

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Anu Aun

**Interaktsioonid pärmi *Saccharomyces cerevisiae*
helikaasi Hmi1 ja tugivalgu Ste5 vahel**

Magistritöö

Juhendaja: Prof. Juhan Sedman

TARTU 2006

SISUKORD

1.	Sissejuhatus.....	4
2.	Kasutatud lühendid.....	5
3.	Kirjanduse ülevaade	6
3.1.	Pärmi <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mitokondriaalne helikaas Hmi1	6
3.1.1.	Mitokondriaalne genoom ja mitokondri replikatsiooniga seotud valgud	6
3.1.2.	Helikaaside üldisloomustus	9
3.1.3.	Mitokondriaalne helikaas Hmi1	10
3.1.4.	Hmi1 funktsioon mtDNA metabolismis	11
3.1.5.	Hmi1 teised funktsioonid	12
3.2.	MAP kinaasid ja signaaliülekanerajad.....	14
3.2.1.	Üldisloomustus	14
3.2.2.	<i>S. cerevisiae</i> paardumisspetsiifiline MAPK signaaliülekanerada	15
3.2.3.	<i>S. cerevisiae</i> filamenteerumisspetsiifiline MAPK signaaliülekanerada	17
3.2.4.	Spetsiifilisuse säilitamine ühiseid komponente kasutavate radade vahel	19
3.3.	Paardumisspetsiifiline tugivalk Ste5	22
3.3.1.	Ste5 roll paardumisrajas.....	22
3.3.2.	Ste5 lokalisatsioon rakus.....	24
3.3.3.	Ste5 oligomeriseerumine ja konformatsioonilised muutused	25
4.	Töö eesmärk.....	30
5.	Materjalid ja meetodid.....	31
5.1.1.	Rakutüved ja nende kasvatamine	31
5.1.2.	Vektorid.....	32
5.1.3.	Kloneerimine, sekveneerimine, PCR praimerid.....	32
5.1.4.	Pärmi genoomse DNA raamatukogu	34
5.1.5.	Kaksikhübriidsüsteem.....	34
5.1.6.	Pärmi transformeerimine ja totaalse DNA eraldamine.....	35
5.1.7.	β -galaktosidaasi filter-test	35
5.1.8.	Western blot	36
5.1.9.	GST-pulldown katse	36
5.1.10.	Σ 1278 Δ rpo41 rakutüve valmistamine.....	38

5.1.11.	Southern blot	38
5.1.12.	Haploidsete rakkude invasiooni detekteerimine.....	39
5.1.13.	Butanooli poolt indutseeritud filamenteerumise jälgimine	39
5.1.14.	Q-RT-PCR – kvantitatiivne pöördtranskriptaasi PCR.....	39
6.	Tulemused	42
6.1.1.	Hmi1-ga interakteeruvate valkude otsimine kaksikhübridsüsteemi abil	42
6.1.2.	Interaktsioonid $\Delta 15Hmi1$ ja Ste5 erinevate fragmentide vahel	46
6.1.3.	GST- <i>pulldown</i>	49
6.1.4.	Invasiivne kasv ja 1-butanooli poolt indutseeritud filamenteerumine HMI1 deletsiooniga $\Sigma 1278$ tüves	53
6.1.5.	Kvantitatiivne pöördtranskriptaasi PCR (Q-RT-PCR)	57
7.	Arutelu	60
8.	Kokkuvõte	65
9.	Summary.....	66
10.	Kasutatud kirjandus.....	67
Lisa 1.	Kaksikhübridsüsteemis kasutatud vektorid	72
Lisa 2.	Q-RT-PCR produkti tekke graafik	73
Lisa 3.	Q-PCR-i andmete analüüs	74

1. SISSEJUHATUS

Hmi1 on pärmis *Saccharomyces cerevisiae* tuuma genoomi poolt kodeeritud mitokondriaalne helikaas, mis omab seitset konserveerunud helikaasi motiivi ning kuulub helikaaside superperekonda I. Ta on homoloogne *Escherichia coli* Rep ja UvrD helikaasidega. Hmi1 on vajalik metsikut tüüpi mitokondriaalse genoomi säilitamiseks, kuid respiratoorselt defektse mitokondriaalse genoomi alalhoidmiseks ta vajalik ei ole. Hmi1 transporditakse mitokondrisse unikaalse C-terminaalse transportjärjestuse abil, mis moodustab eeldatavalt amfipaatilise α -heeliksi.

Et teada saada, milliste valkudega Hmi1 interakteerub ning selle abil välja selgitada, millistes rakulistes protsessides ta osaleb, viidi Hmi1 valguga läbi kaksikhübriidsüsteem genoomse DNA raamatukogu vastu. Selle tulemusena leiti kaks Hmi1-ga potentsiaalselt interakteeruvat valku. Üheks neist osutus paardumisspetsiifilise MAPK (mitogeeni aktiveeritud proteiin kinaasi) signaaliülekaneraja tugivalk Ste5, mis on haploidsetes pärmirakkudes vajalik normaalse paardumisfenotüübi kujunemiseks feromooni olemasolul.

Varem ei ole näidatud Hmi1 ega rakkude üldise respireerimisvõime vajalikkust paardumisprotsessis. Küll on aga olemas andmed selle kohta, et HMI1 geeni deletsioon põhjustab defekti butanooli poolt indutseeritud filamenteerumises haploidsetes rakkudes. Filamenteerumisvastus on pärmis reguleeritud kahe signaaliülekaneraja poolt, millest üks toimib läbi filamenteerumisspetsiifilise MAPK kaskaadi. Kuna paardumis- ja filamenteerumisspetsiifilised MAPK signaalirajad jagavad ühiseid komponente, keskenduti antud töös järgnevalt Hmi1 ja Ste5 vahelise interaktsiooni uurimisele. Selleks kasutati erinevaid biokeemilisi ja molekulaarbioloogilisi meetodeid.

Töö autor tänab oma juhendajat Prof. Juhan Sedmani, Dr. Silja Kuuske, Dr. Tiina Tamme, Dr. Tiina Sedmani ja Maie Loooritsat abi ning nõuannete eest katsete tegemisel ja töö kirjutamisel.

2. KASUTATUD LÜHENDID

a-h	– aminohape
ad	– aktivatsioonidomään
bd	– sidumisdomeen
bp	– aluspaar
Da	– dalton
DMSO	– dimetüül sulfoksiid
dNTP	– desoksüribonukleotiid
DTT	– ditiotreitol
EDTA	– etüleendiamiintetraatseet hape
GST	– glutatioon-S-transferaas
HA	– gripiviiruse hemaglutiniin
HS	– hüpersupressiivne
MAPK	– mitogeeni aktiveeritud proteiini kinaas
MCS	– multikloneerimiskoht
mtDNA	– mitokondriaalne DNA
NLS	– tuumalokalisatsioonisignaal
nt	– nukleotiid
NTP	– ribonukleotiid
ORF	– avatud lugemisraam
PCR	– polümeraasi ahelreaktsioon
PMSF	– fenüülmetüülsulfünüül floriid
rpm	– pööret minutis
SDS	– naatriumdodetsüülsulfaat
SP	– superperekond
Tris	– tris(hüdroksümetüül)aminoetaan
wt	– metsikut tüüpi
X-gal	– 5-bromo-4-kloor-3-indolüül-β-D-galaktopüranosiid
Q-RT-PCR	– kvantitatiivne pöördtranskriptaasi polümeraasi ahelreaktsioon
Q-PCR	– kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

3.1. Pärmis *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalne helikaas Hmi1

3.1.1. Mitokondriaalne genoom ja mitokondri replikatsiooniga seotud valgud

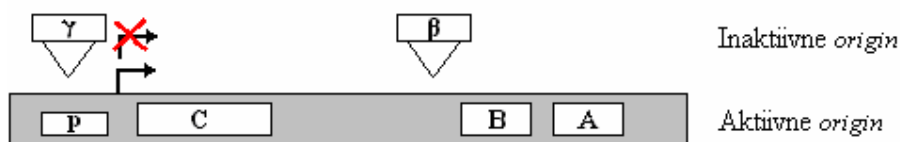
Mitokondrid on kaksikmembraaniga ümbritsetud eukariootse raku organellid, millel on oma genoom. Nende organellide biogenees on tuuma ja mitokondri genoomide koordineeritud koostöö tulemus (ülevaade Contamine & Picard, 2000). Mitokondrid on seotud terve rea raku jaoks oluliste metaboolsete protsessidega nagu Krebsi tsükkel, urea tsükkel, rasvhapete oksüdatsioon, heemi biosüntees ning ATP süntees oksüdatiivsel fosforüleerimisel (ülevaade Scheffler, 2001). Nende oluliste protsesside toimumiskohana on mitokondrid eukariootsete organismide jaoks eluks vajalikud organellid.

Tänu sellele, et *Saccharomyces cerevisiae* on fakultatiivne anaeroob ning on võimeline fermenteeritavate süsinikuallikate (näiteks glükoosi) olemasolul taluma suuri deletsioone mtDNA-s (mitokondriaalses DNA-s) ja isegi selle puudumist, on *S. cerevisiae* väga heaks mudelorganismiks mitokondriaalse genoomi ja sellega seotud protsesside uurimisel.

S. cerevisiae (tüvi FY1679) mtDNA on täielikult sekveneeritud (Foury *et al.*, 1998). Tegemist on 85 779 aluspaari (bp) pikkuse järjestusega, mis sisaldab 8 replikatsiooni alguskohta ehk *origini* (*ori* järjestust); 24 tRNA-d; kahte 21S, ühte 15S ja ühte 9S ribosomaalset RNA-d kodeerivat järjestust; 8 hüpoteetilist ja 18 kirjeldatud avatud lugemisraami. Viimased kodeerivad tervikliku respiratoorse ahela moodustumiseks vajalikke valke ning on seega olulised raku varustamisel energiaga. Kõik ülejäänud mitokondriaalsed valgud on kodeeritud tuuma genoomi poolt ning transporditakse mitokondrisse spetsiaalsete signaaljärjestuste ning transpordi mehhanismide abil (ülevaade Neupert & Brunner, 2002). *S. cerevisiae* kogu genoomi hõlmavate uuringute ning mitokondri proteoomi uuringute põhjal moodustavad mitokondriaalsed valgud pärmis proteoomist ligikaudu 14% (Glover *et al.*, 2002; Sickmann *et al.*, 2003). Oletatakse, et mitokondriaalse genoomi säilitamisest ja ekspressioonist võtab osa neist 25% (Sickmann, *et al.*, 2003).

Pagaripärmi *S. cerevisiae* mtDNA koosneb lineaarsetest molekulidest, mille pikkus võib ületada mitokondriaalse genoomi suuruse mitmekordselt (Bendich, 1996). Vähesel hulgal on mitokondrites detekteeritud ka tsirkulaarseid DNA molekule, millel esinevad ühe- või kaheaahelised lineaarsed nukleiinhappe sabad (Maleszka *et al.*, 1991).

Olenevalt tüvest esineb pärmi mitokondriaalses genoomis 7 või 8 konserveerunud *ori* järjestust (Joonis 1). Erinevad *ori* järjestused on mitokondri genoomis orienteeritud erinevates suundades ning nendes paikneb ka RNA transkriptsiooni initsiatsiooni sait – P järjestus (Baldacci *et al.*, 1984). *Ori* järjestustest on aktiivsed vaid neli (*ori*1, 2, 3, 5). Tegemist on AT rikaste regioonidega, milles paikneb kolm GC-rikast järjestust (A, B ja C boksid). Mitteaktiivsetes *ori* järjestustes (*ori*4, 6, 7, 8) esineb veel lisaks üks või kaks lühemat GC boksi (γ ja/või β boksid), millest üks paikneb promootori piirkonnas ning inaktiveerib promootori (deZamaroczy *et al.*, 1984).



Joonis 1: *S. cerevisiae* mitokondriaalse genoomi replikatsiooni *ori*-de skemaatilised joonised. All on kujutatud aktiivne *ori* järjestus, mis sisaldab aktiivset promootorit P ning kolme GC-rikast järjestust – bokse A, B ja C. Üleval on kujutatud inaktiivne *ori* järjestus, mis sisaldab lisaks A, B ja C boksidele ka kahte väiksemat GC-rikast järjestust γ ja β , millest esimene paikneb promootori piirkonnas (P), inaktiveerides selle. Noolega on näidatud promootorilt initsieeritud RNA ahela sünteesi alguskoht ning suund.

Pärmi mitokondriaalses genoomis võivad spontaanselt tekkida suured deletsioonid, mille tulemusena säilib vaid lühike lõik algsest genoomist (Blanc & Dujon, 1980). Alles jäävat lõiku amplifitseeritakse nii mitmeid kordi, et saavutatakse ligikaudne metsikut tüüpi (wt) mitokondriaalse genoomi kogus. Sellised rakud on respiratoorselt defektsed ning moodustavad väikseid *petite* kolooniaid fermenteeritavatel süsinikuallikatel kasvades, mittefermenteeritavatel süsinikuallikatel (näiteks glütseroolil) nad kasvada ei suuda. Neid mutante nimetatakse ρ^- rakkudeks, metsikut tüüpi rakke aga ρ^+ -deks. Rakke, milles mtDNA puudub täiesti, nimetatakse ρ^0 -ks. Kui ρ^- ning ρ^+ rakkude ristamisel on järglaskond enam kui 95% ulatuses ρ^- , nimetatakse vastavaid ρ^- rakke hüpersupressiivseteks (HS). Kui vastav protsent on väiksem, nimetatakse neid supressiivseteks ning kui järglaskonnas puuduvad ρ^- rakud, nimetatakse neid neutraalseteks *petite*-deks (ülevaated Contamine & Picard, 2000; Lecrenier & Foury, 2000). Kõik HS ρ^- tüved sisaldavad ~300 bp pikkust järjestust ρ^+ mtDNA-st, mis

sisaldab ühte neljast aktiivsest *ori* järjestusest (GC bokse ning aktiivset promootorit). Neutraalsetes ja supressiivsetes ρ^- tüvedes puudub *ori* järjestus täiesti või paikneb pikema kordusjärjestuse sees ning esineb seega tunduvalt madalama sagedusega kui HS tüvede puhul. Seetõttu võib oletada, et HS mitokondriaalsete genoomide eelistatud pärandumine ρ^+ genoomidega võrreldes on tingitud suurenenud *ori* järjestuste tihedusest genoomis, mis võib anda ρ^- mtDNA-le replikatsioonilise ja/või segregatsioonilise eelise (Blanc & Dujon, 1980; deZamaroscy *et al.*, 1981).

MtDNA päranduvuse ühikuks peetakse keerukat DNA-st ning valkudest moodustuvat struktuuri - nukleoidi. On näidatud, et viimase koosseisu kuuluv kahte mitokondri membraani ühendav struktuur TMS (two membrane spanning structure) funktsioneerib autonoomse replisoomina, sidudes replikatsioonil osalevaid valke ning mtDNA-d mitokondri membraaniga. Sellesse kuuluvad mtDNA-ga seonduvad ning viimase reparatsioonis ja replikatsioonis osalevad valgud nagu Mip1 – DNA polümeraas; Mgm101 – oksüdatiivse kahjustuse tulemusel mtDNA-sse tekkivate vigade parandamises osalev valk; Abf2 – mtDNA pakkimises ja rekombinatsioonis osalev valk (Meeusen & Nunnari, 2003).

In organello valkude ristsidumisega mtDNA külge on näidatud, et lisaks eelpoolnimetatud valkudele kuuluvad nukleoidi koosseisu ka mitmed arvatavasti bifunktsionaalsed valgud nagu Kgd20 – α -ketoglutaradi dehüdrogenaasi subühik; Hsp60 – šaperon, mis osaleb mitokondrisse transporditud valkude pakkimisel, kuid seondub ka *ori* järjestustele mtDNA-s ning on oluline nukleoidide pärandumiseks (Kaufman *et al.*, 2003); Ilv5 – hargnenud ahelatega aminohapete biosünteesi raja ensüüm, millel on lisaks roll wt mtDNA alalhoidmises (Zelenaya-Troitskaya, *et al.*, 1995). Kokku detekteeriti *in organello* ristsidumisega 20 nukleoidi koosseisu kuuluvat valku, millest üheksa jäid identifitseerimata. Lisaks võib nukleoidi koosseisu kuuluda veel madala koopiaarvuga valke, mida ei suudetud detekteerida (Kaufman *et al.*, 2000).

Mitokondri replikatsioonil osalevatest valkudest on veel teada üheaahelalise DNA-ga seonduv valk (SSB) Rim1 (VanDyck *et al.*, 1992), mis DNA-le seondumise tõttu kuulub samuti nukleoidi koosseisu; mitokondriaalne RNA polümeraas Rpo41, mis on vajalik ρ^+ mtDNA säilitamiseks (Greenleaf *et al.*, 1986); DNA ligaas Cdc9, mida on vaja kromosoomide replikatsioonil Okazaki fragmentide ühendamiseks ning mis lokaliseerub nii tuuma kui mitokondrisse (ülevaade Lecrenier & Foury, 2001); Pif1 helikaas, mis funktsioneerib tuumas ja mitokondris (Lahaye *et al.*, 1991); Hmi1 helikaas, mille puhul on tegemist mitokondriaalse helikaasiga ning mis on vajalik wt mtDNA säilitamiseks 30°C

juures (Sedman *et al.*, 2000). Viimase nelja valgu puhul pole nende kuulumine nukleoidi koosseisu teada.

Antud töös on uuritud mitokondriaalset helikaasi Hmi1.

3.1.2. Helikaaside üldiseloostus

Helikaasid on laialdaselt levinud grupp ensüüme, mis on võimelised katalüüsima kaksikahelaliste nukleiinhappe molekulide lahtikeeramist. Vajalik energia ahelate vaheliste vesiniksidemete lõhkumiseks ning edasi liikumiseks saadakse 5'-nukleosiid trifosfaatide (NTP) sidumisest ning hüdrolyüsist. Seetõttu defineeritakse neid kui nukleiinhappe-sõltuvaid NTPaase. Kuna kaksikahelaliste nukleiinhapete lahtikeeramine on eelnõudeks põhilistes geneetilistes protsessides – genoomi replikatsioon, reparatsioon, rekombinatsioon, konjugatsioon, transkriptsioon, RNA protsessing ning translatsioon – on helikaasid olulisteks biokeemilisteks uurimisobjektideks (ülevaade Matson *et al.*, 1993). Helikaaside funktsiooni mitmekesisus peegeldub nende arvus pro- ja eukaryootsetes rakkudes, aga ka bakteriofaagides ja viirustes – *Escherichia coli* sisaldab vähemalt 12 erinevat helikaasi. *S. cerevisiae* genoomi analüüsi põhjal sisaldab pärm ligi 40 helikaasi geeni (ülevaade Ellis, 1997).

Helikaasidele omaseks tunnuseks on kõrgelt konserveerunud aminohappe (a-h) järjestuste - helikaasi motiivide – esinemine valgu primaarstruktuuris. A-h järjestuse võrdluse alusel võib helikaasid jagada kolme suurde ning kahte väiksemasse superperekonda (SP) sõltuvalt motiivide arvust, sarnasusest ja organisatsioonist (Gorbalenya & Koonin, 1993). Oletatavasti esindavad perekonnad helikaaside vahelist evolutsioonilist sugulust. Konserveerunud motiive kasutatakse uute helikaaside identifitseerimiseks järjestuste andmepankades.

Helikaase võib eristada substraadi eelistuse, nukleiinhappe ahela lahtikeeramise suuna, protsessiivsuse, kofaktori kasutuse ning teiste valkude mõju järgi nende aktiivsusele (ülevaade Lohman & Bjornson, 1996).

S. cerevisiae mitokondris on käesolevaks ajaks näidatud kahe DNA helikaasi - Pif1 ja Hmi1 olemasolu. Pif1 on oluline mtDNA reparatsiooniks ning säilitamiseks kõrgematel temperatuuridel, mtDNA alalhoidmiseks tavalistes kasvutingimustes ta vajalik ei ole (Lahaye *et al.*, 1991). Teine teadaolev mitokondriaalne helikaas pärmis on Hmi1.

3.1.3. Mitokondriaalne helikaas Hmi1

Hmi1 (*helicase in mitochondria*) on *S. cerevisiae* tuuma genoomi poolt kodeeritud 706 a-h pikkune ning 80575 Da suurune valk. Hmi1 omab seitset konserveerunud helikaasi motiivi ning kuulub helikaaside SP1 superperekonna UvrD alam perekonda. Ta on homoloogne *Staphylococcus aureus* PcrA ning *E. coli* Rep ja UvrD helikaasidega. Hmi1 helikaasil on *S. cerevisiae*'s olemas paraloo - Srs2 helikaas, mis lokaliseerub tuuma ning on seotud DNA meiotilise rekombinatsiooni ja reparatsiooniliste mehhanismidega (Barbour & Xiao, 2003). Hmi1 ja Srs2 helikaasid on konserveerunud N-terminaalses osas, kuid nende C-terminaalsed osad on erinevad. Nii Hmi1 kui Srs2 omavad ortolooge pärmides *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, inimeses neile ortoloogsed geenid puuduvad (Richard *et al.*, 2005).

Hmi1 puhul on tegemist 3'->5' suunalise DNA helikaasiga, mis on aktiivne monomeerina. Ta suudab efektiivselt hüdrolüüsida vaid ATP-d ning dATP-d, oluliseks kofaktoriks on Mg^{2+} (Kuusk *et al.*, 2005; Monroe *et al.*, 2005; Sedman *et al.*, 2000). Eelistatult keerab Hmi1 lahti lühikesi, kuni 30 nukleotiidi pikkuseid DNA duplekseid, olles seega distributiivne DNA helikaas (Kuusk *et al.*, 2005; Monroe *et al.*, 2005). Kaksikahelalise DNA lahtikeeramiseks vajab Hmi1 3' üleulatuvat üheahelalist DNA otsa või sisemist üheahelalist DNA fragmenti kaheahelalises DNA-s. Kaksikahelate lahtikeeramise alustamiseks vajalik 3' üksikahelalise DNA pikkus sõltub substraadi struktuurist. Viimane asjaolu võib viidata Hmi1 struktuurispetsiifilisusele (Kuusk *et al.*, 2005).

Hmi1 lokaliseerub rakus mitokondrisse. Rakuekstraktist puhastub ta välja koos mitokondri sisemembraaniga, olles sellega nõrgalt seotud (Sedman *et al.*, 2000). Hmi1 mitokondrisse importimise signaal paikneb valgu C-terminaalses otsas. Selle poolest erineb Hmi1 kõikidest teistest seni teadaolevatest mitokondriaalsetest valkudest, mille mitokondrisse transportimise signaalid asuvad kas valgu N-terminaalses otsas või harvem valgu keskel (ülevaade Neupert & Brunner, 2002). Hmi1 viimase 15 aminohappe deleteerimisel ($\Delta 15Hmi1$) valku enam mitokondrisse ei transpordita. Sarnaselt seni tuntud mitokondriaalsete importsignaalidega moodustab Hmi1 valgu transportjärjestus eeldatavalt amfipaatilise α -heeliksi (mille ühele küljele jäävad positiivselt laetud aminohappe jäägid, teine külg on aga mittepolaarne). Helikaasi importimisele mitokondrisse järgneb

protsessimine, mille käigus eemaldatakse C-terminaalne segment koos transpordisignaalliga (Lee *et al.*, 1999).

3.1.4. Hmi1 funktsioon mtDNA metabolismis

Fermenteeritaval söötmel kasvades ei ole Hmi1 pärmile eluliselt vajalik. Mittefermenteeritavatel süsinikuallikatel ei ole HMI1 deletandid aga eluvõimelised, sest kaotavad funktsionaalne ρ^+ mtDNA (Sedman *et al.*, 2000). Seega on Hmi1 helikaasil täita roll metsikut tüüpi ρ^+ mtDNA säilitamiseks. Neutraalsete ja HS ρ^- mtDNA-ga tüvede alalhoidmiseks Hmi1 vajalik ei ole, sest HMI1 deletsiooniga tüvede seas esinevad nimetatud kloonid stabiilselt. Samuti ei ole Hmi1 vajalik mtRNA transkriptsiooniks: HS mtDNA-ga HMI1 deletantides esinevad stabiilselt mtRNA transkriptid (Sedman *et al.*, 2000).

HMI1 deletsiooniga HS ρ^- tüvedes suureneb mtDNA-st moodustunud nukleoidide hulk 3-4 korda võrreldes samade tüvedega, kus ekspresseeritakse Hmi1 helikaasi; seejuures ei muutu mtDNA koguhulk raku kohta (Sedman *et al.*, 2005). Vastav asjaolu võib olla seotud HS mtDNA topoloogia muutusega HMI1 deletantides võrreldes HS tüvedega, kus Hmi1 valku ekspresseeritakse. Nimelt on viimastes esinevad kaksikahelalised DNA konkatemeerid pikemad ning samuti esineb neis üksikahelaline mtDNA, mis Hmi1 puudumisel kaob (Sedman *et al.*, 2005). Temperatuuritundliku HMI1 mutandiga (*hmi1-5*) on näidatud, et koos Hmi1 funktsiooni kadumisega kõrgel temperatuuril (37°C) mtDNA fragmenteerub ning seega võib Hmi1 olla vajalik täispika mitokondriaalse genoomi protsessiivseks sünteesiks *S. cerevisiae*'s (Sedman *et al.*, 2005).

Kuna HMI1 geeni deleteerimisel säilib ρ^- mtDNA, ei saa ta sellistes mutantsetes tüvedes olla põhiline mtDNA replikatsiooni elongatsioonis osalev helikaas. Küll võib ta aga olla seotud replikatsiooni initsiatsiooni, rekombinatsiooniliste või reparatsiooniliste protsessidega mtDNA-s. ρ^+ mtDNA-ga rakkudes võib Hmi1 aga osaleda ka replikatsiooni elongatsioonis juhul, kui ta moodustab kompleksi mõne muu replikatsioonis osaleva valguga, mille tulemusena tõuseb tema protsessiivsus küllaldase tasemeni replikatsiooni elongatsiooniks.

Väga huvitav on Hmi1 helikaasi puhul asjaolu, et mutantide hulgas, mis pole võimelised ATP-d hüdrolüüsima (Hmi1-K32M ja Hmi1-E211Q), esineb madala sagedusega selliseid kloone, mis suudavad kasvada mittefermenteeritaval söötmel ning võivad säilitada funktsionaalse ρ^+ mtDNA. Kuigi enamus selliseid mutante on

respiratoorselt defektsed, viitab respireerivate kloonide esinemine teiste hulgas sellele, et Hmi1 helikaasne aktiivsus on küll oluline, kuid mitte hädavajalik Hmi1 funktsioneerimisel wt mtDNA säilitamises ning lisaks helikaassele aktiivsusele võib Hmi1 suure tõenäosusega omada veel mõnda muud olulist, näiteks struktuurset tähtsust (Sedman *et al.*, 2005). Sellist hüpoteesi toetab asjaolu, et ka teiste *S. cerevisiae* mitokondriaalsete valkude puhul on näidatud nende bifunktsionaalsust. Näiteks on Ilv5 ühelt poolt oluline hargnenud ahelatega aminohapete biosünteesi rajas, teiselt poolt aga mtDNA jagunemisel nukleoididesse (Bateman *et al.*, 2002). *E. coli*-s on teada bifunktsionaalne helikaas PriA, mis omab ühelt poolt helikaasest aktiivsust, teisalt on aga vajalik primosoom-kompleksi moodustumiseks. Viimane funktsioon ei vaja seejuures helikaasest ega ATP-aasest aktiivsust (Zavitz & Mariani, 1992).

3.1.5. Hmi1 teised funktsioonid

Nagu eelpool mainitud, omavad mõned mitokondriaalsed valgud mitut funktsiooni, osaledes erinevates bioloogilistes protsessides. Siiani mainitud Hmi1 puudutavad tööd on püüdnud selgitada tema rolli mtDNA metabolismis ning iseloomustanud tema biokeemilisi omadusi. Lisaks on Hmi1 valku intrigeerival kombel tuvastatud aga ka mitmetes kogu *S. cerevisiae* genoomi hõlmavates skriinides, mis on püüdnud välja selgitada hoopis teistes rakulistes protsessides osalevaid valke.

