerumist sünteesida 2000-2500 nukleotiidi pikkuseid lõike. See kinnitab, et pagaripärmi Mip1 suudab funktsioneerida ühesubühikulise polümeraasina, mis ei vaja edukaks DNA sünteesiks protsessiivsust tõstva lisasubühiku abi. Viikov ja kolleegid on samuti leidnud, et väga protsessiivse T7 faagi DNA polümeraasi ja Mip1 protsessiivsused on võrreldavad. Mip1 on ka võimeline kasutama substraadina kaheaahelalist DNA-d, mis tähendab, et ta suudab abistavate lisafaktoriteta ahela väljatõrjumise teel DNA-d sünteesida. Täiendusena tuleb mainida, et Mip1 on võimeline matriitsina kasutama laia amplituud substraate, sealhulgas näiteks polü(dA)-oligo(dT)-d, polü(rA)-oligo(dT)-d, praimereitud M13 faagi ssDNA-d ja vasika tuumuse aktiveeritud DNA-d (Foury 1989; Biswas jt, 1995; Lucas jt, 2004).

Kuigi Poly lülitab mtDNA replikatsiooni käigus selektiivselt ahelasse desoksüribonukleotiide (dNTP), on näidatud, et imetaja mtDNA sisaldab vähemalt 10-30 ribonukleotiidi, mis on umbes 500 bp vahedega jaotatud üle terve mitokondriaalse genoomi (Yang jt, 2002). RITOLS-i replikatsioonimudeli järgi võivad need olla pärit mittetäielikult eemaldatud RNA-st, kuid samas võib tegemist olla ka ebakorrekse DNA sünteesiga Poly poolt. Selle kinnituseks on leitud, et Poly on võimeline DNA sünteesiks kasutama ka ribonukleotiide (Murakami jt, 2003). Kuna mitokondrist on leitud vaid RNaseH1, mis suudab lõigata pikki RNA-DNA hübriide, aga mitte RNaseH2-e, mis on mõeldud üksikute sisselülitunud ribonukleotiidide eemaldamiseks, on ka selge, miks taolised üksikud ribonukleotiidijäägid mtDNA-s stabiilselt püsivad (Cerritelli jt, 2003). Veel ühe anomaaliana eukarüootsete DNA polümeraaside seas on näidatud Poly omadus kasutada DNA sünteesis HIV viiruse infektsiooni tõrjumiseks kasutatavaid didesoksünukleotiide ja muid replikatsiooni blokeerivaid nukleotiidianalooge (Eriksson jt, 1995), mis kinnitab omakorda Poly viraalse päritolu võimalikkust.

Poly 3'-5'-eksonukleaasne aktiivsus vastutab mtDNA replikatsioonis *proofreading*-u eest. Eksonukleaasess domeenis on kolm motiivi, Exo1, Exo2 ja Exo3, mis sisaldavad kõikides vigu parandavates polümeraasides esinevaid aspartaadi- ja glutamaadijääke (Bernad jt, 1989). Exo motiividest pärit katalüütiliste aspartaadijääkide asendamine muudab mtDNA ebastabiilseks ja tõstab võrreldes metsiktüübiga mtDNA punktmutatsioonide tekkesageduse 1500 korda kõrgemaks (Vanderstraeten jt, 1998). On näidatud, et Poly *proofreading* aktiivsus parandab eelkõige tekkinud transversioone, samas kui mitokondriaalne *mismatch* süsteem vabaneb

transitsioonilistest vigadest (Vanderstraeten jt, 1998), mistõttu on mõlemad protsessid vajalikud korrektseks mtDNA replikatsiooniks.

Mip1 abil on leitud tõendeid, et metsiktüüpi Poly täpsus pole tõenäoliselt optimaalne, sest mitmesuguste spetsiifiliste, tihtipeale konserveerunud aminohapete asendustega saab selle *proofreading* funktsiooni parandada. See on võimalik tänu polümeraase ja eksonukleaase aktiivsuse vahelise tasakaalu nihutamisele nukleotiidi väljalõikamise kasuks, mis annab rohkem võimalusi polümerisatsioonil toimunud vigade paranduseks. Selliste modifikatsioonidega on võimalik lausa kompenseerida osalisi *mismatch* süsteemi defekte ja seeläbi vähendada punktmutatsioonide tekkesagedust (Foury ja Szczepanowska, 2011).

Mitokondris on ainukese BER rajas tarviliku desoksüriboosfosfaadi (dRP) lüaasi aktiivsusega valguna identifitseeritud Poly. On näidatud, et inimese Poly suudab eemaldada dRP rühma ja täita reparaatsioonirajas tekitatud ühenukleotiidse lünga (Longley jt, 1998a), mis näitab, et Poly-l on tõenäoliselt oluline roll mtDNA reparaatsioonis (Pinz ja Bogenhagen 1998).

Lisaks kõigele on veel ka näidatud, et Poly on võimeline pöördtranskriptsiooniks. Poly pöördtranskribeerib küll efektiivsemalt kui HIV-1 viiruse pöördtranskriptaas, kuid see aktiivsus on looduslikel DNA järjestustel siiski palju nõrgem kui replikatiivne aktiivsus (Murakami jt, 2003). Siiski klapib pöördtranskriptaase aktiivsuse eksisteerimine hästi RITOLS-i replikatsioonimudeliga, mille järgi sisaldavad replikatsiooni vaheühendid RNA-DNA hübriidseid lõike. Samuti on võimalik spekuloida, et mahajääv ahel, mis on replikatsiooni käigus kaetud RNA transkripti(de)ga, konverteeritaksegi uueks DNA ahelaks üle RNA transkripti(de). Kuna replikatsioonil jäävad Poly teele teatud vahemike tagant ka varasemate replikatsioonivigadena sisselülitunud ribonukleotiidid, võib pöördtranskriptaase aktiivsus mõjuda positiivselt Poly protsessiivsusele, aidates kiiresti ribonukleotiididele komplementaarsed dNTP-d leida.

1.4.3 DNA polümeraas γ -ga seotud haigused ja vananemine

Lisaks baasteaduslikele huvidele on Poly uurimine oluline meditsiinis, sest praeguse seisuga on identifitseeritud üle 150 mutatsiooni *POLGA* geenis, mida seostatakse mitokondriaalsete häiretega. Vead Poly töös võivad põhjustada mtDNA punktmutatsioonide ja deletsioonide teket ning ka mtDNA kadumist. Erineva tasemega vead mtDNA replikatsioonis võivad mitokondri funktsiooni kas häirida või lõplikult rikkuda, tuues kaasa raku surma. On näidatud, et

mutatsioonid Poly-s põhjustavad näiteks progresseeruvat välist oftalmopleegiat (Van Goethem jt, 2001), Alpers-i sündroomi (Davidzon jt, 2005) ja mitmesuguseid muid haigusi.

Suur osa andmeid *POLGA* mutatsioonide mõju kohta on saadud rekombinantse vastavaid mutatsioone sisaldava Poly biokeemilisest iseloomustamisest (näiteks Foury ja Vanderstraeten, 1992; Kasiviswanathan jt, 2010; Qian jt, 2014). Samuti on nende mutatsioonide rolli haiguse tekkes uuritud *S. cerevisiae*-s ja hiirmudelites (näiteks Qian jt, 2014; Trifunović jt, 2004). *S. cerevisiae* on Poly mutatsioonide uurimiseks eriti tänuväärne mudelsüsteem, sest suudab elada ka ilma mtDNA-ta (Goldring jt, 1970).

Hiljuti on ilmunud ka andmed, mis seovad haiguste füsioloogiliste sümptomite progressiooni otseselt mutantse Poly replikatsioonivõimega (Qian jt, 2014). Selle teadasaamiseks loodi „humaniseeritud“ pärm, kelle Mip1 geen oli asendatud inimese PolyA geeniga või siis selle mutantsete, haigustega seostatud variantidega. Muuhulgas sai nii ka selgeks, et inimese Poly suudab efektiivselt *S. cerevisiae*-s komplementeerida Mip1 puudumist, kuigi täielikuks komplementatsiooniks oli tarvilik ka PolyB ekspressioon, mis saavutati *POLGB* geeni sisaldava plasmidi sisestamisega pärmis. Haploidsed mutandid ei säilitanud normaalset mitokondriaalset funktsiooni, kuid heterosügootsetes diploidides sisalduv metsiktüüpi Poly suutis esialgu võimalikud defektid maha suruda. Samas tekkisid heterosügootide mitokondrites kasvu väitel siiski järk-järgult mitmesugused häired. Qian ja kolleegid leidsid, et mutantsete pärmide fenotüübis ilmnevate defektide ulatus ja tekkeaeg on seoses inimhaiguste tõsiduse ja tekkeega. Taolised tulemused annavad lootust, et *S. cerevisiae*-s saab ka mitmesuguste muude meditsiiniliselt oluliste mutatsioonidega ja ehk ka erinevatest organismidest pärit Poly-de funktsioneerimist uurida.

Lisaks erinevatele tõbedele, mida põhjustab mutatsioonidega mitokondriaalne DNA polümeraas, võib Poly haigusi tekitada ka metsiktüüpi valguna, sest on võimeline DNA sünteesiks kasutama nukleosiidianalooge (Eriksson jt, 1995). Taoline mtDNA replikatsiooni inhibeerimine ja sellega seotud haigused ohustavad näiteks retroviirusvastasel ravil olevaid inimesi. Nukleosiidianaloogide mõju mtDNA replikatsioonile saab samuti pärmis uurida (Baruffini ja Lodi, 2010).

Tagatipuks mitmesugustele haigustele on näidatud, et hiirtes põhjustab defektse *proofreading*-funktsiooniga Poly enneaegset vananemist läbi somaatiliste punktmutatsioonide tekke ja mtDNA kadumise. Noored hiired näevad välja normaalsed, kuid defektse Poly tõttu tekivad neil liiga vara mitmesugused vananemisega seotud fenotüübilised tunnused (karvade kaotus,

osteoporoos, viljakuse vähenemine ja selgroo kõverdumine) (Trifunović jt, 2004). Kõrgenenud mutatsioonisagedus oli omane homosügootsetele mutantidele, samas kui heterosügootid suutsid säilitada normaalse fenotüübi, mis viitab sellele, et *proofreading* aktiivsust omava Poly olemasolu rakus komplementeerib defektse *proofreading*-funktsiooniga Poly ebafunktsionaalsuse.

1.5 *Hansenula polymorpha* uurimisobjektina

Hansenula polymorpha (tuntud ka kui *Pichia angusta* ja *Ogataea polymorpha*) on üldlevinud pärmiliik, keda loomulikus elukeskkonnas leidub näiteks riknenud apelsinimahlas, paljude putukaliikide soolestikus ja mullas. *H. polymorpha* kolooniad on värvuselt valged kuni kreemikad ja mittefilamenteeruvad. Ta paljuneb vegetatiivselt pungumise teel (genome.jgi-psf.org/Hanpo1/Hanpo1.home.html, 12.05.14) ning on võimeline ka paarduma (Gleeson ja Sudbery, 1988). Suur osa uuringutest on läbi viidud *H. polymorpha* tüvedega DL-1, CBS4732 ja NCYC495 (Ramezani-Rad jt, 2003). Neil on mitmesuguseid erinevaid omadusi, sealhulgas kromosoomide arv. Sõltuvalt tüvest ja eraldamistingimustest on võimalik eristada kaht kuni seitset kromosoomi (Marri jt, 1993; Gellissen, 2002).

Nii *H. polymorpha* tuuma- kui mitokondriaalne genoom on sekveneeritud ja iseloomustatud. Tüve CBS4732 tuumagenoomi sekveneerimisel nähti, et see sisaldab umbes 6000 ORF-i, on 9,5 Mbp pikkune ning organiseeritud kuueks kromosoomiks, mille suurus jääb vahemikku 0,9-2,2 Mbp (Ramezani-Rad jt, 2003). *H. polymorpha* tööstuslikult huvipakkuva tüve DL-1 tuumagenoomi sekveneerimisel nähti, et genoomi pikkuseks on 9 Mbp, see koosneb seitsmest kromosoomist ning sisaldab umbes 5300 ORF-i, vähe duplikatsioone ja redundantsust (Ravin jt, 2013). *H. polymorpha* mtDNA genoomi kohta loe täpsemalt peatükist 1.2.

H. polymorpha on tuntud uurimisobjekt fundamentaalteaduslikes töödes. Tema abil on selgitatud näiteks peroksüsoomide biogeneesi ja lagundamise (van der Klei ja Veenhuis, 1996, 1997), metanooli metabolismi, nitraadi assimileerimise ja raskemetallide resistentsuse tagamaid (Gellissen, 2002). Samuti on *H. polymorpha* pälvinud elavat huvi ka kui rakuline bioreaktor - teda on kasutatud rekombinantsete valkude sünteesiks näiteks mitmesuguste ravimite tootmisel (de Bruin jt, 2000; Krasovska jt, 2007). *H. polymorpha*-l kui eukarüootsel mikroobil põhinev ekspressioonisüsteem on pagaripärmi järel esimene omataoline, mille abil hakati ravimeid tootma tööstuslikult (Schaefer jt, 2000).

H. polymorpha on hea uurimisobjekt, sest tegemist on termotolerantse mikroorganismiga. Tema optimaalne kasvutemperatuur on 37 °C (Sahm, 1977) ja mõned selle pärmid tüved suudavad kasvada 50 °C-s keskkonnas (Cabeça-Silva ja Madeira-Lopes, 1984), mõned veelgi kõrgema temperatuuri juures (Ishchuk jt, 2009). *H. polymorpha* on võimeline kääritama ksüloosi, tsellobioosi ja glükoosi etanooliks temperatuuril 45-50 °C (Ryabova jt, 2003). See on praeguseni kõrgeim teadaolev temperatuur, mille juures pärmorganism on suutnud kasvada ning eukarüoot etanooli toota (genome.jgi-psf.org/Hanpo1/Hanpo1.home.html, 26.04.14).

Ülalkirjeldatud termotolerantsus on kindlasti väga kasulik omadus tööstuses, kuid lisaks sellele on *H. polymorpha* avanud uued võimalused baasteadustes uurimaks valke, millega töötamine on seni olnud nende termilise ebastabiilsuse tõttu raskendatud. On leitud, et lisaks kõrgele kuumašokivalkude kontsentratsioonile ning mitmesugustele muudele faktoritele (Guerra jt, 2005; Reinders jt, 1999), mis aitavad *H. polymorpha*-l kõrgetel temperatuuridel edukalt kasvada, on selle pärmid valgud väga termostabiilsed. Näiteks rekombinantsed ksülitooli dehüdrogenaasid *H. polymorpha*-st on termostabiilsemad ja omavad optimaalset aktiivsust kõrgemal temperatuuril kui mitmete muude pärmide vastavad ensüümid (Biswas jt, 2010).

H. polymorpha-t on kasutatud *S. cerevisiae* geenide vastavate homologide kloonimiseks ja kirjeldamiseks. *H. polymorpha* DL-1 tüvest kloonitud pagaripärmi *PMRI* geeni (mis kodeerib Ca²⁺-ATPaasi) homologiga tehtud uuringud viitasid selgelt kahe pärmid vahelistele suurtele sarnasustele. Aminohappeliste järjestuste joondamisel leiti, et *H. polymorpha* geeni produkti järjestus on sarnasem (60,3%) *S. cerevisiae* vastava valgu omaga. Samuti sai selgeks, et antud geeni sisestamine pagaripärmi *PMRI* nullmutanti komplementeerib efektiivselt puuduoleva funktsiooni ning *S. cerevisiae* normaalne fenotüüp taastub (Kang jt 1998). Seega on võimalik, et *H. polymorpha*-l ja *S. cerevisiae*-l leidub ka teisi funktsionaalselt väga sarnaseid homologeid valke.

Kuna käesoleva töö eesmärgiks on puhastada ja iseloomustada rekombinantne algselt *H. polymorpha*-st pärit mitokondris tegutsev ensüüm, on kasulik ka teada, et sellest pärmist on mitokondriaalse päritoluga ensüüme juba edukalt puhastatud ja biokeemiliselt iseloomustatud (Bridges jt, 2009). Lisaks *H. polymorpha* valkude kõrgele termostabiilsusele ja sarnasusele pagaripärmi valkudega on selline uurimus kokkuvõttes heaks kinnituseks, et vastava pärmid *Mip1* homolog võib osutada kasulikuks mudelvalgukuks.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Eelnevalt on näidatud, et *S. cerevisiae* mitokondriaalne DNA polümeraas on üsnagi temperatuuritundlik ensüüm, mis kaotab näiteks 45 °C juures poole oma aktiivsusest juba kolme minuti jooksul (Biswas jt, 1995). Seetõttu pole pärmide ühesubühikulised mitokondriaalsed DNA polümeraasid piisava põhjalikkusega biokeemiliselt iseloomustatud.

Käesoleva töö eesmärkideks on viia termotolerantse pärmii *Poly* geen bakteriaalsesse ekspressioonisüsteemi, teha kindlaks antud valguga optimaalsed ekspressioonitingimused ning välja töötada tema puhastusskeem *E. coli*-st. Lisaks sellele antakse isoleeritud valgupreparaadile esmane biokeemiline hinnang.

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1 Töös kasutatud tüved ja kasvutingimused

Mip1 genoomse kloni eraldamiseks kasutati *H. polymorpha* tüve NCYC495 (leu1.1) (Levine ja Cooney, 1973). *Mip1* ekspressioonikonstrukti valmistamiseks kasutati kompetentset *E. coli* tüve DH5 α (F⁻ *dlacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK⁻, mK⁺) *supE44* λ -*thi-1 gyrA96 relA1*) (Hanahan, 1983). Rekombinantset *Poly* valku ekspresseeriti *E. coli* Rosetta(DE3) (edaspidi „Rosetta“) tüves (F⁻ *ompT hsdSB* (rB⁻ mB⁻) *gal dcm lacY1* (DE3) pRARE (*argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL*) (Cam^R)) (EMD Chemicals Inc).

Kõik siintoodud söötmed on valmistatud Sambrook-i ja Russeli laborikäsiraamatu alusel (Sambrook ja Russel, 2001) ja kirjeldatud tabelis 1. *H. polymorpha* tüve kasvatati 37 °C juures rikkas YPD söötmes. *E. coli* DH5 α rakkude kasvatamiseks kasutati Luria-Bertani (LB) söödet. Ekspressioonikonstruktiga transformeeritud *E. coli* DH5 α bakterid selekteeriti söötmesse lisatud kanamütsiini (Kan) abil, mille lõppkontsentratsioon oli 50 μ l/ml. *E. coli* Rosetta rakke kasvatati enne transformatsiooni LB söötmes, mis sisaldas 50 μ l/ml Cam, ning transformatsioonijärgselt LB söötmes, 2xYT söötmes, M9 minimaalsöötmes ja M9 kasaminohapetega minimaalsöötmes, mis sisaldasid seleksiooniks 50 μ l/ml Cam ja 50 μ l/ml Kan. Tardsöötmete tegemiseks lisati YPD või LB söötmele 1,7% agarit. Kõiki *E. coli* kultuure kasvatati 37 °C juures juhul, kui ei ole märgitud teisiti (täpsemalt peatükis 2.3.2.1).

Tabel 1. Bakterite ja pärmide kasvatamiseks kasutatud söötmed.

