TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÜLDISE- JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

***Saccharomyces cerevisiae rho*$^{-}$ mutantide hüpersupressiivsuse pärandumise uurimine PCR meetodil**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Iris Vaask

Juhendaja MSc Sirelin Sillamaa

TARTU 2022

Saccharomyces cerevisiae rho⁻ mutantide hüpersupressiivsuse pärandumise uurimine PCR meetodil

Bakalaureusetöö

Iris Vaask

Kokkuvõte. *Saccharomyces cerevisiae*'le on iseloomulikud *rho*⁻ *petite* mutandid, mida iseloomustab supressiivsus ehk *rho*⁻ mutandi võime eelistatult kanda oma mitokondriaalne DNA järgnevale põlvkonnale kui neid ristata metsiktüüpi tüvega. Supressiivsuse täpsem mehhanism ja selles osalevad valgud on siiani teadmata. Uurimaks *S. cerevisiae* Hmi1, Irc3, Cce1 ja Rpo41 valkude mõju *rho*⁻ mutantide hüpersupressiivsuse pärandumisele, konstrueeriti hüpersupressiivsed ja neutraalsed deletsiooni tüved, mida ristati omavahel. Ristamisest saadud ristamiskolooniate kiireks ja efektiivseks uurimiseks optimeeriti koloonia-PCR. Antud töö tulemusena selgus, et Rpo41 tõenäoliselt mõjutab hüpersupressiivsuse pärandumist.

CERCS kood: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

Märksõnad: *Saccharomyces cerevisiae*, mitokonder, *rho*⁻ *petite* mutandid, hüpersupressiivsus

Heritability studies of hypersuppressiveness in _Saccharomyces cerevisiae rho_⁻ mutants using PCR method

Bachelor's thesis

Iris Vaask

Abstract. *S. cerevisiae rho*⁻ *petite* mutants were used to study inheritance of mitochondrial DNA. *Rho*⁻ *petite* mutants are characterized by the ability to preferentially pass on their mitochondrial DNA when crossed with wild type strains. Not much is known about the mechanisms and the proteins necessary for this process. In this work hypersuppressive and neutral deletion strains were constructed and crossed with each other to assess the roles of the proteins Hmi1, Irc3, Cce1 and Rpo41 on hypersuppressive inheritance. Daughter colonies were studied using optimized colony-PCR. In this study, Rpo41 was deemed a possible influencer of hypersupressive inheritance.

CERSC code: P320 Nucleic acids, protein synthesis

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, mitochondria, *rho*⁻ *petite* mutants, hypersuppressiveness

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID 5
SISSEJUHATUS 6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE 7
1.1 *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalne DNA 7
1.2 *Petite*-mutandid ja supressiivsus 8
1.3 Mitokondriaalse DNA stabiilsusega seotud valgud Rpo41 ja Cce1 10
1.4 *S. cerevisiae* mitokondriaalsed DNA helikaasid Hmi1 ja Irc3 11
2 EKSPERIMENTAALOSA 14
2.1 Töö eesmärk 14
2.2 Meetodid ja materjalid 14
2.2.1 Kasutatud ja konstrueeritud tüved 14
2.2.2 Söötmed 15
2.2.3 PCR reaktsioonisegud, meetodid ja geelid 15
2.2.4 Pärmi tüvede tegemine LiOAc transformatsiooniga 16
2.2.5 LiOAc kiirpuhastuse meetod 17
2.2.6 DAPI värvimine 17
2.2.7 Pärmi totaalse DNA eraldamine 18
2.2.8 *Southern blot* 18
2.2.9 Hüpersupressiivse ja neutraalse tüve ristamine 19
2.3 Tulemused 20
2.3.1 Hmi1, Irc3, Cce1, Rpo41 ja Ste5 deletsiooni kasseti transformatsioon *S. cerevisiae* rakkudesse 20
2.3.2 HS a1328 ja N α1462 deletsiooni tüvede stabiilsuse kontroll DAPI meetodil 22
2.3.3 HS a1328 ja N α1462 deletsiooni tüvede stabiilsuse kontroll *Southern blot* meetodiga 23
2.3.4 Cce1 deletsiooni mõju neutraalsete *rho*$^-$ rakkude mitokondriaalse DNA stabiilsusele 24
2.3.5 Hüpersuppressiivse genoomi pärandumine neutraalse tüvega ristamisel 26
2.3.5.1 Koloonia-PCR optimeerimine 26
2.3.5.2 Geenide HMI1, IRC3, CCE1 ja RPO41 deletsioonide mõju mtDNA pärandumisele 27
2.3.5.3 Ristamiskatsed hüpersupressiivsuse pärandumise uurimiseks 29
2.4 Arutelu 31
KOKKUVÕTE 35
SUMMARY 36

TÄNUAVALDUSED 38
KIRJANDUSE LOETELU 39
LISAD 46
LIHTLITSENTS 51

KASUTATUD LÜHENDID

bp – aluspaar (*basepair*)

DAPI – 4,6-diamidiino-2-fenüülindool

dsDNA – kaheahelaline DNA (*double-stranded DNA*)

G418 – genetitsiin

hph – Hügromütsiin B

HS – hüpersupressiivne *rho*$^-$ mutant

kb – tuhat aluspaari (*kilobase pair*)

mtDNA – mitokondriaalne DNA

mtRNA – mitokondriaalne RNA

MQ – Milli-Q H_2O

N – neutraalne *rho*$^-$ mutant

OD_{600} – optiline tihedus 600 nm valguse lainepikkusel (*optical density*)

ori – replikatsiooni alguskoht (*origin of replication initiation*)

SC – täissünteetiline sööde (*synthetic complete*)

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat

SF – superperekond (*superfamily*)

ssDNA – üheahelaline DNA (*single-stranded DNA*)

wt – metsiktüüp (*wildtype*)

SISSEJUHATUS

Mitokonder on iseseisva genoomiga eukarüootse raku organell, milles leiab aset rakule vajaliku ATP tootmine. Mitokondriaalse DNA metabolismi uurimiseks on *Saccharomyces cerevisae* eriline mudelorganism, sest erinevalt teistest eukarüootidest on ta võimeline ellu jääma ka ilma funktsionaalse mitokondriaalse DNA-ta. Osalise mitokondriaalse DNA-ga *rho*$^-$ mutante iseloomustab supressiivsus. Supressiivsus on *rho*$^-$ mutandi võime eelistatult anda oma mitokondriaalne DNA järgnevale põlvkonnale, kui neid ristata metsiktüüpi pärmitüvega. *Rho*$^-$ mutante jaotatakse supressiivsuse alusel kolme eri gruppi – hüpersupressiivsed, supressiivsed ja neutraalsed. Metsiktüüpi tüve ristamisel hüpersupressiivse tüvega on üle 95% järglastest *rho*$^-$ genoomiga, supressiivse tüvega ristamisel pärandub vähem kui 95% ja neutraalse tüvega on kõik järglased metsiktüüpi mitokondriaalse genoomiga (Blanc & Dujon, 1980).

Supressiivsuse mehhanism ja kõik selles osalevad valgud ei ole veel teada. Kaks valku, mille olulisust on hüpersupressiivsuse mehhanismis varasemalt uuritud, on Rpo41 ja Cce1. Antud töös uuritakse Rpo41 ja Cce1 ning helikaaside Irc3 ja Hmi1 mõju hüpersupressiivsusele. On näidatud, et need valgud on olulised metsiktüüpi tervikliku funktsionaalse mitokondriaalse DNA säilitamiseks.

Käesolevas töös viidi neutraalsetesse ja hüpersupressiivsetesse tüvedesse sisse *hmi1Δ*, *irc3Δ*, *cce1Δ* ja *rpo41Δ* deletsioonid ja kontrolliti tüvede võimet oma mtDNA-d säilitada. Tüvede valmistamisele ja kontrollimisele järgnes hüpersupressiivsete ja neutraalsete deletsiooni tüvede ristamine hüpersupressiivsuse pärandumise uurimiseks. Ristamiste analüüsimiseks optimeeriti koloonia-PCR meetodit ja kasutati seda analüüsimaks ristamistest saadud kolooniatele edasipärandunud mtDNA fragmenti.

Töö eesmärgiks oli välja töötada ja uurida *S. cerevisiae rho*$^-$ mutantide hüpersupressiivsuse pärandumist kasutades PCR-meetodit.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalne DNA

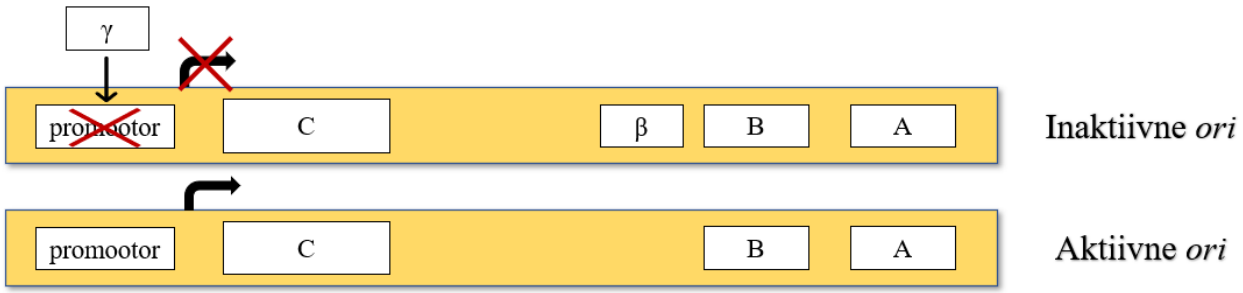
Saccharomyces cerevisiae ehk pagaripärm on ainurakne eukarüoot. Pagaripärm on fakultatiivne anaeroob ning ta on võimeline elama ilma mitokondriaalse DNA-ta (mtDNA) ja mitokondriaalse hingamisahelata (Hyman *et al.*, 1982). Pagaripärm saab kasvada nii fermenteeritaval (näiteks glükoos) kui ka mittefermenteeritaval (näiteks glütserool) süsinikuallikal (De Deken, 1966). Mittefermenteeritaval süsinikuallikal peab pärm kasutama energia saamiseks mitokondriaalset hingamisahelat, kuid fermenteeritava süsinikuallika olemasolul on ta võimeline anaeroobselt hingama ehk saab hakkama ilma hingamisahelata ja võib kaotada osaliselt või täielikult mtDNA, seetõttu on ta hea mudelorganism uurimaks mtDNA säilimist (Tzagoloff & Dieckmann, 1990).

Mitokonder on kahe membraaniga eukarüootsete rakkude organell, millel on oma genoom, mis koos tuuma genoomiga koordineerivad mitokondri funktsioneerimist (ülevaade Baccolo *et al.*, 2018). Mitokondrid on seotud paljude oluliste rakuliste metaboolsete protsessidega – Krebsi tsükkel, uurea tsükkel, ATP süntees oksüdatiivse fosforüleerimisega, rasvhapete oksüdatsioon, reaktiivsete hapnikuühendite tootmine ja apoptoos (ülevaated Bock & Tait, 2020; Spinelli & Haigis, 2018). Kuna mitokonder osaleb raku jaoks väga olulistes protsessides, on mitokondrid eukarüootide eluks hädavajalikud organellid (ülevaade Spinelli & Haigis, 2018).

Pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* (tüve FY1679) mitokondriaalne DNA on 85 779 bp (*basepair*, aluspaari) suurune, mis on pakitud nukleoidideks (Foury *et al.*, 1998; Miyakawa *et al.*, 1987). Teise tuntud *Saccharomyces cerevisiae* labori tüve W303 mitokondriaalne DNA on võrdlemisi sarnase pikkusega (85 883 bp) ja ülesehitusega nagu selgub Ralser *et al.* 2012 artikli käigus valminud sekveneerimise tulemustest (NCBI GenBank ALAV01000000) (Ralser *et al.*, 2012).

Pärmi mtDNA kodeerib vaid kaheksat valku: tsütokroom c oksüdaasi kolme subühikut, ATP süntaasi kolme subühikut, apotsütokroom b ja ribosomaalset valku Var1. Lisaks valkudele kodeerib *S. cerevisiae* mtDNA 24 tRNA-d ja kahte rRNA-d (Foury *et al.*, 1998). Pagaripärmi mtDNA-le on iseloomulik kõrge adeniini ja tümiini sisaldus ning madal guaniini ja tsütosiini sisaldus, mis on koondunud G-C klastritesse. Pagaripärmi mitokondriaalne genoom sisaldab ka kaheksat lühikest *ori* (*origin of replication initiation*) järjestust. Need järjestused on oma nime saanud nende võimalikust seosest replikatsiooni initsiatsioonil (de Zamaroczy *et al.*, 1981).

Ori järjestusi jaotatakse omakorda kaheks grupiks: aktiivsed ja inaktiivsed *ori* järjestused. Aktiivsed *ori* järjestused (*ori* 1, 2, 3, 5) sisaldavad endas promootorjärjestust ja kolme G-C rikast klastrit, mida nimetatakse A, B ja C klastriteks (joonis 1) (Zamaroczy *et al.*, 1984). Aktiivsetel *ori* järjestustel saavad transkriptsioonifaktorid kinnituda promootoritele ja alustada transkriptsiooni. Inaktiivsetel *ori* järjestustel (*ori* 4, 6, 7, 8) on lisaks neile kolmele klastrile veel kaks G-C rikast klastrit (β ja γ klastrid), millest teine asub promootorjärjestuse sees ning seetõttu inaktiveerib promootori kuna transkriptsioonifaktorid ei saa promootoriga seonduda (Baldacci *et al.*, 1984; Foury *et al.*, 1998).



Joonis 1. *S. cerevisiae* mitokondriaalse genoomi *ori*-de skeem. Joonise alumises osas on kujutatud aktiivne *ori* järjestus, mis sisaldab promootorit ja kolme G-C rikast klastrit A, B ja C. Joonise ülemises osas on inaktiivne *ori* järjestus, mis sisaldab lisaks β klastrit ja promootorit inaktiveerivat γ klastrit. Noolega on näidatud transkriptsiooni alguspunkt ja suund.

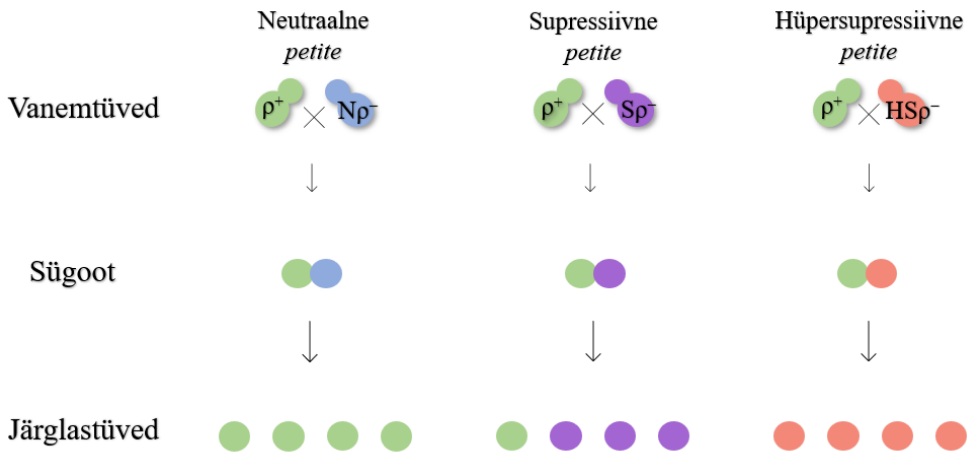
Kuna mitokondriaalne genoom kodeerib ainult kaheksat valku, ei piisa neist kõikide mitokondris toimuvate protsesside läbiviimiseks. Kõik ülejäänud mitokondri funktsioneerimiseks vajalikud valgud kodeeritakse tuumas ning transporditakse mitokondrisse spetsiaalsete signaalpeptiidide abil (Vögtle *et al.*, 2009). Mitokondriaalne proteoom koosneb ligi 3500 valgust ja ainult 12% neist on tegelikkuses seotud energia sünteesiga, kuid 26% vastutab mtDNA säilimise ja geeniekspressiooni eest (Morgenstern *et al.*, 2017). Ka antud töös uuritavad valgud - helikaasid Hmi1, Irc3, resolvaas Cce1 ja RNA polümeraas Rpo41 on kodeeritud tuuma genoomi poolt ja on olulised tervikliku mitokondriaalse DNA säilimiseks (Greenleaf *et al.*, 1986; Kleff *et al.*, 1992; Sedman *et al.*, 2000; Sedman *et al.*, 2014).

1.2 *Petite*-mutandid ja supressiivsus

Pagaripärmi mitokondriaalses genoomis võib tekkida suuri deletsioone, mille tulemusel säilib genoomist vaid lühike lõik, mida tandeemselt paljundatakse nii, et saadakse metsiktüübi mitokondriaalsele genoomile lähedane mtDNA kogus raku kohta (Blanc & Dujon, 1980). Sellised rakud moodustavad fermenteeritaval süsinikuallikal väikeseid kolooniaid, mida nimetatakse *petite* kolooniateks ning mittefermenteeritaval süsinikuallikal nad ei kasva. Tsütoplasmaatilisi *petite*

mutante, millel puudub osaliselt mtDNA nimetatakse *rho*$^-$ rakkudeks ning mutante, millel puudub mtDNA täielikult, nimetatakse *rho*^{0} rakkudeks ja metsiktüüpi rakke *rho*$^+$-ks, mis viitab täisgenoomi olemasolule (ülevaade Dujon, 2020).

