

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Katrin Viikov

***Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalse DNA polümeraasi
Mip1 puhastamine ja biokeemiline analüüs**

Magistritöö

Juhendajad: Juhan Sedman, Prof.
Priit Väljamäe, PhD

Tartu 2006

SISUKORD

LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. MITOKONDRI ROLL EUKARÜOOTSES RAKUS	6
1.2. S. CEREVISIAE MITOKONDRIAALSE GENOOMI ORGANISATSIOON	6
1.3. MTDNA REPLIKATSIOON JA SELLEL OSALEVAD VALGUD	9
1.4. MTDNA REPARATSIOON	13
1.5. S. CEREVISIAE MITOKONDRIAALSED VALGUD	14
1.6. S. CEREVISIAE MTDNA POLÜMERAAS Mip1	14
1.6.1. Mip1 VALGU STRUKTUUR NING HOMOLOOGIA TEISTE DNA POLÜMERAASIDEGA	15
1.6.2. Mip1 VALGU ENSÜMAATILISED AKTIIVSUSED	20
2. TÖÖ EESMÄRK	24
3. MATERJALID JA MEETODID	24
3.1. KASUTATUD RAKUTÜVED JA SÖÖTMED	24
3.2. KASUTATUD VEKTORID JA OLIGONUKLEOTIIDID	25
3.3. PET SÜSTEEM REKOMBINANTSETE VALKUDE EKSPRESSIOONIKS <i>E. COLI</i> RAKKUDES	26
3.4. MIP1 GENOOMSE KLOONI ERALDAMINE	27
3.5. MIP1 EKSPRESSIOONIKONSTRUKTIDE VALMISTAMINE	27
3.6. MIP1 EKSPRESSIOON BL21(DE3) TÜVEDES	28
3.6.1. BL21(DE3) KOMPETENTSETE RAKKUDE VALMISTAMINE NING TRANSFORMATSIOON	28
3.6.2. VÄIKESES MAHUS BL21(DE3) Mip1 JA Δ29Mip1 TÜVEDE KASVATAMINE NING MIP1 EKSPRESSIOONI INDUKTSIOON	28
3.6.3. RIL Δ29Mip1 TÜVE KASVATAMINE FERMENTERIS NING MIP1 EKSPRESSIOONI INDUKTSIOON	28
3.7. REKOMBINANTSE MIP1 VALGU PUHASTAMINE	29
3.7.1. RAKKUDE KOGUMINE, LÜÜS JA SONIKEERIMINE	29
3.7.2. MIP1 PUHASTAMINE Ni-NTA MAATRIKSI ABIL	29
3.7.3. GEELFILTRATSIOON SEPHACRYL-S200 KOLONNIL	30
3.7.4. KATIOONVAHETUS S-SEPHAROSE KOLONNIL	31
3.7.5. ANIOONVAHETUS Q-SEPHAROSE KOLONNIL	31
3.7.6. DIALÜÜS	31
3.8. VALGU ANALÜÜSI MEETODID	32
3.8.1. KONTSENTRATSIOONI MÄÄRAMINE BRADFORDI MEETODIL	32
3.8.2. SDS-POLÜAKRÜÜLAMIIDGEEL (SDS-PAAG)	32
3.8.3. SDS-PAAG VÄRVIMINE COOMASSIE BRILLIANT SINISEGA	32
3.8.4. SDS-PAAG VÄRVIMINE HÖBENITRAADIGA	32
3.9. MIP1 POLÜMERAASSE AKTIIVSUSE MÕÖTMINE PUC119/USP SUBSTRAADIL	33
3.10. MIP1 POLÜMERAASSE AKTIIVSUSE MÕÖTMINE M13/USP SUBSTRAADIL	33

3.10.1. DNA-SUBSTRAADI VALMISTAMINE	33
3.10.2. Mip1 AKTIIVSUSE MÕÕTMINE M13/USP SUBSTRAADIL	34
3.10.3. TULEMUSTE ANALÜÜSIL KASUTATUD MEETODID	35
3.11. POLÜMERAASSE AKTIIVSUSE MÕÕTMINE 45/25 SUBSTRAADIL	35
 4. TULEMUSED	 36
 4.1. MIP1 GENOOMSE KLOONI ERALDAMINE PÄRMI GENOOMSE DNA RAAMATUKOGUST	 36
4.2. MIP1 EKSPRESSIOONIKONSTRUKTIDE VALMISTAMINE	36
4.2.1. Mip1 VALGU MITOKONDRISSSE LOKALISATSIOONI SIGNAALI ENNUSTAMINE	36
4.2.2. EKSPRESSIOONIKONSTRUKTIDE VALMISTAMINE	37
4.3. REKOMBINANTSE MIP1 VALGU EKSPRESSIOON	38
4.3.1. OPTIMAALSETE TINGIMUSTE VALIK REKOMBINANTSE Mip1 EKSPRESSIOONIKS	38
4.3.2. RIL Δ29Mip1 TÜVE KASVATAMINE NING Δ29Mip1 EKSPRESSIOONI INDUKTSIOON FERMENTERIS	41
4.4. REKOMBINANTSE MIP1 VALGU PUHASTAMINE	42
4.5. REKOMBINANTSE MIP1 VALGU ENSÜMAATILISE AKTIIVSUSE MÕÕTMINE	46
4.5.1. Mip1 POLÜMERAASNE AKTIIVSUS M13/USP SUBSTRAADIL	47
4.5.2. Mip1 POLÜMERAASNE AKTIIVSUS 45/25 SUBSTRAADIL	48
 5. ARUTELU	 53
 KOKKUVÕTE	 59
 SUMMARY	 60
 KASUTATUD KIRJANDUS	 61