Kasutatud sööde	Koostis
YPD sööde	1% pärmiekstrakt; 2% peptoon; 2% glükoos
LB sööde	1% trüptoon; 0,5% pärmiekstrakt; 1% NaCl
2xYT sööde	1,6% trüptoon; 1% pärmiekstrakt; 0,5% NaCl
M9 minimaalsööde	1,28% Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O; 0,3% KH ₂ PO ₄ ; 0,05% NaCl; 0,1% NH ₄ Cl; 0,4% glükoos; 100 µM CaCl ₂ ; 1 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O; 0,01% tiamiin
M9 minimaalsööde kasaminohapetega (M9 CA)	1,28% Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O; 0,3% KH ₂ PO ₄ ; 0,05% NaCl; 0,1% NH ₄ Cl; 0,4% glükoos; 100 µM CaCl ₂ ; 1 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O; 0,01% tiamiin; 0,5% kasaminohapped

2.2.2 Töös kasutatud plasmiidne ekspressioonivektor ja oligonukleotiidid

Mip1 ekspressioonikonstrukti valmistamiseks kasutati pET24d vektorit (Novagen), mis omab pET süsteemi toimimiseks vajalikke geneetilisi komponente (kirjeldatud peatükis 2.3.2) kui ka käesolevas töös valgupuhastuseks tarvilikku polühistidiini kodeerivat järjestust (6xHis tag).

Oligonukleotiidsed praimerid, mida kasutati kas sekveneerimises või polümeraasi ahelreaktsioonis (PCR), on toodud tabelis 2. T7F ja T7R on disaininud vanemteadur Aivar Liiv, kõik ülejäänud praimerid töö autor. Praimerid valmistati TAG Copenhagen A/S poolt.

Tabel 2. Sekveneerimiseks ja PCR-ks kasutatud praimerid. PCR praimerite allajoonitud osa tähistab restriksioonilise endonukleaasi lõikesaiti ning paksus kirjas nukleotiidid *Mip1* geeniga homoloogilist järjestust.

Praimeri nimi	Järjestus	Eesmärk töös
T7F	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	Sekveneerimine
HpMip1-554F	5'-AAA GTG ATA CCC TTG ATG G-3'	Sekveneerimine
HpMip1-1153F	5'-CAC ATT TCG CAA TCA TTC-3'	Sekveneerimine
HpMip1-1759F	5'-ATT TTG TCA TCG GAG TAC G-3'	Sekveneerimine
HpMip1-2356F	5'-AGT CAG ACG GTC AAC AAA-3'	Sekveneerimine
HpMip1-2959F	5'-GTT CCC AAA ACT GTG AAA C-3'	Sekveneerimine
T7R	5'-TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG-3'	Sekveneerimine
HpMip1-643R	5'-CTC TGT CGT ACG AAA CAT TA-3'	Sekveneerimine
HpMip1-1246R	5'-CAA TCT TTT CCA CAC TAT CC-3'	Sekveneerimine
HpMip1-1855R	5'-ACT GAT TCA TGA TCC GTT C-3'	Sekveneerimine
HpMip1-2442R	5'-CTC TTG TTC TGC TAT GGT TT-3'	Sekveneerimine

Praimeri nimi	Järjestus	Eesmärk töös
HpMip1-3047R	5'-GTG GCT ATC TGA AGT TTG AT-3'	Sekvencerimine
HansMip1N1	5'-ATA TCG CTA GCA TCC GAT TGC AAC AAA GAA GG-3'	PCR
HansMip1C1	5'-GTA CTC GAG CGC TTG AAT AGT GTG GTG CTT-3'	PCR

2.2.3 Agarosgeelelektroforees (AGE)

Käesolevas uurimuses läbiviidud DNA eraldamis- ja kloonimistööde käigus analüüsiti nukleiinhappeid agarosgeelelektroforeesil (AGE). Sõltuvalt uuritava DNA nukleotiidjärjestuse pikkusest kasutati 0,8% agarosgeeli, mille valmistamiseks lisati TAE puhvrile (40 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8) vastav kogus agarosi ning etiidumbromiidi (EtBr) lõppkontsentratsiooniga 0,5 µg/ml. DNA proovidele lisati enne geelile kandmist TAE laadimisvärvi (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 50% glütserool; 0,25% broomfenoolsinine) ning elektroforees viidi läbi toatemperatuuril, rakendades geelile pinget 2-4 V/cm kohta. Lahutunud DNA visualiseeriti 260 nm juures (Uvipro Gold) ja tulemused jäädvustati Uvi Pro v12.4 tarkvara abil.

2.2.4 Totaalse DNA eraldamine pärmist

H. polymorpha NCYC495 tüve üksik koloonia inokuleeriti 20 ml YPD vedelsöötmesse ning kasvatati 37 °C juures loksutil (180 rpm) üleöö. Seejärel lahjendati kultuur optilise tiheduseni $OD_{600}=0,2$ ning kasvatati 2,5 h, kuni OD_{600} oli tõusnud 0,6-ni. Kultuuri tsentrifuugiti 5 minutit toatemperatuuril (1600 × g), eemaldati supernatant ning põhja sadestatud rakud resuspendeeriti 0,5 ml sorbitoolpuhvril (1 M sorbitool; 10 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)). Lahusele lisati 20 mg zümolaasi (Seikagaku 20T) 1 g raku märgkaalu kohta ning hoiti 1,5 h 37 °C juures. Seejärel tsentrifuugiti lüüsunud rakke 5 minutit (2300 × g) ning supernatandi eemaldamise järel resuspendeeriti sade 0,5 ml lahuses, mis sisaldas 20 mM EDTA-d ja 50 mM Tris-HCl (pH 7,5). Saadud suspensioonile lisati 50 µl 10% SDS lahust ning peale segamist inkubeeriti 65 °C juures. 30 minuti möödudes pipeteeriti lahusesse 200 µl 5 M kaaliumatsetaati (pH 7) (lõppkontsentratsiooniga 1,3 M) ning hoiti 1 h jääl. Seejärel tsentrifuugiti lahust 10 minutit (9300 × g) ning supernatant kanti uude tuubi. Sellele lisati võrdne ruumala isopropanooli ning segati õrnalt, misjärel tsentrifuugiti 10 sekundit (2300 × g). Supernatandi eemaldamise järel pesti sadet 200 µl 80% etanooliga ning tsentrifuugiti 30 sekundit (2300 × g). Supernatant

eemaldati, sademel lasti avatud korgiga tuubis toatemperatuuril kuivada ning resuspendeeriti 0,5 ml T₁₀E_{0,1}-s (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA pH 8). Eraldatud DNA-d analüüsiti spektrofotomeetril (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific) ja AGE meetodil.

2.2.5 Ekspressioonikonstrukti koostamine

2.2.5.1 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-is kasutati matriits-DNA-na *H. polymorpha*-st eraldatud totaalset DNA-d ning praimeritena HansMip1N1 ja HansMip1C1. Reaktsioon viidi läbi 20 µl reaktsioonisegus, mis sisaldas PCR puhvrit (75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Tween 20), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 10 pmol kumbagi praimerit, 2,5 U Pfu/Taq DNA polümeraaside segu (puhastatud TÜ MRI üldise ja mikroobiokeemia õppetooli laboris) ja 10 ng matriits-DNA-d. PCR-i tsükkel koosnes järgmistest etappidest: esmane denaturatsioon (30 sekundit) 95 °C juures, denaturatsioon (3 minutit) 95 °C juures, praimerite seondumine (30 sekundit) 53 °C juures, DNA süntees (4 minutit) 72 °C juures ja lõplik elongatsioon samal temperatuuril (5 minutit). Esimest ja viimast etappi viidi läbi üks kord, kolme keskmist korrati aga 30 korda. Tulemuse analüüsimiseks kasutati AGE meetodit.

2.2.5.2 DNA modifikatsioonid: restriksioon ja ligatsioon

DNA järjestuste töötlemiseks kloonimisel kasutati restriksioonilisi endonukleaase Nhe I ja XhoI vastavalt tootja protokollile (Thermo Scientific).

Mip1 geeni ja pET24d vektori restriктаastöötuse läbinud DNA järjestuste ligeerimiseks kasutati T4 DNA ligaasi (Thermo Scientific). Reaktsioonisegu mahuga 10 µl sisaldas T4 DNA ligaasi puhvrit (lõppkontsentratsiooniga: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 25 µg/ml veise seerumalbumiin (BSA)), 25 ng pET24d-d, 75 ng *Mip1* DNA-d, 0,5 U T4 DNA ligaasi. Reaktsioon kestis 2 h toatemperatuuril. Nii ligeerimis- kui restriктаastöötuseprodukte analüüsiti AGE-l.

2.2.5.3 DNA puhastamine

DNA puhastamiseks pärast töötlust, mis lisasid keskkonda valgulisi ja muid komponente, mis edasist tööd segama võivad hakata, kasutati kahte meetodit: fenoolkloroformmeetodit ja DNA eraldamist agarosgeelist.

PCR produktid ja *E. coli* rakkudest eraldatud plasmiidid (peatükk 2.2.6.2) puhastati fenoolkloroformmeetodil. Selleks viidi lahuse maht 100 µl-ni, lisades T₁₀E_{0,1}-d, NaCl-i (lõppkontsentratsiooniga 100 mM) ja EDTA-d (lõppkontsentratsiooniga 5 mM). Kõik protseduurid viidi läbi toatemperatuuril, kui pole mainitud teisiti. Saadud lahusele lisati 20 µg dekstraani ja 50 µl fenoolkloroformi (pH 7,5). Peale segamist lasti lahusel 5 minutit seista ning tsentrifuugiti 1 minuti jooksul (17 000 × g). Ülemine faas kanti uude tuubi ning lisati naatriumatsetaati (lõppkontsentratsiooniga 300 mM, pH 7) ja 2,5-kordne ruumala 96% etanooli, lahust segati ning DNA-l lasti sadeneda -20 °C juures 20 minutit. Lahust tsentrifuugiti 5 minutit (17 000 × g) ning supernatant eemaldati. Sadet pesti 150 µl 80% etanooliga, tsentrifuugiti samadel tingimustel ja lasti supernatandi eemaldamise järel etanoolist vabanemiseks kuivada. DNA sade lahustati 16 µl T₁₀E_{0,1}-s ning säilitati -20 °C juures.

DNA eraldamist agarosgeelist kasutati restriksioontöötuse läbinud DNA puhastamiseks. Esmalt lahutati uuritav DNA agarosgeelis elektroforeesiga. Õige pikkusega DNA järjestusi sisaldavad alad lõigati geelist välja ning DNA eraldati geelitükist UltraClean[®] 15 DNA puhastamisvarustuse abil vastavalt tootjapoolsele protokollile (Mo Bio Laboratories, Inc.).

2.2.6 *E. coli* transformatsioon ja plasmidi eraldamine bakterirakkudest

2.2.6.1 *E. coli* rakkude transformatsioon

Ekspressiooni- ehk pET24d Mip1 konstrukti paljundamiseks transformeeriti kompetentsed *E. coli* DH5α tüve rakud vastava plasmiidiga. Selleks võeti 50 µl kompetentseid DH5α rakke, lisati 5 µl ligatsioonireaktsiooni segu ning inkubeeriti 15 minutit jääl. Seejärel viidi läbi 2-minutine kuumašokk 37 °C juures ning lisati 10-kordne ruumala LB vedelsöödet, mis sisaldas 20 mM MgCl₂, segati õrnalt ning hoiti 30 minutit temperatuuril 37 °C. Nimetatud aja möödumisel tsentrifuugiti transformatsioonisegu toatemperatuuril 5 minutit (840 × g) ning eemaldati supernatant sellises ulatuses, et tuubi jääks umbes 200 µl vedelikku. Sadenenud rakud resuspendeeriti ning 100 µl rakulahust külvati LB tardsöötmele, mis sisaldas 50 µg/ml Kan-i, ning inkubeeriti 37 °C juures üleöö.

2.2.6.2 Plasmidi eraldamine *E. coli*-st

Transformeeritud *E. coli* DH5α tüve üksik koloonia inokuleeriti 2 ml LB (+50 µg/ml Kan) vedelsöötmesse. Kultuuri inkubeeriti üleöö loksutis (180 rpm) temperatuuril 37 °C. Seejärel tsentrifuugiti rakud toatemperatuuril (1 minut, 220 × g) ning eemaldati supernatant. Rakusade

resuspendeeriti 0,1 ml Sol I-s (50 mM glükoos; 10 mM EDTA pH 8; 25 mM Tris-HCl pH 8; 200 µg/ml RNAasA (Applichem)), segati vorteksil ning asetati jääle. Lahusele lisati 0,2 ml Sol II-e (0,2 M NaOH; 1% SDS) ning segati õrnalt, pöörates tuubi 5 korda üles-alla. Lisaks inkubeeriti lahust veel 5 minutit jääs ning tekkinud viskoossele lahusele lisati jääkülma 0,15 ml Sol III-e (3 M kaaliumatsetaat pH 7; 0,19 M äädikhape). Segu segati tugevalt vorteksil ning hoiti 15 minutit jääs, misjärel tsentrifugiti 5 minutit toatemperatuuril (17 000 × g). Supernatant kanti uude tuubi ning sellele lisati 0,6-kordne ruumala isopropanooli ning hoiti peale segamist 5 minutit toatemperatuuril. Lahust tsentrifugiti taas 5 minutit (17 000 × g) toatemperatuuril ning supernatant eemaldati. Sadenenud DNA-d pesti 200 µl 70% etanooliga, tsentrifugiti 1 minut toatemperatuuril samadel tingimustel kui eelmises etapis ning eemaldati supernatant. Sade lahustati 50 µl T₁₀E_{0,1}-s, millele lisati RNAasA-d (lõppkontsentratsiooniga 20 µg/ml) ning inkubeeriti 30 minutit temperatuuril 55 °C. Seejärel viidi läbi DNA puhastamine fenoolkloroformmeetodil (kirjeldatud peatükis 2.2.5.3). Rakkudest eraldatud plasmidi analüüsiti AGE meetodil ning DNA kontsentratsiooni hinnati spektrofotomeetril. pET24d Mip1 konstrukti säilitati edasisteks töödeks -80 °C juures.

2.2.7 Sekvenerimine

pET24d Mip1 konstrukti sekvenerimiseks kasutatud praimerid on toodud tabelis 2. *Mip1* geeniga homoloogsete praimerite disainimiseks kasutati *H. polymorpha* DL-1 genoomset järjestust, mis oli sekvenerituna antud ajal (08.05.2013) andmebaasist (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) kättesaadav, kuid oli käesoleva töö valmimise hetkel ümberkonstrueerimisel. Sekvenerimisel kasutati 300 ng plasmiidset DNA-d ja 2 pmol praimerit vastavalt Eesti Biokeskuse tuumiklabori sekvenerimise eeskirjale. Saadud nukleotiidseid järjestusi analüüsiti programmis BioEdit 7.1.5.0. Joondamiseks võrreldi *H. polymorpha* NCYC495 *Mip1* geeni järjestust (saadaval aadressil <http://genome.jgi-psf.org/Hanpo1/Hanpo1.home.html>, 24.09.2013) ja pET24d järjestust saadud sekventsiga.

2.2.8 Restriktsioonanalüüs

pET24d Mip1 konstrukti korrektsuse kontrollimiseks viidi läbi ka restriktsioonanalüüs. Konstrukti restrikteeriti vastavalt tootjapoolsele protokollile (Thermo Scientific) restriktaasidega HindIII või SacI või NheI ja XhoI. Analüüsiks lahutati DNA fragmendid agarosgeelil.

2.2.9 Ekspressioonitüve kompetentsete rakkude valmistamine, transformatsioon ja säilitus

E. coli Rosetta tüve transformeerimiseks tuli esmalt rakud kompetentseks muuta. Kompetentsed rakud valmistati vahetult enne transformatsiooni kaltsiumkloriidmeetodil. *E. coli* üksik koloonia külvati 3 ml LB (+ 50 µg/ml Cam) vedelsöötmesse ning kultuuril lasti kasvada optilise tiheduseni $OD_{600}=0,4$. Kultuur jahutati jääl ning tsentrifuugiti 5 minutit 4 °C juures (880 × g), supernatant eemaldati ning rakud resuspendeeriti 1/3-kordses ruumalas (võrreldes rakukultuuriga) 0,1 M CaCl₂-s. Rakususpensiooni hoiti 20 minutit jääl ning tsentrifuugiti nagu eelmine kordki. Supernatandi eemaldamise järel resuspendeeriti rakud 1/20-kordses ruumalas 0,1 M CaCl₂-s.

Kompetentseks muudetud Rosetta rakud transformeeriti ülaltoodud (2.2.6.1) protokollil alusel, lisades transformatsioonisegusse 0,5 µl ekspressiooniplasmidi preparaadi lahust. Transformeeritud rakud külvati LB tardsöötmele, mis sisaldas 50 µg/ml Cam ja 50 µg/ml Kan. Kolooniatel lasti formeeruda 16 h vältel ning edasise töö kiirendamiseks valmistati glütserooli lisamisega (lõppkontsentratsiooniga 15%) transformantide varukultuurid, mida säilitati temperatuuril -80 °C.

2.2.10 Rosetta(DE3) Mip1 tüve kasvatamine ja Mip1 ekspressioon

pET24d Mip1 konstruktiga transformeeritud Rosetta tüve üksik koloonia inokuleeriti 3 ml vedelsöötmesse ja seda kultuuri kasutati suuremate söötmemahtude inokulatsiooniks. Väikeses mahus (20 ml) valguekspressiooniks kasutati erinevaid vedelsöötmeid (LB, 2xYT, M9, M9 CA), suuremahuliseks (1 l) ekspressiooniks 2xYT vedelsöödet. Transformeeritud Rosetta tüve kultuure kasvatati 50 µg/ml Cam ja 50 µg/ml Kan juuresolekul loksutis (180 rpm) 37 °C juures kuni kultuuri OD_{600} oli jõudnud vahemikku 0,3...0,4. Seejärel indutseeriti IPTG (lõppkontsentratsioon 1 mM) lisamisega valguekspressioon, mille kestust, temperatuuri ja söötme keskkonda varieeriti.

2.2.11 Mip1 valgu eraldamine

2.2.11.1 Rakkude kogumine ja lüüs

Nimetatud meetodite kompaksemaks esitlemiseks on väikeses ja suures mahus kasvatatud rakukultuuriga läbiviidavaid protseduure kirjeldatud paralleelselt.

Kõik valgupuhastusega seotud protseduurid viidi läbi 4 °C juures kasutades jääkülmi lahuseid, kui pole märgitud teisiti. Valitud induktsioonaja lõppedes tsentrifugiti 20 ml või 1 l suurusest proovist pärit rakke (4000 × g) vastavalt kas 15 või 20 minutit. Sademelt eemaldati supernatant, rakke pesti vastavalt kas 1 ml või 10 ml ST puhvriga (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8) ja suspensiooni tsentrifugiti vastavalt 3 minutit (2000 × g) või 5 minutit (3000 × g). Supernatandi eemaldamise järel külmutati rakud vedelas lämmastikus ning säilitati -80 °C juures kuni valgu puhastamise järgmise etapini.

