

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

Karin Villemson

IRC3 VALGU MÕJU MITOKONDRIAALSE GENOOMI
STABIILSUSELE

Magistritöö

Juhendaja: Tiina Sedman, PhD

Tartu

2013

Sisukord

| | |
|--|----|
| Kasutatud lühendid..... | 4 |
| Sissejuhatus | 5 |
| 1. Kirjanduse ülevaade | 6 |
| 1.1 Mitokonder ja mitokondriaalne genoom | 6 |
| 1.2 <i>S. cerevisiae</i> mtDNA replikatsioon | 7 |
| 1.3 Mitokondri genoomi säilimiseks vajalikud valgud | 10 |
| 1.4 Valkude transport mitokondrisse | 12 |
| 1.4.1 Mitokondriaalne transpordi signaal | 13 |
| 1.4.2 Mitokondriaalne translokatsiooniaparaat | 14 |
| 1.5 Helikaasid..... | 15 |
| 1.5.1 Helikaaside superperekonnad..... | 16 |
| 1.5.2 Helikaasi konserveerunud motiivid ja nende funktsioonid | 18 |
| 1.5.3 DEAD/H- box helikaasid | 21 |
| 1.6 <i>S. cerevisiae</i> Irc geenid..... | 23 |
| 2. Töö eesmärk | 25 |
| 3. Materjalid ja meetodid | 26 |
| 3.1 Kasutatud bakteritüved, pärmitüved ja söötmed | 26 |
| 3.2 Kasutatud plasmiidid..... | 29 |
| 3.3 PCR reaktsioonid..... | 29 |
| 3.4 Plasmiidide kloneerimine | 30 |
| 3.5 Geelelektroforees ning DNA geelist puhastamine | 33 |
| 3.6 <i>S. cerevisiae</i> tüvede tegemine kasutades LioAc meetodit..... | 34 |
| 3.7 Plasmidi välja vahetamine 5-FOA süsteemiga | 35 |
| 3.8 <i>S. cerevisiae</i> DNA eraldamine | 36 |
| 3.9 Southern Blot ja hübridisatsioon | 37 |

| | |
|--|----|
| 4. Tulemused ja arutelu | 39 |
| 4.1 Mutantse Irc3 valgu mõju <i>S. cerevisiae</i> mitokondriaalsele genoomile..... | 40 |
| 4.2 <i>S. cerevisiae</i> mtDNA analüüs..... | 45 |
| Kokkuvõte | 61 |
| The role of Irc3 in mitochondrial genome maintenance | 62 |
| Kirjanduse loetelu | 63 |
| Lisad | 71 |

Kasutatud lühendid

mtDNA- mitokondriaalne DNA

bp- aluspaar (*base pair*)

wt- metsiktüüpi (*wild type*)

SF- superperekond (*superfamilie*)

rpm- pööret minutis (*rounds per minute*)

5-FOA- 5- fluorooroonhape

ori- *origin of replication*

ORF- avatud lugemisraam (*open reading frame*)

EtBr- etiidiumbromiid

EtOH- etanool

sc- *supercoiled*

ssDNA- üheaheelaline DNA (*single stranded DNA*)

dsDNA- kaheaheelaline DNA (*double stranded DNA*)

RDR- rekombinatsiooni poolt initsieeritud replikatsioon (*recombination driven DNA replication*)

MTS- maatriksisse suunav järjestus (*matrix targeting sequence*)

HR- homologiline rekombinatsioon

S- supressiivne

HS- hüpersupressiivne

2D-AGE- kahedimensionaalne agarosgeelelektroforees

Sissejuhatus

Eukarüootse mudelorganismi *S. cerevisiae* mitokondril on iseseisev genoom, mis kodeerib mitokondri hingamisahela olulisi komponente. Selle replitseerumiseks ning funktsionaalsuse säilimiseks on vaja tuuma poolt kodeeritud valke. Sellised valgud sünteesitakse tsütosoolis ribosoomidel ning transporditakse mitokondrisse spetsiaalsete signaaljärjestuste ning mitokondriaalsete translokaasikomplekside abil. Üle poole mitokondriaalsetest valkudest sünteesitakse N-terminaalse signaaljärjestusega, mille abil suunatakse valk mitokondri maatriksisse.

Nukleiinhapete metabolismiga seonduvates protsessides on väga olulisel kohal helikaasid, mis katalüüsivad kaheaahelalise nukleiinhappe lahtikeeramist, kasutades selleks peamiselt ATP hüdroolüüsist saadud energiat. Nende funktsiooni tagavad konserveerunud motiivid, mille alusel jagatakse helikaasid erinevatesse klassidesse.

Töös uuritav Irc3 on seni tundmatu funktsiooniga mitokondriaalne valk, mis sarnaneb DEAD/H- *box* helikaasidele.

Käesoleva töö esimeses osas uuriti Irc3 võimalikke funktsioone mitokondris, kasutades mutantseid Irc3 ekspressioonikonstrukte. Teises osas uuriti Irc3 mõju mitokondriaalse DNA stabiilsusele, analüüsides selle hulka ja topoloogiat kahedimensionaalsel agarosgeel elektroforeesil.

Käesoleva töö autor tänab oma juhendajat Dr. Tiina Sedmani põhjaliku juhendamise ja igakülgse abi eest ning Prof. Juhan Sedmani nõuannete eest katsete tegemisel.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Mitokonder ja mitokondriaalne genoom

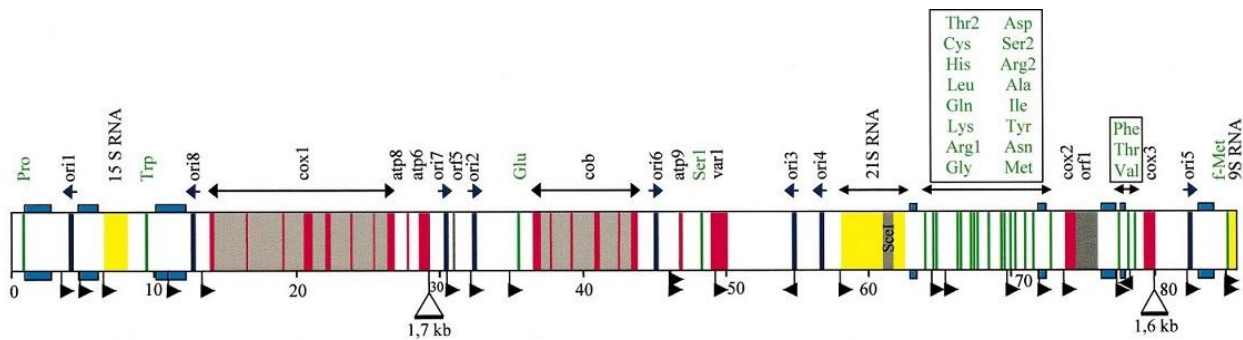
Mitokonder on eukarüootsetes organismides esinev organell, mis on varustatud kaksikmembraaniga, ning millel on oma eraldiseisev genoom. Mitokondrid osalevad arvukates raku elutegevusega seotud protsessides nagu signalisatsioon, rakuline diferentseerumine, raku surm, rakutsükli kontroll ja raku kasvamine. Mitokondrits toodetakse enamuse rakule vajaminevast ATP-st oksüdatiivse fosforüleerimise käigus. ATP sünteesiapparaadi biogenees sõltub kahe eraldiseisva üksuse, tuumagenoomi ja mitokondriaalse genoomi, koostööst. Kuna mitokondriaalne DNA (mtDNA) kodeerib hingamisahela olulisi komponente, on oluline, et selle pärandumine ja säilumine toimuks vigadeta (Chen ja Butow, 2005). Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* on väga hea mudelorganism mitokondriaalsete protsesside uurimiseks, kuna ta on fakultatiivne anaeroob ning suudab kasvada mittefermenteeritaval süsinikuallikal. Seetõttu talub ta ka deletsioone mtDNA-s või sootuks selle puudumist (Ephrussi jt., 1955).

S. cerevisiae mitokondriaalne DNA on kompaktselt pakitud valk-DNA kompleksi, mida kutsutakse nukleoidiks. Aeroobsetes rakkudes on keskmiselt 40-60 mitokondriaalset nukleoidi, diameetriga 0,2 kuni 0,4 µm, anaeroobsetes rakkudes keskmiselt 6,7 suurt nukleoidi, diameetriga 0,6 kuni 0,7 µm, kusjuures DNA hulk mõlemas on sama (Shiiba jt., 1997; Miyakawa jt., 1987).

MtDNA moodustab kogu *S. cerevisiae* genoomist umbes 15% ning koosneb umbes 50-st 75 kuni 80 kbp (*base pair*- aluspaar) suurusest molekulist (Dujon, 1981; Maleszka jt., 1991). Vähesel määral leidub ka tsirkulaarseid molekule, kuid pole teada, kas tsirkulaarsed molekulid on funktsionaalsed üksused või puudub neil roll mitokondri funktsiooni säilimisel (Lecrenier ja Foury, 2000).

S. cerevisiae genoomi iseloomustab madal geenitihedus ja kõrge A-T sisaldus (Bernardi jt., 1972). Geenide G-C sisaldus on umbkaudu 30%, geenidevaheline ala koosneb enamuses mitmesaja bp pikkustest AT-rikastest klastritest, millede vahel on 10 – 80 bp pikkused G-C klastrid. Pärsi mitokondriaalne genoom koosneb geenidest, mis kodeerivad tsütokroom c oksüdaasi alaühikuid I, II ja III (cox1, cox 2, cox3), ATP süntaasi alaühikuid 6, 8 ja 9 (atp6, atp8, atp9), apotsütokroom b (cytb), ribosomaalset valku (var1) ja mitmeid

introniga seotud ORF-e (*open reading frame*- avatud lugemisraam) (Tzagolo ja Mayers, 1986; de Zamaroczy ja Bernardi, 1986). Lisaks sisaldab mtDNA seitset kuni kaheksat replikatsiooni *origin*- laadset elementi ja kodeerib 21S ja 15S ribosomaalset RNA-d, 24 tRNA-d ja RNAas P 9S subühikut (de Zamaroczy ja Bernardi, 1986). Kõik geenid transkribeeritakse samalt ahelalt (Foury jt., 1998) (Joonis 1).



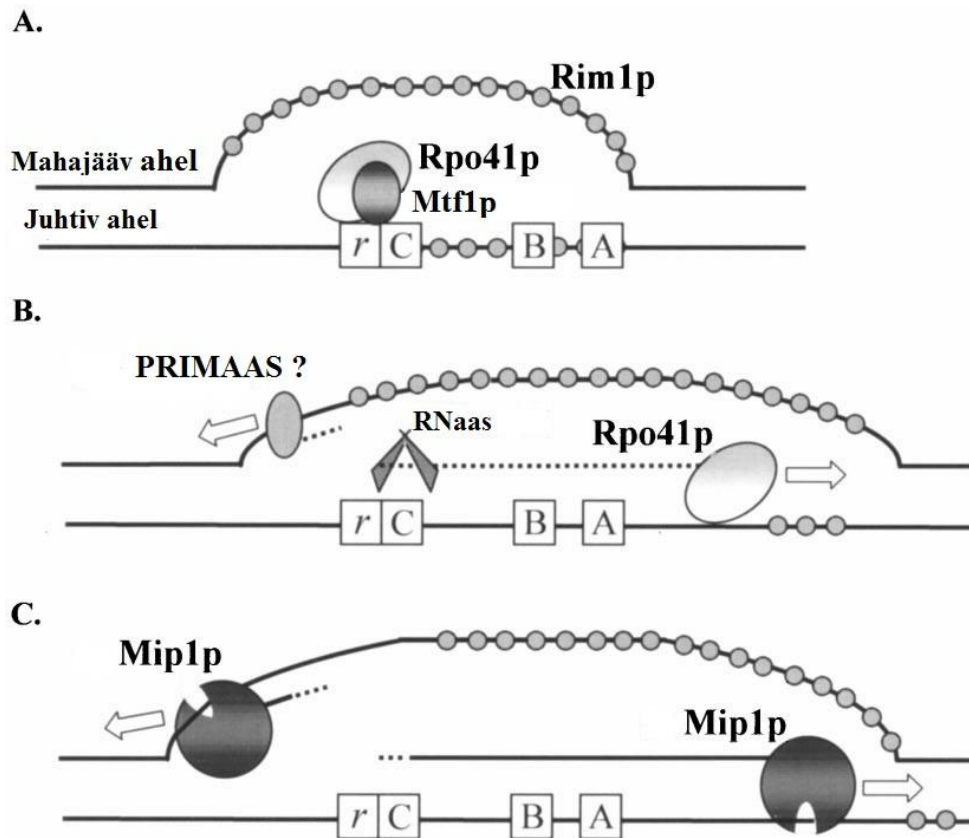
Joonis 1. Mitokondri genoomi lineariseeritud kaart pärmi tüvest FY1679. Punased: eksonid ja valke kodeerivad geenid; hall: intonid või intoniga seotud ORF-d; roheline: tRNA; kollane: 9S, 15S 21S RNA; tumesinine: *ori*-d; lipukesed märgivad transkriptsiooni initsiatsioonisaite ja nende orientatsiooni; 2 suurt deletsiooni on märgitud kolmnurkadega (Foury jt., 1998).

Olenevalt *S. cerevisiae* tüvest, võib mtDNA sisaldada 7 või 8 erinevat *ori* järjestust. *Ori* järjestused on kõrgelt konserveerunud, umbes 280 bp pikad ning koosnevad 3-st G-C kastrist: A, B ja C. Neid eraldavad 4 A-T rikkast klastrit, millest klastrid *p* ja *s* paiknevad A ja B vahel; klaster *l* paikneb B ja C vahel ning klaster *r* paikneb vahetult C järel (*ori* 3 – 7) või eraldab neid lisaklaster *r'* (*ori* 1 ja 2). Suurim erinevus *ori* järjestuste vahel on kahe G-C rikka lisaklastrit, β ja γ , olemasolu, mis paiknevad *ori*-de 4 ja 6 *l*- klastris või *ori*-de 4,6,7 *r*- klastrit keskel. Klaster *r* on transkriptsiooni initsiatsiooni alguskoht ning insertioon selles elimineerib potentsiaalse initsiatsioonisaidi (Joonis 2). A-B klastrite ulatuses võib moodustuda ka juuksenõelastruktuure β ja γ vahendusel. *Ori* 2, 5, 6, 7 on orienteeritud C→A suunas, *ori*-d 1, 3 ja 4 vastassuunas. *Ori* järjestustest omavad aktiivset promootorit vaid *ori*-d 2,3 ja 5 (deZamaroczy jt., 1984; Foury jt., 1998).

1.2 *S. cerevisiae* mtDNA replikatsioon

Arvatakse, et *S. cerevisiae*-s toimub mtDNA replikatsioon RNA praimerit kasutades. RNA polümeraasi kompleks (Rpo41-Mtf1) sünteesib juhtiva ahela *r*- klastrilt RNA ahela, mida lõikab RNAas, ning moodustub lühike RNA praimer. Mahajääval ahelal sünteesitakse praimer primaasi poolt promootorpiirkonnast eespool. Mip1 polümeraas kasutab praimereid

uue DNA ahela elongatsiooniks (Lecrenier ja Foury, 2000) (Joonis 2). Lisaks sellele teooriale peab aga eksisteerima ka alternatiivne mehhanism, kuna katsed on näidanud, et Rpo41 pole vaja ρ^- genoomi säilimiseks (Fangman jt., 1990).



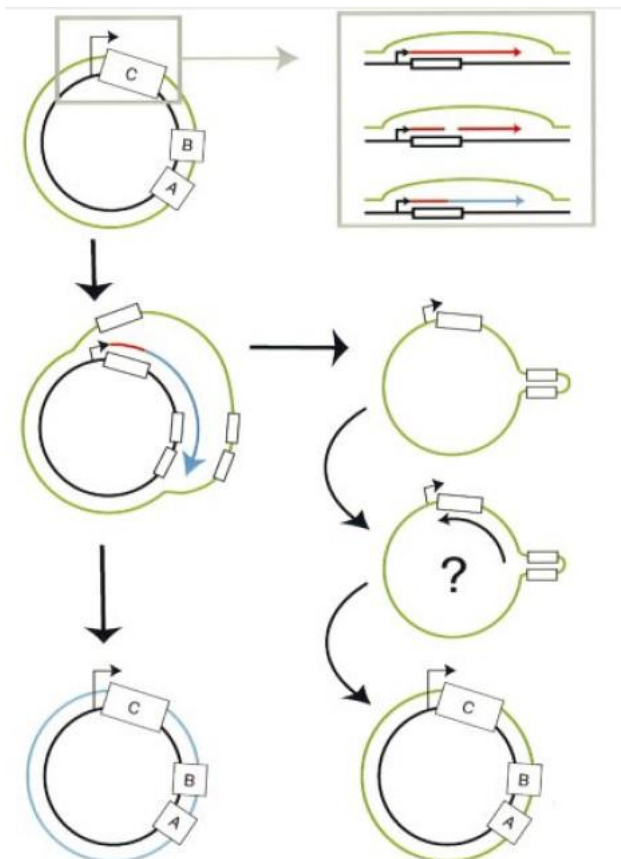
Joonis 2. Ori järjestuse konserveerunud klastrite organisatsioon ja *S. cerevisiae* replikatsioonimudel.

Kujutatud on A, B ja C klastrid ning A-T rikas klaster *r*. **A:** Mitokondriaalne RNA polümeraasi kompleks Rpo41-Mtf1 seondub juhtival ahelal *r*- segmendile ning alustab RNA ahela sünteesi. **B:** RNA lõigatakse RNAasi poolt ning moodustub lühike RNA praimer. Mahajääval ahelal sünteesitakse RNA praimer primaasi poolt promootorist eespool. **C:** Mip1 polümeraas kasutab primereid uue DNA ahela elongatsiooniks. Pidev joon- DNA ahel; punktiirjoon- RNA ahel; nooled- replikatsiooni suund (muudetult Lecrenier ja Foury, 2000).

Mitokondri genoomi hinnatakse rho (ρ) faktoriga ning jagatakse ρ^+ , ρ^- või ρ^0 . Metsiktüüpi mtDNA-ga rakke kutsutakse ρ^+ , neid, mille mitokondriaalne genoom on täielikult kadunud ρ^0 , ning rakke, mille mtDNA-s on deletsioonid ρ^- . ρ^- genotüübiga mutantides moodustavad mitokondriaalse DNA molekuli regulaarselt korduvad wt (*wild type*-metsiktüüpi) genotüübi fragmendid. Fragmendid paiknevad *head-to-tail* kordustena või on organiseeritud pöördkordustena või palindroomselt (Dujon, 1981). ρ^- ja ρ^0 genotüübiga rakud moodustavad fermenteeritaval süsinikuallikal väikeseid „*petite*“ kolooniaid, kuna neil puudub funktsioneeriv hingamisahel. ρ^+ genotüübiga rakud hingavad normaalselt ning moodustavad suuri „*grande*“ kolooniaid. ρ^-/ρ^0 ja ρ^+ genotüübiga rakkude ristamisel moodustub

heteroplasmiline sügoot. Selle jagunemisel tütarakkudeks toimub mtDNA segregatsioon. Vastavalt sellele, kui suure osa tütarakkudest moodustavad ρ^-/ρ^0 genotüübiga rakud, määratakse ρ^-/ρ^0 supressiivsus. Kui järglased moodustavad enim ρ^+ genotüübiga rakke, on tegemist neutraalse genotüübiga. Kui järglaste seas on suures osas (kuni 95%) *petite* rakke, on tegemist supressiivsusega ning kui järglased on kuni 100% ulatuses ρ^- genotüübiga, on tegemist hüpersupressiivsusega (Blanc ja Dujon, 1980).

Kuna ρ^- rakkudest on leitud ssDNA rõngasmolekule, siis on välja pakutud võimalus, et ρ^- rakkudes toimub replikatsioon veereva ratta mudeli järgi, kus ssDNA molekulid on replikatsiooni intermediaadid. Selle mudeli kohaselt initsieeritakse transkriptsioon *C box*'i ees asuvalt promootorilt ning dsDNA rõngasmolekuli ahelad nihkuvad paigast. Transkript protsessitakse *C box*'i juures, vabastades 3'OH otsa ning algab replikatsiooni elongatsioon. Selle käigus nihkub *sense* ahel ning replikatsiooniprotsessi lõpus vabaneb ta tsirkulaarse ssDNA molekulina. ssDNA mahajääva ahela replikatsioon võib alguse saada A ja B *box*'i juures moodustuvast juuksenõelastruktuurist (Joonis 3). Kuid osade ρ^- genoom ei sisalda replikatsiooni *origin*'i ega sellega seotud promootorit. On näidatud, et ka *ori* promootori muteerimisel või selle puudumisel püsib ρ^- rakkudes transkriptide tase muutumatuna tänu alternatiivsetele initsiatsioonisahtidele (MacAlpine jt., 2001).



Joonis 3. *Ori5*-sõltuv mtDNA replikatsiooni mudel. Transkriptsioon initsieeritakse *C-boxi* ees asuvalt 9 nukleotiidiliselt promootorilt ja transkript (punane) protsessitakse *C-boxi* juures, luues vaba 3'OH, mis on replikatsiooni praimeriks (sinine). Elongatsiooni käigus nihkub *sense* ahel (roheline) eemale ning vabaneb ssDNA rõngasmolekul. ssDNA mahajääva ahela süntees võib alguse saada A ja B *boxi* vahel moodustuvast juuksenõelastruktuurist (MacAlpine jt., 2001).

Kuna Rpo41-initsieeritud replikatsioonimudel pole ainus võimalus ρ^- genotüübi edasipärandumiseks, on mitokondris lisaks transkriptsioonist sõltuvale replikatsioonile näidatud ka rekombinatsiooni initsieeritud replikatsioon. Rekombinatsiooni poolt initsieeritud replikatsiooni (RDR- *recombination driven DNA replication*) on kõige rohkem uuritud bakteriofaagis T4 (Kreuzer, 2000) ning arvatakse, et pärmis võib see toimuda sama mehhanismi järgi (Ling jt., 2006). 2010 aastal näitasid Gerhold ja kolleegid RDR toimumist *C. albicans*-is (Gerhold jt., 2010). Päranduvad konkatemeerid moodustuvad Mhr1-st sõltuva veereva ratta replikatsiooni käigus (Ling ja Shibata, 2004). Selles protsessis on olulisel kohal ka endonukleaase aktiivsusega Ntg1 (Sentürker jt., 1998), mis teeb kaheaahelalise katke *ori* piirkonda. Arvatav 5' dsDNA eksonukleas (5'-dsExo) protsessib katkenud ahelatele 3' üleulatuvad otsad. Kui Mhr1 seob vaid ühe 3' üleulatuva otsa teise tsirkulaarse dsDNA molekuli homoloogilisse piirkonda ning moodustab heterodupleksi, saab alguse veereva ratta mudeli replikatsioon ja moodustub konkatemeer. Kui Mhr1 seob mõlemad 3' üleulatuvad otsad intaktse dsDNA molekuliga, moodustub multimeerne molekul üle Holliday struktuuri. Konkatemeer moodustub selle molekuli kaheaahelalisel lõikamisel (Ling jt., 2007). Konkatemeerid on mtDNA jagunemise intermediaadid, mis üleminekul tütarraaku protsessitakse monomeerseteks dsDNA molekulideks (Ling ja Shibata, 2004).

1.3 Mitokondri genoomi säilimiseks vajalikud valgud

Erinevatest liikidest on leitud 30 valku, mis on potentsiaalsed nukleoidi komponendid. Osade nende valkude funktsioon mtDNA säilitamiseks on teada ning võib eeldada, et nad asuvad nukleoidides. Nendeks on näiteks pärmi Abf2 (*abscisic acid responsive elements-binding factor 2*) ja imetajate TFAM (*transcription factor A, mitochondrial*), mis kuuluvad HMG (*High Mobility Group*) valkude gruppi ja vastutavad otseselt DNA pakkimise eest. Üllataval kombel on avastatud nukleoidides ka valke, mille teadaolevad funktsioonid pole esmapilgul mtDNA säilumisega seotud. Seetõttu võib arvata, et mitokondris on välja töötatud süsteem, kus mitokondri metabolismi valgud osalevad samaaegselt nii mtDNA organiseerimisel kui säilitamisel. Näiteks mitokondriaalne akonitaas Aco1, mis on krebsi tsükli ensüüm, konverteerides tsitraadi isotsitraadiks, kuid on vajalik ka mtDNA stabiliseerimiseks. Ka mitokondriaalne Ilv5 omab mitut funktsiooni. Ta osaleb hargnenud ahelaga aminohapete biosünteesis (Petersen ja Holmberg, 1986) ja mtDNA pakkimisel nukleoididesse (Chen ja Butow, 2005). Bifunktsionaalsed valgud, mis osalevad ρ^+ mtDNA stabiilsuse tagamisel on toodud tabelis 1.

Tabel 1. MtDNA säilumisega seotud valgud ja nende funktsioonid.

| mtDNA säilumisega seotud valk | funktsioon | allikad |
|--------------------------------------|--|--|
| Abf2 | DNA sidumine, painutamine ja pakkimine | Diffley ja Stillman, 1991; Diffley ja Stillman, 1992 |
| Rim1 | ssDNA'd siduv valk | Van jt., 1992 |
| Mgm101 | DNA sidumine ja reparatsioon | Chen jt., 1993; Meeusen jt., 1999 |
| Hsp60 | Mitokondriaalse nukleoidi segregatsioon | Kaufman jt., 2000 |
| Ilv5 | Aminohapete biosüntees, mtDNA stabiliseerimine | Zelenya –Troitskaya jt., 1995 |
| Aco1 | Akonitaas, mtDNA säilitamine | Chen jt., 2005 |
| Mip1 | DNA polümeraas | Ropp ja Copeland; 1995; Foury 1989 |
| Mhr1 | rekombinaas | Ling jt., 1995; Ling ja Shibata, 2002 |
| Cce1 | resolvaas | Zweifel ja Fangman, 1991; Kleff jt., 1992; Lockshon jt., 1995 |
| Exo5 | ssDNA 5'-eksonukleaas | Burgers jt., 1988; Burgers jt., 2010 |
| Hmi1 | 3'-5' DNA helikaas | Lee jt., 1999; Sedman jt., 2000; Kuusk jt., 2005; Sedman jt., 2005 |
| Pif1 | 5'-3' DNA helikaas | Foury ja Lahaye, 1987; Lahaye jt., 1991 |
| Rpo41 | RNA polümeraas | Greenleaf jt., 1986; Kelly ja Lehman 1986 |
| Mtf1 | Rpo41 spetsiifilisusfaktor/sigmafaktor | Schinkel jt., 1987; Mangus jt., 1994 |
| Cdc9 | ligaas | Willer jt., 1999; Donahue jt., 2001 |
| Msh1 | <i>mismatch</i> reparatsioon | Reenan ja Kolodner, 1992; |

Esimesed 6 valku on kirjeldatud kui nukleoidi komponendid (Kaufman jt., 2000).

MtDNA säilimiseks on vaja valke, mis on otseselt seotud DNA replikatsiooniga. Sellesse rühma kuuluvad valgud Mip1, Rim1, Rpo41-Mtf1. Mip1 on mtDNA polümeraasi katalüütiline subühik, mille deleteerimisel tekivad ρ^0 genotüübiga rakud (Foury, 1989). Rim1(*replication in mitochondria*) on 135 aminohappe pikkune polüpeptiid, mis seostub üheaheelalise DNA-ga ning on samuti hädavajalik mtDNA säilimiseks (van Dyck jt., 1992). Rim1 valk on homoloogne *Escherichia coli* valgule SSB (*single stranded DNA binding protein*). Rpo41 on mitokondriaalse RNA polümeraasi katalüütiline subühik, mis vastutab mitokondriaalse valgusünteesi eest, aga mõjutab ka mtDNA stabiilsust, kui ta on mtDNA replikatsioonil DNA ahela sünteesi initsiaatoriks. Rpo41 puudumisel kasvavad üles „*petite* „

rakud (Fangman, 1990). Transkriptsiooni läbiviimiseks on vaja spetsiifilisusfaktorit Mtf1 (Schinkel jt., 1989; Mangus jt., 1994).