Schuldineri ja kaastöötajate (1998) poolt avaldatud töös otsiti *S. cerevisiae* genoomist gene, mis sisaldavad promootoralas (40-600 bp initsiatsioonikoodonist ülesvoolu jäävas DNA piirkonnas) spetsiifilisi järjestusi, Gcn4 valgu seondumiskohti. Gcn4 puhul on tegemist transkriptsioonifaktoriga, mis on üldise aminohapete ja nukleotiidide biosünteesiraja positiivne regulaator. Kokku sisaldas 1,1% pärmi geenidest oma promootoralas vastavaid seondumiskohti. Üheks tuvastatud geeniks osutus HMI1. Kuigi sellelaadsete skriinidega on oht saada palju valepositiivseid tulemusi, on HMI1 geen üks vähestest, mis sisaldab oma promootoralas nelja Gcn4 sidumispiirkonda ning seega langeb kategooriasse, kus valepositiivsete protsent peaks eeldatavalt olema väga madal.

HMI1 on tuvastatud ka pärmi haploidsetes rakkudes kui butanooli poolt indutseeritud filamenteerumisfenotüübi täielikuks avaldumiseks vajalik geen (Lorenz *et al.*, 2000). Seejuures ei ole HM1 geeni deleteerimisel mõju diploidsetes rakkudes esile kutsutud filamenteerumisele. Ka haploidis jääb HMI1 deleteerimise mõju vaid osaliseks. Butanooli poolt indutseeritud filamenteerumine rikkas söötmes mimikeerib pärmi

filamenteerumist vastusena lämmastiku näljale ning Hmi1 helikaasi tuvastamine selles skriinis on mõnevõrra üllatuslik. Antud töös leiti veel kaks mitokondriaalset valku Mrp21 ja Msm1 (seotud mitokondriaalse valgusünteesiga), mille deleteerimine põhjustas defekti nii haploidsetes kui ka diploidsetes rakkudes. Mitokondriaalsete valkude tuvastamine selles töös võib viidata vastavate valkude lisarollile väljaspool mitokondrit, aga ka respireerimise üldisele tähtsusele filamenteerumisel (Lorenz *et al.*, 2000). Huvitaval kombel pole varasemates töödes kirjeldatud mitokondri rolli olulisust filamenteerumisenähtuse kujunemises.

Lisaks on Hmi1 leitud TOR (*target of rapamycin*) signaaliülekaneraja uurimisel kui rapamütsiini tundlikkust ja rapamütsiini inhibiitori YL-83583 resistentsust suurendav märklaud (Butcher *et al.*, 2006). Selles töös tuvastati veel rida teisi mitokondriaalseid valke. Oletatakse, et mitokondrite roll antud raja aktiveerimisele järgneva vastuse (mille üheks osaks on aeglasem kasv) kujunemisel seisneb selles, et rapamütsiini juuresolekul lülituvad rikkas söötmes kasvavad pärmirakud fermenteerimiselt (mis glükoosi kõrge kontsentratsiooni puhul on kiireim tee kasvuks piisava energiahulga tootmiseks) respireerimisele ning see on põhjuseks nende kasvu aeglustumises võrreldes fermenteerivate rakkudega. Siinkohal on oletatud pigem mitokondrite funktsiooni üldisemat rolli TOR signaaliülekanerajas kui mõne konkreetse mitokondriaalse valgu ühest tähtsust vastuse kujunemisele.

Pärmi kaksikhübridsüsteemi abil teostatud mass-skriinis, kus kontrolliti paari kaupa pea kõikide *S. cerevisiae* geenide poolt kodeeritud valkude interaktsioone, on teiste seas leitud ka Hmi1 helikaas (Ito *et al.*, 2001). Selles laiaulatuslikus katses tuvastati üle 4500 valkudevahelise interaktsiooni. Omavahel andsid positiivse tulemuse ka Hmi1 ja Mdl2. Mdl2 puhul on tegemist ABC transporteriga, mis paikneb mitokondri sisemembraanis ning mille funktsioon pole teada (Dean *et al.*, 1994). Kuna sellesarnaste mass-skriinide puhul on valepositiivsete tulemuste protsent väga kõrge, korraldame meie laboris hiljem Hmi1 ja Mdl2 vahelise interaktsiooni uurimist kaksikhübridsüsteemi abil. Paraku ei andnud need katsed positiivset tulemust (Aunin, 2005).

Kuna Hmi1-ga interakteeruvad valgud võiksid anda täiendavat infot selle kohta, millises konkreetses mtDNA metabolismiga seotud protsessis Hmi1 osaleb, on minu töö üheks ülesandeks olnud Hmi1-ga interakteeruvate valkude väljaselgitamine GAL4 põhineva kaksikhübridsüsteemi abil.

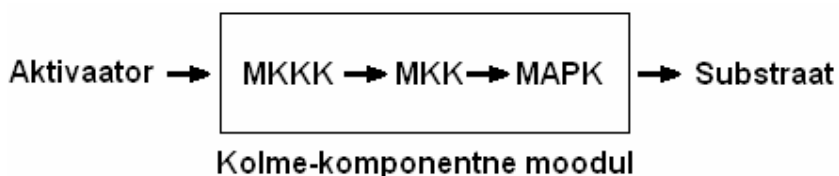
3.2. MAP kinaasid ja signaaliülekan­derajad

Pärmi genoomse raamatukogu skriinimisel kaksikhübridmeetodil Hmi1-ga interakteeruvate valkude leidmiseks tuvastati antud töös interaktsioon paar­dumisspetsiifilise MAPK raja komponendi Ste5 C-terminaalse fragmendiga. Vastava interaktsiooni uurimisele keskenduti ka edasistes katsetes. Nagu eelpool mainitud, on Lorenz ja kaastöötajate (2000) poolt avaldatud artiklis leitud HMI1 geeni mõju filamenteerumisele haploidsetes pärmirakkudes. Kuna filamenteerumise ja paar­dumise MAPK radade komponendid on osaliselt kattuvad, esitatakse järgnevalt ülevaade mõlemast rajast ning tsütoplasmaatilisest valgust Ste5.

3.2.1. Üldiselo­omustus

Rakud puutuvad pidevalt kokku väga suure hulga erinevate väliskeskkonnast tulevate signaalidega, millele tuleb leida ja aktiveerida sobilik rakuline vastus. Sellise vastuse loomist spetsiifilisele stiimulile on lihtne ette kujutada, kui igale stiimulile või sarnasele stiimulite rühmale vastab vaid üks signaaliülekan­derada, mis omakorda aktiveerib ühe sobiliku vastuse. Selline stsenaarium eeldaks aga väga suure hulga erinevate signaaliülekan­deraja komponentide olemasolu. Tegelik­kuses kasutatakse rakkudes piiratud arvu signaaliraja komponente ning sageli kasutavad erinevad rajad ühiseid vahelülisid. Üllatuslikul moel suudetakse seejuures vältida ebaspetsiifiliste vastuste tekkimine ning radadevaheline segunemine. Ühtedeks enam uuritud signaaliülekan­deradadeks eukarüootsetes rakkudes on *S. cerevisiae* MAPK (mitogeeni aktiveeritud proteiini kinaas) signaaliülekan­dekaskaadid, mis on mudeliks ühiseid komponente jagavate radade uurimisel.

MAPK-d on seriin-treoniin proteiin kinaasid, mida ekspresseeritakse kõikides eukarüootsetes rakkudes. Vastavad kinaasid ning signaaliülekan­derajad, milles nad osalevad, on kõrgelt konserveerunud pärmist inimeseni (ülevaade Widmann *et al.*, 1999). Põhiliseks MAPK raja koostisosaks on kolmekomponentne moodul, mis koosneb kolmest järjestikusest üksteise poolt fosforüleerimisega aktiveeritavast kinaasist (Joonis 2).



Joonis 2: Skemaatiline joonis MAP (mitogeeni aktiveeritud proteiini) kinaaside signaliülekanerajast.

MAPK aktiveeritakse MAPK kinaasi poolt (MAPKK ehk MKK), mis omakorda aktiveeritakse MAPK kinaasi kinaasi poolt (MAPKKK ehk MKKK). MKKK aktiveerimine toimub paljudel juhtudel suhteliselt halvasti tuntud mehhanismi abil, mis on seotud rakupinna retseptori aktiveerimisega. MKKK-sid võidakse fosforüleerida kas MAPK kinaasi kinaasi kinaasi (MKKKK) poolt või läbi interaktsiooni Ras või Rho perekonna väikese GTP-d siduva valguga. MAPK-d aktiveerivad või inaktiveerivad fosforüleerimise teel oma substraate, milleks on kõige sagedamini transkriptsioonifaktorid, aga ka erinevad ensüümid, tsütoskeleti komponendid ning järgnevad signaalraja komponendid nagu MAPK-aktiveeritud proteiini kinaasid (MAPKAPK) jt. (ülevaated Edmunds & Mahadevan, 2004; Widmann *et al.*, 1999).

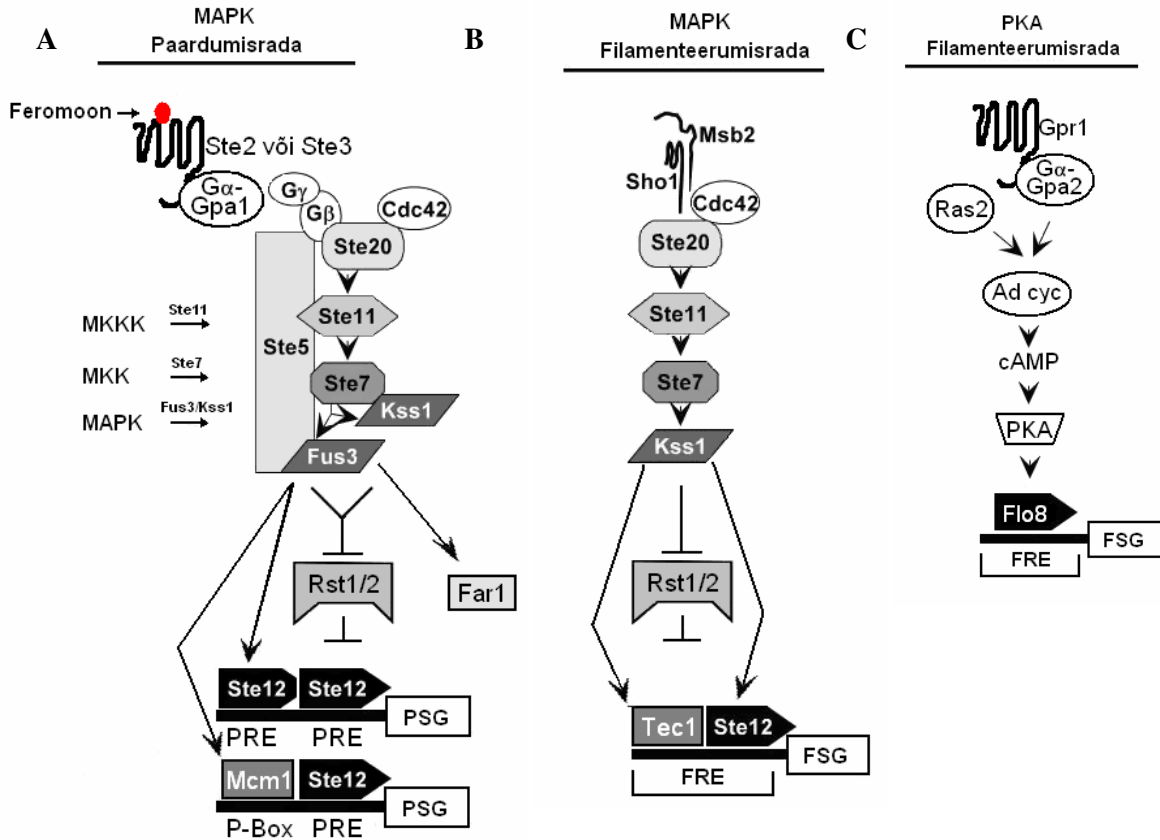
Pagaripärmis *S. cerevisiae* esineb vähemalt viis erinevat MAPK signaaliülekanerada: haploidsete rakkude paardumisrada (Joonis 3A), filamenteerumise ehk invasiivse kasvu rada (Joonis 3B), rakukesta ümbermodelleerimise rada, toitainete puuduse ehk sporuleerumise rada ning kõrge osmolaarsusega glütserooli (HOG) vastuse rada.

3.2.2. *S. cerevisiae* paardumisspetsiifiline MAPK signaaliülekanerada

S. cerevisiae haploidsete rakkude paardumisspetsiifiline MAPK signaaliülekanerada on üks paremini uuritud rakulisi vastuseid välisele signaalile eukariootses rakus. Paardumisrada käivitub, kui kaks erinevat haploidse raku tüüpi (Mat-**a** ja Mat- α) mõjutavad teineteist vastastikku, sekreteerides peptiidhormoone ehk feromoone, mis seonduvad vastas-paardumistüübi rakupinna retseptoriga. Mat-**a** rakud sekreteerivad **a**-faktorit ning reageerivad ise α faktorile; Mat- α rakud sekreteerivad aga α faktorit ning suudavad vastata vaid **a**-faktorile. Feromooni seondumisel toimub rakus rida muutusi: indutseeritakse paardumisspetsiifiliste geenide transkriptsioon, rakutsükkel jääb seisma G1 faasis ning toimub polariseeritud morfogenees ehk raku pikenemine suunas, kus on kõrgeim feromooni kontsentratsioon (lähim vastas-paardumistüübiga rakk). Selle tulemusena sünkroniseerivad paarduvad rakud rakutsükli ning pikenevad üksteise suunas.

Membraanide kokkupuutel rakud ühinevad ning tulemuseks on diploidne (Mat-a/ α) sügoot, mis läheb tagasi mitootilisse tsükklisse (Elion, 2000).

Pärmi feromooni vastuse raja uurimine algas steriilsete (STE) mutantide eraldamisega, mis pole võimelised paarduma (ülevaade Bardwell, 2004). Eelkõige ei suuda STE mutandid peatada rakutsükli või muuta raku kuju vastusena puhastatud feromoonidele (Hartwell, 1980; ülevaade Bardwell, 2004). Praeguseks on kindlaks tehtud kõik olulised paardumisraja komponendid ning määratud nende positsioon ja funktsioon vastavas rajas (Joonis 3A).



Joonis 3: *S. cerevisiae* MAPK paardumisraja (A), MAPK filamenteerumisraja (B) ja PKA filamenteerumisraja (C) skemaatilised joonised. Nooltega on tähistatud valke aktiveerivad; tõmbi otsaga nooltega inhibeerivad interaktsioonid; PRE – feromooni vastuse element, Ste12 transkriptsioonifaktori seondumiskoht; P-Box – Mcm1 transkriptsioonifaktori seondumiskoht; FRE – filamenteerumisvastuse element, Tec1 ja Ste12 transkriptsioonifaktori seondumiskoht; PSG – feromooni spetsiifiline geen; FSG – filamenteerumise spetsiifiline geen (tehtud Bardwell, 2004 järgi).

Feromooni seondumiskohaks rakupinnal on seitse korda membraani läbiv retseptor (Ste2 või Ste3), mis on seotud heterotrimeerse G valguga. Feromoon põhjustab G valgu aktiveerumise, mille tulemusena dissotsieeruvad β -subühik (Ste4) koos γ -subühikuga

(Ste18) α -subühikust (Gpa1). Vabanenud $\beta\gamma$ -subühikud aktiveerivad Ste20 ning seonduvad Ste5 tugivalgule. Sellega aktiveeritakse MAPK moodul ning järgneb aktiveerumiste kaskaad: Ste20 aktiveerib Ste11, mis aktiveerib Ste7, mis omakorda aktiveerib paarumisspetsiifilise MAP kinaasi Fus3. Viimane inaktiveerib Rst1/2 repressorid ning aktiveerib Ste12 transkriptsioonifaktori, mis käivitab paarumisspetsiifiliste geenide ekspressiooni (Joonis 3A) (ülevaade Widmann, 1999).

Kuigi pärmi MAPK paarumisrada on üks paremini uuritud signaaliülekandekaskaade, ei saa teadmisi paarumisrajast lugeda täielikeks, sest raja komponentide vaheliste interaktsioonide hulga ja keerukuse kohta laekub pidevalt lisaandmeid. Samuti pole lõplikult teada mehhanismid, millega saavutatakse paarumisraja eraldatus filamenteerumisspetsiifilisest signaaliülekanderajast, mis jagab paarumisrajaga ühiseid komponente.

3.2.3. *S. cerevisiae* filamenteerumisspetsiifiline MAPK signaaliülekanderada

S. cerevisiae filamenteerumisspetsiifiline MAPK kaskaad aktiveeritakse vastuseks mitmetele signaalidele, millest ajalooliselt tuntuim on lämmastiku nälg (Gimeno *et al.*, 1992). Filamenteerumist põhjustavad signaalmolekulid ning nende äratundmise mehhanismid rakupinnal (aga ka raku sees) pole praeguseks veel täpselt teada. On teada, et filamenteerumise esile kutsumisega on lisaks lämmastiku näljale seotud veel aminohapete kontsentratsiooni muutused raku, lämmastiku katabolismiraja komponendid, mitmesuguste alkoholide olemasolu kasvukeskkonnas ning süsinikuallikate sensorid ja süsiniku metabolismiga seotud valgud (Lorenz *et al.*, 2000; ülevaade Palecek *et al.*, 2002). Sobiva signaali olemasolul toimub pärmiraku rida morfoloogilisi muutusi. Muidu elliptilised diploidsed rakud hakkavad jagunema sümmeetriliselt, pungudes vana punga suhtes raku vastaspoolelt. Punga kasv muutub apikaalseks, mis põhjustab pikenenud tütarakkude tekke. Tekkinud rakkude pinnal eksponeeritakse adhesiooniks vajalikke faktoreid ning seetõttu jäävad tütarrakud emarakuga kleepumise tõttu seotuks. Kõige selle tulemusena tekivad pärmirakkudest filamendid: pikad üksteisega seotud rakkude ahelad ehk pseudohüüfid. Tahkel söötmel kasvades on pseudohüüfid võimelised tungima agarisse. Seetõttu nimetatakse diploidsete rakkude puhul vastavat kasvu pseudohüüfseks kasvuks (ülevaade Widmann *et al.*, 1999). Ka haploidsed rakud on võimelised tungima agarisse, kuid selline vastus ei ole sõltuv lämmastiku näljast nagu diploidsete rakkude puhul.

Haploidsete rakkude tungimist tahkesse söötmesse nimetatakse invasiivseks kasvuks ning seda on võimalik esile kutsuda pärmis kasvatamisel rikkas söötmes glükoosi ammendumisel või mitmesuguste alkoholide lisamisega kasvukeskkonda. Tulemuseks on filamenteeruvate diploididega sarnanevad haploidsed rakud. Haploidsed rakud omandavad alkoholi olemasolul ka vedelas söötmes diploididele omase fenotüübi, lämmastiku nälja tingimustes selline fenotüüp aga ei avaldu (Lorenz *et al.*, 2000, ülevaade Widmann *et al.*, 1999).

Filamenteerumisel tekkiv raku morfoloogia muutus peegeldab raku vastust toitainete vaegusele. Kui lämmastiku ja süsiniku üheagse nälja puhul käivitatakse raku sporuleerumine, mis aitaks rakul üle elada kasvuks kõlbmatuid tingimusi, siis ainult lämmastiku või ainult süsiniku vaeguse korral käivituvat filamenteerumist võib vaadelda kui rakkude liikumist nälja tingimustest eemale. Hargnevad filamendid lubavad keskkonna laiemat hoomamist väiksema energiakuluga kui mittefilamenteeruv kasv. Lisaks võib kõrge rakupinna suhe raku ruumalasse soodustada toitainete paremat transporti raku (ülevaade Palecek *et al.*, 2002).

Nagu mainitud, ei ole teadmised filamenteerumist põhjustavate signaalmolekulide ning nende äratundmise mehhanismide kohta eriti täpsed. Oluliselt rohkem teatakse aga filamenteerumisvastust reguleerivatest signaaliülekandeadest. Vastavad rajad on keerulised ning üksteisega mitmeti seotud. Kaks kõige paremini iseloomustatud rada on tsüklilise AMP (cAMP) sõltuv proteiin kinaasi (PKA) rada ja filamenteerumisspetsiifiline MAPK kaskaadi rada (Joonis 3B, C).

PKA rada stimuleerib glükoosi tunnetav G-valguga seotud Gpr1 retseptor, mis koos Ras2 valguga reguleerib läbi adenüülütsüklaasi cAMP moodustumist ja PKA aktiivsust. PKA aktiveerib mitmeid efektoreid, teiste seas Flo8 transkriptsioonifaktorit, mis omakorda käivitab filamenteerumisspetsiifiliste geenide ekspressiooni ja filamenteerumisvastuse kujunemise (Joonis 3C) (ülevaade Thevelein & de Winder, 1999).

MAPK filamenteerumisraja puhul aktiveeritakse filamenteerumist esile kutsuvate signaalide olemasolul signaaliülekanne moodul, mis koosneb järjestikku aktiveeritavatest Ste20, Ste11 ja Ste7 kinaasidest (Liu *et al.*, 1993) ning filamenteerumisspetsiifilisest MAP kinaasist Kss1, mis on inaktiivses vormis filamenteerumist pärssiv (Joonis 3B) (Cook *et al.*, 1997). Nimelt interakteerub inaktiivne Kss1 transkriptsioonifaktoriga Ste12 ning oletatavalt ka Ste12 repressorite Rst1/2-ga ning inhibeerib sellega transkriptsioonifaktori aktivatsiooni. Efektiveks invasiivseks kasvuks on vajalik Kss1 fosforüleerimine Ste7 poolt, mis muudab Kss1 inhibiitorist aktivaatoriks (Bardwell, *et al.*, 1998). Sellele järgnevalt inhibeerib MAPK Kss1 repressorid Rst1/2 ja aktiveerib Tec1 ja Ste12

transkriptsioonifaktorid, mis koos käivitavad filamenteerumisspetsiifiliste geenide ekspressiooni (Madhani & Fink, 1997). Arvatavasti reguleerib antud rada ka PKA raja üks aktivaatoritest Ras2 (Mösch *et al.*, 1996).

Mõlema raja aktiveerumise tulemusena käivitatakse diploidsetes rakkudes filamenteerumisspetsiifiliste geenide ekspressioon. Haploidsetes rakkudes on filamenteerumise käivitumiseks olulised MAP kinaaside kaskaadi komponendid (Lorenz *et al.*, 2000). Täpsed teadmised ja ülevaade PKA raja märklaudade ja PKA ning filamenteerumisspetsiifilise MAPK radade poolt reguleeritud geenide kattuvuse kohta kahjuks puuduvad.

3.2.4. Spetsiifilisuse säilitamine ühiseid komponente kasutavate radade vahel

Nagu Jooniselt 3A ja 3B näha, jagavad paardumise ja filamenteerumise signaalirajad väga palju ühiseid komponente alates signaaliülekanDEMooduli aktivaatorist Ste20, mooduli koostisosadest Ste11 ja Ste7 ning lõpetades ühise transkriptsioonifaktoriga Ste12. Siiski suudetakse spetsiifilise signaali olemasolul tagada vaid sobiliku vastuse tekkimine. Spetsiifilisuse säilitamiseks kasutatakse mitmeid erinevaid mehhanisme (ülevaade Schwartz & Madhani, 2004).

Esmalt kasutavad erinevad rajad erinevaid MAP kinaase. Paardumisraja spetsiifiliseks MAP kinaasiks loetakse Fus3-e. Fus3 ekspresseerub vaid haploidsetes rakkudes (Liu *et al.*, 1993) ning seega ei saa olla osaline diploidses filamenteerumisrajas. Filamenteerumise puhul on MAP kinaasiks nii haploidsetes kui diploidsetes rakkudes ekspresseeruv Kss1.

Siiski pole vaid ühe spetsiifilise MAPK aktiveerimine erinevate radade korral absoluutne. Nimelt võib Kss1 osaliselt asendada Fus3-e funktsiooni ning vaid mõlema MAPK üheaegne deletsioon põhjustab pärmirakkude steriilsuse (ülevaade Madhani & Fink, 1998). Feromooni olemasolul aktiveeritakse paardumisspetsiifiliste geenide ekspressioon ka Fus3 deletsiooniga tüvedes, oletatavasti tänu Kss1 olemasolule (Breitkreutz *et al.*, 2001). Fus3-e paardumisraja spetsiifilisus võrreldes Kss1-ga arvatakse olevat seotud mittetranskriptsiooniliste faktorite moduleerimisega Fus3 poolt (paardumisraja jaoks spetsiifiliste substraatide aktiivsuste reguleerimisega, millele ei järgne transkriptsioonilisi muutusi). Kss1 võime osaliselt Fus3 asendada võiks olla tingitud aga sellest, et filamenteerumis- ja paardumisradade poolt transkriptsiooniliselt reguleeritud

geenid on osaliselt kattuvad (Breitkreutz *et al.*, 2001; Zeitlinger *et al.*, 2003). Kuna Kss1 deletandid ei oma paardumise defekte, oletati algselt, et Kss1 aktiveeritakse ning ta asendab Fus3-e vaid viimase puudumisel. Tänapäevaks on siiski näidatud, et feromooni signaali korral aktiveeritakse Kss1 ka intaktse Fus3-ga tüvedes ning et kaks MAPK töötavad koos, et reguleerida paardumisspetsiifiliste geenide ekspressiooni (Sabbagh *et al.*, 2001). Paardumisraja spetsiifilisus võidakse seejuures tagada sellega, et feromooni olemasolul saavutatakse Kss1 aktiveerumine vaid osaliselt ja suhteliselt lühiajaliselt (tänu Fus3 poolt aktiveeritud tagasisidemega Kss1 vaigistamisele), mis pole piisav filamenteerumisspetsiifilise vastuse kujunemiseks. Pikaajaline Kss1 aktiveerumine põhjustab aga filamenteerumisspetsiifiliste geenide ekspressiooni (Sabbagh *et al.*, 2001). Seega on Kss1 aktiveerumise ulatus ja kestus feromooni vastuse puhul piiratud ning spetsiifilise vastuse kujunemine võib olla sõltuv konkreetse MAPK aktiivsuse dünaamikast.

Kuigi mõlemad rajad jagavad ühist märklauda - transkriptsioonifaktorit Ste12, aitavad spetsiifilist vastust tagada kummagi raja jaoks spetsiifilised substraadid. Feromooni olemasolul aktiveerib Fus3 peale Ste12 veel paljusid substraate, teiste seas ka paardumisrajale spetsiifilist valku Far1, mis peatab rakutsükli ning on vajalik raku polariseeritud kasvuks (Joonis 3A, B) (Elion *et al.*, 1993). Far1 ei ole Kss1 substraadiks. See-eest aktiveeritakse Kss1 poolt filamenteerumisspetsiifiline transkriptsioonifaktor Tec1. Ste12 koos Tec1-ga seonduvad filamenteerumise vastuse elementidele (FRE – *filamentation response element*) (Madhani & Fink, 1997) paljude filamenteerumisspetsiifiliste geenide promootoralas (Zeitlinger *et al.*, 2003). Seega on filamenteerumisspetsiifiliste geenide ekspressiooniks vajalik mõlema aktiivse transkriptsioonifaktori samaaegne olemasolu. Paardumisraja aktiveerimisel Tec1-te ei aktiveerita ning Ste12 seondub feromooni vastuse elementidele (PRE – *pheromone response element*), aktiveerides paardumisspetsiifiliste geenide ekspressiooni (Joonis 3A) (Dolan *et al.*, 1989). Osade paardumisraja spetsiifiliste geenide ekspressioon aktiveeritakse Ste12 poolt üksi, teiste jaoks on vajalik aga transkriptsioonifaktori Mcm1 olemasolu (Madhani & Fink, 1998). Lisaks suunatakse Tec1 paardumisraja MAP kinaasi Fus3 poolt degradeerimisele ning sellega saavutatakse konkureeriva raja inhibitsioon (Bao *et al.*, 2004), mis aitab läbi ebaspetsiifiliste vastuste blokeerimise samuti kaasa spetsiifilise vastuse kujunemisele.