Lüüsimiseks resuspendeeriti jääs sulatatud rakusade kas 1 ml või 20 ml lüüsi puhvris (300 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8; 10% glütserool; 1 mM PMSF *ex tempore*), lisati lüüsi süümi (Applichem) lõppkontsentratsioonini 1,5 mg/ml ning inkubeeriti 1 h. Rakud külmutati seejärel vedelas lämmastikus, sulatati jääs ning töödeldi ultraheliga vastavalt kas 3 × 5 sekundit või 5 × 30 sekundit Bandelin Sonopuls HD 2070 60 W sonikaatoriga võimsusel 70%. Iga sonikeerimise vahele jäeti 1-minutiline paus, et vältida lahuse ülesoojenemist. Lüsaati tsentrifugiti vastavalt 10 minutit (19 000 × g) või 20 minutit (27 000 × g) ning supernatanti kasutati koheselt edasiseks valgueralduseks.

2.2.11.2 Ni-NTA afiinsuskromatograafia

2.2.11.2.1 Puhastamine väikeses mahus

20 ml-st indutseeritud rakukultuurist valmistatud rakulüsaadile lisati 50 µl lüüsi puhvrissi viidud 50% Ni-NTA agarooši (Qiagen). 2-tunnise segamise järel tsentrifugiti agarooš (100 × g) 30 sekundi jooksul põhja ning eemaldati supernatant. Kasutades sama tsentrifugimiseeskirja, pesti Ni-NTA agarooši 0,5 ml lüüsi puhvriga, 0,5 ml imidasooli (10 mM ja 20 mM) sisaldava lüüsi puhvriga ning elueeriti kaks korda 50 µl elueerimispuhvriga (300 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% glütserool; 500 mM imidasool; 1 mM PMSF *ex tempore*). Fraktsioone analüüsiti SDS-PAGE meetodi abil.

2.2.11.2.2 Puhastamine suures mahus

1 l-st indutseeritud kultuurist valmistatud rakulüsaadile lisati 2 ml 50% Ni-NTA agarooši suspensiooni lüüsi puhvris ja segati 2 h. Agarooši tsentrifugiti (150 × g) 1 minut ning supernatant eemaldati. Seejärel pesti agarooši analoogiliselt üks kord 20 mahu lüüsi puhvriga ning kanti kolonni (Econo-Pac[®], Bio-Rad Laboratories). Kolonnis pesti agarooši 10 kolonnimahu lüüsi puhvriga, 3 mahu 10 mM imidasooli sisaldava lüüsi puhvriga, 2 mahu 20 mM

imidasooli sisaldava lüüsipuhvriga, 3 mahu pesupuhvriga (1 M NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8; 10% glütserool; 20 mM imidasool; 1 mM PMSF *ex tempore*) ning taaskord 2 mahu 20 mM imidasooli sisaldava lüüsipuhvriga. Järgnevalt elueeriti kolonni $8 \times 250 \mu\text{l}$ elueerimispuhvriga. Fraktsioone analüüsiti SDS-PAGE ja Bradfordi meetoditega. Lisaks viidi läbi katseseriad, mille puhul oli lüüsi-, pesu- ja elueerimispuhvrissse lisatud 0,1% erinevaid detergente: NP-40, Tween 20 ja Triton X-100.

2.2.11.3 Väljasoolamine

Rakulüsaadile lisati magnetsegajal 1 h vältel järk-järgult 70% küllastumiskontsentratsioonist ammooniumsulfaati ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Seejärel tseentrifuugiti lahust 30 minutit ($27\,000 \times g$), supernatant eemaldati ning valguline sade viidi 24 ml lüüsipuhvriga tagasi lahusesse. Väljasoolamise läbinud valgulahust kasutati järgnevalt Ni-NTA kolonnkromatograafias.

2.2.11.4 S-Sepharose katioonvahetuskromatograafia

Ni-NTA kolonnilt saadud Mip1-e sisaldavad fraktsioonid lahjendati S-puhvriga (25 mM Hepes pH 8; 10% glütserool; 0,5 mM EDTA; 1 mM PMSF *ex tempore*; 1 mM DTT *ex tempore*), mis sisaldas 50 mM NaCl-i (S_{50} -puhver). Lahjendus tehti nii, et lahuse juhtivus oleks võrdne S-puhvriga, mis sisaldab 100 mM NaCl-i (S_{100} -puhver). Lahust tseentrifuugiti 10 minutit ($3100 \times g$) ja supernatant kanti S_{100} -puhvriga tasakaalustatud 1 ml S-Sepharose kolonnile, mida elueeriti seejärel erineva soolasisaldusega S-puhvritega (tähistatud analoogselt S_{50} - ja S_{100} -puhvriga): 20 kolonnimahu S_{100} -puhvriga, 5 mahu S_{200} -puhvriga, 5 mahu S_{300} -puhvriga, 1,5 mahu S_{500} -puhvriga ja 1 mahu S_{1000} -puhvriga. 0,25-1 ml mahuga fraktsioone analüüsiti Bradfordi ja SDS-PAGE meetoditega.

2.2.11.5 Geelfiltratsioon

Ni-NTA kolonnilt pärit Mip1 fraktsioon (1 ml) filtreeriti läbi $0,45 \mu\text{m}$ (läbimõõt) pooridega nailonfiltri (EMD Millipore) ning kanti Superdex 200 puhvpg HiLoadTM 16/600 kolonni (GE Healthcare), kasutades ÄKTAprime plus süsteemi (GE Healthcare). Kolonni tasakaalustati ja voolutati lüüsipuhvriga (300 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8; 10% glütserool; 1 mM PMSF *ex tempore*). Koguti 0,3-5 ml fraktsioonid ning kõrgeima valgukontsentratsiooniga fraktsioone analüüsiti SDS-PAGE-l.

2.2.12 Sedimentatsioon glütserooligradiendis

Puhastatud Mip1 proovid (umbes 100 µg valku) kanti 5 ml lineaarsele 15-30% glütserooligradiendile, mis oli valmistatud nelja erinevasse puhvrissse (300 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 1 mM PMSF *ex tempore*, 1) 0% detergenti või 2) 0,1% NP-40 või 3) 0,1% Tween 20 või 4) 0,1% Triton X-100). Samadele gradientidele kanti markerina ka 100 µg BSA-d (Sigma). Proove tsentrifuugiti (194 000 × g) 20 h temperatuuril 4 °C. Gradiendid fraktsioneeriti 200 µl suurusteks proovideks ning analüüsiti SDS-PAGE meetodil ning valikuliselt DNA polümeraasse aktiivsuse suhtes vasika tuumuse aktiveeritud DNA-l (täpsemalt peatükis 2.2.13). Lisafraktsioonina koguti ka tsentrifuugitopside põhja kogunenud võimalik sade, loputades tsentrifuugimisanumat 45 µl 0,1% SDS puhvriga.

2.2.13 DNA polümeraasse aktiivsuse määramine vasika tuumuse aktiveeritud DNA-l

Mip1 DNA polümeraasset aktiivsust hinnati [α -³²P]-dCTP (Hartmann Analytic) sisselülitumise alusel vasika tuumuse aktiveeritud DNA-sse (Sigma). Katsed viidi läbi kolmes seerias. Mip1 aktiivsust mõõdeti 10 µl mahuga reaktsioonisegus, mille puhvrile (20 mM Tris-HCl pH 8; 2 mM DTT; 40 mM KCl; 0,5 mg/ml BSA) olid lisatud reaktsioonikomponendid (50 mM MgCl₂; 50 µM dATP; 50 µM dGTP; 50 µM dTTP; 5 µM dCTP; 0,5 µCi [α -³²P]-dCTP; 50 µg/ml aktiveeritud tuumuse DNA; puhastatud Mip1). Reaktsioonid viidi läbi 37 °C juures kestusega 0-10 minutit ning termineeriti 10 µl 60 mM EDTA lisamisega. 5 µl termineerunud reaktsioonisegust pipeteeriti DE81 (Whatman[®]) filterpaberile, mida pesti kolm korda suure mahu 0,25 M naatriumfosfaatpuhvriga (0,25 M Na₂HPO₄; 0,25 M NaH₂PO₄; pH 6,4). Inkorporeerunud radioaktiivsust mõõdeti stsintsillatsiooniloenduriga (TriCarb 2810TR, Perkin Elmer). Reaktsiooniproducti koguse sõltuvus ajast esitati graafikuna, kust esialgse lineaarse osa tõusu abil arvutati eriaktiivsus.

2.2.14 Valguanalüüsi meetodid

2.2.14.1 SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforees (SDS-PAGE)

Käesolevas töös kasutati 10 × 10 cm 10% akrüülamiid/bisakrüülamiidgeeli (Sambrook ja Russel, 2001). Enne geelile kandmist denatureeriti valguproovid SDS proovipuhvriss (lõppkontsentratsioonid: 25 mM Tris-HCl pH 6,8; 5% glütserool; 2% SDS; 0,1% broomfenoolsinine; 50 mM DTT) 95 °C juures 5 minuti vältel. Elektroforees viidi läbi

toatemperatuuril pingel 100-130 V kestusega 2,5-3 h ning foresipuhvrina kasutati SDS puhvrit (0,4 M glütsiin; 50 mM Tris; 0,1% SDS).

Geelid kuumutati Coomassie briljantsinist sisaldavas värvilahuses (25% etanool; 7% äädikhape; 2,5 mg/ml Coomassie Brilliant Blue R-250) ning pesti 2-4 h toatemperatuuril värvieemaldis (25% etanool; 7% äädikhape). Töötuse läbinud geelid skanniti arvutisse Umax Powerlook III skanneriga ning pilte töödeldi programmiga Adobe Photoshop CS6.

2.2.14.2 Valgukontsentratsiooni määramine

Fraktsioonide valgusisalduse analüüsimiseks kasutati Bradfordi meetodit (Bradford, 1976). Mikrotiiterplaadi süvenditesse lisatud 100 µl Bradfordi lahusele (0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250; 5% etanool; 4,25% fosforhape) lisati erinev hulk uuritavat valguproovi. Valgukontsentratsioon leiti OD_{620} mõõtmise abil mikrotiiterplaadilugejas, kasutades standardina BSA-d (arvutamiseks kasutatud graafik ja sirge võrrand toodud lisa 6).

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 *Mip1* ekspressioonikonstrukti valmistamine

H. polymorpha tüve NCYC495 totaalne DNA eraldati 20 ml suurusest logaritmilise faasi kultuurist, mida kasvatati YPD vedelsöötmes antud pärmiliigile optimaalsel temperatuuril (37 °C) (Sahm, 1977). Peatükis 2.2.4 kirjeldatud protokollil alusel saadi DNA preparaat kontsentratsiooniga 0,01 µg/µl, mida kasutati *Mip1* geeni amplifikatsiooniks.

Mip1 geeni amplifitseerimiseks disainiti praimerid HansMip1N1 ja HansMip1C1. Mõlemad praimerid sisaldasid *Mip1* geeniga homoloogseid järjestusi ning 5' otsas 3-5 juhuslikku nukleotiidi ning restriктаaside äratundmisjärjestusi. Restriктаaside äratundmisjärjestuste valimisel arvestati sellega, et *Mip1* geeni sisestamisel pET24d vektorisse jääks vektori koosseisus olev T7 promootor geenist ülesvoolu. *Mip1* geeniga homoloogse praimeriosa disainimisel jäeti praimeritesse lisamata start- ja stoppkoodon, sest pET24d vektor sisaldab vastavaid prokarüootseid koodoneid. HansMip1N1 praimeris on *NheI* restriктаasi ja HansMip1C1 praimeris *XhoI* restriктаasi äratundmisjärjestus ning mõlema praimeris 5'-otsas on 3-5 lisanukleotiidi, mis hõlbustavad restriктаaside seondumist ja seeläbi restriktiooni.

30 tsükli pikkuse *Mip1* geeni amplifikatsioon, mida on täpsemalt kirjeldatud peatükis 2.2.5.1, tulemusel saadud PCR produktid lahutati agarosgeelil ning puhastati fenoolkloroformmeetodil.

pET24d-l baseeruva ekspressioonikonstrukti valmistamiseks töödeldi pET24d plasmidi ja *Mip1* geeni amplifikatsiooniproducti *NheI* ja *XhoI* endonukleaasidega ning saadud produktid puhastati AGE-l lahutamise järel geelist, nagu on viidatud peatükis 2.2.5.3. Lineariseeritud pET24d plasmid ja *Mip1* fragment ligeeriti peatükis 2.2.5.2 toodud protokollil alusel ning 5 µl ligatsioonisegu transformeeriti kompetentsetesse DH5α rakkudesse (2.2.6.1). Ekspressioonikonstrukti paljundamiseks ja väljapuhastamiseks kasutati 2 ml mahuga üleöö kasvatatud kultuuri (kirjeldatud peatükis 2.2.6.2).

pET24d *Mip1* konstrukti (edaspidi *Mip1* konstrukti) korrektsust kontrolliti restriktioonianalüüsiga ja sekveneerimisega. Nii *HindIII*, *SacI* kui *XhoI* ja *NheI* töötamise järgselt oli AGE analüüsil näha korrektse pikkusega oodatavalt restrikteerunud produktid. Ekspressioonikonstrukti järjestuse kontrollimiseks kasutati *Mip1* geeni järjestust, mis pärines *H. polymorpha* NCYC495 tüve andmebaasist <http://genome.jgi-psf.org/Hanpo1/Hanpo1.home.html> (24.09.2013). Järjestuse analüüsimisel programmis

BioEdit nähti, et Mip1 konstrukt sisaldab õiges raamis *Mip1* geeni ja kloonitud PCR produkt ei sisalda asendusi võrreldes andmebaasis saadava vastava tüve *Mip1* geeniga.

Kokkuvõttes valmistati ekspressioonikonstrukt, kus *H. polymorpha Mip1* geen on T7 bakteriofaagi promootori ja terminaatori ning *lac o* operaatori kontrolli all ning geenist ülesvoolu asub prokarüootne start-koodon ja allavoolu polühistiidiini kodeeriv järjestus ning prokarüootne stoppkoodon. Valminud Mip1 konstrukti *Mip1* geeni sisaldavat lõiku on illustratiivselt kujutatud joonisel 3.

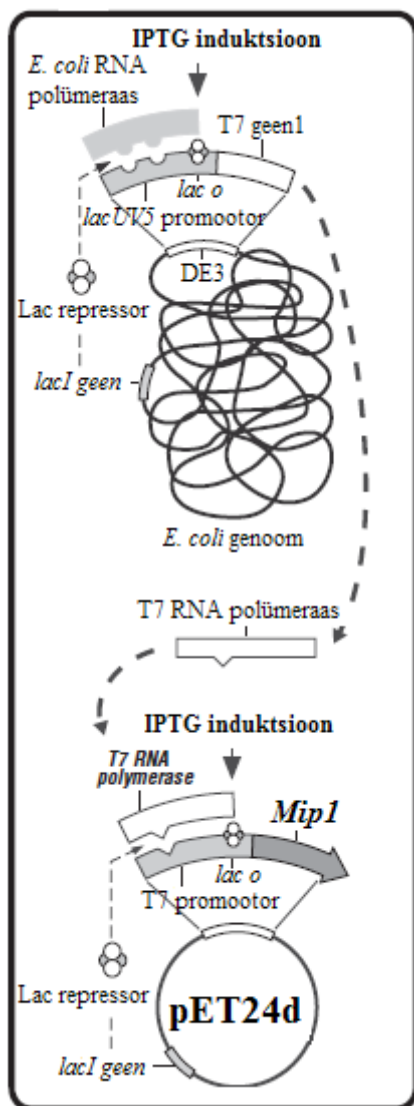


Joonis 3. Fragment moodustatud ekspressioonikonstrukstist. *Mip1* geeni sisestamiseks pET24d vektorisse kasutati NheI ja XhoI restriksioonisaite. T7 promootor ja terminaator aitavad reguleerida valgusünteesi, olles spetsiifiliselt kasutatavad ekspressioonitüve poolt kodeeritava T7 RNA polümeraasi poolt. *lac o* operaatorjärjestusele seonduv Lac repressor pärsib kuni induktsioonini Mip1 ekspressiooni. Prokarüootne start- ja stoppkoodon aitavad läbi viia eukarüootse valgu korrektset translatsiooni. Polühistiidiini kodeeriva järjestuse abil saab Mip1 endale C-terminaalse täienduse, mis aitab antud valku puhastada. RBS – ribosoomi seondumisala kodeeriv järjestus.

2.3.2 Mip1 ekspressioon

E. coli Rosetta(DE3) tüve rakud muudeti kompetentseks kaltsiumkloriidmeetodil ning transformeeriti pET24d Mip1 ekspressioonikonstruktiga (kirjeldatud peatükis 2.2.9). Kuna Rosetta rakud omavad Cam^R geeni, sai enne kompetentide valmistamist neid selekteerida söötmesse lisatud Cam järgi, ning pärast transformatsiooni söötmes sisalduva Kan ja Cam järgi (mõlemaid 50 µg/ml) tänu pET24d plasmidi Kan^R geenile. Valmistatud transformante läks edasistes valgupuhastuseksperimentides vaja korduvalt ja seetõttu valmistati aja säästmiseks Rosetta(DE3) pET24d Mip1 (edaspidi Rosetta Mip1) rakkude vedelkultuurist 15% glütseroolisisaldusega varulahu -80 °C juures säilitamiseks. Edaspidised külvamised Cam ja Kan sisaldavale söötmele tõestasid, et ekspresseerimisvõimelisi Rosetta rakke on võimalik taolisel meetodil säilitada.

Mip1 konstrukti sisestamisel Rosetta rakkudesse viidi kokku kõik vajalikud geneetilised elemendid pET süsteemi toimimiseks. pET süsteem on mõeldud rekombinantsete valkude kloonimiseks ja ekspressiooniks *E. coli*-s (Novagen, 2003). Sihtmärkgeen sisestatakse pET plasmidi T7 bakteriofaagi transkriptsiooni reguleerivate elementide (sealhulgas T7



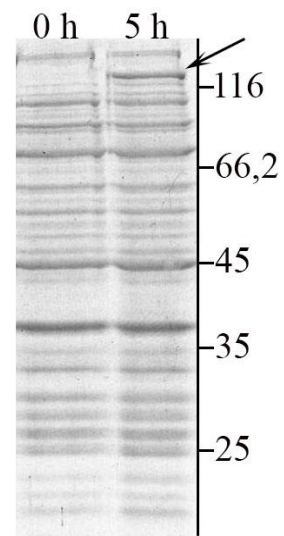
Joonis 4. pET süsteem. Joonisel toodud *trans* ja *cis* elementide rollid on kirjeldatud tekstis (kohandatult Novagen, 2003).

tRNA-de abil suudab antud tüvi edukalt aminohappeid valguahelasse lülitada ka AGA, AGG, AUA, GGA, CUA ja CCC koodonite puhul, mida *E. coli*-is leidub tavaliselt vähe. Lisaks sellele on ekspresseerib see *E. coli* tüvi vähem proteaase, mis aitab kaasa rekombinantsete valkude säilimisele.