Rho$^-$ *petite* mutante jaotatakse kolme eri gruppi – hüpersupressiivsed, supressiivsed ja neutraalsed, vastavalt nende genoomi pärandumise mustritele, kui neid ristatakse metsiktüüpi tüvega (Joonis 2) (Blanc & Dujon, 1980). Kui täisfunktsionaalse mtDNA-ga metsiktüübi *rho*$^+$ ja *rho*$^-$ genoomi ristamisel enam kui 95% järglaskonnast on *rho*$^-$, nimetatakse *rho*$^-$ genoomi sisaldavaid rakke hüpersupressiivseteks (HS), see tähendab HS genoom piltlikult öeldes surub metsiktüüpi genoomi maha ning pärandub eelistatult edasi. Kui järglaskonnas on väiksem protsent *rho*$^-$ rakke, nimetatakse neid supressiivseteks ning *rho*$^-$ rakkude puudumisel järglaskonnas, nimetatakse neid neutraalseteks *petite* rakkudeks (ülevaade Dujon, 2020). Hüpersupressiivse ja neutraalse *petite* mutandi ristamisel pärandub peaaegu 100% ulatuses hüpersupressiivne mtDNA fragment (Lorimer *et al*., 1995).



Joonis 2. Mitokondriaalse genoomi pärandumine *S. cerevisiae rho*$^-$ mutantide ristamisel funktsionaalse mtDNA-ga metsiktüübiga. *Rho*$^-$ mutantide (sinised, lillad ja oranžid) ristamisel metsiktüübiga (roheline) saadavate järglastega määratakse algsete *rho*$^-$ vanemtüvede supressiivsust. Neutraalsete tüvede puhul tekivad ainult *rho*$^+$ järglased ja supressiivsete tüvede puhul on enamik järglasi *rho*$^-$ mtDNA tüübiga. Hüpersupressiivsetel on üle 95% järglastest *rho*$^-$ mtDNA-ga (joonistatud autori poolt D. Williamson, 2002 artikli põhjal).

Kõik HS *rho*$^-$ tüved sisaldavad ühte neljast aktiivsest *ori* järjestusest (A, B ja C kast) ning aktiivset promootorit (Blanc & Dujon, 1980). Supressiivsetes *rho*$^-$ tüvedes on aga inaktiivne *ori* järjestus (promootor inaktiveeritud) ning neutraalsetes tüvedes puudub *ori* järjestus täielikult (Blanc & Dujon, 1980; de Zamaroczy *et al*., 1981).

Varasemalt on välja pakutud, et replikatsioon on *S. cerevisiaes ori* järjestusest ja RNA polümeraasist Rpo41 sõltuv protsess. *In vitro* süsteemis on näidatud, et minimaalselt on pärmi mitokondriaalse DNA sünteesiks vajalikud Rpo41-Mft1 kompleks, *ori* järjestus ja DNA polümeraas Mip1 (Sanchez-Sandoval *et al*., 2015). Siiani on olnud põhiline hüpotees, et HS *rho*$^-$ tüvedele annab metsiktüübiga ristates eelise suurenenud *ori* järjestuste tihedus, mis annab *rho*$^-$ mtDNA-le replikatsiooni eelise (MacAlpine *et al.*, 2001). Sellisele replikatsiooni hüpoteesile räägib aga vastu fakt, et ka neutraalsed *petite* mutandid, mis ei sisalda *ori* järjestust, on võimelised replitseerima mtDNA-d ja see võime säilib ka Rpo41 deleteerimisel (Fangman *et al*., 1989; Fangman & Dujon, 1984).

Hiljuti näidati, et *rho*$^+$ ja HS *rho*$^-$ tüvede ristamisel kaob *rho*$^+$ mtDNA tükkhaaval, mitte kõik korraga, seetõttu on välja pakutud, et HS mtDNA mõjub kahjustavalt *rho*$^+$ mtDNA terviklikkusele ning seetõttu on peale ristamist peaaegu kogu järglaskond *rho*$^-$ mitokondriaalse genoomiga (Corbi & Amon, 2021). Siiski on paljudele hüpoteesidele vaatamata hüpersupressiivsuse täpne mehhanism ning selles protsessis olulist rolli mängivad valgud veel kindlaks tegemata.

1.3 Mitokondriaalse DNA stabiilsusega seotud valgud Rpo41 ja Cce1

Kaks valku, mille olulisust on hüpersupressiivsuse mehhanismis uuritud, on pärmi RNA polümeraas Rpo41 ja DNA resolvaas Cce1 (Greenleaf *et al*., 1986; Kleff *et al*., 1992). Nende roll hüpersupressiivsuse mehhanismil pole aga täpselt teada, sest antud valkude rolli kohta hüpersupressiivsuse tagamisel on avaldatud vastuolulisi andmeid (Corbi & Amon, 2021; Fangman *et al*., 1989; Zweifel & Fangman, 1991).

Mitokondriaalse DNA säilimiseks ja korrektseks replikatsiooniks on vajalikud paljud erinevad valgud. Sellised valgud võivad olla seotud nii replikatsiooni (näiteks mtDNA polümeraas Mip1, ssDNA-d siduv Rim1, mtRNA polümeraas Rpo41 ning ligaas Cdc9), kui ka rekombinatsiooni protsessidega (DNA-d pakkiv Abf2 ja resolvaas Cce1) (Diffley & Stillman, 1991; Greenleaf *et al*., 1986; Isaya *et al*., 1994; Kleff *et al*., 1992; Tomkinson *et al*., 1992; Van Dyck *et al*., 1992). Samuti mõjutab Pif1, Irc3 ja Hmi1 helikaaside puudumine mtDNA terviklikku säilimist (Foury & Kolodynski, 1983; Sedman *et al.*, 2000; Sedman *et al.*, 2014).

Rpo41 on *S. cerevisiae* tuumas kodeeritud 153 kDa suurune mitokondriaalne RNA polümeraas, mis on vajalik nii transkriptsiooniks kui ka funktsionaalse metsiktüüpi mtDNA säilimiseks (Greenleaf *et al.*, 1986; Matsunaga & Jaehning, 2004). Rpo41 vajab promootorjärjestusele aktiivselt seondumiseks polümeraasi transkriptsioonifaktorit Mtf1 (*mitochondrial transcription*

factor 1), mis aitab DNA-d painutada nii, et Rpo41 saaks sellele seonduda (Matsunaga & Jaehning, 2004; Schinkel *et al.*, 1987). Samuti on *in vitro* katses näidatud, et lisaks RNA sünteesile, osaleb Rpo41-Mft1 ka replikatsiooniks vajalike praimerite sünteesis ning omab võimet alustada ka maha jääva ahela sünteesi ja panustada hüpersupressiivsuse pärandumisesse (Graves *et al.*, 1998; Ramachandran *et al.*, 2016; Sanchez-Sandoval *et al.*, 2015).

On näidatud, et *rpo41Δ rho*$^-$ tüved on võimelised siiski enda mtDNA-d paljundama ning seetõttu on võimallik, et *petite* mutandid omavad alternatiivset replikatsiooni mehhanismi või Rpo41-st sõltuv replikatsiooni mehhanism *in vivo* puudub (Fangman *et al*., 1989). Seni on Rpo41 mõju kohta hüpersupressiivsusele avaldatud vastuolulisi andmeid – HS *rho*$^-$ ja N *rho*$^-$ tüvede ristamistest on saadud tulemusi, kus pärandus 100% HS mtDNA, olenemata sellest, kas ristati metsiktüüpi tüvesid või RPO41 geeni deletsiooni sisaldavaid tüvesid, millest järeldati, et Rpo41 ei ole seotud hüpersupressiivsuse pärandumisega (Lorimer *et al*., 1995). Vastupidist näitab aga hiljuti avaldatud artikkel, kus näidati, et Rpo41 võib olla siiski osaleb hüpersupressiivsuse mehhanismis, sest Rpo41 funktsioneerimise mahasurumine vähendab *rho*$^+$ ja HS *rho*$^-$ tüvede ristamisel HS *rho*$^-$ genotüübi edasipärandumist (Corbi & Amon, 2021).

Cce1 (*cruciform cutting endonuclease*) on 41 kDa suurune tuuma genoomi poolt kodeeritud mitokondriaalne endonukleaas (Kleff *et al*., 1992). Endonukleaasid on ensüümid, mis lõikavad fosfodiestersidet nukleiinhappe seest, mille tulemusena tekivad oligonukleotiidid (Laskowski, 1967). Cce1 deletsioonitüvedes on suurenenud *petite* mutantide osakaal ning Cce1 omab rolli tervikliku metsiktüüpi mtDNA stabiilsuse säilitamises (Kleff *et al.*, 1992; Zweifel & Fangman, 1991). On näidatud, et mitokondris lõikab Cce1 *Holliday*-ühenduste (*Holliday junction*) tulemusena tekkivaid X-kujulisi struktuure ja Cce1 deletsiooniga tüvedes on selliste struktuuride hulk suurenenud (Kleff *et al.*, 1992). Selliste struktuuride suurem hulk viib mtDNA agregeerimiseni ja takistab antud mt genoomide pärandumise protsessi (Lockshon *et al*., 1995; Piskur, 1997; Zweifel & Fangman, 1991).

1.4 *S. cerevisiae* mitokondriaalsed DNA helikaasid Hmi1 ja Irc3

Helikaasid on ensüümide klass, mis kasutavad energia saamiseks ATP hüdrolüüsi ning harutavad lahti erinevaid nukleiinhapete struktuure. Helikaasid panustavad põhilistesse geneetilistesse protsessidesse – replikatsioon, transkriptsioon, translatsioon, RNA töötlus, vigade parandamine, rekombinatsioon ja konjugatsioon (ülevaated Brosh & Matson, 2020; Lohman & Bjornson, 1996).

Kõrgemat järku struktuuri alusel on helikaase võimalik jaotada monomeerseteks ja oligomeerseteks (Gao & Yang, 2020; Singleton *et al.*, 2007). Lisaks saab helikaase eristada substraadi eelistuse (DNA või RNA), nukleiinhappe ahela lahti keeramise suuna (5'-3' või 3'-5'), protsessiivsuse (lühikesed vs. pikad produktid) ning koensüümide (ATP, GTP, TTP, CTP) kasutamise alusel (Lohman & Bjornson, 1996; Singleton *et al.*, 2007; ülevaade Brosh & Matson, 2020).

Praeguseks on *S. cerevisiae* mitokondris kirjeldatud kolme DNA helikaasi – Superperekond 1 helikaasid Pif1, Hmi1 ja Superperekond 2 helikaas Irc3. Mõlema Superperekonna liikmetel on seitse põhilist helikaasi motiivi ning kahe perekonna eristamiseks kasutatakse motiivide spetsiifilisi erinevusi (Fairman-Williams *et al.*, 2010). Pif1 ja Hmi1 kuuluvad vastavalt Pif1-laadsete ja UvrD/Rep helikaaside alamperekonda (Bessler *et al*., 2001; Sedman *et al*., 2000). Irc3 kuuluvust alamperekonda ei ole kindlaks määratud (Sedman *et al*., 2014). On näidatud, et need helikaasid on vajalikud tervikliku funktsionaalse mitokondriaalse DNA säilitamiseks ning on võimalik, et osalevad näiteks rekombinatsioonis ja replikatsioonis (Lahaye *et al.*, 1991; Sedman *et al.*, 2000; Sedman *et al.*, 2014).

S. cerevisiae Hmi1 rolliks on funktsionaalse tervikliku metsiktüüpi mitokondriaalse genoomi säilitamine (Sedman *et al.*, 2000). Hmi1 on 80 kDa suurune valk, mida kodeerib geen YOL095c kromosoomis XV ning seejärel suunatakse valk mitokondrisse (Lee *et al.*, 1999; Sedman *et al.*, 2000). Hmi1 on eriline mitokondriaalne valk, mille puhul esimesena näidati, et 36 aluspaari pikkune mitokondrisse liikumise sihtmärksignaal asub C-terminaalses otsas (Lee *et al.*, 1999; Sedman *et al.*, 2000). Hmi1 hüdrolüüsib ATP-d, kasutades kofaktorina Mg^{2+} ja substraadina kõige efektiivsemalt 19 nt pikkust ssDNA üleulatuvat otsa ning on 3'-5' suunaline helikaas (Kuusk *et al.*, 2005; Sedman *et al.*, 2000). Hmi1 puhul on *in vitro* katsetega näidatud, et mutatsioonid ATP seondumise ja hüdrolüüsiga seotud positsioonides K32M ja E211Q põhjustavad ATP hüdrolüüsi kadu ja omavad tugevat destabiliseerivat mõju metsiktüüpi tervikliku mtDNA säilimisele (Kuusk *et al*., 2005; Sedman *et al*., 2005).

Irc3 on *S. cerevisiae* monomeerne mitokondriaalne DNA helikaas (Piljukov *et al.*, 2020; Sedman *et al.*, 2014). Irc3 puudumisel on näidatud mitokondriaalse DNA kaksikahelaliste katkete hulga suurenemist ja arvatakse, et Irc3 osaleb nende katkete parandamisel (Sedman *et al.*, 2014). Lisaks on *in vitro* katsetega näidatud, et Irc3 on võimeline liikuma kaheahelalise DNA peal ja osaleb replikatsioonikahvlite (*replication fork*) ja *Holliday* ühenduste (*Holliday junction*) sarnaste

struktuuride lahti harutamises aidates sellega kaasa mtDNA korrektsele säilimisele (Gaidutšik *et al.*, 2016). Irc3 on umbes 75 kDa suurune tuumas kodeeritud ATPaasse aktiivsusega helikaas, mis translokeerub 3'-5' suunal (Gaidutšik *et al.*, 2016; Piljukov *et al.*, 2020; Sedman *et al.*, 2017). Irc3-l on oluline, aga mitte hädavajalik funktsioon tervikliku mitokondriaalse DNA säilimises, sest Irc3 deleteerumisel metsiktüübist, on ainult umbes 10% mutantsetest metsiktüüpi rakkudest eluvõimelised glütseroolil (Sedman *et al.*, 2014).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärk

Käesoleva bakaleureusetöö eesmärgiks oli välja töötada ja uurida *S. cerevisiae rho*$^{-}$ mutantide hüpersupressiivsuse pärandumist PCR-meetodil, milleks oli vajalik:

1. Hüpersupressiivsest ja neutraalsest pärmitüvest IRC3, HMI1, CCE1, RPO41 ja STE5 geeni deleteerimine.
2. Deletsioone kandvate tüvede mtDNA stabiilsuse kontrollimine.
3. Hüpersupressiivsete ja neutraalsete tüvede ristamine hüpersupressiivsuse pärandumise uurimiseks PCR-meetodil.

2.2 Meetodid ja materjalid

2.2.1 Kasutatud ja konstrueeritud tüved

Tabel 1 Töös kasutatud ja konstrueeritud tüved

Tüvi	Genotüüp	Päritolu
Töös kasutatud pärmi tüved		
W303α LEU2+ *rho*^{0}	*MATα ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 can1-100* mtDNA puudub	Valmistatud 2020 Tiina Sedmani poolt
HS a1328 *ori*2	*MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100* 1328 aluspaari *rho*$^{-}$ mtDNA sisaldab *ori*2 fragmenti	Valmistatud 2018 Astrid Salumäe poolt
N α1462 tRNA LEU2+	*MATα ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 can1-100 LEU2+* 1462 aluspaari *rho*$^{-}$ mtDNA sisaldab tRNA cys ja his fragmente	Valmistatud 2019 Mirjam Kärmase poolt
N α740	*MATα ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 can1-100* Mitte kodeeriv *rho*$^{-}$ mtDNA fragment 740 aluspaari	Valmistatud 2019 Mirjam Kärmase poolt
N α1809 ATP9	*MATα ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 can1-100* 1809 aluspaari *rho*$^{-}$ mtDNA fragment sisaldab ATP9 geeni	Valmistatud 2019 Mirjam Kärmase poolt

Töö käigus konstrueeritud pärmitüved	
W303a HIS3+ *rho*^{0}	*MATa ade2-1 ura3-1 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 HIS3+* mtDNA puudub
HS a1328 *ori*2 HIS3+	*MATa ade2-1 ura3-1 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 HIS3+* 1328 aluspaari mtDNA sisaldab *ori*2 fragmenti
N α1462 LEU2+ *irc3*Δ	N α1462 LEU2+ *irc3::KanMX4*
N α1462 LEU2+ *ste5*Δ	N α1462 LEU2+ *ste5::KanMX4*
N α1462 LEU2+ *hmi1*Δ	N α1462 LEU2+ *hmi1::KanMX4*
N α1462 LEU2+ *cce1*Δ	N α1462 LEU2+ *cce1::KanMX4*
N α1462 LEU2+ *rpo41*Δ	N α1462 LEU2+ *rpo41::HphMX6*
HS a1328 *ori*2 HIS3+ *irc3*Δ	HS a1328 *ori*2 HIS3+ *irc3::KanMX4*
HS a1328 *ori*2 HIS3+ *ste5*Δ	HS a1328 *ori*2 HIS3+ *ste5::KanMX4*
HS a1328 *ori*2 HIS3+ *hmi1*Δ	HS a1328 *ori*2 HIS3+ *hmi1::KanMX4*
HS a1328 *ori*2 HIS3+ *cce1*Δ	HS a1328 *ori*2 HIS3+ *cce1::KanMX4*
HS a1328 *ori*2 HIS3+ *rpo41*Δ	HS a1328 *ori*2 HIS3+ *rpo41::HphMX6*

2.2.2 Söötmed

Pärmide kasvatamiseks kasutati standardsöötmeid (Sherman, 1991). Pärmi tüvesid kasvatati mitte-selektiivselt YPD (*yeast extract peptone dextrose*) vedelsöötmes või agariga tardsöötmel (1% pärmiekstrakt, 2% peptoon, 2% glükoos; tardsöötme saamiseks lisati 1,7% agarit). Selektiivsöötmete saamiseks lisati YPD söötmele antibiootikume: G418 (genetitsiin) (0,35 mg/ml) või Hph (hügromütsiin B) (300 µg/ml). Selektiivsete aminohapetega söötme jaoks kasutati SC (Synthetic complete) söödet (0,67% pärmi lämmastikalus (ilma aminohapeteta), 0,2% aminohapete ja nukleosiidide segu (välja jäetud histidiin või leutsiin), 2% glükoos, 1,7% agar).