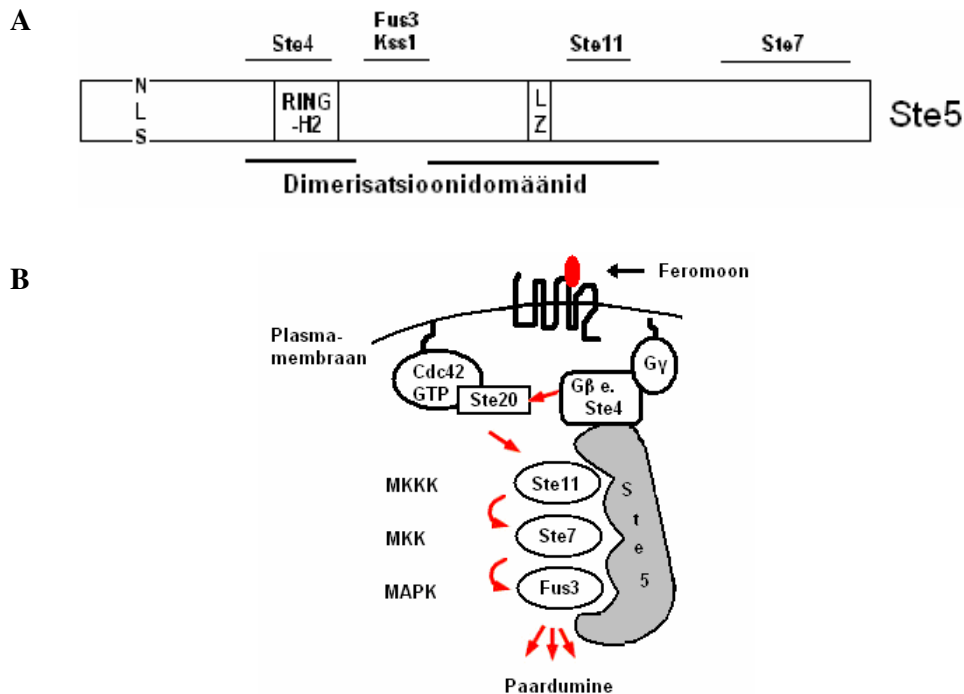
Veel üheks oluliseks spetsiifilisuse säilitamise mooduseks on ühes rajas osalevate kinaaside koondamine ühtsesse kompleksi läbi valk-valk interaktsioonide. Sellise

kompleksi moodustumine võib toimuda *scaffold* ehk tugivalgu abil, mis seob korraga mitmeid raja komponente. Paardumisraja tugivalguks on Ste5 (Joonis 3A). Filamenteerumisrajas sellist tugivalgu leitud pole, kuid on oletatud, et paardumisraja tugivalk on piisav kahe komponente jagava raja füüsiliseks eraldamiseks ning signaaliülekanne lekkimise takistamiseks erinevate radade vahel (Yashar *et al.*, 1995).

3.3. Paardumisspetsiifiline tugivalk Ste5

3.3.1. Ste5 roll paardumisrajas

Esimeseks kirjeldatud tugivalguks, mille peamiseks funktsiooniks on ühes signaaliülekanderajas osalevate valkude sidumine, oli *S. cerevisiae* paardumisraja spetsiifiline tugivalk Ste5. Teadaolevalt puuduvad Ste5 homoloogid, ta ekspresseerub vaid haploidsetes rakkudes ning on vajalik ainult paardumisraja komponendina (ülevaade Elion, 2001). Kaksikhübriidmeetodi ning immunosadestamisega on näidatud, et Ste5 interakteerub paardumisraja MAPK mooduli komponentide Ste11, Ste7, Fus3 ja Kss1-ga (Choi *et al.*, 1994; Printen & Sprague, 1994; Marcus *et al.*, 1994). Ste5 interakteerub nende kinaasidega üheaegselt erinevate seondumiskohtadega (Joonis 4A) ning liigub glütserooli gradiendis suure molekulmassiga kompleksina, mille järgi võib oletada, et kõik valgud kompleksis esinevad dimeeridena. Ste5 soodustab ka Ste11 ja Ste7 vahelisi interaktsioone (Choi *et al.*, 1994; Marcus *et al.*, 1994).



Joonis 4: A – Ste5 valgu lineaarne skeem. NLS- tuuma lokalisatsioonisignaal; LZ – leutsiinilukk; skeemi all on kujutatud Ste5 dimeriseerumiseks olulised piirkonnad; skeemi ülemises osas on tähistatud piirkonnad, millega interakteeruvad näidatud valgud (tehtud Wang & Elion, 2003 järgi). B – Ste5 ja temaga seotud valkude kompleks skemaatiliselt kujutatuna. Nooltega on tähistatud signaali ülekande (tehtud Elion, 2001 järgi).

Lisaks eelpoolnimetatud valkudele interakteerub Ste5 feromooni sõltuvalt veel G valgu β -subühikuga Ste4. Ste4 seondumiskiirkonda Ste5-es jääb tsüsteiinirikas ala – RING H2 motiiv (Joonis 4A) (Inouye *et al.*, 1997b). Peale paardumisraja komponentide interakteerub Ste5 arvatavasti ka raku polaarsust määrava kompleksiga (ülevaade Elion, 2001).

Ste5 tugivalgu olemasolul rakus põhjustab feromooni esinemine kasvukeskkonnas kolmekomponentse kaskaadi aktiveerumise ning MAPK Fus3 aktiveerumise, millega saavutatakse normaalse paardumisvastuse kujunemine. Ste5 puudumisel kaskaadi ei aktiveerita (ülevaade Bardwell, 2004). Seetõttu on oletatud, et Ste5 suurim tähtsus seisneb Ste11, Ste7 ja Fus3 üheaegses sidumises, millega suurendatakse nende efektiivne kontsentratsioon tugivalgul ja soodustatakse signaaliülekannet läbi kinaaside üksteisele lähendamise (ülevaade Ferrell & Cimprich, 2003).

Kinaasikaskaadi komponentide lähendamise tähtsuse kasuks räägib töö, kus konstrueeriti kahest tugivalgust – Ste5 ning osmootse stressi raja tugivalgust Pbs2 koosnev liitvalk (Park *et al.*, 2003). Sellise strateegia puhul kasutati ära asjaolu, et mõlema raja ühiseks komponendiks on kinaas Ste11. Mutageneesi abil rikuti Ste5 tugivalgus Ste11-st allavoolu jääva kinaasi (Ste7) seondumiskoht ning Pbs2 valgus signaaliülekande algusesse, Ste11-st ülesvoolu jäävate valkude seondumiskohad. Kui Ste5 ja Pbs2 topelt-deletantides ekspresseeriti kirjeldatud liitvalku, suutsid rakud osmootse stressi tingimustes ellu jääda vaid feromooni olemasolul. Sellised rakud olid steriilsed ning ei suutnud aktiveerida osmootse stressi vastust kõrge soola kontsentratsiooni tingimustes. Feromooni olemasolul aktiveeritud transkriptsiooniline vastus oli aga peaaegu identne metsikut tüüpi osmootse vastusega (Park *et al.*, 2003). Sellest tulenevalt võib järeldada, et kinaasikaskaadi komponentide üksteisele lähendamine on piisav ja ehk ka olulisim aspekt funktsionaalse raja tekitamiseks ning et see ongi Ste5 (jt. tugivalgude) üks tähtsamaid rolle.

Lisaks on oletatud, et Ste5 tugivalk võib aidata raja komponente üksteise suhtes õigesti orienteerida ning välistada valede komponentide osalemise vastavas rajas (ülevaade Ferrell & Cimprich, 2003). Komponentide füüsiline sidumine tugivalguga võib takistada aktiveeritud kinaaside kiiret lekkimist valedesse radadesse nagu näidatud aktiveeritud Ste7 mutantidega, mis suudavad teisi MAPK kaskaade Ste5 puudumisel aktiveerida oluliselt efektiivsemalt (Yashar *et al.*, 1995).

Veel üheks oluliseks Ste5 rolliks on kolmekomponentse kinaasimooduli lokaliseerimine plasmamembraanile läbi Ste4-ga seondumise. Ste5 tugivalgu abil tuuakse Ste11 ning sellest allavoolu jäävad kinaasid Ste20-e lähedusse, mis lokaliseerub samuti

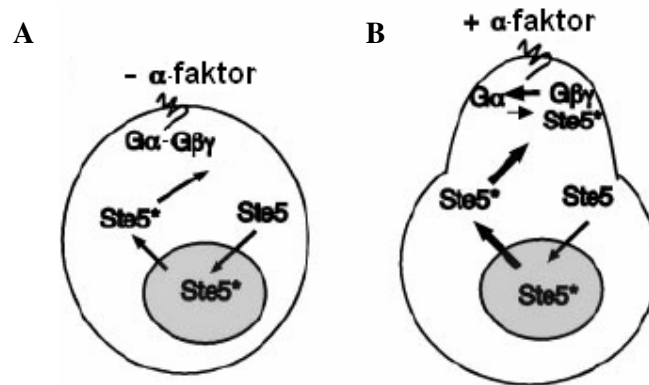
plasmamembraanile ning feromooni olemasolul interakteerub Ste4-ga (Joonis 4B). Ste5 tugivalgu interaktsioon Ste4-ga ning Ste20 valgu olemasolu plasmamembraanil on vajalikud ning piisavad signaali ülekandmiseks Ste11 kinaasile ning tema aktiveerimiseks (ülevaade Elion, 2001). On näidatud, et Ste5 kunstlik membraanile ankurdamine (transmembraansete domäänide lisamisega Ste5 külge) mimikeerib feromooni olemasolu aktiveerides paardumisrada ning kaotab vajaduse tugivalgu seondumiseks Ste4-ga. Ste20 puudumisel see efekt aga kaob, viidates Ste20 tähtsusele kinaasikaskaadi aktiveerimisel (Pryciak & Huntress, 1998).

3.3.2. Ste5 lokalisatsioon rakus

GFP-Ste5 hübriidvalgu abil on näidatud, et ta paikneb rakus nii tsütoplasmas kui tuumas, lokaliseerudes feromooni puudumisel peamiselt tuuma (Pryciak & Huntress, 1998; Mahanti *et al.*, 1999). Feromooni lisamisel kontsentreerub Ste5 kiiresti paardumisel tekkiva raku pikenenud osa (projektsiooni) tippu plasmamembraani lähedal, kuid esineb endiselt difuusselt ka tsütoplasmas. Tuumas paikneva Ste5 hulk kaob seevastu α -faktori lisamisel peaaegu täielikult juba 5 minuti jooksul (Mahanti *et al.*, 1999; Pryciak & Huntress, 1998).

Ste5 mutantide lokalisatsiooniuuringute põhjal on oletatud, et tuuma läbimine on vajalik Ste5 normaalseks funktsioneerimiseks ning tema aktiveerumiseks feromooni olemasolul (aktiveeritud Ste5 all peetakse silmas tugivalgu sellist olekut, kus ta käivitab paardumisrada konstitutiivselt). Nimelt ei suuda Ste5 mutandid, mis lokaliseeruvad vaid tsütoplasmasse (Ste5 $\Delta 49-66$, deleteeritud tuumalokalisatsioonisignaali (NLS) mutant) või ainult tuuma (TAg^{NLS}-Ste5, lisa NLS-iga mutant) komplementeerida STE5 geeni deletsiooni ei üksi ega koos ekspresseerituna (Mahanti *et al.*, 1999). Samas töös uuriti järgnevalt vaid tuuma lokaliseeruvaid Ste5 mutante *nsp1*-temperatuuritundlikes tüvedes, kus valkude transport tuuma on kõrgematel temperatuuridel blokeeritud, tuumast välja aga mitte. Sellistes tüvedes indutseeriti TAg^{NLS}-Ste5 ekspressioon normaalsetel kasvutemperatuuridel, seejärel ekspressioon represseeriti ning rakke inkubeeriti kõrgematel temperatuuridel, et inaktiveerida valkude transport tuuma. Selle tulemusena akumulerus muidu vaid tuuma lokaliseeruv TAg^{NLS}-Ste5 3h jooksul tsütoplasmasse ning ankurdati α -faktori olemasolul plasmamembraanile, lubades oletada, et normaalsetes tingimustes plasmamembraanile lokaliseeruv Ste5 pärineb just tuumast. Kolmanda Ste5 mutandiga, mis lokaliseerus rohkem tuuma võrreldes tsütoplasmaatilise Ste5 mutandiga ning rohkem

tsütoplasmasse võrreldes vaid tuuma lokaliseeruva Ste5 mutandiga (kuid vähem tsütoplasmasse ja rohkem tuuma kui wt Ste5) näidati, et selline mutant põhjustab rakkude suurenemist ning paardumisele omase projektsiooni teket pidevalt ka ilma α -faktori olemasolul. Samuti indutseerivad sellised mutandid paardumisspetsiifilise geeni FUS1 ekspressiooni ning rakutsükli peatumise G1 faasis (Mahanti *et al.*, 1999). Sellest tulenevalt on välja pakutud mudel, mille kohaselt on tuuma läbimine vajalik Ste5 plasmamembraanile ankurdamiseks ning paardumisspetsiifilise signaaliraja aktiveerimiseks feromooni olemasolul (Joonis 5).



Joonis 5: Mudel Ste5 lokaliseerumise kohta raku α -faktori puudumisel (A) ning olemasolul (B). Nooled tähistavad valkude liikumise suunda, paksemate nooltega on tähistatud liikumise intensiivistumist (Mahanti *et al.*, 1999), * tähistab Ste5 aktiveerimist.

3.3.3. Ste5 oligomeriseerumine ja konformatsioonilised muutused

Nagu eelpool kirjeldatud, suudab Ste5 siduda samaaegselt mitmeid erinevaid valke ning lokaliseerub olenevalt väliskeskkonna tingimustest raku erinevatesse osadesse. Arvatavasti omab Ste5 ka konformatsioonilise ja oligomeriseerumise seisukohast mitmeid erinevaid vorme. Kuna Ste5 tugivalgu kristallstruktuur pole tänaseks välja selgitatud, on kõik oletused tema konformatsiooniliste muutuste ja oligomeriseerumise kohta kaudsed.

Esmalt viitavad Ste5 oligomeriseerumisele tööd, kus on näidatud, et kahe erineva paardumisdefektiga Ste5 mutandi samaaegne ekspresseerimine STE5 deletsiooniga tüvedes taastab raku võime paarduda (Yablonski *et al.*, 1996; Inouye *et al.*, 1997a). Inouye ja kaastöötajate poolt (1997) avaldatud töös tehti rida Ste5 punktmutante, mis polnud võimelised siduma kas Ste11 kinaasi või Ste7 kinaasi. Kui Ste11 sidumise poolest defektseid või Ste7 sidumise poolest defektseid mutante ekspresseeriti STE5 deletsiooniga tüvedes ühekaupa, oli paardumisraja käivitamise efektiivsus märgatavalt alanenud. Kui raku ekspresseeriti Ste11 ja Ste7 sidumise poolest defektseid mutante koos, aktiveeriti

paardumisrada normaalsel tasemel, viidates interalleelse komplementatsiooni olemasolule (Inouye *et al.*, 1997a).

Otsesemalt toetavad Ste5 dimeriseerumist või oligomeriseerumist kaksikhübriidmeetodiga tehtud katsed, kus on näidatud interaktsioone Ste5 erinevate fragmentide vahel. Selle abil on määratud ka dimeriseerumiseks vajalikud regioonid (RING-H2 regioon ning leutsiini-rikas regioon; Joonis 4A) (Yablonski *et al.*, 1996). Hiljem on immunosadestamisega näidatud, et dimeriseerumiseks olulisim regioon on RING-H2 domään, kuna leutsiini-rikka regiooni osaline deleteerimine ei põhjusta veel dimeriseerumise täielikku kadu (Wang & Elion 2003).

Kuna Ste7, Ste11, Fus3 või Ste4 deleteerimine ei kahanda dimeriseerumist kaksikhübriidkatsetes, võib oletada, et Ste5 – Ste5 interaktsioon on otsene ning ei sõltu Ste5-ga seonduvatest valkudest. Ste5 dimeriseerumist on kinnitatud ka immunosadestamisega (Yablonski *et al.*, 1996). Kui erineva pikkusega Ste5 fragmente ekspresseeriti temperatuuritundlikes paardumisdefektiga Ste5 tüvedes, suutsid vaid need fragmendid, mis olid vajalikud dimeriseerumiseks kaksikhübriidsüsteemis, komplementeerida paardumisdefekti. Seetõttu on oletatud, et dimeriseerumine on vajalik Ste5 funktsiooni täitmiseks.

Ste5 dimeeride teket soodustab tugivalgu sidumine GST domääniga tänu GST homodimeriseerumisele (Inouye *et al.*, 1997b; Wang & Elion, 2003). GST-Ste5 ekspresseerimine madalal tasemel Ste5 promootorilt põhjustab paardumisraja pideva aktiveerumise ning liitvalgu lokaliseerumise plasmamembraanile ka ilma α -faktorita (Wang & Elion, 2003). Sellest on veel kord järeldatud, et oma aktiivses vormis ehk paardumisrada indutseerivas olekus on Ste5 dimeerne. Paardumisraja aktiveerimiseks ei piisa aga ainult Ste5 dimeriseerumisest, kuna Ste4 deleteerimisel GST-Ste5 võime rada aktiveerida kaob (Wang & Elion, 2003).

Immunosadestamisega on kindlaks tehtud, et natiivsel tasemel ekspresseeritud epitoobiga liidetud Ste5 valkude dimeerid moodustavad kogu Ste5 hulgast vähem kui 1%. Seega on enamus rakus olevast Ste5 suure tõenäosusega monomeerses vormis ning dimeriseerumise puhul võib tegu olla rangelt reguleeritud protsessiga, mis on vajalik feromooni vastuse kujunemiseks (Wang & Elion, 2003).

Nagu eelpool kirjeldatud, on Ste5 lokaliseerumist puudutavate katsete põhjal järeldatud, et Ste5 aktiveerimiseks on vajalik valgu liikumine läbi tuuma. Dimeriseerumise katsetest tulenevalt piisab Ste5 aktiveerimiseks aga selle kunstlikust dimeriseerimisest

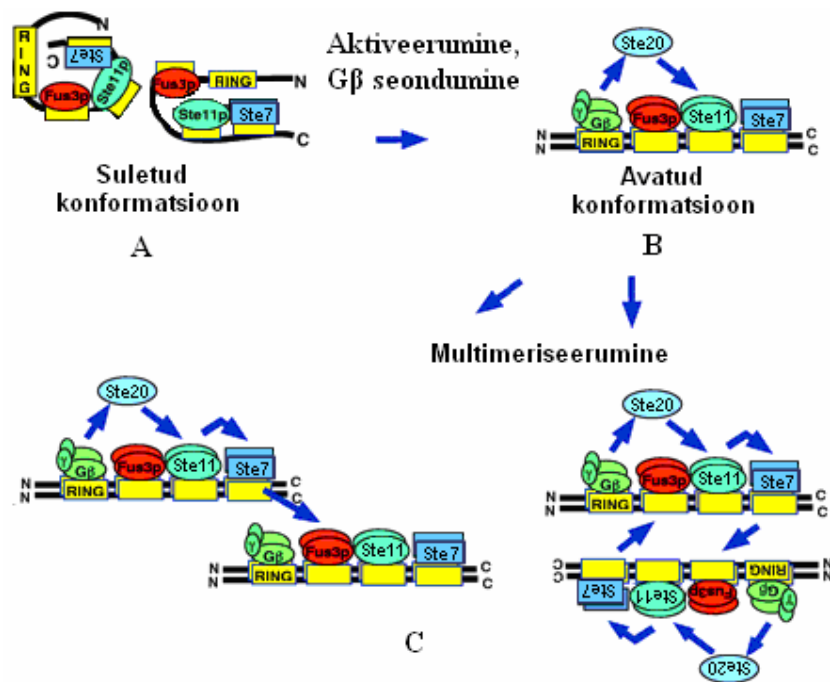
GST domääni abil. Sellest tulenevalt on esitatud küsimus, kas ja kuidas on Ste5 lokaliseerimine ja dimeriseerumine omavahel seotud.

Sellele küsimusele vastamiseks liideti eelpool kirjeldatud vaid tuuma lokaliseeruva TAg^{NLS}-Ste5 mutandile (mis pole võimeline lokaliseeruma tsütoplasmasse ning aktiveerima paardumisrada) GST domään. Selle tulemusena saadi liitvalk, mis lokaliseerus α -faktori puudumisel tuuma ning ei suutnud aktiveerida paardumisrada. α -faktori olemasolul transporditi eeldatavalt dimeerne GST-TAg^{NLS}-Ste5 liitvalk aga oluliselt efektiivsemalt tsütoplasmasse kui TAg^{NLS}-Ste5 ning paardumisrada aktiveeriti normaalsel tasemel, mida TAg^{NLS}-Ste5 ilma GST domäänita teha ei suutnud. Sellest tulenevalt on järeldatud, et Ste5 oligomeerseid vorme võidakse transportida tuumast välja efektiivsemalt kui monomeere (Wang & Elion 2003).

Lisaks dimeriseerumisele võib Ste5 tugivalk esineda suure tõenäosusega ka mitmes erinevas konformatsioonis (Joonis 6). Immunosadestamisega on näidatud, et *E. coli* rakulüsaadist puhastatud GST domääniga seotud Ste5 N-terminaalne osa (a-h 1-518) on võimeline siduma *in vitro* transleeritud Ste5 C-terminaalset osa (a-h 520-917) (Sette *et al.*, 2000). N- ja C-terminaalsete fragmentide vahelised interaktsioonid on veelgi tugevamad, kui neisse viia Ste5 aktiveerivad mutatsioonid (P44L N-terminusse ning S770K C-terminusse), millede esinemisel täispikas Ste5 valgus on paardumisrada pidevalt aktiveeritud ka Ste4 puudumisel (Sette *et al.*, 2000). Arvatakse, et need mutatsioonid mõjutavad Ste5 aktiveerumist tänu N- ja C-terminaalsete osade vahelise interaktsiooni moduleerimisele, millele järgneb hüpoteetiliselt konformatsiooniline muutus Ste5 tugivalgus. Sellele võib omakorda järgneda Ste5-ga seonduvate kinaaside ümberpaigutumine üksteise suhtes. Küsimusele, kas Ste5 N- ja C-terminaalsed osad interakteeruvad intra- või intermolekulaarselt, hetkel vastus puudub.

Hüpoteesi Ste5 tugivalguga toimuda võivatest konformatsioonilistest muutustest toetavad katsed Ste5 mutantidega (Ste5 Δ 474-487 ja Ste5L482/485), mis dimeriseeruvad immunosadestamise katsetes oluliselt paremini kui wt Ste5 ning suudavad samas efektiivsemalt siduda Ste4 ning Ste7 (valke, mille seondumiskohad Ste5 primaarstruktuuris jäävad vastavalt N- ja C-terminusse, Joonis 4A) (Wang & Elion, 2003). Sellest tulenevalt on oletatud, et vastavad mutandid omavad modifitseeritud konformatsiooni, mille puhul on RING-H2 domään kättesaadavam oligomeriseerumiseks ja Ste4-ga seondumiseks ning Ste5 C-terminaalne osa paremini ligipääsetav interaktsiooniks Ste7-ga (Joonis 6B) (Wang & Elion, 2003).

Nagu kirjeldatud katsetest näha, põhinevad kõik Ste5 oligomeriseerumist ning konformatsioonilisi muutusi puudutavad hüpoteesid kaudsetel tõenditel. Üks mudel, mis suudab hõlmata enamikku Ste5 konformatsiooni ja oligomeriseerumise kohta avaldatud tulemusi, avaldati E. A. Elioni ülevaates (2001). Selle nn “alternatiivse mudeli” kohaselt võib Ste5 eksisteerida kahes vormis (Joonis 6).



Joonis 6: Mudel Ste5 erinevate alternatiivsete konformatsioonide kohta rakus. A – Ste5 suletud konformatsioon; B – Ste5 avatud ehk aktiivne konformatsioon; C – Ste5 aktiivsete konformatsioonide multimeriseerumine. Ste5 on kujutatud musta joonega, mille paiknevad kollased kastid tähistavad Ste5-ga interakteeruvate valkude seondumiskohti; N tähistab valgus N-terminaalset, C C-terminaalset otsa. Ovaalidega on tähistatud Ste5-ga interakteeruvad valgud, nooled tähistavad signaaliülekande suunda (Elion, 2001).

Vähem aktiivse, suletud monomeeri puhul ei ole Ste5 RING-H2 regioon, mis on vajalik Ste4 sidumiseks ning oligomeriseerumiseks, Ste4-le kättesaadav ning signaaliülekande on takistatud (Joonis 6A). Aktiivses vormis (avatud konformatsioonis) moodustab Ste5 di- või multimeere, kus Ste4 seondub RING-H2 regioonile ning Ste5 tugivalgu N- ja C-terminaalsed osad on vabad kinaaside sidumiseks ja üksteisega seotud multimeeride tekkeks (Joonis 6B, C). Selline avatud konformatsioon teeb Ste11 kinaasi Ste20-le kättesaadavaks ning aitab teised kinaasid üksteise suhtes õigesti orienteerida järjestikuseks aktiveerimiseks.

Mudeli avatud konformatsiooni puhul ei saa Ste5 N- ja C-terminus intramolekulaarselt seonduda ning vastavate interaktsioonide tulemusena erinevate Ste5

molekulide vahel saavutatakse kõrvuti olevate dimeeride multimeriseerumine. Ste5 multimeriseerumine plasmamembraani lähedal ja Ste5-st koosneva võrgustiku moodustumine seletaks ka asjaolu, miks Ste5 on lokaliseeritud uuringutes ankurdatuna plasmamembraanile nii hästi visualiseeritav (ülevaade Elion, 2001).

Vaatamata sellele, et Ste5 valguga on suur kogus informatsiooni tema rollist pärmi paardumisrajas, spetsiifilisuse säilitamise osast erinevate radade vahel, interaktsioonidest teiste valkudega, lokaliseerumisest rakus ja konformatsioonilistest muutustest, ei paista selle huvitava tugivalgu puhul ühegi nimetatud valdkonna uurimine veel niipea ammenduvat ning hüpoteesidest kindlate faktideni jõudmiseks on vaja koguda veel palju lisaandmeid.

4. TÖÖ EESMÄRK

Käesoleva töö eesmärgiks on leida *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalse helikaasi Hmi1-ga interakteeruvad valgud kaksikhübridsüsteemi abil, kinnitada interaktsioonide olemasolu immunosadestamisega ning kontrollida tuvastatud interaktsioonide funktsionaalsust erinevate raku- ja molekulaarbioloogiliste meetoditega.

5. MATERJALID JA MEETODID

5.1.1. Rakutüved ja nende kasvatamine

Tabel 1: Töös kasutatud rakutüved

Tüvi	Genotüüp	Päritolu
<i>S. cerevisiae</i> tüved		
CG1945	(MAT- a <i>ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3,112 GAL4-542 gal80-538 cyh^r2 LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3 URA3::GAL4₁₇mers(λ3)-CYC1_{TATA}-lacZ)</i>	Clontech Laboratories, Inc
W303	(Mat- a <i>ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>)	Wallis <i>et al.</i> , 1989
Σ 1278	(Mat- a <i>ura3-1 leu2-3,112</i>)	Dr. Steffen Rupp, Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik
Σ 1278 Δ rpo41	(Mat- a <i>rpo41::ura3 leu2-3,112</i>)	Valmistatud selles töös
Σ 1278 Δ hmi	(Mat- a <i>hmi1::ura3 leu2-3,112</i>)	Valmistatud Priit Jõersi poolt
<i>E. coli</i> tüved		
DH5 α	(F'phi80dlacZ delta(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, m k+) <i>phoA supE44 lambda-thi-1 gyrA96 relA1/F' proAB+ lacIqZdeltaM15 Tn10(tetr)</i>)	Hanahan, 1983
HB101	(<i>leuB6, proA2, recA13, thi-1, ara-14, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, rspL20, supE44, hsdS20</i>)	Lacks & Greenberg, 1977

Pärmi kasvatati 30°C juures YPD söötmel [1% pärmiekstrakt, 2% peptoon, 2% glükoos]. Selektiivse söötmena kasutati SM [2% glükoos, 0,2% drop-out mix (inositool; para-aminobensoehape; lämmastikalustest adeniin ja uratsiil; aminohapetest olid välja jäätud plasmidi selekteerimiseks vajalikud aminohapped), 0,67% lämmastikalused]. GST-*pulldown* katsetes sisaldas SM 2% glükoosi asemel 2% rafinoosi ning valkude ekspressioon indutseeriti galaktoosi lisamisega lõppkontsentratsioonini 2%. Tardsöötmete tegemisel lisati 1,75% agarit.