LÜHENDID

ah	aminohape
BER	N-aluste ekstsioonreparatsioon (Base Excision Repair)
bp	aluspaar
BSA	veise seerum albumiin
Cam	klooramfenikool
DTT	ditiotreitol
EDTA	etüleendiamiintetraädikhape
Hepes	N-2-hüdroksüetüülpiperasiin-N'-2-etaansulfoonhape
HS	hüpersupressiivne
IPTG	isopropüül-2-tio-β-D-galaktopüranosiid
Kan	kanamütsiin
kb	tuhat aluspaari
mtDNA	mitokondriaalne DNA
nt	nukleotiid
PAAG	polüakrüülamiid geelelektroforees
PEG	polüetüleenglükool
PMSF	fenüülmetüülsulfonüül floriid
PNK	polünukleotiid kinaas
Poly	DNA polümeraas γ (gamma)
SDS	naatrium dodetsüülsulfaat
Tris	tris(hüdroksümetüül)aminoetaan

SISSEJUHATUS

S. cerevisiae mitokondril on iseseisev genoom, mille replitseerimine toimub rakutsüklil faasist sõltumatult mitokondriaalse DNA polümeraasi Mip1 poolt. Mip1 on ainuke teadaolev pärmi mitokondris funktsioneeriv DNA polümeraas ning seega vastutab ta ainuüksi kõikide DNA sünteesi protsesside eest nii mtDNA replikatsioonil kui ka reparatsioonil. MIP1 deleteerimine genoomist põhjustab mtDNA täielikku kadumist ehk rho⁰ genotüübi teket.

Mip1 kuulub DNA polümeraaside Perekonna A hulka ning omab peale DNA polümeraase aktiivsuse ka 3'→5' eksonukleaasset aktiivsust, mis täidab DNA sünteesimise käigus *proof-reading* funktsiooni. Koos teistest organismidest pärit mitokondriaalsete polümeraasidega kuulub Mip1 γ DNA polümeraaside gruppi. Mip1 erineb suuresti oma kõrgematest eukarüootidest pärit Polγ homoloogidest. Esiteks on tal pikenenud C-terminaalne osa (~100 aa), mille funktsioon on teadmata. Teiseks Mip1-l ei ole praeguseks teada ühtegi protsessiivsusefaktorit, samal ajal kui praktiliselt kõikidel tema homoloogidel on see olemas.

Kui Mip1 eksonukleaasne aktiivsus on üsna hästi uuritud, siis tema polümeraasset aktiivsust on üsna pealiskaudselt iseloomustatud. Käesoleva töö peamiseks eesmärgiks oli puhastada rekombinantne Mip1 ning uurida tema ensümaatilisi aktiivsusi, keskendudes eelkõige polümeraassele aktiivsusele.

Töö autor tänab Prof. Juhan Sedmani ja Dr. Priit Väljamäed sisuka ja põhjaliku juhendamise eest, Silja Kuuske nõuaanete eest töö eksperimentaalse osa läbiviimisel ja töö koostamisel, Tiina Tamme ja Tiina Sedmanit abi eest töö kirjutamisel ning teisi kolleege abivalmiduse ja meeldiva seltskonna eest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Mitokondri roll eukarüootses rakus

Mitokondrid on aeroobsete organismide jaoks hädavajalikud organellid. Neis toimuvad mitmed metaboolsed protsessid, sealhulgas tsitraadi tsükkel, Fe/S klastrite assambleerimine ja paljude rakuliste metaboliitide biosüntees. Mitokondrite tähtsaimaks funktsiooniks on aga rakkude varustamine energiaga, mida genereeritakse oksüdatiivse fosforüleerimise kaudu.

Seoses mitokondrite keskse rolliga raku metabolismis on nende alatalitus inimestel põhjuseks paljudele pärilikele haigustele nagu Friedreich'i ataksia, Leberi pärilik optiline neuropaatia, Pearsoni sündroom jt. Peale selle on mitokondrid seotud vananemise ja apoptoosi protsessidega ning selliste süsteemsete haigustega nagu diabeet, Parkinsoni ja Alzheimeri tõved. Tänu sellele on mitokondrid olnud juba aastakümneid huvipakkuvaks uurimisobjektiks.

Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* on hea ja laialdaselt kasutatav mudelorganism mitokondrite uurimiseks. Ta on ainurakne eukarüoot, mille paljud rakulised protsessid ja valgud on suures osas homoloogsed inimese omadega. Mitokondriaalsete protsesside uurimiseks on *S. cerevisiae* eriti sobilik eelkõige tema fakultatiivse anaeroobsuse tõttu, nimelt ei vaja ta ellu jäämiseks respiratoorselt funktsionaalset mitokondrit ning suudab elatuda etanoolkäärimisel saadud energiast.

1.2. *S. cerevisiae* mitokondriaalse genoomi organisatsioon

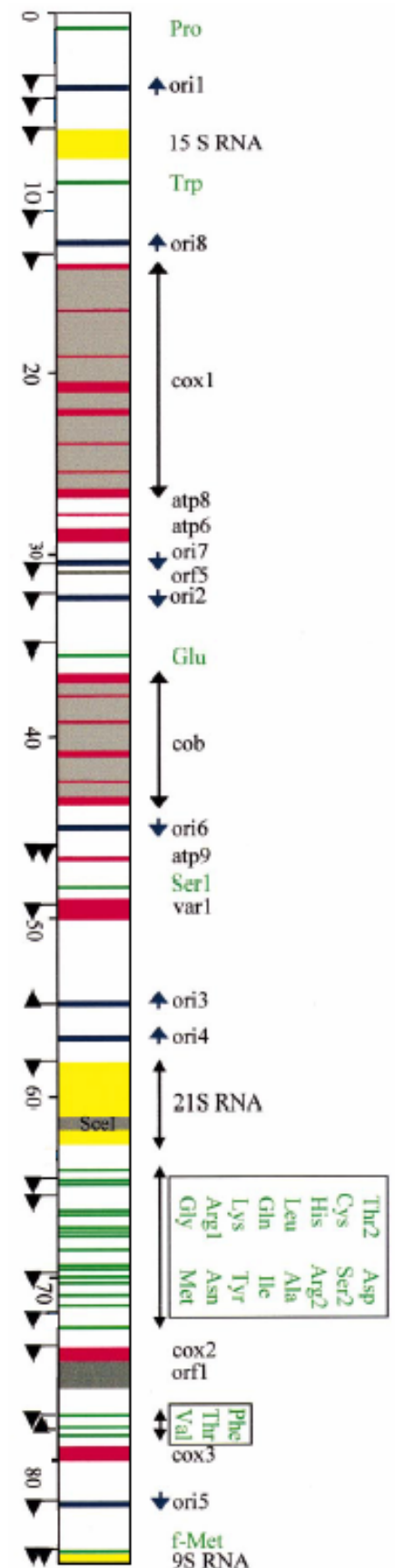
Kõikide organismide mitokondritel on iseseisev genoom. *S. cerevisiae* metsiktüüpi rakus on tavaliselt 50–100 mitokondriaalse DNA (mtDNA) molekuli (Williamson & Fennell, 1987).

S. cerevisiae mtDNA on keskmiselt 70-80 kb pikk ning kodeerib 8 valku: tsütokroomi oksüdaasi subühikuid 1-3 (vastavad geenid on COX1, COX2, COX3), ATP süntaasi subühikuid 6, 8 ja 9 (ATP6, ATP8, ATP9), tsütokroomi b (COB) ning ühte ribosomaalset valku (VAR1) (Joonis 1). Peale nende kodeerib mtDNA 21S ja 15S ribosomaalseid RNA (rRNA) molekule, 24 tRNA molekuli ja 9S RNA molekuli (RNAas P komponent) (Foury *et al.*, 1998). Kõik mtDNA poolt kodeeritud valgud on vajalikud hingamisahela funktsioneerimiseks. Seetõttu on mtDNA veatu replikatsioon vajalik rakkude respiratoorseks kompetentsuseks.

S. cerevisiae mtDNA on äärmiselt heterogeense nukleotiidskoostisega (Bernardi, 1976). Umbes pool sellest koosneb pikkadest AT rikastest regioonidest, mille pikkus varieerub 150 ja 1500 aluspaari vahel. GC rikkad regioonid, nn GC klastrid, moodustavad kõigest 2-3% kogu mtDNast ning on küllaltki lühikesed (50-80 aluspaari). Seetõttu on mtDNA-l ebaharilikult kõrge AT sisaldus – 82% (Bernardi, 1976).

Algselt arvati, et *S. cerevisiae* mtDNA, nagu ka teiste organismide mtDNA, on tsirkulaarne (ülevaade Williamson, 2002). mtDNA geelelektroforeesil nähtud lineaarseid molekule peeti aga eraldamise käigus katki läinud tsirkulaarseteks molekulideks. Nn *broken-circle* teooriale tegi lõpu PFGE (*Pulse-Field Gel Electrophoresis*) ja elektronmikroskoopia kasutuselevõtt. Nende meetoditega näidati, et *S. cerevisiae* mtDNA koosneb erineva molekulmassiga lineaarsetest molekulidest, mille suurus