2.2.3 PCR reaktsioonisegud, meetodid ja geelid

Deletsiooni kontrolliks kasutati PCR segu, mis koosnes 1x puhvrist (75 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM $(NH_4)_2SO_4$; 0,1% Tween 20), 0,2 mM dNTP, 2 mM $MgCl_2$, 0,5 pmol edaspidist ja 0,5 pmol

tagasivaatavast praimerist, 2 U-st Taq DNA polümeraasist, matriitsina 3 µl puhastatud pärmi DNA-d(peatükk 2.2.5) ning mahti viidi 20 µl-ni Milli Q H_2O-ga (edaspidi MQ).

Ristamise koloonia PCR läbiviimiseks kasutati sama reaktsioonisegu järgmiste muudatustega: 1) matriitsina kasutati 10 minutit 37 °C juures 5 µl zümolaasis (0,5 mg/ml) inkubeeritud pärmi kolooniat; 2) 1 pmol kumbagi α1462 probe ja ORI IN praimeri paari. Produkte kontrolliti 1,5%-lisel agaroosgeelil.

Lisaks katsetati optimeerimisel erinevaid DNA eraldusmeetodeid. Prooviti kahte kõige vähem töömahukamat meetodit: kolooniat suspendeeriti 10 µl-s MQ-s ning keedeti 95 °C 10 minutit; kolooniat suspendeeriti 10 µl-s MQ-s ning keedeti 2 minutit mikrolaineahjus, mõlemal juhul kanti 5 µl supernatanti 20 µl PCR reaktsioonisegusse (Mirhendi *et al*., 2007). Samuti prooviti kolooniat inkubeerida 10 minutit 95 °C juures 20 µl-s 20 mM NaOH lahuses ja koloonia inkubeerimist 4 minutit 0,2% SDS-s 95 °C juures, mõlemal juhul tsentrifuugiti rakud põhja ning 1 µl supernatanti kanti PCR reaktsioonisegusse (Packeiser *et al*., 2013; Ruiz-Gaitán *et al*., 2018).

Töös kasutatud deleteeritava geeniga homoloogiliselt rekombineeruvad integratsioonifragmendid olid eelnevalt valmistatud juhendaja poolt PCR-ga pFa6a HphMX6 ja pFa6a KanMX4 plasmiididelt (*EuroScarf)* ning selleks kasutatud praimerid on välja toodud koos teiste selles töös kasutatud praimeritega lisas 1.

PCR programmid (*Biometra Thermocycler T1*): algne denaturatsioon 95 °C 3 minutit ja 30 sekundit. Denaturatsioon 95 °C 30 sekundit. Praimerite seondumise temperatuur 30 sekundi jooksul ning elongatsiooni aeg 72 °C juures iga PCR jaoks on välja toodud vastavate praimerite paaride juures lisas 1.

Kõiki PCR produkte kontrolliti 0,8%-lise agaroosgeeliga (0,8 g agaroosi 100 ml 1xTAE puhvri kohta (40 mM Tris, 20 mM etaanhape, 1 mM EDTA), etiidiumbromiid (0,5 µg/ml)) elektroforeesiga kui pole öeldud teisiti. Geelid pildistati *Uvitec Cambridge Firereader V10*-ga.

2.2.4 Pärmi tüvede tegemine LiOAc transformatsiooniga

Pagaripärmi tüvede valmistamiseks kasutati modifitseeritud liitium atsetaadi meetodit (Rose *et al*., 1990).

Töö käigus viidi läbi kahte eri sorti transformatsiooni. Esimese puhul funktsionaalse HIS3 geeni tagasiviimiseks HS a1328 *ori2* tüvesse kasutati HIS3+ geeni fragmenti, mis saadi pUC19 HIS3+ plasmiidilt XbaI ja SacI restriktaasidega lõigates. Teine transformatsioon oli N α1462 tRNA

LEU2+ (edaspidi N α1462) ja HS a1328 *ori2* HIS3+ (edaspidi HS a1328) tüvedesse *hmi1Δ, irc3Δ, cce1Δ, rpo41Δ, ste5Δ* deletsioonide sisse viimiseks.

Iga transformatsiooni jaoks kasvatati 15 ml vastavat eelkultuuri YPD söötmes 30 °C juures loksutil tiheduseni OD_{600} 0,4-0,5. Kultuuri tsentrifuugiti siin ja edaspidi 3 minutit 1600 g juures *Hettich Universal* R32R (rootor 1617 *Swing-out*) tsentrifuugis. Rakke pesti MQ-ga ja tsentrifuugiti. Seejärel resuspendeeriti rakud 1x LiOAc/TE (0,1 M LiOAc; 10 mM Tris-HCl (pH 8); 1 mM EDTA) lahuses ja tsentrifuugimist korrati 1 minut. Supernatant aspireeriti ja rakke inkubeeriti 20 minutit 30 °C juures 50 µl-s 1x LiOAc/TE-s. Segule lisati 100 µg kandja DNA-d (lõhe spermi DNA), mida oli eelnevalt 5 minutit 95 °C juures denatureeritud, ja transformeeritavat fragmenti 1µg, segu inkubeeriti 20 minutit 30 °C. Lisati PEG-LiOAc/TE (800 µl 50% polüetüleenglükooli (PEG) (50g PEG4000,100 ml MQ-s ja autoklaavitud); 0,1 ml 10xLiOAc/TE; 0,1 ml MQ) lõppkontsentratsiooniga 33% (w/v), segu inkubeeriti 30 °C juures 45 minutit. DMSO-t (dimetüül sulfoksiid) lisati lõppkontsentratsiooniga 8,8% ja inkubeeriti 10 minutit 42 °C juures. Tsentrifuugis (*Eppendorf MiniSpin*) koguti rakud kokku 918 g juures 1 minuti jooksul ning supernatant eemaldati.

HIS3+ tüve tegemisel suspendeeriti rakud 100 µl MQ-s ning plaaditi välja SC -His tardsöötmele. Deletsiooni tüvede tegemisel kasvatati rakke enne väljakülvi 8 tundi YPD-s ning rakud plaaditi välja selektiivsele YPD+G418 või YPD+hph tardsöötme tassile.

2.2.5 LiOAc kiirpuhastuse meetod

DNA puhastamiseks rakkudest kasutati LiOAc kiirpuhastuse protokolli (Lõoke *et al.*, 2011). ~8 kolooniat suspendeeriti 100 µl-s 200 mM LiOAc/1% SDS-i lahuses ja inkubeeriti 70 °C juures 10 minutit. Suspensioonile lisati 3 mahtu 96% etanooli ja sadestati 2 minutit. Rakud tsentrifuugiti põhja 3 minutit 12045 g (*Eppendorf MiniSpin*) ning supernatant eemaldati. Rakke pesti 500 µl 70% etanooliga ja seejärel lahustati 100 µl $T_{10}E_{0,1}$-s (10 mM Tris-HCl (pH 8); 0,1 mM EDTA (pH 8)). PCR-i jaoks korrati tsentrifuugimist 1 minut ja kasutati 3 µl supernatanti.

2.2.6 DAPI värvimine

YPD tardsöötmel 30 °C juures kasvanud rakke pesti MQ-s ning rakud tsentrifuugiti põhja 687 g 1 minuti jooksul (*Eppendorf MiniSpin*). Rakke fikseeriti 1 ml-s 96% etanoolis 10 minutit -20 °C juures. Rakke tsentrifuugiti samadel tingimustel ja pesti kaks korda läbi 500 µl MQ-s. Rakke töödeldi 1 minut DAPI-ga lõppkontsentratsiooniga 0,5 µg/ml ja seejärel pesti rakke kaks korda MQ-ga. Rakud võeti üles 350 µl-s MQ-s ja 5 µl proovi kanti alusklaasile. Kuivanud proovile, lisati

fluorestsentsihajuvuse vähendamiseks 5 µl *antifade*'i (80% glütserool, 1mg/ml p-fenüleendiamiini PBSs). Proove analüüsiti fluorestsentsmikroskoobis (*Olympus BX61*) 100x suurendusega õliimmersioonis.

2.2.7 Pärmi totaalse DNA eraldamine

Totaalse DNA eraldamiseks pärmist kasutati kohandatud Methods in Yeast Genetics (Rose *et al*., 1990) kirjeldatud protokolli.

Üleöö YPD söötmes 30 °C juures kasvanud kultuur (4ml) tsentrifuugiti põhja 2040 g 4 °C juures 5 minutit (*Hettich Universal, Mikro 200R*), eemaldati sööde ning rakke suspendeeriti 1 ml MQ-s, tsentrifuugimist korrati 1 minut, MQ eemaldati ja rakkude kuiv mass kaaluti. Rakud võeti üles 0,5 ml-s 1 M sorbitooli; 10 mM Tris-Hcl (pH 8); 10 mM EDTA lahuses. Vastavalt saadud rakumassile lisati rakkudele zümolaasi 4 mg ühe 1 mg rakkude kohta ja inkubeeriti 30 minutit 37 °C juures. Rakud tsentrifuugiti põhja 12045 g juures 1 minuti jooksul (*Eppendorf MiniSpin*), supernatant eemaldati. Rakud suspendeeriti 500 µl 50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 20 mM EDTA lahuses ja lisati SDS-i lõppkontsentratsiooniga 1%, segu inkubeeriti 15 minutit 65 °C juures. Jahutatud proovidele lisati lõppkontsentratsiooniga 1,3 M kaaliumatsetaati ja segu inkubeeriti 40 minutit jääl. Suspensiooni tsentrifuugiti 5 minutit 16000 g 4°C juures (*Hettich Universal, Mikro 200R*). Üle viidud supernatandile lisati võrdne maht isopropanooli, sadestati 5 minutit toatemperatuuril ja seejärel Tsentrifuugiti pööretel 12045 g 5 minutit. Sadet pesti 300 µl 80% etanooliga, tsentrifuugimist korrati ja etanool eemaldati. Sade suspendeeriti 100 µl $T_{10}E_1$ RNaasA-s (10 mM Tris-HCl (pH 8); 0,1 mM EDTA; 20 µg/ml RNaas A) ning inkubeeriti 65 °C juures 30 minutit. Inkubeeritud segule lisati 100 µl Proteinaas K puhvrit (1% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA) ja 20 µg Proteinaas K ensüümi (*Thermo* Scientific) ning inkubeeriti 55 °C juures 30 minutit. Segule lisati ½ mahtu fenool/kloroformi (pH 7,5), inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril ja segu tsentrifuugiti 12045 g 1 minut (*Eppendorf MiniSpin*). Vesifaasile lisati NaOAc lõppkontsentratsiooniga 300 mM ja 2,5 mahtu 96% etanooli, sadestati -20 °C juures 15 minutit. Sademe saamiseks tsentrifuugiti segu 5 minutit 12045 g, etanool eemaldati ning pesu korrati 80% etanooliga. Sade lahustati $T_{10}E_{0,1}$-s.

2.2.8 *Southern blot*

Southern blot'i tegemiseks lõigati HS a1328 ja N α1462 deletsiooni tüvede genoomsed DNA-d vastavalt EcoRV ja ApaI ensüümiga. Restriktsiooniks kasutati *Thermo Scientific* ensüüme ja vastavaid puhvreid, jälgides tootja ette antud juhendeid. Restriktsioon kestis 2 tundi ja 15 minutit

37 °C. Lõigatud DNA-le lisati lõppkontsentratsiooniga 1x TAE laadimispuhvrit (10 mM Tris-HCl pH7,5; 5 mM EDTA; 0,25% BFB; 50% glütserool) ning lahutati 0,7% agaroosgeelil, lisatud 12 µg etiidiumbromiidi. Geelelektroforees viidi läbi pingel 3V/cm.

DNA kandmiseks agaroosgeelilt nailonfiltrile kasutati *Southern blot* meetodit. Geeli leotati 30 minutit SolA lahuses (0,5 M NaOH; 1,2 M NaCl, (pH ≥12)) ning 2 X 15 minutit SolB lahuses (1 M Tris; 1,5 M NaCl). DNA ülekandeks filtrile tehtud sild koosnes 10X SSC ülekandepuhvris (1,5 M NaCl; 150 mM $Na_3C_6H_5O_7$, (pH=7)) leotatud filterpaberist, 3 MM Whatman paberist, geelist, nailonfiltrist (*NY Laminated Membrane Filter*) ja pabersalvrättidest.

Ülekanne toimus 15 tundi ja seejärel DNA ristseoti filtrile 24 sekundi jooksul 0,12 J UV valgusega (*Herolab CL-1*). Filtritele tehti eelhübridisatsioon 30 ml *Church* puhvriga (1mM EDTA; 7% SDS; 0,5% BSA; 0,5M NaPO4 (pH 7,5)) 65 °C juures 30 minutit. DNA hübridiseeriti radioaktiivse hübridisatsiooniprooviga 30 ml-s *Church* puhvris 8 tundi 65 °C juures. Filtritelt eemaldati mittespetsiifiline radioaktiivne sidumine pesupuhvriga (1mM EDTA; 5% SDS; 40 mM NaPO4 pH 7,5) 2 x 15 minutit 65 °C juures. Filtreid eksponeeriti kassetile *Amesham Biosciences Storage Phosphor Screen* 1 päev. DNA signaalid skaneeriti arvutisse *Typhoon TRIO Phosphoimager* masinaga.

Radioaktiivsete hübridisatsiooniproovidena kasutati vastavalt tüvedele α1462 probe up, α1462 probe down rev või ORI 3 IN ja ORI 5 IN praimerite produkte. Märgistamiseks kasutati radioaktiivse fosforiga (32P) α dCTP nukleotiide. Hübridiseerimise ja filtrite skanneerimise viis läbi Tiina Sedman.

2.2.9 Hüpersupressiivse ja neutraalse tüve ristamine

Ristatavad tüved võeti säilituskultuurist üles SC -Leu ja SC -His tassidele ja kasvatati 2,5 päeva 30 °C juures. Ristatavate tüvede eelkultuure kasvatati 8 tundi, 3 ml YPD-s 30 °C juures loksutades 180 pööret minutis. 1 ml YPD söötmele lisati kumbagi eelkultuuri 0,5 ml ja ristati 2 tundi samadel tingimustel. Ristamiskultuurid tsentrifuugiti kokku 269 g 5 minuti jooksul (*Eppendorf MiniSpin*). Rakke hoiti 15 minutit toatemperatuuril, lisati 0,5 ml YPD-d ja korrati inkubeerimist. Ristatud kultuurile tehti 8000 kordne lahjendus MQ-s ning 100 µl lahjendust külvati SC -His -Leu tassidele.