E. coli DH5 α ja HB101 kasvatati 37°C juures LB söötmel [1% trüptoon, 1% NaCl, 0,5% pärmiekstrakt], 2YT söötmel [1,6% trüptoon, 1% pärmiekstrakti, 0,5% NaCl] või M9-Leu söötmel [2% glükoos, M9 soolad (48mM Na₂HPO₄·12H₂O; 22mM KH₂PO₄; 4,2mM NaCl; 8mM NaH₄Cl), -Leu drop-out mix, 2mM MgSO₄, 6x10⁻⁵% vitamiin B1]. Plasmidi selektsiooniks lisati ampitsilliini lõppkontsentratsioonini 100µg/ml. Kompetentsete rakkude tegemisel lisati söötmele 20mM MgSO₄. Tardsöötmete tegemisel lisati 1,75% agarit.

5.1.2. Vektorid

Kaksikhübridsüsteemi katsetes kasutati pAS2-1, pGBT9 ja pGADGH vektoreid (Lisa 1) (CLONTECH Laboratories, Inc).

pAS2-1 vektor sisaldab *S. cerevisiae* täispikka ADH1 promootorit ning sellelt vektorilt ekspresseeritakse valke stabiilselt kõrgel tasemel. ADH1 promootorile järgneb GAL4 DNA sidumisdomeeni (bd) kodeeriv järjestus, mis sisaldab endas NLS-i. Selle taga paikneb multikloneerimiskoht (MCS), mille taga asub ADH1 terminaator. Tegemist on *shuttle* vektoriga, mis replitseerub autonoomselt nii *E. coli* 's kui *S. cerevisiae* 's, sisaldades vastavalt Col E1 ning 2 μ replikatsiooni alguskohti. Vektor kannab ampitsilliiniresistentsusgeeni ja TRP1 geeni selektsiooniks vastavalt bakteris ja pärmis. pAS2-1 vektorist ekspresseeritakse hübriidvalku, mille algusesse jääb GAL4 DNA-bd koos NLS-ga ning lõppu MCS-i kloneeritud järjestuse poolt kodeeritud valk (Lisa1).

pGBT9 vektorit kasutati positiivse kontrollvalgu Snf1 ekspresseerimiseks. See vektor on sarnane pAS2-1-ga, ainsaks erinevuseks on ADH1 promootor, mis pGBT9 puhul on osaline. Seetõttu on positiivse kontrollvalgu Snf1 ekspressioon madalam võrreldes pAS2-1 vektorist ekspresseeritavate valkudega. Kuna positiivne kontroll töötab väga hästi ka pGBT9 vektorist ekspresseerituna, oli vastav konstrukt sobilik kasutamiseks kaksikhübridsüsteemi kontrollina (Lisa1).

pGADGH vektor sisaldab *S. cerevisiae* täispikka ADH1 promootorit, mille taga asub GAL4 aktivatsioonidomeeni (ad) kodeeriv järjestus koos SV40 NLS-iga. Sellele järgneb MCS, mille taga asub ADH1 terminaator. Ka pGADGH on *shuttle* vektor, sisaldades Col E1 ning 2 μ replikatsiooni alguskohti. Selektioonimarkeriteks ampitsilliiniresistentsus ning LEU2 geenid. pGADGH vektorist ekspresseeritakse liitvalku, mille algusesse jääb GAL4-ad ning NLS, lõppu valk, mida kodeeriv nukleotiidne järjestus on kloneeritud MCS-i (Lisa1).

5.1.3. Kloneerimine, sekveneerimine, PCR praimerid

Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR), sekveneerimine

PCR viidi läbi standartse protokoll järgi (Sambrook *et al.*, 1989), kasutades Pwo (*Pyrococcus woesei*) DNA polümeraasi (Roche). Reaktsioon kestis 30 tsüklit: 95°C 30sek, 50°C 30sek, 72°C 1min/1000 bp DNA järjestuse kohta (Perkin-Elmeri PCR-i masinas).

Sekveneerimiseks kasutati PCR-ga amplifitseeritud DNA fragmente, mis amplifitseeriti kasutades Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polümeraasi (biokeemia laboris

puhastatud) ning (NH₄)₂SO₄ sisaldavat PCR-i puhvrit (Fermentas). Sekveneerimise reaktsioonid viidi läbi nagu kirjeldatud DYNAMIC™ ET Terminator Sequencing kit'is, pGADGH vektoris olevate insertide sekveneerimiseks kasutati JSR2 ja KS praimereid.

Katsetes kasutati Tabelis 2 ära toodud praimereid (DNA Technology A/S)

Tabel 2: Töös kasutatud praimereid

Katse	Nimetus	Järjestus	Tüüp
Kaksik-hübriid-süsteem	HMIM1Bam	5'CGGGATCCAAATGGACAAGCTAACTCCA3'	Pärisuunaline
	RHMIR691Pst	5'GGCTGCAGTTATGCTCTATAAAATCCA3'	Vastassuunaline
	STE5N24Bam	5'CTGGATCCTGGTACCTTGTCGAGAACT3'	Pärisuunaline
	STE5N336Bam	5'AAGGATCCAATTCCGTCGGGAGCAAAC3'	Pärisuunaline
	STE5N586Bam	5'ACGGATCCTGTCGACAGTATACAATCTG3'	Pärisuunaline
	STE5N667Bam	5'GCGGATCCTTCACTAGATTCATCTCAAA3'	Pärisuunaline
	STE5N744Bam	5'ACGGATCCGAACGTTGACTACAGTGATA3'	Pärisuunaline
	STE5C895Apa	5'ATAGGGCCCCTATCTGGTTATGCCATCGAT3'	Vastassuunaline
	STE5CApa	5'GCCGGGGCCCACTCTATATATAATCCATA3'	Vastassuunaline
	STE7NBam	5'GCGGATCCTCATGTTTCAACGAAAGAC3'	Pärisuunaline
	STE7C200Sal	5'TAAGTCGACGCAAGCTTCTCTCAATCG3'	Vastassuunaline
GST-pulldown	GSTNHind	5'CCGAAGCTTAGAATGTCCCCTATACTAGGT3'	Pärisuunaline
	GSTCXho	5'TACTCGAGTCGACCCGGAATTCCG3'	Vastassuunaline
	5BamREP (HMINBam)	5'CGGGATCCAGAATGGACAAGCTAACT	Pärisuunaline
	STE5NBam	5'TAGGATCCAGAATGATGGAACTCCTACA3'	Pärisuunaline
	STE5CBam	5'TAGGATCCACTCTATATATAATCCATATGGAG3'	Vastassuunaline
Sekveneerimine	JSR2	5'TACCACTACAATGGATG3',	Pärisuunaline
	KS	5'TCGAGGTCGACGGTATC3	Vastassuunaline
Σ1278 Arpo41 tüve kontrollimine	RPO41 Sac5	5'TCCCAGCTCGGTAAATATCTTCAAAGGGATC3	Pärisuunaline
	RPO41 Xho3	5'GTGCTCGAGCGAGAAAAAATATTGACTGTTTC3	Vastassuunaline
Q-RT-PCR	RDN18-1Left	5'ATCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGA3'	Pärisuunaline
	RDN18-1Right	5'AGTCGGCATAGTTTATGGTTAAGAC3'	Vastassuunaline
	FUS1 Left	5'GCTCTACACCGTCTAATCTACTC3'	Pärisuunaline
	FUS1 Right	5'ACACCGAATTCCTTTTAAGGTAGAA3'	Vastassuunaline
	FLO11 Left	5'TATTGCTCCTTCGCTTCTATTTAAC3'	Pärisuunaline
	FLO11 Right	5'TATACTGCATGATATTTGCTGGTCC3'	Vastassuunaline

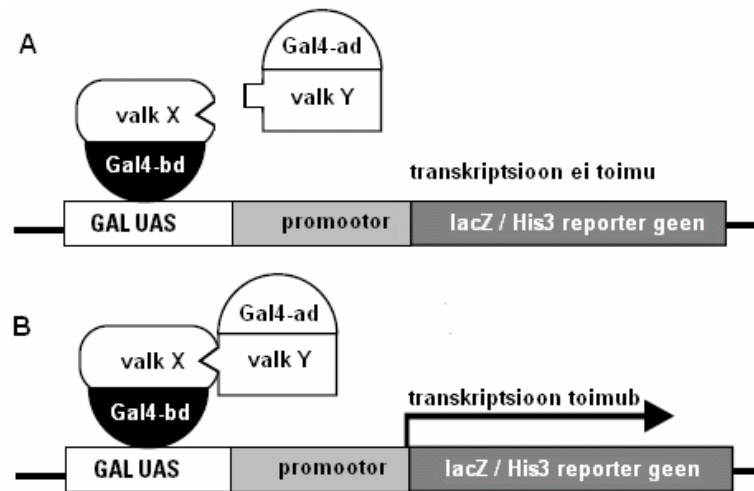
Kloneerimiseks kasutati standardseid molekulaarbioloogia meetodeid (Sambrook *et al.*, 1989). DNA geelist puhastamiseks kasutati Ultra Clean™15 DNA Purification Kit From Gels and Solutions, Mo BIO Laboratoris. Restriksiooniks ja ligeerimiseks kasutatud puhvrid ning ensüümid olid pärit Fermentasest.

5.1.4. Pärimi genoomse DNA raamatukogu

S. cerevisiae genoomse DNA raamatukogu oli kloonitud vektori pGADGH MCS-i *EcoRI* lõikesaiti kolmes lugemisraamis. Raamatukogu oli valmistatud üldise- ja mikroobibiokeemia laboratooriumis Prof. Juhan Sedmani ja Dr. Tiina Sedmani poolt.

5.1.5. Kaksikhübridsüsteem

Pärimi kaksikhübridsüsteemi näol on tegemist *in vivo* meetodiga, mis võimaldab uurida valk-valk interaktsioonide esinemist.



Joonis 7: Kaksikhübridsüsteemi põhimõte. Kaks liitvalku, millest üks sisaldab GAL4 DNA sidumisdomeeni ning teine GAL4 aktivatsioonidomeeni, transformeeritakse ühte rakku (A). Kui liitvalgud interakteeruvad, tuuakse aktivatsioonidomeen piisavale kaugusele promootorist ning käivitatakse reportergeeni (antud juhul lacZ või HIS3) transkriptsioon (B).

Katsetes kasutati GAL4 põhinevat kaksikhübridsüsteemi (Joonis 7). Selle puhul on ühte uuritavat valku kodeeriv geen kloonitud NLS-i sisaldava transkriptsioonifaktori GAL4 DNA-sidumisdomeeni (bd) kodeeriva järjestuse taha. Pärimi transformeerituna transporditakse vastav liitvalk X tuuma, kus ta on suuteline seonduma reportergeenist eespool paiknevale GAL4 spetsiifilisele aktivatsiooni järjestusele (UAS). Teist uuritavat valku kodeeriv geen kloonitakse GAL4-aktivatsioonidomeeni (ad) kodeeriva järjestuse taha, millele on lisatud SV40 T-antigeeni NLS. Vastav liitvalk Y transporditakse samuti tuuma, kus ta pole aga suuteline aktiveerima transkriptsiooni reportergeenilt, sest ei suuda seonduda promootorjärjestusele. Juhul kui mõlemad liitvalgud X ja Y on samas rakus ning on suutelised omavahel interakteeruma, aktiveeritakse transkriptsioon reportergeenilt. Antud katsetes on reportergeenideks GAL1 UAS promootori kontrollitud lacZ geen ning GAL1 promootori TATA boksi kontrollitud HIS3 geen, millede ekspressiooni saab

kontrollida vastavalt β -galaktosidaasi testi abil ning kloonide kasvuga histidiini mittesisaldaval söötmel. Reportergeenide ekspressiooniga selekteeritakse omavahel interakteeruvaid valke sisaldavaid kloone.

Kaksikhübriidsüsteemi läbiviimiseks kasutati Clontech Laboratories, Inc protokoll PT1265-1.

5.1.6. Pärm transformeerimine ja totaalse DNA eraldamine

Väikeses mahus pärm transformeerimiseks kasutati standardset liitium atsetaat meetodit (Rose *et al.*, 1990). Suures mahus transformeerimine viidi läbi sama protokoll alusel, kuid transformeerimiseks valmistati ette 11 rakke, enne rakkude inkubeerimist 42°C juures lisati DMSO-d (dimetüül sulfoksiid) lõppkontsentratsioonini 5% ning transformeerimiseks kasutati 500µg plasmidi.

Totaalne DNA eraldati pärmist nagu kirjeldatud Methods in Yeast Genetics (Rose, M. D., Winston, F., Hieter, P., 1990, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

5.1.7. β -galaktosidaasi filter-test

Pärmi kolooniad külvati ümber vees immutatud Whatmani 3M paberile, mis oli asetatud vastavale selektiivsöötmele, ning kasvatati 30°C juures üle öö. Seejärel külmutati filter läbi vedelas lämmastikus ning asetati Z-puhver/X-gal lahuses [Z-puhvrile (60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgSO₄), lisati X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolüül- β -D-galaktopüranosiid lahustatud N,N-dimetüülformamiidis) lõppkontsentratsioonini 0,33mg/ml ja β -merkaptotetanooli lõppkontsentratsioonini 40mM] immutatud Whatmani 3M paberile, inkubeeriti 30°C juures 2-16h.

Kolooniates, mis sisaldavad omavahel interakteeruvaid valke, aktiveeritakse lacZ reportergeeni ekspressioon, mis kodeerib β -galaktosidaasi. Viimane lagundab värvitu X-gal'i 5-bromo-4-kloroindoksüülis, mis omakorda oksüdeerub õhuhapnikuga reageerides sinise värvusega 5,5'-dibromo-4,4'-dikloroindigoks. Kui rakud värvuvad X-gal'i juuresolekul siniseks, on neis olemas funktsionaalne β -galaktosidaas ning järelikult sisaldavad need rakud omavahel interakteeruvaid valke, mis aktiveerisid lacZ geeni. Positiivse kontrollina kasutati kõikide testide puhul pGBT9-SNF1 / pGADGH-SNF4-ga transformeeritud kolooniaid. Varem on näidatud, et Snf1 ning Snf4 on hästi ekspresseeruvad ning omavahel interakteeruvad valgud, sobides seega hästi positiivseks

kontrolliks (Fields & Song, 1987). Negatiivse kontrollina kasutati pAS2-1 ja pGADGH vektoritega transformeeritud kolooniaid.

5.1.8. Western blot

Pärmi kasvatati 5ml vastavas selektiivsöötmes üleöö, rakud tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga põhja 5sek 13000rpm ning suspendeeriti 80µl T₁₀E₁ [10mM Tris (tris(hüdroksümetüül)aminoetaan)-HCl (pH7,5), 1mM EDTA (etüleendiamiintetraatseet hape)], kuhu lisati 1mM PMSF (fenüülmetüülsulfünüül floriid), vedelikule lisati võrdne ruumala 0,5mm läbimõõduga klaaskuule (Sigma), purustati 2x30sek vortexil, lasti vahepeal 1min jääl jahtuda. Lüsadile lisati 20µl 5xSDS puhvrit [(60mM Tris-HCl (pH6,8), 24% glütserool, 2% SDS (naatrium dodetsüülsulfaat), 14,4mM DTT (ditiotreitol), 1% broomfenoolsinine] ja keedeti 5min 100°C juures.

Valgud lahutati 10% SDS-poliakrüülamidegeelis, kanti üle nitrotselluloosfiltrile ning detekteeriti antikehadega (IgG2a GAL4-bd vastu, IgG2b GAL4-ad vastu, GST(B-14), HA(3F10), Santa Cruz Biotechnology) (Sambrook *et al.*, 1989). Signaal detekteeriti kemoluminestsentsiga, kasutades Supersignal kit'i (Pierce).

Antikehade eemaldamiseks nitrotselluloosfiltrilt inkubeeriti filtreid 30min 50°C juures *stripping* puhvris [100mM β-merkaptotaanool, 2% SDS, 63mM Tris-HCl (pH6,7)]. Seejärel pesti filtreid 30min jooksul 2 korda 1xTBS.

5.1.9. GST-pulldown katse

Ekspressioonikonstruktide valmistamine

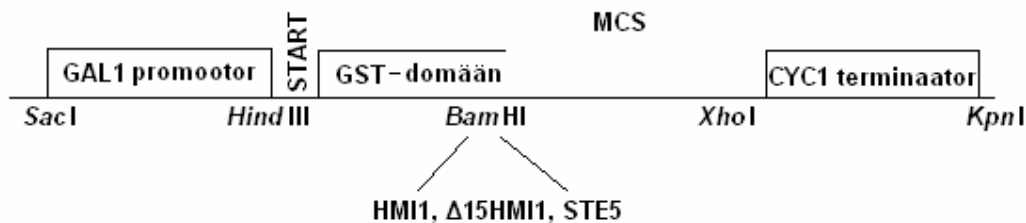
GST-liitvalkude ekspresseerimiseks kasutati pRS316 vektorit, mille selektsioonimarkeriks on URA3 geen. Vastava vektori MCS-i kloneeriti esmalt GAL1 promootor koos CYC1 terminaatoriga *SacI* ja *KpnI* restriктаaside lõikesaiti (Joonis 8A). Selline promootorist ja terminaatorist koosnev kassett oli meie laboris varem valmistatud Dr. Tiina Sedmani poolt. Seejärel kloneeriti *HindIII* ja *XhoI* lõikesaitide vahele initsiatsioonikoodoniga algav GST domääni kodeeriv järjestus, mis amlifitseeriti pGEX-4T-1 vektorist GSTNHind ja GSTCXho praimerite abil (Tabel 1). Selle tulemusena moodustus Joonisel 8A kujutatud ekspressioonikassett, mille *BamHI* lõikesaiti kloneeriti Hmi1, Δ15Hmi1 ja Ste5 kodeerivad järjestused.

HA epitoobiga valgu ekspresseerimiseks kasutati pRS315 vektorit, mille selektsioonimarkeriks on LEU2 geen. Vastava vektori MCS-i kloneeriti *SacI* ja *EagI* lõikesaitide vahele GAL1 promootor, mis lõigati välja varem meie laboris Dr. Tiina

Sedmani valmistatud kassetist. Seejärel kloneeriti *EagI* ja *XhoI* lõikesaitide vahele kassett, mis algab ADH1 geeni 5'UTR järjestusega, millele järgneb initsiatsioonikoodon, HA epitoopi kodeeriv järjestus, *BamHI* restriктаasi lõikesait ning ADH1 terminaator (Joonis 8B). Vastav kassett lõigati välja pYCAT vektorist (Alexandre *et al.*, 1993). *BamHI* lõikesaiti kloneeriti Hmi1, $\Delta 15$ Hmi1 ja Ste5 kodeerivad järjestused. Konstruktid kontrolliti sekveneerimise teel.

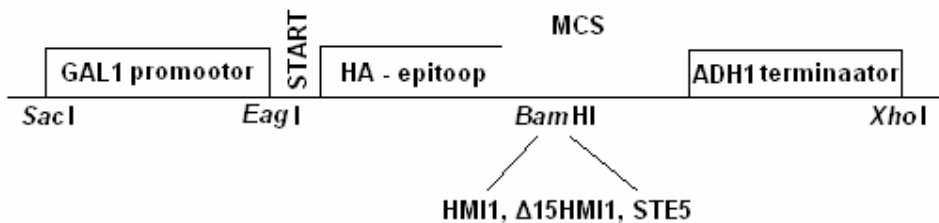
A

pRS316, CEN, -Ura



B

pRS315, CEN, -Leu



Joonis 8: A – GST liitvalku kodeeriva vektori ekspressioonikasseti skeem, mis oli kloneeritud pRS316 vektorisse *SacI* ja *KpnI* restriктаaside lõikesaitide vahele. B – HA-epitoobiga liitvalku kodeeriva vektori ekspressioonikasseti skeem, mis oli kloneeritud pRS315 vektorisse *SacI* ja *XhoI* lõikesaitide vahele.

GST-pulldown

Uuritavaid liitvalke kodeerivad konstruktid transformeeriti pärmitüvesse W303 ning külvati –Ura–Leu SM selektiivsöötmele. Järgnevalt kasvatati uuritavaid kloone üleöö 5ml-s vastavas selektiivsöötmes. Kuna glükoos on GAL1 promootori negatiivseks regulaatoriks, kasutati SM selektiivsöötmes süsinikuallikana glükoosi asemel 2% rafinoosi. Hommikul lahjendati kultuur 50ml-sse samasse söötmesse OD₆₀₀~0,2-ni ning kasvatati OD₆₀₀~0,5-0,7. Seejärel lisati galaktoosi lõppkontsentratsioonini 2%, et indutseerida GAL1 promootori kontrolli all olevate geenide ekspressioon. Peale 2h indutseerimist (OD₆₀₀~0,6-0,9) tsentrifuugiti rakke Hettich universal 32R tsentrifuugi 1617 rootoriga 5min 3500rpm, rakud pesti 50ml jääkülma veega ning tsentrifuugiti uuesti. Seejärel pesti rake 1,5ml jääkülmas H-puhvris [25mM Tris-HCl (pH7,5), 15mM EGTA (etüleenglükool-bis(2-

aminoetüüleeter)tetraatseet hape), 1mM DTT, 0,1% TritonX-100, 250mM NaCl, 10% glütserool, 1mM PMSF, 5µg/ml pepstatiinA, 5µg/ml leupeptiin, 5µg/ml aprotiniin], tsentrifuugiti põhja lauatsentrifuugiga 4°C juures 5min 2500rpm ning resuspendeeriti 300µl H-puhvris. Vedelikule lisati võrdne ruumala klaaskuule, segati 3x2min vortexil, lastes vahepeal 1min jääl jahtuda. Seejärel lisati 300µl H-puhvrit ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga 4°C juures 10min 13000rpm, supernatant tõsteti uude eppendorfi ning lisati veel 300 µl H-puhvrit. Selles etapis võeti välja 40µl rakulüsaati. Ülejäänud lüsaadile lisati 10µl glutatioon-agarooosi maatriksit (Sigma) ning inkubeeriti 4°C juures 2h *end-over-end* masinas. Seejärel tsentrifuugiti rakulüsaati lauatsentrifuugiga 4°C juures 3min 2000rpm, eemaldati supernatant, glutatioon-agarooosi pesti 3x 1ml H-puhvriga, lõpuks resuspendeeriti 80µl H-puhvris. Valkude denatureerimiseks lisati 20µl 5xSDS puhvrit ja keedeti 5min 100°C juures. Lisaks denatureeriti 40µl esialgset rakulüsaati, et kontrollida ekspresseeritud valkude hulka kogu rakulüsaadis. Proovid lahutati 7,5% SDS-polüakrüülamiidgeelis, kanti nitrotselluloosfiltrile ning detekteeriti antikehadega.

5.1.10. Σ1278 Δ*rpo41* rakutüve valmistamine

Varem oli meie laboris Dr. Tiina Sedmani poolt valmistatud konstrukt (pBluescript-RPO41::URA3) RPO41 geeni deleteerimiseks, kus RPO41 geeni sisse, *Bgl*II restriктаasi lõikesaiti, oli kloonitud URA3 geen koos promootorpiirkonnaga. Selle tulemusena säilis 717bp (aluspaari) fragment RPO41 geeni 5' otsast ning 330bp fragment 3' otsast, vahepealne osa oli deleteeritud ning asendatud URA3 geeniga. Vastav RPO41 konstrukt lõigati vektorist välja *Xho*I ja *Sac*I restriктаasidega, transformeeriti pärmütüvesse Σ1278 (Mat-**a**) ning plaaditi –Ura selektiivsele söötmele. Saadud kloonides on URA3 geeniga konstrukt integreeritud kromosoomi ja kuna *S. cerevisiae*'s toimub homoloogiline rekombinatsioon kõrge sagedusega, on integreerumine toimunud eeldatavalt RPO41 geeni lookusesse, asendades metsikut tüüpi alleeli. Kolooniaid kontrolliti külvamisega mittefermenteeritavale söötmele ja Southern blot-iga.

5.1.11. Southern blot

Σ1278 Δ*rpo41* tüve kontrollimiseks eraldati pärmirakkudest totaalne DNA ning restriктеeriti *Spe*I ja *Pst*I ensüümidega. *Spe*I lõikab RPO41 geeni 1251bp initsiatsioonikoodonist ülesvoolu ning 2023bp stopkoodonist allavoolu. *Pst*I restriктаasil eelpoolnimetatud vahemikus lõikesait puudub ning seega tekib metsikut tüüpi RPO41 geeni

olemasolul sellest piirkonnast 7274bp fragment. URA3 geeni sees esineb aga *Pst*I lõikesait ning juhul kui URA3 konstrukt on genoomi sisenenud RPO41 lookusesse, tekivad sellest piirkonnast *Pst*I ja *Spe*I restriктаasidega lõigates 2505bp ja 2934bp pikkused fragmendid.

Lõigatud genoomne DNA lahutati 0,8% agaros-TAE geelis, kanti Southern blot meetodil nailonfiltrile ning hübridiseeriti radioaktiivse märkega prooviga (Sambrook *et al.*, 1989).

Radioaktiivse märkega proov valmistati Random Priming meetodil DecaLabel DNA Labelin Kit'i (Fermentas) kasutades, matriits DNA-ks oli PCR-i abil RPO41Sac5 ja RPO41Xho3 praimeritega (Tabel 2) amplifitseeritud RPO41 geen.

5.1.12. Haploidsete rakkude invasiooni detekteerimine

Haploidsete rakkude invasiooni detekteerimiseks külvati respiratoorselt defektsed Σ 1278 Δ rpo41 ja Σ 1278 Δ hmi1 rakud YPDA (YPD + 0,01% adeniin) söötmele ning kasvatati 30°C juures 3 päeva, seejärel külvati samale tassile wt W303 ja wt Σ 1278 tüved ning tassi inkubeeriti 30°C juures veel 5 päeva. Tasse pildistati. Järgnevalt pesti tardsöötme pinnal kasvavad rakud voolava vee all maha ning tasse inkubeeriti 30°C juures 24h. Tasse pildistati uuesti.

5.1.13. Butanooli poolt indutseeritud filamenteerumise jälgimine

Filamenteerumise esile kutsumiseks kasvatati tüve Σ 1278 ning selle deletante üle öö 30°C juures YPD söötmes. Järgmisel päeval lahjendati kultuur OD₆₀₀~0,1-0,15 ning lisati söötmele 1-butanool lõppkontsentratsioonini 1%. Kolvid suleti parafilmiga ning inkubeeriti 30°C juures loksutis. 0, 8, 22 ja 30h pärast butanooli lisamist võeti kultuuridest välja 2ml proovid, millel mõõdeti optiline tihedus 600nm juures, rakke pildistati Olympus BX61 mikroskoobiga 1000x suurendusel (Lorenz *et al.*, 2000).