Joonis 1. *S. cerevisiae* tüve FY1679 mitokondriaalse genoomi lineariseeritud kaart. Punased – valku kodeerivate geenide eksonid; hallid – intronid; rohelised – tRNAd; kollased – 9S, 15S ja 21S rRNAd; tumesinised – *ori* järjestused. Transkriptsiooni initsiatsiooni kohad on märgitud lippudega (Muudetult Foury *et al.*, 1998).



varieerub 75–150 tuhande aluspaari vahel. Lisaks lineaarsetele molekulidele sisaldab mtDNA hargnenud molekule ning vähemal määral ka tsirkulaarseid molekule (Maleszka *et al.*, 1991). Sellisele heterogeensele koostisele toetudes on oletatud, et *S. cerevisiae* mtDNA võiks replitseeruda veereva ratta mudeli järgi ning tsirkulaarsed molekulid võiksid funktsioneerida pärandatavate ühikutena (Maleszka *et al.*, 1991).

S. cerevisiae mtDNA tüübi järgi jaotatakse rakke ρ^+ , ρ^- ja ρ^0 rakkudeks. Metsiktüüpi mtDNA molekulidega rakke nimetatakse ρ^+ rakkudeks. Kui mtDNA puudub üldse, siis nimetatakse rakke ρ^0 -ks. Kui enamus mitokondriaalsest genoomist on deleteeritud ning alles jäänud järjestus amplifitseeritud ning organiseeritud oligomeerses kordustesse, siis on tegemist ρ^- genoomiga. ρ^- ja ρ^+ mitokondriaalse genoomiga haploidide ristamisel moodustub heteroplasmiline sügoot. Selle sügoodi jagunemisel tütarakkudeks toimub mtDNA segregeerumine ning ρ^- genotüübiga tütarakkude protsentuaalse osakaalu järgi määratakse selle ρ^- supressiivsus. Kui ρ^- genotüübi pärinud järglaste protsent ületab 95%, siis nimetatakse seda ρ^- mtDNAd hüpersupressiivseks (HS), kui see on alla 5%, siis on see ρ^- genotüüp neutraalne. Ülejäänud ρ^- genotüüpe nimetatakse supressiivseteks ning nende supressiivsust iseloomustatakse protsentuaalse väärtusega, mis jääb 5% ja 95% vahele.

Nii ρ^0 kui ka ρ^- mtDNA genotüübiga *S. cerevisiae* rakud on respiratoorselt defektsed ning moodustavad *petite* fenotüübiga (väikeseid) kolooniaid. Defektide tõttu mtDNA-s on nad sunnitud elatuma ainult fermenteerimisest, mille energeetiline efektiivsus on suhteliselt energiarikaste lõpp-produktide tõttu madal.

S. cerevisiae mitokondriaalne genoom on organiseeritud nukleoididesse, mis on nukleiinhapete ja valkude kompleksid. Ühes rakus on 40-60 nukleoidi, millest igaüks sisaldab 1-2 mitokondriaalset genoomi (Miyakawa *et al.*, 1987). Anaeroobses rakus on nukleoidide arv tunduvalt väiksem, ≈ 8 , ning nad sisaldavad ≈ 20 genoomi (Shiiba *et al.*, 1997). Nukleoide peetakse aktiivseteks mtDNA segregatsioonilisteks üksusteks.

In organello formaldehüüdiga ristsidumise meetodiga on identifitseeritud valke, mis seonduvad *S. cerevisiae* mitokondris DNA-ga. Nende hulgas on mtDNA pakkimisel osalev Abf2, üksikahelalise DNA-ga seonduv Rim1, mtDNA säilitamisel osalevad Mgm101, Ilv5 ja Hsp60 valgud ning teised (Kaufman *et al.*, 2000). Neid valke peetakse kuuluvat mitokondriaalsete nukleoidide koosseisu.

Nukleoidide valgulise koostise uurimine on näidanud, et *S. cerevisiae* mitokondris esineb vähemalt kaks erinevat nukleoidide subpopulatsiooni. Replitseeruvad mtDNA molekulid assotsieeruvad erilise valgulise struktuuriga – TMS-ga (Two Membrane-

Spanning Structure), mida võib pidada mtDNA replisoomiks. TMS on isereplitseeruv ühik, mida pärandatakse järglastele raku jagunemisel. mtDNA polümeraas Mip1, Mgm101 ja mitokondri välismembraani valk Mmm1 on TMS-i püsivateks komponentideks (Meeusen & Nunnari, 2003).

Hiljutised uuringud näitasid, et mitokondri välismembraanis paiknevad valgud, Mmm1, Mdm10 ja Mdm12, mis vastutavad mitokondrite aktiivist sõltuva liikumise eest on samuti vajalikud mitokondriaalsete nukleoidide säilitamiseks ja stabiliseerimiseks (Boldogh *et al.*, 2003). On näidatud, et need valgud moodustavad omavahel kompleksi, mis seondub mtDNA-ga. Võimalik, et selline kompleks on aktiivse segregatsiooni mehhanismi osa, mis vahendab tsütoskeleti seondumist mtDNA-ga ning mtDNA ja mitokondri membraanide liikumist tütaraku suunas raku jagunemisel. Et Mmm1 on TMS kompleksi komponendiks, siis võimalik, et TMS-il on ka aktiivset segregatsiooni tagav funktsioon.