Ekspressiooni õnnestumist analüüsiti induksiooni alguses ja lõpus, hinnates rakkudes sisalduvat Mip1 taset. Analüüsimaterjalina kasutati rakulüsaati ning ekspressiooni kiirtest viidi läbi kõikide valgupuhastuskatsete eel. Kõrvalasuval joonisel (5) on analoogiliseks kontrolliks kasutatud SDS-polüakrüülamiidgeeli pilt, millelt on selgelt näha Mip1 puudumine 0-tunnise ja esinemine 5-tunnise ajapunkti proovis. Järelikult õnnestus

promootori) kontrolli alla. Peremeestüvi, kuhu vastav plasmiid transformeeritakse, omab aga T7 RNA polümeraasi geeni, mis on *lacUV5* promootori kontrolli all (konstrukt on tuntud nime all DE3 ning on bakteriofaag λ lüsogeen). T7 ja *lacUV5* promootoritelt toimuvat ekspressiooni represserib *lac o* operaatoralale seonduv Lac repressor, mida kodeerib nii pET plasmidis kui ka ekspressioonitüves asuv *lacI* geen. Antud geeni ekspresseeritakse konstitutiivselt ning Lac repressori mõju on võimalik tühistada ja promootoritelt geeniekspressioon indutseerida isopropüül-1-tio- β -D-galaktopüranosiidi (IPTG) lisamisel söötmesse. Kuna T7 RNA polümeraas omab kõrget ensümaatilist aktiivsust ja on väga selektiivne T7 promootori suhtes, suunatakse indutseerimise järel märkimisväärne osa raku ressurssidest sihtmärkgeeni ekspressiooni tarbeks. Käesolevas töös Rosetta(DE3) rakkude ja Mip1 konstrukti ühendamisel saadud pET süsteemi illustreerib joonis 4.

Kuna Mip1 on eukarüootne valk, soodustavad selle translatsiooni Rosetta vastavas tüves kodeeritavad lisa-tRNA-d, millela eukarüootne valgusüntees on pärsitud. Taoliste

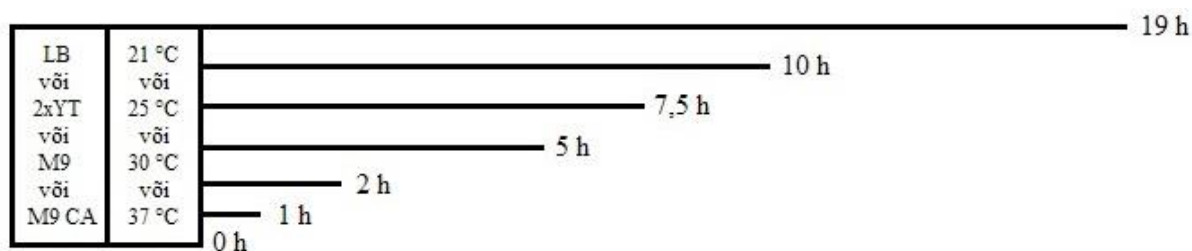


Joonis 5. Ekspressiooni kiirtesti näide 5-tunnise ekspressiooni (2xYT söötmes temperatuuril 21 °C) järgselt. Geelil analüüsiti 10 μ l igast proovist. Joonise küljel on toodud valgumarker (kDa) ja noolega on näidatud Mip1 asukoht geelil.

rekombinantse *H. polymorpha* Mip1 valgu ekspresseerimine pET süsteemis ning indutseeritud rakukultuurid on kasutatavad Mip1 väljapuhastamiseks.

2.3.2.1 *H. polymorpha* Mip1 ekspressioonitingimuste optimeerimine

Mip1 ekspressioonitingimuste optimeerimiseks võrreldi valguekspressiooni taset erinevates söötmetes, erinevatel temperatuuridel ning ajapunktidel (katseskeem toodud joonisel 6).



Joonis 6. *H. polymorpha* Mip1 ekspressioonitingimuste optimeerimise katseskeem, kus on kujutatud ekspressiooniks kasutatud induktsiooniaegu, erinevaid temperatuure ja söötmeid (M9 CA – M9 minimaalsööde kasaminohapetega).

Optimeerimiseks kasutati 20 ml Mip1 konstruktiga transformeeritud *E. coli* Rosetta tüve kultuure (20 ml), mida kasvatati enne induktsiooni bakterikasvu soodustamiseks 37 °C juures. Mip1 ekspressioon indutseeriti kasvu logaritmilises faasis ($OD_{600}=0,3\dots0,4$) IPTG lisamisega (2.2.10) ning kõikides katsetes viidi Mip1 ekspressioon läbi LB söötmes 21 °C juures 5 h vältel, kui just vastava ekspressioonitingimuse (söötmetüübi, temperatuuri või kestuse) varieerimine antud katseseeria eesmärk polnud.

Valguekspressiooni selgemaks hindamiseks puhastati rakulüsaatidest Mip1 Ni-NTA afiinsuskromatograafilisel meetodil (2.2.11.2.1), mida võimaldas Mip1 C-terminaalsesse otsa lisatud polühistidiinjärjestus. Järjestikused His jäägid seonduvad immobiliseeritud nikliioonidega (Hochuli jt, 1987), kuid keskkonda lisatav 500 mM imidasool konkureerib $6 \times$ His järjestuse nikliioonide küljest lahti. Ni-NTA afiinsuskromatograafia abil saadud eelfraktsioone, eluaati ja Ni-NTA agarosile (ka pärast elueerimist) seondunud Mip1 valgu hulka analüüsiti SDS geelelektroforeesil.

Söötme mõju Mip1 ekspressioonile. Mip1 ekspressioonitaseme uurimisel erinevates söötmetes kasutati LB, 2xYT, M9 minimaalsöödet ning M9 minimaalsöödet 0,5% kasaminohapetega. SDS-PAGE geelidelt (lisa 1) nähti, et Mip1 ekspressioon ei erine valitud söötmetes väga suures amplituudis. Kuigi LB ja 2xYT sööde on *E. coli* paljunemiseks küllaltki soodne keskkond, ei mõju käesolevate andmete alusel kasutatud vaesemad söötmed rekombinantse Poly ekspressioonile kardinaalse erinevusega. Kuna 2xYT söötmes ekspresseeritud Mip1-e oli eluaadi ja Ni-NTA agarosile seondunud valkude lahutamisel

saadud geelide paralleelse analüüsi alusel natuke rohkem, kui teistes söötmetes ekspresseeritud Mip1-e, leiti, et optimaalseim sööde nii valguekspressiooniks kui bakterikultuuri kasvamiseks on 2xYT.

Temperatuuri mõju Mip1 ekspressioonile. Erinevatel temperatuuridel esineva ekspressioonitaseme uurimiseks indutseeriti Mip1 valku 21 °C, 25 °C, 30 °C ja 37 °C juures. Esmasel katsel selgus, et eluaadis esineb enim Mip1-e 21 °C ja 37 °C juures kasvatatud rakkudel, Ni-NTA agarosile seondunud valgu hulk on aga ülekaalukalt suurim 37 °C juures kasvatatud rakkudel (vaata lisa 2). Ekspressioonitaseme ülekontrollimiseks 21 °C ja 37 °C juures viidi läbi lisakatsed, millest selgus, et antud temperatuuride puhul on Mip1 ekspressioonitase tõepoolest võrreldav, ka Ni-NTA agarosile seondunud Mip1 järgi (lisa 3). Samuti nähti, et bakterirakkude kasv pidurdub indutseerimisjärgselt oluliselt: sõltuvalt kasvutemperatuurist oli poolestusaeg umbes 2,5-5 h, kusjuures 37 °C temperatuur oli paljunemiseks umbes kaks korda soodsam kui 21 °C temperatuur. Näiteks kultuurid, mille OD₆₀₀ oli indutseerimishetkel 0,3, omasid 5 h möödumisel optilist tihedust 0,6 (21 °C juures ekspresseeruv Mip1) ja 1,23 (37 °C juures ekspresseeruv Mip1).

Kuna üht kindlat optimaalset temperatuuri eristada polnud võimalik, otsustati edasistes katsetes proovida nii 21 °C kui ka 37 °C ekspressioonitemperatuure, sest kuigi *E. coli* rakud paljunevad 37 °C juures paremini, näitavad varasemad andmed, et sel temperatuuril kipuvad mitmesugused rekombinantsed valgud *E. coli*-s inkluusioonkehadesse kogunema (näiteks Vera jt, 2007; Varejão jt, 2010). Lisaks võib huvipakkuv olla võimalus, et 37 °C kui *H. polymorpha* optimaalne kasvutemperatuur (Sahm, 1977) võib Mip1 stabiilsusele ja aktiivsusele positiivselt mõjuda. Bakterirakkude kasvu pidurdumine induktsioonijärgselt viitab Mip1 ekspressiooni toksilisele mõjule *E. coli* suhtes. Samas oli 37 °C juures kasvanud rakkude hulk ligikaudu kaks korda suurem kui 21 °C juures kasvanud bakteritel, aga sellest hoolimata omavad nad küllaltki sarnast Mip1 valgu kogust. See kinnitab, et 21 °C ekspressiooni edasine testimine 37 °C ekspressioonitemperatuuri kõrval on perspektiivikas, võimaldades väiksemast rakumassist saada rohkem Mip1 valku.

Induktsioonaja mõju Mip1 ekspressioonile. Lisaks söötmetele ja temperatuuridele varieeriti ka ekspressiooni kestust. Indutseerimisjärgselt lasti ekspressioonil esmalt kesta 0 h, 1 h, 2 h, 5 h ja 19 h. SDS-PAGE järel selgus, et Mip1 tase oli kõrgeim 5 h ja 19 h kestusega ekspressioonikatsetest pärit proovides (vaata lisa 4), kuid optimaalseima kestuse täpsustamiseks viidi läbi lisakatsed 2xYT söötmes, mille puhul lasti ekspressioonil kesta 0 h, 5 h, 7,5 h ja 10 h. Nähti, et 10 h möödudes hakkab valgu tase langema, samas kui 5 h ja 7,5 h kestusega indutseerimisjärgse inkubatsiooniga on Mip1 tase ligikaudu sama (lisa 5). Aja

säästmiseks otsustati 5 h kui optimaalseima induktsioonaja kasuks, mis on pikem kui *S. cerevisiae* rekombinantse Mip1 ekspressiooni kestus (Viikov jt, 2010).

2.3.3 Mip1 puhastamine ja selle optimeerimine

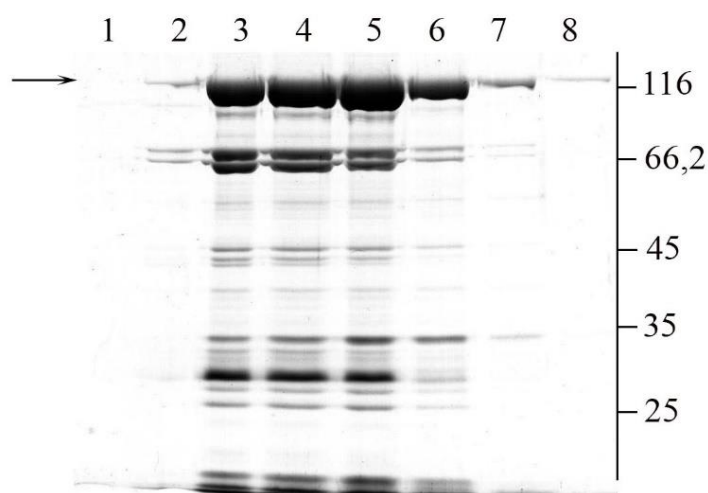
Kuna ensümaatilise lüüsi koos vedelas lämmastikus läbikülmutamise ja sonikeerimisega toimis hästi väikeses mahus puhastamisel, kasutati antud meetodeid ka suures mahus Mip1 väljapuhastamisel (1 l). Samuti oli Ni-NTA affiinsuskromatograafia hästi toiminud ning ka selle meetodiga otsustati edasi töötada. Eeltoodud meetodite valimisel olid abiks teadmised *S. cerevisiae* rekombinantse Mip1 puhastamisest (Viikov jt, 2010), kuid siiski muudeti nimetatud artiklis kirjeldatud protseduuride detaile käesoleva töö käigus – vastavad protokollid on toodud meetodite ja materjalide peatükis.

Rakkude kogumine ja lüüs. Rakkude lüüsimiseks kasutati eeltestimisel edukalt rakendatud ensümaatilist lüüsi koos rakkude lõhkumist tõhustava vedelas lämmastikus läbikülmutamise ja sonikeerimisega. Valitud lüüsipuhvri kogust lüüsitava rakususpensiooni valmistamiseks suurendati proportsionaalselt rakkude massiga 10 ml-ni ning ultrahelitöötuse ühe tsükli pikkust pikendati samal põhimõttel 30 sekundini (täpsemalt 2.2.11.1).

Eelfraktsioneerimine ammooniumsulfaadiga väljasoolamise teel. Klaaritud rakulüsaadis sisalduvate valkude sadestamiseks kasutati $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -i, mida lisati lahusele 70% küllastumiskontsentratsioonist, et tagada Mip1 väljasadestamine. Ammooniumsulfaadiga lahusest välja viidud valgud tsentrifugeeriti põhja ning soolarikka supernatandi eemaldamise järel lahustati valgud lüüsipuhvri abil.

Ammooniumsulfaadiga väljasoolamise üks põhieeliseid on valkude stabilisatsioon (Scopes, 1994), mis oli antud meetodi rakendamise peamiseks eesmärgiks ka Mip1 puhastamise käigus. Kuivõrd Mip1 säilitas oma aktiivse vormi väljasoolamist kasutades (täpsemalt käesoleva peatüki alateemas „Detergentide kasutamine Mip1 puhastamisel“), võib antud meetodiga saavutatav stabilisatsioon olla kasulik ka käesolevas töös.

Ni-NTA affiinsuskromatograafia. Väikeses mahus puhastamisest oli näha, et kasutatud tingimustes elueerub Ni-NTA agarosilt rida kontamineerivaid valke koos Mip1-ga (vaata lisasid 1-5). Seetõttu otsustati Ni-NTA agarosilt, millele oli seondunud Mip1, pesta peale 10 mM ja 20 mM imidasoolisisaldusega lüüsipuhvrite ka pesupuhvriga, mis sisaldas 20 mM imidasooli ja kõrgemat NaCl-i kontsentratsiooni (1 M võrreldes lüüsipuhvri 300 mM NaCl kontsentratsiooniga). Mip1 on selles puhvris veel tugevalt seotud Ni-NTA agarosiga ja elueerub 500 mM imidasoolisisaldusega elueerimispuhvri kasutamisel. Põhiline osa Mip1



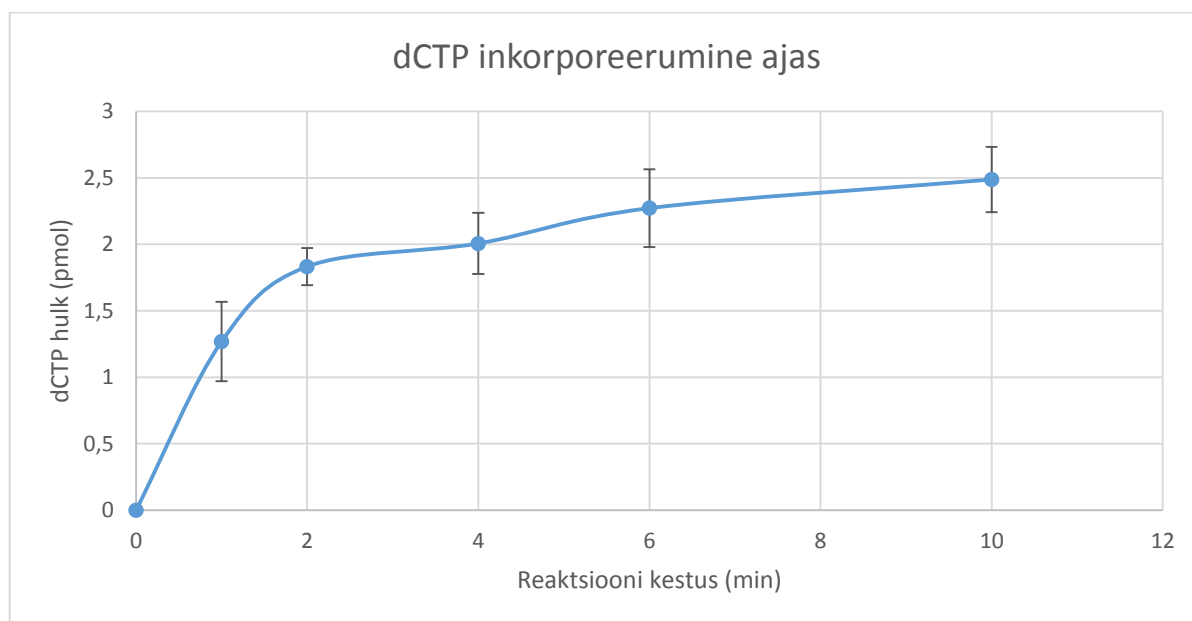
Joonis 7. Ni-NTA maatriksi eluaat: kõrgeima Mip1 sisaldusega on fraktsioonid 3-6. Geelil analüüsiti 16 µl igast fraktsioonist. Mip1 asukoht geelil on näidatud noolega. Pildi paremas servas on toodud valkude molekulmassi marker (kDa).

valgust koguti nelja 250 µl suurusesse fraktsiooni (joonis 7) ning edasiste katsete käigus otsustati kasutada nende fraktsioonide kokkusegamisel saadud 1 ml mahuga lahust. Ni-NTA maatriksi abil puhastatud lahuse tüüpiline valgukontsentratsioon oli 1 mg/ml, mis annab eelkirjeldatud puhastamismeetodite tüüpiliseks valgusaagiseks 1 mg valku 1 liitri rakukultuuri kohta.

Pole välistatud, et rekombinantne Mip1 võis ebaspetsiifiliselt olla interakteerunud mõne muu valguga ning seetõttu on võimalik, et soolakontsentratsiooni tõstmine aitas nendest kontaminantidest vabaneda. Põhiline osa puhastumisest saavutati siiski (eelfraktsioonide ja praeguse Ni-NTA maatriksi eluaate võrreldes) astmelise imidasooli kontsentratsiooni tõstmisega ning tuleb tõdeda, et juba affiinsuskromatograafia abil on jõutud märgatavalt puhtama Mip1 valguni.

DNA polümeraase aktiivsuse hindamine. 1 ml mahuga Ni-NTA eluaadi põhifraktsioonide segu peaks olema järgmise puhastusetapi algmaterjaliks. Samas sooviti uurida antud valgupreparaadi ensümaatilist aktiivsust, kinnitamaks, kas tegemist on endiselt aktiivse lahusega või mitte. 37 °C juures ekspresseeritud Mip1 DNA polümeraase aktiivsuse hindamiseks rakendati klassikalist testi, milles analüüsiti [α -³²P]-dCTP inkorporeerumist replikatsiooniprodukti, kasutades matriitsina vasika tuumuse aktiveeritud DNA-d. Reaktsiooni viidava valgukoguse valimisel arvestati Viikovi ja kolleegide poolt läbiviidud katseid, milles testiti 5-100 ng homogeense *S. cerevisiae* Mip1 polümeraasset aktiivsust samasugusel substraadil (Viikov jt, 2010). Ni-NTA fraktsioneeritud materjali otsustati lisada igasse reaktsioonisegusse 500 ng valku. Toimides peatükis 2.2.13 toodud protokollil alusel, viidi

aktiivsuskatsed läbi kolmes seerias *H. polymorpha* optimaalse kasvutemperatuuri (37 °C) juures ning inkorporeerunud [α - 32 P]-dCTP hulka mõõdeti ajapunktidel 0, 1, 2, 4, 6 ja 10 minutit. Arvutuste tulemusena saadud dCTP inkorporeerumist ajas iseloomustav graafik on toodud allpool (joonis 8).



Joonis 8. Mip1 sünteesitud replikatsiooniproducti teke ajas. Ühte reaktsiooni lisati 500 ng valku. Katsed viidi läbi kolmes seerias ning tulemuste varieeruvust iseloomustab joonisele kantud standardhälve.