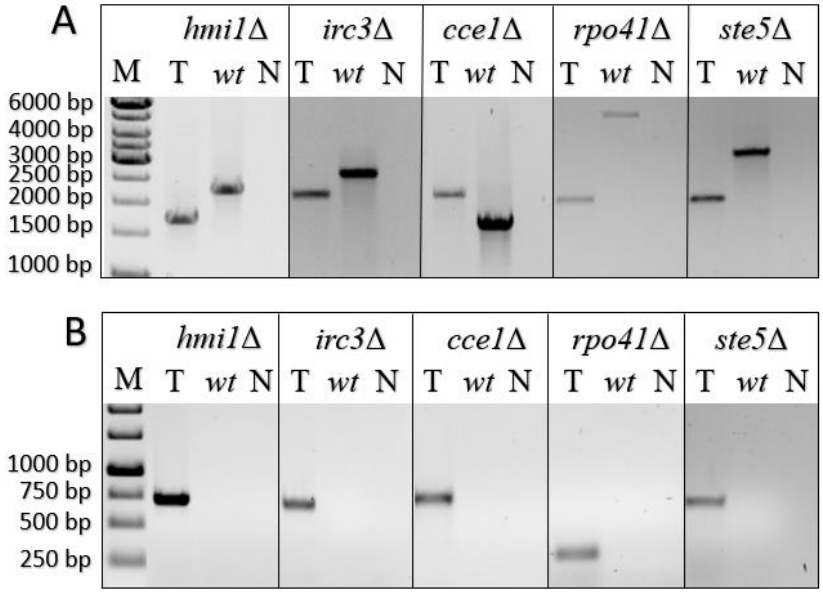
2.3 Tulemused

2.3.1 Hmi1, Irc3, Cce1, Rpo41 ja Ste5 deletsiooni kasseti transformatsioon *S. cerevisiae* rakkudesse

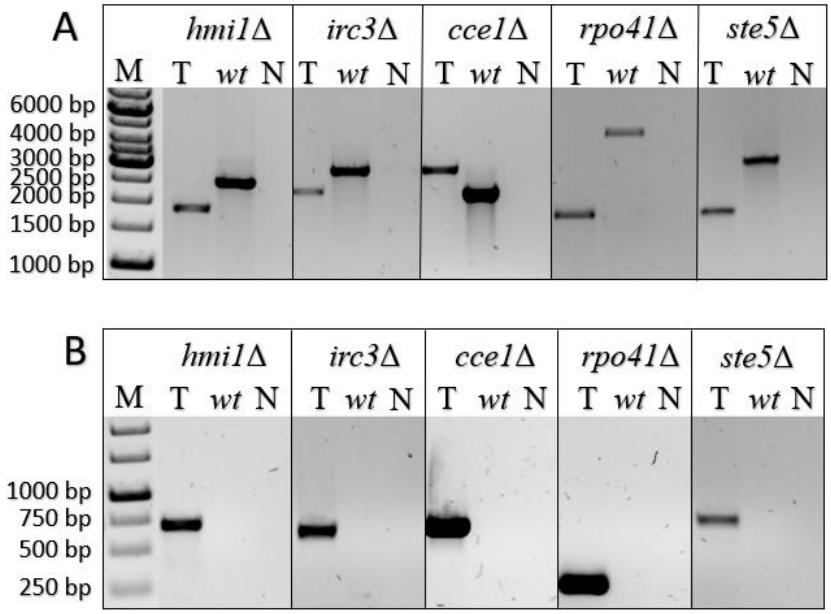
Käesoleva töö raames kasutati ristamiskatseteks W303 tüvel baseeruvat neutraalset tüve N α1462 ja hüpersupressiivset tüve HS a1328-t. Tänu mutatsioonidele *ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112* ei oma laborites laialdaselt kasutatav tüvi W303 viite funktsionaalset aminohappe sünteesiraja geeni, mida saab seetõttu kasutada markeritena erinevate tüvede selekteerimisel. Katsete käigus kasutati varasemalt konstrueeritud N α1462 tüve, milles oli taastatud leutsiini kodeeriv LEU2 geen. Antud töö käigus konstrueeriti lisaks hüpersupressiivne tüvi HS a1328, millel taastati histidiini HIS3 geeni funktsioon (kirjeldatud peatükis 2.2.4).

Uurimaks Hmi1, Irc3, Cce1 ja Rpo41 valkude mõju hüpersupressiivse genoomi pärandumisele oli esmalt vajalik neid valke kodeerivate geenide deleteerimine HS a1328 ja N α1462 tüvedest. HMI1, IRC3, CCE1, STE5 geeni deleteerimiseks HS a1328 ja N α1462 tüvedest kasutati G418 (genetitsiin) antibiootikumiresistentsust kodeerivat KanMX4 kassetti. Antud töös tehtud deletsiooni tüvesid on hiljem planeeritud kasutada ka edasisteks katseteks, mille käigus valmivad *rpo41Δ* kaksikmutandid. Selleks, et kaksikmutantides oleks võimalik selekteerida mõlemat deletsiooni, kasutati RPO41 deleteerimiseks hügromütsiin B resistentsust kodeerivat HphMX6 kassetti. Transformatsiooni kontrolliks kasutati paardumisspetsiifilist tugivalku kodeerivat STE5 geeni, mille deletsioon üldise- ja mikroobibiokeemia labori varasemate katsete põhjal ei mõjuta tüvede respiratsiooni ja mtDNA stabiilsust.

Transformantidele tehti kontrolliks PCR kahe erineva praimeri paariga. Üks praimerite paar paljundas vastavat geeni ning deletsiooni tulemusena muutus amplikoni suurus. Lisaks kasutati antibiootikumiresistentsust kodeerivate geenide spetsiifilisi praimerite paare kontrollimaks transformantidel Kan- või Hph-kasseti olemasolu (meetod peatükis 2.2.3). PCR tulemuste põhjal oli näha (joonised 3 ja 4), et kontrollitud tüved sisaldasid deletsiooni õiges asukohas, mis tähendab, et tegu oli deletsioone sisaldavate mutantidega.



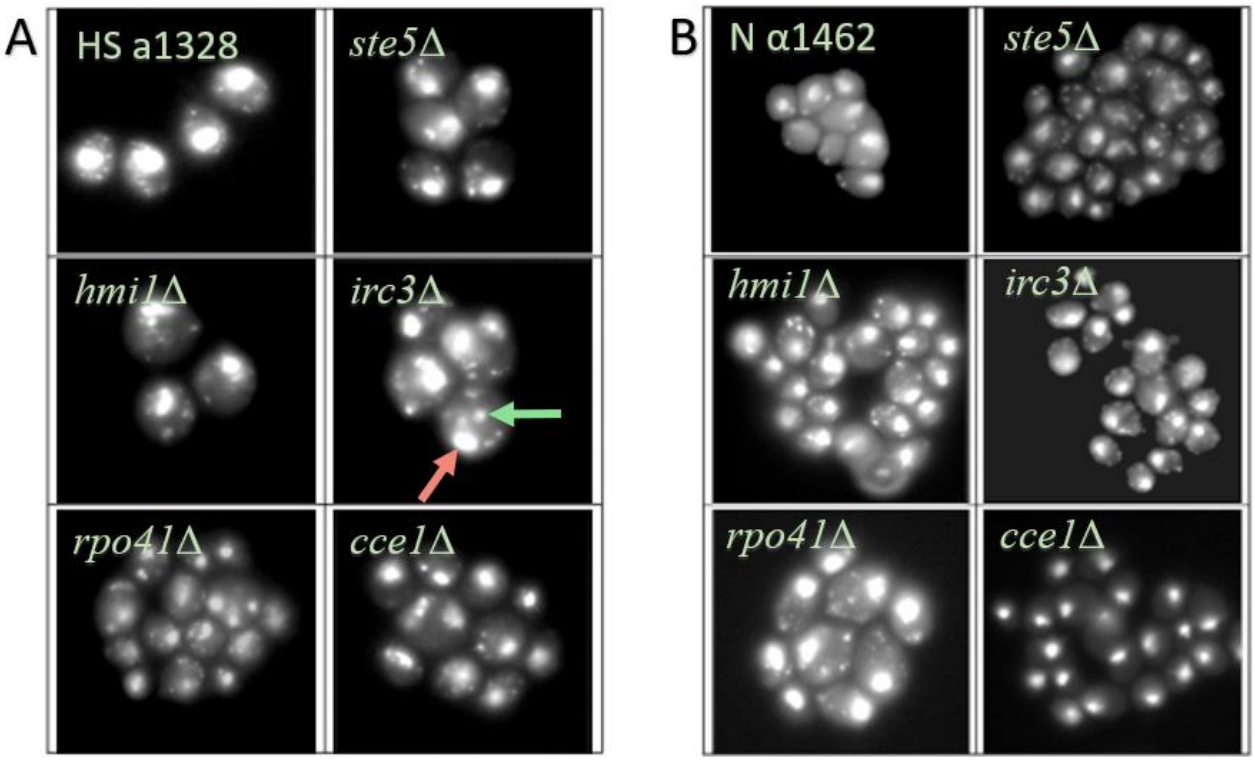
Joonis 3. HS a1328 deletsiooni tüvede transformantide antibiootikumiresistentsuse geeni kontroll. A paneel: antibiootikumiresistentsust kodeeriva geeni integreerumise kontroll HS a1328 deletsiooni tüvedes. B: KanMX4-kasseti olemasolu kontroll *hmi1Δ, irc3Δ, cce1Δ* ja *ste5Δ* tüvedel ning HphMX6-kasseti olemasolu kontroll *rpo41Δ* tüvel. T tähistab transformanti. *wt* - kontrollina kasutatud deletsioonita metsiktüüpi. N - PCR reaktsiooni negatiivne kontroll, mis ei sisalda DNA-d. M - *Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder* marker.



Joonis 4. N α1462 deletsiooni tüvede transformantide antibiootikumiresistentsuse geeni kontroll. A paneel: antibiootikumiresistentsust kodeeriva geeni integreerumise kontroll α1462 deletsiooni tüvedes kasutades geeni amplifitseerivaid praimereid. B: KanMX4-kasseti olemasolu kontroll *hmi1Δ, irc3Δ, cce1Δ* ja *ste5Δ* tüvedel ning HphMX6-kasseti olemasolu kontroll *rpo41Δ* tüvel. T tähistab transformanti. *wt* - kontrollina kasutatud deletsioonita metsiktüüpi. N - PCR reaktsiooni negatiivne kontroll, mis ei sisalda DNA-d. M - *Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder* marker.

2.3.2 HS a1328 ja N α1462 deletsiooni tüvede stabiilsuse kontroll DAPI meetodil

Kontrollimaks, kas saadud deletsiooni tüved sisaldavad mtDNA-d, värviti rakke 4',6-diamino-2-fenüülindool (DAPI) värviga (meetod kirjeldatud peatükis 2.2.6), mis seondub DNA-ga ja fluorestseerub UV-valguse käes siniselt. Lisaks tuuma genoomile värvub ka mitokondriaalne DNA ja seetõttu on võimalik eristada, kas rakkudes on mtDNA säilinud nukleoididena või on mtDNA ära kadunud (D. H. Williamson & Fennell, 1975). Selleks, et hinnata iga deletsiooni tüve mtDNA säilimist pikema aja jooksul värviti kaheksa koloonia rakke esimesel nädalal ja viie nädala möödudes esimese DAPI värvimise hetkest.



Joonis 5. Deletsiooni tüvede N α1462 ja HS a1328 värvimine DAPI meetodil määramaks mtDNA olemasolu. A. HS a1328 tüve ja selle ste5Δ, hmi1Δ, irc3Δ, rpo41Δ ja cce1Δ deletsiooni tüvede DAPI värvimise näidistulemused. B. N α1462 tüve ja selle ste5Δ, hmi1Δ, irc3Δ, rpo41Δ ja cce1Δ deletsiooni tüvede DAPI värvimise näidistulemused. Oranž nool tähistab tuuma ja roheline nool tähistab mtDNA nukleoidi.

DAPI meetodil selgus, et HS a1328 *rpo41Δ* tüves oli esimesel ja viiendal nädalal üks kolooniatest *rho*^{0}, kõik ülejäänud HS a1328 deletsiooni tüved omasid mitokondriaalset DNA-d ka peale viite nädalat. Neutraalses N α1462 tüves sisaldasid mtDNA-d kõik N α1462 *hmi1Δ* ja N α1462 *ste5Δ* kolooniad. Tüve N α1462 *irc3Δ* puhul oli üks kolooniatest kaotanud oma mtDNA ning viie nädala möödudes oli *rho*^{0} kolooniaid kolm. N α1462 *rpo41Δ* tüves olid nii esimesel kui ka viiendal nädalal

kolm kolooniat *rho*^{0}. Ükski N α1462 *cce1Δ* koloonia ei omanud DAPI-ga detekteeritav mtDNA-d (joonis 5).

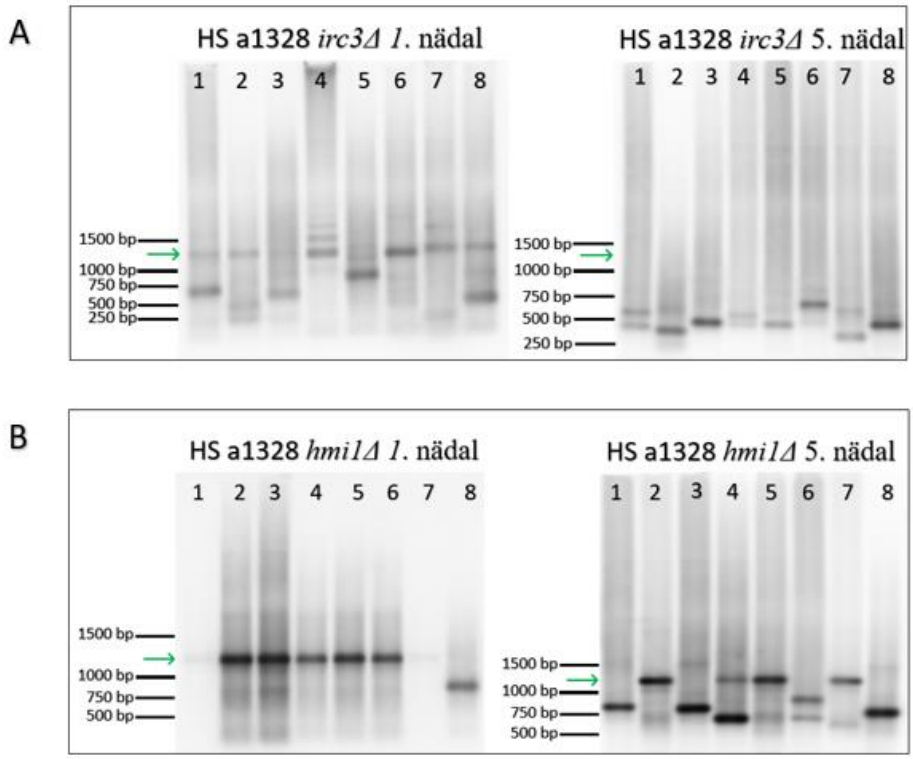
2.3.3 HS a1328 ja N α1462 deletsiooni tüvede stabiilsuse kontroll *Southern blot* meetodiga

DAPI meetodil on võimalik hinnata ainult mtDNA olemasolu, aga mitte selle suurust ja fragmenteerumist, seetõttu kontrolliti deletsiooni tüvede stabiilsust *Southern blot* meetodil (meetod peatükis 2.2.8) uurimaks, kas mtDNA fragmendi suurus säilib pikema aja jooksul või mitte. Selleks kontrolliti DAPI-ga värvitud kolooniaid ka *Southern* blot meetodiga.

Southern blot meetod näitas, et stabiilsed olid kõik kaheksa kontrollitud proovi N α1462 *hmi1Δ* ja N α1462 *ste5Δ* tüvedest ja kõik kaheksa proovi HS a1328 *cce1Δ*, HS a1328 *rpo41Δ* ja HS a1328 *ste5Δ* tüvedest (lisa 2a). See tähendab, et nendes tüvedes ei olnud toimunud fragmenteerumist ja mtDNA on stabiilne, suudab säilitada oma suurust.

Southern blot'i tulemused näitasid, et pärast viite nädalat olid tüvede HS a1328 *hmi1Δ* ja HS a1328 *irc3Δ* kõik 8 proovi tugevalt fragmenteerunud ning kolm N α1462 *rpo41Δ* proovidest ja kaks N α1462 *irc3Δ* proovidest olid *rho*^{0} (lisa 2b). Selleks, et kontrollida, kas HS a1328 *hmi1Δ* ja HS a1328 *irc3Δ* tüvede fragmenteerumine toimus viie nädala jooksul ning tegu on ajas süveneva protsessiga või oli see fragmenteerunud juba peale transformatsiooni, eraldati nendel tüvedel ka 1. nädalal kasvatatud rakkudest totaalne DNA ja tehti uus *Southern blot*. Samuti tehti uus *Southern blot* N α1462 *rpo41Δ* ja N α1462 *irc3Δ* tüvedele jälgimaks *rho*^{0} kolooniate osakaalude erinevust 0. ja 5. nädalal ning võrdlemaks seda DAPI värvimise tulemusega.

Joonisel 6 on näha esimese nädala *Southern blot*, mis näitas, et HS a1328 *irc3Δ* oli fragmenteerunud juba tüve säilituskultuurist üles võtmisel, kuid viie nädala jooksul oli fragmenteerumine süvenenud. Kuuest proovist, mille totaalse DNA puhastus õnnestus, oli üks fragmenteerunud juba alguses ning teised fragmenteerusid viie nädala jooksul, mis tähendab, et nii HS a1328 *irc3Δ* kui ka HS a1328 *hmi1Δ* mtDNA fragment on ebastabiilne. N α1462 *rpo41Δ* ja N α1462 *irc3Δ* tüvede *Southern blot* tulemused korreleerusid DAPI värvimise tulemusega (lisa 2b).



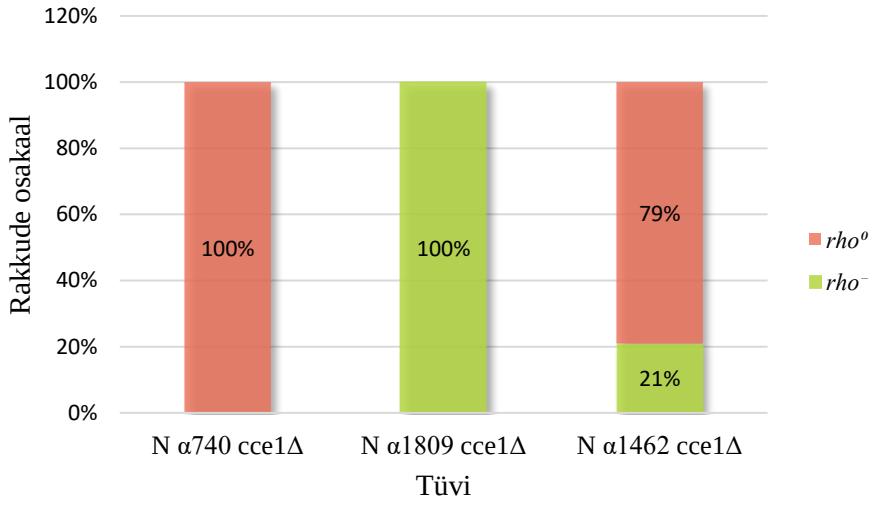
Joonis 6. *Southern blot* meetodil detekteeritud EcoRV-ga restrikteeritud mtDNA HS a1328 *irc3Δ* ja HS a1328 *hmi1Δ* tüvedest 1. ja 5. nädalal. A: HS a1328 *irc3Δ* fragmenteerumise süvenemine viie nädala jooksul. B: HS a1328 *hmi1Δ* fragmenteerumine viie nädala jooksul. Rajad 1-8 tähistavad erinevaid proove. Roheline nool tähistab mtDNA täissuuruses (1328 aluspaari) fragmenti. Markerina kasutati *Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder*.