Lisaks replikatsiooniga seotud valkudele on vaja ka valke, mis osalevad mtDNA rekombinatsioonis ja reparatsioonis. Pif1 (*Petite Integration Frequency*) on ATP-st sõltuv mtDNA helikaas, mis on seotud DNA rekombinatsiooni ja reparatsiooniga. Pif1 geeni produkt stabiliseerib mtDNA-d kõrgetel temperatuuridel (van Dyck jt., 1992). Helikaasidest on veel oluline Hmi1, mis tagab ρ^+ genoomi stabiilsuse, kuid mille puudumisel on siiski tagatud ρ^- genoomi säilumine (Sedman jt., 2005). Nukleoidi valk Mgm101 on seotud mtDNA säilimisega. Ta kuulub Rad52-tüüpi rekombinatsioonivalkude hulka ning seob ssDNA-d. Mgm101 supresseerib mtDNA fragmenteerumist *in vivo* (Mbantenkhu jt., 2011) ning osaleb oksüdatiivselt kahjustunud DNA rekombinatiivses reparatsioonis. Mgm101 mutandid on tundlikud UV- ja gammakiirgusele ning H₂O₂-le (Meeusen jt., 1999). Msh1 on *E. coli* MutS valgu homoloog, mis on *S. cerevisiae*'s seotud mtDNA reparatsiooni ja säilitamisega. Msh1 hüdrolüüsib ATP-d, seondub valestipaardunud DNA-le ja tunneb ära paardumata nukleotiide (Chi ja Kolodner, 1994). Valestipaardunud DNA-le seotud Msh1 interakteerub BER (*Base Excision Repair*) valkudega (Pogorzala jt., 2009). Mhr1 osaleb homoloogilises rekombinatsioonis ja reparatsioonis ning ka mtDNA korrektses pärandumises tütarakkudele. Mhr1p seob ssDNA-d homoloogilise dsDNA-ga, moodustades heterodupleksi (Ling ja Shibata, 2002).

Kuna need valgud on tuuma poolt kodeeritud, siis on tarvis, et need valgud transporditaks korrektselt mitokondrisse.

1.4 Valkude transport mitokondrisse

Pärmi mitokondris leidub umbes 1000 erinevat valku. Vaid 8 on kodeeritud mitokondriaalselt genoomilt ning sünteesitud mitokondriaalsetel ribosoomidel. Ülejäänud 99% mitokondriaalsetest prekursoritest on kodeeritud tuumagenoomilt ning peale nende sünteesi tsütosooli ribosoomidel imporditakse nad sihtorganelli. Nende valkude mitokondrisse suunamine ja selle erinevatesse subkompartementidesse (välismembraan, membraanidevaheline ala, sismembraan, maatriks) importimine nõuab erinevate membraansete translokaaside ja *chaperonide* ning lisa-*chaperonide* koostööd (van der Laan jt., 2006).

1.4.1 Mitokondriaalne transpordi signaal

Valgud suunatakse mitokondrisse spetsiifiliste mitokondriaalsete signaalide abil. Need signaalid on väga varieeruvad ning võivad asetseda polüpeptiidi järjestuse ükskõik mis piirkonnas. Umbes pooled mitokondriaalsetest valkudest sünteesitakse N-terminaalse pikendusega, mida kutsutakse maatriksisse suunavaks järjestuseks (MTS- *matrix targeting sequence*). MTS-d pole oma primaarjärjestuselt eriti konserveerunud, kuid kõigil on kalduvus moodustada amfipaatne heeliks, millel on nii positiivselt laetud kui ka hüdrofoobne pind (Neupert ja Mokranjac, 2009). Enamasti koosnevad MTS-id 20-60 aminohappejäägist ning on rikkad arginiini, seriini ja leutsiini poolest, vähe esineb neis asparagiini, glutamiini ja isoleutsiini (von Heijne, 1986). MTS suunab valgu mitokondriaalsesse maatriksisse, kus see peptidaaside poolt proteolüütiliselt eemaldatakse (Mukhopadhyay jt., 2002). MTS-d asetsevad enamasti eelvalgu N-terminuses (Joonis 4), kuid erandina on avastatud ka C- terminaalse signaaliga valk- mitokondriaalne DNA helikaas Hmi1 (Sedman jt., 2000). Ülejäänud mitokondriaalsed eelvalgud omavad valgusisest signaali ning neid saab klassifitseerida mitmesse gruppi.

| Lõigatavad mitokondriaalsed transpordisignaalid | | | |
|---|--|-----------------------|-------------------------|
| Prekursorvalgu variatsioonid | | Kompleks | Sihtkoht |
| Amfipaatne α heeliks | | TOM TIM23 PAM | Maatriks |
| Amfipaatne α heeliks + hüdrofoobne sorteerimissignaal | | TOM TIM23 (PAM) | Sisemembraan |
| Amfipaatne α heeliks + lõigatav hüdrofoobne sorteerimissignaal | | TOM TIM23 (PAM) | Membraanidevaheline ala |

Joonis 4. Mitokondriaalsed prekursorvalgud äralõigatava signaaljärjestusega. Signaaljärjestused suunavad valgu erinevatesse translokatsioonikompleksidesse, mis suunavad valgu edasi sihtkohta. Signaaljärjestused eemaldatakse MPP (*mitochondrial processing peptidase*) poolt maatriksis. Hüdrofoobsed sorteerimissignaalid eemaldatakse IMP (*inner membrane peptidase complex*) poolt (Chacinska jt., 2009 järgi).

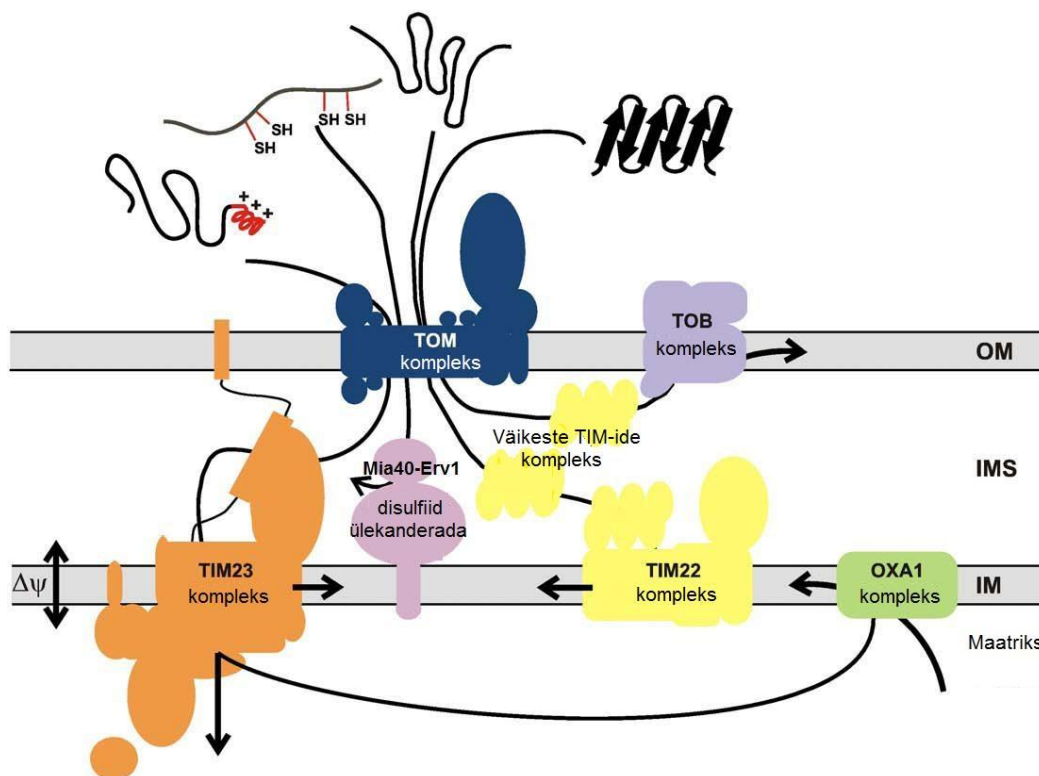
Mitokondri välismembraanil leidub vähemalt 3 tüüpi valke. Aminotermiinaalse signaaliga valgud integreeruvad välismembraani α -heeliksi domääni kaudu, mis asub N- või C- terminuse läheduses. β -silinder tüüpi valgu β - lehed võivad läbida välismembraani mitu korda (Rapaport, 2003). Membraanidevahelisse alasse suunduvad valgud sisaldavad konserveerunud tsüsteiinijääke, mis on lisaks transpordile olulised ka nende funktsiooni tagamisel (Lutz jt., 2003). Hüdrofoobsed sisemembraani valgud omavad valgusisest signaali,

mis pole väga hästi kirjeldatud, kuid mis koosnevad nii transmembraansetest segmentidest kui ka ühendavatest *loop*'idest (Endres jt., 1999).

Paljudel tuntud mitokondriaalsetel valkudel tundub puuduvat ükski neist signaalidest, mis viitab sellele, signaaljärjestuste repertuaar on tegelikult palju suurem.

1.4.2 Mitokondriaalne translokatsiooniaparaat

Mitokondriaalne translokatsiooniaparaat koosneb mitmetest erinevatest kompleksidest. TOM (*translocase of outer membrane*) kompleks on välismembraanil asuv translokatsiooni kompleks. TOM tunneb ära tsütosoolis sünteesitud valgud ja vahendab nende transporti välismembraani kaudu (Joonis 5).



Joonis 5. Mitokondriaalne translokatsiooniaparaat skemaatiliselt. Näidatud on erineva signaaljärjestusega valgud ning nende teekond sihtkohta. OM-mitokondriaalne välismembraan; IM- mitokondriaalne sisemembraan; IMS-intermembraanne ala (Neupert ja Mokranjac, 2009 järgi).

MTS-signaali valgude transportiks on vajalik TOM- ja TIM23-komplekside kooskõlastatud funktsioneerimine. TOMi, väiksete TIMide ja TIM22 komplekside koostöö toimel sisestatakse hüdrofoobsed membraanivalke sisemembraanile. Tsüsteiini sisaldavate valgude transport membraanidevahelisse alasse sõltub TOM-kompleksi ja membraanide vahelises alas asuva Mia40-Erv1-disulfiid ülekanderaja koostööst. Välismembraani

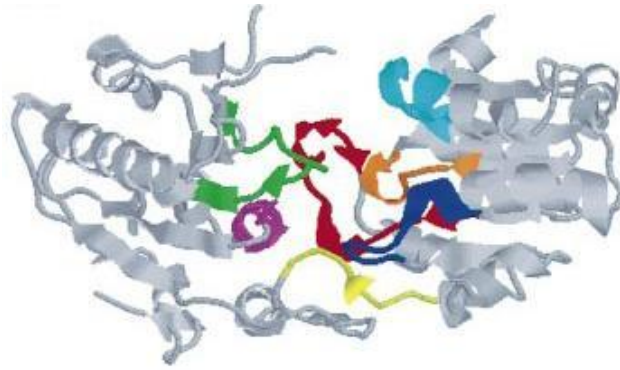
sisestatavate β -silinder valkude transpordis osalevad TOM, väike TIM intermembraanses alas ja välismembraanis asuv TOB/SAM- kompleks (Neupert ja Mokranjac, 2009).

Paljud sisemembraani valgud sünteesitakse lisatava eeljärjestusega. Osadel on lisaks sellele ka ülekannet peatav signaal, mis peatab nende transpordi TIM23-kompleksi juures ja nad sisestatakse sisemembraanile. Ülejäänud aga transporditakse kõigepealt maatriksisse ja pärast seda sisestatakse Oxa1-kompleksi abil sisemembraanile (Jia jt., 2003; Szyrach jt., 2003). Oxa1-kompleks osaleb ka mitokondris kodeeritud ja sünteesitud valkude transpordis (Neupert ja Mokranjac, 2009).

1.5 Helikaasid

Helikaasid mängivad olulist rolli pea kõigis DNA metabolismiga seonduvates protsessides. (Hall ja Matson, 1999). Helikaasid on mootorvalgud, mis katalüüsivad energeetiliselt stabiilsete dupleks nukleiinhappe molekulide lahtikeerdumist kasutades NTP hüdrolyüsist saadud energiat (Tuteja ja Tuteja, 2004). Nende esinemine prokarüootides, eukarüootides ja viirustes näitab nende rolli DNA ja RNA metaboolsetes protsessides, sealhulgas replikatsioonis, rekombinatsioonis, DNA reparatsioonis, transkriptsioonis, translatsioonis, ja RNA splaissingus (Schmid ja Linder, 1992; Matson, 1994).

Helikaase iseloomustab rühm kõrgelt konserveerunud aminohappelisi järjestusi, mida kutsutakse helikaaside motiivideks ja mida peetakse helikaasi funktsiooni tagamises olulisemateks elementideks (Gorbalenya ja Koonin, 1993.) Samasugused motiivid on omased ka valkudele, mis osalevad kromatiini ümbermodelleerimisel. Helikaaside kolmedimensionaalsed kristallstruktuuri uuringud on näidanud, et kõigi helikaaside konserveerunud järjestused on klasterdunud, moodustades nukleotiidi seondumiseks tasku ja nukleiinhappe seondumise saidi (Joonis 6). Nukleotiidide hüdrolyüsireaktsioonist saadud energiast sõltuvalt on neil võime keerata lahti kaheahelalist nukleiinhapet $3' \rightarrow 5'$ või $5' \rightarrow 3'$ suunas. Kuigi helikaaside katalüüsitud biokeemiline reaktsioon on oma olemuselt kõigis sarnane, on helikaasidel sõltuvalt nende rollist bioloogilises protsessis kujunenud erinevad mehhanismid nukleiinhappe lahtikeeramiseks (Hall ja Matson, 1999).

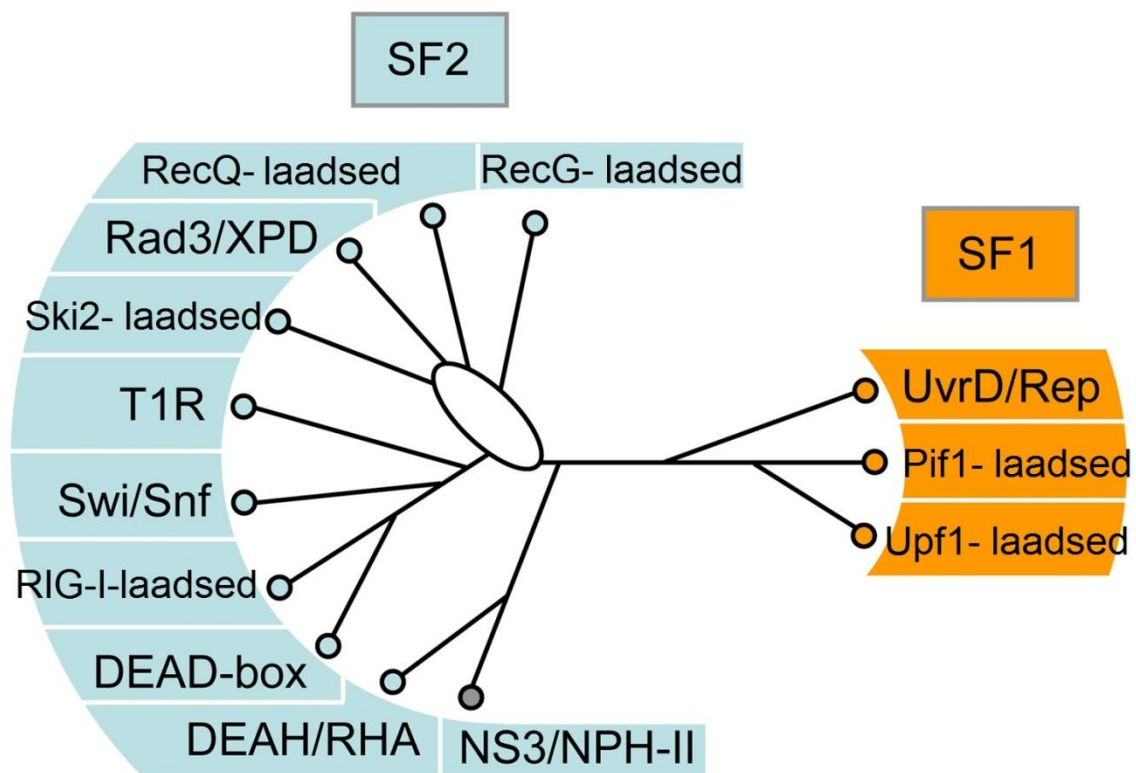


Joonis 6. SF1 ja SF2 helikaaside konserveerunud järjestuste kolmedimensionaalne kristallstruktuur. Joonisel on *E.coli* Rep valgu domeenid 1 ja 2. Konserveerunud motiivid värvitud järgmiselt: I- tumesinine, Ia- helesinine, II- oranz, III- punane, IV- kollane, V- roheline, VI- lilla (Hall ja Matson, 1999).

1.5.1 Helikaaside superperekonnad

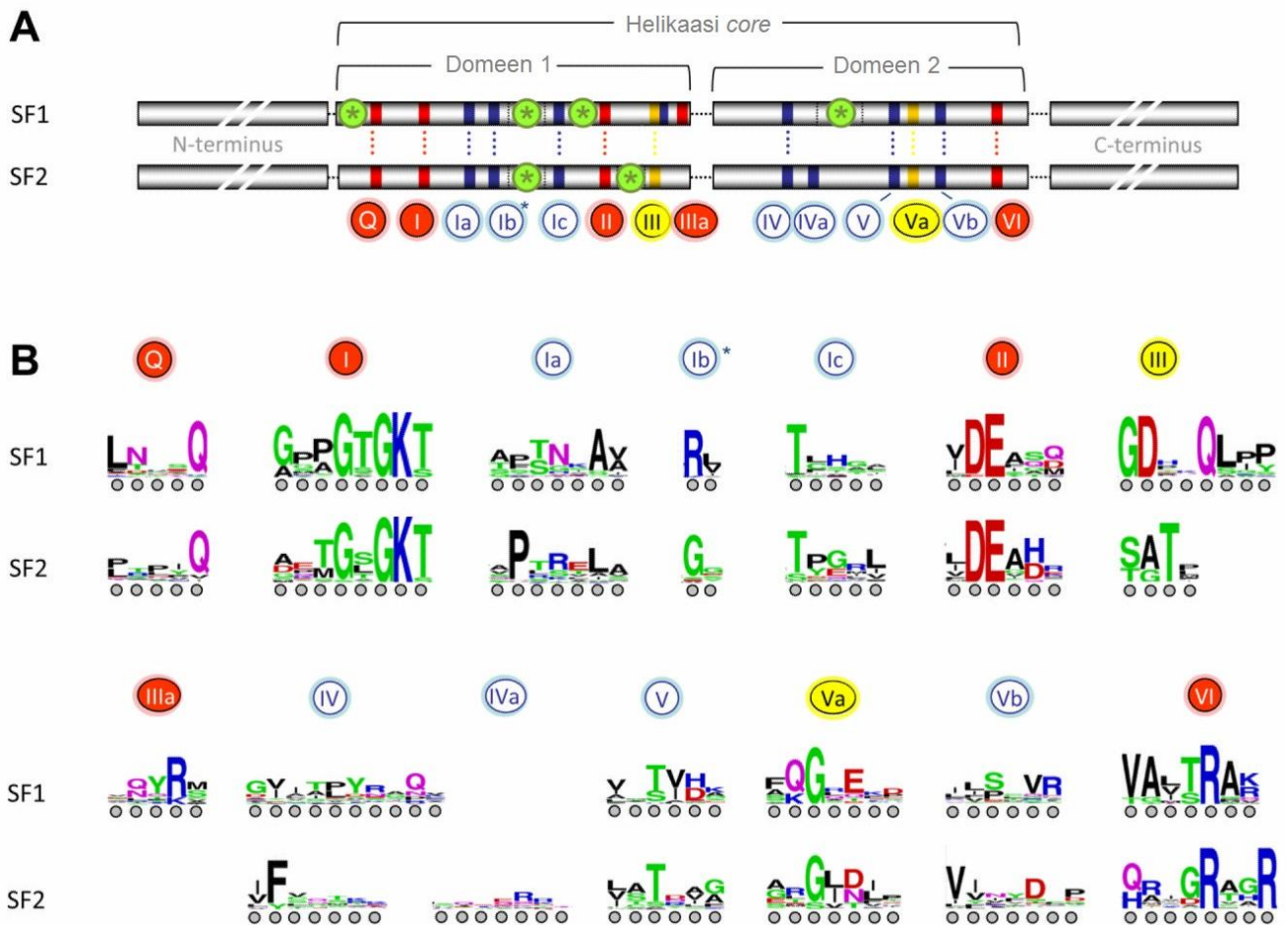
Gorbalenya ja Koonin koostasid 1993. aastal helikaaside jaoks klassifikatsiooni, jagades nad superperekondadeks motiivide arvu ja konsensusjärjestuste erinevuste alusel. SF (*superfamilies*- superperekonnad) 3-6 kuuluvad multimeerseid rõngaid moodustavad helikaasid ning SF1 ja SF2 monomeersed helikaasid, mis ei moodusta rõngasstruktuure (Singleton, 2007). Kõigile neis gruppides olevatele helikaasidele on omane ATP sidumise võime ning Walker A (*Phosphate-binding loop or "P-loop,*) ja Walker B (*Mg²⁺ - binding aspartic acid*) motiivid (Walker jt., 1982).

2010. aastal reastasid Fairman-Williams ja kolleegid inimese, *S. cerevisiae*, *E. Coli* ja osade viirusvalkude SF1 ja SF2 helikaaside *core* järjestused ja viisid läbi fülogeneetilise analüüsi, mille käigus jagati valgud järjestuste sarnasuse alusel klastritesse. Klastrid, millesse koondus 3 või enam valku ühest organismist, nimetati perekonnaks ning klastrid, milles on 2 valku ühest organismist, grupiks. Vastavalt sellisele definitsioonile identifitseeriti SF2-s 9 perekonda ja 1 grupp ning SF1-s 3 perekonda (Joonis 7).



Joonis 7. Skemaatiline kladogramm, kus paremal pool on näidatud 3 perekonda SF1-st ja vasakul 9 perekonda ning 1 grupp SF2-st. Harude pikkused ei ole vastavuses ning ovaal tähistab ebamäärasust puu selle regiooni topoloogias. Perekondade nimetused on võetud kas juba käibel olevate nimetuste järgi või silmapaistvamate esindajate järgi. T1R – *type 1 restriction enzymes*; RHA – *RNA helicase A* (Fairman-Williams jt., 2010 järgi).

Üheks silmapaistvamaks jooneks SF1 ja SF2 helikaaside seas on neile iseloomulikud motiivid, millest vähemalt 12 on mõlemal superperekonnal ühised, kuigi need kõik ei pruugi esineda igas perekonnas (Gorbalenya ja Koonin, 1993) (Joonis 8A). Need motiivid on perekonna piires kõrgelt konserveerunud. Superperekonna tasandil on enamus motiivide konserveerumus väikesem (Fairman-Williams jt., 2010) (Joonis 8B). SF1 ja SF2 motiivid on klasterdunud 200 kuni 700 aminohappe kaupa, moodustades tuumiku (*core*). Motiive eraldavad lõigud, mis on vähesel määral järjestuselt, kuid suuresti pikkuses konserveerunud. Helikaaside C- ja N- terminaalised regioonid on aga nii järjestuselt kui ka pikkuselt väga varieeruvad. Just need osad annavad helikaasile individuaalse funktsiooni, samas kui konserveerunud piirkonnad osalevad ATP sidumises ja hüdrolyüüsis või nukleinhappe sidumises ja lahtiharutamises (Tuteja ja Tuteja, 2004)



Joonis 8. SF1 ja SF2 helikaasi motiivide järjestus ja struktuurne organisatsioon. **A:** SF1 ja SF2 helikaasi motiivid on värvitud vastavalt nende funktsioonile: punane- ATP sidumine ja hüdrolyüs; kollane- nukleiinhappe ja NTP sidumissaitide kordinatsioon; sinine- nukleiinhappe sidumine; rohelised tähekesed märgivad lisadomäänide insertioonikohti. SF2 motiiv IVa võib olla tähistatud ka kui QxxR ja Ic kui TPGR. **B:** helikaasi motiivide konserveerumine. Tähe kõrgus motiivi järjestuses peegeldab aminohappejärgi konservatsiooniatet: mida kõrgem täht, seda konserveerunum (Fairman-Williams jt., 2010 järgi).

1.5.2 Helikaasi konserveerunud motiivid ja nende funktsioonid

Q motiiv

Q motiiv on kõige hiljem avastatud motiiv, mis on omane DEAD-*box* helikaaside perekonnale. Motiiv koosneb 9 aminohappelisest järjestusest, kus on üks kõrgelt konserveerunud glutamiin (Q), mille järgi on motiiv nime saanud. See asub motiiv I-st 15-22 aminohapet eespool ja osaleb nukleotiidi sidumisel ja hüdrolyüsil. Kristallstruktuuri uuringud on näidanud, et Q motiiv loob tasku nukleotiidi sidumiseks (Tanner jt., 2003).

Motiiv I (Walker A) ja Ia

Motiiv I ehk Walker A on ATPaasi A motiiv. SF1 perekonnas on sel motiivil RNA helikaasi konsensusjärjestus AXXGXGKT. SF2 perekonnas on sel motiivil järjestus GxxxxGKT, mis on ATPaasi, GTPaasi ja mõne DNA helikaasi konsensusjärjestus (Gorbalenya jt., 1989). Järjestuses märgitud x võib olla ükskõik mis aminohape. On näidatud, et järjestuse GKT kõrgelt konserveerunud osas on olulisel kohal lüsiin (K), mis seostub ATP molekulis fosfaadiga. ATPaas-mutantsetel valkudel puudub ka helikaasne aktiivsus (Pause ja Sonenberg, 1992; Hall ja Matson, 1999). Motiiv Ia osaleb ssDNA sidumises (Tuteja ja Tuteja, 2004)

Motiiv II (Walker B)

Motiiv II ehk Walker B on ATPaasi B motiiv. Valke, mis sisaldavad seda motiivi kutsutakse *DEAD-box* valkudeks (Linder jt., 1989). DEAD motiivis on kõrgelt konserveerunud järjestus DE, mis on omane paljudele DNA ja RNA replikatsioonis osalevatele valkudele (Gorbalenya jt., 1989). Konserveerunud järjestuses DE on oluline aspartaathape (D), mis on vajalik ATP sidumiseks. Mutatsioonid DE järjestuses mõjutavad valgu ATPaasset ja helikaasset aktiivsust. Walker B motiivis on leitud ka variatsioone, mis jagavad seda motiivi omavad SF2 perekonna helikaasid erinevatesse gruppidesse: DEAD, DEAH, DEXH ja DEAH*. DEAH*- *box* valgud omavad suurimat varieeruvust konserveerunud piirkondades ning neid iseloomustab DNA- helikaasne aktiivsus (Tuteja ja Tuteja, 2004)

Motiiv III

See SF2 perekonna motiiv on oluline nukleiinhappe dupleksi lahtikeeramisel. Motiivi mutandid säilitavad ATPaasse aktiivsuse, kuid kaotavad võime kaheaahelalist nukleiinhapet lahti keerata. See võib tähendada, et motiiv III-1 on oluline roll ATPaasse aktiivsuse ja DNA lahtikeeramise ühendamisel (Graves-Woodward jt., 1997; Tuteja ja Tuteja, 2004).

Motiiv IV

Selles motiivis on kahe alifaatse aminohappe jäägi järel kõrgelt konserveerunud fenüülalaniin (F), mis tagab *DEAD-box* helikaaside ensümaatilise aktiivsuse. *S. cerevisiae* esineb selle aminohappejäägi mutantidel defektne kasvufenotüüp ning paljudel esineb

temperatuuritundlikkus, mis viitab sellele, et mutatsioon destabiliseerib valgukonformatsiooni. *In vitro* analüüsid näitasid, et mutantidel puudus ATP-st sõltuv RNA sidumise võime. Arvatavasti seondub IV motiifi fenüülalaniin VI motiivi arginiiniga, aidates hoida sidemeid eri motiivide vahel, mis osalevad ATP ja RNA sidumises (Banroques jt., 2008).