On näha, et rekombinantne Mip1 on funktsionaalne ja omab polümeraasset aktiivsust. Samas väheneb produkti tekkekiirus märgatavalt juba 2 minuti möödudes. Taolise platoo saabumine võib olla seotud liiga madala substraadi kontsentratsiooniga reaktsioonisegus. Samas on pagaripärmi väga protsessiivse Poly (Viikov jt, 2010) uurimisel nähtud, et nukleotiide ja matriitsi on antud reaktsioonitingimuste juures ülehulgas. Teine võimalus võib olla seotud Mip1 eksonukleaase aktiivsusega – kui reaktsioonisegusse sai lisatud liiga suures ülehulgas ensüümi, võis õige pea polümeraasse aktiivsuse kõrval tööle hakata ka eksonukleaasne aktiivsus substraatide kontsentratsiooni järsu vähenemise tõttu. Tasakaalu nihkumisel 3'-5'-eksonukleaase aktiivsuse suunas lagundati vastsünteesitud DNA ahelad taas nukleotiidideks piirini, mil polümeraasne ja eksonukleaasne aktiivsus saavutasid tasakaalu.

Kolmandaks on võimalik, et Mip1 hakkas 2-minutilise reaktsiooni järel inaktiveeruma. Reaktsioon viidi läbi 37 °C juures, mis on natuke madalam kui Biswas ja kolleegide läbiviidud stabiilsuskatsetel kasutatud temperatuur - 45 °C (Biswas jt, 1995). Nende andmetel inaktiveerus sellise temperatuuri juures umbes pool *S. cerevisiae* Mip1-st 3-5 minuti jooksul. Me ei pea termilist inaktiveerumist aga kuigi tõenäoliseks, sest *H. polymorpha* suudab kasvada 50 °C-s keskkonnas (Cabeça-Silva ja Madeira-Lopes, 1984) ning tal on teisigi ensüüme, mis on

rekombinantset puhastatuna termostabiilsed ja omavad optimaalset aktiivsust kõrgemal temperatuuril kui mitmete muude pärmide vastavad ensüümid (Biswas jt, 2010). Samas ei saa välistada võimalust, et rekombinantne *H. polymorpha* Mip1 pole kuigi termostabiilne, sest pagaripärmi Poly varasemad uuringud on just seda näidanudki (Biswas jt, 1995).

Graafiku esialgse lineaarse osa tõusu abil arvutati uuritava valgu eriaktiivsus, mille väärtus kohandati standardse DNA polümeraasi ühiku definitsiooniga. 1 ühik defineeriti kui *H. polymorpha* Poly hulk, mis inkorporeerib 1 pmol dCTP-d 30 minuti jooksul 37 °C juures. Uuritava valgu eriaktiivsus oli $7,6 \times 10^4$ U/mg, mis on *S. cerevisiae* homogeensuseni puhastatud Mip1-e eriaktiivsusega ($7,0 \times 10^5$ U/mg) mõistlikus kooskõlas (Viikov jt, 2010). Mitmed lisandid afiinsuskromatograafia eluaadis võivad takistada ensüümi aktiivsust, olles ehk Poly-ga ebaspetsiifiliselt seotud. Lisaks - kirjeldatud aktiivsuskatsetes kasutati Mip1-e, mis oli ekspresseerunud 37 °C juures ning mille puhastamisel ei kasutatud valke stabiliseerivat väljasoolamismeetodit ega detergente. Edaspidi oleks kasulik analüüsida, kas väljasoolamine, detergentide lisamine puhastuspuhvritesse ning ekspresioonitemperatuuri varieerimine (näiteks 21 °C juures indutseerimine) omavad olulist mõju aktiivsusele või mitte.

Rekombinantse Mip1 täiendav puhastamine. Afiinsuskromatograafia kohendatud protokollil abil puhastatud Mip1 preparaati sisaldab endiselt mitmeid kontaminante (joonis 7), ehkki neid on oluliselt vähem kui klaaritud lüsaadis (joonis 5). On võimalik, et mõned nendest valkudest on ebaspetsiifiliselt interakteerunud Mip1-ga, kuid ei saa välistada, et osa kontaminantidest on tugevalt seotud Ni-NTA maatriksiga ning elueeruvad koos Mip1-ga. Lisanditest vabanemiseks oleks edaspidi kasulik Mip1 preparaati puhastada meetoditega, mis lahutavad valke Ni-NTA afiinsuskromatograafiast erinevalt.

S-Sepharose kationvahetuskromatograafia. *S. cerevisiae* rekombinantse Mip1 puhastamiskeemi alusel (Viikov jt, 2010) otsustati teise kromatograafiana proovida S-Sepharose kationvahetuskromatograafiat, mille abil oleks võimalik valgulahus puhastada Mip1-st erineva pinnalaenguga valkudest. S-Sepharose kolonnile kandmiseks viidi Mip1 S-puhvrise analoogiliselt Viikovi ja kolleegide poolt kirjeldatule. Mip1 seondumiseks S-Sepharose kolonniga viidi lahuse juhtivus võrdseks S₁₀₀-puhvri juhtivusega, sest sama puhvriga oli eelnevalt tasakaalustatud ka mainitud kolonn. S₁₀₀-puhvriga sarnase juhtivuse saavutamiseks kasutati 1 ml Ni-NTA fraktsiooni lahjendamisel S₅₀-puhvrit, et mitte liialt järsku soolakontsentratsiooni alla viia. Vaatamata sellele, et lahjendamisel välditi ekstreemaalselt madala soolakontsentratsiooniga lahuse kasutamist, oli umbes 10-15 minuti pärast näha lahuses niitjat sadet. Seetõttu tseentrifuugiti lahjendatud valgulahust 10 minutit ($3100 \times g$), et vältida

sademega kolonni ummistamist. Supernatant kanti S-Sepharose kolonni, mida pesti, nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.11.4. Nii Bradfordi kui SDS-PAGE meetodil ei olnud S-Sepharose-i eluaadis Mip1 detekteeritav, isegi mitte pärast 1 M soolasisaldusega S-puhvri pesu, mis on mõeldud viimaste kinnitunud valkude väljatõrjumiseks maatriksi küljest. Samuti polnud Mip1 detekteeritav ka esialgses kolonni läbijooksus. Antud andmete põhjal on mõeldav, et Mip1 sadenes lahusest tervikuna välja juba S₅₀-puhvriga lahendamisel või osaliselt ka hiljem, S-Sepharose maatriksil.

Esimene S-Sepharose kromatograafia analüüs viidi läbi Mip1 valguga, mis oli saadud 37 °C juures kasvanud rakkude lüsaadist. Kuivõrd sageli pakitakse rekombinantsed võõrvalgud bakterirakus sellisel temperatuuril inaktiivsete inklusioonkehadena (Vera jt, 2007; Varejão jt, 2010), viidi läbi analoogilised katsed 21 °C juures ekspresseeritud valguga. Ka madalamal temperatuuril sünteesitud Mip1 lahusele S₅₀-puhvri lisamisel juhtivuse korrigeerimiseks tekkis lahusesse niitjas sade. Lahuse tsentrifuugimisjärgne supernatant kanti S-Sepharose kolonnile, kuid jällegi ei olnud Mip1 üheski fraktsioonis detekteeritav ei Bradfordi ega SDS-PAGE meetodiga.

Seega sadeneb Mip1 suure tõenäosusega lahusest soolakontsentratsiooni langetamisel 100 mM-ni. Kuivõrd 300 mM ja kõrgema NaCl-i kontsentratsiooniga puhvris püsib Mip1 hästi lahuses, kontrolliti, kas madala ioonse jõu juures tekkinud sade on uuesti lahustatav S₅₀₀- ja S₁₀₀₀-puhvrite lisamisel. Ka 5-tunnise ekstraheerimise tulemusel polnud võimalik tuvastada märkimisväärse osa Mip1 valgu taaslahustumist.

Geelfiltratsioon Superdex 200 kolonnil. Kuna ionvahetuskromatograafiat polnud võimalik rakendada, otsustati Mip1 edasiseks puhastamiseks katsetada geelfiltratsiooni, mis lahutab valke molekulmassi alusel. *H. polymorpha* Mip1 ennustatav molekulmass on 130,6 kDa ning Superdex 200 kolonn on mõeldud tööks valkudega, mille molekulmass on vahemikus 10-600 kDa (tootja juhendi alusel), mistõttu sobis antud kolonn ettevõetavaks tööks. Geelfiltratsioonikolonnile kanti Ni-NTA eluaat, milles esinevatest põhilistest lisanditest suurimad on umbes 60-70 kDa molekulmassiga (joonis 7) ning peaksid seetõttu geelfiltratsioonil Mip1-st, mille molekulmass on ligi kaks korda suurem, hästi lahutama. Valgulahus (1 ml) filtreeriti ja kanti lüüsipuhvriga tasakaalustatud 120 ml mahuga Superdex 200 kolonnile, mida voolutati seejärel ühe kolonnimahu lüüsipuhvriga. Fraktsioone koguti suurusvahemikus 0,3-5 ml. Geelfiltratsiooni käigus ilmnes neli põhilist suurima valgukontsentratsiooniga fraktsioonide komplekti (vaata lisa 7). Kui umbes ½ (60 ml) kolonnimahust oli voolutatud, koguti 12 ml filtraati 0,3 ml fraktsioonide kaupa, mis SDS-PAGE analüüsi põhjal sisaldas Mip1 valku. Seega lahjenes Mip1 12-kordselt ning kuigi Mip1 oli väga

õrnalt nähtav SDS-polüakrüülamiidgeelil, polnud antud fraktsioonide kontsentratsiooni võimalik Bradfordi meetodil hinnata. Samuti polnud geelfiltratsiooni produktist detekteeritav Mip1 DNA polümeraasne aktiivsus.

Kokkuvõttes suudeti geelfiltratsiooni tulemusena SDS-PAGE alusel lahutada Mip1 valk oma kontaminantidest. Samas aga lahjendati valgupreparaati märkimisväärselt ning aktiivsuskatsetel kasutatud Mip1 aktiivsust ei omanud, kuigi arvestati geelfiltratsiooni käigus tekkinud lahjendust, lisades reaktsioonisegusse mitmekordne maht valgupreparaati võrreldes varasemates aktiivsuskatsetes kasutatud Ni-NTA eluaadi mahuga. On võimalik, et reaktsioonipuhver ja –komponendid lahjenesid sellistel tingimustel ning reaktsiooni sattus liiga suur kogus lisandeid, mis replikatsiooni pärssima hakkasid. Taolisteks lisanditeks võivad olla näiteks 60-70 kDa molekulmassiga kontaminantide (joonis 7) dimeerid, mis lahutuvad koos Mip1-ga. Kui aga tegemist pole replikatsiooni takistavate valguliste lisanditega, vaid lihtsalt reaktsioonipuhvri kontsentratsioonide olulise muutusega suure mahu valgulahuse lisamise tõttu, oleks ehk võimalik geelfiltratsiooni produkti kontsentreerimisel saada polümeraaselt aktiivne valgupreparaat.

Detergentide kasutamine Mip1 puhastamisel. Ioonvahetuskromatograafiast ja geelfiltratsioonist saadud andmete põhjal otsustati üle vaadata puhastusprotseduurides kasutatavate puhvrite koosseis. Kuna mitokondriaalse nukleoidi koosseisust on leitud valke, mis teadaolevalt asuvad mitokondri sisemembraanis ja seeläbi viitavad võimalusele, et mtDNA ja valkude kompleks on membraaniga seotud (Wang ja Bogenhagen, 2006), võib ka *H. polymorpha* Poly omada hüdrofoobseid alasid, mis võivad *in vitro* omavahel agregeeruda ning seeläbi tekitada mitmest Poly-st koosnevaid komplekse. Taoliste agregaatide puhul võib olla võimalik, et puhvritingimuste muutmisel sadeneb multimeerne Mip1 lahusest lihtsamini välja kui antud valgu monomeerne vorm. Samuti on äärmiselt tõenäoline, et taoline agregatsioon takistab Mip1 ensümaatilisi aktiivsuseid, mis võis olla geelfiltratsioonist saadud valguproovi polümeraasse inaktiivsuse põhjuseks. Mitmete mitokondriaalsete valkude, mida seostatakse mtDNA-ga, uurimisel on edukaks väljapuhastamiseks kasutatud detergentide abi (näiteks Van Dyck jt, 1992; Sen jt, 2012) ning nende mõju Mip1 puhastamisele otsustati uurida ka käesolevas töös.

Detergentide mõju uurimiseks analüüsiti nende toimet Mip1 valgu agregatsioonile, lisades kõikidele afiinsuskromatograafias kasutatavatele puhvritele kas 0% detergenti, 0,1% NP-40-t, 0,1% Tween 20-t või 0,1% Triton X-100-t. Puhastamiseks kasutatud rakulüsaat pärines kultuurist, milles ekspresseeriti Mip1 valku 21 °C juures ning valgulüsaat oli eelfraktsioneeritud ammooniumsulfaadi abil (kirjeldatud peatükis 2.2.11.3). Taaslahustatud

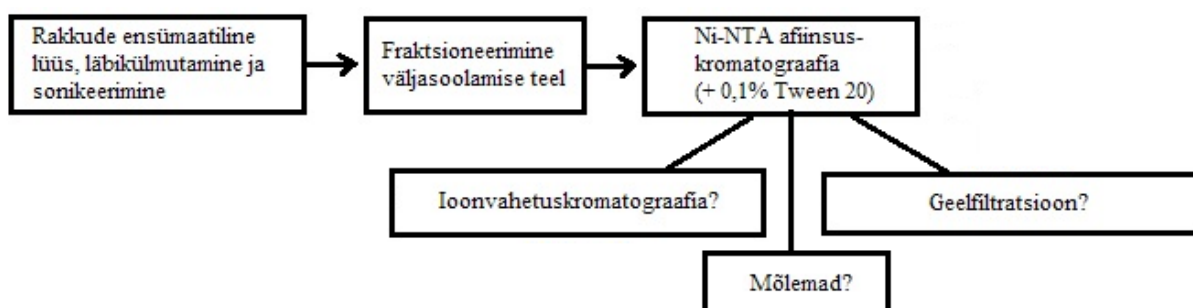
valgupreparaat jagati neljaks võrdseks osaks, millest kolmele lisati 0,1% ülaltoodud detergente. Kõiki proove puhastati sarnaselt Ni-NTA maatriksil (erinevusega vaid detergendisalduses ja viisil, nagu on kirjeldatud 2.2.11.2.2). Mip1 preparaate analüüsiti järgnevalt 15-30% glütserooligradiendil. Igast seeriast pärit suurima valgukontsentratsiooniga eluaadifraktsiooni 100 µl suurune proov kanti gradiendile (2.2.12), mis sisaldas vastavat detergenti ning mida sedimenteeriti 20 h ($194\ 000 \times g$). Iga gradient sisaldas sisemise standardina ka 100 µg BSA-d.

Pärast ultratsentrifuugimist jagati 5 ml mahuga gradiendid 200 µl fraktsioonideks ning analüüsiti SDS-PAGE-l (geelipildid toodud lisades 8-11). Geelide analüüsil oli näha, et Mip1 monomeerne vorm omab palju suuremat kontsentratsiooni lahustes, mis sisaldavad detergente, seda eriti neis proovides, mis sisaldasid Tween 20-t (lisa 10) ja Triton X-100-t (lisa 11). Detergendivaba proovi monomeerse Mip1 sisaldus oli madalam (lisa 8) ning 26-ndas fraktsioonis ehk tsentrifuugitopsi põhja pesemiseks kasutatud 0,1% SDS puhvril oli näha Mip1 sisaldust - see viitab võimalusele, et gradiendile kantud lahuses leidis tõesti agregate, mis tsentrifuugimisel põhja sedimenteerusid. 26. fraktsioon sisaldas Mip1-e ka Triton X-100 ja NP-40 sisaldavates lahustes (lisad 9 ja 11). Paralleelselt SDS-PAGE analüüsiga viidi läbi ka aktiivsuskatsed (täpsemalt peatükis 2.2.13), ning fraktsioonid, kus geelide põhjal esines Mip1, omasid polümeraasset aktiivsust. Tulemuste kvantitatiivseks täpsustamiseks on aga vajalik täiendav analüüs.

Taolised tulemused viitavad õrnalt võimalusele, et Mip1 võib oma looduslikus keskkonnas omada kontakte mitokondri membraaniga nagu mitmed teised mitokondri nukleoidis esinevad valgud (Wang ja Bogenhagen, 2006). Sel juhul on detergentide kasutamine valgu puhastamisel monomeerse ja seeläbi ka aktiivse Poly eraldamiseks üsna põhjendatud, küsimus on aga detergendi valikus. Triton X-100 ja NP-40 omavad küllaltki sarnast keemilist struktuuri, kuid Tween 20 molekul on neist suurem ja omab rohkem hüdrofiilseid pindu. Seetõttu mahub valgul esinevate hüdrofoobsete aladega seonduma vähem Tween 20 kui Triton X-100 ja NP-40 molekule. Taolise õrnema mõjuga detergendi kasutamine võib olla Mip1 korrektse tertsiaarstruktuuri säilitamiseks parem ning samas näitas ka SDS-PAGE analüüs, et antud detergendi sisaldava proovi 26. fraktsioon ei sisalda sellise analüüsimeetodi puhul detekteeritavat valgukogust ehk agregeerunud Mip1-e oli tõenäoliselt käsitletavas proovis väga vähe. Kuigi ka Triton X-100-ga proovis leidis üsna kõrges kontsentratsioonis monomeerset Poly-t, sisaldas 26. fraktsioon rohkelt sama valku, mis annab põhjust pigem antud detergendi vältida lahuses toimuva võimaliku agregatsiooni tõttu. Peale selle näitasid fraktsioonides sisalduva Mip1-ga läbiviidavad esmased aktiivsuskatsed, et Tween 20 sisaldavas lahuses esinev

Mip1 omab kõrgeimat aktiivsust. Samas peaks antud proovides sisalduvat aktiivsust põhjalikumalt uurima, et selles küsimuses põhjapanevamaid ja kindlamaid tulemusi saada, ning seetõttu esitab töö autor vaid selle, pelgalt üldsõnalise hinnangu proovide iseloomustamiseks detergentide valikul. Jättes kõrvale aktiivsuse taseme, leidub ka juba praegu mitmeid muid põhjuseid, mida kirjeldati ülalpool, Tween 20 eelistamiseks teiste detergentide ees.

Kuigi käesoleval juhul jäi ammoniumsulfaadiga väljasoolamise konkreetselt ilmnev mõju Mip1 stabiilsusele selgitamata, on väga tõenäoline, et antud etapi lisamine puhastusprotokollile Mip1-ele halvasti ei mõju, sest väljasoolamine on, nagu varemgi mainitud, üldtuntud meetod valkude stabiliseerimiseks (Scopes, 1994). Samas nähti detergentide ilmselget mõju ja vajadust Mip1 agregatsiooni vältimisel ning seetõttu tuleks edasistes katsetes antud aspektiga arvestada. Kokkuvõttes oleks praegustel teadmistel baseeruv optimaalne Mip1 puhastuskeem järgmine:



Joonis 9. Käesolevas töös väljatöötatud Mip1 puhastuskeem.