5.1.14. Q-RT-PCR – kvantitatiivne pöördtranskriptaasi PCR

Rakutüvede kasvatamine

Σ 1278, Σ 1278 Δ rpo41 ja Σ 1278 Δ hmi1 tüvesid kasvatati üle öö YPD-s, seejärel lahjendati kahes paralleelis OD₆₀₀~0,05. Ühele paralleelile lisati 1-butanooli lõppkontsentratsioonini 1% ning kasvatati 13,5h. Teisel paralleelil lasti kasvada üle öö ning seejärel jagati omakorda kaheks. Ühele poolele lisati α -faktorit (Sigma) lõppkontsentratsioonini 5 μ M ning inkubeeriti 30°C juures 1h, teine pool jäi kontrolliks.

RNA eraldamine

15ml rakke tsentrifuugiti Hettich universal 32R tsentrifuugi 1617 rootoriga 5min 2500rpm, pesti 15ml jääkülma veega, 1ml jääkülma RNA-puhvriga (50mM Tris-HCl (pH7,4), 100mM NaCl, 10mM EDTA). Rakud külmutati vedelas lämmastikus, sulatati jääl ja resuspendeeriti 120µl jääkülmas RNA-puhvris. Vedelikule lisati võrdne ruumala 0,5mm läbimõõduga klaaskuule, segati 4°C juures 3min vorteksil, lisati 450µl RNA-SDS-puhvrit (RNA puhver, 1,3% SDS), 450µl fenooli (pH5,0) ja segati 4°C juures 3min vorteksil. Seejärel tsentrifuugiti lauatsentrifuugil 4°C juures 10min 13000rpm. Vesifaas puhastati fenool(pH5,0)/kloroformiga ekstraheerimise teel ja RNA sadestati -70°C juures (Sambrook *et al.*, 1989). RNA kvaliteeti kontrolliti 1,8% agaros-TBE (Sambrook *et al.*, 1989) geelil ning nukleiinhappe kontsentratsioon määrati mõõtmisega optilise tiheduse 260nm juures. Kontamineerivast genoomsest DNA-st vabanemiseks töödeldi ~10µg nukleiinhapet DNAasI-ga 1xDNaasI puhvril 37°C juures 30min (Promega). Reaktsioon peatati Stop lahuse (Promega) lisamisega ja inkubeerimisega 65°C juures 10min. Proovid puhastati fenool/kloroformi ekstraheerimise teel (Sambrook *et al.*, 1989).

Pöördtranskriptaasiga matriits DNA valmistamine

Q-PCR jaoks matriits DNA tegemiseks lisati eraldatud RNA-le ühte reaktsioonisegusse kõigi uuritavate geenide vastassuunalised praimerid (RDN18-1 Right, FUS1 Right, FLO11 Right, Tabel 1). Pöördtranskriptaasi reaktsiooniks kasutati ühe proovi kohta 15U Thermoscript pöördtranskriptaasi ning sellele vastavat 1x puhvrit (Seikakaku), reaktsioonisegule lisati 2mM dNTP-d, 100mM DTT, 20U RNaasi inhibiitor (Fermentas). Reaktsioonisegusid inkubeeriti 50°C juures 1h, seejärel inaktiveeriti ensüümid 85°C juures 5min. Saadud cDNA-d kasutati matriitsina Q-PCR jaoks. RDN18 reaktsioonide jaoks kasutatavat matriitsi lahjendati Q-PCR jaoks võrreldes teiste proovide matriitsiga 100 korda.

Kvantitatiivne PCR

Q-PCR reaktsioonideks kasutati Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix kit'i (Abgene) ning ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System masinat. Iga proovi puhul detekteeriti 3 erineva uuritava RNA pealt sünteesitud cDNA olemasolu iga uuritava geeni jaoks spetsiifiliste praimeritega (Tabel 1). Q-PCR-i puhul toimus reaktsioon iga praimerite paariga eraldi reaktsioonisegus. Iga praimerite paariga tehti reaktsioon samalt matriitsilt kolmes korduses, seejärel arvutati keskmine tulemus. Negatiivse kontrollina tehti Q-PCR RDN18-1 praimeritega revertaasiga töötlemata RNA matriitslt.

Andmete analüüs

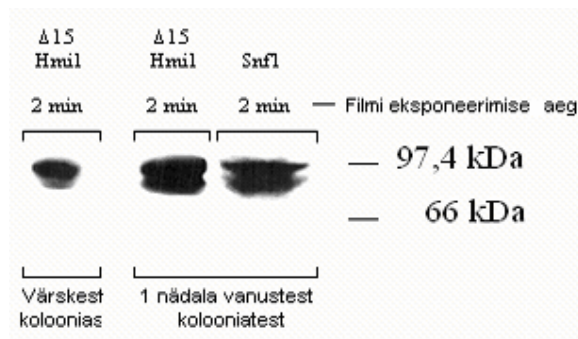
Q-PCR andmete analüüsiks kasutati võrdlevat Ct meetodit, mille puhul võrreldakse uuritavates proovides produkti tekke eksponentsiaalsesse faasi jäävaid Ct väärtusi. Ct on tsüklite arv, mis on vajalik ühe kindla signaaltugevuse – signaaltugevuse välja – saavutamiseks (Lisa 2). Esmalt valitakse kokkuleppeline tsüklite arv, mis loetakse nullväärtuseks C0. Minu katsetes on selleks tsüklite arv, mille puhul jõuab signaaltugevuse lävele revertaasiga töötlemata proov, C0=28. Revertaasiga töötlemata proovide puhul ei ole produkti matriitsiks mitte RNA-lt sünteesitud cDNA, vaid kontamineeriv genoomne DNA. C0 väärtustele lähedaste Ct väärtuste puhul loetakse rakus olnud RNA hulk tinglikult allpool detekteeritavuse piiri olevaks, mis võib tähendada vastava RNA täielikku puudumist või väga madalat taset. Järgnevalt lahutatakse C0-st tsüklite arv, mille puhul jõuab uuritavas proovis produkti fluorestsentssignaal signaaltugevuse väljale, C0 - Ct. Sellega saadakse tsüklite arv, mis näitab erinevust kokkuleppelise nullpunkti ja vastava uuritava proovi vahel. Kuna iga tsükel tähendab produkti hulga suurenemist 2 korda, on vastava proovi hulk võrreldes nullpunktiga signaali detekteerimise hetkeks $2^{C_0-C_t}$ arv korda suurem. Seejärel ühtlustatakse kõik proovid endogeense *housekeeping* geeni järgi, et vältida erineva hulga totaalse matriitsi DNA kasutamisest tingitud erinevusi. *Housekeeping* geeniks on minu katsetes ribosomaalset rRNA-d kodeeriv RDN18, mis peaks olema ekspresseeritud sarnasel tasemel kõikides rakkudes. Proovid ühtlustamiseks üldise mRNA hulga suhtes, jagatakse kõikide proovide $2^{C_0-C_t}$ väärtused läbi vastava *housekeeping* RDN- $2^{C_0-C_t}$ väärtusega samas proovis, $(2^{C_0-C_t})/(RDN-2^{C_0-C_t})$. Tulemusena saadakse erinevate proovide kohta arvud, mille suhe üksteisesse kajastab algse RNA hulga erinevusi proovide vahel. Edasi vaadeldakse proovide omavahelisi $(2^{C_0-C_t})/(RDN-2^{C_0-C_t})$ suhteid, mis näitavad uuritava RNA hulga erinevusi kordades proovide vahel. Sel viisil proove omavahel võrreldes saab teada mil määral on uuritava RNA tase vastavas tüvedes ja katse tingimustes reguleeritud.

6. TULEMUSED

6.1.1. Hmi1-ga interakteeruvate valkude otsimine kaksikhübridsüsteemi abil

Et teada saada, milliste valkudega pärmi mitokondriaalne helikaas Hmi1 rakus interakteerub ning selle abil selgitada tema rolli mtDNA metabolismis, teostati $\Delta 15$ Hmi1 valguga kaksikhübridsüsteem pärmi genoomse DNA raamatukogu vastu. Kuna kaksikhübridmeetodis toimuva valkudevahelise interaktsiooni detekteerimiseks on vajalik mõlema uuritava liitvalgu transport tuuma, ei pruugita täispikka Hmi1 mitokondriaalse importsignaali tõttu sinna lokaliseerida. Lisaks eemaldatakse Hmi1 importsignaali suure tõenäosusega peale transporti mitokondrisse ning oma aktiivses olekus on Hmi1 arvatavasti ilma signaaljärjestuseta. Seetõttu viidi esialgne skriin läbi ilma mitokondriaalse transportsignaali $\Delta 15$ Hmi1-ga.

$\Delta 15$ Hmi1 ekspresseerimiseks kasutati pAS2-1 vektorit (ekspresseerib liitvalku, mille N-terminaalsesse otsa jääb GAL4-bd), pärmi genoomne raamatukogu oli kloneeritud pGADGH vektorisse (ekspresseerib liitvalku, mille N-terminaalsesse otsa jääb GAL4-ad). Valkude ekspressiooni pAS2-1 vektorist kontrolliti Western blotil (Joonis 9).



Joonis 9: pAS2-1 vektoris oleva $\Delta 15$ HMI1 ekspressiooni analüüs. Positiivse kontrollina on kasutatud GAL4-bd-Snf1 valku, ~93,7kDa. GAL4-bd- $\Delta 15$ Hmi1 on ~100kDa suurune. Valgu nime all on toodud filmi eksponeerimise aeg; pildi alumises servas on kolooniate vanus, millest kasvama pandud kultuurist valk eraldati; paremal pool servas on valgu molekulmassi suurused.

Kuna kaksikhübridsüsteemi puhul on oluline valgu hea ja stabiilne ekspresseerumine rakus, kontrolliti $\Delta 15$ Hmi1 ekspressiooni nii värskest transformeeritud pärmi kolooniatest kasvama pandud kultuurist kui ka 1 nädala vanustest kolooniatest

kasvama pandud kultuurist. Western bloti järgi ekspresseerub $\Delta 15Hmi1$ pAS2-1 vektorist stabiilselt.

6.1.1.1. Kaksikhübriidsüsteem

Esmalt transformeeriti pAS2-1- $\Delta 15HMI1$ väikeses mahus pärmi *S. cerevisiae* tüvesse CG1945 ning külvati -Trp selektiivsöötmele. Saadud kolooniaid transformeeriti suures mahus genoomse DNA raamatukoguga ning külvati -Trp/-Leu/-His selektiivsöötmele. Histidiini puudumine söötmest lubab selekteerida kolooniaid, kus esineb plasmiidide poolt kodeeritud liitvalkude vahel interaktsioon, mille tulemusena käivitatakse reportergeeni (GAL1 TATA boksi kontrollitud HIS3 geeni) ekspressioon. Kuna sellelt promootorilt toimub transkriptsioon madalal tasemel konstitutiivselt, ei ole selektsioon -His söötmel täielik.

Tekkinud suured kolooniad külvati viie päeva pärast ümber -Trp/-Leu/-His tassidele. Järgneva kümne päeva jooksul külvati ümber juurde lisandunud suured kolooniad. Kokku külvati ümber 1252 kolooniat.

Transformatsiooni efektiivsust hinnati -Trp/-Leu tassil kasvavate kolooniate arvu järgi. Selleks saadi $2,6 \times 10^3$ kolooniat/ $1 \mu\text{g}$ DNA kohta. Arvestades, et transformeerimiseks kasutati $500 \mu\text{g}$ DNA-d, pärmi genoom koosneb ~ 6000 ORF-ist ning genoomse DNA raamatukogu sisaldab kolme lugemisraami, saame, et $[(500 \times 2,6 \times 10^3) / (6000 \times 3) \sim 72]$ kogu pärmi genoom peaks olema esindatud umbes 72 kordselt. Kuna genoomse DNA raamatukogu sisaldab ka mittekodeerivaid järjestusi ning inserdita vektoreid, on iga ORF (avatud lugemisraam) esindatud siiski väiksem arv kordi.

Kõigile ümberkülvatud kolooniatele tehti β -galaktosidaasi test kahel korral, et kontrollida (GAL1 promootori UAS elemendi poolt kontrollitud) lacZ reportergeeni ekspressiooni ning välja selekteerida oletatavad positiivsed kloonid. Kui uuritavad valgud interakteeruvad omavahel, muutuvad kolooniad X-gal juuresolekul lacZ reportergeeni ekspresseerumise tõttu siniseks (+ tulemus), kui lacZ geeni ekspressiooni ei käivitata, jäävad kolooniad valgeks (- tulemus). Positiivse kontrollina kasutati siin ja edaspidi GAL4bd-Snf1 ja GAL4ad-Snf4 liitvalke sisaldavaid kolooniaid. Negatiivse kontrollina kasutati inserdita pAS2-1 ning pGADGH vektoritega transformeeritud rakke. Testi tulemusena värvus 1252-st kloonist kokku siniseks 11. Kõik 11 kloni värvusid nii esimesel kui teisel β -galaktosidaasi testil.

6.1.1.2. Valepositiivsete tulemuste elimineerimine

Et välja selgitada ja elimineerida võimalikud valepositiivsed tulemused, eraldati genoomset DNA-d sisaldav pGADGH vektor. pAS2-1 vektorist vabanemiseks eraldati DNA kõigist 11 kloonist, transformeeriti bakteri tüvesse HB101 ning külvati välja M9-Leu tassidele. Kuna HB101 tüvi ei suuda kasvada leutsiini mittesisaldaval söötmel, on pGADGH vektoris olev LEU2 geen bakterile M9 -Leu tassidel kasvamiseks hädavajalik. pAS2-1 vektori suhtes selline selektsioon puudub ning seega sisaldavad tassidel kasvavad kolooniad eeldatavalt vaid pGADGH vektorit. Tekkinud kolooniatest eraldati plasmiidne DNA, millele tehti restriksioonanalüüs, et kontrollida pGADGH vektoris inserdi olemasolu.

pGADGH vektorist ekspresseeritud liitvalk ei tohi olla suuteline üksinda ega koos pAS2-1 vektorist ekspresseeritud GAL4-bd-ga aktiveerima reportergeeni ekspressiooni. Samas peavad õiged positiivsed konstruktid suutma aktiveerida reportergeeni ekspressiooni, kui nad transformeeritakse tagasi koos uuritavat valku ekspresseeriva vektoriga. Kui kasvõi ükski neist tingimustest pole täidetud, ei saa vastavat konstrukti lugeda õigeks positiivseks tulemuseks. Saadud 11 genoomse DNA fragmendi kontrollimiseks transformeeriti genoomset DNA-d sisaldavad plasmiidid tagasi pärmi üksinda, koos inserdita pAS2-1 vektoriga ning koos pAS2-1- Δ 15HMI1-ga. Seejärel kontrolliti saadud kolooniaid β -galaktosidaasi testiga (Tabel 3).

Tabel 3: β -galaktosidaasi testi positiivsed tulemused genoomset DNA-d (gen. DNA) sisaldava plasmidi transformeerimisel pärmi üksi, koos inserdita või pAS2-1- Δ 15HMI1-ga.

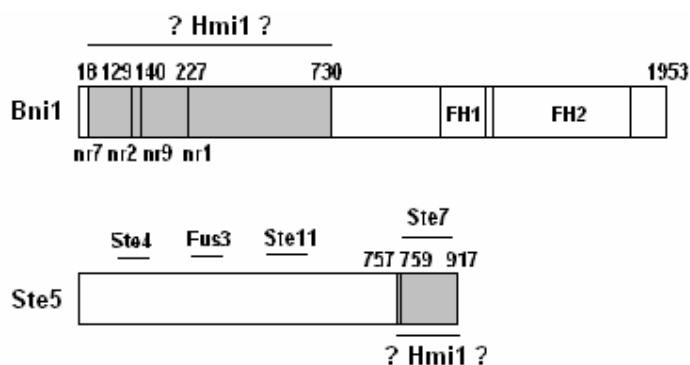
Koekspresseeritud valgud	β -galaktosidaasi testi + tulemused
GAL4ad- gen. DNA / -	nr. 5, 6
GAL4ad- gen. DNA / GAL4bd	nr. 5, 6
GAL4ad- gen. DNA / GAL4bd- Δ 15Hmi1	nr. 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

+ tulemuse puhul on ära toodud siniseks värvunud klooni number.

Testi tulemusena värvusid konstruktid 5 ja 6 transformeeritud rakud siniseks ka ilma Δ 15Hmi1-ta. Kloonidest 3 ja 11 saadud konstruktidega transformeeritud rakud ei värvunud siniseks aga ka koos pAS2-1 Δ 15HMI1-ga transformeeritult. Seega on konstruktid 5, 6, 3 ja 11 puhul tegemist valepositiivsete tulemustega. Konstrukte nr. 1, 2, 4, 7, 8, 9 ja 10 kasutati edasiseks analüüsiks.

6.1.1.3. Sekveneerimine

Et kindlaks teha, millist valku ekspresseerivad õiged positiivsed konstruktid, sekveneeriti pGADGH vektoris olevad genoomse DNA fragmendid. Saadud järjestusi võrreldi pärmi genoomi andmebaasis (www.yeastgenome.org). Selle tulemusena leiti, et konstruktid nr. 1, 2, 7 ja 9 sisaldasid BNI1 geeni fragmente, mis kõik asusid õiges lugemisraamis, kuid algasid geeni erinevatest kohtadest (Tabel 4, Joonis 10). Konstruktid nr. 4, 8 ja 10 sisaldasid STE5 geeni 3' osa. Konstrukt nr.4 kodeerib Ste5 aminohappeid 759-917 (edaspidi 759-917Ste5), konstruktid 8 ja 10 aminohappeid 757-917 (edaspidi 757-917Ste5). Kõik järjestused asuvad õiges lugemisraamis. Konstruktid nr. 8 ja 10 on identsed, konstrukt nr. 4 genoomse DNA fragment on eelmistega võrreldes 3' otsast 404 nukleotiidi pikem. Kuna see järjestus sisaldab STE5 geeni lõppu ning viimase stopp koodonit, on kõigilt konstruktidelt ekspresseeruvad liitvalgud C-terminaalsest otsast identsed (Tabel 4, Joonis 10).



Joonis 10: Bni1 ja Ste5 valkude skemaatilised joonised. Hallid piirkonnad tähistavad positiivsetelt konstruktidelt ekspresseeritud valgu osi; Bni1 puhul on vastava konstrukti algus näidatud valgu all, FH1 ja FH2 on aktiinifilamentide moodustamise alustamiseks vajalikud domäänid. Kriipsudega on tähistatud teiste interakteeruvate valkude seondumiskohad, numbrid tähistavad aminohappeid.

Tabel 4: Positiivse tulemuse andnud konstruktide poolt kodeeritud valkude fragmendid.

Klooni number	Valgu järjestus
Nr. 1	BNI1 valgu 227-730 a-h
Nr. 2	BNI1 valgu 129-730 a-h
Nr. 7	BNI1 valgu 18-730 a-h
Nr. 9	BNI1 valgu 140-730 a-h
Nr. 4	STE5 valgu 757-917 a-h (+ järgnevad 1149 nt)*
Nr. 8	STE5 valgu 759-917 a-h (+ järgnevad 745 nt)*
Nr. 10	STE5 valgu 759-917 a-h (+ järgnevad 745 nt)*

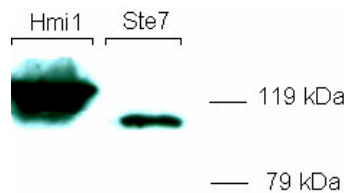
*sulgudes on ära toodud konstruktidest olevale stopp-koodonile järgnev mittetransleeritavate nukleotiidide arv.

Bni1 valk lokaliseerub rakus tsütoplasmasse. Tegemist on formiiniga, millelt algab lineaarsete aktiinifilamentide moodustumine membraani lähedal. Selle protsessi jaoks on olulised Bni1 domäänid FH1 ja FH2 (Joonis 10) (Pruyne *et al.*, 2002). Tänu rollile aktiinifilamentide moodustumises on Bni1 vajalik ka mitokondrite liikumiseks rakus (Fehrenbacher *et al.*, 2004). Kuna tsütoskeleti komponendid on sageli valepositiivseteks tulemusteks kaksikhübridskriinides, pole Hmi1 ja Bni1 vaheliste interaktsioonide edasist uurimist esialgu veel alustatud.

Järgnevas töös keskenduti Hmi1 ja Ste5 vahelise interaktsiooni kontrollimisele.

6.1.2. Interaktsioonid $\Delta 15$ Hmi1 ja Ste5 erinevate fragmentide vahel

Kaksikhübriid-skriinis tuvastatud interaktsiooni $\Delta 15$ Hmi1 ja Ste5 viimase 161 C-terminaalse aminohappe vahel uuriti edasi. Järgnevalt kontrolliti interaktsiooni olemasolu täispika Ste5 valgu ja $\Delta 15$ Hmi1 vahel ning samuti Ste5 ning täispika Hmi1 vahel. Selleks kloneeriti täispikk HMI1 pAS2-1 vektorisse ning STE5 alates 24 aminohappest (24-917STE5) pGADGH vektorisse (aluseks Choi *et al.*, 1994 artikkel, kus täispika Ste5 asemel oli kasutatud 24. aminohappest algavat Ste5 vormi). Western blot näitas, et valgud ekspresseerusid (pAS2-1 konstruktid Joonisel 11, pGADGH konstruktid Joonisel 13)



Joonis 11: pAS2-1 vektorist ekspresseeritavate liitvalkude kontroll Western blotil. Parem pool on toodud valgumarkeri molekulmassi suurused. GAL4-bd-Hmi1 on ~100kDa, GAL4-bd-Ste7 ~80kDa suurune.

Järgnevalt transformeeriti vastavad konstruktid pärmi. Valk-alk interaktsioonide olemasolu detekteerimiseks kasutati β -galaktosidaasi testi (Tabel 5). Positiivse tulemuse andsid vaid eelnevalt tuvastatud valgupaare ekspresseerivate konstruktidega transformeeritud rakud. Interaktsiooni ei nähtud ei 24-917Ste5 – $\Delta 15$ Hmi1 ega 24-917Ste5 – Hmi1, 757-917, 759-917Ste5 – Hmi1 paaride vahel.

Kuna Ste5 esineb rakus arvatavasti mitmes erinevas konformatsioonis ning sellest tingituna võib interakteeruda seondumispartneritega erineva afiinsusega, ei pruugi 24-917Ste5 valgu C-terminaalne regioon kaksikhübridsüsteemis olla vaba seondumiseks $\Delta 15$ Hmi1-ga. Hmi1 ja Ste5 vahelise interaktsiooni puudumise põhjuseks võib olla aga asjaolu, et pAS2-1 vektorist ekspresseeritud täispikka Hmi1 liitvalku ei transpordita tuuma

mitokondriaalse transpordisignaali esinemise tõttu liitvalgu primaarstruktuuris. Tuuma lokaliseerumine on aga eeltingimuseks kaksikhübridsüsteemi toimimiseks.

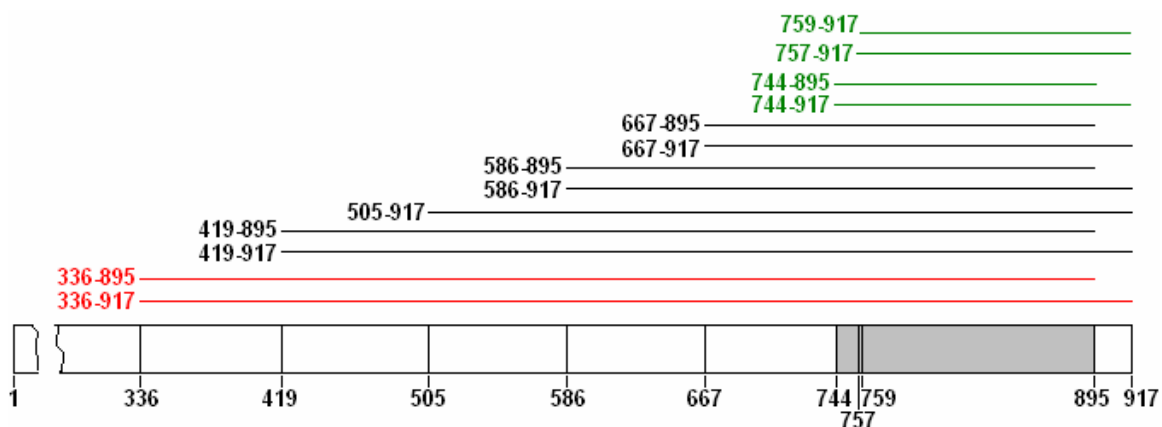
Tabel 5: β -galaktosidaasi testi tulemused Ste5 erinevate fragmentide interaktsioonidest $\Delta 15\text{Hmi1}$ ning Hmi1-ga.

AD-Ste5 fragmendid	DNA BD – $\Delta 15\text{Hmi1}$	DNA BD – Hmi1
24-917Ste5	-	-
757-917Ste5	+	-
759-917Ste5	+	-

+ tähistab positiivset tulemust ehk interaktsiooni olemasolu kaksikhübridsüsteemis;

- interaktsiooni puudumist

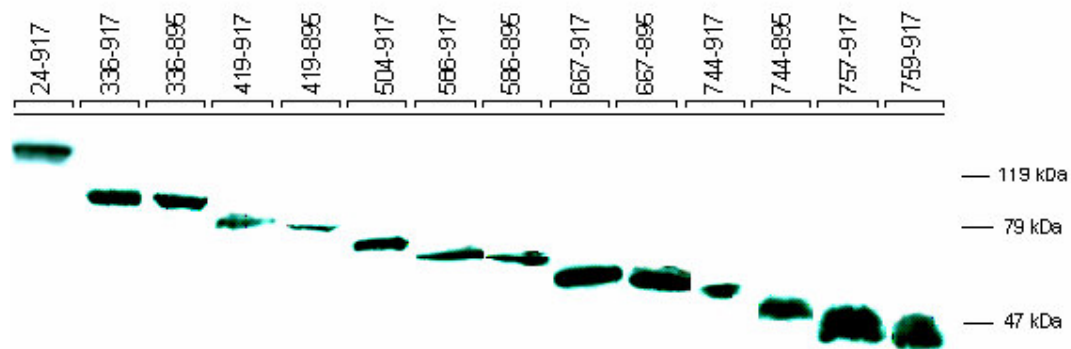
Et välja selgitada, millised erineva pikkusega Ste5 valgu piirkonnad interakteeruvad $\Delta 15\text{Hmi1}$ -ga, kloneriti järgnevalt rida Ste5 C-terminaalseid fragmente pGADGH vektorisse, et läbi viia kaksikhübridsüsteem vastavate fragmentide ja $\Delta 15\text{Hmi1}$ ning Hmi1 valkude vahel. Kuna eelnevalt tuvastatud $\Delta 15\text{Hmi1}$ -ga interakteeruv Ste5 piirkond on oluline ka Ste7-ga seondumiseks (Inouye *et al.*, 1997a mutatsioonanalüüsi põhjal, Joonis 12), kloneriti STE7 pAS2-1 vektorisse, et paralleelselt kontrollida Ste5 erineva pikkusega fragmentide interaktsioone Ste7-ga (ekspressiooni kontrolliti Western blotil, Joonis 11).



Joonis 12: Antud töös kasutatud Ste5 fragmendid. Punasega on tähistatud fragmendid, mis interakteerusid Ste7-ga, rohelisega fragmendid, mis interakteerusid $\Delta 15\text{Hmi1}$ -ga. Numbrid tähistavad aminohappeid, joonise all on toodud Ste5 primaarstruktuur, hall piirkond tähistab ala, mis mutatsioonanalüüsi põhjal on oluline Ste7-ga interakteerumiseks (Inoue *et al.*, 1997a). Fragmentid on kujutatud õigetes proportsioonides.