Motiiv V

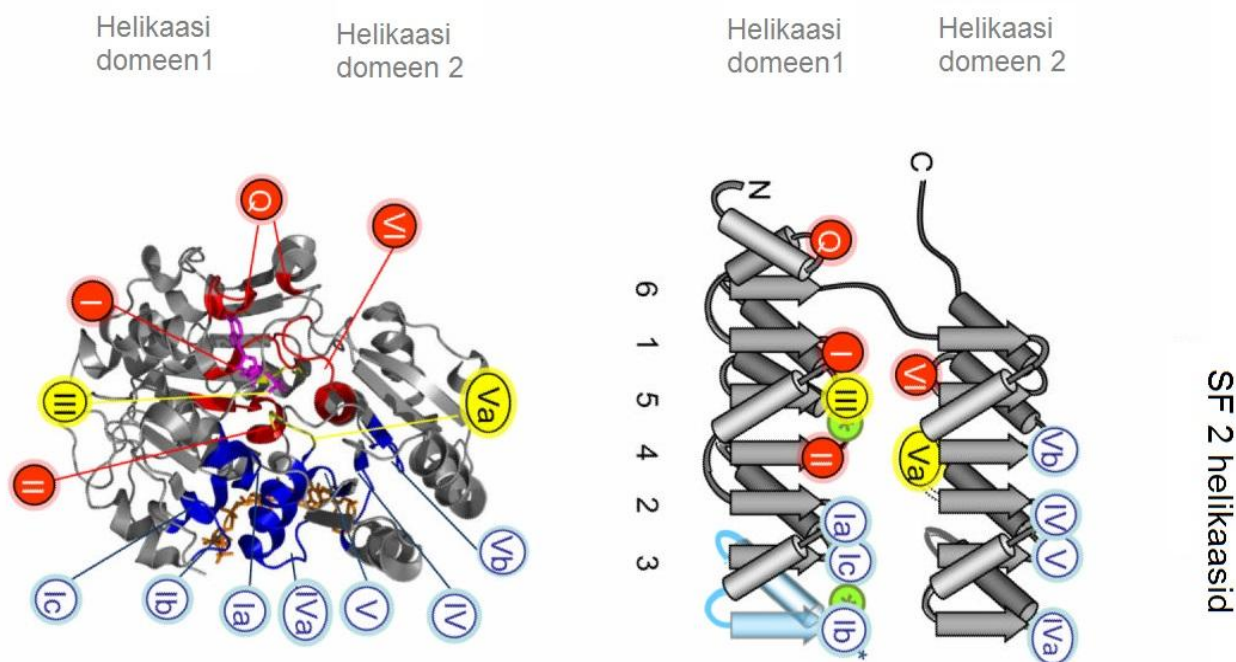
Selle helikaasi motiivi roll on tänaseks päevaks kõige ebaselgem ning ta funktsioon SF2 helikaaside seas ilmselt kõige varieeruvam. Muteerides motiivi glütsiini (G) DNA helikaasides, väheneb valgufiinsus ssDNA-le ning hüdrolyüsivõime (Moolenaar et al., 1994). Sama mutatsioon RNA helikaasidel ei vähenda RNA sidumise võimet, kuid väheneb ensüümi ATPaasne ning helikaasne aktiivsus (Fernandez et al., 1997).

Motiiv VI

Motiiv VI järjestust QxxGRxxR kirjeldasid esimesena Gorbalenya ja Koonin 1993. DEAD-*box* RNA helikaasidega läbi viidud katsed toetavad mudelit, et VI motiivi arginiin (R) interakteerub ATP-ga. Erinevate SF2 valkude puhul on pakutud sellele motiivile erinevaid funktsioone. Konserveerunud järjestuse asendused või selle eemaldamine kutsusid osades SF2 valkudes esile defekte nukleiinhappe sidumises (Pause ja Sonenberg, 1992). Teised hüpoteesid pakuvad, et see motiiv osaleb energia ülekandemehhanismis ühendamiseks ATP hüdrolyüsi ja DNA lahtikeeramist (Kim jt., 1998).

Kõigi konserveerunud motiivide järjestused ning struktuurne organisatsioon on näidatud joonisel 8.

SF1 ja SF2 perekonna helikaasi motiividest on enim konserveerunud trifosfaadi sidumise ja hüdrolyüsiga seotud aminohappejäägid (motiivid I, II ja VI). Need paiknevad 2 helikaasi domeeni vahel moodustavas lõhes. Nukleiinhappega seonduvad motiivid (motiivid Ia,b,c, IV, IVa, V, Vb) paiknevad trifosfaati siduva *saidi* vastas, valgufiinspinna poole suunatult (Fairman-Williams jt., 2010) (Joonis 9).



Joonis 9. Parempoolne joonis: SF2 helikaaside konserveerunud motiivide paiknemine kahes domeenis 2- dimensionaalses mudelis. β - lehed on tähistatud nooltena, α - heelksid silindritena. Vasakpoolne joonis: SF2 helikaaside konserveerunud motiivide paiknemine kahes domeenis 3- dimensionaalses mudelis. Joonisel on SF2 DEAD- box helikaasi Vasa mudel. ATP analoog on joonisel tähistatud lilla, nukleiinhape beezi värviga. Helikaasi motiivid on värvitud vastavalt nende funktsioonile: punane- ATP sidumine ja hüdrolyüs; kollane- nukleiinhappe ja NTP sidumissaitide kordinatsioon; sinine- nukleiinhappe sidumine (Fairman-Williams jt., 2010 järgi).

1.5.3 DEAD/H- box helikaasid

DEAD-*box* valke iseloomustab kuni üheksa konserveerunud motiivi *core* regioonis, mida ääristavad unikaalsed C- ja N-terminaalsed järjestused (de la Cruz jt., 1999). DEAD-*box* valke on palju leitud eukarüootidest, kuid prokarüootides on neid vähe. Enamus DEAD-*box* valke osaleb RNA metabolismis, nad on väga spetsiifilised ja ei ole omavahel asendatavad. *In vitro* on paljudel DEAD-*box* valkudel näidatud RNA-st sõltuv ATPaasne aktiivsus ja ATP-st sõltuv RNA helikaasne aktiivsus (Linder, 2006). DEAD-*box* perekonna RNA helikaasid kuuluvad RNA *chaperon* 'ide hulka, mis on vajalikud RNA korrektseks voltimiseks ja spetsiifiliste sekundaar- või tertsiaarstruktuuride säilitamiseks või modifitseerimiseks. RNA helikaasid on teadlaste huviorbiidis, kuna neil on oluline roll RNA sünteesis ja funktsioonis, sealhulgas pre-mRNA protsessimine (splaiissing), ribosoomi biogenees, RNA eksport ja translatsioon ning protsessid, mis hõlmavad mitmeastmelist RNP komplekside ühendamist ja eraldamist ning moduleerimist. Palju on leitud tõendeid ka selle kohta, et DEAD- *box*

perekonna valgud täidavad rakus mitmeid funktsioone, kuid osad neist ei vaja selleks RNA helikaasest aktiivsust (Fuller-Pace, 2006).

Palju on valke, millel on DEAD-*box* perekonna helikaasidega sarnaseid motiive. Neil valkudel on aga ka perekonna siseselt kõrgelt konserveerunud motiivid, mis eristavad neid DEAD-*box* perekonna helikaasidest. Need suguluses olevad valgud kuuluvad DEAH ja Ski2 perekondadesse, mis koos DEAD-*box* valkudega on koondatud ühise nimetaja alla DExD/H-*box* valgud (Wassarman ja Steitz, 1991).

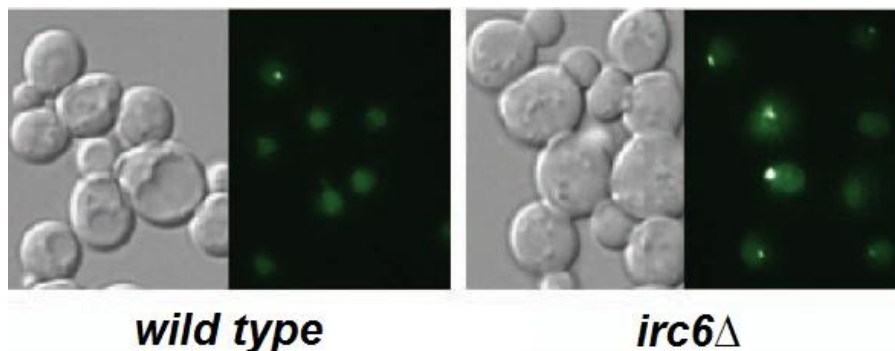
S. cerevisiae-s on kirjeldatud 26 DEAD-*box* valku, 13 DExH-*box* valku (7 DEAH-*box* valku ja 6 Ski2p perekonda kuuluvat valku) (de la Cruz jt., 1999). Neli oletatavat *S. cerevisiae* DExD/H-*box* RNA helikaasi, Mss116p, Suv3p, Mrh4 ja Irc3 sünteesitakse küll tuumas, kuid oma funktsiooni täidavad nad mitokondris. Mss116p on RNA *chaperon*, mis osaleb mitokondri grupp I ja II intronite splaissingus, translatsioonilises aktivatsioonis ja RNA protsessimises. Kristallstruktuuri uuringud on näidanud, et helikaasi *core* teeb koostööd funktsionaalse C-terminaalse pikendusega RNA sidumisel (Del Campo ja Lambowitz, 2009). RNA helikaas Suv3p on 3'-5' eksonukleaasest aktiivsust omava NTP-st sõltuva mitokondriaalse degradosoomi (mtEXO) üks kolmest subühikust. mtEXO on olulisim mitokondriaalne eksoribonukleas, mis vastutab RNA metabolismi eest (de la Cruz jt., 1999). Suv3 mutantsetes rakkudes kuhjuvad mitokondrisse kõrvalised transkriptid ja prekursorid, mis segavad mitokondriaalset geeniekspressiooni ja viivad respiratsioonivõime kadumiseni (Rogowska jt., 2006). Mrh4 mutantsetes rakkudes kaob funktsionaalne mtDNA, kuid selle valgu täpne funktsioon pole teada (Schmidt jt., 2002). Irc3 on II motiivi järjestuse poolest DEAH grupi helikaas, kuid üldjärjestuselt sarnaneb rohkem DEAD-*box* helikaasidele (de la Cruz jt., 1999).

DExH-*box* DNA helikaaside perekonda kuuluvad valgud, mille prototüübiks on *E. coli* RecQ valk, mis osaleb homoloogilises rekombinatsioonis ja kaheaaheliste DNA katkete reparatsioonis (Umezu jt., 1990). Nii inimesel kui ka hiirel on leitud 5 selle perekonna valku. *S. cerevisiae*s kuulub RecQ taoliste valkude perekonda helikaas SGS1, mis osaleb rekombinatsioonis, kromosoomide lahknemises ning genoomi stabiliseerimises (Watt jt., 1996; Myung jt., 2001).

1.6 *S. cerevisiae* Irc geenid

Vastusena DNA kahjustustele toimub homoloogilises rekombinatsioonis osalevate valkude lokaliseerumine nukleaarsetesse fookustesse. Selles protsessis on oluline *S. cerevisiae* RAD52 valk, mis on vajalik efektiivse homoloogse rekombinatsiooni (HR) toimumiseks, kuna initsieerib teiste HR valkude lokaliseerumise fookustesse. Fluorestseeruvalt märgistatud reparaatsiooni ja kontrollpunkti valke saab kasutada nende fookuste struktuuri ja toimemehhanismide uurimiseks (Joonis 10). Lisaks välistele DNAd kahjustavatele teguritele (dsDNA kahjustamine γ -kiirgusega, H_2O_2 või endonukleasid) kutsuvad Rad52 fookuste moodustumist esile ka raku sisenemine rakutsükli S-faasi, peegeldades spontaanseid DNA katkeid (Lisby jt., 2001). Mutatsioonid, mis mõjutavad DNA metabolismi, näiteks kahjustuste kontrollpunktides (*mec1*, *sml1*), homoloogilises rekombinatsioonis (*rad51* Δ) ja DNA replikatsioonis (*pol12-100*) põhjustavad fookuste tekkimise sagedust (Alvaro jt., 2007).

S. cerevisiae-s esindab Rad52 epistaasigrupi, kuhu kuuluvad *E. coli* RecA homoloogid Rad51, Rad55, Rad57 ning Dmc1; arvatav SWI/SNF perekonna ATPaas Rad54; Rad52 homoloog Rad59, ning Mre11, Xrs2 ja Rad50. Rad52 epistaasi grupp on vajalik homoloogiliseks rekombinatsiooniks. Rad52 seondub ssDNA-le *in vitro* ning stimuleerib DNA seondumist ning Rad51 poolt katalüüsitud ahelate invasiooni (Lisby jt., 2001). Mitootilistes rakkudes vastutab HR kaheaahelaliste DNA katkete reparaatsiooni, rDNA koopiate arvu säilitamise, telomeeride pikkuse säilitamise ja vigaste replikatsioonikahvlite päästmise eest.



Joonis 10. Spontaansed Rad52-YFP fookused metsiktüüpi tüves ja $\Delta irc6$ tüves, mis avastati ülegenoomse analüüsi tulemusel (Alvaro jt., 2007).

Ülegenoomne Rad52 fookuste analüüs viis 2007. aastal mitmete uute geenide identifitseerimiseni. Leiti nii varem kirjeldatud gene, mis reguleerivad replikatsiooni, reparaatsiooni, geenide vaigistamist ja kromosoomide segregatsiooni. Lisaks leiti 22 varem

kirjeldamata ORF-i, mis nimetati IRC2-11, IRC13-16, IRC18-25 (*Increased Recombination Centres*). Uuritud geenid koos varem kirjeldamata IRC-geenidega jagati nelja alamklassi sõltuvalt nende mõjust homoloogilisele rekombinatsioonile.

Klass I. Sellesse klassi kuuluvad 3 Rad25 epistaasigrupi geeni, mille deletsioonid tõstsid Rad52 fookuste esinemissagedust, kuid vähendasid Rad51-st sõltuvat HR-i ning võimetust rekombinatsiooniprotsessi lõpule viia. Ükski avastatud IRC-geen ei kuulu sellesse klassi.

Klass II. Siia klassi kuuluvad geenid, mis vastutavad genoomi stabiilsuse ning spontaansete DNA vigastuste mahasurumise eest. Lisaks kuuluvad sellesse klassi tuumapoori geenid ja 2 mitokondriaalset geeni (COX16 ja MRPI17). Deletsioonid nendes geenides tõstavad homoloogilise rekombinatsiooni taset õdekromatiidide ning homoloogiliste kromosoomide vahel, mis viitab spontaansete DNA katkete tõusule.

Klass III. Geenide mutandid põhjustasid diploidsetes rakkudes homoloogsete kromosoomide vahelise rekombinatsiooni taseme tõusu võrreldes tütarchromatiidide vahelise rekombinatsiooniga. Kõrgenenud homoloogsete kromosoomide rekombinatsiooni taseme tõus võib viidata defektile tütarchromatiidide vahelise rekombinatsiooni tõhususes. Kuna enamik siia klassi kuuluvaid geene vastutavad DNA replikatsiooni, reparatsiooni ja kromatiini dünaamika eest, siis on tõenäoline, et kuus avastatud siia klassi kuuluvat IRC-geeni (IRC 4, IRC 5, IRC7, IRC9, IRC14, IRC19) on samuti seotud DNA metabolismiga.

Töös uuritav IRC3 geen kuulub neljandasse klassi, kus on geenid, mis ei mõjuta HR sagedust, või mõjuvad homoloogilisele rekombinatsioonile vaid spetsiifilistes regioonides. See võib olla põhjustatud üldisest HR protsessi aeglustumisest või fookuse lahknemise aeglustumisest, ilma, et lõpptulemus muutuks. Siia klassi kuuluvad mitokondriaalsed geenid, mis osalevad kromatiini ümbermodelleerimises ja rakutsükli kontrollpunktide geenid. Seetõttu võib arvata, et 12 siia klassi kuuluvat IRC-geeni on seotud nende protsessidega. IRC3 geen kodeerib arvatavasti DEAD/DEAH *box* helikaasi, mis transporditakse mitokondrisse (Alvaro jt., 2007).

2. Töö eesmärk

Antud töö eesmärk oli uurida Irc3 valgu võimalikku funktsiooni *S. cerevisiae* mitokondris. Eesmärgiks oli iseloomustada Irc3 transpordisignaali, uurida kuidas mõjutavad Irc3 konserveerunud helikaasi motiivide mutatsioonid selle valgu funktsioonile *in vivo*, ning kuidas mõjub Irc3 deleteerimine mtDNA stabiilsusele ρ^- tüvedes.

3. Materjalid ja meetodid

3.1 Kasutatud bakteritüved, pärmitüved ja söötmed

Töös kasutatud bakteri- ja pärmitüved on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Töös kasutatud bakteritüved ja pärmitüved

| <i>E. coli</i> tüved | | |
|----------------------------|--|---|
| Tüvi | Genotüüp | Päritolu |
| DH5α | <i>F endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ⁻</i> | Hanahan, 1985 |
| Top10 | <i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻</i> | Invitrogen |
| <i>S. cerevisiae</i> tüved | | |
| Tüvi | Genotüüp | Kirjeldus |
| w303 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1</i> | Wallis jt., 1989 |
| w303 Δirc3 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, irc3::Hph</i> | Valmisatud Ilja Gaidutsiku poolt |
| w303 S* A7 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1</i> | ori 2, ori 7 B ja A box, mtDNA fragmendi suurus 2193 bp |
| w303 S A1184 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1</i> | ori 2, ori 7 B ja A box, mtDNA fragmendi suurus 1184 bp |
| w303 S A1184 Δrpo41 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, rpo41::KanMX</i> | ori 2, ori 7 B ja A box, mtDNA fragmendi suurus 1184 bp |
| w303 S A1184 Δirc3 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, irc3::Hph</i> | ori 2, ori 7 B ja A box, mtDNA fragmendi suurus 1184 bp |
| w303 S A1184 Δrpo41 Δirc3 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, rpo41::KanMX, irc3::Hph</i> | ori 2, ori 7 B ja A box, mtDNA fragmendi suurus 1184 bp |
| w303 S A1184 Δirc3 Δrpo41 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, irc3::Hph, rpo41::KanMX</i> | ori 2, ori 7 B ja A box, mtDNA fragmendi suurus 1184 bp |
| w303 S A1184 Δrpo41 Δhmi1 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, rpo41::KanMX, hmi1::Hph</i> | ori 2, ori 7 B ja A box, mtDNA fragmendi suurus 1184 bp |

| | | |
|--------------------------------|--|---|
| w303 S A1184 Δrpo41 Δste5 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, rpo41::KanMX, ste5::Hph</i> | ori 2, ori 7 B ja A box, mtDNA fragmendi suurus 1184 bp |
| w303 S A1184 Δrpo41 Δmtf1 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, rpo41::KanMX, mtf1::Hph</i> | ori 2, ori 7 B ja A box, mtDNA fragmendi suurus 1184 bp |
| w303 S A1184 Δrpo41 Δmss116 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, rpo41::KanMX, mss116::Hph</i> | ori 2, ori 7 B ja A box, mtDNA fragmendi suurus 1184 bp |
| w303 HS* A61 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, hmi1::TRP, Hmi1 (KanMX)</i> | ori 2, mtDNA fragmendi suurus 826 bp |
| w303 HS A61 Δrpo41 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, hmi1::TRP, Hmi1 (KanMX), rpo41::URA3</i> | ori 2, mtDNA fragmendi suurus 826 bp |
| w303 HS A61 Δirc3 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, hmi1::TRP, Hmi1 (KanMX), irc3::Hph</i> | ori 2, mtDNA fragmendi suurus 826 bp |
| w303 HS A61 Δrpo41 Δirc3 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, hmi1::TRP, Hmi1 (KanMX), rpo41::URA3, irc3::Hph</i> | ori 2, mtDNA fragmendi suurus 826 bp |
| w303 HS A61 Δirc3 Δrpo41 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, hmi1::TRP, Hmi1 (KanMX), irc3::Hph, rpo41::URA3</i> | ori 2, mtDNA fragmendi pikkus 826 bp |
| w303 HS A61 Δrpo41 Δhmi1 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, hmi1::TRP, Hmi1 (KanMX), rpo41::URA3, hmi1::Hph</i> | ori 2, mtDNA fragmendi suurus 826 bp |
| w303 HS A61 Δrpo41 Δste5 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, hmi1::TRP, Hmi1 (KanMX), rpo41::URA3, ste5::Hph</i> | ori 2, mtDNA fragmendi suurus 826 bp |
| w303 HS A61 Δrpo41 Δmtf1 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, hmi1::TRP, Hmi1 (KanMX), rpo41::URA3, mtf1::Hph</i> | ori 2, mtDNA fragmendi suurus 826 bp |
| w303 HS A61 Δrpo41 Δmss116 | <i>can1-100, leu2-3,-112, his3-11,-15, trp1-1, ura3-1, ade2-1, hmi1::TRP, Hmi1 (KanMX), rpo41::URA3, mss116::Hph</i> | ori 2, mtDNA fragmendi suurus 826 bp |

Lühendid: S*- supressiivne, HS*- hüpersupressiivne

DH5 α ja Top10 rakud kasvatati 37° C juures LB söötmes (1% baktotrüpton, 0,5% baktopärmiekstrakt, 0,5% NaCl pH 7) või 2xYT söötmes (1,6% trüpton; 1% pärmiekstrakt; 0,5% NaCl). Tardsöötmele lisati 1,7% agarit. Selekteerimiseks kasutati ampitsiliini lõppkontsentratsiooniga 100 μ g/ml.

Pärmitüved kasvatati 25 või 30° C juures kasutades järgmisi söötmeid:

YPG: 1% pärmiekstrakt; 2% baktotrüpton; 3% glütserool.

YPD: 1% pärmiekstrakt; 2% baktotrüpton; 2% glükoos.

Tardsöötmetele lisati 1,7 % agarit. Seleksiooniks lisati antibiootikume G418 ja Hph lõppkontsentratsiooniga 300 μ g/ml.

Selektiivsöötmed (SC- *Synthetic complete media*) Sc-Ura, Sc-Leu või Sc-Ura -Leu: 0,67% ilma aminohapeteta pärmilämmastikalust; 0,2% aminohapete ja nukleosiidide segu, kust oli välja jäetud vastavalt uratsiil, leutsiin või mõlemad; 2% glükoos või 3% glütserool (Rose jt., 1990). Tardsöötmele lisati 1,7% agarit.

SC Minimal sööde: 2% glükoos, 0,67% ilma aminohapeteta lämmastikalust, trüpton 100mg/l, adeniin 20 mg/l, uratsiil 50 mg/l, histidiin 100 mg/l, leutsiin 250 mg/l (Rose jt., 1990).

3.2 Kasutatud plasmiidid

Töös kasutatud plasmiidid on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Töös kasutatud plasmiidid

| Plasmiiidi nimetus | Kirjeldus | Marker |
|----------------------------------|---|--------|
| pRS 315 | (pBLUESCRIPT KS+ +LEU2, CEN6, ARSH4)(Skiroski ja Hieter, 1989) | LEU2 |
| pRS 316 | (pBLUESCRIPT KS+ +URA3, CEN6, ARSH4 (Skiroski ja Hieter, 1989) | URA3 |
| pRS 315 Irc3 | IRC3 genoomne järjestus ±400 bp (Dmitri Lubenets) | LEU2 |
| pRS 316 Irc3 | IRC3 genoomne järjestus ±400 bp (Dmitri Lubenets) | URA3 |
| pRS 315 Irc3 Δ15 | IRC3 esimese 45 bp N- terminaalne deletsioon | LEU2 |
| pRS 315 Irc3 Δ28 | IRC3 esimese 84 bp N- terminaalne deletsioon | LEU2 |
| pRS 315 Irc3 Δ28 CIT1 | IRC3 esimese 84 bp N- terminaalne deletsioon ning CIT1 signaaljärjestus | LEU2 |
| pRS 315 Irc3 GKT →GAT mut | IRC3 mutatsiooniga Walker A ATPaasi A motiivis GKT→GAT | LEU2 |
| pRS 315 Irc3 QMIGR →AMIGQ mut | IRC3 mutatsiooniga helikaasi VI motiivis QMIGR→AMIGQ | LEU2 |
| pRS 315 Irc3 LLF→LLA mut | IRC3 mutatsiooniga helikaasi IV motiivis LLF→LLA | LEU2 |
| pRS 425 Irc3 | IRC3 genoomne järjestus ±400 bp | LEU2 |
| pRS 425 Irc3 GKT →GAT mut | IRC3 mutatsiooniga Walker A ATPaasi A motiivis GKT→GAT | LEU2 |
| pRS 425 Irc3 Δ28 | IRC3 esimese 84 bp N- terminaalne deletsioon | LEU2 |
| pYPGC | QUATTROMED | LEU2 |
| pYPGC Irc3 | IRC3 genoomne järjestus ±400 bp (Natalja Tšernikova) | LEU2 |
| pFA6a Hph | Hügroümütsiini resistentsusgeen (Euroscarf) | |
| pFA6a KanMX | G418-sulfaadi resistentsusgeen (Euroscarf) | |
| 315 rep stop CIT | CIT1 signaaljärjestus | LEU2 |

3.3 PCR reaktsioonid

Kõik PCR reaktsioonid teostati Eppendorfi või Biometra Thermocycler T1 PCR masinates. PCR reaktsioonid viidi läbi standardse protokoll järgi Taq, Taq/Pfu või Pfu polümeraasidega (puhastatud Biokeemia laboris) ning reaktsioonid kestsid 30 tsükli 95° C 30 sek, 54° C 30 sek, 72° C 1min/1000bp DNA järjestuse kohta (va megaprimer mutageneesi- ja sekveneerimisreaktsioonid).

3.4 Plasmiidide kloneerimine

Kloneerimiseks kasutatud praimerid on toodud tabelis 4.

Tabel 4. Töös kasutatud praimerid

| Integratsioonikassetide amplifitseerimine | | |
|---|--|--|
| Nimi | Järjestus 5'-3' | Kasutatud plasmiid |
| YDR332wDelFrSt | TTATTTACATAACGGAAGAAGCCTATTGGAG CCATGAGTATAATAAAATATAGATTAAGGCGC GCCAGATCTG | pFAB6a Hph |
| YDR332wDelRev | CTAGTGACTIONTATATTAATATATGCACATTTAT GTAGCACGGATTTTAATCGATGAATTCGAGTC G | pFAB6a Hph |
| RpoUpKan | TTTACATTTTATAACATTCCTTGGATCAGTTCCT CCCCCTCTTTGATATTCACCTCAATATGCGTACG CTGCAGGTCGAC | pFAB6a KanMX |
| RpoDownKan | TGTATATATGTACAAGTTAAATAAAAATAACA CAAATAAATTTTAGTTTGTAGTTCACGGCTCA GAATTCGAGCTCGTTTTTCGACAC | pFAB6a KanMX |
| Integratsiooni kontrollimine | | |
| Praimer | Järjestus 5'-3' | Positsioon geenil/ integratsioonikassetil |
| Irc3BamHI5 | GCCGGATCCCTTGGAGACTTACCGCAAAAAC AAT | Up 400bp Irc3 |
| revHph5out | ACATGGGGATGTATGGGCTA | 193 bp IK |
| Hmipseq | CTTCCCTTGTGATGTGTCAG | Up 141bp Hmi1 |
| Rpo41up5 | GCAGATCTCCTGTTCATATACC | Up 73 bp Rpo41 |
| KanMX3 | GAATTCGAGCTCGTTTTTCGACAC | 1,6 kbp IK |
| Rpo41down3 | GCAAACGATAAACGCTAAGTATG | Down 68 bp Rpo41 |
| Ste5pr | TATTTTCGAGTGAAGAAGAAGCGTTAAA | Up 423 bp Ste5 |
| MtfEcoRI | CGGAATTCGGATTATTGCGACTAATTTG | Up 212 bp Mtf1 |
| Mss116up5 | CGTGTATCGTGATATATCGTG | Up 279 bp Mss116 |
| Konstruktide valmistamine/amplifitseerimine | | |
| IRC3P_5_SacI | GGAGCTCCTTGGAGACTTACCGCAAAAACAA T | Up 400 bp Irc3 |
| Irc3_1097rev* | GTGAACGCGATTTTGTGGGCCTAC | 1097 bp Irc3 |
| CIT1BamHI5 | GCAGGATCCATGTCAGCGATATTATC | 5' Cit1 |
| CIT1BamHI3 | TCAGGATCCACTATAGTGGCGAGCATTC | 3' Cit1 |
| Mutagenees | | |
| IRC3_LL_F_mut | TCAACATTACTGGCTGGCGTTGATAAAG | 865 bp Irc3 |
| IRC3_QMIGR_mut | GTAAACCTTGCCAATCATTGCAATCAAAG | 979 bp Irc3 |
| Irc3_SacI_3 | GCCGAGCTCGCAATTCATCATTTATCTGGTC TG | Down 400 bp Irc3 |
| Sekvenerimine | | |
| Irc3_739Rev* | AAACCCGGGGAAGTCATCTGCAGTGCTTTTTA CAT | 739 bp Irc3 |
| Ori5out* | GAAAATAATAATTGGGACCCCC | Ori A box |
| Ori3out* | ACCCACCCCTCCCCCTA | Ori C box |
| IRC3_FWD_677* | GATGACAAGTGGCTATGTGAGGC | 677 bp Irc3 |

| Radioaktiivse proovi tegemine | | |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------|
| Ori3in | TAGGGGGAGGGGGTGGGT | Ori C box |
| Ori5in | GGGGGTCCCAATTATTATTTTC | Ori A box |
| DNR3834 | CCGAATTCGCTAAAATTGGTATCTCCGTA | 2752 bp Dna2 |
| DNR4193 | CCGGATCCTATTGCTTCTTTTGGATTCAA | 3188 bp Dna2 |

Lühendid ja märkmed: IK- integratsioonikassett, Up = geeni algusest ülesvoolu, down = geeni lõpust allavoolu.