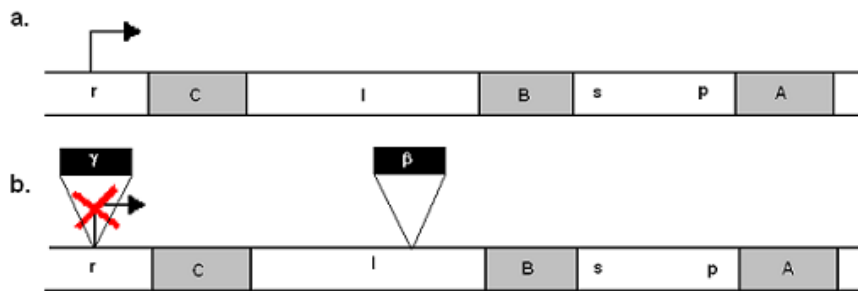
1.3. mtDNA replikatsioon ja sellel osalevad valgud

mtDNA replikatsioon toimub mitokondri maatriksis sõltumatult tuuma DNA replikatsioonist ja rakutsükli faasidest (Bogenhagen & Clayton, 1977).

S. cerevisiae mtDNA replikatsiooni alguskohtadeks on *ori* (*origin*) järjestused, mida esmalt kirjeldati HS mutante uurides. Nimelt täheldati, et nende mtDNA pärandub järglastele eelistatult. Sellist fenomeni seostati HS genoomide eelistatud replitseerumisega sügoodis (Blanc & Dujon, 1980). Uurides nende järjestusi täheldati, et kõikide HS mutantide mtDNA koosneb tandeemselt korratud, AT rikaste segmentidega eraldatud, GC rikastest konserveerunud elementidest, mida nimetatigi *ori* järjestusteks (Baldacci *et al.*, 1984).

Sõltuvalt *S. cerevisiae* tüvest sisaldab mtDNA seitse või kaheksa *ori* järjestust, millest ainult kolme või nelja peetakse aktiivseteks. *S. cerevisiae* tüve FY1679 mtDNA sisaldab näiteks 8 *ori* järjestust, millest on aktiivsed ainult *ori2*, *ori3* ja *ori5* (Foury *et al.*, 1998). *Ori* järjestused on umbes 300 aluspaari pikkad ning koosnevad kolmest 100% konserveerunud GC klastrist: A, B ja C (Joonis 2). Need klastrid on eraldatud AT rikaste segmentide poolt nii, et A ja B vahele jäävad AT rikkad regioonid p ja s, ning B ja C vahele pikim AT rikas regioon l. C klastrile eelneb AT rikas segment r (Zamaroczy *et al.*, 1984). See segment sisaldab üheksast nukleotiidist koosnevat promootorit, millelt algab

transkriptsioon. Segmentis r alguse saava transkriptsiooni suund on klastrist C klastri A suunas (Joonis 2.a). A ja B klastrite vahel paikneval alal on potentsiaal moodustada juuksenõel struktuur. Lisaks konserveerunud A, B ja C klastritele võivad *ori* järjestused sisaldada GC rikkaid lisaklastreid (Joonis 2.b, γ ja β klastrid), mis tavaliselt paiknevad l või r segmentis. GC rikka lisaklastrite paiknemine r segmentis inaktiveerib promootorit. On täheldatud, et aktiivsed replikatsiooni *ori*-d ei sisalda lisaklastreid (Foury *et al.*, 1998).