Tänu mitmetele välistamiskatsetele on kindlasti õigetele sammudele lähemale jõutud ning järgmisena proovime Mip1 täiendavaks puhastamiseks rakendada ioonvahetuskromatograafiat ja geelfiltratsiooni Tween 20 juuresolekul.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärkideks oli viia termotolerantse pärmi Poly geen bakteriaalsesse ekspressioonisüsteemi, teha kindlaks antud valgu optimaalsed ekspressioonitingimused ning välja töötada tema puhastusskeem *E. coli*-st. Esmalt konstrueeriti selleks ekspressioonikonstrukt, mille abil oleks võimalik Mip1-e pET süsteemis ekspresseerida. *H. polymorpha* NCYC495 rakkudest eraldatud DNA-st amplifitseeriti *Mip1* geen, mis sisestati pET24d vektorisse. Moodustatud ekspressioonikonstrukti paljundati molekulaarse kloneerimise teel ja kontrolliti restriksioonanalüüsi ning sekveneerimisega.

Mip1 konstrukti transformeerimise järel ekspressioonitüve Rosetta(DE3) rakkudesse viidi läbi eelkatsed valgu optimaalsete ekspressioonitingimuste selgitamiseks. Erinevate induktsiooniaegade, temperatuuride ja söötmete varieerimisel selgus, et Mip1 ekspresseerib kõige edukamalt 5-tunnise induktsiooni jooksul 2xYT söötmes temperatuuril 21 °C või 37 °C.

H. polymorpha Poly puhastamiseks kasvatati rakke eeltoodud tingimustel, lüüsi nad ensümaatilisel ja efekti tõhustamiseks külmutati ka lämmastikus ning sonikeeriti. Klaaritud rakulüsaat fraktsioneeriti väljasoolamise teel, mille põhiliseks eeliseks on valkude stabilisatsioon. Mip1 puhastati lüsaadist Ni-NTA aafiinsuskromatograafiaga ning sel viisil saadud valgu saagiseks oli tüüpiliselt 1 mg valku 1 l rakukultuuri kohta. Lisaks näidati, et Ni-NTA eluaadist saadud Mip1 on funktsionaalselt aktiivne DNA polümeraas.

Mip1 täiendavaks puhastamiseks viidi läbi katsed S-Sepharose katioonvahetuskromatograafia, Superdex 200 geelfiltratsiooni ja kolme erineva detergendiga. Näidati, et ioonvahetuskromatograafia tarvis läbiviidud valgulahuse soolakontsentratsiooni allaviimine põhjustab Mip1 sadenemise. Geelfiltratsioon Superdex 200 kolonnil lahjendas Mip1 valku 12-kordselt, kuid saadud preparaadi polümeraasse aktiivsuse olemasolu hindamiseks on tarvilik edasine analüüs. Lisaks uuriti, kas detergentidel võib olla mõju Mip1 agregatsioonile ning ultratsentrifuugimise abil läbi viidud analüüsil selgus, et detergentid (eriti Tween 20) aitavad Mip1-e hoida monomeerse ja seeläbi tõenäoliselt ka aktiivsena.

Kokkuvõttes töötati välja skeem funktsionaalselt aktiivse valgu puhastamiseks ning edaspidi uuritakse Mip1 põhjalikuma puhastamise võimalusi geelfiltratsioonil ja ioonvahetuskromatograafias Tween 20 juuresolekul. Samuti asutakse põhjalikuma biokeemilise analüüsi juurde, mille abil oleks võimalik välja selgitada, kuidas tagatakse protsessiivne DNA süntees ühest subühikust koosneva mitokondriaalse DNA polümeraasi poolt.

Purification of a thermotolerant microorganism's mitochondrial DNA polymerase

Paula Salme Sandrak

SUMMARY

The aim of this study was to purify *Hansenula polymorpha*'s recombinant, potentially thermostable mitochondrial DNA polymerase, also known as Poly or Mip1.

Mitochondrial DNA polymerase is responsible for the DNA replication (Genga et al., 1986; Hance et al., 2005), recombination (Dujon, 1981; Gerhold et al., 2010) and reparation (Longley et al., 1998a) in the mitochondria. Understanding the biochemical properties of the protein is important to explain the maintenance and replication of the mitochondrial genome as well as to understand the background of many mitochondrial diseases.

Poly's low natural abundance in *S. cerevisiae* cells, sensitivity to proteolysis and oxidative damages along with its thermal unstability (Biswas et al., 1995; Graziewics et al., 1995) has complicated structural and enzymatic studies. *Hansenula polymorpha* as a thermotolerant microorganism might yield a mitochondrial DNA polymerase that is easier to analyze.

In this study, firstly, an expression construct to synthesize *H. polymorpha*'s Mip1 in the pET system was assembled. Gene encoding Poly was amplified from the *H. polymorpha* NCYC495 cells' total DNA and was cloned in the pET24d plasmid. The expression vector was verified by restriction analysis and sequencing. The optimal expression conditions of Mip1 were determined in the *E. coli* expression strain Rosetta(DE3). Different induction periods, expression temperatures and media were tested. Mip1 is most actively synthesized in 2xYT medium at 21 °C or 37 °C during a 5 hour induction.

For the purification of *H. polymorpha* Poly the bacteria were lysed enzymatically, frozen in liquid nitrogen and sonicated. Cleared lysate was fractionated by prefractionation with ammonium sulphate and Mip1 was purified with Ni-NTA affinity chromatography that yielded approximately 1 mg of protein from 1 L of *E. coli* cell culture. It was also shown that Mip1 from the Ni-NTA chromatographic elution fractions is a functionally active DNA polymerase.

Additional purification techniques S-Sepharose ion exchange chromatography and Superdex 200 gel filtration were tested along with the experiments on different detergents. It was shown that lowering salt concentration during dilution - which is necessary for carrying out ion exchange chromatography - will cause precipitation of Mip1. Gel filtration on Superdex 200 column caused 12 fold dilution of Mip1, but further investigation is needed to assess the DNA

polymerase activity. Different detergents and especially Tween 20, were found to stabilize the monomeric form of Mip1 and therefore probably could help to maintain the active form of the protein.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada oma juhendajat Juhan Sedmani mõtlemapanevate ja humoorikate hetkede eest. Lisaks tahan oma tänulikkust väljendada mitmetele teistele laborikaaslastele. Olen väga rõõmus, et mul on olnud võimalus koos töötada ülimalt abivalmi, sõbraliku ja südamliku Maie Looritsaga. Tänan Tiina Sedmani armsa naeratuse ja asjalike nõuannete eest ning Ilja Gaidutšiki mõnusate aruteluhetkede, kaasamõtlamise ning huumorimeele eest. Samuti oli väga tore ja arendav küsida nõu Joachim Gerholdilt, kes sellistel juhtudel jagas minuga peale lihtsa nõuande veel lahkesti analüüsi- ja loogikameelt stimuleerivaid mõttekäike. Igapäevases laboritöös puutusin lisaks meie uurimisgrupis tegutsevatele kaaslastele palju kokku ka molekulaarbioloogia ja tsellulaasi uurimisgrupi laborite sõbralike ja teraste inimestega, kelle seast sooviksin eriti tänada Kaspar Reierit, Margus Leppikut ja Aivar Liiva pideva üliasjatundliku tehnilise abi eest ning Jaanus Remmet vahvate mõttevahetuste eest.

KIRJANDUSE LOETELU

Allen, J. F. (1993). Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *J Theor Biol* 165: 609–631.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., deBruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreider, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R., Young, I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.

Baldacci, G., Chérif-Zahar, B., Bernardi, G. (1984). The initiation of DNA replication in the mitochondrial genome of yeast. *EMBO J* 3: 2115–2120.

Bandy, B., Davison, A. J. (1990). Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implication for carcinogenesis and ageing? *Free Radic Biol Med* 8: 523–539.

Baruffini, E., Lodi, T. (2010). Construction and validation of a yeast model system for studying in vivo the susceptibility to nucleoside analogues of DNA polymerase gamma allelic variants. *Mitochondrion* 10: 183–187.

Beckman KB, Ames BN (1996). Detection and quantification of oxidative adducts of mitochondrial DNA. *Methods Enzymol* 264: 442–453.

Beese, L. S., Derbyshire, V., Steitz, T. A. (1993). Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA. *Science* 260: 352–355.

Bendich, A.J. (1993). Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure. *Curr Genet* 24: 279-290.

Bendich, A. J. (1996). Structural Analysis of Mitochondrial DNA Molecules from Fungi and Plants Using Moving Pictures and Pulsed-field Gel Electrophoresis. *J Mol Biol* 4: 564-588.

Bendich, A. J. (2010). The End of the Circle for Yeast Mitochondria. *Mol Cell* 39: 831-832.

Bernad, A., Blanco, L., Lazaro, J. M., Martin, G., Salas, M. (1989). A conserved 3'----5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell* 59: 219-228.

Bianchi, N. O., Bianchi, M. S., Richard, S. M. (2001). Mitochondrial instability in human cancers. *Mutat Res* 488: 9– 23.

- Biswas, D., Datt, M., Ganesan, K., Mondal, A. K. (2010). Cloning and characterization of thermotolerant xylitol dehydrogenases from yeast *Pichia angusta*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88: 1311-1320.
- Biswas, T. K., Sengupta, P., Green, R., Hakim, P., Biswas, B., Sen, S. (1995). Properties of mitochondrial DNA polymerase in mitochondrial DNA synthesis in yeast. *Acta Biochim Pol* 42: 317-324.
- Bogenhagen, D., Clayton, D. A. (1977). Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* 11: 719-727.
- Bowmaker, M., Yang, M. Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Jacobs, H. T., Huberman, J. A., Holt, I. J. (2003). Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem* 278: 50961-50969.
- Braithwaite, D. K., Ito J. (1993). Compilation, alignment and phylogentic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 21: 787–802.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bratic, I., Hench, J., Henriksson, J., Antebi, A., Burglin, T. R., Trifunović, A. (2009). Mitochondrial DNA level, but not active replicase, is essential for *Caenorhabditis elegans* development. *Nucleic Acids Res* 37: 1817–1828.
- Bridges, H. R., Grgic, L., Harbour, M. E., Hirst, J. (2009). The respiratory complexes I from the mitochondria of two *Pichia* species. *Biochem J* 422: 15-159.
- Bron, S., Holsappel, S., Venema, G., Peeters, B. P. (1991). Plasmid deletion formation between short direct repeats in *Bacillus subtilis* is stimulated by single-stranded rolling-circle replication intermediates. *Mol Gen Genet* 226: 88-96.
- Cabeça-Silva, C., Madeira-Lopes, A. (1984). Temperature relations of yield, growth and thermal death in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Z Allg Mikrobiol* 24: 129–132.
- Carrodeguas, J.A., Kobayashi, R., Lim, S. E., Copeland, W. C., Bogenhagen, D. F. (1999). The accessory subunit of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA polymerase gamma increases processivity of the catalytic subunit of human DNA polymerase gamma and is related class II aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Cell Biol* 19: 4039–4046.

- Cerritelli, S. M., Frolova, E. G., Feng, C., Grinberg, A., Love, P. E., Crouch, R. J. (2003). Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in Rnaseh1 null mice. *Mol Cell* 11: 807–815.
- Chang, D. D., Clayton, D. A. (1985). Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 351–355.
- Chi, N.-W., Kolodner, R. D. (1994). Purification and characterization of MSH1, a yeast mitochondrial protein that binds to DNA mismatches. *J Biol Chem* 269: 29984–29992.
- Clark-Walker, G. D., Linnane, A. W. (1966). In vivo differentiation of yeast cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis with antibiotics. *Biochem Biophys Res Commun* 25: 8-13.
- Claros, M. G., Perea, J., Shu, Y., Samatey, F. A., Popot, J. L., Jacq, C. (1995). Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *Eur J Biochem* 228: 762–71.
- Clayton, D. A. (1982). Replication of animal mitochondria. *Cell* 28: 693–705.
- Conway, D. J., Fanello, C., Lloyd, J. M., Al-Joubori, B. M., Baloch, A. H., Somanath, S. D., Roper, C., Oduola, A. M., Mulder, B., Pova, M. M., Singh, B., Thomas, A. W. (2000). Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA. *Mol Biochem Parasitol* 111: 163-171.
- Davidzon, G., Mancuso, M., Ferraris, S., Quinzii, C., Hirano, M., Peters, H. L., Kirby, D., Thorburn, D. R., DiMauro, S. (2005). POLG mutations on Alpers syndrome. *Ann Neurol* 57: 921-924.
- Davis, A. F., Ropp, P. A., Clayton, D. A., Copeland, W. C. (1996). Mitochondrial DNA polymerase γ is expressed and translated in the absence of mitochondrial DNA maintenance and replication. *Nucleic Acids Res* 24: 2753-2759.
- de Bruin, E. C., de Wolf, F. A., Laane, N. C. (2000). Expression and secretion of human alpha-1 (I) procollagen fragment by *Hansenula polymorpha* as compared to *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol* 26: 640-644.
- Desai, S. D., Pasupathy, K., Chetty, K. G., Pradhan, D. S. (1989). Evidence for the presence of a DNA primase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Res Commun* 160: 525–534.

- Dujon, B. 1981. Mitochondrial genetics and functions, p. 505-592. In J. N. Strathern, E. W. Jones, J. R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: life cycle and inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Eldarov, M. A., Mardanov, A. V., Beletsky, A. V., Ravin, N. V., Skryabin, K. G. (2011). Complete sequence and analysis of the mitochondrial genome of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. *FEMS Yeast Res* 11: 464-472.
- Ephrussi, B., Hottinguer, H., Tavlitzki, J. (1949). Action de l'acri flavine sur les levures. II. Etude genetique du mutant petite colonies. *Ann Inst Pasteur* 79: 419-450.
- Eriksson, S., Xu, B., Clayton, D. A. (1995). Efficient incorporation of Anti-HIV deoxynucleotides by recombinant yeast mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* 270: 18929-18934.
- Falkenberg, M., Larsson, N.-G., Gustafsson, C. M. (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76: 679-699.
- Fan, L., Kim, S., Farr, C. L., Schaefer, K. T., Randolph, K. M., Tainer, J. A., Kaguni, L. S. (2006). A novel processive mechanism for DNA synthesis revealed by structure, modeling and mutagenesis of the accessory subunit of human mitochondrial DNA polymerase. *J Mol Biol* 358: 1229–1243.
- Fan, L., Sanschagrin, P. C., Kaguni, L. S., Kuhn, L. A. (1999). The accessory subunit of mtDNA polymerase shares structural homology with aminoacyl-tRNA synthetases: implications for a dual role as a primer recognition factor and processivity clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9527-9532.
- Filée, J., Forterre, P., Sen-Lin, T., Laurent, J. (2002). Evolution of DNA polymerase families: evidences for multiple gene exchange between cellular and viral proteins. *J Mol Evol* 54: 763–773.
- Foury, F. (1989). Cloning and sequencing of the nuclear gene MIP1 encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* 264: 20552–20560.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 440: 325-331.
- Foury, F., Szczepanowska, K. (2011). Antimutator Alleles of yeast DNA polymerase gamma modulate the balance between DNA synthesis and excision. *PLoS ONE* 6: e27847.

- Foury, F., Vanderstraeten, S. (1992). Yeast mitochondrial DNA mutators with deficient proofreading exonucleolytic activity. *EMBO J* 11: 2717-2726.
- Fuste, J. M., Wanrooij, S., Jemt, E., Granycome, C. E., Cluett, T. J., Shi, Y., Atanassova, N., Holt, I. J., Gustafsson, C. M., Falkenberg, M. (2010). Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. *Mol Cell* 37: 67–78.
- Gellissen, G. (Ed.) 2002. *Hansenula polymorpha – biology and applications*, p. 11, 21-40, 61-75, 76-94. Wiley-VCH, Weinheim.
- Genga, A., Bianchi, L., Foury, F. (1986). A nuclear mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in mitochondrial DNA replication and polymerase activity. *J Biol Chem* 261: 9328–9332.
- Gerhold, J. M., Aun, A., Sedman, T., Jõers, P., Sedman, J. (2010). Strand Invasion Structures in the Inverted Repeat of *Candida albicans* Mitochondrial DNA Reveal a Role for Homologous Recombination in Replication. *Mol cell* 39: 851-861.
- Germaniuk, A., Liberek, K., Marszalek, J. (2002). A chaperone (Hsp70-Hsp78) system restores mitochondrial DNA synthesis following thermal inactivation of Mip1p polymerase. *J Biol Chem* 277: 27801-27808.
- Gleeson, M. A., Sudbery, P. E. (1988). Genetic analysis in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 4: 293-303.
- Goldring, E. S., Grossman, L. I., Krupnick, D., Cryer, D. R., Marmur, J. (1970). The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. *J Mol Biol* 52: 323– 335.
- Graziewicz, M. A., Day, B. J., Copeland, W. C. (2002). The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic Acids Res* 30: 2817-2824.
- Graziewicz, M. A., Longley, M. J., Copeland, W. C. (2006). DNA polymerase γ in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem Rev* 106: 383-405.
- Graves, S. W., Johnson, A. A., Johnson, K. A. (1998). Expression, purification and initial kinetic characterization of the large subunit of the human mitochondrial DNA polymerase. *Biochemistry* 37: 6050-6058.
- Gray, H., Wong, T. W. (1992). Purification and identification of subunit structure of the human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* 267: 5835–5841.

- Guerra, E., Chye, P. P., Berardi, E., Piper, P. W. (2005). Hypoxia abolishes transience of the heat-shock response in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Microbiology* 151: 805–811.
- Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Hance, N., Ekstrand, M. I., Trifunović, A. (2005). Mitochondrial DNA polymerase γ is essential for mammalian embryogenesis. *Hum Mol Genet* 14: 1775–1783.
- Hensen, F., Cansiz, S., Gerhold, J. M., Spelbrink, J. N. (2014). To be or not to be a nucleoid protein: a comparison of mass-spectrometry based approaches in the identification of potential mtDNA-nucleoid associated proteins. *Biochimie* 100: 219-226.
- Hochuli, E., Döbeli, H., Scacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* 411: 177-184.
- Holt, I. J., Harding, A. E., Morgan-Hughes, J. A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331: 717–719.
- Holt, I. J., Lorimer, H. E., Jacobs, H. T. (2000). Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 100: 515–524.
- Hübscher, U., Maga, G., Spadari, S. (2002). Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* 71: 133-163.
- Insdorf, N. F., Bogenhagen, D. F. (1989). DNA polymerase γ from *Xenopus laevis*. I. The identification of a high molecular weight catalytic subunit by a novel DNA polymerase photolabeling procedure. *J Biol Chem* 264: 21491-21497.
- Ishchuk, O.P., Voronovsky, A.Y., Abbas, C.A., Sibirny, A.A. (2009). Construction of *Hansenula polymorpha* strains with improved thermotolerance. *Biotechnol Bioeng* 104: 911-919.
- Ito, J., Braithwaite, D. K. (1990). Yeast mitochondrial DNA polymerase is related to the family A DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 18: 6716.
- Jacobs, H. T. (2003). The mitochondrial theory of aging: dead or alive? *Aging cell* 2: 11-17.
- Kalifa, L., Sia, E. A. (2007). Analysis of Rev1p and Pol zeta in mitochondrial mutagenesis suggests an alternative pathway of damage tolerance. *DNA Repair (Amst)* 6: 1732–1739.