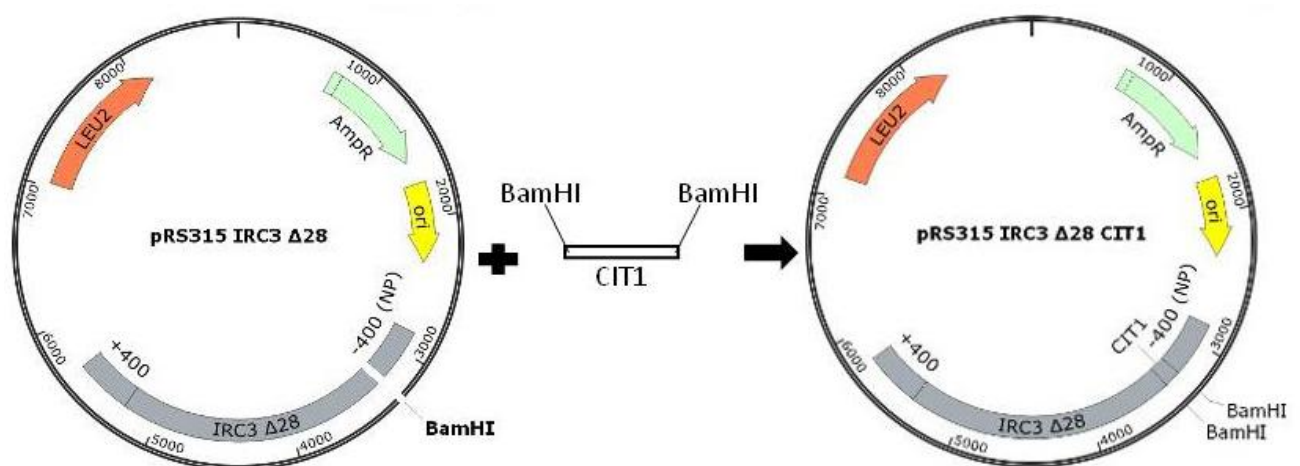
Tärniga tähistatud primereid kasutati mitmes protsessis. *Bold*-is on tähistatud restriktasid löikekohad, restriksiooniks sobiv ensüüm on mainitud praimeri nimetuses.

Kõigis reaktsioonides kasutati firma Fermentas (Thermo Scientific) restriktase, T4 DNA ligaasi, T4 polünukleotiidkinaasi ja FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase ning puhvreid. Reaktsioonid viidi läbi firma Fermentas poolt välja töötatud protokoll järgi.

Restriksioonifragmendid ligeeriti T4 DNA ligaasi abil 1x T4 DNA ligaasi puhvis toatemperatuuril või 4° C juures.

Plasmiidi pRS 315 Irc3 Δ28 CIT1 konstrueerimine

pRS 315 Irc3 Δ28 CIT1 konstrueerimiseks amplifitseeriti praimeritega CIT1BamHI5 ja CIT1BamHI3 plasmiidilt 315 rep stop CIT 134 bp suurune fragment, mis sisaldas CIT1 signaali. Fragmenti töödeldi restriktasiga BamHI. Sama restriktasiga lineariseeriti plasmiid pRS 315 Irc3 Δ28 ning defosforüleeriti religeerumise vältimiseks. 114 bp pikkune signaaljärjestus inserteeriti plasmidi promotori ning mutantse Irc3 geeni N-terminuse vahele (Joonis 11).

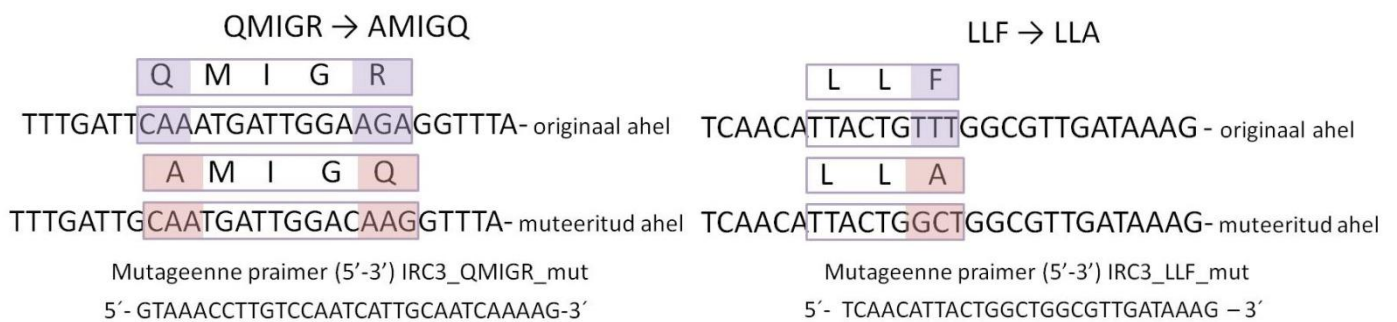


Joonis 11. pRS 315 Irc3 Δ28 CIT1 plasmidi konstrueerimine. NP-natiivpromootor.

pRS 315 Irc3 Δ28 CIT1 korrektsuse kontrollimiseks kasutati restriksioonanalüüsi ja sekveneerimist.

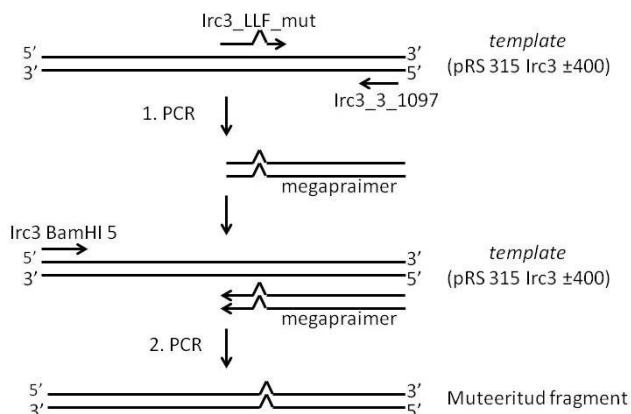
pRS 315 Irc3 ±400 QMIGR→AMIGQ mut ja pRS 315 Irc3 ±400 LLF→LLA mut konstrueerimine

Mutantseid helikaasi motiive sisaldavate plasmiidide pRS 315 Irc3 QMIGR→AMIGQ mut ja pRS 315 Irc3 LLF→LLA mut tegemiseks kasutati megaprimer meetodit (Ling ja Robinson, 1997). Mutageneesi tulemusel muudeti plasmiidis pRS 315 Irc3 ±400 QMIGR→AMIGQ mut Irc3 valku kodeerivas järjestuses helikaasi VI motiivi kõrgelt konserveerunud aminohappejäägid Q (glutamiin) ja R (arginiin) vastavalt A-ks (alaniin) ja Q-ks (glutamiin), et inaktiveerida selle motiivi funktsioon. Plasmiidis pRS 315 Irc3 ±400 LLF→LLA mut oli samal eesmärgil muudetud L (leutsiin) A-ks (alaniin). Mutageneesipraimerite ja originaaljärjestuste võrdlus on toodud joonisel 12.



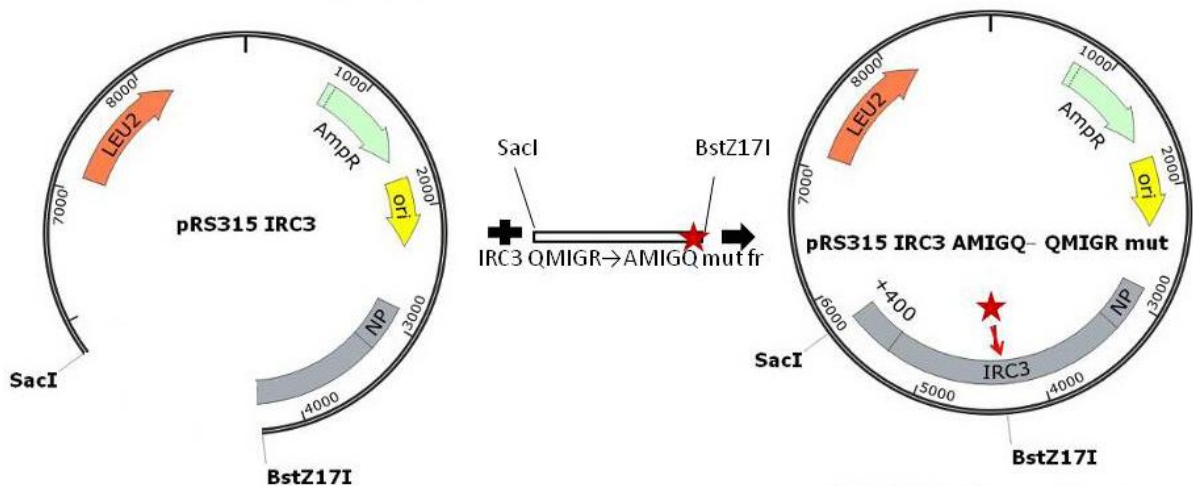
Joonis 12. Irc3 helikaasi motiivide originaalalabelad, muteeritud ahelad ning mutageensed praimerid

pRS 315 Irc3 QMIGR→AMIGQ mut kloneerimiseks vajamineva megaprimeri sünteesiks kasutati praimeripaari IRC3_QMIGR_mut ja IRC3_FWD_677, mille abil amplifitseeriti 457 bp suurune fragment. Fragmenti kasutati järgmises PCR reaktsioonis megaprimerina koos 3' praimeriga Irc3_SacI_3. *Template*-na kasutati plasmidi pRS 315 Irc3. pRS 315 Irc3 LLF→LLA mut kloneerimiseks vajamineva megaprimeri süntees toimus sama strateegia järgi, kasutatud praimerid on toodud joonisel 13 ja tabelis 4.



Joonis 13. Illustratsioon megaprimer punktmutageneesi meetodist töös kasutatud Irc3 helikaasi IV motiivi muteerimise näitel.

Irc3 QMIGR→AMIGQ mutantset fragmenti ja sihtmärkplasmidi pRS 315 Irc3 lõigati samade restriktasidega, restriksiooniproduktid lahutati agarosgeelil ning ligeeriti (Joonis 14). Analoogselt toimiti ka pRS 315 Irc3 LLF→LLA mut plasmidi konstrueerimisel.



Joonis 14. pRS 315 Irc3 QMIGR→AMIGQ mut plasmidi konstrueerimine. Punane täheke märgib QMIGR→AMIGQ mutatsiooni asukohta. pRS 315 Irc3LLF→LLA mut plasmidi konstrueerimine toimus analoogsel meetodil.

pRS 315 Irc3 Δ 28 CIT1, pRS 315 Irc3 QMIGR→AMIGQ mut ja pRS 315 Irc3 LLF→LLA mut plasmiidide paljundamiseks transformeeriti nad *E. coli* kompetentsetesse tüvedesse DH5 α või Top10 Heat-Shock meetodiga (Hanahan, 1983). Plasmidi sisaldavad rakud selekteeriti LB ampitsiliini sisaldaval söötmel. Üles kasvanud rakkudes kontrolliti IRC3 geeni olemasolu koloonia PCR abil, kasutades tabelis 4 toodud primereid. Saadud positiivsetest kolooniatest eraldati plasmiidne DNA aluselise lüüsi meetodil (Sambrook ja Russell, 2001). DNA-d sisaldavale lahuse puhastamiseks valkudest viidi läbi fenooltötlus nagu on kirjeldanud Sambrook ja Russell, 2001.

Konstruktide õigsust kontrolliti sekveneerimise abil, kus matriitsahelana kasutati PCR'iga amplifitseeritud fragmente ning reaktsioon viidi läbi vastavalt BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit'i (Applied Biosystems) protokollile. Sekveneerimine teostati Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi DNA sekveneerimise tuumiklaboris.

3.5 Geelektroforees ning DNA geelist puhastamine

Kloneerimise ning analüütilised PCR- ja restriksiooniproduktid voolutati 0,8% TAE agarosgeelis (0,8% agaros; 40mM Tris- atsetaat; 2mM EDTA pH 8,5; 300 ng/ml EtBr).

DNA geelile kandmiseks kasutati 6x TAE laadimispuhvit (10 mM Tris- HCl pH 7,6; bromofenool sinine; 60% glütserool; 60mM EDTA). Suurusmarkerina kasutati Mix5 (valmistatud Tiina Sedmani poolt). DNA geelist puhastamiseks kasutati UltraClean™ 15 DNA purification Kit'i (Mo Bio Laboratories, Inc) vastavalt selle protokollile.

3.6 *S. cerevisiae* tüvede tegemine kasutades LiOAc meetodit

Tabelis 3 toodud plasmiidid transformeeriti *S. cerevisiae* w303 Δ irc3::Hph rakkudesse LiOAc meetodiga Rose, 1990 järgi.

W303 S A1184 tüve tegemine: w303 S A7 rakke kasvatati SC Minimal vedelsöötmes 7 päeva, plaaditi tardsöötmele ning üksikutest kolooniatest eraldati totaalne DNA ning analüüsiti Southern Blot meetodiga. Sobiva suurusega fragment (1184 bp) sekveneeriti selle täpse järjestuse teada saamiseks ning nimetati w303 S A1184.

Selleks, et uurida IRC3 deletsiooni mõju HS A61 ja S A1184 rakkude mtDNA stabiilsusele, valmistati neist Δ irc3, Δ rpo41, Δ irc3- Δ rpo41 ning Δ rpo41- Δ irc3 deletsioonitüved. Kontrolliks valmistati samadest algtüvedest veel Δ rpo41- Δ hmi1, Δ rpo41- Δ ste5, Δ rpo41- Δ mtf1 ning Δ rpo41- Δ mss116 deletsioonitüved. Selleks transformeeriti PCR abil amplifitseeritud integratsioonikassetid HS A61 ja S A1184 tüvedesse kasutades Rose jt., 1990 LiOAc modifitseeritud protokoll (enne *heat shocki* 42° C juures lisati rakulüsaadile dimetüül sulfoksiidi lõppkontsentratsioonini 10%). Kassetid integreeruvad vajalikku piirkonda genoomis homoloogilise rekombinatsiooniga ning insertioon deleteerib soovitud geeni.

Geenide deleteerimiseks kasutati antibiootikumide hügromütsiin ja G418- sulfaat resistentsusgeene Hph ja KanMX, tänu millele oli võimalik soovitud deletsiooni omavaid rakke hiljem selekteerida. Hph markeriga Δ irc3 integratsioonikasset ja KanMX markeriga Δ rpo41 integratsioonikasset amplifitseeriti tabelis 4 (Integratsioonikassetide amplifitseerimine) toodud praimeritega plasmiididelt pFA6a Hph ja pFA6a KanMX. URA3 markeriga Δ rpo41 integratsioonikasset, mida kasutati HS A61 tüves, oli valmistatud Tiina Sedmani poolt.

S A1184 tüvesse transformeeriti integratsioonikassetid *irc3::Hph* ning *rpo41::KanMX*. Δ irc3 ja Δ rpo41 topelt *knockoutide* saamiseks transformeeriti S A1184 Δ irc3 tüvesse veel *rpo41::KanMX* integratsioonikasset ning S A1184 Δ rpo41 tüvesse *irc3::Hph*

integratsioonikassett. HS A61 tüve muteerimiseks kasutati sama strateegiat, kuid RPO41 deleteerimiseks kasutati integratsioonikassetti rpo41::URA3, kus RPO41 geeni järjestusse on inserteeritud URA3 markergeen. Kontrolltüvedede valmistamiseks transformeeriti S A1184 Δ rpo41 ja HS A61 Δ rpo41-sse integratsioonikassetid hmi1::Hph, ste5::Hph, mtf1::Hph ning mss116::Hph.

Deletsioonide insertsiooni kontrolliti PCR abil. Selleks eraldati rakkudest DNA LioAc-SDS meetodi abil (Lõoke jt., 2011). Soovitud geenide deletsiooni kindlakstegemiseks kasutati praimeripaare, millest üks seondub kontrollitava geeni promootor- või terminaatorpiirkonda ning teine integratsioonikassetile. Korrekse integratsiooni korral amplifitseerub kindla suurusega fragment. Rpo41::URA deletsiooni kontrolliti praimeritega, millest üks seondub RPO41 geeni ette ning teine geeni C-terminaalsele osale. URA markergeeni integratsioon tehti kindlaks PCR produkti suuruse järgi. Integratsiooni kontrollimisel kasutatud praimerid on toodud tabelis 4 (Integratsioonikassetide kontrollimine).

3.7 Plasmidi välja vahetamine 5-FOA süsteemiga

Mutantset IRC3 geeni sisaldavate plasmiidide funktsionaalsust kontrolliti w303 Δ irc3 tüves plasmiidivahetuse meetodit kasutades.

Selleks transformeeriti w303 Δ irc3 tüvesse täispikka IRC3 geeni ning funktsioneerivat valku kodeeriv plasmiid pRS 316 Irc3 \pm 400, millel on URA3 marker ning see plasmiid kompenseerib deleteeritud kromosomaalse IRC3 geeni. Tüvi selekteeriti SC-URA söötmel. Järgmisena transformeeriti w303 Δ irc3 pRS 316 Irc3 \pm 400 rakkudesse LEU2 markeriga pRS315 baasil valmistatud IRC3 mutantset järjestust sisaldavad plasmiidid, ning selekteeriti SC –URA –LEU söötmel.

Selleks, et uurida mutantset IRC3 geeni sisaldavate rakkude fenotüüpi, oli vaja vabaneda plasmiidist pRS 316 Irc3 \pm 400, mis sisaldas metsiktüüpi IRC3 geeni. Selleks kasutati 5-FOA (fluorooroonhape) meetodit. 5-FOA kasutatakse *S. cerevisiae* rakkude selekteerimiseks, millel on URA3 lookuses mutatsioon (*ura3--*rakud). Rakud, mis omavad selle lookuse metsiktüüpi varianti on võimetud 5-FOA juuresolekul kasvama, kuna nad kasutavad uratsiili substraadina 5-FOA-d, mille produkt 5-fluorouratsiil on rakkudele mürgine. 5-FOA-d sisaldavale söötmele külvatud rakkudest jäävad ellu vaid need, mis ei oma funktsionaalset URA3 geeni ning uratsiili ei sünteesi (Boeke jt., 1987).

Rakkude respiratsioonivõime on jälgitav tänu ADE2 mutatsioonile, mille tulemusel erinevat mtDNA-d sisaldavad rakud moodustavad punaseid, valgeid või punaste ja valgete sektoritega kolooniad (Boeke jt., 1987).

Puna- valge fenotüübi jälgimiseks ning statistilise analüüsi läbiviimiseks sobiv kolooniate arv 5-FOA-d sisaldaval Petri tassil saadi külvates tassile 10^5 raku, arvestusega, et FOA-d sisaldaval söötmel kasvab üles 1/1000 rakkudest.

3.8 *S. cerevisiae* DNA eraldamine

S. cerevisiae tüvede totaalne DNA eraldati Rose jt., 1990 modifitseeritud protokoll järgi. Rakud kasvatati 30° C juures vedelsöötmes, arvestusega 4 ml kultuuri 1 eralduse kohta. Rakud tsentrifugeeriti põhja 1 min 14000 rpm Hettich Universal 32R (rootor 1617 *swing out*) tsentrifugeeriga (edaspidi kasutati sama tsentrifugeeriga samadel pööretel). Sööde eemaldati ning sade lahustati 500 µl 1M sorbitool 10mM Tris pH 8 10mM EDTA pH 8, kuhu lisati rakukestade lüüsimiseks Zymolase 20T 4mg/ 1g rakkude kohta. Lahus homogeniseeriti vortexi abil ning inkubeeriti 37° C 10-15 min. Seejärel tsentrifugeeriti 1 min ning eemaldati supernatant. Sade lahustati 500µl 50mM Tris pH 7,5 20mM EDTA pH 8 ning lisati 50 µl 10% SDS-i. Segu suspendeeriti ning inkubeeriti 30 min 65°C. Tuubid pandi jääle, lisati 200µl 5M KoAC ning inkubeeriti jääs 40 min- 1h. Lüsati tsentrifugeeriti 4° C 2-5 min, supernatant tõsteti uude tuubi ning DNA sadestati võrdse mahu isopropanooli lisamisega. Totaalne DNA tsentrifugeeriti põhja 1 min, supernatant eemaldati ning sadet pesti 80% EtOH-ga. RNA-st vabanemiseks lisati DNA-le T₁₀E₁ RnaasA-d (10 mM Tris pH 7; 1 mM EDTA pH 8; 20 µg/ml RnaasA) ning inkubeeriti 15 min 65°C. Valkude lõhkumiseks lisati 2X Proteinaas K puhvrit Proteinaas K-ga (1% SDS; 10 mM Tris pH8; 10 mM EDTA pH8; 0,2µg/ µl Proteinaas K) ning inkubeeriti 55°C 50 min. Seejärel lisati T₁₀E₁, tehti fenool/kloroformi ekstraktsioon, DNA sadestati 2,5 mahu 99% EtOH-ga ning lahustati T₁₀E₁-s.

Mitokondriaalse DNA eraldamise jaoks kasvatati 1l rakukultuuri YPD söötmes tiheduseni OD₆₀₀ 0,8-1. Rakud tsentrifugeeriti RC5 (rootor GS 3) tsentrifugeeriga 10 min 6000 rpm 4°C. Rakke pesti ddH₂O-ga ning tsentrifugeeriti Hettich Universal 32R (rootor 1617 *swing out*) (edaspidi kasutati sama tsentrifugeeriga) tsentrifugeeriga 3200 rpm 5 min 4°C. Seejärel pesti rakke 1,2M sorbitooliga ning tsentrifugeeriti uuesti. Sade resuspendeeriti 1,2M sorbitooli ja 20 mM KHPO₄ pH 7,5 lahuses 1ml/ 0,15g rakkude kohta ja rakukestade lõhkumiseks lisati Zymolase 20T 7mg/1g rakkude kohta ning loksutati aeglaselt 30°C 15-20 min. Segu jahutati

jääl ja tsentrifugeeriti 3200 rpm 5 min 4°C. Sade resuspendeeriti külmas homogenisatsioonipuhvris (0,6M sorbitool; 10mM Tris pH 7,5; 0,1% BSA; 1mM PMSF) 1ml/ 0,15 g rakkude kohta. Rakud lõhuti Dounce homogenisaatoriga ning tsentrifugeeriti 3500 rpm 5 min 4°C. Supernatant eemaldati ning mitokondrid tsentrifugeeriti põhja (rootor 1620A) 9000 rpm 10 min 4°C. Mitokondrid pesti külma homogenisatsioonipuhvriga, kuhu polnud lisatud BSA-d ja suspendeeriti lüüsi puhvris (75 mM NaCl; 50 mM EDTA pH 8; 1% SDS; 0,5 mg/ml Proteinaas K) ning inkubeeriti 30 min 37°C. Segu lahjendati võrdse mahu T₁₀E₁-ga. Valkude lõhkumiseks tehti fenool/kloroformi ekstraktatsioon, fenooli jäägid eemaldati kloroformi ekstraktatsiooniga. DNA sadestati 2,5 mahu 99% EtOH ning sadet pesti 80% EtOH-ga. MtDNA lahustati T₁₀E₁-s.

3.9 Southern Blot ja hübridisatsioon

1D Southern blotiga kontrolliti tabelis 2 toodud HS A61 ja S A1184 tüvede mtDNA fragmentide stabiilsust. HS A61 ja S A1184 ning nende deletsioonitüvede totaalne või mtDNA restrikteeriti eelnevalt vastavalt EcoRV või DraI-ga ning restriktiooniproduktid lahutati 0,7% TAE agarosgeelis (300ng/ml EtBr) 2,5V/cm ning ka puhvrissse lisati samas kontsentratsioonis EtBr.

2D Southern bloti võimaldas analüüsida mtDNA-d suuruse ja kuju järgi. Lõikamata mtDNA 2D- AGE teostati kõigist tüvedest pärinevale DNA-le ühtemoodi. 1D jaoks voolutati mtDNA 0,5% TAE agarosgeelis ilma EtBr-ta 1V/cm 15-16h toatemperatuuril. 2D jaoks voolutati mtDNA 1% TAE agarosgeelis (300ng/ml EtBr) 5V/cm 5h 4°C juures. Restriktaasidega lõigatud mtDNA voolutati esmalt 0,5% TBE agarosgeelis ilma EtBr 1V/cm 16h toatemperatuuril ning seejärel 1,5% TBE agarosgeelis (300ng/ml EtBr) 5V/cm 6h 4°C juures.

Geelis lahutatud DNA kanti Applichemi positiivselt laetud nailonfiltrile, kasutades Southern Blot'i aluselise puhvri (0,4M NaOH, 0,6M NaCl) ülekande meetodit (Applicchemi protokoll). Edasi kandunud DNA hübridiseeriti Church hübridisatsiooni protokoll järgi (Church ja Gilbert, 1984). Esmalt hübridiseeriti DNA radioaktiivselt märgistatud nukleaarse Dna2 prooviga, et DNA kogust kvantitatiivselt hinnata. Seejärel eemaldati nukleaarne proov (Applicchemi protokoll) ning filtril olev DNA hübridiseeriti radioaktiivselt märgistatud mitokondriaalse *Ori* prooviga.

Filtril olev signaal detekteeriti kasutades Amersham Biosciences Storage Phosphor Screen-i ning skaneeriti Typhoon Phosphoimager masinaga.

Radioaktiivse proovi tegemiseks amplifitseeriti kaheaahelaline DNA proov PCR abil (Sambrook ja Russell, 2001). Nukleaarse proovi jaoks amplifitseeriti geenilt DNA2 436 bp pikkune radioaktiivselt märgistatud fragment. Mitokondriaalse proovi jaoks amplifitseeriti mitokondriaalselt Ori2-lt 280 bp suurune radioaktiivselt märgistatud fragment. Mitokondriaalse proovi jaoks, mida kasutati 2D-AGE Southern blotis, amplifitseeriti radioaktiivselt märgistatud fragment nii Ori2-lt kui *ori*-de vaheliselt alalt. Radioaktiivsete proovide tegemiseks kasutatud praimerid on toodud tabelis 4 (Radioaktiivse proovi tegemine).