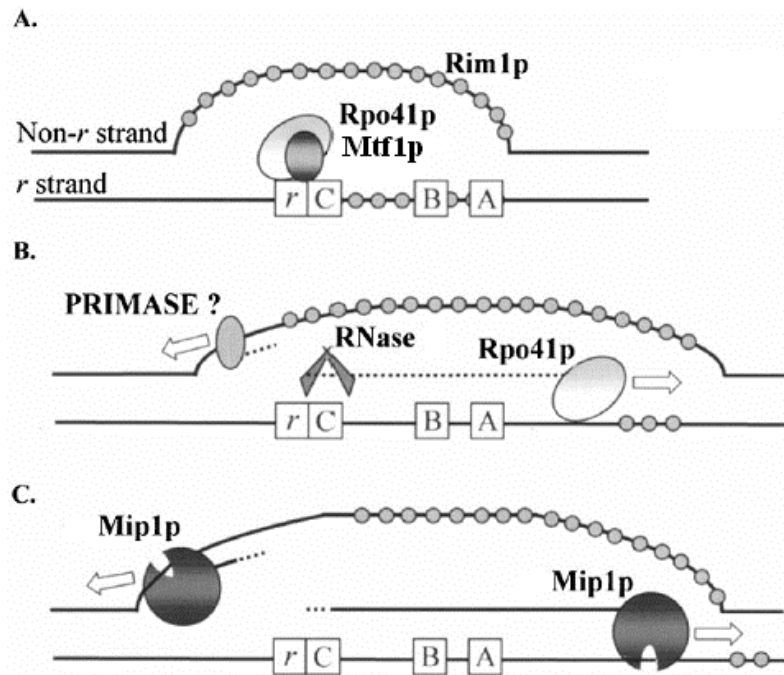


Joonis 2. *ori* järjestuste skemaatiline organisatsioon. **a.** Aktiivsed *ori* järjestused sisaldavad kolm konserveerunud GC rikast klastrit: A, B, C ning nende vahele jäävaid AT rikkaid segmente: p, s, l ja r. Viimane on transkriptsiooni initsiatsiooni kohaks (transkriptsiooni suund on näidatud noolega). **b.** Inaktiivsed *ori* järjestused sisaldavad tavaliselt kaks GC rikast lisaklastrit γ ja β , mis paiknevad vastavalt r ja l segmentis. γ klastrite insertioon r segmenti põhjustab promootori inaktiveerumise ning transkriptsiooni mittetoimumise (rist noolel).

Üldjoontes on *S. cerevisiae* aktiivsed *ori* järjestused struktuurilt sarnased imetajate mtDNA raske ahela replikatsiooni alguskohaga – O_H (*origin heavy*). Imetajate puhul on levinuim mtDNA replikatsiooni mudel, mille puhul raske ja kerge ahela replikatsioon toimub erinevatelt *ori*-delt, O_L (*origin light*) ja O_H , mis on vastassuunalised ja asuvad üksteisest suhteliselt kaugel. Replikatsioon saab alguse RNA praimerite sünteesist O_H -st eespool asuvalt kerge ahela promootorilt, LSP-lt, katalüüsitud mitokondriaalse RNA polümeraasi poolt. Genereeritud praimerit kasutab mitokondriaalne DNA polümeraas replikatsiooni elongatsiooniks. Kui raske ahela replikatsioon jõuab O_L -ni, siis initsieeritakse kerge ahela replikatsioon kasutades spetsiifilise primaasi poolt sünteesitud RNA praimerit (ülevaade Fernandez-Silva *et al.*, 2003).

Et *S. cerevisiae* *ori*-de replikatsiooniliseks aktiivsuseks on vajalik promootorit sisaldav r segment, siis arvatakse, et *S. cerevisiae* mtDNA replikatsioon toimub analoogselt imetajate omaga kasutades RNA praimerit (Baldacci *et al.*, 1984). Selle mudeli järgi algab RNA ahela süntees juhtival ahelal paikneva r segmenti promootorilt ning selle viib läbi mitokondriaalse RNA polümeraasi kompleks – Rpo41 ja Mtf1 (joonis 3). *In vitro* transkriptsiooni katsetes näidati stabiilsete RNA-DNA dupleksite formeerumist *ori*

järjestustel (Xu & Clayton, 1995). Pärast RNA ahela sünteesi lõigatakse seda järjestusspetsiifiliselt RNAasi aktiivsusega valgu poolt, mille tagajärjel genereeritakse RNA praimer vaba 3'-OH rühmaga (Stohl & Clayton, 1992). Kasutades sellist praimerit alustab mitokondriaalne DNA polümeraas Mip1 replikatsiooni juhtival ahelal.



Joonis 3. *S. cerevisiae* mtDNA replikatsiooni mudel. A. Mitokondriaalse RNA polümeraasi kompleks, Rpo41 ja Mtf1, seondub juhtival ahelal (*r strand*) asuva *ori* järjestuse r segmendiga ning alustab RNA ahela sünteesi. B. RNA ahel lõigatakse RNAasi poolt ning moodustub lühikene RNA praimer. Mahajääval ahelal (*non-r strand*) sünteesitakse RNA praimer primaasi poolt promootorregioonist eespool. C. Neid RNA praimereid kasutatakse mitokondriaalse DNA polümeraasi Mip1p poolt uue DNA ahela sünteesi elongatsiooniks. Pidev joon tähistab DNA ahelat, punktiirjoon RNA ahelat. Valged nooled tähistavad replikatsiooni suunda. A, B, C ja r tähistavad juhtival ahelal asuva *ori* järjestuse vastavaid klastreid ja promootorregiooniga AT rikast segmenti (muudetult Lecrenier & Foury, 2000).

Et mahajääva ahela replikatsiooni alguskohale ei eelne promootorjärjestust, siis arvatakse, et RNA praimerit süntees sellel ahelal viiakse läbi mitokondriaalse primaasi poolt (Baldacci *et al.*, 1984). On näidatud, et mahajääva ahela praimer algab 34 aluspaari juhtiva ahela praimerit alguskohast eespool ning et juhtiva ahela praimer lõpeb C klatri piires (Graves *et al.*, 1998). Seni pole täpselt teada, mis valgud võiksid vastutada RNAase ja primaase aktiivsuse eest *S. cerevisiae* mtDNA replikatsioonis.