Kuigi saadud HS a1328 *irc3Δ* ja HS a1328 *hmi1Δ* mtDNA-d fragmenteerusid, hübridiseerus *Southern blot*'il *ori*2 proov, mille tegemiseks kasutati samu ORI praimereid, mida edaspidi kasutatakse ristamiskatsete PCR-s. Seetõttu oli võimalik analüüsida ka neid tüvesid koloonia-PCR meetodiga ristamiskatsetes.

2.3.4 Cce1 deletsiooni mõju neutraalsete *rho*$^-$ rakkude mitokondriaalse DNA stabiilsusele

Tulenevalt eelnevalt saadud DAPI värvimise tulemustest, kus neutraalne N α1462 tüvi kaotas pärast CCE1 geeni deleteerimist oma mtDNA, viidi läbi katse uurimaks, kas tegu on N α1462 tüve spetsiifilise muutusega või põhjustab CCE1 geeni deleteerimine ka teistes neutraalsetes tüvedes mtDNA kadu. Selleks korrati transformatsiooni ja DAPI värvimist N α740 (sisaldab mittekodeerivat ala), N α1809 ATP9 (koosneb ATP9 geeni sisaldavatest fragmentide kordustest) ja N α1462 tRNA (sisaldab tRNA-de tCys ja tHis DNA järjestusi) tüvedega. DAPI värvimisest selgus, et α1809 *cce1Δ* tüves oli kõikidel kontrollitud kolooniatel (*n*=8) mtDNA olemas, N α740

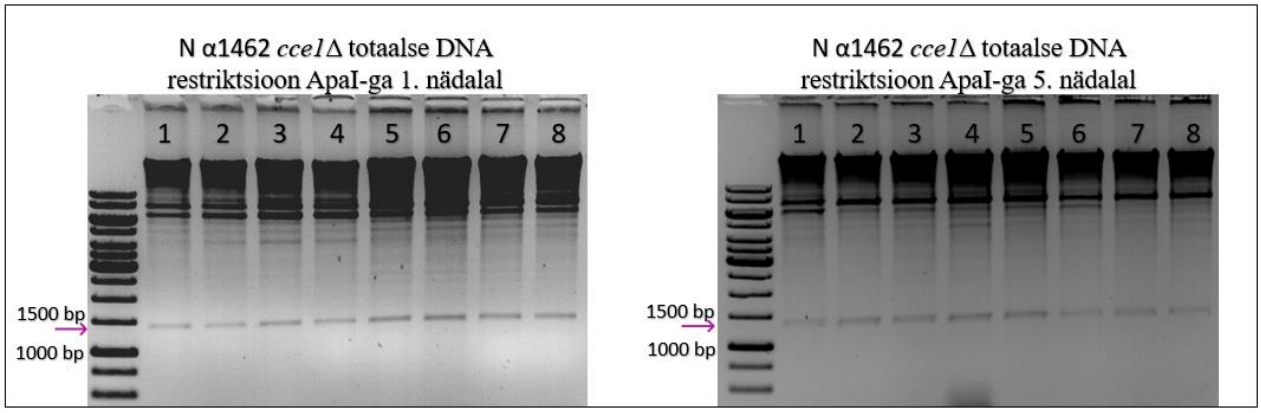
cce1Δ tüvel olid kõik kolooniad *rho*^{0} (*n*=7). N α1462 tüve puhul oli 24-st kolooniast viiel mtDNA olemas ning ülejäänud 19 kolooniat olid mtDNA kaotanud (joonis 7).



Joonis 7. MtDNA sisalduse relatiivne väärtus vastusena CCE1 geeni deletsioonidele neutraalsetes *rho*$^-$ tüvedes. MtDNA-d sisaldavate ja mittesisaldavate kolooniate relatiivne arv N α740 *cce1Δ*, N α1809 *cce1Δ* ja N α1462 *cce1Δ* tüvedes määratuna DAPI värvimise meetodil. *Rho*^{0} kolooniad on tähistatud oranžiga ja *rho*$^-$ kolooniad rohelisega.

Kinnitamaks mtDNA olemasolu viiel N α1462 *cce1Δ* koloonial, eraldati nendest tüvedest totaalne DNA, mis restrikteeriti ApaI ensüümiga. Viiest restrikteeritud DNA-st neljal oli näha mtDNA olemasolu ning nendest neljast valiti edasi töötamiseks kaks tüve, millel analüüsiti kummastki kaheksa koloonia mtDNA säilimist viie nädala jooksul DAPI meetodil. Viiendal nädalal tehtud DAPI värvimisel ei detekteeritud mtDNA olemasolu üheski koloonias. Viiendal tüvel totaalse DNA eraldamine ebaõnnestus ja seetõttu on võimatu teha kindlaid järeldusi selle tüve mtDNA olemasolu kohta.

DAPI värvimisest saadud tulemuste kinnitamiseks tehtud totaalse DNA restriktsiooni geeli pildil olevad õrnad fragmendid näitasid aga vähese mtDNA olemasolu, mis tähendab, et mtDNA-d oli väga vähe, mistõttu polnud seda võimalik DAPI värvimisel näha. DAPI meetodi ja restriktsiooni tulemustest järeldub, et *cce1Δ* ei põhjusta siiski N α1462 tüves täielikku mtDNA kadu, kuid põhjustab selle koguse silmanähtavat vähenemist (joonis 8).



Joonis 8. N α1462 *cce1Δ* tüvede mtDNA olemasolu kontroll totaalse DNA restriktsiooniga. N α1462 *cce1Δ* tüve kaheksa koloonia ApaI-ga restrikteeritud totaalne DNA 1. ja 5. nädalal. Lilla noolega on näidatud oodatud fragmendi suurus (1462 bp). Rajad 1-8 *tähistavad* erinevaid *proove*. Markerina kasutatud *Thermo Scientific Generuler 1 kb Ladder.*

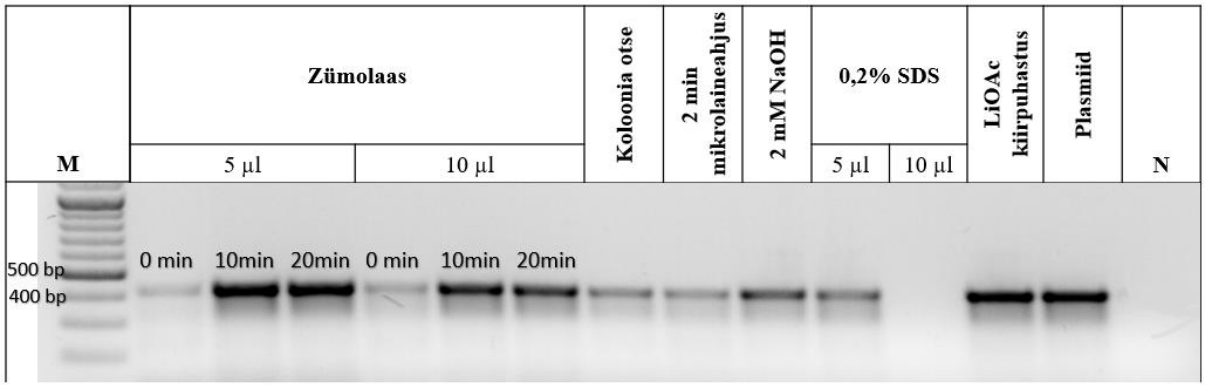
2.3.5 Hüpersuppressiivse genoomi pärandumine neutraalse tüvega ristamisel

2.3.5.1 Koloonia-PCR optimeerimine

Antud töö üheks eesmärgiks oli optimeerida koloonia-PCR, et katse oleks võimalikult efektiivne, kiire ja võimaldaks läbi testida statistiliselt olulises hulgas ristamisi. Varasema info põhjal valiti praimerite seondumise temperatuuriks 52 °C nii, et ühes reaktsioonis saaks kasutada N α1462 ja HS a1328 DNA spetsiifilisi praimereid – see vähendab läbiviidavate PCR reaktsioonide arvu poole võrra. Samuti optimeeriti tsüklite arvu sellisele piirile (30), kus PCR programm on võimalikult lühike, aga tekiks piisavalt produkti, mida on agaroosgeelil hästi näha.

Joonisel 9 on näha viite testitud DNA eraldusmeetodit, leidmaks, milline neist töötab kõige paremini ja on kõige optimaalsem. Kuna N α1462 tRNA fragment on suurem ja selle detekteerimine PCR-ga on HS a1328 *ori*2 fragmendist keerulisem, katsetati DNA eraldusmeetodeid N α1462 kolooniate peal α1462 probe up ja α1462 probe down rev praimeritega (lisa1). Eraldamismeetodi optimeerimine sisaldas zümolaasi töötlust erinevate zümolaasi kogustega ja inkubatsiooniajaga, samuti inkubeerimist 2 mM NaOH-s ja 0,2% SDS-s 95 °C juures (Amberg *et al*., 2006; Packeiser *et al*., 2013; Ruiz-Gaitán *et al*., 2018). Kõige kiirem ja vähem töömahukam variant oleks olnud otse koloonia suspendeerimine MQ-s (Mirhendi *et al*., 2007) või koloonia keetmine 2 minutit mikrolaineahjus, kuid need meetodid andsid kõige vähem produkti ja tulemused olid märkimisväärselt erinevad katsete vahel, mistõttu nende meetodite usaldusväärsus oli kaheldav. Kõiki DNA eraldusmeetodeid võrreldi meie laboris standartselt kasutatava LiOAc kiirpuhastusmeetodiga (Lõoke *et al*., 2011) ja PCR reaktsiooni kontrolliks kasutati plasmiidi.

Selgus, et kõige usaldusväärsem ja optimaalsem on zümolaasi töötlus, kus kolooniat inkubeeriti 5 µl-s zümolaasis 10 minutit 37 °C juures.



Joonis 9. DNA eraldusmeetodi optimeerimine. M tähistab markerit (*Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*). 1-6 radadel koloonia töötlus Zümolaasiga 37 °C juures 0, 10 või 20 minutit. 7. MQ-s suspendeeritud koloonia. 8. MQ-s suspendeeritud koloonia keedetud kaks minutit mikrolaineahjus. 9. 2 mM NaOH töötlus, millest 1 µl viidi PCR segusse. 10. koloonia töötlus 20 µl 0,2% SDS segus, millest 0,5 µl viidi PCR segusse. 11. koloonia töötlus 20 µl 0,2% SDS segus, millest 1 µl viidi PCR segusse. 12. LiOAc kiirpuhastus 13. Positiivne kontroll - pGem 5 α1462 plasmiid (10 ng). N tähistab negatiivset kontrolli – DNA puudus.

2.3.5.2 Geenide HMI1, IRC3, CCE1 ja RPO41 deletsioonide mõju mtDNA pärandumisele

Pärast koloonia-PCR optimeerimist sooritati katse uurimaks hüpersupressiivsuse pärandumist (meetod kirjeldatud peatükis 2.2.9).

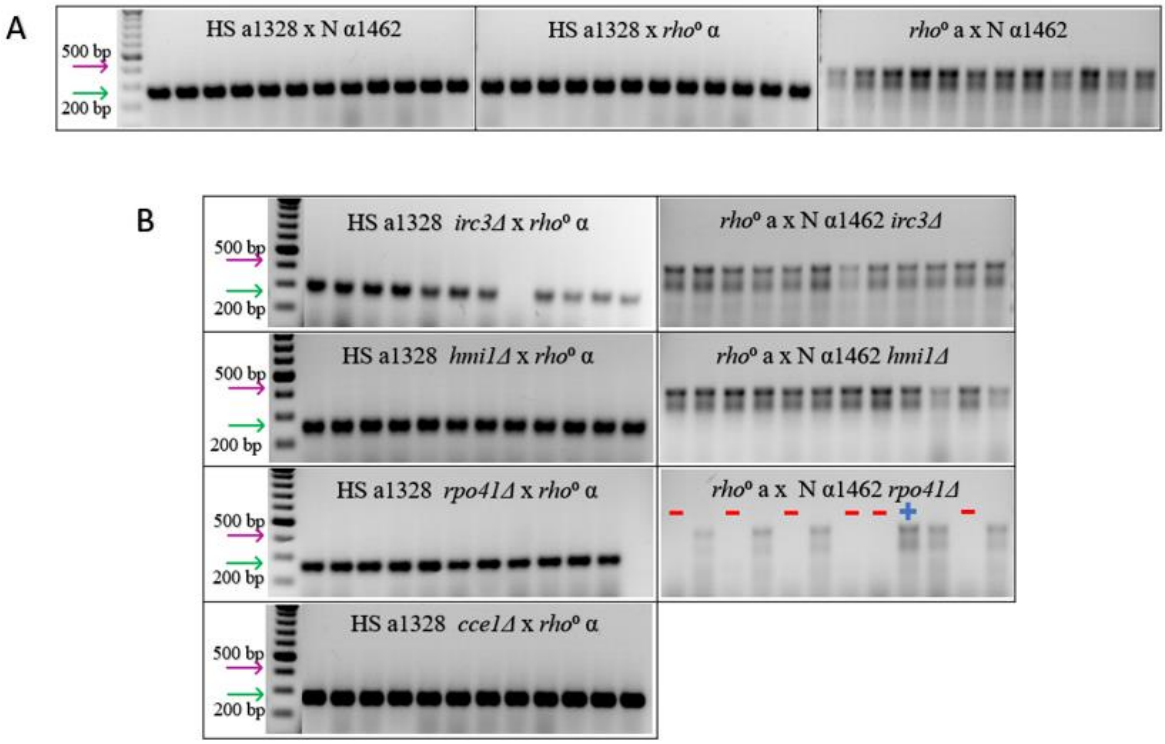
Kontrollimaks, et ristamisel ei toimu mtDNA kadu HS a1328 ja N α1462 tüvedes, ristati kõigepealt algseid *rho*$^-$ tüvesid omavahel ning vastavalt W303α LEU2+ *rho*^{0} (edaspidi *rho*^{0} α) ja W303a HIS3+ *rho*^{0} (edaspidi *rho*^{0} a) tüvedega. Lisaks ristati kõiki HS a1328 deletsiooni tüvesid N *rho*^{0} α tüvega ja kõiki N α1462 deletsiooni tüvesid *rho*^{0} a tüvega, et näha, kas mõni HMI1, IRC3, CCE1 ja RPO41 geenide deletsioonidest mõjutab mtDNA pärandumise protsessi. Kõikidest ristamisest kontrolliti 12 kolooniat, väljaarvatud HS a1328 *rpo41Δ* x *rho*^{0} α ristamisest, kus kasvas üles ainult 11 kolooniat.

Edasi pärandunud fragmendi nägemiseks oli vaja kolooniatele teha PCR: kui edasi oli pärandunud hüpersupressiivne HS a1328 *ori*2 fragmenti sisaldav mtDNA, oli PCR-produkt 266 nt suurune ning neutraalse N α1462 tRNA fragmenti sisaldava mtDNA edasipärandumisel oli produkt 436 nt suurune.

N α1462 tRNA fragmendi PCR-ga esines probleeme nagu seda on näha jooniselt 10. Nimelt tekkis lisaks 436 nukleotiidi pikkusele produktile veel üks mittespetsiifiline väiksem produkt ehk esines

ebaspetsiifikat, mis optimeerimise ajal ei olnud märgatav. Kuna HS a1328 *ori*2 fragmenti sisaldav mtDNA ja kontrollid tulid välja, siis viitab see spetsiifiliselt α1462 probe up ja α1462 probe down rev praimerite probleemile ning ristamisel saadud diploidsete kolooniate testimiseks see praimerite paar ei sobinud.

Metsiktüüpide omavahelisel ja *rho*^{0} tüvega ristamisel ning *hmi1Δ* ja *cce1Δ* kontrollristamistel *rho*^{0} tüvega pärandus alati edasi oodatud fragment ning sellega välistati ristamisprotsessiga HMI1 ja CCE1 geenide deletsioonist põhjustatud võimalik mtDNA kadumine(joonis 10).