4. Tulemused ja arutelu

Käesolevas töös uuritav Irc3 on seni tundmatu funktsiooniga valk. Kõik seni avaldatud andmed selle geeni kohta pärinevad ülegenoomsetest analüüsides. IRC3 avastati ülegenoomse uuringu käigus ühe geenina, mis põhjustas Rad52 fookuste tekkesageduse tõusu, mis viitab sellele, et nendes tüvedes on suurenenud tuuma DNA kahjustuste hulk (Alvaro jt., 2007). DNA kahjustused parandatakse homoloogilise rekombinatsiooniga tuuma subnukleaarsetes fookustes, mille moodustavad Rad52 epistaasigrupi valgud (Lisby jt., 2001). Praeguseks on teada, et Irc3-GFP lokaliseerub mitokondriaalsesse maatriksisse (Alvaro jt., 2007). Sama tulemuse sai ka Üldise- ja Mikroobibiokeemia endine töötaja Dmitri Lubenets. Irc3 deleteerimisel tekivad suures osas ρ^- ja ρ^0 genotüübiga rakud ning vaid 1-10% rakkudest säilib ρ^+ genotüüp, mis mittefermenteeritaval süsinikuallikal on stabiilne (Szczesny jt., 2013). See tähendab, et funktsionaalne mtDNA säilib metaboolse pressi all. Seda näitavad ka meie labori katsed. Kui w303 Δ irc3 tüve komplementeerida täispika IRC3 geeni sisaldava plasmiidiga, siis hingamisaktiivsus säilib (avaldamata andmed). Irc3 Irc3p null mutant on temperatuuritundlik (kasvukiirus 30°C juures aeglustub ning 37°C juures on efekt veelgi suurem) (Shiratori jt., 1999). Irc3 on arvatav helikaas, mis omab sarnast järjestust DEAD/H-box helikaasidega (Alvaro jt., 2007), kuhu kuuluvad nii RNA kui DNA helikaasid. W303 Δ irc3 tüvi omab respiratoorset defekti, mis viitab sellele, et Irc3 valgu funktsioon on seotud mtDNA metabolismiga (Shiratori jt., 1999).

Irc3 funktsiooni uurimiseks tehti Biokeemia laboris Dmitri Lubenetsi poolt *in silico* analüüs, ja kasutades programme Mitoprot, PSORT ja Turget P ennustati, et IRC3 mitokondriaalne signaaljärjestus on 28 aminohapet pikk.

Eelnevalt minu bakalaureusetöös tehtud katsed näitasid, et kui Irc3 N-terminusest eemaldati 15 aminohapet, siis säilis funktsionaalne mitokondriaalne genoom ning rakkude fenotüüp sarnanes *wild type* tüvele. Kui N-terminaalsest regioonist eemaldati 28 või 35 aminohappe pikkune regioon, kadus enamus rakkudest teatud aja möödumisel funktsionaalne mitokondriaalne genoom. See lubas arvata, et MPP poolt ära lõigatava Irc3 funktsionaalse N-terminaalse transpordisignaali pikkus jääb vahemikku 15 kuni 28 aminohapet (Karin Villemson bakalaureusetöö, 2011). 2013. aastal leiti kasutades mass spektromeetria andmed, et mitokondrites on Irc3 valgu molekulid, mille N-terminus algab 29. ndast aminohapest (teostatud Tartu Ülikooli Tehnoloogainstituudis). Seega on Irc3 valgu transportimiseks vaja 28 aminohappe pikkust transpordisignaali.

4.1 Mutantse Irc3 valgu mõju *S. cerevisiae* mitokondriaalsele genoomile

Irc3 funktsiooni ja erinevate *irc3* mutantide mõju uurimiseks *S. cerevisiae* rakkudes planeeriti plasmidi vahetuskatse. Selleks konstrueeriti mutantid *irc3* ekspressioonivektorid.

Et teada saada, kas Irc3 N-terminaalne signaal on unikaalne või asendatav mingi muu signaaljärjestusega, kloneeriti IRC3 deleteeritud transpordisignaali asemele CIT1 mitokondriaalne transpordi signaaljärjestus. Selleks kloneeriti plasmiid pRS 315 Irc3 Δ 28 CIT1. Cit1 on tuuma poolt kodeeritud mitokondrisse lokaliseeruv tsitraadi süntaas. Cit1 MTS lõigatakse mitokondri maatrikisis MPP poolt ära. CIT1 signaaljärjestus on võimeline transportima ka teisi valke (Lee jt., 2000).

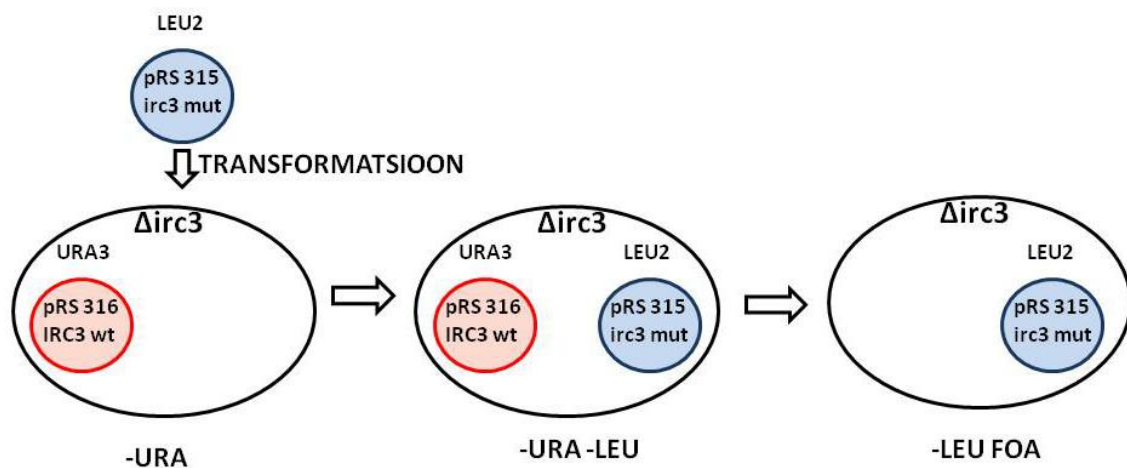
Irc3 valgu helikaasse funktsiooni uurimiseks kloneeriti konstruktid, mis sisaldasid mutantseid helikaasi konserveerunud motiive. Eelnevalt bakalaureusetöös tehtud katsed näitasid, et Irc3 Walker A mutantset motiivi omavad rakud kaotasid funktsionaalse mtDNA ning sarnanesid fenotüübilt Δ irc3 tüvele. Selleks, et teada saada, kuidas mõjutavad mutatsioonid helikaasi teistes konserveerunud motiivides valgu funktsionaalsust, konstrueeriti plasmiidid pRS 315 Irc3 QMIGR→AMIGQ mut ja pRS 315 Irc3 LLF→LLA mut. Neist esimene sisaldab mutatsiooni helikaasi VI motiivis, mida seostatakse ATP sidumise ja hüdroolüüsiga, ning teine mutatsiooni helikaasi IV motiivis, mis arvatakse osalevat nukleiinühapete sidumises. Katses kasutatud pRS 315 Irc3 GKT→GAT mut plasmiid oli konstrueeritud eelnevalt bakalaureusetöö käigus (Karin Villemson bakalaureusetöö, 2011).

Saadud konstrukte kasutati plasmidi välja vahetamise katses. Esmalt transformeeriti tüvesse täispikka IRC3 geeni ning funktsioneerivat valku kodeeriv plasmiid pRS 316 Irc3, millel on URA3 marker ning mis kompenseerib deleteeritud kromosomaalse IRC3 geeni. Järgmisena transformeeriti samasse tüvesse madala koopiaarvuga (1-2 koopia raku kohta) *irc3* mutantid vektorid pRS 315 Irc3 Δ 15, pRS 315 Irc3 Δ 28, pRS 315 Irc3 Δ 28 CIT1, pRS 315 Irc3 QMIGR→AMIGQ mut, pRS 315 Irc3 LLF→LLA mut ja pRS 315 Irc3 GKT→GAT mut. Lisaks transformeeriti pRS 425 Irc3, pRS 425 Irc3 GKT→GAT mut ja pRS 425 Irc3 Δ 28 NP. pRS 425 on kõrgema koopiaarvuga plasmiid (umbes 20 koopia raku kohta), mis võimaldab jälgida sellesse kloneeritud geeni üleekspressiooni mõju mtDNA stabiilsusele.

Positiivsete kontrollidena kasutati plasmide pRS 315 Irc3 ja pYPGC Irc3, mis sisaldavad IRC3 genoomset järjestust ning lisaks 400 bp genoomsest järjestusest geeni ees ja

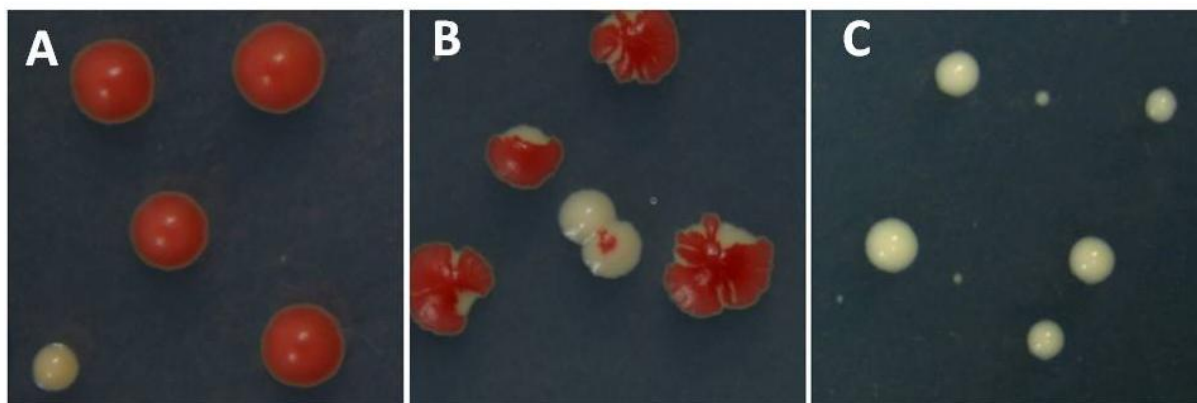
taga. Plasmiid pYPGC Irc3 sisaldab Irc3 C terminuses E2 tag-i, mille abil on võimalik uurida Irc3 valgu ekspressiooni. Negatiivsete kontrollidena kasutati pRS 315 ja pYPGC.

Selleks, et uurida mutantset IRC3 geeni sisaldavate rakkude fenotüüpi, oli vaja vabaneda plasmiidist pRS 316 Irc3, mis sisaldas metsiktüüpi IRC3 geeni. Kuna 5-FOA-d sisaldaval söötmel hülgevad rakud URA3 markergeeniga plasmidi, siis plaaditigi transformandid SC-LEU FOA söötmel, kus olid võimalised kasvama vaid pRS 316 Irc3 plasmidi kaotanud mutantset vektorit sisaldavad rakud (Joonis 15).



Joonis 15. Katseskeem metsiktüüpi IRC3 geeni sisaldava plasmidi pRS 316 Irc3 välja vahetamisest mutantse IRC3 geeniga plasmidi vastu. Joonisel toodud LEU2 markergeeniga pRS315 irc3 mut plasmiid representeerib kõiki erinevaid Irc3 mutatsiooni sisaldavaid plasmide, mida antud katses kasutati. Toodud on ka söötmed, millega oli võimalik antud plasmide sisaldavaid rakke selekteerida.

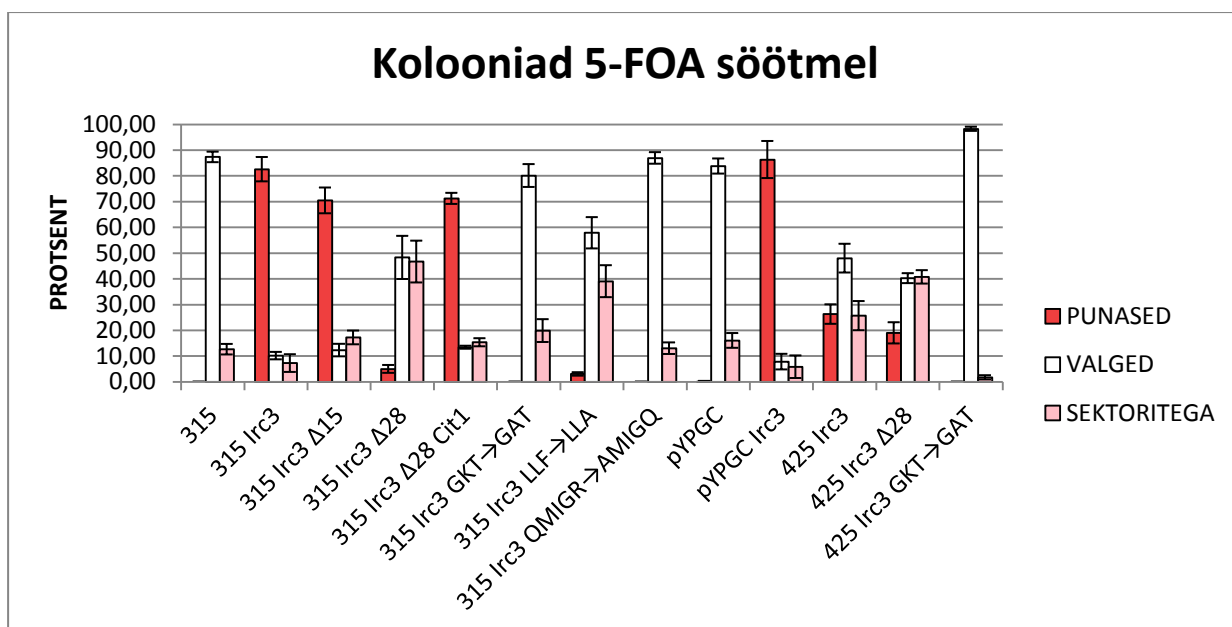
Rakkude respiratsioonivõime oli jälgitav tänu ADE2 mutatsioonile. ADE2 geeni produkt vastutab adeniini biosünteesi eest. ADE2 mutatsiooni korral akumuleerub respireerivates rakkudes biosünteesiraja intermediaatmolekul P-ribosüülaminoimidiasool (AIR), mis konverteeritakse punaseks pigmendiks. Nimetatud mutatsiooni tõttu moodustavad funktsionaalse mtDNA-ga respireerivad rakud fermenteeritaval süsinikuallikal suuri punaseid kolooniaid. Rakud, mille funktsionaalne mitokondriaalne genoom on kaduma läinud (ρ^- või ρ^0) ning mis on kaotanud respiratsioonivõime, moodustavad väikeseid valgeid *petite* kolooniaid. ρ^+ rakud, mis jagunemise käigus kaotavad oma funktsionaalse mtDNA, moodustavad segatüüpi punaste ja valgete sektoritega kolooniaid (Joonis 16). Seega oli vastavalt värvuse muutusele võimalik jälgida töös kasutatud mutantsete irc3 valkude mõju pärmi rakkude hingamisvõimele.



Joonis 16. Punased, sektoritega ning valged kolooniad SC-LEU FOA söötmel. A: punased kolooniad (ρ^+ rakud), võrdluseks on pildil ka üks valge koloonia; B: sektoritega kolooniad (ρ^+ ja ρ^-/ρ^0 rakud), võrdluseks on pildil ka 1 valge koloonia; C: valged kolooniad (ρ^-/ρ^0 rakud).

Fenotüübi avaldumise järgi saab erinevalt värvunud kolooniaid kvanitatiivselt analüüsida- mida rohkem valgeid kolooniaid moodustub, seda suurem on uuritava *irc3* mutandi funktsionaalne defekt.

SC-LEU FOA söötmel moodustunud erineva värvusega kolooniad loendati ning teostati statistiline analüüs. Katses tehti 3 kordust ning erinevalt värvunud kolooniad loendati 20 päeva möödumisel (Joonis 17, lisades tabel 5).



Joonis 17. SC-LEU FOA tassidelt loendatud erinevaid IRC3 mutatsiooniga plasmide sisaldavad rakukolooniad protsentuaalselt. Punased tulbad tähistavad punaseid kolooniaid, valged tulbad valgeid kolooniaid ning roosad tulbad sektoritega kolooniaid.

Negatiivsete kontrollidena kasutatud plasmide pYPGC ja pRS315 sisaldavad rakud moodustasid kõige rohkem valgeid kolooniaid (vastavalt 87,35% ja 83,81%), kuna neis puudus funktsionaalne IRC3 geen. Vähesel määral esines ka sektoritega (kuni 16%) ning üks punane koloonia. Punase või sektoritega kolooniate esinemine negatiivset kontrolli sisaldavate rakkude hulgas on seletatav sellega, et osades rakkudes ei kaomingil põhjusel funktsionaalne mtDNA esimeste rakkude pooldumiste käigus. Positiivsete kontrollidena kasutatud täispikka IRC3 geeni kodeerivaid pRS315 Irc3 ja pYPGC Irc3 plasmide sisaldavad rakud moodustasid enim punaseid kolooniaid (82,58% ja 86,33%). Kuna neid plasmide sisaldavad rakud omasid väga sarnast fenotüüpi, võib väita, et plasmidi pYPGC Irc3 C-terminaalne E2 tag ei mõjuta Irc3 valgu funktsiooni. Rakud, mis sisaldasid pRS315 Irc3 Δ 15 plasmidi, mille Irc3 valgu N-terminaalsest osast oli deleteeritud 15 aminohappe suurune lõik, moodustasid 70,45% punaseid kolooniaid, sarnanedes positiivsele kontrollile. Seetõttu võib arvata, et Irc3 valk transporditakse edukalt mitokondrisse, kus ta tagab respiratsioonivõime. Rakud plasmidiga pRS315 Irc3 Δ 28, mille Irc3 valgu N-terminaalsest osast oli deleteeritud 28 aminohappe suurune lõik, moodustasid 48,3% valgeid, 46,70% sektoritega ja vaid 5% punaseid kolooniaid, mistõttu võib järeldada, et enamustes rakkudes ei toimu Irc3 valgu transporti mitokondrisse. Plasmidi pRS315Irc3 Δ 28 CIT1, mille N-terminusse oli inserteeritud CIT1 signaaljärjestus, sisaldavad rakud moodustasid 71,24% ulatuses punaseid kolooniaid, sarnanedes fenotüübilt *wt* rakkudega. Seega võib järeldada, et Irc3 N-terminaalne signaaljärjestus pole ainulaadne ning selle asendamine CIT1 signaaljärjestusega tagab Irc3 valgu transporti mitokondrisse. Rakud, mis omasid Irc3 helikaasi mutantse Walker A motiiviga plasmidi pRS 315 Irc3 GKT→GAT mut, moodustasid 80,12% valgeid kolooniaid ning mitte ühegi punast kolooniat, sarnanedes fenotüübilt Δ irc3 tüvele. Plasmidi pRS 315 Irc3 QMIGR→AMIGQ mut sisaldavad rakud moodustasid 86,96% valgeid kolooniaid, sarnanedes negatiivsele kontrollile. See helikaasi motiiv arvatakse osalevat ATP sidumises või ATP hüdrolyüüsi energia ülekandmises DNA ahela lahtikeeramiseks. pRS 315 Irc3 LLF→LLA mut plasmidi omavad rakud moodustasid võrreldes eelnevalt kirjeldatud mutantidega vähem valgeid kolooniaid (57,88%) ning rohkem sektoritega kolooniaid (39,08%). Selle motiivi funktsiooniks võib olla helikaasse valgu konformatsiooni stabiliseerimine. Kõiki neid andmeid arvesse võttes võib väita, et töös uuritud helikaasi motiivid on väga olulised Irc3 valgu funktsionaalsuse tagamises.

Katses uuriti ka ka kõrge koopiarvuga pRS425 plasmidi kloonitud mutantsete IRC3 geenide mõju pämirakkude mtDNA stabiilsusele. pRS425 Irc3 plasmidi sisaldavad

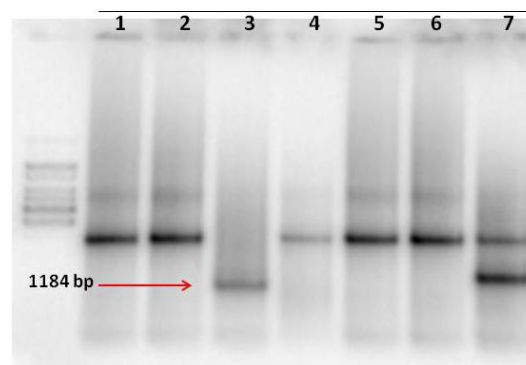
rakud moodustasid vaid 26,29% punaseid kolooniaid 48,02% valgeid ning 25,08% sektoritega kolooniaid. Seega funktsionaalse Irc3 valgu üleekspressioon suurendab mtDNA ebastabiilsust. pRS425 Irc3 GKT→GAT mut sisaldavad rakud sarnanesid fenotüübilt negatiivsele kontrollile. pRS425 Irc3 Δ28 sisaldavad rakud moodustasid võrreldes madala koopiaarvuga pRS315 Irc3 Δ28 plasmidi sisaldavate rakkudega 14% rohkem punaseid kolooniaid. Punaste kolooniate osakaalu tõusu põhjused pole teada (Andmed esitatud joonisel 17 ja lisades tabelis 5).

Selleks, et jälgida erinevalt värvunud kolooniate fenotüübi muutumist rakkude jagunemise käigus, külvati mutantsete IRC3 geenidega plasmide sisaldavad rakud joonkülvimeetodiga fermenteeritavale söötmele (näidised kolooniatest on näha lisaleheküljel 72). Negatiivsete kontrollidena kasutatud pYPGC ja pRS315 plasmide sisaldavad sektoritega rakud värvusid –LEU glükoosi sisaldvatele tassidele edasi külvates suures osas valgeks. See näitab, et väikeses osas rakkudes, milles esialgu säilis funktsionaalne mtDNA, kadus see siiski jagunemise käigus. Plasmide pRS315 Irc3 ja pYPGC Irc3, pRS315 Irc3 Δ15, pRS315 Irc3 Δ28 CIT1 sisaldavate rakkude punased ja sektoritega kolooniad värvusid edasi külvates peaaegu 100% punaseks. Seetõttu võib väita, et mtDNA säilus ja parandus rakkude jagunemise käigus intaksena ning CIT1 signaal kompenseerib 28 aminohappe deletsiooni, tagades mtDNA säilumise ja parandumise nagu wt rakkudes. pRS315 Irc3 Δ28 plasmidiga sektoritega raku edasi külvamisel moodustus umbes 50% valgeid ning 50% punaseid või sektoritega kolooniaid. See tähendab, et mtDNA kaotab rakkude jagunemise käigus oma funktsionaalsuse, kuid see ei toimu nii kiiresti, kui Δirc3 tüves. Ka w303 Δirc3 tüves ei kaota 1-2 % rakkudest kohe peale deleteerimist hingamisvõimet. mtDNA stabiilsuse tõus neis ja pRS315 Irc3 Δ28 plasmidi sisaldavates rakkudes võib olla tingitud sekundaarsetest mutatsioonidest mõnedes teistes valkudes, mis supresseerivad Δirc3 fenotüüpi. Siiski, rakkude edasise pooldumise käigus toimub ka nendest rakkudest järkjärguline funktsionaalse mtDNA kadumine. Plasmide pRS 315 Irc3 QMIGR→AMIGQ mut, pRS 315 Irc3 GKT→GAT mut ja pRS425 Irc3 GKT→GAT mut sisaldavad sektoritega kolooniad kolooniad värvusid edasi külvates ühtmoodi suures osas valgeks, sarnanedes negatiivsele kontrollile. Mõlemad uuritud helikaasi motiivid on seotud ATP sidumise või hüdroolüüsiga ning võib väita, et nende motiivide muteerimisel on arvatav Irc3 helikaas võimetu täitma oma funktsiooni mtDNA metabolismis. Rakud plasmidiga pRS 315 Irc3 LLF→LLA mut, mis sisaldab mutatsiooni helikaasi IV motiivis, andsid eelnevalt analüüsitud helikaasi mutantsetest motiividest veidi erineva tulemuse. Sektoritega kolooniad, mis külvati edasi, moodustasid

lisaks valgetele kolooniatele ka umbes sama palju punaseid kolooniaid. Tundub, et seda mutatsiooni omavates rakkudes säilib teatud hulgas rakkudes funktsionaalne mtDNA või toimub selle kadumine aeglaselt. Selle põhjuseks võib olla asjaolu, et Irc3 teised helikaasi motiivid kompenseerivad mingil määral IV motiivi valgu konformatsiooni stabiliseeriva funktsiooni. pRS425 Irc3 sektortitega ning punased kolooniad andsid edasi külvates suures osas punaseid kolooniaid, kuid umbes veerand kolooniatest olid valged, mis viitab sellele üle ekspresseeritud Irc3 vähendab mtDNA stabiilsust ka rakkude jagunemisel.

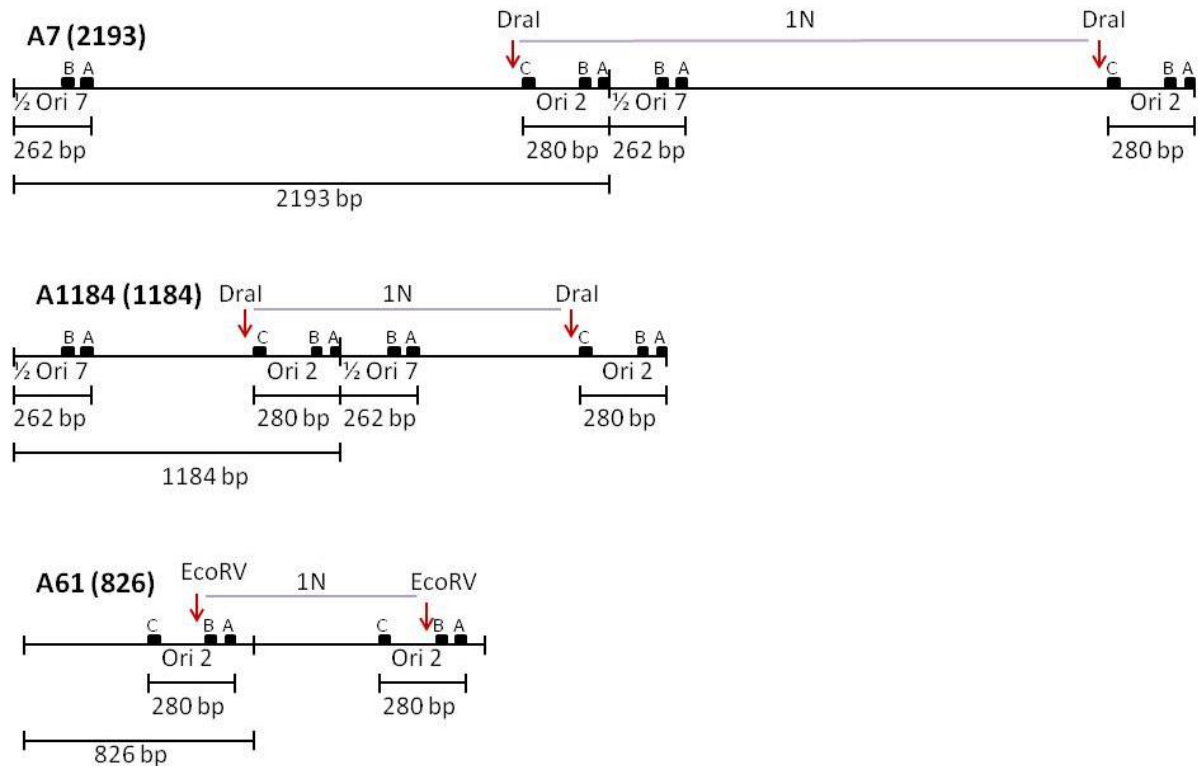
4.2 *S. cerevisiae* mtDNA analüüs

Selleks, et analüüsida töös uuritava geeni Irc3 mõju pärmis mitokondriaalse DNA stabiilsusele, oli vaja stabiilse ρ^- genotüübiga tüve, mida oleks samas mugav analüüsida kahedimensionaalse agarosgeeliga. Biokeemia labori tüvede kollekttsioonis olid olemas tüved HS A61 (mtDNA fragment 826 bp) ning S A7 (mtDNA fragment 2193). HS 61 mtDNA fragmendi pikkus polnud selleks katseks sobiv ning S A7 tüve mtDNA stabiilsuse osas puudusid andmed. Suure mtDNA fragmendiga ρ^- tüved on suurema tõenäosusega ebastabiilsed võrreldes lühemat mtDNA fragmenti sisaldavate tüvedega. Seetõttu otsustati teha lühema mtDNA fragmendiga tüvi. Selleks kasutati S A7 tüve ning mtDNA fragmenteerimine indutseeriti näljaga. Rakke kasvatati SC Minimal söötmel, kus kasutada on vaid essentsiaalsed aminohapped ja lämmastikalus. Rakud plaaditi üksikute rakupopulatsioonide saamiseks ning eraldati totaalne DNA. Saadud DNA-d restrikteeriti ning analüüsiti Southern Blot meetodiga. Selle tulemusel isoleeriti sobiva suurusega fragmenti (1184 bp) sisaldav tüvi (Joonis 18), mis sekveneeriti selle täpse järjestuse teada saamiseks (tüve järjestus on toodud lisaleheküljel 73). Tüvi nimetati w303 supressiivne (S) A1184.