Toetudes mitmete eksperimentaalsete andmete põhjal on RNA praimerit kasutav replikatsioonimudel tõenäoliselt efektiivne replikatsiooni viis nii ρ^+ rakkudes kui ka ρ^- HS mutantides. Mitmete uuringute andmed viitavad aga sellele, et *S. cerevisiae*'s peab

olema vähemalt veel üks mehhanism mtDNA replikatsiooniks (Fangman & Dujon, 1984; Fangman *et al.*, 1989a; Lorimer *et al.*, 1995).

ρ^- mutantide genoomi uurimisel on täheldatud, et mõnede supressiivsete ja neutraalsete mutantide mitokondriaalne genoom koosneb 100% ulatuses AT aluspaaridest (Fangman & Dujon, 1984). Nende genoom ei sisalda *ori* järjestuste konserveerunud GC klastreid ega üheksanukleotiidilist promootorit. Vaatamata sellele säilitatakse nende mtDNA-d stabiilsena mitokondris ning isegi pärandatakse kuni 35%-lise supressiivsusega järglastele ristamisel ρ^+ rakkudega (Fangman *et al.*, 1989a). Nende tulemuste kohaselt ei pea mtDNA järjestus, mis tagab sellise mitokondriaalse genoomi säilitamise, sisaldama *ori* järjestust ning on oma ülesehituselt lihtsam.

Et RNA praimerit kasutavas DNA replikatsiooni mehhanismis on oluline roll RNA polümeraasil, kontrolliti selle katalüütilise subühiku Rpo41 vajalikkust mtDNA replikatsiooniks kasutades mutatsioonanalüüsi. RPO41 geeni väljalülitamine *S. cerevisiae* ρ^+ rakkudes põhjustab mtDNA täieliku kadumise ja ρ^0 genotüübi tekkimise (Greenleaf *et al.*, 1986). Hilisemates töödes on aga näidatud, et RPO41 geeni deleteerimine ρ^- tüvedes ei mõjuta ρ^- genoomide struktuurset terviklikkust, replikatsiooni ega ka eelistatud pärandumist järglastele (Lorimer *et al.*, 1995; Fangman *et al.*, 1989b). Seega pole Rpo41 sõltuv transkriptsioon oluline ρ^- mutantide mtDNA replikatsiooniks. Nende andmete kohaselt peab ρ^- mutantides olema mingi alternatiivne replikatsiooni mehhanism, mis ei kasuta Rpo41 poolt läbiviidavat transkriptsiooni.

Et rekombinatsioon toimub *S. cerevisiae* mitokondris kõrgel tasemel, siis rekombinatsioonist sõltuv replikatsioon võiks olla teiseks mtDNA replikatsiooni mehhanismiks. Sellist mehhanismi mtDNA replikatsiooniks kasutab näiteks malaaria parasiit *Plasmodium falciparum* (Preiser *et al.*, 1996). Toetudes *S. cerevisiae* ja *P. falciparum* mtDNA struktuursetele sarnasustele ja rekombinatsioonilisele aktiivsusele on oletatud, et nende organismide mtDNA replikatsioon võiks toimuda sarnase mehhanismi järgi, milleks on rekombinatsioonist sõltuv replikatsioon (Williamson, 2002). Seni see alternatiivne mehhanism mtDNA replikatsiooniks *S. cerevisiae*'s eksisteerib vaid hüpoteesi tasemel ning vajab veel täiendavat uurimist.

Peale mitokondriaalse DNA polümeraasi (Mip1) ja oletatavasti ka RNA polümeraasi kompleksi (Rpo41 ja Mtf1) on näidatud mitme teise valgu osalust *S. cerevisiae* mtDNA replikatsioonil. Nendeks valkudeks on näiteks üheaheelalise DNA-ga seonduv Rim1, Okazaki fragmentide ligeerimisel osaleva Cdc9 ligaasi mitokondriaalne vorm ning

arvatavasti ka mitokondriaalne DNA helikaas Hmi1 (Van Dyck *et al.*, 1992; Donahue *et al.*, 2001; Sedman *et al.*, 2000).

1.4. mtDNA reparatsioon

Uuringud on näidanud, et mtDNA punktmutatsioonide sagedus ületab tuuma DNA oma ligi 10 korda (Brown *et al.*, 1979). mtDNA mutatsioonisageduse tõstmisel mängivad olulist rolli tema seotus mitokondri sisemembraaniga, kus genereeritakse reaktiivseid hapniku ühendeid, ning tõenäoliselt ka halvem kaitstus pakkivate valkude poolt. Ka oksüdatiivse stressi tagajärjel tekkinud kahjustusi tekib mtDNA-s 10 korda rohkem kui tuuma DNA-s (Yakes & Van Houten, 1997). Peamiseks DNA reparatsiooni mehhanismiks pärmi mitokondris on BER (*Base Excision Repair*), milles osalevad glükosülaasid funktsioneerivad nii tuumas kui ka mitokondris (Croteau *et al.*, 1999). BER reparatsiooni lõppetapid viiakse läbi DNA polümeraas Mip1 ning DNA ligaas Cdc9 poolt (Donahue *et al.*, 2001). Oksüdatiivsete kahjustuste parandamisel arvatakse osalevat ka Mgm101, mille mittefunktsionaalsus põhjustab rakkude suuremat tundlikkust DNA-d kahjustavate faktorite suhtes, kuid mille täpne roll reparatsioonil pole veel teada (Meeusen *et al.*, 1999).