- Kang, H. A., Kim, J.-Y., Ko, S.-M., Park, C. S., Ryu, D. D. Y., Sohn, J.-H., Choi, E-S, Rhee, S.-K. (1998). Cloning and Characterization of the *Hansenula polymorpha* homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* PMR1 gene. *Yeast* 14: 1233-1240.
- Kasiviswanathan, R., Copeland, W. C. (2011). Biochemical analysis of the G517V POLG variant reveals wild-type like activity. *Mitochondrion* 11: 929–934.
- Kasiviswanathan, R., Longley, M. J., Young, M. J., Copeland, W. C. (2010). Purification and functional characterization of human mitochondrial DNA polymerase gamma harboring disease mutations. *Methods* 51: 379-384.
- Klingbeil, M. M., Motyka, S. A., Englund, P. T. (2002). Multiple mitochondrial DNA polymerases in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell* 10: 175–186.
- Korhonen, J. A., Gaspari, M., Falkenberg, M. (2003). TWINKLE has 5'→3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem* 278: 48627–48632.
- Korhonen, J. A., Pham, X. H., Pellegrini, M., Falkenberg, M. (2004). Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *EMBO J* 23: 2423-2429.
- Krasovska, O.S., Stasyk, O.G., Nahorny, V.O., Stasyk, O.V., Granovski, N., Kordium, V.A., Vozianov, O.F., Sibirny, A.A. (2007). Glucose-induced production of recombinant proteins in *Hansenula polymorpha* mutants deficient in catabolite repression. *Biotechnol Bioeng* 97: 858-870.
- Kukat, C., Wurm, C. A., Spahr, H., Falkenberg, M., Larsson, N. G., Jakobs, S. (2011). Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 13534–13539.
- Kuznetsov, A. V., Hermann, M., Saks, V., Hengster, P., Margreiter, R. (2009). The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1928-1939.
- Lecrenier, N., Foury, F. (2000). New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene* 246: 37-48.
- Lecrenier, N., Van Der Bruggen, P., Foury, F., (1997). Mitochondrial DNA polymerases from yeast to man: a new family of DNA polymerases. *Gene* 185: 147–152.
- Lee, D. Y., Clayton, D. A. (1996). Properties of a primer RNA-DNA hybrid at the mouse mitochondrial DNA leading-strand origin of replication. *J Biol Chem* 271: 24262-24269.

- Lee, Y. S., Kennedy, W. D., Yin, Y. W. (2009). Structural insight into processive human mitochondrial DNA synthesis and disease-related polymerase mutations. *Cell* 139: 312–324.
- Levine, D. W., Cooney, C. L. (1973). Isolation and characterization of a thermotolerant methanol-utilizing yeast. *Appl Microbiol* 26: 982-989.
- Levings, C. S. 3rd, Pring, D. R. (1976). Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and Texas cytoplasmic male-sterile maize. *Science* 193: 158–160.
- Lim, S. E., Longley, M. J., Copeland, W. C. (1999). The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase gamma enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance. *J Biol Chem* 274: 38197–38203.
- Longley, M. J., Prasad, R., Srivastava, D. K., Wilson, S. H., Copeland, W. C. (1998a). Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12244–12248.
- Longley, M. J., Ropp, P. A., Lim, S. E., Copeland, W.C. (1998b). Characterization of the native and recombinant catalytic subunit of human DNA polymerase gamma: identification of residues critical for exonuclease activity and dideoxynucleotide sensitivity. *Biochemistry* 37: 10529–10539.
- Lucas, P., Lasserre, J. P., Plissonneau, J., Castroviejo, M. (2004). Absence of accessory subunit in the DNA polymerase gamma purified from yeast mitochondria. *Mitochondrion* 4: 13-20.
- MacAlpine, D. M., Perlman, P. S., Butow, R. A. (2000). The numbers of individual mitochondrial DNA molecules and mitochondrial DNA nucleoids in yeast are co-regulated by the general amino acid control pathway. *EMBO J* 19: 767–775.
- Maleszka, R., Skelly, P.J., Clark-Walker, G.D. (1991). Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *EMBO J* 10: 3923-3929.
- Masters, B. S., Stohl, L. L., Clayton, D. A. (1987). Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell* 51: 89-99.
- Mecocci, P., MacGarvey, U., Kaufman, A. E., Koontz, D., Shoffner, J. M., Wallace, D. C., Beal, M. F. (1993). Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol* 34: 609-616.
- Meeusen, S., Nunnari, J. (2003). Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *J Cell Biol* 163: 503–510.

- Miyakawa, I., Miyamoto, M., Kuroiwa, T., Sando, N. (2004). DNA content of individual mitochondrial nucleoids varies depending on the culture conditions of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cytologia* 69: 101–107.
- 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.
- Murakami, E., Feng, J. Y., Lee, H., Hanes, J., Johnson, K. A., Anderson, K. S. (2003). Characterization of novel reverse transcriptase and other RNA-associated catalytic activities by human DNA polymerase gamma: importance in mitochondrial DNA replication, *J Biol Chem* 278: 36403–36409.
- Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 66: 863-917.
- Newton, K. J., Coe, E. H. (1986). Mitochondrial DNA changes in abnormal growth (nonchromosomal stripe) mutants of maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 7363–7366.
- Novagen (2003). pET System Manual, p. 11. 10th edition.
- Okamoto, K., Perlman, P. S., Butow, R. A. (1998). The sorting of mitochondrial DNA and mitochondrial proteins in zygotes: preferential transmission of mitochondrial DNA to the medial bud. *J Cell Biol* 142: 613–623.
- Papa, S. (1996). Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiopathological implications. *Biochim Biophys Acta* 1276: 87–105.
- Penta, J. S., Johnson, F. M., Wachsman, J. T., Copeland, W. C. (2001). Mitochondrial DNA in malignancy. *Mutat Res* 488: 119–133.
- Pinz, K. G., Bogenhagen, D. F. (1998). Efficient repair of abasic sites in DNA by mitochondrial enzymes. *Mol Cell Biol* 18: 1257-1265.
- Pohjoismäki, J. L., Goffart, S., Tynismaa, H., Willcox, S., Ide, T., Kang, D., Suomalainen, A., Karhunen, P. J., Griffith, J. D., Holt, I. J. (2009). Human heart mitochondrial DNA is organized in complex catenated networks containing abundant four-way junctions and replication forks. *J Biol Chem* 284: 21446–21457.
- Qian, Y., Kachroo, A. H., Yellman, C. M., Marcotte, E. M., Johnson, K. A. (2014). Yeast cells expressing the human mitochondrial DNA polymerase reveal correlations between polymerase fidelity and human disease progression. *J Biol Chem* 289: 5970-5985.

- Reinders, A., Romano, I., Wiemken, A., De Virgilio, C. (1999). The thermophilic yeast *Hansenula polymorpha* does not require trehalose synthesis for growth at high temperatures but does for normal acquisition of thermotolerance. *J Bacteriol* 181: 4665–4668.
- Ropp, P. A., Copeland, W. C. (1996). Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA polymerase, DNA polymerase γ . *Genomics* 36: 449-458.
- Ryabova, O.B., Chmil, O.M., Sibirny, A.A. (2003). Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res* 4: 157-164.
- Sahm, H. (1977). Metabolism of methanol by yeasts. *Adv Biochem Eng* 6: 77-103.
- Sambrook, J., Russel, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schaefer, S., Piontek, M., Ahn, S.-J., Papendieck, A., Janowicz, Z. A., Gellissen, G. 2001. Recombinant hepatitis B vaccines - characterization of the viral disease and vaccine production in the methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*, p. 245-274. In K. Dembowski, P. Stadler (ed.), *Novel Therapeutic Proteins: Selected Case Studies*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Scopes, R. K. (1994). *Protein purification - principles and practice*, p. 76-85. 3rd edition, Springer, USA.
- Sen, D., Nandakumar, D., Tang, G.-Q., Patel, S. S. (2012). Human mitochondrial DNA helicase TWINKLE is both an unwinding and annealing helicase. *J Biol Chem* 287: 14545-14556.
- Simsek, D., Furda, A., Gao, Y., Artus, J., Brunet, E., Hadjantonakis, A. K., Van Houten, B., Shuman, S., McKinnon, P. J., Jasin, M. (2011). Crucial role for DNA ligase III in mitochondria but not in Xrcc1-dependent repair. *Nature* 471: 245–248.
- Smeitink, J., van den Heuvel, L., DiMauro, S. (2001). The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nature Rev Genet* 2: 342–352.
- Spelbrink, J. N., Li, F.Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q. P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L., Santoro, L., Toscano, A., Fabrizi, G. M., Somer, H., Croxen, R., Beeson, D., Poulton, J., Suomalainen, A., Jacobs, H.T., Zeviani, M., Larsson, C. (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature Genet* 28: 223–231.

- Zelenaya-Troitskaya, O., Newman, S. M, Okamoto, K., Perlman, P. S., Butow, R. A. (1998). Functions of the high mobility group protein, Abf2p, in mitochondrial DNA segregation, recombination and copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148: 1763–1776.
- Zhang, H., Chatterjee, A., Singh, K. K. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* polymerase zeta functions in mitochondria. *Genetics* 172: 2683–2688.
- Zuo, X. M., Clark-Walker, G. D., Chen, X. J. (2002). The mitochondrial nucleoid protein, Mgm101p, of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the maintenance of rho(1) and ori/rep-devoid petite genomes but is not required for hypersuppressive rho(-) mtDNA. *Genetics* 160: 1389–1400.
- Tapper, D. P., Clayton, D. A. (1981). Mechanism of replication of mitochondrial DNA. Localization of the 5' ends of nascent daughter strands. *J Biol Chem* 256: 5109-5115.
- Trifunović, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., Törnell, J., Jacobs, H. T., Larsson, N. G. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429: 417–423.
- Tyynismaa, H., Sembongi, H., Bokori-Brown, M., Granycome, C., Ashley, N., Poulton, J., Jalanko, A., Spelbrink, J. N., Holt, I. J., Suomalainen, A. (2004). Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Hum Mol Genet* 13: 3219–3227.
- van der Klei, I. J., Veenhuis, M. (1996). Peroxisome biogenesis in the yeast *Hansenula polymorpha*: a structural and functional analysis. *Ann N Y Acad Sci* 804: 47-59.
- van der Klei, I. J., Veenhuis, M. (1997). Yeast peroxisomes: function and biogenesis of a versatile cell organelle. *Trends Microbiol* 5: 502-509.
- Van Dyck, E., Foury, F., Stillman, B., Brill, S. J. (1992). A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB. *EMBO J* 11: 3421–3430.
- Van Goethem, G., Dermaut, B., Lofgren, A., Martin, J. J., Van Broeckhoven, C. (2001). Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* 28: 211–212.
- Vanderstraeten, S., van den Brule, S., Hu, J., Foury, F. (1998). The role of 3'-5' exonucleolytic proofreading and mismatch repair in yeast mitochondrial DNA error avoidance. *J Biol Chem* 273: 23690-23697.

- Varejão, N., Almeida, Mda S., De Cicco, N. N., Atella, G. C., Coelho, L. C. Correia, M. A., Foquel, D. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). *Biochim Biophys Acta* 1804: 1917-1924.
- Vera, A., Gonzáles-Montalbán, N., Arís, A., Villaverde, A. (2007). The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnol Bioeng* 96: 1101-1106.
- Viikov, K., Jasnovidova, O., Tamm, T., Sedman, J. (2012). C-terminal extension of the yeast mitochondrial DNA polymerase determines the balance between synthesis and degradation. *PloS ONE* 7: e33482.
- Viikov, K., Våljamäe, P., Sedman, J. (2010). Yeast mitochondrial DNA polymerase is a highly processive single-subunit enzyme. *Mitochondrion* 11: 119-126.
- von Heijne, G. (1986). Why mitochondria need a genome. *FEBS Lett* 198: 1–4.
- Wang, Y., Bogenhagen, D. F. (2006). Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 281: 25791–25802.
- Wanrooij, S., Falkenberg, M. (2010). The human mitochondrial replication fork in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1378–1388.
- Ward, B. L., Anderson, R. S., Bendich, A. J. (1981). The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (Cucurbitaceae). *Cell* 25: 793-803.
- Wernette, C. M., Kaguni, L. S. (1986). A mitochondrial DNA polymerase from embryos of *Drosophila melanogaster*. Purification, subunit structure and partial characterization. *J Biol Chem* 261: 14764–14770.
- Wintersberger U., Wintersberger, E. (1970). Studies on deoxyribonucleic acid polymerases from yeast. 2. Partial purification and characterization of mitochondrial DNA polymerase from wild type and respiration-deficient yeast cells. *Eur J Biochem* 13: 20-27.
- Wong, T. W., Clayton, D. A. (1986). DNA primase of human mitochondria is associated with structural RNA that is essential for enzymatic activity. *Cell* 45: 817-825.
- Xu, B., Clayton, D. A. (1995). A persistent RNA-DNA hybrid is formed during transcription at a phylogenetically conserved mitochondrial DNA sequence. *Mol Cell Biol* 15: 580-589.

Xu, B., Clayton, D. A. (1996). RNA-DNA hybrid formation at the human mitochondrial heavy-strand origin ceases at replication start sites: an implication for RNA-DNA hybrids serving as primers. *EMBO J* 15: 3135-3143.

Yakubovskaya, E., Chen, Z., Carrodeguas, J. A., Kisker, C., Bogenhagen, D. F. (2006). Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer. *J Biol Chem* 281: 374–82.

Yang, M. Y., Bowmaker, M., Reyes, A., Vergani, L., Angeli, P., Gringeri, E, Jacobs, H. T., Holt, I. J. (2002). Biased Incorporation of Ribonucleotides on the Mitochondrial L-Strand Accounts for Apparent Strand-Asymmetric DNA Replication. *Cell* 111: 495-505.

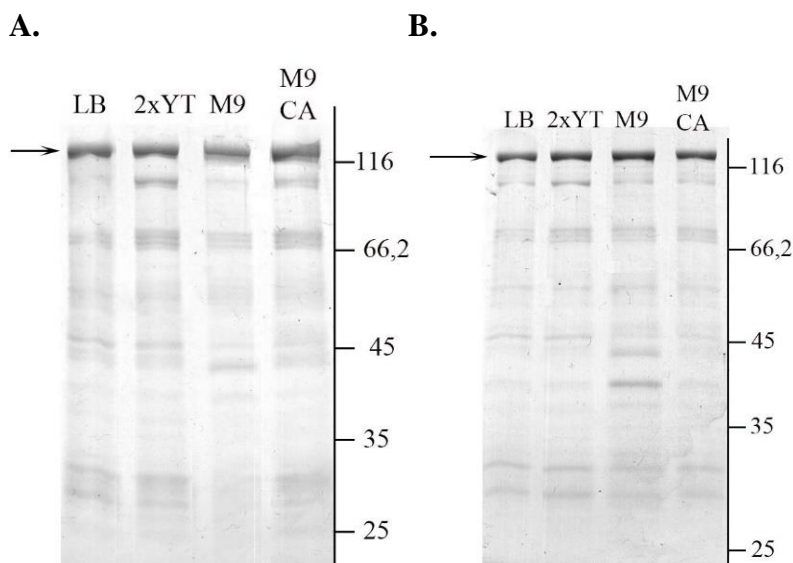
Yasukawa, T., Yang, M. Y., Jacobs, H. T., Holt, I. J. (2005). A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Mol Cell* 18: 651-662.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

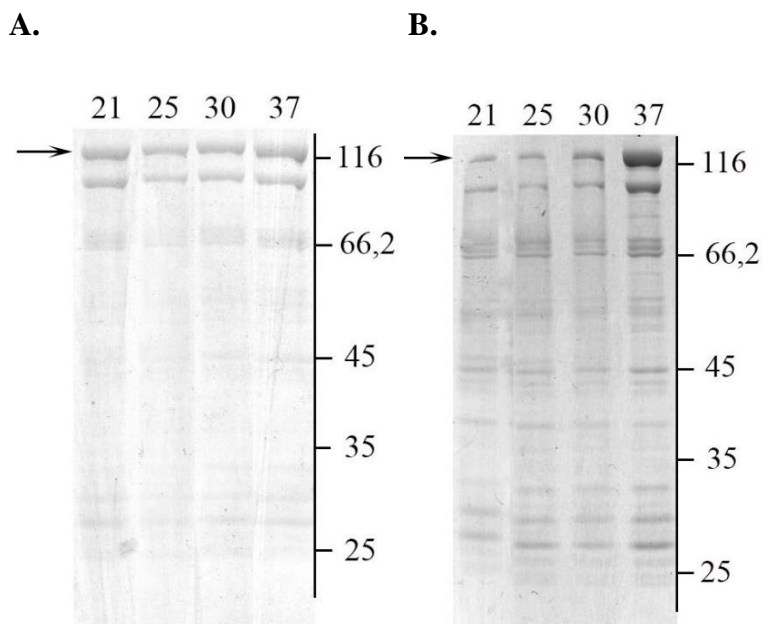
Sybirny, A.A. Hansenula polymorpha NCYC495 leu1.1 v2.0: <http://genome.jgi-psf.org/Hanpo1/Hanpo1.home.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

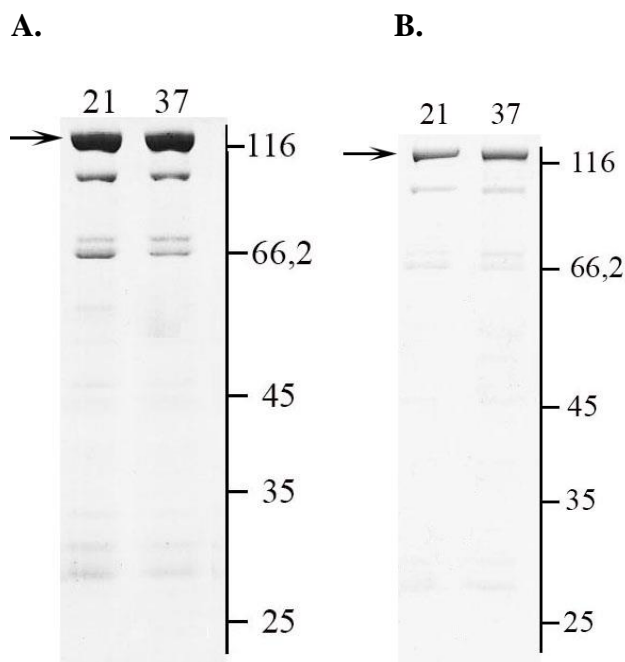
LISAD



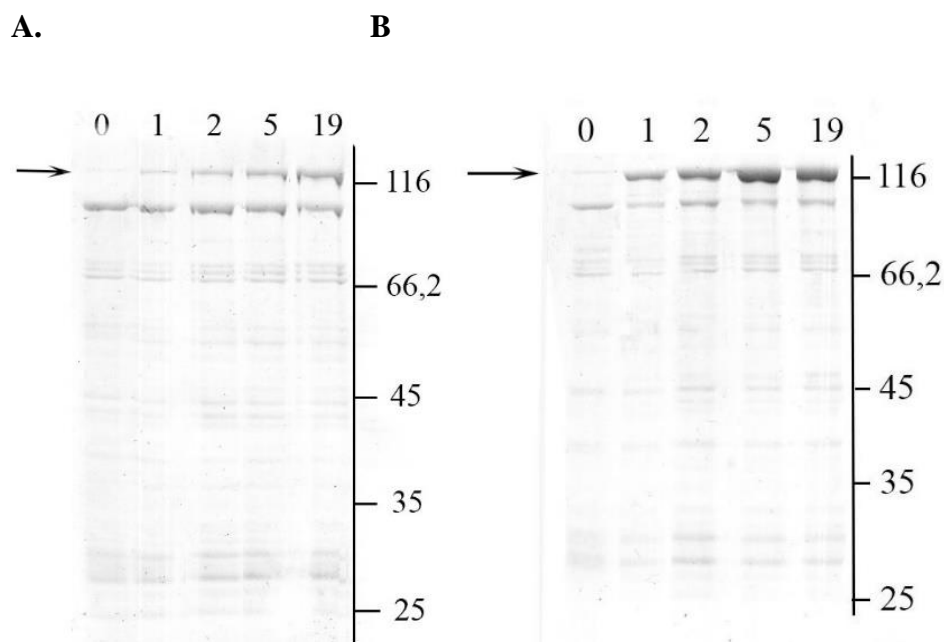
Lisa 1. Ekspressiooni optimeerimine – optimaalseima söötme leidmine. SDS-polüakrüülamiidgeelide pildid, mille paremale küljele on märgitud molekulmasside marker (kDa). Analüüsitud söötmed on näidatud ülises servas (M9 CA – M9 minimaalsööde kasaminohapetega). Noolega on märgitud Mip1 asukoht geelil. **A.** Väikeses mahus Ni-NTA afiinsuskromatograafiaga puhastatud lüsaadi eluaat (geelil analüüsitud proovi maht oli 16 µl). **B.** Väikeses mahus Ni-NTA afiinsuskromatograafilisel puhastamisel kasutatud Ni-NTA agaros (geelil analüüsitud proovi maht sisaldas ligikaudu 1/5 materjalist, mis ei elueerunud imidasooliga).