Joonis 18. Näljaga indutseeritud S A7 mtDNA fragmenteerumise tulemusel saadud tüve S A1184 1184 bp suurune mtDNA fragment, mis asub rajas number 3.

Järgnevat katsetes kasutati autori poolt valmistatud S A1184 tüve ning HS A61, mis oli labori tüvede kollektsioonis. Nende tüvede mitokondriaalse fragmendi skemaatiline kirjeldus ning analüüsiks kasutatud restriктаaside lõikekohad on esitatud joonisel 19.



Joonis 19. Tüvede S A1184 ja HS A61 mtDNA 2 järjestikust fragmenti skemaatiliselt. Võrdluseks on joonisel ka S A7. Välja on toodud 1 fragmendi suurus, ori regioonid, töös kasutatud restriктаaside lõikekohad ning restriктаaside lõikekohtade vahele moodustuvad 1N fragmendid.

Eelnevalt oli näidatud, et *S. cerevisiae* w303 Δ irc3 tüves kaob mitokondriaalne DNA fermenteeritaval süsinikuallikal kiiresti ning rakud kaotavad respiratsioonivõime. Samas säilib nendes rakkudes ρ^- mtDNA (Dmitri Lubenetsi avaldamata andmed). Selleks, et teada saada, kas IRC3 deletsioon mõjutab ka *S. cerevisiae* ρ^- rakkude mitokondriaalse genoomi stabiilsust, deleteeriti HS A61 ja S A1184 tüvedest IRC3.

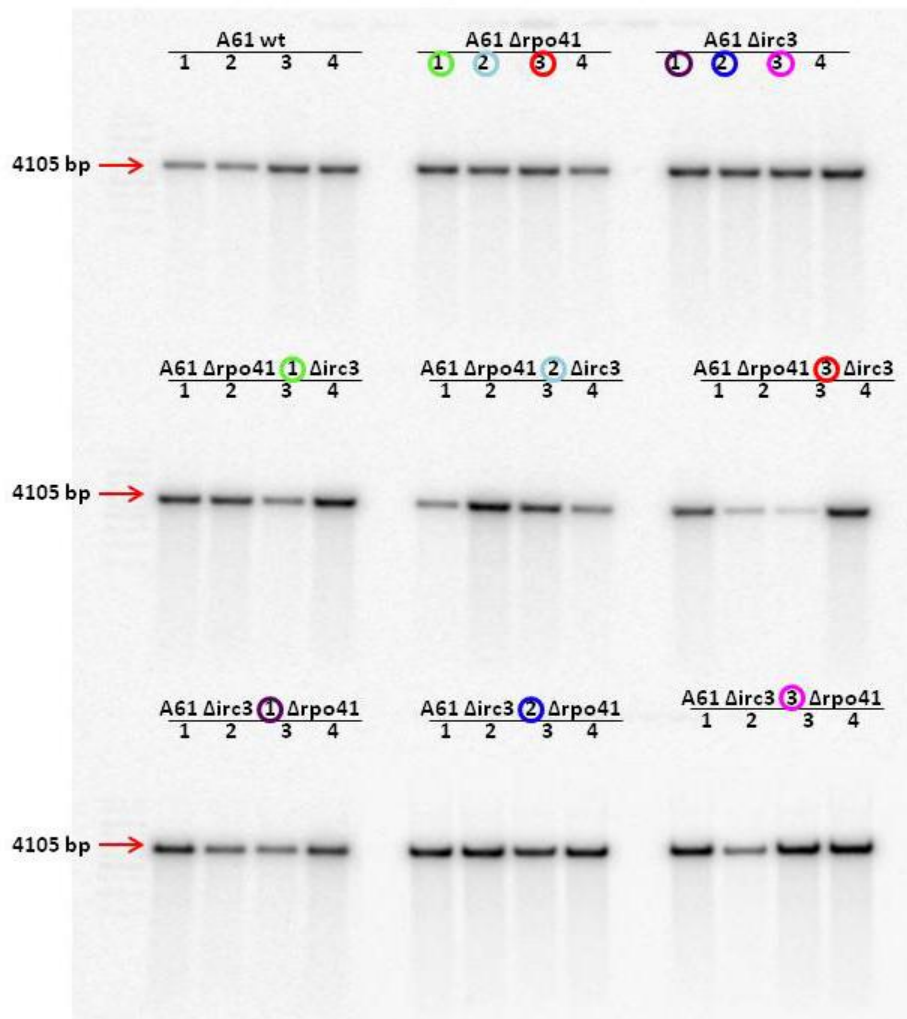
Et teada saada kas IRC3 omab koostoimet mitokondriaalse RNA polümeraasi RPO41-ga, valmistati samadest ρ^- tüvedest ka IRC3- RPO41 topelt *knockout* tüved. RNA polümeraas Rpo41 on vajalik wt mitokondriaalseks geeniekspressiooniks ning mtDNA säilitamiseks, sest deletsioonitüvedes kaob funktsionaalne mtDNA. Samas on näidatud, et ρ^- genotüübiga rakkude mtDNA stabiilsus on tagatud Δ rpo41 tüvedes.

Katses kasutati nelja HS A61 Δ irc3 tüve ja nelja HS A61 Δ rpo41 tüve. Kolmest HS A61 Δ irc3 tüvest valmistati neli Δ irc3- Δ rpo41 topelt *knockout* subklooni. HS A61 Δ rpo41-ga toimiti samamoodi. Kontrollina kasutati nelja HS A61 wt isolaati.

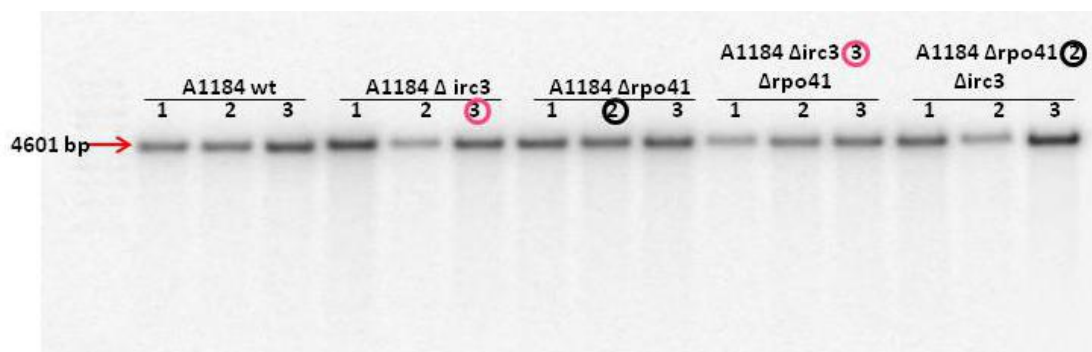
Samal eesmärgil tehti kolm S A1184 Δ irc3 ning kolm S A1184 Δ rpo41 tüve. Ühest S A1184 Δ irc3 tüvest valmistati kolm S A1184 Δ irc3- Δ rpo41 topelt *knockout* subklooni. Samamoodi toimiti tüvega S A1184 Δ rpo41. Kontrollina kasutati kolme S A1184 wt isolaati.

Selleks, et analüüsida Δ irc3, Δ rpo41, Δ irc3- Δ rpo41 ja Δ rpo41- Δ irc3 deletsioonide mõju mitokondriaalsele genoomile, eraldati eespool mainitud tüvedest totaalne DNA (peatükk 3.8) ning töödeldi restriктаasidega. HS A61 ja selle mutante lõigati restriктаasiga EcoRV, mis lõikab tüve mtDNA fragmenti 1 kord. Seega vastavad restriksiooniproduktid mtDNA fragmenti suurusele (826 bp). S A1184 ja selle tüve mutante lõigati sama strateegia järgi restriктаasiga DraI ning tekkivate produktide suuruseks oli 1184 bp. Ka edaspidistes katsetes kasutati nende tüvede lõikamiseks samu restriктаase.

Fragmendid lahutati agarosgeelil ning DNA kanti Southern Blot meetodil nailonfiltrile. Kvantitatiivseks hindamiseks hübridiseeriti filtrile kandunud DNA esmalt nukleaarse geeni Dna2 radioaktiivselt märgistatud prooviga (Joonis 20 ja 21).



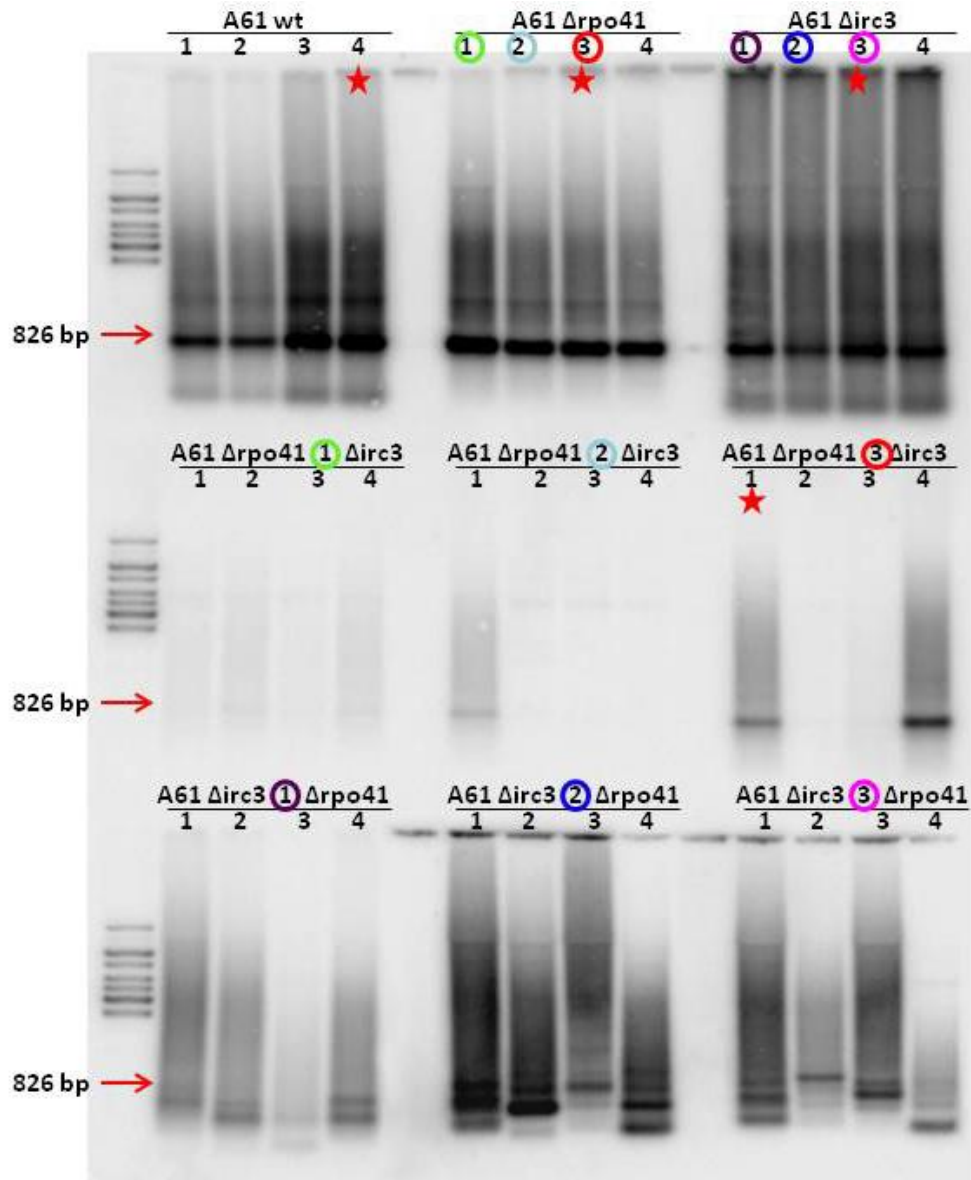
Joonis 20. HS A61 ning selle tüve mutantide EcoRV-ga lõigatud totaalne DNA hübridiseeritud radioaktiivselt märgistatud nukleaarse prooviga. EcoRV-ga lõigatud radioaktiivse prooviga hübridiseeruva fragmendi suurus on 4105 bp. Topelt *knockout* tüvede nimes olev värviliselt tähistatud number märgib nende sama numbriga ja värviga tähistatud algtüve esimeses reas.



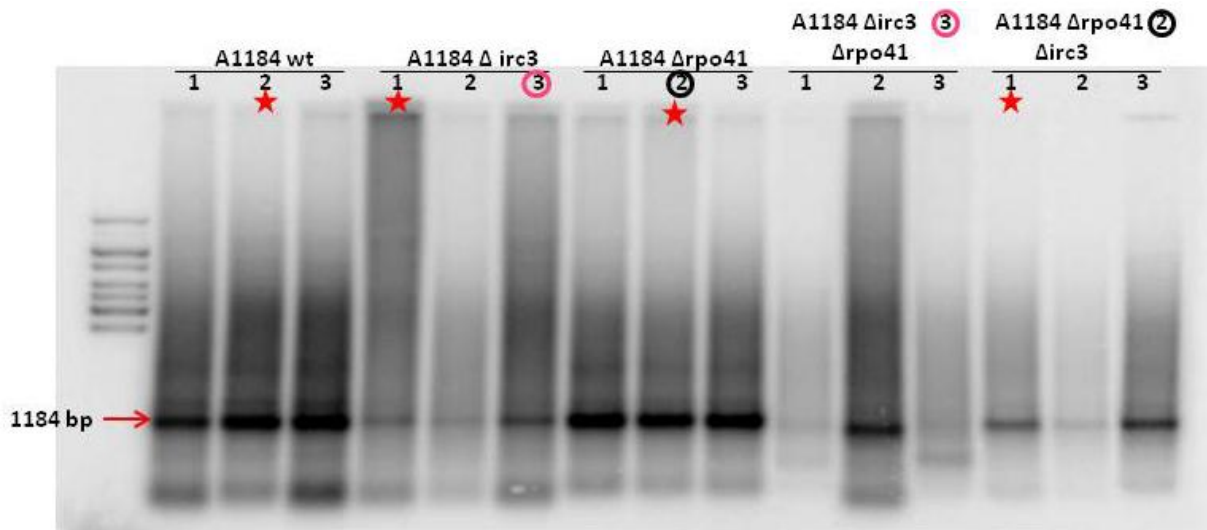
Joonis 21. S A1184 ning selle tüve mutantide DraI-ga lõigatud totaalne DNA hübridiseeritud radioaktiivselt märgistatud nukleaarse prooviga. DraI-ga lõigatud radioaktiivse prooviga hübridiseeruva fragmendi suurus on 4601 bp. Topelt *knockout* tüvede nimes olev värviliselt tähistatud number märgib nende sama numbriga ja värviga tähistatud algtüve.

Kuna kõigist tüvedest eraldatud DNA-ga hübridiseeritud nukleaarne proov andis signaali, võidi kindel olla, et DNA eraldamine rakkudest õnnestus ning see on filtrile edasi kandunud.

Nukleaarne proov eemaldati ning filtril olev DNA hübridiseeriti radioaktiivselt märgistatud mitokondriaalse *Ori* prooviga (Joonis 22 ja 23).



Joonis 22. HS A61 ning selle tüve mutantide EcoRV-ga lõigatud totaalne DNA hübridiseeritud radioaktiivselt märgistatud mitokondriaalse prooviga. EcoRV-ga lõigatud radioaktiivse prooviga hübridiseeruva fragmendi suurus on 826 bp. Topelt *knockout* tüvede nimes olev värviliselt tähistatud number märgib nende sama numbri ja värviga tähistatud algtüve esimeses reas. Joonisel olevad punased tähekesed märgivad tüvesid, mida hiljem 2D-AGE meetodil analüüsiti.



Joonis 23. S A1184 ning selle tüve mutantide DraI-ga lõigatud totaalne DNA hübridiseeritud radioaktiivselt märgistatud mitokondriaalse prooviga. DraI-ga lõigatud radioaktiivse prooviga hübridiseeruva fragmendi suurus on 1184 bp. Topelt *knockout* tüvede nimes olev värviliselt tähistatud number märgib nende sama numbriga ja värviga tähistatud algtüve. Joonisel olevad punased tähekesed märgivad tüvesid, mida hiljem 2D-AGE meetodil analüüsiti.

Mitokondriaalse prooviga hübridiseerimine võimaldas hinnata mtDNA intaktsust fragmentide suuruse järgi ning kogust võrreldes nukleaarse DNA-ga.

Joonistel, millel on näidatud mitokondriaalse *ori* prooviga hübridiseeritud mtDNA analüüs, on selgelt eristatav 1N fragment. HS A61 puhul on see 862 bp ning S A1184 puhul 11842 bp fragmentid. Suuremad fragmentid, näiteks 2N fragmentid tekivad, siis kui restriктаasid mingil põhjusel ei löika kõigist võimalikest lõikekohtadest. Selle põhjuseks võib olla see, et mtDNA on selles kohas üheaheelaline, või on lõikekoht blokeeritud sinna seondunud valkude poolt.

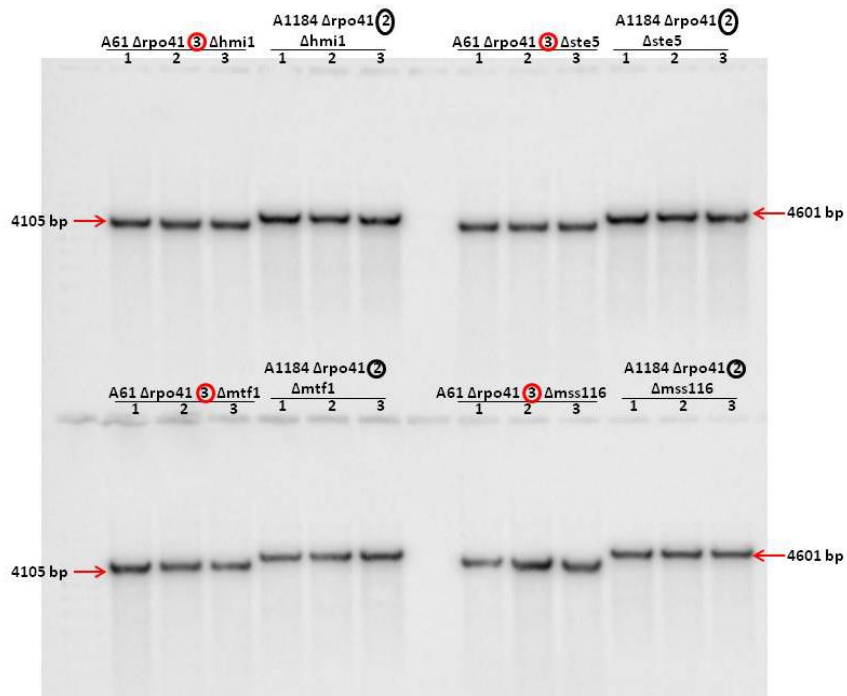
HS A61 Δ irc3 tüvede mtDNA lahutub geelil võrreldes *wt* ja Δ rpo41-ga erinevalt. Rajas hajusalt jaotunud DNA on suure molekulmassiga ning ilmselt sisaldab hargnenud molekule. HS A61 Δ irc3 tüve 1N fragmendi intensiivsus on vähenenud võrreldes *wt* ja Δ rpo41-ga ning 2N fragment on praktiliselt eristamatu. (Joonis 22). S A1184 Δ irc3 on näha sarnast DNA hajusust ning nendes tüvedes on mtDNA hulk veelgi enam vähenenud (Joonis 23).

HS A61 ja S A1184 tüvedes, kus esmalt deleteeriti IRC3 ning seejärel RPO41 geen, on näha ümberkorraldusi mtDNA fragmendi suuruses. Enamus tüvedes on näha erineva

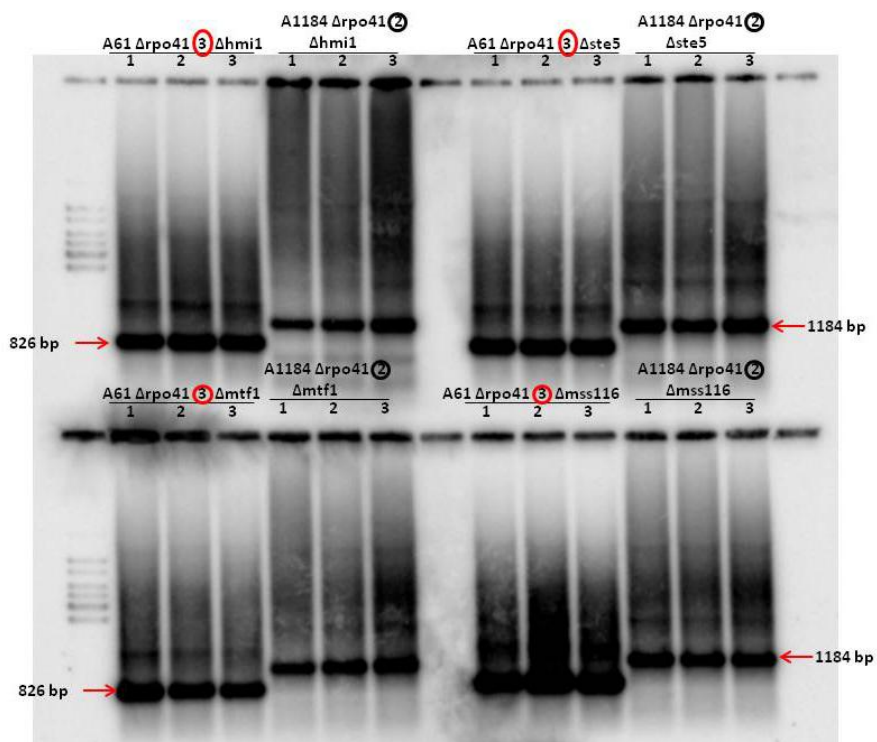
suurusega fragmente, mistõttu võib arvata, et mtDNA on fragmenteerunud ning osades neist on selle hulk vähenenud. Mõne tüve puhul on näha ka 1N ja 2N vahepealseid fragmente.

HS A61 ja S A1184 tüvede puhul on näha, et osades tüvedes, millest on esmalt deleteeritud RPO41 geen ning seejärel IRC3 geen, on mitokondriaalse DNA fragmendi suurus jäänud stabiilseks, kuid see on märgatavalt vähenenud või hoopis kadunud. HS A61 Δ rpo41 Δ irc3 12-st analüüsitud tüvest on 3 nõrgenenud signaaliga, 2 väga nõrga signaaliga ning ülejäänud 7 tüves on mitokondriaalne DNA kaduma läinud (Joonis 22). S A1184 Δ rpo41 Δ irc3 tüvedes on samuti märgata signaali nõrgenemist, kuid fragmendi suurus on jäänud intaktseks (Joonis 23).

Et olla kindel, et Δ rpo41 Δ irc3 tüvedes kaob mtDNA IRC3 deletsioonist sõltuvalt, valmistati kontrolltüved. HS A61 Δ rpo41-st ja S A1184 Δ rpo41-st deleteeriti geenid HMI1, STE5, MTF1 ja MSS116. HMI1 on mitokondriaalne SF1 DNA helikaas, mis on hädavajalik ρ^+ genoomi stabiilsuse tagamiseks, kuid mille puudumisel on tagatud ρ^- genoomi säilumine (Sedman jt., 2005). Ste5 on tuumas lokaliseeruv (Pryciak ja Huntress, 1998), haploidsetes rakkudes ekspresseeruv paardumisraja komponent, mille deletandid on steriilsed. Ste5 deleteerimine ei põhjusta mtDNA ebastabiilsust (Park jt., 2003). MTF1 on RPO41 spetsiifilisusfaktor, mis on vajalik transkriptsiooni läbiviimiseks. Nii MTF1 kui ka RPO41 deleteerimine põhjustab ρ^- teket (Schinkel jt., 1989; Mangus jt., 1994). MSS116 on mitokondriaalne DexD/H-*box* RNA helikaas, mille nullmutant omab respiratoorset defekti (Del Campo ja Lambowitz, 2009). Tüvedest eraldatud totaalse DNA analüüs toimus nagu eelnevalt kirjeldatud. Nukleaarse prooviga hübridiseeritud kontrolltüvedest eraldatud totaalne DNA on joonisel 24 ja mitokondriaalse prooviga hübridiseeritud DNA joonisel 25.



Joonis 24. Nukleaarse prooviga hübriidiseeritud HS A61 ja S A1184 kontrolltüved. Kontrolltüvede topelt *knockout* tüvede nimes olev värviliselt tähistatud number märgib nende sama numbri ja värviga tähistatud algtüve joonistel 22 ja 23.



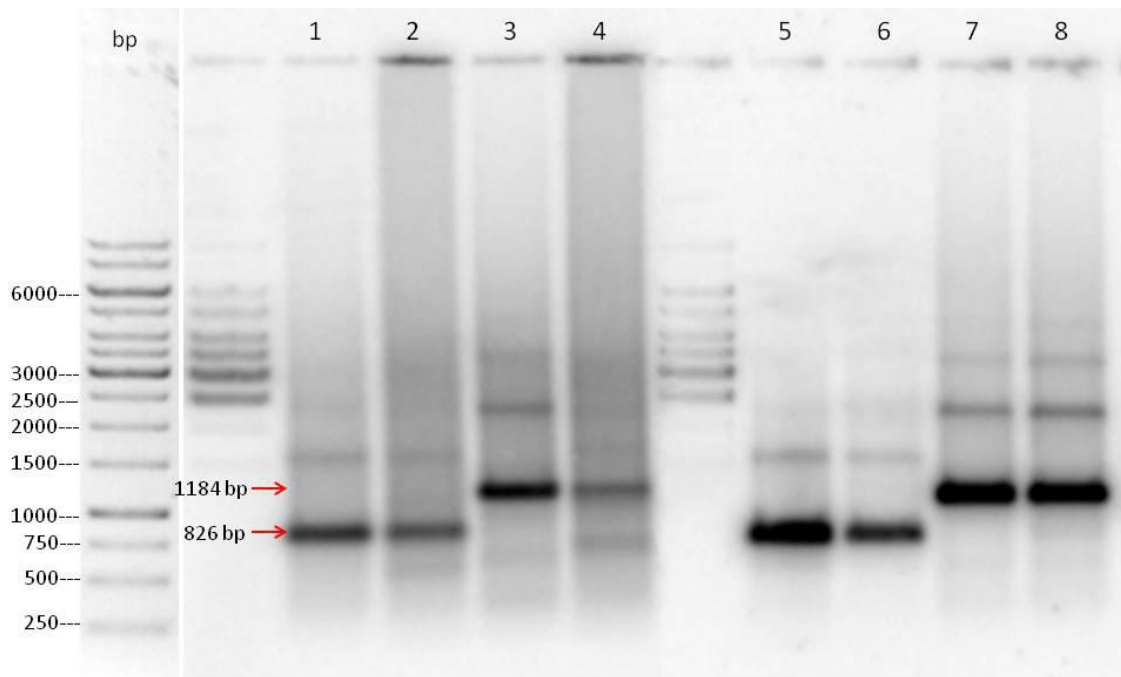
Joonis 25. Mitokondriaalse prooviga hübriidiseeritud HS A61 ja S A1184 kontrolltüved. Kontrolltüvede topelt *knockout* tüvede nimes olev värviliselt tähistatud number märgib nende sama numbri ja värviga tähistatud algtüve joonistel 22 ja 23.

Kuna kontrolltüvede mtDNA on stabiilne, siis võib väita, et mitokondri genoomi ebastabiilsust põhjustas HS A61 Δ rpo41 ja S A1184 Δ rpo41 tüvedest ainult IRC3 deleteerimine.