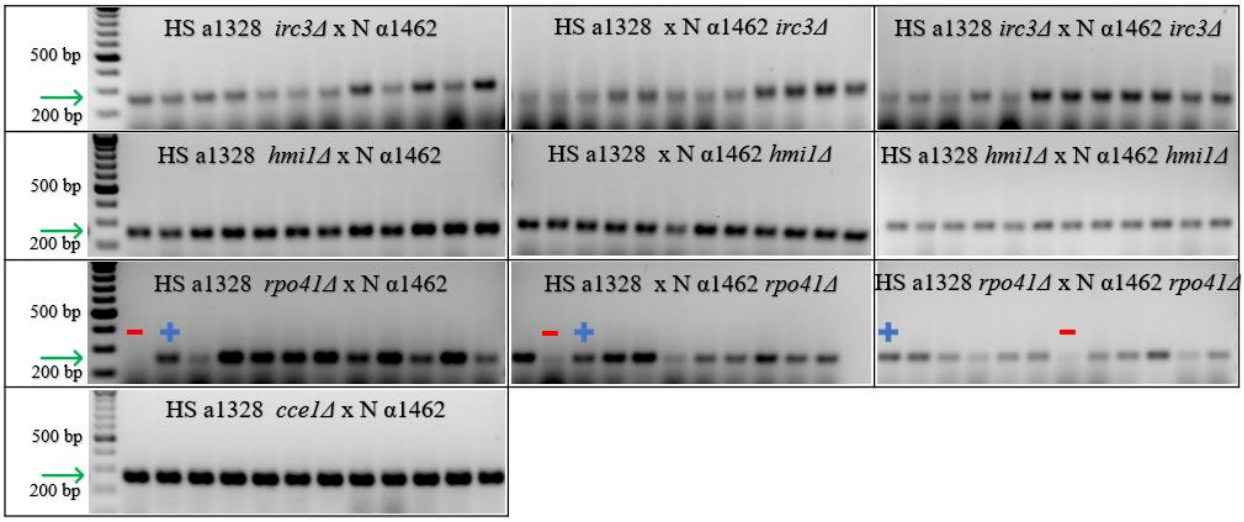
Joonis 10. Geenide HMI1, IRC3, CCE1 ja RPO41 deletsioonide mõju mtDNA pärandumisele. A. Metsiktüüpi tüvede ristamine omavahel ja *rho*^{0} tüvedega välistamaks ristamisest tulenevat mtDNA juhuslikku kadu. B. IRC3, HMI1, RPO41 ja CCE1 geenide deletsiooni sisaldavate tüvede ristamised *rho*^{0} tüvega vaatamaks deletsioonide mõju mtDNA pärandumisele. Lilla noolega on tähistatud N tRNA fragmendi oodatud suurus (436 bp). Rohelise noolega on tähistatud HS *ori*2 fragmendi oodatud suurus (1328 bp). Punase miinusega on tähistatud mitte produkti andvad kolooniad, mida kontrolliti totaalse DNA restriktsiooniga. Sinise plussiga on tähistatud kolooniat, mida kasutati restriktsiooni kontrolliks. Iga rada on eraldi ristamiskoloonia. Markerina kasutati *Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*

Irc3Δ täheldati mtDNA teatud ebastabiilsus, kuna antud ristamise kontrolliks kasutatud HS a1328 *irc3Δ* x *rho*^{0} α järglaskonnas sisaldas *ori*2 fragmenti 11 kolooniat ning üks koloonia oli kaotanud mtDNA ning muutunud *rho*^{0}-ks (joonis 10), mida tõestas ka ristamistüvede totaalse DNA restriktsioon.

rho^0 a x N α1462 *rpo41Δ* ristamisel oli PCR tulemustest näha (joonis 10), et 50% järglastest ehk kuuel koloonial oli PCR-i produkt puudu. Kontrollimaks, kas see on tõesti nii, viidi läbi produktita kolooniate ja ühe produktiga kontrollkoloonia totaalse DNA restriktsioon, mille käigus selgus, et kõik PCR-produkti mitte andvad kolooniad sisaldasid siiski mtDNA-d, kuid restriktsioonigeeli pildil oli nende kolooniate mtDNA fragment oluliselt nõrgem kui kontrollina kasutatud *rho*$^-$ koloonia oma, mis tõenäoliselt tähendas, et mtDNA kogus oli märgatavalt väiksem ning PCR-ga detekteerimiseks ebapiisav (lisa 3).

2.3.5.3 Ristamiskatsed hüpersupressiivsuse pärandumise uurimiseks

Lisaks viidi ristamised läbi Irc3, Hmi1, Cce1 ja Rpo41 valke kodeerivate geenide deletsioone sisaldavate HS a1328 ja N α1462 tüvedega, et jälgida, kuidas mõjutavad need valgud hüpersupressiivsuse edasi pärandumist. Selleks kasutati kolme skeemi: ühel juhul ristati metsiktüüpi neutraalset tüve hüpersupressiivse tüvega, mis sisaldas deletsiooni ja teisel juhul vastupidi. Kolmandaks ristamiseks oli nii neutraalse kui hüpersupressiivse deletsiooniga tüve ristamine. Kõikidest ristamisest kontrolliti 12 kolooniat, väljaarvatud HS a1328 x N α1462 *rpo41Δ* ristamisest, kus kasvas üles ainult 11 kolooniat.

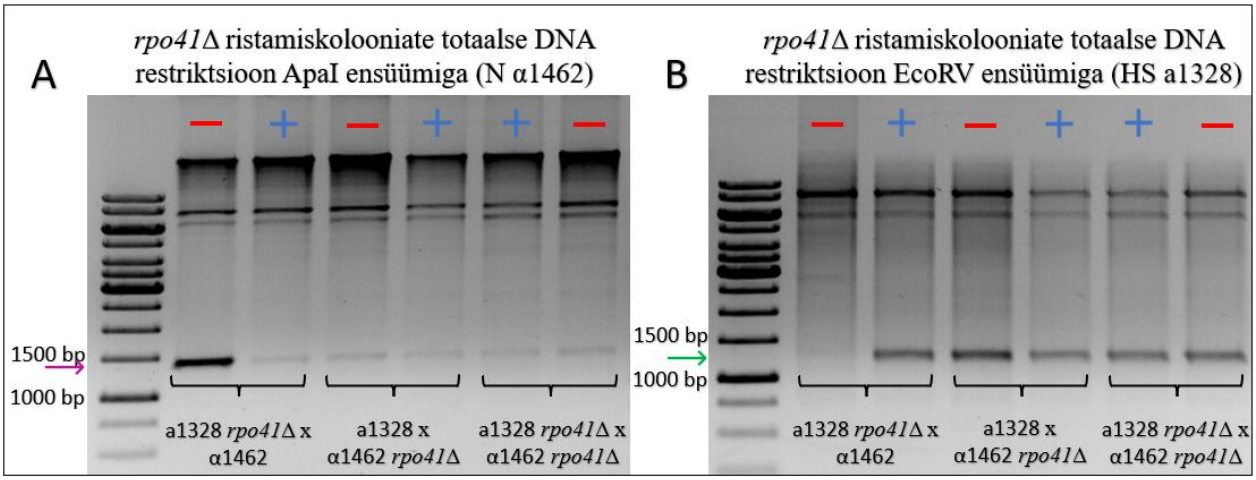


Joonis 11. Hüpersupressiivsuse pärandumise uurimise ristamiste PCR analüüsid. Koloonia-PCR analüüs uurimaks ristamiskolooniatesse pärandunud fragmenti IRC3, HMI1, RPO41 ja CCE1 deletsioone sisaldavate HS a1238 ja N α1462 tüvede ristamistel. Rohelise noolega on märgitud HS *ori*2 fragmendi suurus (266 bp). Arvatavad *rho*^{0} kolooniad on märgitud punase miinusega ning DNA puhastuse ja restriktsiooni kontrolliks võetud kolooniad on märgitud sinise plussiga. Markerina kasutati *Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder.*

Joonisel 11 on näha, et *hmi1Δ*, *irc3Δ* ja *cce1Δ* tehtud ristamiste tulemusteks oli kõigil kolme ristamisskeemi korral saadud fragment 266 nt pikk, see tähendab, et kõikidel kolooniatel pärandus

edasi hüpersupressiivne *ori*2 fragmenti sisaldav mtDNA genoom. See viitab sellele, et nendel deletsioonidel ei ole mõju hüpersupressiivsuse pärandumisele.

Rpo41Δ tüvede tehtud ristamiste tulemusteks oli kõigi kolme ristamisskeemi korral 11 kolooniat *rho*$^{-}$ genoomiga ning üks koloonia *rho*^{0} genoomiga. Kõikidele *rho*^{0} genoomiga ja igast ristamisest ühele *rho*$^{-}$ genoomiga kontrollkolooniale tehti samuti totaalse DNA restriktsioon kinnitamaks mitokondriaalse DNA fragmendi puudumist (joonis 12). Arvatavad *rho*^{0} kolooniad siiski sisaldasid *ori*2 fragmenti sisaldavat mtDNA-d, aga ka vähesel määral tRNA fragmenti sisaldavat mtDNA-d, mis viitab sellele, et neutraalne α1462 tRNA fragment on algses ristamiskoloonias olemas. Üllataval kombel sisaldas HS a1328 *rpo41Δ* x α1462 ristamise arvatav *rho*^{0} koloonia hoopis palju rohkem tRNA fragmenti.



Joonis 12. *Rpo41Δ* tüvede ristamiste arvatavate *rho*^{0} ristamiskolooniate kontroll totaalse DNA restriktsiooniga. A: neutraalse mtDNA olemasolu analüüs ApaI restriktsiooniga. Lilla nool tähistab oodatud N fragmendi suurust (1462 bp). B: hüpersupressiivse mtDNA olemasolu analüüs EcoRV restriktsiooniga. Roheline nool tähistab oodatud HS fragmendi suurust (1328 bp). Punase miinusega on märgitud kolooniad, mis PCR-s ei andnud tulemusi ja sinise plussiga on märgitud kontrollkolooniad, mille puhul oli PCR-ga näha HS *ori*2 fragment. Markerina kasutati *Thermo Scientific Gene*Ruler *1 kb Ladder*.

2.4 Arutelu

Antud töö eesmärgiks oli välja töötada meetod, millega on võimalik kontrollida hüpersupressiivsuse pärandumist. Selleks, et jälgida mtDNA pärandumist pärmirakus, tuleb ristata kahe erineva paardumistüübiga (a ja α) tüve (Duntze *et al*., 1970). Varasemalt on selliseid katseid tehtud kahel eri meetodil: ristates eri paardumistüüpidega hüpersupressiivset tüve metsiktüüpi tüvega või neutraalse *petite* tüvega (Lockshon *et al*., 1995; Lorimer *et al*., 1995). Selles töös kasutati hüpersupressiivsuse uurimiseks hüpersupressiivse ja neutraalse tüve ristamist kuna RPO41 ja HMI1 geeni ei saa metsiktüüpi tüvest deleteerida nii, et tüvi ei kaotaks metsiktüüpi mtDNA-d (Greenleaf *et al*., 1986; Sedman *et al*., 2000). Neutraalsetest *rho*$^-$ tüvedest on aga RPO41 ja HMI1 geeni deletsioon võimalik kuna see ei põhjusta mtDNA kadu ja on võimalik jälgida hüpersupressiivsuse pärandumist (Fangman *et al*., 1989; Sedman *et al*., 2000).

Enne tüvede ristamist oli vajalik hinnata konstrueeritud deletsiooni tüvede stabiilsust ehk oma mtDNA säilitamise võimekust. DAPI ja *Southern blot* tulemused näitasid, et HS a1328 *hmi1Δ* fragmenteerus viie nädala jooksul ja HS a1328 *irc3Δ* tüve fragmentatsioon süvenes.. Varasemalt on näidatud, et Hmi1 on hädavajalik metsiktüüpi tüves mtDNA stabiilsuse säilitamiseks, kuid pole mtDNA fragment püsib stabiilsena hüpersupressiivses HS61 tüves (Sedman *et al*., 2000). Antud töös saadud tulemus on varasemalt avaldatuga vastuolus, sest hüpersupressiivses HS a1328 tüves on HMI1 vajalik täieliku *rho*$^-$ mtDNA fragmendi säilitamiseks. Need erinevused võivad tulla sellest, et eelnevalt avaldatud töös kasutatud hüpersupressiivne HS61 tüvi on saadud teisel meetodil. HS61 tüvi on saadud W303 tüvest HMI1 geeni deleteerimisel ja tekkinud *rho*$^-$ valiti välja edasi töötamiseks. Lisaks on eelnevalt avaldatud töös kasutatud HS61 mutant märkimisväärselt väikesema mtDNA fragmendiga (829 nt) ning seni on näidatud, et väiksemat fragmenti sisaldavad hüpersupressiivsed mutandid säilitavad oma mtDNA-d stabiilsemalt kui suuremat fragmenti sisaldavad tüved (de Zamaroczy *et al*., 1981).

Tegemaks kindlaks, kas mutantse mtDNA pikkus mõjutab hüpersupressiivsete *hmi1Δ* tüvede mtDNA stabiilsust, oleks vaja tulevikus läbi viia sarnane katse, kus vaadatakse erinevate suurustega hüpersupressiivseid *ori*2 fragmenti sisaldavate *hmi1Δ* tüvede võimekust oma mtDNA fragmenti säilitada.

HS a1328 *hmi1Δ* ja HS a1328 *irc3Δ* tüvede ebastabiilsus viitab sellele, et hüpersupressiivses tüves on Irc3 ja Hmi1 olulised mtDNA 1328 aluspaari pika fragmendi säilitamiseks. Järelikult on antud

valgud vajalikud osade hüpersuppresiivsete mitokondriaalsete genoomide korrektseks säilitamiseks, tagades näiteks vigadeta replikatsiooni või DNA parandamise.

Rpo41 on vajalik metsiktüüpi tüvedes tervikliku mtDNA säilimiseks (Greenleaf *et al*., 1986), kuid hüpersupressiivsetes ja neutraalsetes tüvedes pole Rpo41 mtDNA säilimiseks vajalik ning *rpo41Δ* tüved säilitavad oma osalise mtDNA fragmendi ka mitme poolestusaja möödudes (Fangman *et al*., 1989; Lorimer *et al*., 1995). Käesoleva töö DAPI ja *Southern blot* tulemused näitasid, et N α1462 *rpo41Δ* tüves esines *rho*^{0} kolooniaid, millel puudus mtDNA, kuid tundub, et tegu on pigem transformatsioonist tuleneva muutusega kuna aja jooksul *rho*^{0} kolooniate hulk ei suurenenud. Seepärast oleks edaspidi mõistlik läbi viia peale transformatsiooni antu tüve subkloneerimine, millega on võimalik lahti saada transformatsiooni käigus tekkinud *rho*^{0} kolooniatest.

Varasemalt on näidatud, et hüpersupressiivsetes tüvedes on CCE1 deleteerimine võimalik ning see ei põhjusta mtDNA kadu (Zweifel & Fangman, 1991). Neutraalsete tüvede kohta sellist kirjandust leida ei ole. Antud töö DAPI värvimise tulemustest järeldub, et CCE1 on neutraalsetes tüvedes stabiilsuseks hädavajalik, sest selle deleteerumisel ei ole mutandi mtDNA stabiilne. Kuigi DAPI meetodil N α1462 *cce1Δ* tüves mtDNA olemasolu ei täheldatud, oli kontrolliks tehtud totaalse DNA restriktsioonil detekteeritav väikeses koguses mtDNA fragment, mille kogus langes viie nädala jooksul veelgi. See viitab sellele, et *cce1Δ* põhjustab neutraalses N α1462 tüves mtDNA märkimisväärset vähenemist. Selline mtDNA koguse vähenemine aga tähendaks, et ristamisel stabiilse hüpersupressiivse *cce1Δ* tüvega oleks N α1462 *cce1Δ* tüvi ebasoodsas seisus kuna pärandatavaid üksuseid on palju vähem. Saamaks selgeks, kas *cce1 Δ* põhjustab neutraalsetes tüvedes mtDNA kadu pika aja jooksul või põhjustab ainult mtDNA koguse vähenemist, oleks vaja neutraalse *cce1Δ* tüve stabiilsust kontrollida veel pikema aja jooksul.

Samuti võib olla põhjuseks N α1462 tüve mtDNA fragmendi pikkus. Varem on üldise ja mikroobibiokeemia labori tudengi Mirjam Kärmase kirjutatud bakalaureusetöös näidatud, et väiksema mtDNA fragmendiga neutraalsetes tüvedes püsib mtDNA fragment stabiilsemana kui suurema fragmendiga tüvedes. Samas antud töö tulemused näitavad, et tüvedes, kus *cce1* oli deleteeritud, säilus 100 % mtDNA-st just tüves, mis kandis kõige pikemat fragmenti. Seega on võimalik, et mtDNA säilumise koha pealt CCE1 deletsiooni sisaldavas tüves pigem olulisem fragmendis olevad struktuurielemendid, mitte selle üldine pikkus.

Hüpersupressiivse ja neutraalse *petite* mutandi ristamisel on näidatud, et pärandub 100% ulatuses hüpersupressiivne mtDNA fragment (Lorimer *et al*., 1995). Käesolevas töös tehti kindlaks, kas

HMI1, IRC3, RPO41 või CCE1 geeni deleteerimine hüpersupressiivsest ja neutraalsest tüvest mõjutab hüpersupressiivsuse pärandumismustrit.

Varasemalt on hüpersupressiivsuse pärandumismustrite muutumise nägemiseks kasutatud *Southern blot* meetodit, kuid tulemused avaldanud autorid nentisid, et tegu on äärmiselt töömahuka ja aeganõudva meetodiga, millega ei ole võimalik kontrollida nii palju kolooniaid kui oleks vaja, et näha hüpersupressiivsuse kadumise efekti (Lorimer *et al*., 1995). Seetõttu optimeeriti käesoleva töö jaoks koloonia-PCR meetodit, et suuremahulist katset oleks võimalik läbi viia võimalikult kiirelt ja efektiivselt.