Töös kasutati Ste5 fragmente, mis algavad valgu N-terminaalsest osast alates 336. aminohappest kuni 744. aminohappeni iga ~ 80 aminohappe tagant ning lõppevad Ste5 C-terminuses 917. (viimase) või 895. aminohappega (edaspidi tähistatud: 336-917Ste5, 336-

895Ste5, 419-917Ste5, 419-895Ste5, 505-917Ste5, 586-917Ste5, 586-895Ste5, 667-917Ste5, 667-895Ste5, 744-917Ste5, 744-895Ste5, kus esimene arv tähistab esimest aminohapet Ste5 fragmendis, teine viimast) (Joonis 12). 336. aminohappest algava fragmendi alguskoht valiti kirjanduse põhjal, mille järgi on teada, et kaksikhübriidsüsteemis esineb interaktsioon täispika Ste7 ja 336. aminohappest algava Ste5 fragmendi vahel (Choi *et al.*, 1994). 744. algava ja 895. aminohappega lõppeva fragmendi algus ja lõpp valiti artikli põhjal, milles on mutatsioonanalüüsi põhjal kindlaks tehtud, et interaktsiooniks Ste7-ga on oluline just see Ste5 piirkond (Inouye *et al.*, 1997, Joonis 12). Vastavad fragmendid kloneeriti pGADGH vektorisse. Western blot näitas, et kõik Ste5 fragmendid ekspresseeruvad (Joonis 13).



Joonis 13: Ste5 erineva pikkusega fragmentide ekspressiooni kontroll Western blotil. Joonise ülemises servas on ära toodud Ste5 erinevate fragmentide esimese ja viimase aminohappe number, paremal pool on kujutatud valgumarker.

Vastavate Ste5 fragmentide interaktsioone $\Delta 15\text{Hmi1}$, Hmi1 ning Ste7-ga kontrolliti kaksikhübriidsüsteemis β -galaktosidaasi testi abil. Tulemused on toodud Tabelis 6.

Katses suudeti detekteerida interaktsioon $\Delta 15\text{Hmi1}$ ja Ste5 fragmendiga alates 744. aminohappest, mis on vaid 13 aminohapet N-terminaalsest osast pikem kui pärmi genoomse raamatukogu skriinimisel tuvastatud Ste5 fragmendid. N-terminaalsest osast veel pikemate fragmentide puhul kaksikhübriidsüsteemi abil detekteeritav interaktsioon aga kadus. Seejuures säilis interaktsioon 744. aminohappest algava fragmendiga, milles Ste5 22 C-terminaalset aminohapet olid deleteeritud.

Täispikk Hmi1 ei andnud positiivset interaktsiooni ühegi kontrollitud Ste5 fragmendiga. Ste7 andis interaktsiooni vaid 336. a-h-st algava Ste5 fragmendiga, mille viimased 22 a-h võivad olla deleteeritud. Üllatav on asjaolu, et 336. a-h-st algava fragmendi lühenemisel N-terminaalsest osast vaid 83 a-h võrra (419. a-h-ni), kaob kaksikhübriidsüsteemis tuvastatav interaktsioon Ste7 ja Ste5 vahel, kuigi

mutatsioonanalüüsi põhjal on Ste7-ga seondumiseks vajalik regioon Ste5 C-terminuses alles alates 744. a-h-st (Joonis 12, Inouye *et al.*, 1997a). See võib ühelt poolt viidata mõne lisaregiooni vajalikkusele Ste5 valgus interaktsiooni toimumiseks Ste7-ga, teisalt olla aga taas tingitud Ste5 fragmentide erinevatest konformatsioonidest.

Tabel 6: β -galaktosidaasi testi tulemused Ste5 erinevate fragmentide interaktsioonidest $\Delta 15$ Hmi1, Hmi1 ja Ste7-ga.

AD- Ste5 fragmendid	DNA BD		
	Hmi1	$\Delta 15$ Hmi1	Ste7
336-917	-	-	+
336-895	-	-	+
419-917	0	-	-
419-895	0	-	-
505-917	0	-	-
586-917	0	-	-
586-895	0	-	-
667-917	0	-	-
667-895	0	-	-
744-917	-	+	-
744-895	-	+	-
757-917	-	+	-
759-917	-	+	-
pGAD GH	-	-	-

+ tähistab positiivset tulemust ehk interaktsiooni olemasolu;

- interaktsiooni puudumist,

0 – vastavat interaktsiooni ei kontrollitud

Kokkuvõtteks suudeti kaksikhübridsüsteemis näidata interaktsioone Ste5 ja Ste7 ning Ste5 ja $\Delta 15$ Hmi1 paaride vahel Ste5 selliste fragmentidega, mis jäid kahe interakteeruva valgu jaoks pikkuselt erinevaks. Ste5 fragmenti, mis suudaks interakteeruda nii $\Delta 15$ Hmi1 kui Ste7-ga ei leitud. Samuti ei andnud kaksikhübridsüsteemis positiivset tulemust Hmi1 ühegi Ste5 fragmendiga.

6.1.3. GST-pulldown

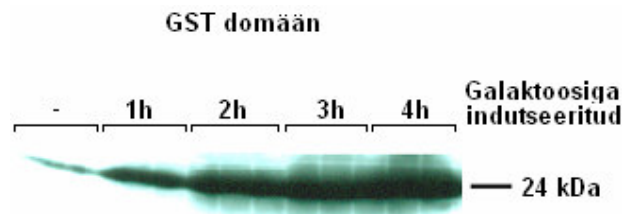
Et kinnitada interaktsiooni olemasolu $\Delta 15$ Hmi1 ja Ste5 valkude vahel, viidi järgnevalt läbi GST-pulldown katse, kus GST (*Schistosoma japonicum* glutatioon S-transferaas) domääniga liitvalk puhastati rakulüsaadist ning analüüsiti seejärel, kas potentsiaalselt interakteeruv valk puhastub kaasa. Nii Ste5 kui Hmi1 on rakus madalal

tasemel ekspresseeruvad valgud. Lisaks on Ste5 suhteliselt ebastabiilne ning Hmi1 peaks eeldatavasti lokaliseeruma mitokondrisse. Seetõttu otsustati mõlemat valku ekspresseerida GST-liitvalguna indutseeritavalt GAL1 promootorilt madala koopia arvuga plasmiididelt. Sarnaselt on näidatud kõik interaktsioonid Ste5 komplekside analüüsis (Choi *et al.*, 1994). Antud katsetes otsustati kasutada täispikka Hmi1, $\Delta 15$ Hmi1 ning täispikka Ste5 valku, sest sellistena esinevad nad *in vivo*.

Ekspressioonikonstruktide valmistamine

Valkude ekspresseerimiseks antud katses konstrueeriti vajalikud vektorid, mis pidid täitma järgneva tingimusi. Esmalt pidid vektorid sisaldama erinevaid selektsioonimarkereid. Et valke ekspresseerida kõrgel tasemel, kloneeriti vektoritesse GAL1 promootor, mis on indutseeritav galaktoosi lisamisega söötmesse. Valgukompleksi puhastamiseks rakulüsaadist pidi üks ekspresseeritavatest valkudest olema seotud GST domääniga, et vastavat liitvalku saaks puhastada glutatioon-agarooosi maatriksi abil ning detekteerida GST-vastaste antikehadega. Teise, interakteeruva valgu olemasolu detekteerimiseks liideti selle külge HA (gripiiviiruse hemaglutiniin) epitoop, mis võimaldab valgu ekspressiooni ja kaasapuhastumist kontrollida vastavate antikehade abil. Nii HA epitoopi kui GST domääni kodeerivad alad kloneeriti vektoritesse valke kodeerivatest geenidest ülesvoolu, et konstruktidelt ekspresseeritavates liitvalkudes jääksid nad N-terminaalsesse otsa.

HMI1, $\Delta 15$ HMI1 ning STE5 geenid kloneeriti mõlemasse kirjeldatud vektorisse ning valkude ekspresseerumist galaktoosi lisamisel söötmesse kontrolliti Western blotil. Selleks võeti proovid indutseerimata, 1, 2, 3 ja 4h indutseeritud rakkudest. Joonisel 14 on ära toodud induktsioonipunktid GST domääni ekspresseerumise näitel, HA-epitoobiga liitvalgud ekspresseerusid sarnaselt.



Joonis 14: GST domääni ekspressioon indutseerimata, 1, 2, 3 ja 4h galaktoosiga indutseerimise järel. Rakke kasvatati selektiivses rafinoosi söötmes ning GAL1 promootori indutseerimiseks lisati söötmesse galaktoosi.

Nagu jooniselt 14 näha, toimub GAL1 promootorilt transkriptsioon konstitutiivselt madalal tasemel, sest ekspresseeritav valk on detekteeritav ka indutseerimata rakkudes. Galaktoosi lisamisel on juba 1h pärast suurenenud valgu ekspressioonitase, tõustes 2 ja 3 tunni jooksul veelgi. Edasistes GST-*pulldown* katsetes indutseeriti valkude ekspressiooni 2h.

GST-*pulldown* katse läbi viimiseks transformeeriti pärmitüvesse W303 paari kaupa järgnevad konstruktid:

pRS316:GST - / pRS315:HA- Δ 15Hmi1 (- kontroll);

pRS316:GST-STE5 / pRS315:HA- Δ 15Hmi1;

pRS316:GST- / pRS315:HA-Hmi1 (- kontroll);

pRS316:GST-STE5/ pRS315:HA-Hmi1;

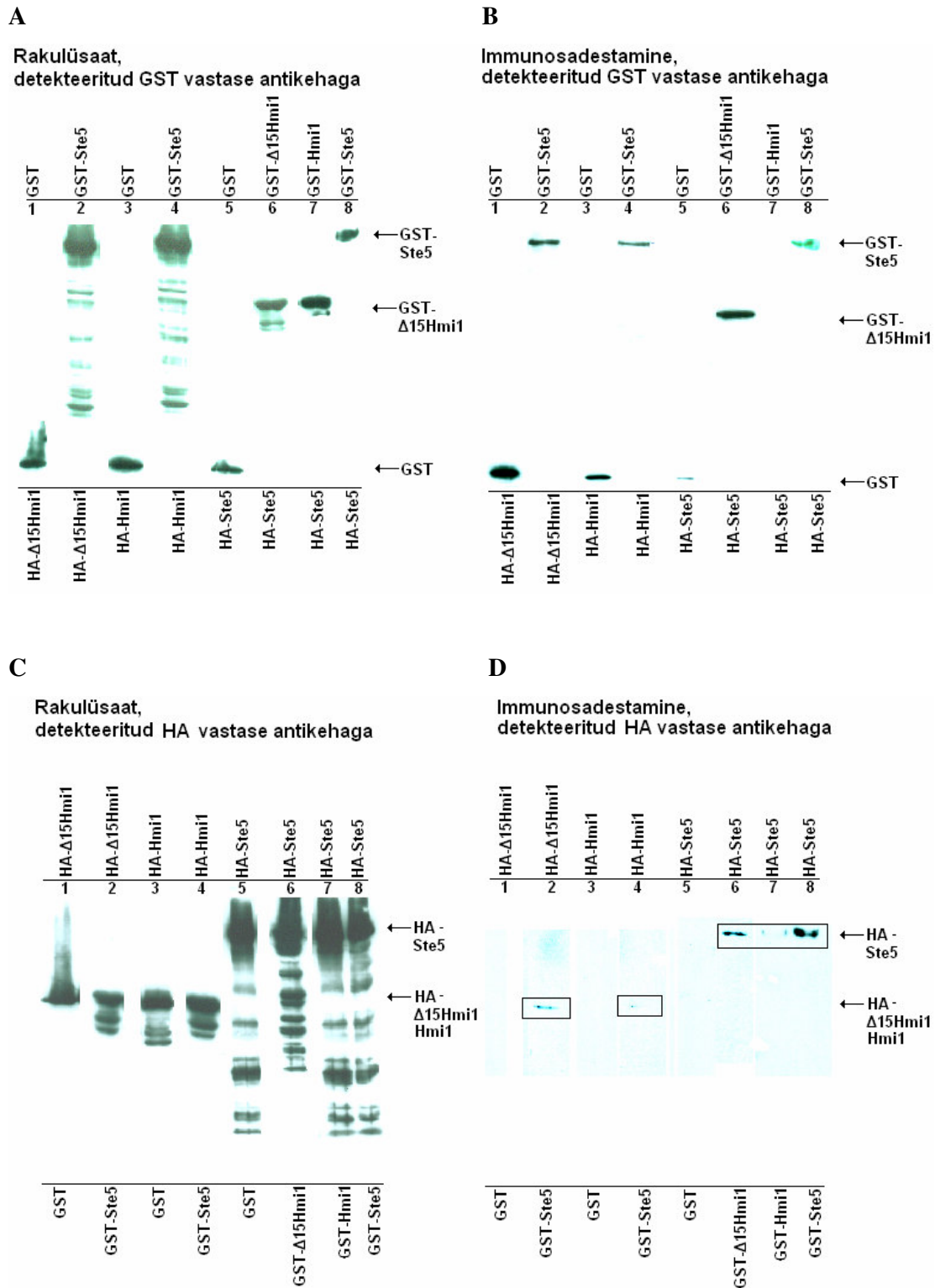
pRS316:GST- / pRS315:HA-STE5 (- kontroll);

pRS316:GST- Δ 15Hmi1 / pRS315:HA-STE5; pRS316:GST-Hmi1 / pRS315:HA-STE5;

pRS316: GST-STE5 / pRS315:HA-STE5 (+ kontroll).

Negatiivseks kontrolliks oli GST domään ekspresseerituna koos HA-liitvalguga, et kontrollida potentsiaalse interaktsioonipartneri seondumist GST domääniga. Positiivseks kontrolliks olid GST-Ste5 ja HA-Ste5 liitvalke koekspresseerivad rakud, milles Ste5 dimeriseerumise tõttu peab olema detekteeritav vastav interaktsioon. Ste5 ja Hmi1 ning Ste5 ja Δ 15Hmi1 vahelist interaktsiooni otsustati uurida nii GST-Ste5 kui GST-Hmi1 ja GST- Δ 15Hmi1 liitvalkude abil. Kirjanduse põhjal on teada, et GST-Ste5 liitvalk on dimeriseerunud olekus, HA epitoobi sidumine valgu külge dimeriseerumist aga ei mõjuta (Wang & Elion, 2003). Dimeriseerumise esinemise või puudumise tõttu võivad GST-Ste5 ja HA-Ste5 liitvalgud omada erinevat konformatsiooni ja sellest tulenevalt seonduda erinevalt Δ 15Hmi1 ja Hmi1 valkudega.

Eelpoolnimetatud valgupaaride ekspresseerimiseks indutseeriti vastavaid ekspressioonikonstrukte sisaldavaid rakke ning viidi läbi GST-*pulldown* katse. Enne rakulüsaadiga teostatavat sadestamist võeti igast rakulüsaadist proov valkude ekspressioonitaseme kontrolliks. Ülejäänud lüsaadist seoti GST-valk-valk kompleksid glutatioon-agaroosi maatriksi külge. Seejärel valgud denatureeriti, eraldati SDS-geelelektroforeesi abil ja kanti nitrotselluloosfiltrile. Valke detekteeriti esmalt GST vastaste antikehadega ning seejärel peale filtrite puhastamist antikehadest HA vastaste antikehadega (Joonisel 15).



Joonis 15: GST-pulldown katse tulemused detekteerituna Western blotil. A, C – geelis lahutatud proov kogu rakulüsaadist, B, D – immunosadestamise tulemused. A, B – valke detekteeriti GST vastaste antikehadega, C, D – valke detekteeriti HA vastaste antikehadega. Iga veeru üleval ja all on ära toodud vastavas proovis koekspressioneeritud valgud. A, C – eksponeerimise aeg filmile 2min, B, D – eksponeerimise aeg filmile 12h.

Nagu Jooniselt 15 näha, puhastus positiivse kontrolliga proovis GST-Ste5 liitvalguga kaasa HA-Ste5 (Joonis 15D, rada 8). Seejuures oli rakulüsaadist puhastunud GST-Ste5 hulk suhteliselt väike (Joonis 15B, rada 8). Negatiivsete kontrollide puhul (Joonis 15D, rajad 1,3,5) ei puhastunud GST domääniga kaasa ükski koos ekspresseeritud valk, kuid GST – HA-Ste5 negatiivse kontrolli puhul oli ka välja puhastatud GST tase väga madal (Joonis 15B, rada 5). GST-Ste5 liitvalguga puhastus kaasa HA-Δ15Hmi1 (Joonis 15D, rada 2) ja oluliselt madalamal tasemel ka HA-Hmi1 (Joonis 15D, rada 4). GST-Δ15Hmi1 liitvalguga puhastus kaasa HA-Ste5 (Joonis 15D, rada 6). GST-Hmi1 ja HA-Ste5 koekspressseerivates rakkudes ei õnnestunud detekteerida GST-Hmi1 puhastumist rakulüsaadist (Joonis 15D, rada 7), kuid väga nõrgal tasemel võis näha HA-Ste5 liitvalku. See võib olla tingitud asjaolust, et GST-Hmi1 tase oli liiga madal detekteerimaks seda GST antikeha abil kemoluminestsentsiga.

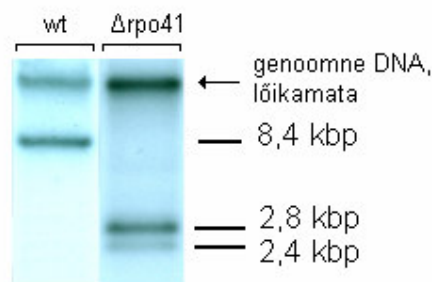
Kuigi GST-*pulldown* katses detekteeritud signaalid olid nõrgad, kinnitavad saadud andmed Ste5 ja Hmi1 vahelise interaktsiooni olemasolu. Nagu Jooniselt 15 näha, suudeti ka GST liitvalke peale lüsaatide sadestamist detekteerida väga nõrgal tasemel. Kuna Western blotil andsid rakulüsaadist detekteeritavad valgud tugeva signaali, pole põhjus valkude liiga madalas ekspressioonitasemes. Järgnevalt on plaanis katse tingimusi optimeerida, et saavutada GST-liitvalkude parem seondumine glutatioon-agarooosi maatriksile ning saada selgem tulemus GST-*pulldown* katses.

6.1.4. Invasiivne kasv ja 1-butanooli poolt indutseeritud filamenteerumine HMI1 deletsiooniga Σ1278 tüves

Nagu peatüks 3.1.5. mainitud, on HMI1 varasemalt tuvastatud geneetilises skriinis kui 1-butanooli poolt haploidsetes rakkudes esile kutsutud filamenteerumisenähtuse (bipolaarne pungumine, pikenenud rakud, adhesiooni suurenemine) täielikuks avaldumiseks vajalik geen (Lorenz *et al.*, 2000). Eelnevates katsetes tuvasatud interaktsioon Hmi1 ja paardumisraja komponendi Ste5 vahel tõstatab küsimuse, kuidas on Hmi1 seotud MAPK signaaliülekanaladega. Et Lorenz ja kaastöötajate töös leiti ka teisi filamenteerumiseks vajalikke mitokondriaalse funktsiooniga geene, analüüsisime HMI1 deletsiooniga Σ1278b (edaspidi Δhmi1) haploidset tüve invasiivse kasvu ja 1-butanooli poolt indutseeritud filamenteerumise osas, kasutades paralleelse kontrollina respiratoorselt defektset, RPO41 geeni deletsiooniga Σ1278b tüve (edaspidi Δrpo41). Rpo41 puhul on tegemist mitokondriaalse RNA polümeraasiga, mis on oluline rho⁺ mtDNA säilitamiseks.

Rpo41 pole varem leitud üheski filamenteerumist puudutavas skriinis. Selle deleteerimisel kaotavad pärmirakud sarnaselt HMI1 geeni deleteerimisega funktsionaalse mtDNA. Seega juhul, kui Hmi1 peaks omama lisarolli väljaspool mitokondrit, mis pole seotud mtDNA säilitamisega ja juhul, kui respireerimine pole oluline filamenteerumisenfenotüübi kujunemise seisukohalt, peaksid HMI1 ja RPO41 deletsiooniga tüved käituma erinevalt. Kui vastavad tüved käituvad aga ühtemoodi, vihjab see pigem respireerimis-funktsiooni üldisele vajalikkusele filamenteerumisel.

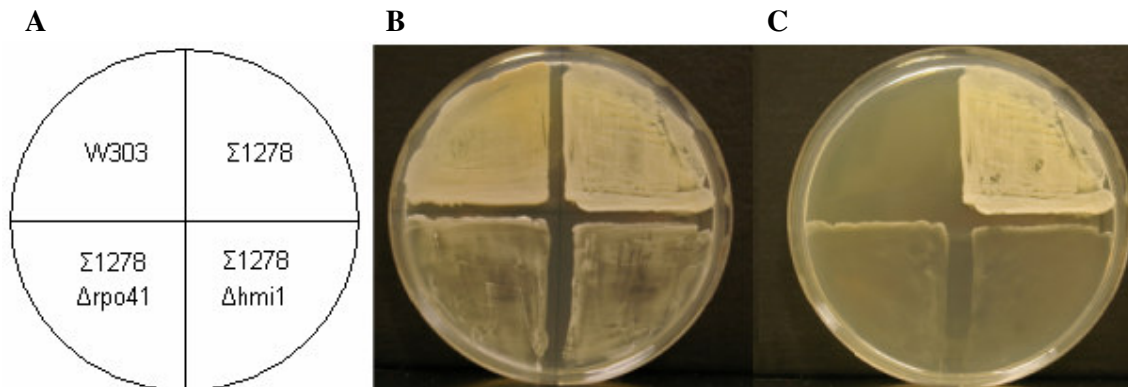
RPO41 deleteerimiseks inserteeriti wt Σ 1278b tüve RPO41 geeni lookusesse URA3 geen, tüve selekteeriti kasvu järgi –Ura söötmel ning kasvu puudumise järgi mittefermenteeritaval süsinikuallikal. Järgnevalt kontrolliti tüve Southern blotil, mille puhul peab metsikut tüüpi tüve korral tekkima ~7300 bp pikkune fragment, Δ rpo41 tüve puhul aga kaks ~2900 ja ~2500 bp pikkust fragmenti (restriksioon peatükis 5.1.11., Joonis 16). HMI1 geeni deletsiooniga Σ 1278b tüvi (edaspidi Δ hmi1) oli meie labori varem valmistatud Priit Jõersi poolt.



Joonis 16: Σ 1278b Δ rpo41 tüve kontroll Southern blotil. Wt tähistab metsikut tüüpi tüve, Δ rpo41 vastava geeni deletsiooniga tüve, paremal pool on ära toodud DNA marker. Kui tüves on säilinud metsikut tüüpi RPO41 geen, on Southern blotil näha ~7300 bp suurune fragment, kui RPO41 lookusesse on inserteerunud URA3 geen, on näha ~2900 ja 2500 bp pikkused fragmendid.

Esmalt uuriti eelpoolnimetatud tüvede võimet tungida agarisse invasiivse kasvu katses. Selleks kasvatati tüvesid YPD tardsöötmel 5-8 päeva ning võrreldi seejärel tüvede agarisse tungimist peale söötmepinnal olevate rakkude eemaldamist. Negatiivse kontrollina kasutati W303 tüve, mis pole võimeline agarisse tungima. Nagu Jooniselt 17B näha, jäi mutantsete rakutüvede tihedus wt tüvega võrreldes mõnevõrra väiksemaks, olles aga väga sarnane kahe mutandi vahel. Jooniselt 17C on näha, et negatiivse kontrollina kasutatud W303 tüvi ei suuda agarisse tungida, Σ 1278b invasioon oli aga väga tugev nagu varem teada ka kirjanduse põhjal. Δ hmi1 ja Δ rpo41 tüved olid agarisse tunginud oluliselt vähem kui wt Σ 1278b tüvi. Kahe mutandi vahel puudus antud katses erinevus agarisse tungimise osas. Vähesem invasioon võrreldes wt tüvega võis olla ühelt poolt tingitud otsesest

defektist invasiooni osas (nagu oletatud Lorenz *et al.*, 2000), kuid ei saa välistada ka võimalust, et vähesema invasiooni põhjuseks oli rakkude algne madalam tihedus ning deletantide aeglasem kasv, mis ei ole piisav invasiooni esile kutsumiseks.



Joonis 17: Agarisse invasioon W303 (- kontroll), $\Sigma 1278b$, $\Delta rpo41$ ja $\Delta hmi1$ tüvede puhul. A – rakutüvede paiknemine tassidel, B – foto tassist enne söötme pinnal paiknevate rakkude mahapesemist C – foto tassist peale söötme pinnal paiknevate rakkude mahapesemist.

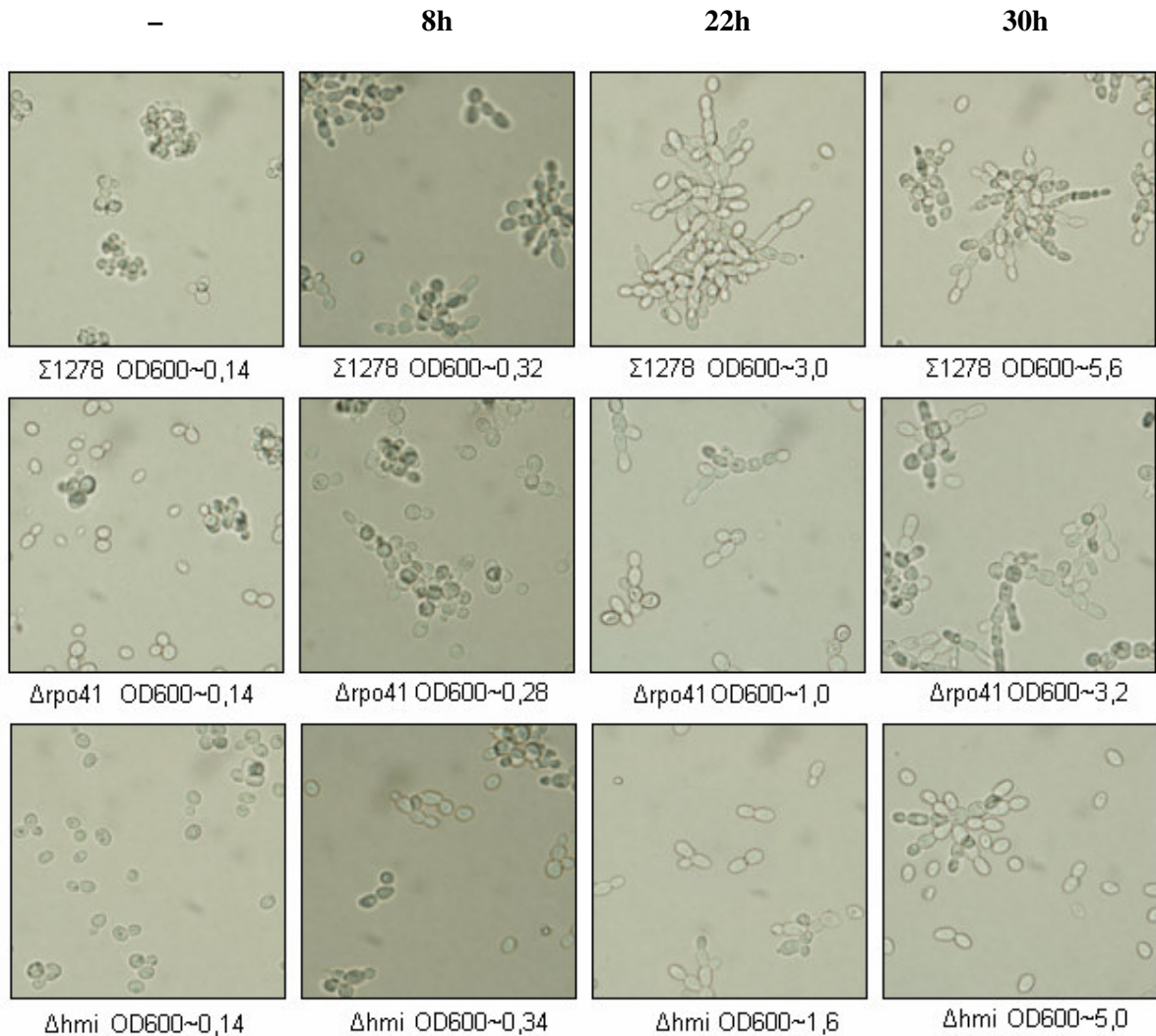
Järgnevalt uuriti 1-butanooli mõju HMI1 deletsiooniga tüve filamenteerumisele. Selleks inokuleeriti $\Sigma 1278b$, $\Delta hmi1$ ja $\Delta rpo41$ tüved 1-butanooli sisaldavasse YPD söötmesse ning rakke pildistati 0, 8, 22 ja 30h pärast kasvatamist.