Eelnev katse võimaldas jälgida deletsioonidest tulenevaid mitokondriaalse genoomiga toimuvaid muutusi kvantitatiivselt, andes infot mtDNA hulga ning fragmentide suuruse kohta. Lisaks sellele otsustati uurida, kas IRC3, RPO41 ning nende mõlema deletsioonid uuritavates tüvedes kutsuvad esile muutusi ka mtDNA topoloogias võrreldes *wild type*-ga. Seda saab teha 2-dimensionaalse agarosgeelelektroforeesi (2D-AGE) abil, kus DNA molekul on võimalik lahutada massi ja kuju järgi.

Katsesse valiti analüüsimiseks HS A61 ja S A1184 Δ rpo41- Δ irc3 tüved, mis eelnevates katsetes omasid stabiilset mtDNA-d. Lisaks analüüsiti nende algtüvesid, HS A61 Δ rpo41 ja S A1184 Δ rpo41, ning HS A61 Δ irc3 ja S A1184 Δ irc3. Kontrollidena kasutati HS A61 ja S A1184 wt tüvesid. Kõik katsesse valitud tüved on joonistel 22 ja 23 tähistatud punase tähekesega.

Nende tüvede detailsemaks analüüsiks eraldati neist mtDNA. Selleks, et olla kindel, et rakkude jagunemise käigus pole mtDNA destabiliseerunud või kaotsi läinud, analüüsiti seda enne 2D-AGE teostamist esmalt 1D Southern blot meetodiga. Selleks restrikteeriti valitud tüvede mtDNA EcoRV ja DraI restriктаasidega, restriksiooniproduktid lahutati geelil ning kanti nailonfiltrile nagu oli kirjeldatud eelnevates katsetes. DNA hübridiseeriti radioaktiivselt märgistatud *ori* prooviga. Hübridisatsiooniga visualiseeritud mtDNA fragmendid on vaadeldavad joonisel 26.



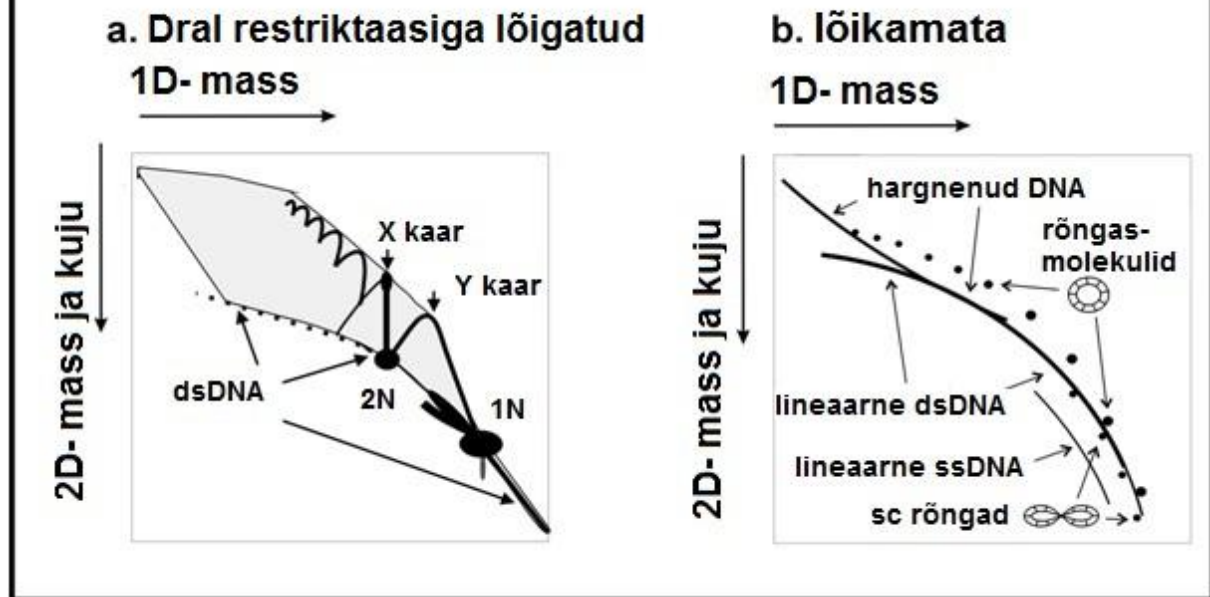
Joonis 26. HS A61 ja S A1184 ja nende mutantidest eraldatud ning DraI või EcoRV-ga lõigatud mtDNA hübridiseeritud radioaktiivselt märgistatud mitokondriaalse prooviga. Vasakul pool on fragmentide suuruste paremaks jälgimiseks lisatud 1kb DNA marker. **1-** HS A61 wt; **2-** HS A61 Δ irc3; **3-** S A1184 wt; **4-** S A1184 Δ irc3; **5-** HS A61 Δ rpo41; **6-** HS A61 Δ rpo41 Δ irc3; **7-** S A1184 Δ rpo41; **8-** S A1184 Δ rpo41 Δ irc3.

Lisaks 1N fragmentidele on selgelt eristatavad ka 2N fragmendid. HS A61 Δ irc3 ja S A1184 Δ irc3 tüvede mtDNA on võrreldes teistega rajas hajusamalt jaotunud ning 1N ja 2N fragmendid annavad nõrgema signaali. Δ irc3 tüvede puhul on näha ka 1N väiksemad fragmendid, mis viitavad mtDNA fragmenteerumisele.

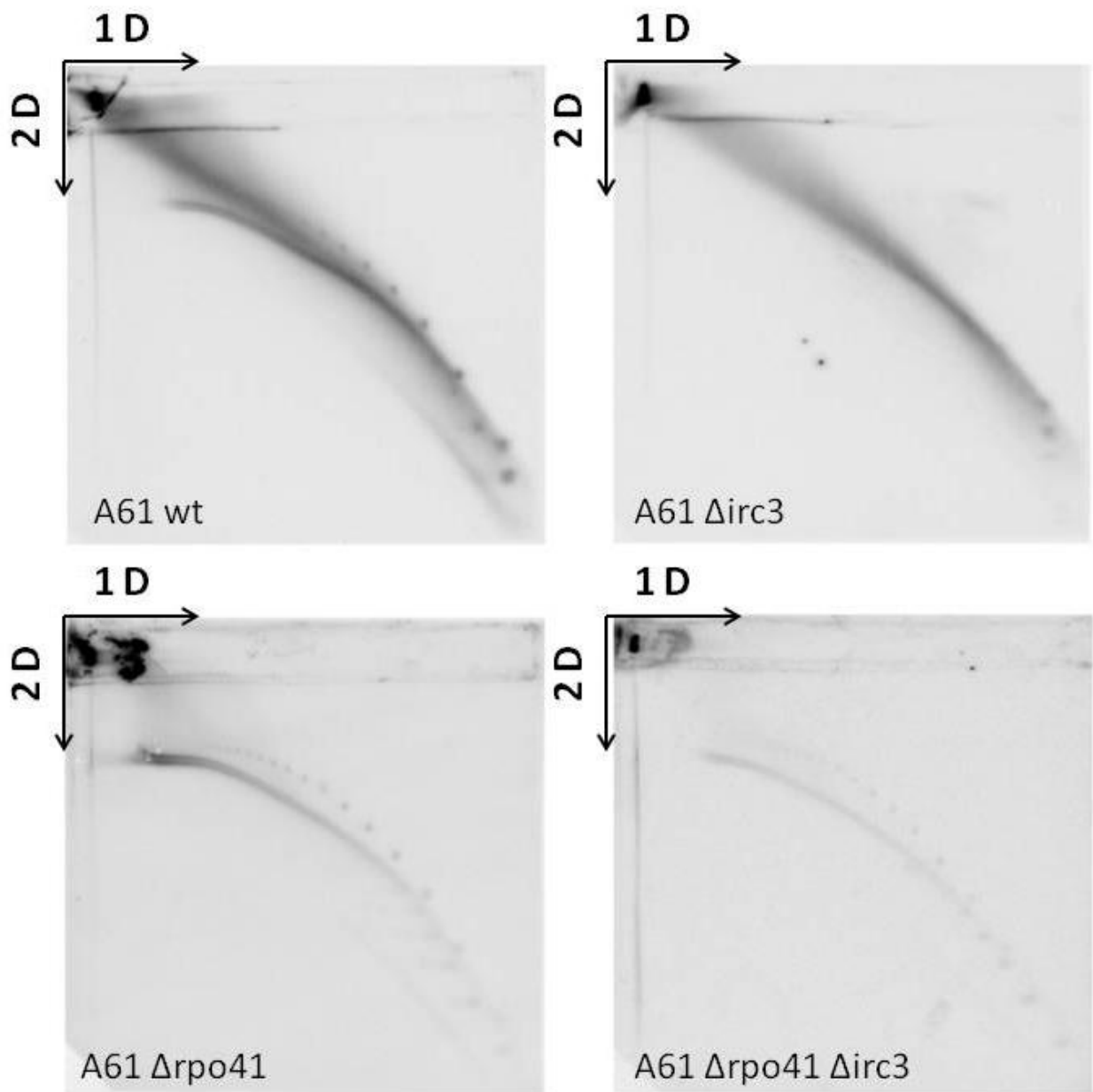
mtDNA struktuuri ning replikatsiooni intermediaatide jälgimiseks teostati lõikamata DNA-le 2D-AGE. Geelelektroforeesi esimeses dimensioonis (1D) lahutati DNA massi järgi. Rada, mis sisaldas erineva suurusega DNA molekule lõigati geelist välja ning „istutati“ 90° võrreldes 1D voolu suunaga teise agarosgeeli. Geelelektroforeesi teises dimensioonis (2D) lahutati erineva topoloogiaga molekulid vastavalt massile ning kujule. DNA kanti nailonfiltrile ning hübridiseeriti mitokondriaalse DNA fragmendile vastava radioaktiivselt märgistatud prooviga.

2D-AGE abil vaadeldavad DNA struktuurid on toodud skemaatiliselt joonisel 27 ning joonisel 28 ja 29.

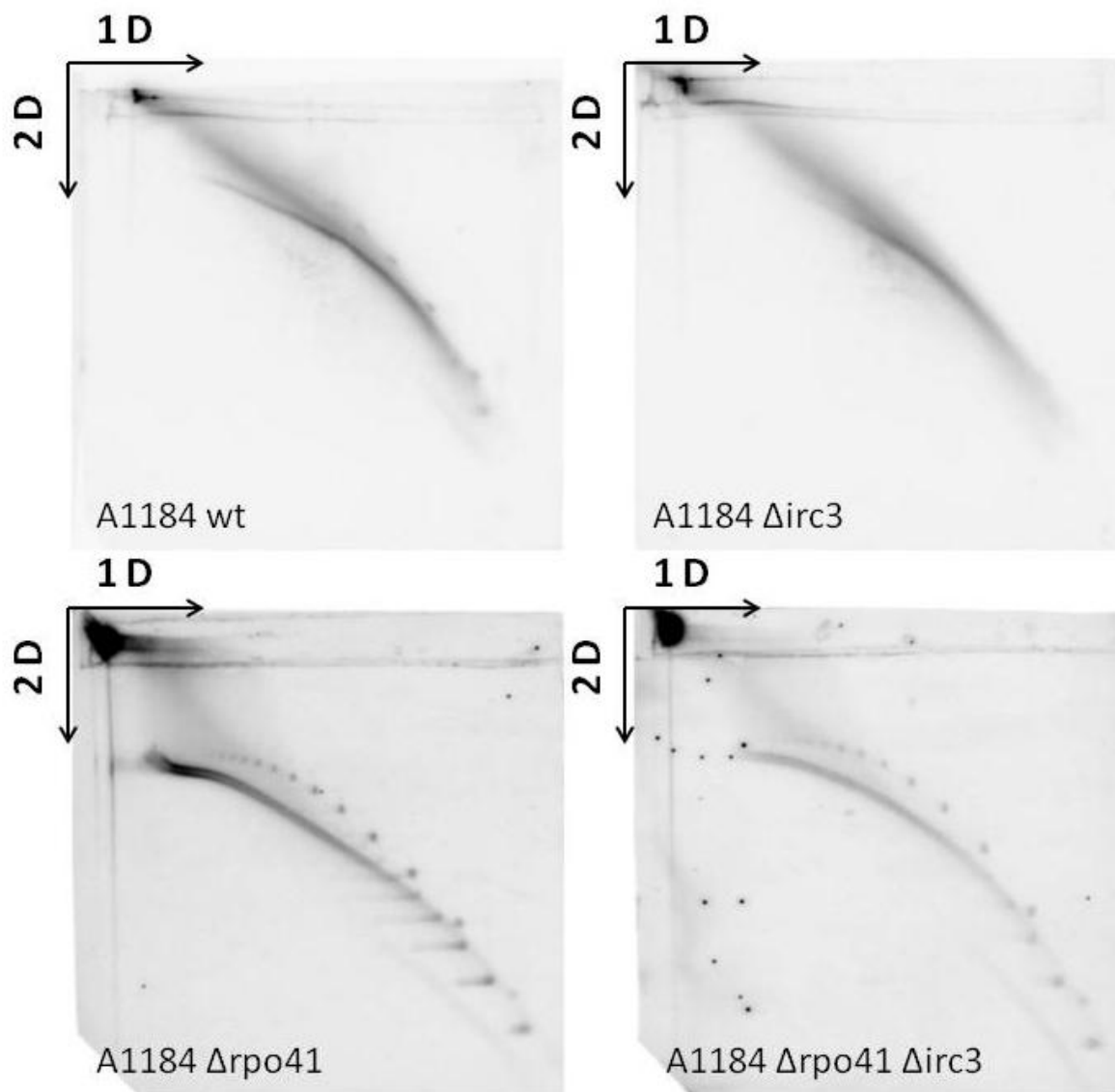
2D-AGE mtDNA analüüs



Joonis 27. 2D-AGE mtDNA analüüsi meetod. A: 2D-AGE-ga lahutatunud lõigatud mtDNA võimalikud struktuurised vormid. Y- kaar tekib 1N ja 2N fragmentide vahele ning on põhjustatud replikatsioonikahvli likumisest mööda substraati. X-kaar moodustub otse 2N fragmenti kohale ning arvatakse representeerivad neljaahelalist rekombineeruvat DNA-d, mis esineb näiteks Holliday *junction*ites. B: 2D-AGE-ga lahutatunud lõikamata mtDNA võimalikud struktuurised vormid. Näidatud on lineaarne dsDNA, hargnenud DNA, lineaarne ssDNA, kaheaahelised relakseerunud rõngasmolekulid, ning sc (*supercoiled*) rõngasmolekulid.



Joonis 28. Tüvede HS A61, HS A61 Δ irc3, HS A61 Δ rpo41 ja HS A61 Δ rpo41 Δ irc3 lõikatamta mtDNA 2D-AGE. Piltide all on toodud tüved, millest analüüsitav mtDNA on eraldatud. Nooltega on näidatud 1D ja 2D voolu suund.



Joonis 29. Tüvede S A1184, S A1184 Δ irc3, S A1184 Δ rpo41 ja S A1184 Δ rpo41 Δ irc3 lõikatamta mtDNA 2D-AGE. Piltide all on toodud tüved, millest analüüsitav mtDNA on eraldatud. Nooltega on näidatud 1D ja 2D voolu suund.

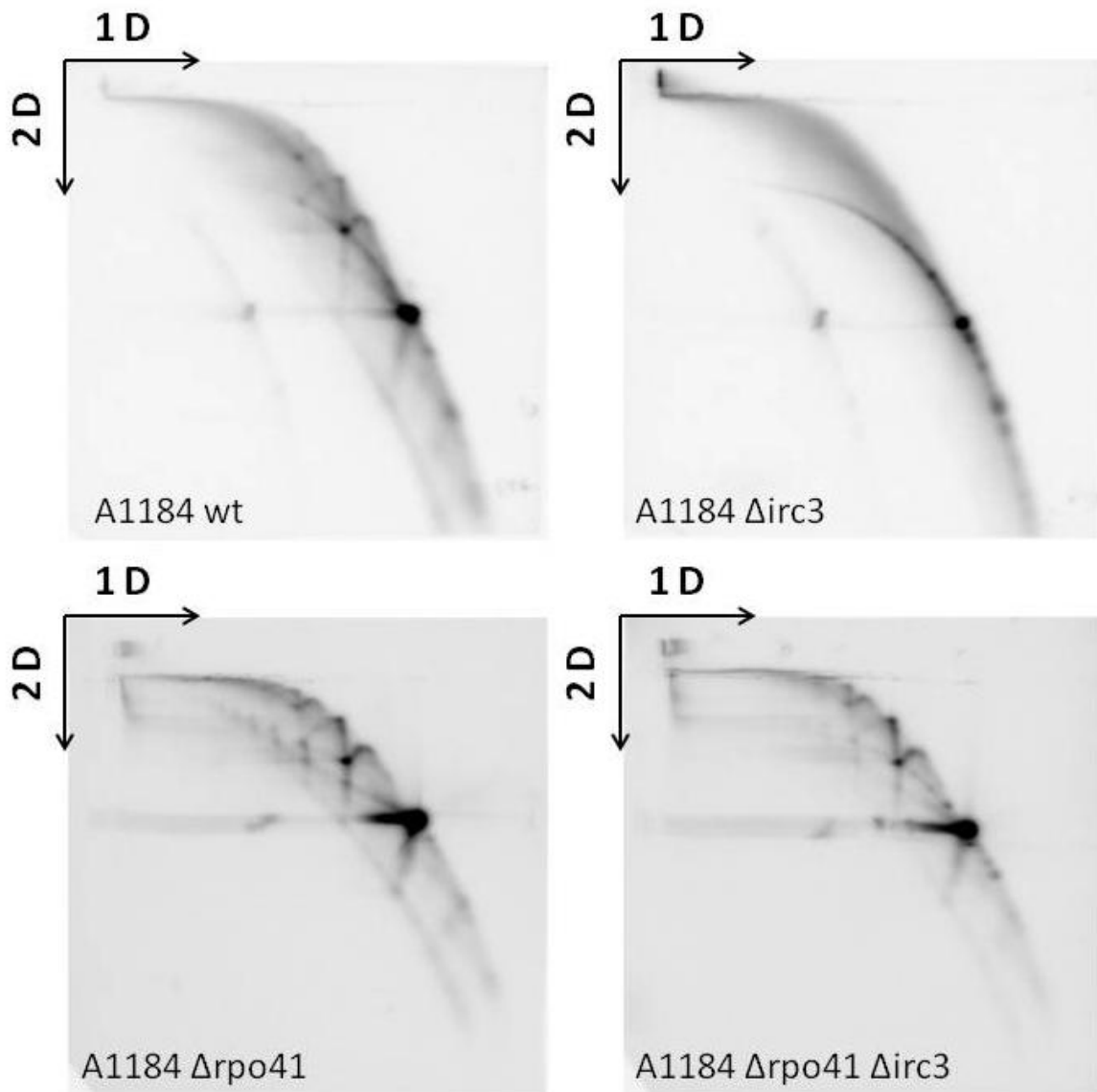
Mõlema tüve *wt* puhul on näha lineaarne dsDNA, hargnenud DNA molekulid, relakseerunud ja *sc* (*supercoiled*) DNA rõngasmolekulid ning lineaarne ssDNA.

Δ irc3 erineb mõlemas tüves väga palju *wt*-st ning ka ülejäänud tüvedest. mtDNA rõngasmolekulid on täielikult kadunud, alles on vaid 2 või 3 *sc* rõngasmolekuli. Tugevalt on vähenenud ssDNA hulk ning lineaarne dsDNA on võrreldes teiste tüvedega lühenenud, mis viitab sellele, et Δ irc3 tüves võib replikatsioon olla häiritud. Suure osa hõlmab hargnenud DNA molekulidest moodustuv pilv, mis on tõenäoliselt moodustunud rekombinatsiooni teel.

Δ rpo41 tüves on näha lineaarse dsDNA pikenemist võrreldes *wt*-ga, mis võib tähendada, et replikatsioon toimub Rpo41 puudumisel efektiivsemalt. See võib olla põhjustatud asjaolust, et selles tüves ei toimu mitokondriaalse transkriptsiooni- ja replikatsioonikomplekside kokkupõrget. Ühtlasi näitab see ka seda, et transkriptsioonil ei ole ρ^- tüvedes replikatsiooni initsiaatorina nii suurt rolli, kui on eelnevalt välja pakutud (Lecrenier ja Foury, 2000). Tsirkulaarseid DNA molekule on vähemalt sama palju ja kuna pilve regiooni intensiivsus on vähenenud, on rõngasmolekule paremini näha. Arvatavasti moodustab suure osa geelil lahutumata „hambasse“ jäänud DNA-st just hargnenud, suure molekulmassiga DNA.

Δ rpo41- Δ irc3 topeltmutandid sarnanevad kõige rohkem Δ rpo41 tüvedele. Erinevus seisneb selles, et lineaarne dsDNA on pisut lühem. Samas on see siiski pikem, kui *wt* tüvedes. Ka signaali tugevus on vähenenud, mis võib tuleneda sellest, et enne DNA eraldust neist tüvedest oli mingi osa rakkudest juba kaotanud mtDNA.

2D-AGE meetodiga analüüsiti ka restriктаasiga lõigatud S A1184 ning selle mutantidest eraldatud mtDNA-d (Joonis 30). HS A61 tüved jäeti sel moel analüüsimata, kuna nende mtDNA fragment on väga lühike, mis muudab antud meetodi kasutamise keerukamaks.



Joonis 30. Tüvede S A1184, S A1184 Δ irc3, S A1184 Δ rpo41 ja S A1184 Δ rpo41 Δ irc3 DraI lõigatud mtDNA 2D-AGE.

S 1184 wt tüve puhul on näha 1N ja 2N fragmendid, mis sisaldavad replitseerunud dsDNA-d. 1N ja 2N vahele moodustub Y-kaar ning 2N fragmendi kohal X-kaar. Hargnenud dsDNA molekulidest moodustub pilv ning 1N fragmendist allpool on näha punktid, kus lahutuvad väikesed DNA fragmendid. Vaadeldav on ka ssDNA.

Δ irc3 tüves on võrreldes *wt*-ga 1N fragmendi intensiivsus nõrgenenud. Puuduvad Y- ja X-kaared, ssDNA ja 2N fragment, kuid 1N fragmendist kõrgemal on näha nõrk 1,5N. 1N-st allpool on märgata väiksemate fragmentide arvu tõusu, mis viitab mtDNA

fragmenteerumisele. Kuna replikatsiooni intermediaadid puuduvad, siis võib arvata, et replikatsiooni toimumine Δ irc3 tüves on raskendatud.

Δ rpo41 tüves on vaadeldavad kõik replikatsiooni intermediaadid. Võrreldes wt-ga on tõusnud 1N punkti intensiivsus ning hargnenud DNA pilve on lisandunud teatud struktuuriga molekulid. Võib arvata, et Rpo41 puudumisel toimub replikatsioon isegi suurema efektiivsusega, kui wt tüves.

Δ rpo41- Δ irc3 tüvest eraldatud mtDNA sarnaneb nii wt kui ka Δ rpo41-ga. Veidi vähem esineb ssDNA-d. Võrreldes Δ rpo41-ga on hargnenud DNA pilv väiksem.

Kuna mtDNA replikatsioon ei toimu *S. cerevisiae*-s vaid rakutsükli S-faasi ajal, on võimalus replikatsiooni- ning transkriptsioonikomplekside kokkupõrkeks suur. Selle tulemuseks on replikatsioonikahvli seiskumine ning mtDNA kahjustused. Kuna eukarüootides liiguvad transkriptsiooni- ja replikatsioonikompleksid mööda *template* ahelat samaväärsete kiirustega, siis kokkupõrked võivad toimuda, kui kompleksid liiguvad vastassuunaliselt. Komplekside samasuunalisel liikumisel võib kokkupõrkeid põhjustada näiteks kummagi kompleksi ajutine peatumine või aeglustumine. Kokkupõrke tulemusel peatuvad mõlemad kompleksid, replikatsiooni taaskäivitavad valgud stimuleerivad replisoomi edasi liikumist ning transkriptsioonikompleks eemaldatakse ajutiselt DNA-lt. Seejärel võib transkriptsioonikompleks uuesti seonduda ning elongatsiooniprotsess taaskäivitub. Praeguseks pole veel teada, mis mehhanismid vastutavad kokkupõrgete lahendamise ja DNA stabiilsuse säilitamise eest taoliste kokkupõrgete korral (Helmrich jt., 2013).

2D-AGE analüüsi tulemustest on näha, et Irc3 deleteerimine Δ rpo41 tüvest ei oma mtDNA replikatsiooni intermediaatidele nii suurt mõju, kui selle deleteerimine wt tüvest. See võib tuleneda sellest, et Irc3 aitab transkriptsiooni- ja replikatsioonikomplekside kokkupõrkeid ära hoida. Irc3 funktsioon võib seisneda nii transkriptsioonikomplekside eemaldamisel replitseeruvalt DNA-lt või replisoomi taaskäivitamises. Kuna aga Δ rpo41 tüves transkriptsiooni ei toimu, ei mõjuta ka IRC3 deleteerimine oluliselt replikatsiooni intermediaate. Võib arvata, et Δ irc3 tüves toimub pidev transkriptsiooni- ja replikatsioonikomplekside kokkupõrge, mis võiks seletada nii mtDNA ebastabiilsuse kui ka replikatsiooni intermediaatide puudumise selles tüves.

Kokkuvõte

Käesoleva töö esimeses osas tehtud *in vivo* katsete abil püüti välja selgitada mitokondriaalse Irc3 valgu N-terminaalse signaaljärjestuse unikaalsus, kasutades selleks ekspressioonikonstrukti, mille N-terminaalne signaaljärjestus oli asendatud CIT1 signaaliga. Samas katses uuriti ka Irc3 võimalikku funktsiooni helikaasina, kasutades kolme ekspressioonikonstrukti, mis sisaldasid mutatsioone Irc3 helikaasi konserveerunud motiivides I, IV ja VI. Selleks, et uurida neid konstrukte sisaldavate rakkude respiratsioonivõimet, viidi läbi plasmidi vahetuskatse.

Katsest selgus, et Irc3 signaaljärjestus on asendatav CIT1 signaaliga, mis kompenseerib valgu N-terminaalse deletsiooni ja tagab Irc3 transpordi mitokondrisse. See tähendab, et Irc3 signaaljärjestus ei ole ainulaadne ning on asendatav teiste funktsionaalsete N-terminaalsete signaaljärjestustega. Teiseks, Irc3 helikaasi mutantset I ja VI motiivi omavad pärmirakud ei suutnud komplementeerida Δ irc3 respiratoorset defekti. Mutantset helikaasi IV motiivi omavad rakud kaotasid suures osas samuti respiratsioonivõime, kuid see efekt ei olnud nii drastiline, kui kahe eelneva motiivi puhul. Sellest võis järeldada, et Irc3 on ennustatav helikaas ning mtDNA stabiilsuse tagamisel on vajalik uuritud motiivide funktsioon.

Kuna w303 Δ irc3 tüves on mtDNA ebastabiilne, otsustati töö teises osas uuriti IRC3 geeni deletsiooni mõju mtDNA stabiilsusele ρ^- tüvedes. Samas uuriti Irc3 võimalikku koostoimet Rpo41-ga. Selleks valmistati kahest ρ^- tüvest (HS A61 ja S A1184) Δ irc3, Δ rpo41, Δ irc3- Δ rpo41 ja Δ rpo41- Δ irc3 deletsioonitüved.

Tüvede mtDNA analüüs 1D Southern Blot meetodiga näitas, et Δ rpo41- Δ irc3 tüvedes vähenes mtDNA hulk märgatavalt ning paljudes tüvedes kadus see sootuks. Δ irc3- Δ rpo41 tüvedes oli mtDNA hulk jäänud muutumatuks, kui enamus tüvedes oli näga selle fragmenteerumine. Uuritud tüvede mtDNA täpsemaks uurimiseks viidi läbi 2D-AGE. Selle tuleusel selgus, et IRC3 deleteerimine antud wt tüvedest põhjustas replikatsiooni intermediaatide kadumist. IRC3 deleteerimine Δ rpo41 tüvedest ei omanud replikatsiooni intermediaatidele peaaegu mitte mingit mõju. Põhjuseks võib olla see, et Irc3 osaleb transkriptsiooni- ja replikatsioonikomplekside kokkupõrgete ennetamises.

The role of Irc3 in mitochondrial genome maintenance

Karin Villemson

Summary

Irc3 is a putative DEAD/H- box helicase, that localizes to the mitochondria and is proposed to be involved in the metabolism of mtDNA. Δ irc3 strain exhibits a respiratory deficient phenotype, when grown on a fermentable carbon source.