Helikaaside Irc3 ja Hmi1 puudumise mõju kohta hüpersupressiivsuse pärandumisele varasemalt publikatsioone avaldatud ei ole. Selles töös saadud tulemused näitavad, et *hmi1Δ* ei avalda mõju hüpersupressiivsuse pärandumisele kuna kõigi ristamiste puhul olid 100% järglastest *ori*2 fragmenti sisaldava mtDNA genoomiga. Vaatamata sellele, et IRC3 deletsiooni puhul täheldati mõju HS a1328 tüve mtDNA edasi pärandumisele järglaskolooniatele, ei märgatud ka selle helikaasi puhul mõju hüpersupressiivsuse pärandumisele ning see võib tuleneda sellest, et *irc3Δ* mõju on siiski võrdlemisi väike või oli valimi suurus ebapiisav.

Varasemalt on publitseeritud tulemused, kus täheldati *cce1Δ* tüvede ristamisel hüpersupressiivsuse kadu (Zweifel & Fangman, 1991). Üllataval kombel ei lähe see tulemus kokku antud töös näidatuga, kus hüpersupressiivsuse kadu näha ei olnud ning kõigile järglastele pärandus edasi hüpersupressiivne mtDNA fragment. Saadud erinevusi on võimalik põhjendada sellega, et Zweifeli ja Fangmani tehtud katses ristati hüpersupressiivset tüve metsiktüüpi tüvega, kuid antud töö katses ristati hüpersupressiivset ja neutraalset tüve ning siin võivad rolli mängida metsiktüüpi ja neutraalse tüve võimalikud replikatsiooni eelised kui ka mtDNA pärandumise erinevused. Edaspidi peaks antud tulemuste valideerimiseks viima läbi ka ristamised metsiktüüpi tüvega ja võrdlema PCR-i tulemusi varasemalt *Southern blot* meetodil saadud tulemustega.

Rpo41 osaluses hüpersupressiivsuse mehhanismis ei olda siiani kindel ning selle kohta on avaldatud vastakaid tulemusi. Näidatud on nii Rpo41 rolli puudumist hüpersupressiivsuse pärandumises (Lorimer et al., 1995), kuid hilisemalt on publitseeritud tulemusi, mis näitavad, et Rpo41 puudumine toob kaasa hüpersupressiivsuse kadumise ja osaleb selle mehhanismis (Corbi & Amon, 2021). *Rpo41Δ* ristamisest saadud PCR tulemus näitas, et kolmel ristamise skeemil oli kõigil üks koloonia, mis ei andnud produkti, kuid totaalse DNA restriktsiooniga olid nähtavad nii HS *ori*2 ja N tRNA mtDNA fragmendid. See viitab sellele, et kui järglaskoloonia sisaldab kahte

fragmenti on seda PCR-meetodiga raske detekteerida, mis võib tuleneda näiteks DNA fragmendi hulga erinevusest. Kuna järglased sisaldavad mõlemat mtDNA-d, siis on raske öelda, kuidas RPO41 geeni deletsioon mõjutab hüpersupressiivsust ja kumb fragment aja jooksul järglastele edasi kandub. Selle tõestamiseks peaks läbi viima ristamiskatsed, kus vaadatakse mtDNA fragmendi edasipärandumist pikema aja jooksul peale ristamist. See on kooskõlas varasemalt avaldatud tulemustega, kus täheldati Rpo41 mõju hüpersupressiivsusele ja mõlema fragmendi olemasolu ristamise järgselt (Corbi & Amon, 2021). Käesoleva bakalaureusetöö tulemused viitavad sellele, et Rpo41 panustab hüpersupressiivsuse mehhanismi toimimisse, kuid täpsem viis on teadmata. Tulevikus oleks vajalik rohkemate ristamiste läbiviimist ja vajadusel ristamiskolooniate analüüsimist *Southern blot* meetodil.

Ristamiskatsete tulemused näitasid, et koloonia-PCR võib anda kallutatud tulemusi ja seda mitmel erineval põhjusel. Esiteks on N α1462 mtDNA fragmendi PCR tõenäoliselt ebaefektiivsem kui hüpersupressiivse mtDNA oma, mistõttu antud detektsiooni meetod võib anda kallutatud tulemusi. Edaspidisteks katseteks oleks vaja uuesti disainida, tellida ja optimeerida praimerid neutraalsele tüvele, milleks selle töö raames aega ei jätkunud. Teiseks on hüpersupressiivses tüves mtDNA kordused lühemad, sisaldades seega rohkem kordusi sama koguse DNA kohta, mis mõjutab PCRi efektiivsust ka sama koguse mtDNA puhul. Kolmandaks on teadmata, milline on mtDNA kogus ühe raku kohta, mis juhul, kui see on suurem hüpersupressiivses tüves, võib veelgi enam tulemusi moonutada. Seepärast tuleks saadud andmeid täiendada mtDNA koguse mõõtmisega, et välistada eelpool kirjeldatud stsenaariumitest tulenev võimalik hüpersupressiivse mitokondriaalse genoomi üle esindatus. Vastsel juhul on järeldused limiteeritud relatiivse koguste suhtes ühe katse raames. Kokkuvõtvalt võib väita, et koloonia-PCR sobib pigem hüpersupressiivsuse pärandumise mehhanismis osalevate valkude uurimise valimi kitsendamiseks ja võimaldab spetsiifilisi kanditaatvalke põhjalikemate meetoditega edasi uurida.

KOKKUVÕTE

S. cerevisiae osalise mitokondriaalse DNA-ga *rho*$^-$ mutante iseloomustab supressiivsus. Supressiivsus on *rho*$^-$ mutandi võime eelistatult kanda oma mitokondriaalne DNA järgnevale põlvkonnale, kui neid ristata metsiktüüpi pärmitüvega. Supressiivsuse mehhanism ja selles osalevad valgud on aga siiani teadmata.

Käesoleva bakaleureusetöö eesmärgiks oli välja töötada ja uurida *S. cerevisiae rho*$^-$ mutantide hüpersupressiivsuse pärandumist PCR meetodil. Selleks oli vajalik esmalt hüpersupressiivsete ja neutraalsete IRC3, HMI1, CCE1, RPO41 deletsiooni tüvede konstrueerimine ja nende mtDNA säilimise analüüsimine. Sellele järgnes koloonia-PCR meetodi optimeerimine, et mahuka katse analüüs oleks võimalikult kiire ja efektiivne. Viimaseks teostati hüpersupressiivsete ja neutraalsete tüvede ristamine hüpersupressiivsuse pärandumise uurimiseks ning saadud kolooniate mtDNA fragmente analüüsiti koloonia-PCR abil.

Töö käigus selgus, et koloonia-PCR ei pruukinud anda korrektseid tulemusi kuna ühe praimeri paariga esines ebaspetsiifiliste fragmentide teket ning selle lahendamiseks edaspidisteks katseteks oleks vajalik uute praimerite disainimine ja tellimine. Osadel juhtudel ei töötanud ristatud tüvede peal PCR, mis võib tuleneda sellest, et ristamisel toimusid mtDNA ümberkorraldused, mistõttu ei saanud praimerid DNA-le korralikult seonduda. Antud töö tulemused näitavad, et koloonia-PCR võiks paremate praimerite korral sobida hüpersupressiivsuse pärandumise mehhanismis osalevate valkude uurimisel valimi kitsendamiseks kuna tegu on suuremahulise katse jaoks efektiivseima meetodiga ja selle põhjal saaks hüpersupresiivsust mõjutavaid valke uurida põhjalikumalt edasi.

Ristamiste ja PCR tulemustest ei olnud näha, et helikaasid Hmi1 ja Irc3 ning resolvaas Cce1 mõjutaks hüpersupressivsuse pärandumist, sest kõigil juhtudel pärandus järglastele edasi hüpersupressiivne mtDNA fragment. Mõju hüpersupressiivsuse pärandumisele oli näha vaid Rpo41 valgu puhul, kus totaalse DNA restriktsiooni geelil oli näha, et edasi on pärandunud nii neutraalne kui ka hüpersupressiivne mtDNA fragment ning selle valgu mõju hüpersupressiivsuse mehhanismile oleks vaja edaspidi lähemalt uurida. Lisaks on võimalik, et *rpo41Δ* tüvede ristamisest saadud tulemused viitavad hüpersupressiivsuse kadumisele pikema aja jooksul, kuid täpsemad järeldused nõuavad uue katseskeemi koostamist.

Heritability studies of hypersuppressiveness in *Saccharomyces cerevisiae rho*$^-$ mutants using PCR method

Iris Vaask

SUMMARY

Saccharomyces cerevisiae is a unique model organism to study inheritance of mitochondrial DNA (mtDNA) because of its ability to survive without functional mtDNA. Mutants without fully functional mtDNA are referred to as *rho*$^-$ *petite* mutants. *Rho*$^-$ mutants are also characterized by the ability to preferentially pass on their mtDNA when crossed with wild type strains. This trait has been termed suppressiveness. *Rho*$^-$ mutants are divided into three groups based on the nature of their suppressiveness – hypersuppressive, suppressive and neutral. When the strain's progeny is wild type, then the *rho*$^-$ mutant is neutral. If all the strain's progeny has *rho*$^-$ mtDNA, then the mutant is hypersuppressive. Intermediate outcomes are categorized as suppressive *rho*$^-$ mutants. The mechanisms and participating proteins of this process are currently unclear.

The aim of this thesis was to study the roles of four proteins in the inheritance of hypersuppressiveness in *S. cerevisiae rho*$^-$ mutants using PCR. First, hypersuppressive and neutral IRC3, HMI1, CCE1, RPO41 deletion strains were constructed and their ability to maintain functional mtDNA over a five-week period was analyzed. HS a1328 *hmi1Δ* and HS a1328 *irc3Δ* strains showed signs of instability by fragmenting during five-week period. Also signs of instability were noticed in N α1462 *irc3Δ* and N α1462 *rpo41Δ* strains. This was followed by colony-PCR optimization for maximal efficiency of the following large-scale experiments. The final step of the process was to cross hypersuppressive and neutral deletion strains with each other to assess the roles of the proteins Hmi1, Irc3, Cce1 and Rpo41 in hypersuppressive inheritance using colony-PCR.

Unfortunately, colony-PCR exhibited some problems for studying inheritance of hypersuppressiveness since one pair of primers used for colony-PCR caused the formation of non-specific fragments upon use, meaning that future experiments would require designing new primers. There is a possibility that DNA modifications occurred during mating which resulted primers not annealing to the DNA properly. The results of this study indicate that colony-PCR is an appropriate methodology for determining the proteins involved in hypersuppressive inheritance due to its high throughput. However, the study of the precise roles of such proteins in hypersuppressive inheritance would require a more in-depth technique.

PCR results indicated that helicases Irc3 and Hmi1 as well as resolvase Cce1 don't seem to have any effect on the inheritance of hypersuppressiveness, since only the inheritance of hypersuppressive fragments was observed. Of the studied proteins only RNA polymerase Rpo41 appeared to affect the inheritance of hypersuppressiveness, which is in accordance with the previous results from other types of mating experiments. The effect of this enzyme on the mechanism of hypersuppressiveness remains unclear and needs to be elucidated in the future. There is also a possibility that the result from mating *rpo41Δ* strains indicates that hypersuppressiveness is lost during longer time periods, but confirmation would require further experiments using altered methods.

TÄNUAVALDUSED

Avaldan siirast ja sügavat tänu oma juhendajale Sirelin Sillamaale. Sirelin, aitäh, et tutvustasid mulle teaduse maailma ja uurimismeetodeid, pöörasid tähelepanu minu iseseisvumisele laboris ja õpetasid akadeemilist kirjutamist. Tänan, professor Juhan Sedman, et olid nõus mind oma laborisse tudengiks võtma ning minult alati küsisid, kuidas mul hästi läheb. Tänan, Tiina Sedman ja Vlad Piljukov, sain teie poole alati nii teoreetiliste kui ka praktiliste muredega pöörduda. Aitäh, meie töökas laborant Maie Loorits, sain Sinule oma muresid kurta ja alati nõu ning nukleotiide küsida. Aitäh, Elise Helena, et need kolm aastat minuga õppisid ja mulle kõik õppeained selgeks õpetasid. Tänan oma vanemaid, venda ja koera, et olite rasketel hetketel minu jaoks olemas ja veensite mind siiski õpinguid jätkama.

KIRJANDUSE LOETELU

Baccolo, G., Stamerra, G., Coppola, D. P., Orlandi, I., & Vai, M. (2018). Chapter One—Mitochondrial Metabolism and Aging in Yeast. In C. López-Otín & L. Galluzzi (Eds.), *Mitochondria and Longevity* (Vol. 340, pp. 1–33). Academic Press.

Baldacci, G., Chérif-Zahar, B., & Bernardi, G. (1984). The initiation of DNA replication in the mitochondrial genome of yeast. *The EMBO Journal*, *3*(9), 2115–2120.

Bessler, J. B., Torre, J. Z., & Zakian, V. A. (2001). The Pif1p subfamily of helicases: Region-specific DNA helicases? *Trends in Cell Biology*, *11*(2), 60–65.

Blanc, H., & Dujon, B. (1980). Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA responsible for suppressiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *77*(7), 3942–3946.

Bock, F. J., & Tait, S. W. G. (2020). Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(2), 85–100.

Brosh, R. M., & Matson, S. W. (2020). History of DNA Helicases. *Genes*, *11*(3).

Corbi, D., & Amon, A. (2021). Decreasing mitochondrial RNA polymerase activity reverses biased inheritance of hypersuppressive mtDNA. *PLOS Genetics*, *17*(10), 1–31.

De Deken, R. H. (1966). The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. In *Microbiology* (Vol. 44, Issue 2, pp. 149–156). Microbiology Society.

de Zamaroczy, M., Marotta, R., Faugeron-Fonty, G., Goursot, R., Mangin, M., Baldacci, G., & Bernardi, G. (1981). The origins of replication of the yeast mitochondrial genome and the phenomenon of suppressivity. *Nature*, *292*(5818), 75–78.

Diffley, J. F., & Stillman, B. (1991). A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(17), 7864–7868.

Dujon, B. (2020). Mitochondrial genetics revisited. *Yeast*, *37*(2), 191–205.

Duntze, W., MacKay, V., & Manney, T. R. (1970). *Saccharomyces cerevisiae*: A Diffusible Sex Factor. *Science*, *168*(3938), 1472–1473.

Fairman-Williams, M. E., Guenther, U.-P., & Jankowsky, E. (2010). SF1 and SF2 helicases: Family matters. *Current Opinion in Structural Biology*, *20*(3), 313–324.

Fangman, W. L., & Dujon, B. (1984). Yeast mitochondrial genomes consisting of only AT base pairs replicate and exhibit suppressiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(22), 7156–7160.

Fangman, W. L., Henly, J. W., & Brewer, B. J. (1989). RPO41-independent maintenance of [rho-] mitochondrial DNA in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular and Cellular Biology*, *10*(1), 10–15.

Foury, F., & Kolodynski, J. (1983). Pif mutation blocks recombination between mitochondrial rho+ and rho- genomes having tandemly arrayed repeat units in Saccharomyces cerevisiae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *80*(17), 5345–5349.

Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., & Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Letters*, *440*(3), 325–331.

Gaidutšik, I., Sedman, T., Sillamaa, S., & Sedman, J. (2016). Irc3 is a mitochondrial DNA branch migration enzyme. *Scientific Reports*, *6*(1), 1–11.

Gao, Y., & Yang, W. (2020). Different mechanisms for translocation by monomeric and hexameric helicases. *Current Opinion in Structural Biology*, *61*, 25–32.

Graves, T., Dante, M., Eisenhour, L., & Christianson, T. W. (1998). Precise mapping and characterization of the RNA primers of DNA replication for a yeast hypersuppressive petite by in vitro capping with guanylyltransferase. *Nucleic Acids Research*, *26*(5), 1309–1316.

Greenleaf, A. L., Kelly, J. L., & Lehman, I. R. (1986). Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *83*(10), 3391–3394.

Hyman, B. C., Cramer, J. H., & Rownd, R. H. (1982). Properties of a Saccharomyces cerevisiae mtDNA segment conferring high-frequency yeast transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(5), 1578–1582.

Isaya, G., Miklos, D., & Rollins, R. A. (1994). MIP1, a new yeast gene homologous to the rat mitochondrial intermediate peptidase gene, is required for oxidative metabolism in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(8), 5603–5616.

Kleff, S., Kemper, B., & Sternglanz, R. (1992). Identification and characterization of yeast mutants and the gene for a cruciform cutting endonuclease. *The EMBO Journal*, *11*(2), 699–704.

Kuusk, S., Sedman, T., Jõers, P., & Sedman, J. (2005). Hmi1p from Saccharomyces cerevisiae mitochondria is a structure-specific DNA helicase. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(26), 24322–24329.

Lahaye, A., Stahl, H., Thines-Sempoux, D., & Foury, F. (1991). PIF1: A DNA helicase in yeast mitochondria. *The EMBO Journal*, *10*(4), 997–1007.

Laskowski Sr, M. (1967). DNases and their use in the studies of primary structure of nucleic acids. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, *29*, 165–220.

Lee, C. M., Sedman, J., Neupert, W., & Stuart, R. A. (1999). The DNA helicase, Hmi1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(30), 20937–20942.

Lockshon, D., Zweifel, S. G., Freeman-Cook, L. L., Lorimer, H. E., Brewer, B. J., & Fangman, W. L. (1995). A role for recombination junctions in the segregation of mitochondrial DNA in yeast. *Cell*, *81*(6), 947–955.

Lohman, T. M., & Bjornson, K. P. (1996). Mechanisms of helicase catalyzed DNA unwinding. *Annual Review of Biochemistry*, *65*(1), 169–214.