Katse tulemusena omandasid wt rakud juba 8h pärast butanooli lisamist filamenteerumisele omase fenotüübi, moodustades ümarate rakukogumike asemel väljaulatuvate jätketega klastreid (Joonis 18A). 22 ja 30h möödudes olid filamenteeruvad jätked pikenenud, rakukogumikud koosnesid suuremast arvust rakkudest ning rakud omandanud pikliku kuju. Üksikuid rakke kultuuris praktiliselt ei esinenud, seda ka enne butanooli lisamist söötmesse.

$\Delta hmi1$ ja $\Delta rpo41$ tüved erinesid antud tingimustes wt $\Sigma 1278b$ tüvest. Mõlema mutandi puhul olid paljud rakud üksikult ning seda ka 8h möödudes butanooliga söötmesse inokuleerimisest. Filamentidest koosnevate klastrite moodustumine võttis nii $\Delta rpo41$ kui $\Delta hmi1$ mutantid puhul oluliselt rohkem aega kui wt tüvel ning ka 30h-ks ei saavutanud need wt tüvega võrreldavat suurust. Lisaks paistsid mutantide rakud 22h ajapunktis ümaramad võrreldes wt tüve selgelt piklike rakkudega. 30h möödudes oli $\Delta rpo41$ tüves näha juba ka piklikke rakke, kuid $\Delta hmi1$ tüve puhul olid enamused rakud endiselt ümarad. $\Delta rpo41$ ja $\Delta hmi1$ tüved erinesid lisaks ka selle poolest, et $\Delta hmi1$ tüve puhul oli väga palju üksikuid rakke ka 30h möödudes butanooli sisaldavasse söötmes inokuleerimisest, kuid

Δ rpo41 tüves nad selleks ajaks praktiliselt kadusid. Seejuures olid kõik tüved sarnase rakutihedusega ning seega omavahel võrreldavad.

Kokkuvõtteks omavad nii Δ rpo41 kui Δ hmi1 tüved defekti 1-butanooli poolt indutseeritud filamenteerumises. Seejuures on Δ hmi1 tüve defekt Δ rpo41 omast suurem, seda nii rakkudevahelise adhesiooni (Δ hmi1 tüves on oluliselt rohkem üksikuid rakke ja vähem rakukogumikke) kui rakkude pikenemise seisukohast.



Joonis 18: 1% 1-butanooli poolt indutseeritud filamenteerumine YPD vedelsöötmes. Tulpades on vasakult paremale ära toodud 0, 8, 22 ja 30h 1-butanooliga söötmes kasvanud rakud. Ülemisel real on wt Σ1278b, keskmisel Δ rpo41 ning alumisel Δ hmi1 tüvede seeriad. Iga pildi all on ära toodud vastava kultuuri OD600 juures.

6.1.5. Kvantitatiivne pöördtranskriptaasi PCR (Q-RT-PCR)

Et uurida paardumis- ja filamenteerumisradade aktiveerumist $\Delta hmi1$ tüves, otsustati jälgida antud radade märklaugeenide poolt kodeeritud mRNA-de taseme muutumist rakus feromooni või 1-butanooli lisamisel. Selleks kasutati kvantitatiivset-pöördtranskriptaasi-PCR reaktsiooni (Q-RT-PCR), mis on väga tundlik meetod mRNA hulga kvantifitseerimiseks. Paardumisspetsiifiliseks geeniks valiti FUS1, mille transkriptsioon aktiveeritakse väga spetsiifiliselt ning kõrgel tasemel feromooni olemasolul. FLO11 geeni ekspressiooni otsustati detekteerida kui võimalikku märklauda butanooli poolt indutseeritud filamenteerumisel. Kontrollgeeninena kasutati RDN18-1 rRNA-d kodeerivat geeni. $\Sigma 1278b$, $\Delta rpo41$ ja $\Delta hmi1$ tüvesid kasvatati 1-butanooli või α -faktori juuresolekul, negatiivse kontrollina YPD söötmes. Enne RNA eraldamist mõõdeti kultuuride optiline tihedus 600nm juures.

Tabel 6: OD₆₀₀ enne RNA eraldamist

Tüvi	OD600		
	YPD	YPD + 1-butanool	YPD + α -faktor
$\Sigma 1278b$	0,54	0,7	0,5
$\Delta rpo41$	0,7	0,25	0,7
$\Delta hmi1$	0,45	0,35	0,45

Tiheduse järgi otsustades olid enamus kultuurid eksponentsiaalses kasvufaasis, rakkude tihedus butanooli juuresolekul kasvanud $\Delta rpo41$ ja $\Delta hmi1$ tüvede puhul oli 2 korda madalam võrreldes teiste kultuuridega (Tabel 6). Rakkudest eraldati RNA, tehti DNAasi töötlus ja pöördtranskriptsiooni reaktsioon. Saadud cDNA-d kasutati matriitsina Q-PCR reaktsioonides. Q-PCR-i andmed ja nende analüüs on ära toodud Lisas 3.

Q-PCR tulemusena leiti, et paardumisspetsiifiline FUS1 ekspresseerub feromooni puudumisel YPD-s kasvanud rakkudes detekteeritaval tasemel nii wt kui $\Delta rpo41$ tüves (Tabel 7). Seejuures on viimases FUS1 mRNA tase ~2x väiksem. $\Delta hmi1$ tüves on FUS1 mRNA tase antud tingimustes allpool detekteeritavuse piiri. (Ct väärtus on väga lähedal nullnivoole ehk C0-Ct väärtused ≤ 2 . Sellistel juhtudel pole saadud andmed täpsed, sest olulist rolli hakkab mängima genoomse DNA kontaminatsioon ning tulemused loetakse alla detekteeritavuse piiri olevaiks). Butanooli lisamisel langeb ka wt ja $\Delta rpo41$ tüvedes FUS1 mRNA tase alla detekteeritavuse piiri. Arvatavasti toimub konkureeriva filamenteerumisspetsiifilise raja sisselülitumisel basaalselt ekspresseeruva FUS1 geeni

ekspressiooni inhibitsioon. Feromooni lisamisel kasvukeskkonda indutseeritakse FUS1 geeni ekspressioon ootuspäraselt kõikides tüvedes. Wt tüvedes indutseeritakse ekspressioon võrreldes basaalse tasemega ~13,5 korda. Üllatavalt on Δ rho41 ja Δ hmi1 tüvedes toimuv induktsioon aga vastavalt ~34 ja ~80 kordne võrreldes basaalse tasemetega samades tüvedes (Tabel 7, FUS1 II tulp) ehk ~2,4 ja ~5,8 korda suurema ulatusega kui wt tüves toimuv induktsioon (Tabel 7, FUS1 tulp II; 34/13,5 ja 81/13,5). Kui võrrelda Δ rho41 ja Δ hmi1 tüvedes esinevat FUS1 mRNA hulka feromooni olemasolul wt tüves esinevaga, on Δ rho41 tüves FUS1 mRNA-d ~1,3 korda, Δ hmi1 tüves aga veidi üle 2 korra rohkem (Tabel 7, FUS1 I tulp).

Tabel 7: Q-PCR andmete võrdlus.

Kasvu-tingimus	Tüvi	FUS1 mRNA tase					FLO11 mRNA tase				
		C0-Ct* (28-Ct)	I mRNA tase (wt/uuritav tüvi)		II mRNA tase (YPD/uuritav tingimus)		C0-Ct* (28-Ct)	I mRNA tase (wt/uuritav tüvi)		II mRNA tase (YPD/uuritav tingimus)	
YPD	Σ 1278	2,7	1		1		8	1		1	
	Δ rho41	2,6	1,92	↓1,9	1		4,7	16,63	↓16,6	1	
	Δ hmi1	1		ND	1		4,8	7,19	↓7,2	1	
1-butanool 13,5h	Σ 1278	0,5		ND		ND	7,8	1		1,5	↓1,5
	Δ rho41	0,4		ND		ND	1,1		ND		ND
	Δ hmi1	0,4		ND		ND	1,9		ND		ND
α -faktor 1h	Σ 1278	6,5	1		0,07	↑13,5	1,1		ND		ND
	Δ rho41	7,4	0,76	↑1,3	0,03	↑34	0,8		ND		ND
	Δ hmi1	8	0,46	↑2,2	0,01	↑↑~81	0,9		ND		ND

* Co-Ct tähistab PCR-i tsüklite arvu erinevust kokkuleppelisest nullpunktist (C0=28), kui Co-Ct on < 2, loetakse ekspressioonitase alla detekteeritavuse piiri olevaks - ND.

I tulbas on võrreldud mRNA taset vastavas katsetingimuses kasvanud Δ rho41 ja Δ hmi1 tüvedes samas tingimuses kasvanud wt tüvega.

II tulbas on võrreldud mRNA taset antud tingimuses kasvanud rakkudes võrreldes sama tüvega YPD-s. Arvud tähistavad RNA taseme erinevust võrreldavast tüvest kordades.

↑ numbri ees tähistab ekspressioonitaseme tõusu, ↓ ekspressioonitaseme langust.

↑↑~ tähistab ekspressioonitaseme tõusu mittedetekteeritavalt tasemelt.

FLO11 mRNA on kõikides YPD-s kasvanud tüvedes hästi detekteeritav (C0-Ct üle 4). Δ rho41 ja Δ hmi1 tüvedes on seda aga vastavalt ~16 ja ~7 korda vähem kui wt tüves, jäädes kummaski siiski hästi detekteeritavaks. Feromooni olemasolul langeb FLO11 mRNA tase alla detekteeritavuse piiri kõikides tüvedes, viidates paardumisspetsiifilise MAPK raja sisselülitumisel toimuvale konkureeriva raja inhibitsioonile nagu seda oli näha ka FUS1 mRNA taseme muutuse puhul butanooli söötmes kasvanud rakkudes. Huvitaval

kombel ei suurene FLO11 mRNA tase aga butanooli juuresolekul üheski tüves. Vastupidiselt ootustele langeb selle tase wt tüves võrreldes ilma butanoolita kasvanud rakkudega ~1,5 korda, jäädes hea detekteeritavuse piiridesse. Mõlemas mutantses tüves langeb FLO11 mRNA tase basaalselt tasemelt aga alla detekteeritavuse piiri, viidates FLO11 geeniekspressiooni täielikule inhibeerimisele (Tabel 7, FLO11 I ja II tulp).

Kokkuvõtteks võib öelda, et nii $\Delta rpo41$ kui $\Delta hmi1$ tüvedes on muutunud paardumisspetsiifilise geeni FUS1 ja filamenteerumisspetsiifilise geeni FLO11 ekspresioonitasemed võrreldes wt tüvega, seda nii kontroll kui katsetingimustes. RPO41 ja HMI1 deletsiooni mõju on seejuures kummagi raja puhul sarnane, kuid erineva ulatusega. Kuna FLO11 ekspresiooni regulatsioon arvatakse olevat väga keeruline, on järgnevalt plaanis kasutada filamenteerumise jälgimiseks ka teiste potentsiaalselt filamenteerumisele spetsiifiliste geenide ekspresiooni.

7. ARUTELU

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada *S. cerevisiae* mitokondriaalse helikaasi Hmi1-ga interakteeruvad valgud ning uurida nende interaktsioonide bioloogilist tähtsust. Skriinides pärmi genoomset DNA raamatukogu mitokondriaalse importsignaalita $\Delta 15\text{Hmi1}$ vastu detekteeriti kaksikhübriidsüsteemi abil interaktsioonid kahe tsütoplasmaatilise valgu – Bni1 ja Ste5 – ning $\Delta 15\text{Hmi1}$ vahel. Leitud interaktsioonid olid mõnevõrra üllatavad, sest Ste5 ja Bni1 ei oma teadaolevalt rolli mtDNA metabolismis ning vastupidiselt ootustele ei õnnestunud tuvastada ühtegi mitokondriaalset $\Delta 15\text{Hmi1}$ -ga kompleksi moodustavat valku.

Bni1 puhul on tegemist formiiniga, millelt algab lineaarsete aktiinifilamentide moodustumine membraani lähedal. Ta osaleb mitootilise telje määratlemises, pungumise regulatsioonis ja organellide segregatsioonis. On näidatud, et Bni1 on tänu rollile aktiinifilamentide organiseerimises vajalik mitokondrite liikumiseks rakus (Fehrenbacher *et al.*, 2004). Kuna tsütoskeleti komponendid on sageli valepositiivseteks tulemusteks kaksikhübriidsüsteemis, pole Hmi1 ja Bni1 vaheliste interaktsioonide edasist uurimist esialgu veel alustatud.

Ste5 on vaid haploidsetes rakkudes ekspresseeruv paardumisspetsiifilise MAP kinaaside signaaliülekaneraja tugivalk. Tema rolliks on paardumise esilekutsumiseks vajaliku signaali – feromooni – olemasolul plasmamembraanile lokaliseerumine ja paardumisraja komponentide – Ste11, Ste7, Fus3 (ja Kss1) kinaaside – sidumine. Peale lokaliseerumist plasmamembraanile aktiveerivad Ste5-ga seotud kinaasid üksteist järjestikku fosforüleerimise teel ning signaali jõudmisel MAP kinaasi Fus3-ni käivitatakse paardumisvastus.

Hmi1 võimaliku rolli kohta paardumisrajas varasemad andmed puuduvad. Küll on Hmi1 aga varem tuvastatud kui butanooli poolt indutseeritud filamenteerumise fenotüübi kujunemiseks vajalik valk haploidsetes rakkudes (Lorenz *et al.*, 2000). Filamenteerumisvastuse kujunemine on pärmis reguleeritud vähemalt kahe signaaliülekaneraja poolt, millest üks toimib läbi MAP kinaaside kaskaadi ning jagab ühiseid komponente (Ste11, Ste7, Kss1) paardumisspetsiifilise MAP kinaaside rajaga. Seega on vihjed Hmi1 osalusele ühelt poolt filamenteerumisrajas ning teiselt poolt leitud interaktsioon paardumisraja komponendi Ste5-ga küllaltki huvipakkuvad. Seetõttu keskenduti antud töös Hmi1 ja Ste5 vahelise interaktsiooni uurimisele.

Kaksikhübriidskriinis tuvastatud interaktsioon $\Delta 15\text{Hmi1}$ ja Ste5 vahel toimus läbi Ste5 C-terminaalse osa (aminohapped 757-917). Et teada saada, millised regioonid Ste5 valgus suudavad interakteeruda $\Delta 15\text{Hmi1}$ -ga, kontrolliti rea Ste5 C-terminaalsete fragmentide interaktsioone $\Delta 15\text{Hmi1}$ ja Hmi1-ga. Kuna kaksikhübriidsüsteemis tuvastatud Ste5 valgus C-terminaalne osa on mutatsioonanalüüsi põhjal oluline Ste7-ga seondumiseks (aminohapped 744-895), kontrolliti paralleelselt Ste5 erineva pikkusega fragmentide võimet interakteeruda ka Ste7-ga. Kaksikhübriidsüsteemi tulemusena ei õnnestunud tuvastada interaktsioone täispika Hmi1 ja ühegi Ste5 fragmendi vahel. Kuna kaksikhübriidmeetodis toimuva valkudevahelise interaktsiooni detekteerimiseks on vajalik mõlema uuritava liitvalgu transport tuuma, ei pruugita täispikka Hmi1 mitokondriaalse importsignaali tõttu sinna lokaliseerida ja see võib olla põhjuseks, miks Hmi1 ja $\Delta 15\text{Hmi1}$ käituvad antud katses erinevalt. $\Delta 15\text{Hmi1}$ suutis interakteeruda lisaks algselt tuvastatud Ste5 fragmentidele 744. aminohappest algava Ste5 fragmendiga (744-917Ste5) ehk regiooniga, mis arvatakse siduvat Ste7 kinaasi. Pikemate Ste5 fragmentide puhul kaksikhübriidsüsteemi abil detekteeritav interaktsioon $\Delta 15\text{Hmi1}$ -ga kadus. Huvitavad on ka Ste7 ja Ste5 vaheliste interaktsioonide tulemused. Kuigi mutatsioonanalüüsi põhjal asub Ste7-ga interakteerumiseks vajalik piirkond Ste5 C-terminuses alates 744. aminohappest, kaob kaksikhübriidsüsteemis Ste7 ja Ste5 vaheline interaktsioon, mis esines 336. aminohappest algava Ste5 fragmendiga, juba vaid 80 aminohapet N-terminaalsest osast lühema Ste5 fragmendi puhul (419-917Ste5). Seega on kaksikhübriidsüsteemis interaktsiooni detekteerimiseks vajalik Ste5 C-terminaalne fragment mutatsioonanalüüsil tuvastatud piirkonnast tervelt 408 aminohapet pikem. Ei $\Delta 15\text{Hmi1}$ ega Ste7 interaktsiooniks Ste5-ga pole antud katsetes vajalikud Ste5 viimased 22 aminohapet. Kuna Ste7 sidumiseks vajalik valgupiirkond oli oluliselt pikem Inouye ja kaastöötajate poolt (1997a) mutatsioonanalüüsis tuvastatud piirkonnast, võib see viidata mõne lisaregiooni vajalikkusele Ste5 valgus Ste7-ga seondumiseks või teise võimalusena olla põhjustatud Ste5 erinevate fragmentide erinevatest konformatsioonidest, mis ei suuda Ste7 kinaasi ühtmoodi efektiivselt siduda. Ste5 fragmenti, mis suudaks interakteeruda nii $\Delta 15\text{Hmi1}$ kui Ste7-ga leida ei õnnestunud. Kuna oletatakse, et Ste5 esineb rakus olenevalt feromooni olemasolust või puudumisest erinevates konformatsioonides, võivad $\Delta 15\text{Hmi1}$ ja Ste7 hüpoteetiliselt interakteeruda Ste5 erinevate konformatsiooniliste vormidega. Seitse erineva pikkusega Ste5 fragmenti ei suutnud interakteeruda kummagi valguga. Nendel juhtudel võib tegu olla mõne kolmanda Ste5 konformatsiooni, Ste5

oligomeriseerumise/monomeriseerumise või ebakorrekse pakkumisega seotud valgude vormidega, mis ei suuda interakteeruda kummagi valguga.

Kuna kaksikhübridsüsteemi puhul ei saa välistada, et kasutatud liitvalgud on ebakorrektselt pakitud ning võtavad konformatsiooni, mida *in vivo* tegelikult ei esine, viidi Hmi1 ja Ste5 vahelise interaktsiooni kinnitamiseks läbi GST-*pulldown* katse. Katses kasutati täispikka Ste5 ning Hmi1 ja $\Delta 15$ Hmi1 valke, sest sellistena esinevad nad *in vivo*. Interaktsioonide detekteerimiseks ekspresseeriti valke kõrgel tasemel indutseeritava GAL1 promootori abil. Ekspresseeritud GST ja HA liitvalkude puhul paiknesid vastavad epitoobid valkude N-terminaalses osas, et Ste5 C-terminus, mis oli oluline interaktsiooni toimumiseks kaksikhübridsüsteemis, jäaks vabaks. Katse tulemusena õnnestus rakulüsaadist koos GST-Ste5 liitvalguga välja puhastada HA- $\Delta 15$ Hmi1 ning madalamal tasemel ka HA-Hmi1. Vastupidiste kombinatsioonide puhul õnnestus GST- $\Delta 15$ Hmi1 liitvalguga välja puhastada HA-Ste5 ning väga vähesel määral GST-Hmi1-ga interakteeruv HA-Ste5 (Joonis 15). Nagu Jooniselt 15 näha, suudeti nii HA- kui GST-liitvalke GST-*pulldown* katses detekteerida Western blotil vaid väga nõrgal tasemel. Samas olid kogu rakulüsaadist detekteeritud signaalid tugevad ning seega ei ole valkude vähene hulk GST-*pulldown* katses tingitud nende madalast ekspressioonist. Kuigi katse tulemusena detekteeritud signaalid olid suhteliselt nõrgad, lubavad nad kinnitada Ste5 ja Hmi1 ning Ste5 ja $\Delta 15$ Hmi1 vaheliste interaktsioonide olemasolu. Kuna ühelgi juhul ei puhastunud HA-liitvalk kaasa koos GST domääniga, peaks detekteeritud interaktsioonid esinema just uuritavate valkude vahel.

Ste5 ja Hmi1 vaheliste interaktsioonide esinemine viitab Hmi1 rollile paarumisspetsiifilises MAPK signaalirajas. Kuna Hmi1 seondumispirkond Ste5 tugivalgus kattub filamenteerumiseks vajaliku Ste7 kinaasi siduva piirkonnaga, võib Hmi1 hüpoteetiliselt Ste5 tugivalguga seondudes konkureerides Ste7 kompleksist Ste5-ga välja ning sellega moduleerida ka filamenteerumisspetsiifilist MAPK rada. Viimase aktiveerumise efektiivsus võib olla sõltuv vabast (Ste5-ga mitteseondunud) Ste7 hulgast (Yashar *et al.*, 1995) ning seega võib Hmi1 paarumisspetsiifilisele tugivalgule Ste5 seondumisega mõjutada haploidsetes rakkudes toimuvat filamenteerumist.

Et kontrollida hüpoteesi *in vivo*, korraldati esmalt Lorenz ja kaastöötajate (2000) poolt saadud esialgseid tulemusi Hmi1 rolli kohta haploidse pärmi invasiivses kasvus ja butanooli poolt indutseeritud filamenteerumises. Kuna eelpoolnimetatud töös tuvastati veel kahe mitokondriaalse valgude funktsioon filamenteerumisvastuse kujunemises, otsustati kontrollida respireerimise üldist mõju nii invasiivsele kasvule kui butanooli poolt

indutseeritud filamenteerumisele. Katsed viidi läbi filamenteerumisvõimelise wt $\Sigma 1278b$, $\Sigma 1278b \Delta hmi1$ ja $\Sigma 1278b \Delta rpo41$ tüvedega. Sarnaselt $\Delta hmi1$ tüvele kaob RPO41 deletantides funktsionaalne mitokondriaalne genoom. Samas pole Rpo41 üheski varasemas töös leitud osalisena filamenteerumis- või paardumisvastuse kujunemises ning seega peaks antud tüvi olema sobilik kontrollimaks respireerimise üldist vajalikkust vastuste kujunemises. Invasiivse kasvu katse tulemusena leiti, et $\Delta hmi1$ ja $\Delta rpo41$ tüved omasid defekti agarisse tungimise osas võrreldes wt tüvega, viidates pigem respireerimise üldisele tähtsusele antud protsessis. Kuna katse alguses jäi deletantide rakutihedus wt tüve omast väiksemaks, ei saa välistada ka võimalust, et vähesem invasioon oli põhjustatud madalast rakutihedusest. Butanooli poolt esile kutsud filamenteerumise võrdlemine eelpoolnimetatud tüvedes näitas, et nii $\Delta rpo41$ kui $\Delta hmi1$ tüved omasid defekti antud fenotüübi kujunemises. Mõlemas deletandis kujunes filamenteerumisenfenotüüp vaid osaliselt ning võttis rohkem aega. Samas oli $\Delta hmi1$ tüve filamenteerumisenefekt $\Delta rpo41$ tüvega võrreldes suurem, viidates HMI1 spetsiifilisele rollile antud vastuse kujunemisel. $\Delta rpo41$ ja $\Delta hmi1$ tüvede sarnase defekti tõttu butanooli poolt esile kutsutud filamenteerumisenfenotüübi kujunemises võib oletada respireerimise üldist tähtsust filamenteerumisenvastuses lisaks HMI1 spetsiifilisele efektile.

Et teada saada, millisel määral erinevad $\Delta hmi1$ ja $\Delta rpo41$ tüved filamenteerumise osas teineteisest ja selgitada Hmi1 rolli paardumisrajas, alustati paardumis- ja filamenteerumisspetsiifiliste märklaudgeenide poolt kodeeritud mRNA-de taseme võrdlemist Q-RT-PCR-i abil sõltuvalt feromooni või 1-butanooli olemasolust. Paardumisspetsiifiliseks märklaudgeeniks valiti FUS1, mille transkriptsioon aktiveeritakse feromooni olemasolul spetsiifiliselt ja kõrgel tasemel. Filamenteerumisspetsiifilise geeni leidmine oli mõnevõrra keerulisem, sest erinevad ekspressiooniandmed oletatavate filamenteerumisspetsiifiliste geenide kohta pole alati kattuvad. Samuti pole teada, millised geenid ekspresseeruvad just alkoholi poolt indutseeritud filamenteerumise korral haploidsetes rakkudes. Kuigi Lorenz ja kaastöötajate poolt (2000) leiti, et rakkude adhesiooniks vajaliku FLO11 geeni deleteerimine ei avalda mõju haploidsele filamenteerumisele, otsustati antud töös siiski detekteerida FLO11 geeni ekspressiooni kui võimalikku filamenteerumisspetsiifilist märklauda butanooli poolt indutseeritud filamenteerumisel. Varasemast on teada, et FLO11 ekspressioon indutseeritakse pseudohüüfse kasvu korral diploidsetes rakkudes. Haploidse filamenteerumise korral võidakse Flo11 selle puudumisel hüpotetiliselt asendada mõne muu adhesiooniks vajaliku geeni produktiga ja seega ei pruugi ta olla hädavajalik filamenteerumisenfenotüübi

kujunemiseks. FLO11 olemasolul võib ta aga siiski olla reguleeritud butanoolist sõltuvalt. Kuna antud töös kasutatud mutantide puhul paistab rakkude adhesioon võrreldes wt tüvega olevat vähenenud – esineb palju üksikuid rakke (Joonis 18) – on mutantides arvatavasti vähenenud ka adhesioonifaktorite ekspressioon ning seega võiks FLO11 mRNA taseme detekteerimine olla huvipakkuv.

Katse tulemusena leiti, et nii FUS1 kui FLO11 ekspressioonitase langes konkureerivat rada aktiveerivates tingimustes kõikides tüvedes basaalselt tasemelt alla detekteeritavuse piiri. Kooskõlas kirjanduse andmetega viitab see konkureeriva raja poolt käivitatud inhibitsiooni olemasolule. Huvitav on asjaolu, et feromooni olemasolul indutseeriti nii Δ rpo41 kui Δ hmi1 tüvedes FUS1 geeni ekspressioon wt tüvedega võrreldes kõrgemal tasemel ning FUS1 mRNA koguhulk feromooni olemasolul oli Δ hmi1 tüves üle kahe korra suurem võrreldes wt tüvega, jäädes Δ rpo41 tüves Δ hmi1 tüves esinevast 1,6 korda madalamaks. Antud tulemus on küllaltki huvipakkuv ja viitab lisaks respireerimise tähtsusele Hmi1 spetsiifilisemale rollile MAPK paardumisrajas. FLO11 mRNA taseme uurimisel selgus, et vastavat geeni ekspresseeritakse hästi detekteeritaval tasemel kõikides tüvedes ka butanooli puudumisel, kuid deletantides on selle tase kordades madalam. Vastupidiselt ootustele langeb FLO11 ekspressioon aga butanooli olemasolul, jäädes wt tüves endiselt hästi detekteeritavaks, kuid langedes deletantides alla detekteeritavuse piiri. Kuna FLO11 ekspressioon ei olnud wt tüves butanooli poolt indutseeritud, on järgnevalt plaanis kasutada teisi potentsiaalseid filamenteerumisspetsiifilisi märklaudgeene filamenteerumisvastuse uurimiseks.