The first aim of the present study was to clarify the function of Irc3 in the mitochondria. For this purpose a number of different Irc3 mutants were constructed and introduced into yeast cells. First, the N-terminal signal sequence was deleted or replaced with the CIT1 signal. The substitution was made to find out if the CIT1 signal complements the deletion of the natural MTS of Irc3. The other mutations targeted the conserved helicase motifs I, IV and VI of Irc3, to determine its function as a helicase. A plasmid shuffling assay was conducted to assess the activity of the mutants.

The results of this experiment demonstrated that CIT1 signal complemented the deletion of the Irc3 N-terminal signal sequence, which means that the N-terminus of Irc3 targets the protein to mitochondria, but the structure of the signal peptide is not unique and its replacement with a different signal still ensures the function of Irc3. The constructs, which had mutations in the helicase motifs I and VI, were unable to complement the loss of respiratory efficiency in Δ irc3 strain. Cells with mutations in the helicase motif IV showed the same tendency, but the phenotype was less drastic. Nevertheless, it can be concluded that the conserved helicase motifs play a crucial role in the helical function of Irc3.

The second objective of this study was to find out if the deletion of IRC3 has an impact on the mtDNA of ρ^- strains. The possible interactions of Irc3 helicase and Rpo41 RNA polymerase were also analyzed. Δ irc3, Δ irc3- Δ rpo41 and Δ rpo41- Δ irc3 knockouts were made of two different ρ^- strains (HS A61 and S A1184).

The analysis of mtDNA of these strains with 2D-AGE showed that the deletion of IRC3 caused the loss of specific replication intermediates in one of the ρ^- strains. The deletion of IRC3 from a Δ rpo41 strain had almost no effect on the replication intermediates, indicating that Irc3 may prevent the adverse effects of mitochondrial RNA polymerase and replisome collisions.

Kirjanduse loetelu

- Alvaro D, Lisby M, Rothstein R. Genome-wide analysis of Rad52 foci reveals diverse mechanisms impacting recombination. *PLoS genetics* 2007;3:e228.
- Banroques J, Cordin O, Doere M, Linder P, Tanner NK. A conserved phenylalanine of motif IV in superfamily 2 helicases is required for cooperative, ATP-dependent binding of RNA substrates in DEAD-box proteins. *Molecular and cellular biology* 2008;28:3359-71.
- Bernardi G, Piperno G, Fonty G. The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. I. Preparation and heterogeneity of mitochondrial DNA. *Journal of molecular biology* 1972;65:173-89.
- Blanc H, Dujon B. Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA responsible for suppressiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980;77:3942-6.
- Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, Fink GR. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in enzymology* 1987;154:164-75.
- Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 2009;138:628-44.
- Chen XJ, Butow RA. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature reviews Genetics* 2005;6:815-25.
- Chi NW, Kolodner RD. Purification and characterization of MSH1, a yeast mitochondrial protein that binds to DNA mismatches. *The Journal of biological chemistry* 1994;269:29984-92.
- Church GM, Gilbert W. Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984;81:1991-5.
- de la Cruz J, Kressler D, Linder P. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends in biochemical sciences* 1999;24:192-8.
- de Zamaroczy M, Faugeron-Fonty G, Baldacci G, Goursot R, Bernardi G. The ori sequences of the mitochondrial genome of a wild-type yeast strain: number, location, orientation and structure. *Gene* 1984;32:439-57.

Del Campo M, Lambowitz AM. Structure of the Yeast DEAD box protein Mss116p reveals two wedges that crimp RNA. *Molecular cell* 2009;35:598-609.

de Zamaroczy, M., Bernardi, G. (1986) The primary structure of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*--a review. *Gene* 47(2-3):155-77

Dujon, B. 1981. Mitochondrial genetics and function, p. 505–635. In J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: life cycle and inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Endres M, Neupert W, Brunner M. Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *The EMBO journal* 1999;18:3214-21.

Ephrussi B, de Margerie-Hottinguer H, Roman H. Suppressiveness: A New Factor in the Genetic Determinism of the Synthesis of Respiratory Enzymes in Yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1955;41:1065-71.

Fairman-Williams ME, Guenther UP, Jankowsky E. SF1 and SF2 helicases: family matters. *Current opinion in structural biology* 2010;20:313-24.

Fangman WL, Henly JW, Brewer BJ. RPO41-independent maintenance of [rho-] mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 1990;10:10-5.

Fernandez A, Guo HS, Saenz P, Simon-Buela L, Gomez de Cedron M, Garcia JA. The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic acids research* 1997;25:4474-80.

Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* 1998;440:325-31.

Fuller-Pace FV. DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucleic acids research* 2006;34:4206-15.

Gerhold JM, Aun A, Sedman T, Joers P, Sedman J. Strand invasion structures in the inverted repeat of *Candida albicans* mitochondrial DNA reveal a role for homologous recombination in replication. *Molecular cell* 2010;39:851-61.

Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic acids research* 1989;17:4713-30.

Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V. (1993) Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 419–429.

Graves-Woodward KL, Gottlieb J, Challberg MD, Weller SK. Biochemical analyses of mutations in the HSV-1 helicase-primase that alter ATP hydrolysis, DNA unwinding, and coupling between hydrolysis and unwinding. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:4623-30.

Hall MC, Matson SW. Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. *Molecular microbiology* 1999;34:867-77.

Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* 1983;166:557-80.

Helmrich A, Ballarino M, Nudler E, Tora L. Transcription-replication encounters, consequences and genomic instability. *Nature structural & molecular biology* 2013;20:412-8.

Jia L, Dienhart M, Schrap M, McCauley M, Hell K, Stuart RA. Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *The EMBO journal* 2003;22:6438-47.

Kaufman BA, Newman SM, Hallberg RL, Slaughter CA, Perlman PS, Butow RA. In organello formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:7772-7.

Kim JL, Morgenstern KA, Griffith JP, Dwyer MD, Thomson JA, Murcko MA, et al. Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* 1998;6:89-100.

Kreuzer KN. Recombination-dependent DNA replication in phage T4. *Trends in biochemical sciences* 2000;25:165-73.

Lecrenier N, Foury F. New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene* 2000;246:37-48.

- Linder P. Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic acids research* 2006;34:4168-80.
- Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Nishi K, et al. Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 1989;337:121-2.
- Ling F, Hori A, Shibata T. DNA recombination-initiation plays a role in the extremely biased inheritance of yeast [rho-] mitochondrial DNA that contains the replication origin ori5. *Molecular and cellular biology* 2007;27:1133-45.
- Ling F, Shibata T. Recombination-dependent mtDNA partitioning: in vivo role of Mhr1p to promote pairing of homologous DNA. *The EMBO journal* 2002;21:4730-40.
- Ling F, Shibata T. Mhr1p-dependent concatemeric mitochondrial DNA formation for generating yeast mitochondrial homoplasmic cells. *Molecular biology of the cell* 2004;15:310-22.
- Ling MM, Robinson BH. Approaches to DNA mutagenesis: an overview. *Analytical biochemistry* 1997;254:157-78.
- Lisby M, Rothstein R, Mortensen UH. Rad52 forms DNA repair and recombination centers during S phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:8276-82.
- Lutz T, Neupert W, Herrmann JM. Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *The EMBO journal* 2003;22:4400-8.
- Löoke, M., Kristjuhan, K., Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques* **50**:325-328.
- MacAlpine DM, Kolesar J, Okamoto K, Butow RA, Perlman PS. Replication and preferential inheritance of hypersuppressive petite mitochondrial DNA. *The EMBO journal* 2001;20:1807-17.
- Maleszka R, Skelly PJ, Clark-Walker GD. Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *The EMBO journal* 1991;10:3923-9.

Mangus DA, Jang SH, Jaehning JA. Release of the yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor from transcription complexes. *The Journal of biological chemistry* 1994;269:26568-74.

Matson SW, Bean DW, George JW. DNA helicases: enzymes with essential roles in all aspects of DNA metabolism. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 1994;16:13-22.

Mbantenkhu M, Wang X, Nardoizzi JD, Wilkens S, Hoffman E, Patel A, et al. Mgm101 is a Rad52-related protein required for mitochondrial DNA recombination. *The Journal of biological chemistry* 2011;286:42360-70.

Meeusen S, Tieu Q, Wong E, Weiss E, Schieltz D, Yates JR, et al. Mgm101p is a novel component of the mitochondrial nucleoid that binds DNA and is required for the repair of oxidatively damaged mitochondrial DNA. *The Journal of cell biology* 1999;145:291-304.

Miyakawa I, Sando N, Kawano S, Nakamura S, Kuroiwa T. Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science* 1987;88 (Pt 4):431-9.

Mokranjac D, Neupert W. Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling. *Biochimica et biophysica acta* 2009;1793:33-41.

Moolenaar GF, Visse R, Ortiz-Buysse M, Goosen N, van de Putte P. Helicase motifs V and VI of the *Escherichia coli* UvrB protein of the UvrABC endonuclease are essential for the formation of the preincision complex. *Journal of molecular biology* 1994;240:294-307.

Mukhopadhyay A, Hammen P, Waltner-Law M, Weiner H. Timing and structural consideration for the processing of mitochondrial matrix space proteins by the mitochondrial processing peptidase (MPP). *Protein science : a publication of the Protein Society* 2002;11:1026-35.

Myung K, Datta A, Chen C, Kolodner RD. SGS1, the *Saccharomyces cerevisiae* homologue of BLM and WRN, suppresses genome instability and homeologous recombination. *Nature genetics* 2001;27:113-6.

Park SH, Zarrinpar A, Lim WA. Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms. *Science* 2003;299:1061-4.

Pause A, Sonenberg N. Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *The EMBO journal* 1992;11:2643-54.

Petersen JG, Holmberg S. The ILV5 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is highly expressed. *Nucleic acids research* 1986;14:9631-51.

Pogorzala L, Mookerjee S, Sia EA. Evidence that msh1p plays multiple roles in mitochondrial base excision repair. *Genetics* 2009;182:699-709.

Pryciak PM, Huntress FA. Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the Gbetagamma complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway. *Genes & development* 1998;12:2684-97.

Rapaport D. Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. *EMBO reports* 2003;4:948-52.

Rogowska AT, Puchta O, Czarnecka AM, Kaniak A, Stepień PP, Golik P. Balance between transcription and RNA degradation is vital for *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: reduced transcription rescues the phenotype of deficient RNA degradation. *Molecular biology of the cell* 2006;17:1184-93.

Rose F, PH Winston (1990) *Methods in yeast genetics, a laboratory course* Annal. Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Sambrook, J., Russell, D. W. (2011) Preparation of plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS. Argentine, J., Irwin, N., Janssen, K. A. (Toim.), *Molecular Cloning: a laboratory manual* (lk. 1.32- 1.35), Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sambrook, J., Russell, D. W. (2011) Preparation of Radiolabeled DNA and RNA probes- Radiolabeling of DNA probes by the Polymerase Chain Reaction. Argentine, J., Irwin, N., Janssen, K. A. (Toim.), *Molecular Cloning: a laboratory manual* (lk. 9.14- 9.18), Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sambrook, J., Russell, D. W. (2011) Southern Blotting: Capillary Transfer of DNA to Membranes. Argentine, J., Irwin, N., Janssen, K. A. (Toim.), *Molecular Cloning: a laboratory manual* (lk. 6.39- 6.47), Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sambrook, J., Russell, D. W. (2011) Southern Hybridization of Radiolabeled Probes to Nucleic Acids Immobilized on Membranes; Additional Protocol: Stripping Probes from

Membranes. Argentine, J., Irwin, N., Janssen, K. A. (Toim.), *Molecular Cloning: a laboratory manual* (lk. 6.50- 6.58), Cold Spring Harbor Laboratory Press

Schinkel AH, Tabak HF. Mitochondrial RNA polymerase: dual role in transcription and replication. *Trends in genetics* : TIG 1989;5:149-54.

Schmid SR, Linder P. D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Molecular microbiology* 1992;6:283-91.

Schmidt U, Lehmann K, Stahl U. A novel mitochondrial DEAD box protein (Mrh4) required for maintenance of mtDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 2002;2:267-76.

Sedman T, Joers P, Kuusk S, Sedman J. Helicase Hmi1 stimulates the synthesis of concatemeric mitochondrial DNA molecules in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* 2005;47:213-22.

Sedman T, Kuusk S, Kivi S, Sedman J. A DNA helicase required for maintenance of the functional mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 2000;20:1816-24.

Senturker S, Auffret van der Kemp P, You HJ, Doetsch PW, Dizdaroglu M, Boiteux S. Substrate specificities of the ntg1 and ntg2 proteins of *Saccharomyces cerevisiae* for oxidized DNA bases are not identical. *Nucleic acids research* 1998;26:5270-6.

Shiiba, D., Fumoto, S. I., Miyakawa, I., Sando, N. (1997). Isolation of giant mitochondrial nucleoids from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Protoplasma*, 198(3-4), 177-185.

Shiratori A, Shibata T, Arisawa M, Hanaoka F, Murakami Y, Eki T. Systematic identification, classification, and characterization of the open reading frames which encode novel helicase-related proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by gene disruption and Northern analysis. *Yeast* 1999;15:219-53.

Singleton MR, Dillingham MS, Wigley DB. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annual review of biochemistry* 2007;76:23-50.

Szczesny RJ, Wojcik MA, Borowski LS, Szewczyk MJ, Skrok MM, Golik P, et al. Yeast and human mitochondrial helicases. *Biochimica et biophysica acta* 2013.

Szyrach G, Ott M, Bonnefoy N, Neupert W, Herrmann JM. Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *The EMBO journal* 2003;22:6448-57.

Tanner NK, Cordin O, Banroques J, Doere M, Linder P. The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Molecular cell* 2003;11:127-38.

Tuteja N, Tuteja R. Unraveling DNA helicases. Motif, structure, mechanism and function. *European journal of biochemistry / FEBS* 2004;271:1849-63.

Tzagoloff A, Myers AM. Genetics of mitochondrial biogenesis. *Annual review of biochemistry* 1986;55:249-85.

Umezu K, Nakayama K, Nakayama H. Escherichia coli RecQ protein is a DNA helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87:5363-7.

van der Laan M, Rissler M, Rehling P. Mitochondrial preprotein translocases as dynamic molecular machines. *FEMS yeast research* 2006;6:849-61.

Van Dyck E, Foury F, Stillman B, Brill SJ. A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB. *The EMBO journal* 1992;11:3421-30.

von Heijne G. Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *The EMBO journal* 1986;5:1335-42.

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal* 1982;1:945-51.

Wassarman DA, Steitz JA. RNA splicing. Alive with DEAD proteins. *Nature* 1991;349:463-4.

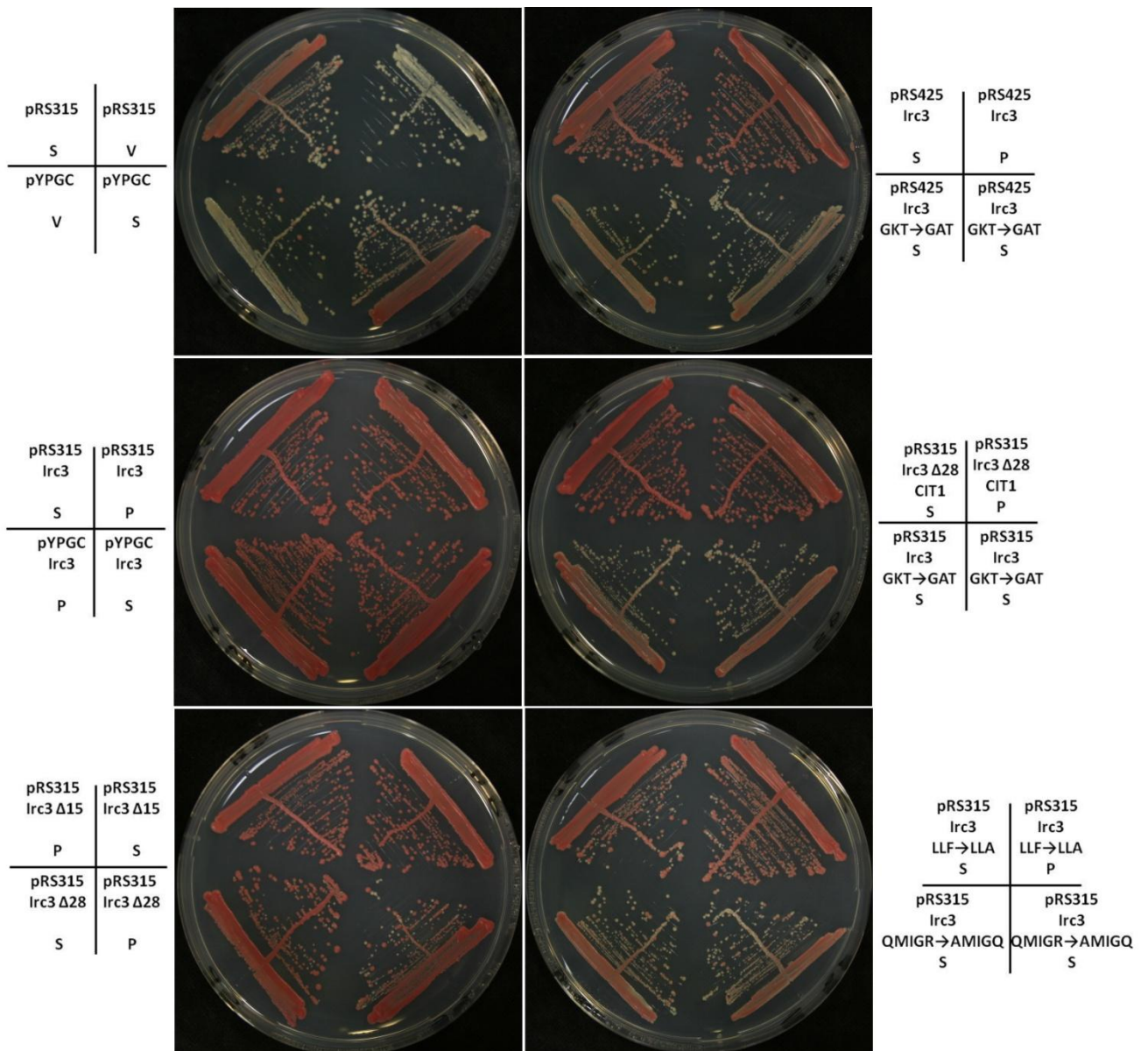
Watt PM, Hickson ID, Borts RH, Louis EJ. SGS1, a homologue of the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1996;144:935-45.

Lisad

Tabel 5. Kolooniade loendus –LEU FOA tassidelt.

| | | 315 | 315 Irc3 | 315 Irc3 Δ15 | 315 Irc3 Δ28 | 315 Irc3 Δ28 Cit1 | 315 Irc3 GKT→GAT | 315 Irc3 LLF→LLA | 315 Irc3 QMIGR→ AMIGQ | pYPGC | pYPGC Irc3 | 425 Irc3 | 425 Irc3 Δ28 | 425 Irc3 GKT→GAT |
|--------------|-------------|-------|----------|-----------------|-----------------|----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|-------|---------------|----------|-----------------|---------------------|
| 1. loendus | PUNASED | 0 | 171 | 134 | 17 | 111 | 0 | 2 | 0 | 0 | 101 | 32 | 18 | 0 |
| | VALGED | 126 | 30 | 45 | 100 | 53 | 111 | 128 | 200 | 151 | 44 | 99 | 63 | 111 |
| | SEKTORITEGA | 8 | 21 | 42 | 61 | 34 | 18 | 65 | 20 | 10 | 37 | 16 | 57 | 2 |
| | KOKKU | 134 | 222 | 221 | 178 | 198 | 129 | 195 | 220 | 161 | 182 | 147 | 138 | 113 |
| 2. loendus | PUNASED | 0 | 196 | 170 | 11 | 136 | 0 | 10 | 0 | 1 | 146 | 70 | 53 | 0 |
| | VALGED | 221 | 44 | 37 | 114 | 44 | 234 | 136 | 186 | 194 | 28 | 84 | 75 | 116 |
| | SEKTORITEGA | 40 | 20 | 45 | 189 | 59 | 54 | 82 | 28 | 53 | 51 | 64 | 78 | 3 |
| | KOKKU | 261 | 260 | 252 | 314 | 239 | 288 | 228 | 214 | 248 | 225 | 218 | 206 | 119 |
| 3. loendus | PUNASED | 0 | 178 | 142 | 4 | 162 | 0 | 9 | 0 | 0 | 105 | 36 | 25 | 0 |
| | VALGED | 155 | 21 | 42 | 108 | 32 | 198 | 117 | 142 | 162 | 61 | 55 | 53 | 110 |
| | SEKTORITEGA | 31 | 21 | 38 | 94 | 38 | 73 | 116 | 29 | 42 | 47 | 53 | 59 | 1 |
| | KOKKU | 186 | 220 | 222 | 206 | 232 | 271 | 242 | 171 | 204 | 213 | 144 | 137 | 111 |
| | | 315 | 315 Irc3 | 315 Irc3 Δ15 | 315 Irc3 Δ28 | 315 Irc3 Δ28 Cit1 | 315 Irc3 GKT→GAT | 315 Irc3 LLF→LLA | 315 Irc3 QMIGR→ AMIGQ | pYPGC | pYPGC Irc3 | 425 Irc3 | 425 Irc3 Δ28 | 425 Irc3 GKT→GAT |
| 1. loendus % | PUNASED | 0,00 | 77,03 | 60,63 | 9,55 | 56,06 | 0,00 | 1,03 | 0,00 | 0,00 | 55,49 | 21,77 | 13,04 | 0,00 |
| | VALGED | 94,03 | 13,51 | 20,36 | 56,18 | 26,77 | 86,05 | 65,64 | 90,91 | 93,79 | 24,18 | 67,35 | 45,65 | 98,23 |
| | SEKTORITEGA | 5,97 | 9,46 | 19,00 | 34,27 | 17,17 | 13,95 | 33,33 | 9,09 | 6,21 | 20,33 | 10,88 | 41,30 | 1,77 |
| 2. loendus % | PUNASED | 0,00 | 75,38 | 67,46 | 3,50 | 56,90 | 0,00 | 4,39 | 0,00 | 0,40 | 64,89 | 32,11 | 25,73 | 0,00 |
| | VALGED | 84,67 | 16,92 | 14,68 | 36,31 | 18,41 | 81,25 | 59,65 | 86,92 | 78,23 | 12,44 | 38,53 | 36,41 | 97,48 |
| | SEKTORITEGA | 15,33 | 7,69 | 17,86 | 60,19 | 24,69 | 18,75 | 35,96 | 13,08 | 21,37 | 22,67 | 29,36 | 37,86 | 2,52 |
| 3. loendus % | PUNASED | 0,00 | 80,91 | 63,96 | 1,94 | 69,83 | 0,00 | 3,72 | 0,00 | 0,00 | 49,30 | 25,00 | 18,25 | 0,00 |
| | VALGED | 83,33 | 9,55 | 18,92 | 52,43 | 13,79 | 73,06 | 48,35 | 83,04 | 79,41 | 28,64 | 38,19 | 38,69 | 99,10 |
| | SEKTORITEGA | 16,67 | 9,55 | 17,12 | 45,63 | 16,38 | 26,94 | 47,93 | 16,96 | 20,59 | 22,07 | 36,81 | 43,07 | 0,90 |
| KESKMINE% | PUNASED | 0,00 | 77,77 | 64,02 | 5,00 | 60,93 | 0,00 | 3,04 | 0,00 | 0,13 | 56,56 | 26,29 | 19,01 | 0,00 |
| | VALGED | 87,35 | 13,33 | 17,99 | 48,30 | 19,66 | 80,12 | 57,88 | 86,96 | 83,81 | 21,75 | 48,02 | 40,25 | 98,27 |
| | SEKTORITEGA | 12,65 | 8,90 | 17,99 | 46,70 | 19,41 | 19,88 | 39,08 | 13,04 | 16,06 | 21,69 | 25,68 | 40,74 | 1,73 |
| stdev | PUNASED | 0,00 | 2,77 | 2,00 | 1,53 | 6,61 | 0,00 | 0,67 | 0,00 | 0,21 | 7,80 | 3,79 | 4,12 | 0,00 |
| | VALGED | 2,04 | 3,69 | 2,23 | 8,38 | 3,09 | 4,44 | 6,08 | 2,25 | 2,94 | 8,13 | 5,58 | 1,93 | 0,81 |
| | SEKTORITEGA | 2,04 | 0,94 | 0,47 | 8,12 | 4,20 | 4,44 | 6,21 | 2,25 | 2,87 | 0,49 | 5,67 | 2,61 | 0,81 |

Tabeli arvutuskäik: Kolme koduskatse kolooniad loendati ning erinevalt värvunud kolooniade osakaal arvatati protsentides. Arvatati kome katse punaste, valgete ja sektoritega kolooniade keskmine osakaal ning standardhälve.



-LEU FOA tassidel erinevalt värvunud kolooniad edasi külvatud –LEU söötmele. Piltide kõrval on toodud rakkudesse transformeeritud plasmiid ning –LEU FOA tassilt edasi külvatud koloonia värvus. P- punane; S- sektoritega; V- valge.

```

30305      ATAAA TAAATTAAA ATAATTAATA TATATATATA AATATAATA ATTATTATAT
30361 ATAAATATAT ATAATTTTTA TAATAAATAT TATAATATTA TATAAATAAA TAATTATAAT
30421 ATATAATAAA TATATAATA TAATAAAAAT ATTAACAATA TAATAAAAAT TTATAATATA
30481 AATATAAATT ATAAATAAGT TAAATTAATA AAATAATAAA TGATTAACAA GAAGATATCT
30541 GGGGTCCCA TAATAATTAT TATTTTCAAT AATAATTGGG ACCCCCCACC ATTATAATAT
30601 CATATTAATT AATATAATA TAATGTATAT AAAATAGAAA TAATAATTAA TATAATAATA
30661 ATAATATATA TAAAATAGAA ATAATAATTA AATATATATA TAAATAATTA TTTATATAAT
30721 ATATTATAAA TAATAATAAT AATAAATATT TATTAATTAA TAATGATTAT AAATATTTTA
30781 TTTAATATAA ATTTATAACT ATTTTATTAT ATATATATTT TTTATTCATA AAAATTCCCT
30841 TTGAGGATTT TTATTTTATA TAAATATCTT CTAATATTTA TAATAAATA TAATATATTC
30901 ATTATATTTA TAATTATATA TAAT
      Δ 1008 BP      TATAATTA TAAATAATTT ATATAAAAAA AGTTTATTA AAAAATATTA
31981 TTAAAAATAT AATATTAATA ATAAATAAAA ATAATATTAT ACTCTTAATA GAATTTATAA
32041 TGATAAAAAAT TAAGATGAAG ACTTTTTTTTT ATAATTATTA TAAATTTATA TAAAAATAAT
32101 ATATATATAT TTATATTTAT TTTATTAATA TATATAATAT ATTTATGTAT ATTUAAAAAGA
32161 TATATTTAAA TATTTTTTATT TTTTTTTTAT AAGATAATTT TTGTAAATAT ATAAGTAATA
32221 AATTAAGTTT TATGGGGGA GGGGGTGGGT GATTAGAAC TTAAGTGAAT AATATATATA
32281 AAGCATACAT TAGTTAATAT TTAATAATAT AATCAATATA TAATAATTAT AAAATAATTA
32341 ATTATATAAT AATAATAATG TATAACAAT ATAATAAATT GTATAAATA AAATATAAAT
32401 CATAAATAAA GCTAAATTA TAAATAATA AATGATAAAC AAGAAGATAT CCGGGTCCCA
32461 ATAATAATTA TTATTGAAAA TAATAATTGG GACCCC 32498

```

Tüve A1184 järestus. Järjestuse koordinaadid on Foury, 1998 järgi. Tumeroosalt on märgitud Ori 7, lillaga Ori2. Rohelise kastiga on ümbritsetud C-box, helesinise kastiga ümbritsetud B-box ning kollase kastiga A-box. Järjestuse keskel punasega tähistatud Δ1008 bp tähistab 1008 aluspaari deletsiooni selle tüve algüvest w303 s A7. Allajoonitud 6 bp suurune lõik on DraI lõikesait.