Lõoke, M., Kristjuhan, K., & Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques*, *50*(5), 325–328.

Lorimer, H. E., Brewer, B. J., & Fangman, W. L. (1995). A test of the transcription model for biased inheritance of yeast mitochondrial DNA. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(9), 4803–4809.

MacAlpine, D. M., Kolesar, J., Okamoto, K., Butow, R. A., & Perlman, P. S. (2001). Replication and preferential inheritance of hypersuppressive petite mitochondrial DNA. *The EMBO Journal*, *20*(7), 1807–1817.

Matsunaga, M., & Jaehning, J. A. (2004). Intrinsic Promoter Recognition by a "Core" RNA Polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(43), 44239–44242.

Mirhendi, H., Diba, K., Rezaei, A., Jalalizand, N., Hosseinpur, L., & Khodadadi, H. (2007). Colony PCR is a rapid and sensitive method for DNA amplification in yeasts. *Iranian Journal of Public Health*, *36*(1), 40–44.

Miyakawa, I., Sando, N., Kawano, S., Nakamura, S., & Kuroiwa, T. (1987). Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Cell Science*, *88*(4), 431–439.

Morgenstern, M., Stiller, S. B., Lübbert, P., … Warscheid, B. (2017). Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *Cell Reports*, *19*(13), 2836–2852.

Packeiser, H., Lim, C., Balagurunathan, B., Wu, J., & Zhao, H. (2013). An Extremely Simple and Effective Colony PCR Procedure for Bacteria, Yeasts, and Microalgae. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *169*(2), 695–700.

Piljukov, V., Garber, N., Sedman, T., & Sedman, J. (2020). Irc3 is a monomeric DNA branch point-binding helicase in mitochondria of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Letters*, *594*(19), 3142–3155.

Piskur, J. (1997). The transmission disadvantage of yeast mitochondrial intergenic mutants is eliminated in the mgt1 (cce1) background. *Journal of Bacteriology*, *179*(17), 5614–5617.

Ralser, M., Kuhl, H., Ralser, M., Werber, M., Lehrach, H., Breitenbach, M., & Timmermann, B. (2012). The *Saccharomyces cerevisiae* W303-K6001 cross-platform genome sequence: Insights into ancestry and physiology of a laboratory mutt. *Open Biology*, *2*(8), 120093.

Ramachandran, A., Nandakumar, D., Deshpande, A. P., Lucas, T. P., R-Bhojappa, R., Tang, G.-Q., Raney, K., Yin, Y. W., & Patel, S. S. (2016). The Yeast Mitochondrial RNA Polymerase and Transcription Factor Complex Catalyzes Efficient Priming of DNA Synthesis on Single-stranded DNA. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(32), 16828–16839.

Ruiz-Gaitán, A. C., Fernández-Pereira, J., Valentin, E., Tormo-Mas, M. A., Eraso, E., Pemán, J., & Groot, P. W. J. de. (2018). Molecular identification of Candida auris by PCR amplification of species-specific GPI protein-encoding genes. *International Journal of Medical Microbiology*, *308*(7), 812–818.

Sanchez-Sandoval, E., Diaz-Quezada, C., Velazquez, G., Arroyo-Navarro, L. F., Almanza-Martinez, N., Trasviña-Arenas, C. H., & Brieba, L. G. (2015). Yeast mitochondrial RNA polymerase primes mitochondrial DNA polymerase at origins of replication and promoter sequences. *Mitochondrion*, *24*, 22–31.

Schinkel, A. H., Koerkamp, M. J., Touw, E. P., & Tabak, H. F. (1987). Specificity factor of yeast mitochondrial RNA polymerase. Purification and interaction with core RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(26), 12785–12791.

Sedman, T., Gaidutšik, I., Villemson, K., Hou, Y., & Sedman, J. (2014). Double-stranded DNA-dependent ATPase Irc3p is directly involved in mitochondrial genome maintenance. *Nucleic Acids Research*, *42*(21), 13214–13227.

Sedman, T., Garber, N., Gaidutšik, I., Sillamaa, S., Paats, J., Piljukov, V. J., & Sedman, J. (2017). Mitochondrial helicase Irc3 translocates along double-stranded DNA. *FEBS Letters*, *591*(23), 3831–3841.

Sedman, T., Jõers, P., Kuusk, S., & Sedman, J. (2005). Helicase Hmi1 stimulates the synthesis of concatemeric mitochondrial DNA molecules in yeast Saccharomyces cerevisiae. *Current Genetics*, *47*(4), 213–222.

Sedman, T., Kuusk, S., Kivi, S., & Sedman, J. (2000). A DNA Helicase Required for Maintenance of the Functional Mitochondrial Genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(5), 1816–1824.

Singleton, M. R., Dillingham, M. S., & Wigley, D. B. (2007). Structure and Mechanism of Helicases and Nucleic Acid Translocases. *Annual Review of Biochemistry*, *76*(1), 23–50.

Spinelli, J. B., & Haigis, M. C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature Cell Biology*, *20*(7), 745–754.

Tomkinson, A. E., Tappe, N. J., & Friedberg, E. C. (1992). DNA ligase I from Saccharomyces cerevisiae: Physical and biochemical characterization of the CDC9 gene product. *Biochemistry*, *31*(47), 11762–11771.

Tzagoloff, A., & Dieckmann, C. L. (1990). PET genes of Saccharomyces cerevisiae. *Microbiological Reviews*, *54*(3), 211–225.

Van Dyck, E., Foury, F., Stillman, B., & Brill, S. J. (1992). A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in S. cerevisiae is homologous to E. coli SSB. *The EMBO Journal*, *11*(9), 3421–3430.

Vögtle, F.-N., Wortelkamp, S., Zahedi, R. P., … Meisinger, C. (2009). Global Analysis of the Mitochondrial N-Proteome Identifies a Processing Peptidase Critical for Protein Stability.

Williamson, D. (2002). The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nature Reviews Genetics*, *3*(6), 475–481.

Williamson, D. H., & Fennell, D. J. (1975). Chapter 16 The Use of Fluorescent DNA-Binding Agent for Detecting and Separating Yeast Mitochondrial DNA. In D. M. Prescott (Ed.), *Yeast Cells* (Vol. 12, pp. 335–351). Academic Press.

Zamaroczy, M. de, Faugeron-Fonty, G., Baldacci, G., Goursot, R., & Bernardi, G. (1984). The ori sequences of the mitochondrial genome of a wild-type yeast strain: Number, location, orientation and structure. *Gene*, *32*(3), 439–457.

Zweifel, S. G., & Fangman, W. L. (1991). A nuclear mutation reversing a biased transmission of yeast mitochondrial DNA. *Genetics*, *128*(2), 241–249.

Raamatud:

Amberg, D. C., Burke, D. J., & Strathern, J. N. (2006). Yeast colony PCR. *Cold Spring Harbor Protocols*, *1*, prot4170.

Rose, M., Winston, F., & Hieter, P. (1990). Laboratory course manual for methods in yeast genetics. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Open Biol*, *6*(150178), 14.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning-Sambrook & Russel-Vol. 1, 2, 3. *Cold Springs Harbour Laboratory Press*.

Sherman, F. (1991). [1] Getting started with yeast. In *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Vol. 194, pp. 3–21). Academic Press.

Laskowski Sr, M. (1967). DNases and their use in the studies of primary structure of nucleic acids. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, *29*, 165–220.

Kasutatud veebiaadressid:

W303 tüve sekveneerimise tulemused: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CM001823.1

LISAD

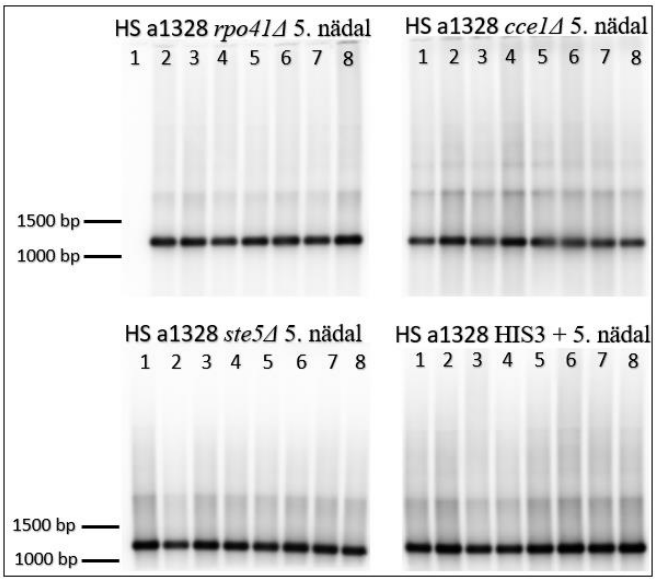
Lisa 1 Töös kasutatud praimerid ja PCR tingimused

Praimeri nimi	Järjestus 5'-3' suunas	Temperatuur	Elongatsiooni aeg
Integratsioonifragmentide amplifikatsioon			
Ste5-KanMX4N	CTAAAAAAGGAAGATACAGGATACAGCGGAAACAACTTTTAAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC	54 °C	2 min
Ste5-KanMX(C-term)2	GGGATGCTTTCTTTTTATTATTGCATAAAATTTAGTGTATACTCTAGAATTCGAGCTCGTTTTCGACAC		
YRD332w DelFr	TTATTTCACATAACGGAAGAAGCCTATTGGAGCCATGAGTATAATAAAATATGCGTACGCTGCAGGTCGAC		
YRD332w DelRev	TGTACTAGTGACTGTATATTAATATATGCACATTTATGTAGCTACGGATTTTAATCGATGAATTCGAGCTCG		
Hmi1 S1	TAATATGTAGAAAAAATATAGAGAAGGTATACGTCGTTCGTTGAAGACAGCGTACGCTGCAGGTCGAC		
Hmi1 S2	ATTATGTAAAAGGGTGATAATACATTATGAAAGGTAAGTAAAAAACTATTATCGATGAATTCGAGCTCG		
Cce1 S1	TACAACGAAGGCTTACGGTTATACAGTCTAAAGCTAAAAAAGATAGTAATCGTACGCTGCAGGTCGAC		

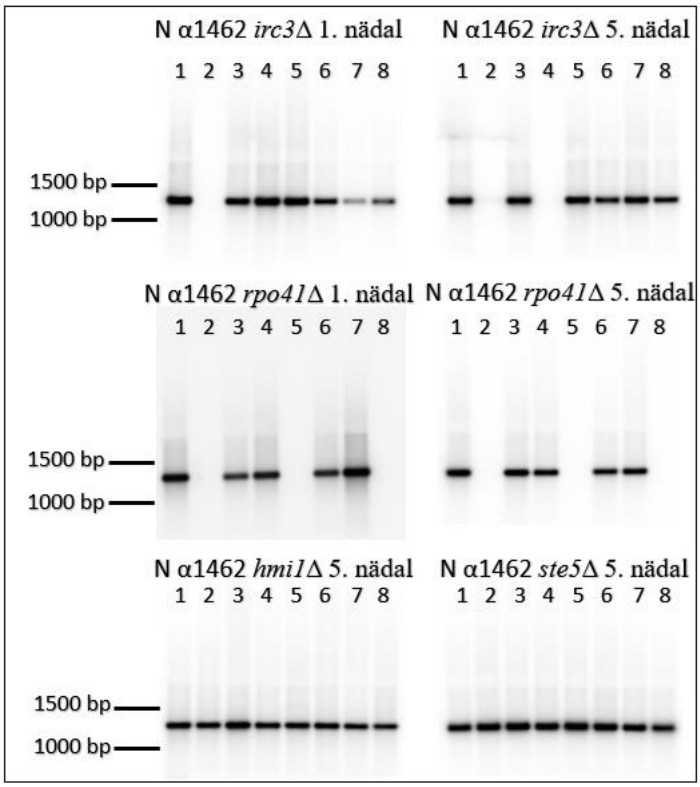
Cce1 S2	ATACATAGAGATTACATGTTATTTCAAGTTTGCGATCACCGCACAATTTCGATGAATTCGAGCTCG		
Rpo up Kan	TTTACATTTTATACATTCCTTGGATCAGTTCCTCCCCCTCTT	54 °C	3 min
Rpo down Kan	TATATGTACAAGTTAAATAAAAATAACACAAATAAATTTTAG		
Integratsioonifragmentide kontroll			
Rpo41 up 5	GCAGATCTCCTGTTCATATAC	54 °C	4 min 30 sek
Rpo41 down 3	GCAAACGATAAACGCTAAGTATG		
Irc3 Bam HI5	GCCGGATCCCTTGGAGACTTACCGCAAAAACAAT	56 °C	3 min 30 sek
Irc3 SacI3	GCCGAGCTCGCAATTCCATCATTTATCTGGTCTG		
Ste5 prom	TATTTCGAGTGAAGAAGAAGCGTTAAA		
Ste5 term	ATGAACTTGAAAGACTAAGAAGAA		
Hmi1 pseq	CTTCCCTTGTGATGTGTCAG	54 °C	2 min 30 sek
Hmi1 term rev	CCGCATCCTAGAATAGTTTTTTACTTAC		
Cce1 3 down	GAATCTCTTGAATACAAGGCA		
Cce1 5 up	GCTGAAGATGGCCTAACAG		
Antibiootikumi resistentsuskasseti kontroll			
Kan forward	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT	54 °C	35 sek

Hmi1 term rev	CCGCATCCTAGAATAGTTTTTTACTTAC		
Rev Hph 5 out	ACATGGGGATGTATGGGCTA		
Rpo41 up 5	GCAGATCTCCTGTTCATATAC		
Kan forward	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT	50 °C	1 min
Cce1 3 down	GAATCTCTTGAATACAAGGCA		
Kan rev	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	56 °C	40 sek
Ste5 prom	TATTTCGAGTGAAGAAGAAGCGTTAAA		
Kan rev	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	56 °C	50 sek
Irc3 Bam HI5	GCCGGATCCCTTGGAGACTTACCGCAAA AACAAT		
Radioaktiivsete hübridisatsiooniproovide amplifikatsioon ja ristamiste kontroll			
α1462 probe up	CGCTTGTGGTGCGTTAAATCTG	52 °C	40 sek
α1462 probe down rep	GAAGGAGTCCGATCGAAAGAGA		
ORI 3 IN	TAGGGGGAGGGGGTGGGT		
ORI 5 IN	GGGGGTCCCAATTATTATTTTC		

Lisa 2 Stabiilsuse kontrollimise *Southern blot* meetodi tulemused.

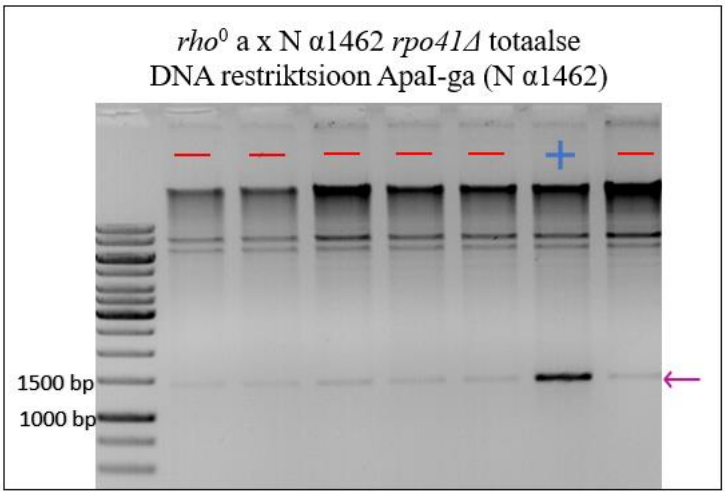


Lisa 2a HS a1328 deletsiooni tüvede 5. nädala *Southern blot* mtDNA stabiilsuse kontrolliks. Rajad 1-8 tähistavad kaheksat erinevat kolooniat igast HS a1328 deletsiooni tüvest, mida restrikteeriti EcoRV restriktaasiga. Fragmendi oodatav pikkus 1328 bp.



Lisa 2b N α1462 deletsiooni tüvede 1. ja 5. nädala *Southern blot* mtDNA stabiilsuse kontrolliks. Rajad 1-8 tähistavad kaheksat erinevat kolooniat N α1462 deletsiooni tüvest, mida restrikteeriti ApaI restriktaasiga. Fragmendi oodatav pikkus 1462 bp.

Lisa 3 HS *rho*^{0} a x N α1462 Δ*rpo41* ristamise totaalse DNA restriktsioon ApaI ensüümiga kontrollimaks neutraalse fragmendi olemasolu.



Lisa 3. HS *rho*^{0} a x N α1462 Δ*rpo41* ristamise totaalse DNA restriktsioon kontrollimaks neutraalse fragmendi olemasolu. Noolega on näidatud oodatava neutraalse mtDNA fragmendi suurus (1462 bp). Plussiga on tähistatud kontrollina kasutatud koloonia, millel oli neutraalne fragment näha PCR-ga. Ülejäänud miinusega tähistatud proovid on ristamiskolooniad, mille puhul PCR-s ei olnud näha mtDNA fragmenti. Kõigil proovidel on kasutatud ApaI restriktaasi. Markerina kasutati *Thermo Scientific Generuler 1 kb Ladder*.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Iris Vaask,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose "*Saccharomyces cerevisiae rho*$^-$ mutantide hüpersupressiivsuse pärandumise uurimine PCR meetodil", mille juhendaja on MSc Sirelin Sillamaa, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 26.05.2024 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Iris Vaask

26.05.2022