Antud töös oleme seega näidanud, et Hmi1 ja Ste5 moodustavad potentsiaalselt kompleksi. Seejuures on Hmi1-ga seondumiseks vajalik regioon Ste5 tugivalgus kattuv Ste7 sidumise eest vastutava piirkonnaga. Lisaks põhjustab HMI1 deletsioon spetsiifilise filamenteerumisdefekti haploidses tüves butanooli olemasolul kasvukeskkonnas ja omab spetsiifilist efekti MAPK signaaliülekanalade poolt reguleeritud geenide ekspressioonile. Saadud tulemus on väga huvitav ning viitab Hmi1 rollile väljaspool mitokondrit MAPK signaaliülekanalades. Esialgsete katsete põhjal respiratoorselt defektsete Δ hmi1 ja Δ rpo41 tüvedega võib oletada, et lisaks Hmi1 spetsiifilisele rollile antud radade moduleerimises mõjutab ka tüvede võime respireerida filamenteerumisvastuse kujunemist. Varasemad andmed mitokondrite rolli kohta filamenteerumisvastuse kujunemisel pärmis puuduvad. Seetõttu on järgnevalt huvitav ja oluline jätkata nii Hmi1 spetsiifilise kui ka respireerimise üldise tähtsuse uurimist paardumis- ja filamenteerumisvastuse kujunemisele.

8. KOKKUVÕTE

Käesolevas töös püüti välja selgitada *S. cerevisiae* mitokondriaalse helikaasi Hmi1-ga interakteeruvaid valke, et teada saada, millistes rakulistes protsessides Hmi1 osaleb. Kaksikhübridskriinis detekteeriti interaktsioon mitokondriaalse importsignaali $\Delta 15\text{Hmi1}$ ja kahe tsütoplasmaatilise valguga, millest üks oli paardumisrajaspetsiifiline tugivalk Ste5 ning teine tsütoskeleti komponent Bni1.

Antud töös keskenduti Ste5 ja Hmi1 vahelise interaktsiooni uurimisele. Kaksikhübridsüsteemi abil analüüsiti interaktsioone Ste5 erineva pikkusega C-terminaalsete fragmentide ja $\Delta 15\text{Hmi1}$ ning Hmi1 vahel. Kuna kaksikhübridskriinis Hmi1-ga interakteeruv Ste5 piirkond on oluline seandumiseks Ste7 kinaasiga, kontrolliti paralleelselt Ste5 fragmentide võimet interakteeruda Ste7-ga. Katsete tulemused näitasid, et $\Delta 15\text{Hmi1}$ -ga interakteerub 744. aminohappest algav, Ste7-ga aga 336. aminohappest algav Ste5 C-terminaalne osa. Sellise erinevuse põhjus võib olla tingitud Ste5 fragmentide erinevatest konformatsioonidest.

Hmi1 ja täispika Ste5 vahelise interaktsiooni olemasolu uurimiseks *in vivo* kasutati GST-*pulldown* katset. Selle tulemusena õnnestus näidata, et rakulüsaadist puhastuvad madalal tasemel koos välja Ste5 ja Hmi1 ning Ste5 ja $\Delta 15\text{Hmi1}$.

Et kontrollida Hmi1 ja Ste5 vahelise interaktsiooni bioloogilist funktsiooni *in vivo*, uuriti HMI1 geeni deleteerimise mõju Ste5 poolt reguleeritud paardumisrajaga ühiseid komponente jagavas filamenteerumisrajas. Respiratsiooni üldise mõju selgitamiseks filamenteerumisprotsessis kasutati mitokondriaalse RNA polümeraasi RPO41 deletsiooniga tüve. Invasiivse kasvu ja 1-butanooli poolt indutseeritud filamenteerumise jälgimisel selgus, et nii Δhmi1 kui Δrpo41 tüved omasid mõlemad defekti filamenteerumise osas, ent Δhmi1 puhul oli butanooli poolt esile kutsutud filamenteerumisdefekt Δrpo41 tüvega võrreldes suurem. MAPK paardumis- ja filamenteerumisradade märklaudgeenide FUS1 ja FLO11 ekspressioonitaseme uurimisel metsikut tüüpi, Δhmi1 ning Δrpo41 tüvedes feromooni või 1-butanooli olemasolul kasvukeskkonnas kvantitatiivse PCR-i abil detekteeriti spetsiifilised HMI1 sõltuvad efektid nii mõlema geeni ekspressioonile.

Plaanis on jätkata Hmi1 ja Ste5 vahelise interaktsiooni uurimist, et täpsustada Hmi1 spetsiifilist ja respireerimise üldist vajalikkust MAPK signaaliülekanalade poolt reguleeritud protsesside moduleerimisel.

9. SUMMARY

Hmi1p is a mitochondrial DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae* encoded by the nuclear genome. It possesses seven conserved helicase motifs and belongs to the helicase superfamily I. Hmi1p is required for the maintenance of the wild-type mitochondrial genome but is dispensable for inheritance of a defective rho⁻ mitochondrial genome.

To investigate which proteins interact with Hmi1p *in vivo* and to discover in which cellular processes Hmi1p is involved in, yeast two-hybrid analysis of Hmi1 protein against genomic DNA library was performed. As a result, fragments from two cytoplasmic proteins – the cytoskeletal protein Bni1 and the scaffold protein Ste5 which is a component of the mating specific MAPK cascade – were identified.

It has been previously shown that disruption of HMI1 causes butanol induced filamentation defects in haploid cells. Filamentation in yeast is regulated by two different pathways, one of which operates via a MAPK cascade. Filamentation and mating specific MAPK cascades are interconnected and share several components. Therefore interaction between Hmi1p and Ste5p was investigated further.

Interaction between Hmi1p and Ste5p was confirmed using a GST-*pulldown* assay. Next, haploid invasion and butanol induced haploid filamentation in a Δ hmi1 Σ 1278 strain were monitored. As a control the respiration-deficient Δ rpo41 Σ 1278 strain was used to distinguish between a Hmi1 specific role or requirement for respiration within the filamentation MAPK signaling pathway. Both mutants acted very similarly suggesting that respiration plays a role in development of normal filamentation response in haploid cells upon growth in butanol containing media. The role of mitochondrial function in filamentation response has not been shown previously. To quantify filamentation defects of Δ hmi1 and Δ rpo41, and to specify the role of Hmi1p in mating we have started to measure the expression level of genes regulated by mating and filamentation MAPK cascades using quantitative reverse transcription PCR.

Further experiments are needed to investigate and confirm the specific role of Hmi1 and respiration in filamentation and mating response development.

10. KASUTATUD KIRJANDUS

Alexandre, C., Grueneberg, D. A., Gilman, M. Z., (1993). Studying heterologous transcription factors in yeast. *METHODS: A Companion to Method in Enzymology* **5**: 147-155

Aunin, E., (2005). *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalsete valkude Mdl2 ja Hmi1 interakteeruvuse uurimine kaksikhübrüidsüsteemi abil, *Tartu Ülikool*

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

Bao, M. Z., Schwartz, M. A., Cantin, G. T., Yates III, J. R., Madhani, H. D., (2004). Pheromone-dependent destruction of the Tec1 transcription factor is required for MAP kinase signaling specificity in yeast. *Cell* **119**: 991-1000

Barbour, L., Xiao, W., (2003). Regulation of alternative replication bypass pathways at stalled replication forks and its effects on genome stability: a yeast model. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **532**: 137-155

Bardwell, L., (2004). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* **25**: 1465-1476

Bardwell, L., Cook, J. G., Voora, D., Baggott, D. M., Martinez, A. R., Thorner, J., (1998). Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes & Development* **12**: 2887-2898

Bateman, J. M., Perlman, P. S., Butow, R. A., (2002). Mutational bisection of the Mitochondrial DNA Stability and Amino Acid Biosynthetic Functions of Ilv5p of Budding Yeast. *Genetics* **161**: 1043-1052

Bendich, A. J., (1996). Structural analysis of mitochondrial DNA molecules from fungi and plants using moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **255**: 564-588

Blanc, H. & Dujon, B., (1980). Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA responsible for suppressiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 3942-3946

Breitkreutz, A., Boucher, L., Tyers, M., (2001). MAPK specificity in the yeast pheromone response independent of transcriptional activation. *Current Biology* **11**: 1266-1271

Butcher, R. A., Bhullar, B. S., Perlstein, E. O., Marsischky, G., LaBaer, J., Schreiber, S. L., (2006). Microarray-based method for monitoring yeast overexpression strains reveals small-molecule targets in TOR pathway. *Nature Chemical Biology* **2**: 103-109

Choi, K. Y., Satterberg, B., Lyons, D. M., Elion, E. A., (1994). Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* **78**: 499-512

Contamine, V. & Picard, M., (2000). Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 281-315

Cook, J. G., Bardwell, L., Thorner, J., (1997). Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* **390**: 85-88

Dean, M., Allikmets, R., Gerrard, B., Stewart, C., Kistler, A., Shafer, B., Michaelis, S., Strathern, J., (1994). Mapping and sequencing of two yeast genes belonging to the ATP-binding cassette superfamily. *Yeast* **10**: 377-383

- deZamaroczy, M., 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**: 439-457
- deZamaroczy, 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**: 75-78
- Dolan, J. W., Kirkman, C., Fields, S., (1989). The yeast STE12 protein binds to the DNA sequence mediating pheromone induction. *Biochemistry* **86**: 5703-5707
- Edmunds, J. W., Mahadevan, L. C., (2004). MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes. *Journal of Cell Science* **117**: 3715-3723
- Elion, E. A., (2000). Pheromone response, mating and cell biology. *Current Opinion in Microbiology* **3**: 573-581
- Elion, E. A., (2001). The Ste5p scaffold. *Journal of Cell Science* **114**: 3967-3978
- Elion, E. A., Satterberg, B., Kranz, J. E., (1993). FUS3 phosphorylates multiple components of the mating signal transduction cascade: evidence for STE12 and FAR1. *Molecular Biology of the Cell* **4**: 495-510
- Ellis, N. A., (1997). DNA helicases in inherited human disorders. *Current Opinion in Genetics & Development* **7**: 354-363
- Fehrenbacher, K. L., Yang, H. C., Gay, A. C., Huckaba, T. M., Pon, L. A., (2004). Live cell imaging of mitochondrial movement along actin cables in budding yeast. *Current Biology* **14**: 1996-2004
- Ferrell, J. E., Cimprich, K. A., (2003). Enforced proximity in the function of a famous scaffold. *Molecular Cell* **11**: 289-291
- Fields, S. & Song, O., (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., Purnelle, B., (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS* **440**: 325-331
- Giaver, G., Chu, A. M., Ni, L., Connely, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K. D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Güldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kötter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scerens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Stroms, R. K., Strathern, J. N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C. Y., Ward, T. R., Wilhelmy, J., Winzeler, E. A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W., Johnstone, M., (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**: 387-391
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A., Fink, G. R., (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**: 1077-1090
- Gorbalenya, A. E. & Koonin, E. V., (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current Opinion in Structural Biology* **3**: 419-429
- Greenleaf, A. L., Kelly, J. L., Lehman, I. R., (1986). Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3391-3394
- Hanahan, D., (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580

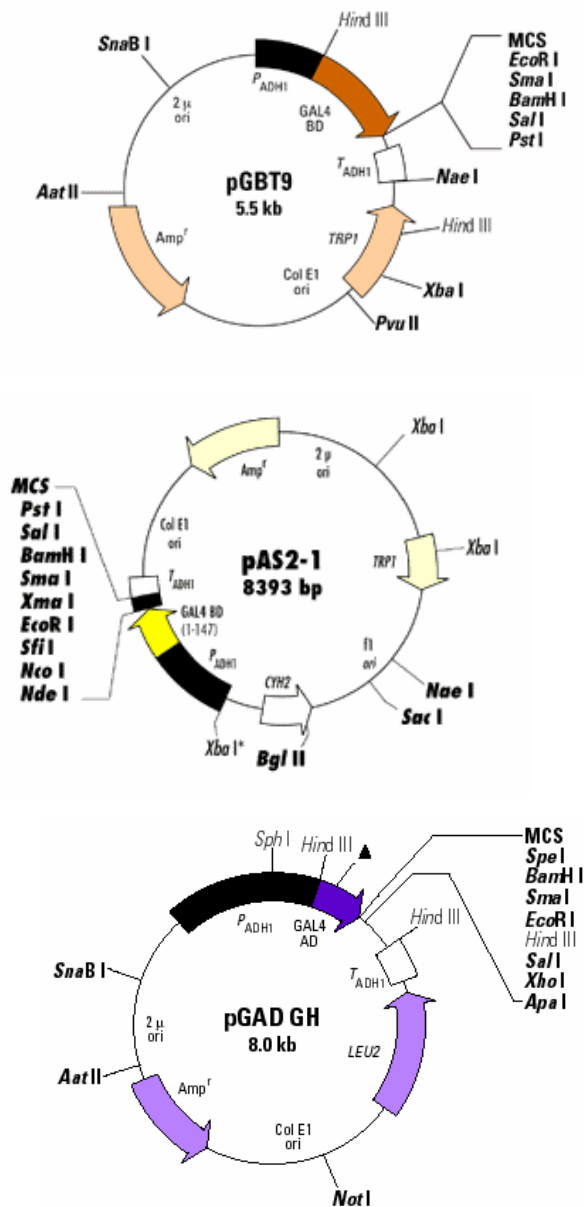
- Hartwell, L. H., (1980). Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* unresponsive to cell division control by polypeptide mating hormone. *Journal of Cell Biology* **85**: 811-822
- Inouye, C., Dhillon, N., Thorner, J., (1997b). Ste5 RING-H2 domain: role in Ste4-promoted oligomerization for yeast pheromone signaling. *Science* **278**: 103-106
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., Sakaki, Y., (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *PNAS* **98**: 4569-4574
- Kaufman, B. A., Kolesar, J. E., Perlman, P. S., Butow, R. A., (2003). A function for the mitochondrial chaperonin Hsp60 in the structure and transmission of mitochondrial DNA nucleoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* **163**: 457-461
- Kaufman, B. A., Newman, S. M., Hallberg, R. L., Slaughter, C. A., Perlman, P. S., Butow, R. A., (2000). *In organello* formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: Identification of bifunctional proteins. *PNAS* **97**: 7772-7777
- Kuusk, S., Sedman, T., Jöers, P., Sedman, J., (2005). Hmi1 from *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria Is a Structure-specific DNA Helicase. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 24322-24329
- Lacks, S., Greenberg, J. R., (1977). Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *Journal of Molecular Biology* **114**: 153-168
- Lahaye, A., Stahl, H., Thines-Sempoux, D., Foury, F., (1991). PIF1: a DNA helicase in yeast mitochondria. *The EMBO Journal* **10**: 997-1007
- Lecrenier, N. & Foury, F., (2000). New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene* **246**: 37-48
- 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. *J. Biol. Chem.* **274**: 20937-20942
- Liu, H., Styles, C. A., Fink, G. R., (1993). Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**: 1741-1743
- Lohman, T. M., Bjornson, K. P., (1996). Mechanism of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 169-214
- Lorenz, M. C., Cutler, N. S., Heitman, J., (2000). Characterization of Alcohol-induced Filamentous Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **11**: 183-199
- Madhani, H. D., Fink, G. R., (1997). Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**: 1314-1317
- Madhani, H. D., Fink, G. R., (1998). The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends in Genetics* **14**: 151-155
- Mahanty, S. K., Wang, Y., Farley, F. W., Elion, E. A., (1999). Nuclear shuttling of yeast scaffold Ste5 is required for its recruitment to the plasma membrane and activation of the mating MAPK cascade. *Cell* **98**: 501-512
- Maleszka, R., Skelly, P. J., Clarck-Walker, (1991). Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *The EMBO Journal* **12**: 3923-3929
- Marcus, S., Polverino, A., Barr, M., Wigler, M., (1994). Complexes between STE5 and components of the pheromone-responsive mitogen-activated protein kinase module. *Cell Biology* **91**: 7762-7766
- MATCHMAKER Two-hybrid system PT1265-1. Clontech Laboratories, Inc.

- Matson, S. W., Bean, D. W., George, J. W., (1993). DNA helicases: enzymes with essential roles in all aspects of DNA metabolism. *BioEssays* **16**: 13-22
- Meeusen, S. & Nunnari, J., (2003). Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *The Journal of Cell Biology* **163**: 503-510
- Monroe, D. S., Leitzel, A.K., Klein, H. L., Matson, S. W., (2005). Biochemical and genetic characterization of Hmi1p, a yeast DNA helicase involved in the maintenance of mitochondrial DNA. *Yeast* **22**: 1269-1286
- Mösch, H. U., Roberts, R. L., Fink, G. R., (1996). Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **93**: 5352-5356
- Neupert, W. & Brunner, M., (2002). Reviews: The protein import motor of mitochondria. *Nature Reviews* **3**: 555-565
- Palecek, S. P., Parikh, A. S., Kron, S. J., (2002). Sensing, signaling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. *Microbiology* **148**: 893-907
- Park, S. H., Zarrinpar, A., Lim, W. A., (2003). Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms. *Science* **299**: 1061-1064
- Printen, J. A., Sprague, G. F., (1994). Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* **138**: 609-619
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., Boone, C., (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* **297**: 612-615
- Pryciak, P. M., Huntress, F. A., (1998). Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the G $\beta\gamma$ complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway. *Genes & Development* **12**: 2684-2697
- Richard, G. F., Kerrest, A., Lafontaine, I., Dujon, ., (2005). Comparative Genomics of Hemiascomycete Yeasts: Genes Involved in DNA Replication, Repair, and Recombination. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 1011-1023
- Rose, M. D., Winston, F., Hieter, P., (1990). *Methods in Yeast Genetics*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sabbagh, W., Flatauer, L. J., Bardwell, A. J., Bardwell, L., (2001). Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Molecular Cell* **8**: 683-691
- Sambrook, J., Fritsch, G. F., Maniatis, T., (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Scheffler, I. E., (2001). Review article: A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* **1**: 3-31
- Schuldiner, O., Yanover, C., Benvenisty, N., (1998). Computer analysis of the entire budding yeast genome for putative targets of the GCN4 transcription factor. *Current Genetics* **33**: 16-20
- Schwartz, M. A., Madhani, H. D., (2004). Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review in Genetics* **38**: 725-748
- Sedman, T., Jöers, P., Kuusk, S., Sedman, J., (2005). Helicase Hmi1 stimulates the synthesis of concatemeric mitochondrial DNA molecules in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* **47**: 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**: 1816-1824

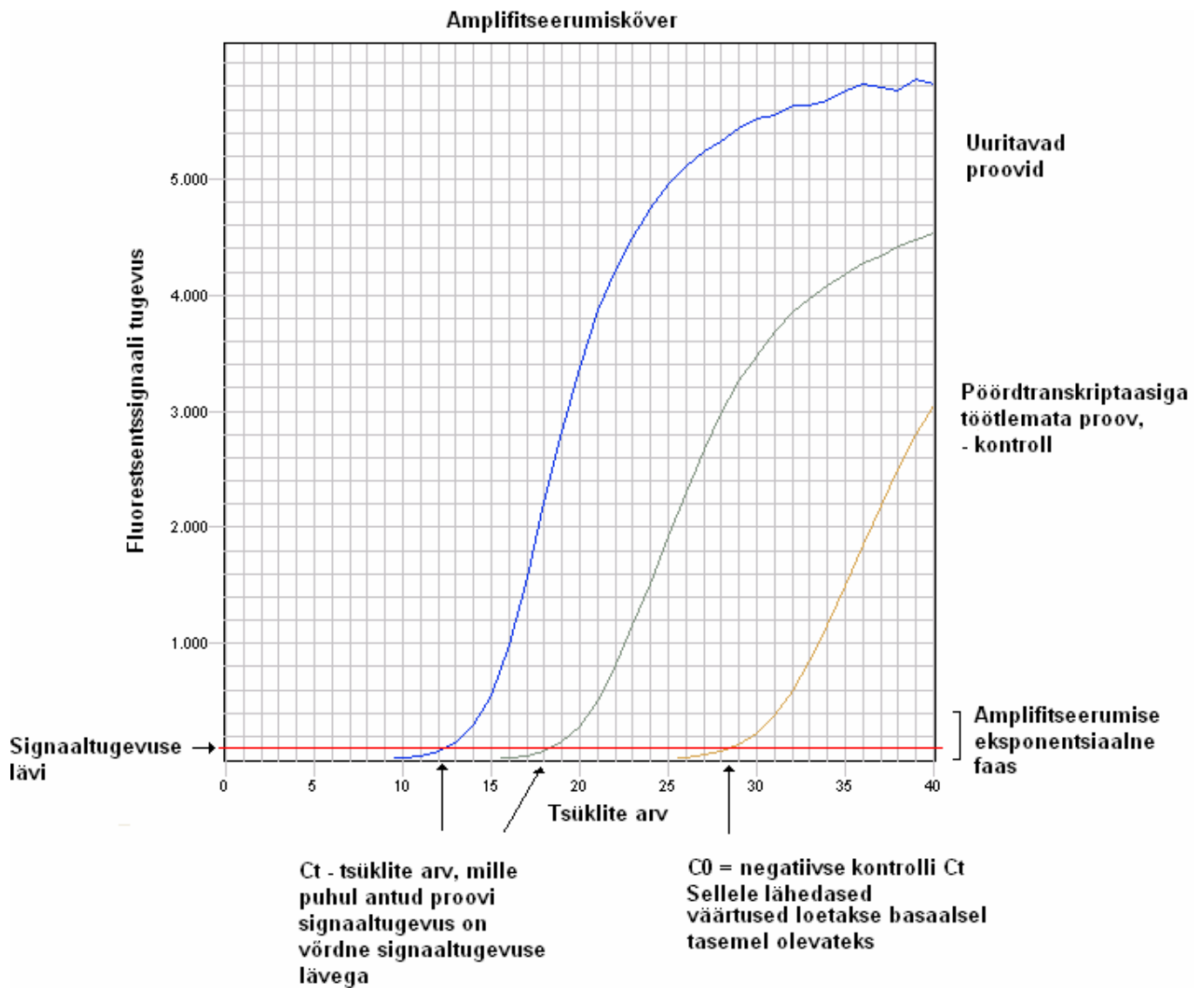
- Sette, C., Inouye, C. J., Stroschein, S. L., Iaquina, P. J., Thorner, J., (2000). Mutational analysis suggests that activation of the yeast pheromone response mitogen-activated protein kinase pathway involves conformational changes in the Ste5 scaffold protein. *Molecular Biology of the Cell* **11**: 4033-4049
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chancinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., Meisinger, C., (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *PNAS* **100**: 13207-13212
- Thevelein, J. M., de Winde, J. H., (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinases A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **33**: 904-918
- 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**: 3421-3430
- Wallis, J. W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M., Rothstein, R., (1989). A hyper-recombination in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* **58**: 409-419
- Wang, Y. & Elion, E. A., (2003). Nuclear export and plasma membrane recruitment of the Ste5 scaffold are coordinated with oligomerization and association with signal transduction components. *Molecular Biology of the Cell* **14**: 2543-2558
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., Johnson, G. L., (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews* **79**: 143-180
- Yablonski, D., Marbach, I., Levitzki, A., (1996). Dimerization of Ste5, a mitogen-activated protein kinase cascade scaffold protein, is required for signal transduction. *Genetics* **93**: 13864-13869
- Yashar, B., Irie, K., Printen, J. A., Stevenson, B. J., Sprague, G. F., Matsumoto, K., Errede, B., (1995). Yeast MEK-dependent signal transduction: response thresholds and parameters affecting fidelity. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 6545-6553
- Zavitz, K. H., Marians, K. J., (1992). ATPase-deficient Mutants of the *Escherichia coli* DNA Replication Protein PriA are capable of catalyzing the Assembly of Active Primosomes. *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 6933-6940
- Zeitlinger, J., Simon, I., Harbison, C. T., Hannett, N. M., Volkert, T. L., Fink, G. R., Young, R. A., (2003). Program-specific distribution on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell* **113**: 395-404
- Zelenaya-Troitskaya, O., Perlman, P.S., Butow, R. A., (1995). An enzyme in yeast mitochondria that catalyzes a step in branched-chain amino acid biosynthesis also functions in mitochondrial DNA stability. *The EMBO Journal* **14**: 3268-3276

LISA 1. KAKSIKHÜBRIIDSÜSTEEMIS KASUTATUD VEKTORID

Kaksikhübriidsüsteemi puhul kasutatud vektorid. pGBT9 ning pAS2-1 vektoritesse kloneeriti HMI1 osalised nukleotiidsed järjestused BamHI ja PstI lõikesaitide vahele, pGADGH vektorisse oli kloneeritud genoomne DNA raamatukogu EcoRI saiti.



LISA 2. Q-RT-PCR PRODUKTI TEKKE GRAAFIK



LISA 3. Q-PCR-I ANDMETE ANALÜÜS

Kasvutingimus	Tüvi	Detekteeritav geen	ΔCt	C0-Ct, (28-Ct)	2^{C0-Ct}	$\frac{(2^{C0-Ct})}{(RDN 2^{C0-Ct})} \times 10^4$	Wt/uuritav tüvi tingimustes	YPD/uuritav tingimus
YPD	$\Sigma 1278$	RDN18	13,74	14,26	19671,94			
	$\Delta rpo41$	RDN18	12,95	15,05	33868,01			
	$\Delta hmi1$	RDN18	14,03	13,97	16101,26			
YPD + 13,5h 1% 1-butanool	$\Sigma 1278$	RDN18	13,37	14,63	25334,78			
	$\Delta rpo41$	RDN18	14,09	13,91	15400,58			
	$\Delta hmi1$	RDN18	14,59	13,41	10914,21			
YPD + 1h 5 μ M α -faktor	$\Sigma 1278$	RDN18	13,68	14,32	20425,33			
	$\Delta rpo41$	RDN18	13,26	14,74	27375,2			
	$\Delta hmi1$	RDN18	13,36	14,64	25616,81			
YPD	$\Sigma 1278$	FUS1	25,27	2,73	6,63	3,37	1	1
	$\Delta rpo41$	FUS1	25,43	2,57	5,93	1,75	1,92	1
	$\Delta hmi1$	FUS1	27	1	2	1,24	2,71	1
YPD + 13,5h 1% 1-butanool	$\Sigma 1278$	FUS1	27,55	0,45	1,37	0,541	1	6,23
	$\Delta rpo41$	FUS1	27,56	0,44	1,35	0,877	0,62	2
	$\Delta hmi1$	FUS1	27,6	0,4	1,32	1,21	0,45	1,03
YPD + 1h 5 μ M α -faktor	$\Sigma 1278$	FUS1	21,46	6,54	93,1	45,58	1	0,07
	$\Delta rpo41$	FUS1	20,64	7,36	164,39	60,05	0,76	0,03
	$\Delta hmi1$	FUS1	20	8	256,54	100,15	0,46	0,01
YPD	$\Sigma 1278$	FLO11	20,05	7,95	247,54	125,83	1	1
	$\Delta rpo41$	FLO11	23,32	4,68	25,63424	7,57	16,63	1
	$\Delta hmi1$	FLO11	23,18	4,82	28,16	17,49	7,19	1
YPD + 13,5h 1% 1-butanool	$\Sigma 1278$	FLO11	20,23	7,77	218,19	86,12	1	1,46
	$\Delta rpo41$	FLO11	26,86	1,14	2,21	1,44	60,02	5,27
	$\Delta hmi1$	FLO11	26,15	1,85	3,61	3,31	26,04	5,29
YPD + 1h 5 μ M α -faktor	$\Sigma 1278$	FLO11	26,89	1,11	2,15	1,05	1	119,54
	$\Delta rpo41$	FLO11	27,16	0,84	1,79	0,654	1,61	11,58
	$\Delta hmi1$	FLO11	27,08	0,92	1,89	0,738	1,43	23,7

ΔCt

C0-Ct, (28-Ct)

2^{C0-Ct}

$\frac{(2^{C0-Ct})}{(RDN 2^{C0-Ct})} \times 10^4$

Wt/uuritav tüvi tingimustes

YPD/uuritav tingimus

- Keskmise tsükli arv, mille juures on detekteeritud kindla tugevusega signaal

- Erinevus PCR-i tsükli kokkuleppelisest nullpunktist, C0=28

- Produkti hulk kordades võrreldes kokkuleppelise nullpunktiga

- Normaliseerimine *housekeeping* geeni suhtes

- Mitu korda vähem on mutantsetes tüvedes vastavat mRNA-d võrreldes samadel tingimustel kasvanud wt tüvega

- Mitu korda vähem on vastavat mRNA-d antud tingimuses kasvanud rakkudes võrreldes sama tüvega YPD-s