Lisa 2. Ekspressiooni optimeerimine – optimaalseima temperatuuri leidmine. SDS-polüakrüülamiidgeelide pildid, mille paremale küljele on märgitud molekulmasside marker (kDa) ja ülisesse serva, mis temperatuuri juures rakukultuuris toimuv Mip1 ekspressioon läbi viidi (°C). Noolega on märgitud Mip1 asukoht geelil. **A.** Väikeses mahus Ni-NTA afiinsuskromatograafiaga puhastatud lüsaadi eluaat (geelil analüüsitud proovi maht oli 14 µl). **B.** Väikeses mahus Ni-NTA afiinsuskromatograafilisel puhastamisel kasutatud Ni-NTA agaros (geelil analüüsitud proovi maht sisaldas ligikaudu 1/5 materjalist, mis ei elueerunud imidasooliga).

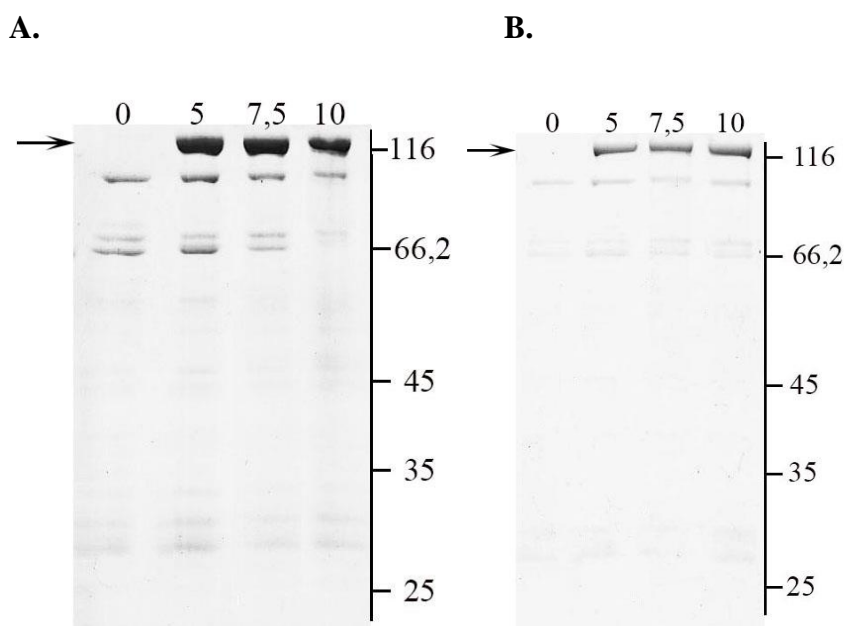


Lisa 3. Ekspressiooni optimeerimine – optimaalseima temperatuuri leidmise lisakatse. SDS-poliakrüülamiidgeelide pildid, mille paremale küljele on märgitud molekulmasside marker (kDa) ja ülemisse serva, mis temperatuuri juures rakukultuuris toimuv Mip1 ekspressioon läbi viidi (°C). Noolega on märgitud Mip1 asukoht geelil. **A.** Väikeses mahus Ni-NTA afiinsuskromatograafiaga puhastatud lüsaadi eluaat (geelil analüüsitud proovi maht oli 12 µl). **B.** Väikeses mahus Ni-NTA afiinsuskromatograafilisel puhastamisel kasutatud Ni-NTA agarooos (geelil analüüsitud proovi maht sisaldas ligikaudu 1/5 materjalist, mis ei elueerunud imidasooliga).

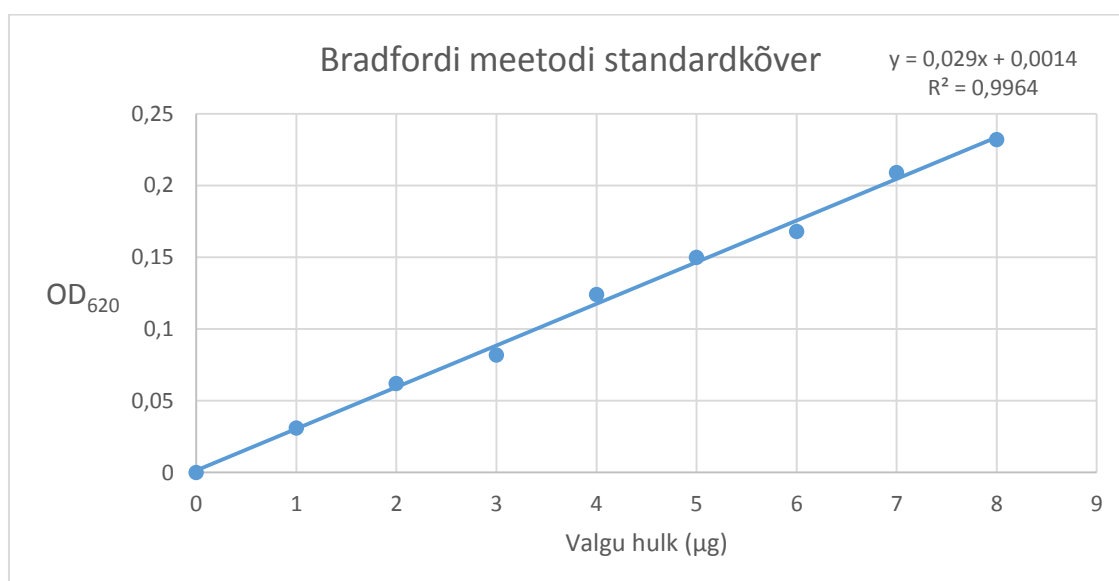


Lisa 4. Ekspressiooni optimeerimine – optimaalseima induktiooniaja leidmine. SDS-poliakrüülamiidgeelide pildid, mille paremale küljele on märgitud molekulmasside marker (kDa) ja ülemisse serva, kaua kestis Mip1 ekspressioon (h). Noolega on märgitud Mip1 asukoht geelil. **A.** Väikeses mahus Ni-NTA afiinsuskromatograafiaga puhastatud lüsaadi eluaat (geelil analüüsitud proovi maht oli 12 µl). **B.** Väikeses mahus Ni-NTA

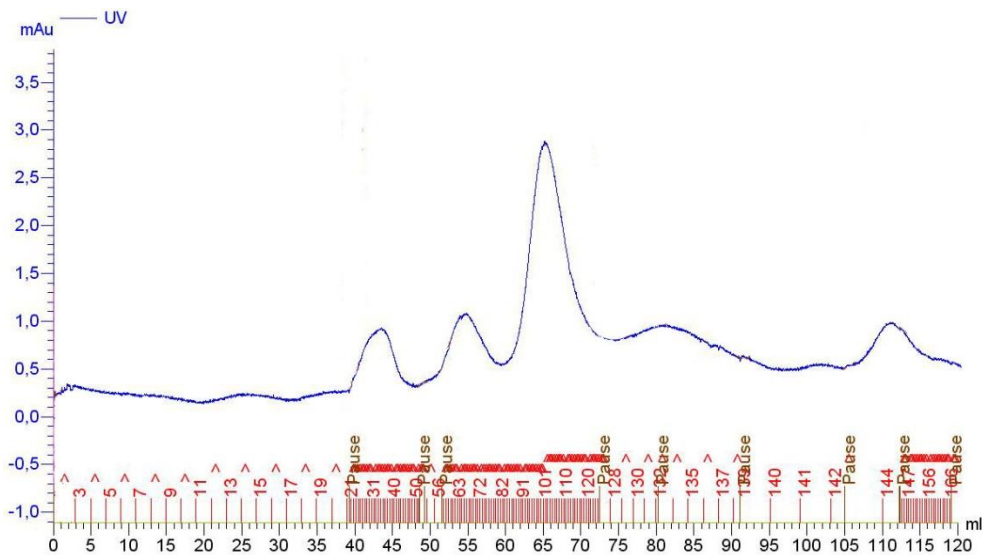
afiinsuskromatograafilisel puhastamisel kasutatud Ni-NTA agarooos (geelil analüüsitud proovi maht sisaldas ligikaudu 1/5 materjalist, mis ei elueerunud imidasooliga).



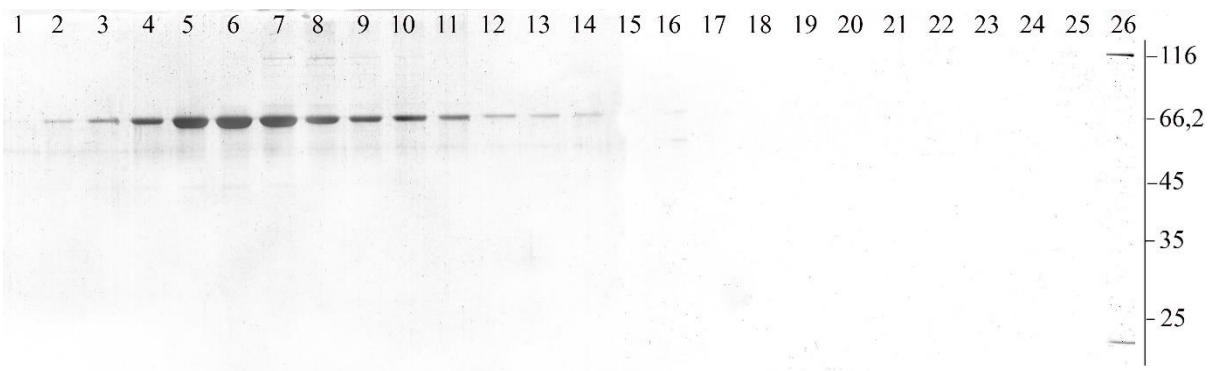
Lisa 5. Ekspressiooni optimeerimine – optimaalseima induktsioonaja leidmise lisakatse. SDS-polüakrüülamiidgeelide pildid, mille paremale küljele on märgitud molekulmasside marker (kDa) ja ülemisse serva, kuu kestis Mip1 ekspressioon (h). Noolega on märgitud Mip1 asukoht geelil. **A.** Väikeses mahus Ni-NTA afiinsuskromatograafiaga puhastatud lüsaadi eluaat (geelil analüüsitud proovi maht oli 12 µl). **B.** Väikeses mahus Ni-NTA afiinsuskromatograafilisel puhastamisel kasutatud Ni-NTA agarooos (geelil analüüsitud proovi maht sisaldas ligikaudu 1/5 materjalist, mis ei elueerunud imidasooliga).



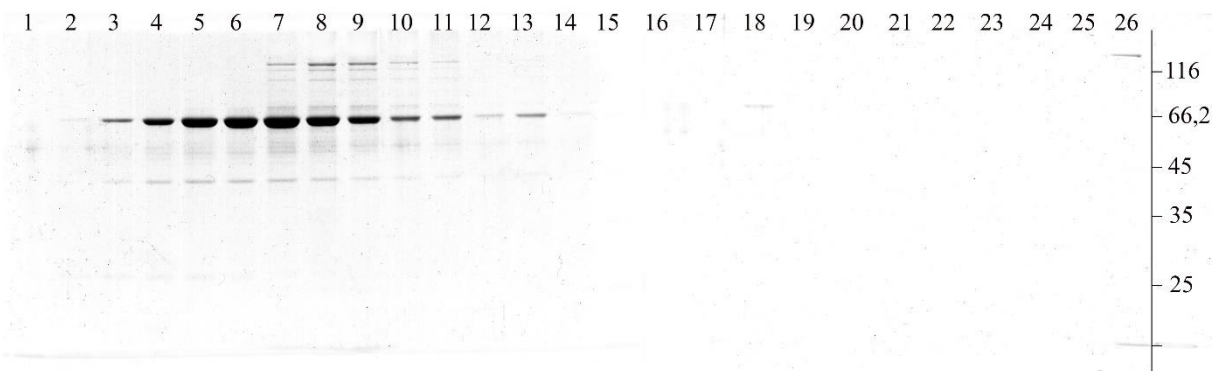
Lisa 6. Valgukontsentratsiooni arvutamiseks kasutatud standardkõver ja sirge võrrand.



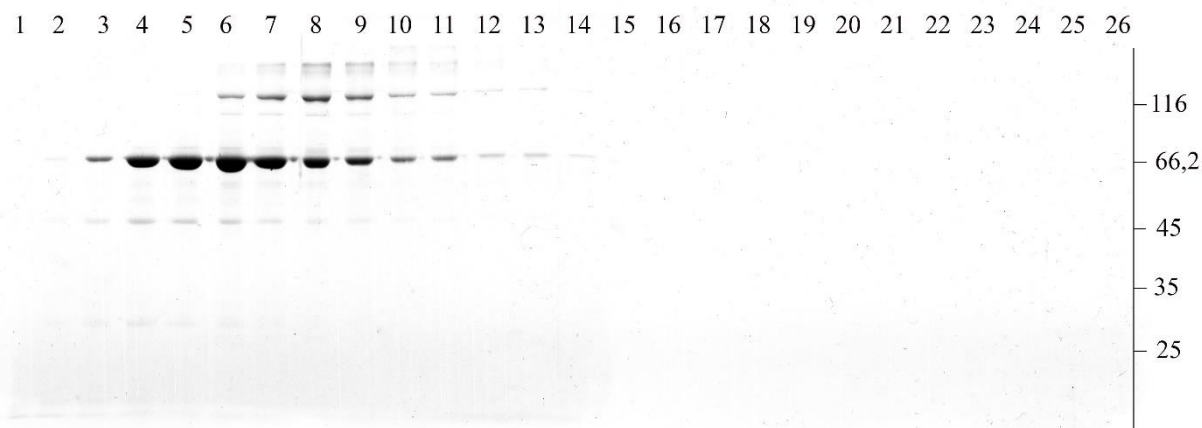
Lisa 7. Geelfiltratsioon Superdex 200 kolonnil. Ühe kolonnimahu (120 ml) voolutamisel koguti neli kõrgeima valgukontsentratsiooniga fraktsioonide komplekti. Joonise abstsisssteljel on punaselt toodud fraktsioonide numbrid ning mustalt läbivoolutatud puhvri maht. Ordinaatteljel toodud neelduvust mõõdeti lainepikkusel 280 nm.



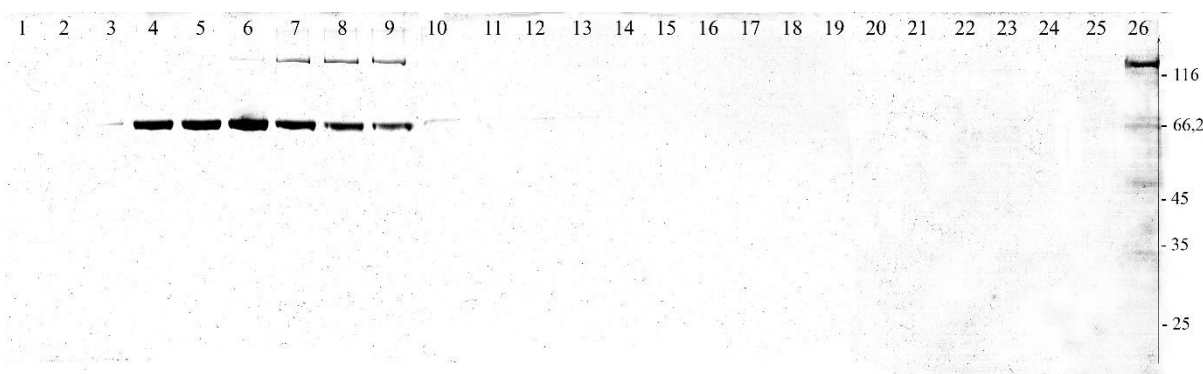
Lisa 8. Glütserooligradiendi sedimentatsioonijärgsed fraktsioonid, mis ei sisaldanud ühtegi detergenti. Geelipildi paremal küljel on toodud valgu molekulmassi marker (kDa) ja ülemises servas fraktsiooni number. 1 vastab gradiendi pinnale. Mip1 suurim kontsentratsioon on näha fraktsioonides 7-9 ning 26. ~66 kDa molekulmassiga valk on BSA. Geelil on analüüsitud 14 µl igast fraktsioonist.



Lisa 9. Glütserooligradiendi sedimentatsioonijärgsed fraktsioonid, mis sisaldasid 0,1% NP-40-t. Geelipildi paremal küljel on toodud valgu molekulmassi marker (kDa) ja ülemises servas fraktsiooni number. 1 vastab gradiendi pinnale. Mip1 suurim kontsentratsioon on näha fraktsioonides 7-10 ning 26. ~66 kDa molekulmassiga valk on BSA. Geelil on analüüsitud 14 µl igast fraktsioonist.



Lisa 10. Glütserooligradiendi sedimentatsioonijärgsed fraktsioonid, mis sisaldasid 0,1% Tween 20-t. Geelipildi paremal küljel on toodud valgu molekulmassi marker (kDa) ja ülemises servas fraktsiooni number. 1 vastab gradiendi pinnale. Mip1 suurim kontsentratsioon on näha fraktsioonides 7-9. ~66 kDa molekulmassiga valk on BSA. Geelil on analüüsitud 13 µl igast fraktsioonist.



Lisa 11. Glütserooligradiendi sedimentatsioonijärgsed fraktsioonid, mis sisaldasid 0,1% Triton X-100-t. Geelipildi paremal küljel on toodud valgu molekulmassi marker (kDa) ja ülemises servas fraktsiooni number. 1 vastab gradiendi pinnale. Mip1 suurim kontsentratsioon on näha fraktsioonides 7-9 ning 26. ~66 kDa molekulmassiga valk on BSA. Geelil on analüüsitud 10 µl igast fraktsioonist.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Paula Salme Sandrak

(sünnikuupäev: 28.11.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Termotolerantse mikroorganismi mitokondriaalse DNA polümeraasi puhastamine,

mille juhendaja on professor Juhan Sedman,

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

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **18.06.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 23.05.2013