Replikatsioonil tekkinud vigade parandamiseks eksisteerib pärmi mitokondris nn *mismatch* reparatsioonisüsteem, mille komponendid ja toimemehhanism on analoogsed *Escherichia coli* MutHLS süsteemiga. Tänu homoloogiale prokarüootse MutS valguga isoleeriti esimene mitokondriaalne valk – Msh1, mis osaleb replikatsioonil tekkinud valepaardumiste reparatsioonil (Reenan & Kolodner, 1992). Msh1 seondub DNA-ga ning tal on ATPaasne aktiivsus, mis on stimuleeritud DNA heterodupleksi poolt (Chi & Kolodner, 1994). Teisteks teadaolevateks pärmi mitokondriaalse *mismatch* reparatsioonisüsteemi komponentideks on üksikahelalise DNAGA seonduv Rim1 ning DNA helikaas Pif1, mis osalevad valepaardumist sisaldava DNA lõigu eemaldamises, ning ka DNA polümeraas Mip1, mille poolt sünteesitakse täis tekitatud üksikahelaline osa DNA-s (Lahaye *et al.*, 1991; Van Dyck *et al.*, 1992).

1.5. *S. cerevisiae* mitokondriaalsed valgud

S. cerevisiae proteoomi on uuritud mitme teadlaste grupi poolt kasutades erinevaid biokeemilisi ja molekulaargeneetilisi meetodeid (Prokisch *et al.*, 2004; Sickmann *et al.*, 2003; Ohlmeier *et al.*, 2003; Lascaris *et al.*, 2003; Pflieger *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2002). Nende uuringute andmed erinevad suuremal või vähemal määral üksteisest, mis teeb *S. cerevisiae* proteoomi suuruse ja kompositsiooni hindamise keeruliseks. Praeguseks arvatakse kindlalt mitokondrisse lokaliseeruvat 477 valku, samas kui terve proteoom võiks hõlmata ligi 700-900 valku.

Et mtDNA kodeerib kõigest 8 valku, siis 99% mitokondriaalsetest valkudest on kodeeritud tuuma genoomi poolt ning imporditakse posttranslatsiooniliselt mitokondrisse nende polüpeptiidides sisalduva mitokondrisse lokaliseerumise signaali abil. See signaaljärjestus asub üldjuhul valgu N-terminuses ning on tavaliselt 20-60 aminohapet pikk. Mitokondriaalne signaaljärjestus sisaldab mitmeid positiivselt laetud (R, H, K) ja hüdrofoobseid aminohappeid (M, L, I, V, W, F, Y, A, C) ning tal puuduvad täiesti negatiivselt laetud aminohapped. Sellisel järjestusel on amfipaatse α -heeliksi moodustamise võime. Mitokondrisse importimisel eemaldatakse see signaaljärjestus proteolüütiliselt. Selline N-terminuse struktuur on olemas enamusel mitokondriaalsetel valkudel. Mõned valgud lokaliseeruvad mitokondrisse aga valgusiseste signaaljärjestuste abil, näiteks mitokondriaalse RNA polümeraasi spetsiifilisuse faktor Mtf1 (Sanyal & Getz, 1995). Erandiks on ka DNA helikaas Hmi1, millel asub mitokondrisse lokaliseerumise signaal C-terminuses (Lee *et al.*, 1999).

1.6. *S. cerevisiae* mtDNA polümeraas Mip1

Mip1 on ainuke DNA polümeraas *S. cerevisiae* mitokondris, mis mängib asendamatu rolli nii mtDNA replikatsioonil kui ka reparatsioonil. Koos teistest organismidest pärinevate mitokondriaalsete DNA polümeraasidega kuulub Mip1 γ DNA polümeraaside (Poly) hulka. MIP1 deleteerimine genoomist põhjustab mtDNA täielikku kadumist, rho^o genotüübi teket (Genga *et al.*, 1986).

Esmakordselt kirjeldati ja osaliselt puhastati *S. cerevisiae* Poly juba 1970-ndate aastate alguses Wintersbergeri uurimisgrupi poolt (Wintersberger & Wintersberger, 1970).

Selle hulk rakkudes osutus olevat sõltuvaks rakkude kasvutingimustest, nagu näiteks aeratsioon ja süsinikuallikas söötmes, ning suurenes ligi kaks korda rakkude kasvatamisel etiidiumbromiidi juuresolekul (Wintersberger & Blutsch, 1976). Samade uurijate poolt näidati ka, et Poly on optimaalselt aktiivne 50mM Mg^{2+} kontsentratsioonil ning eelistab substraadina aktiveeritud DNA-d (DNAasiga osaliselt töödeldud lõhe spermi või vasika tüümuse DNA) või poly(dA)·oligo(dT). Mn^{2+} ionide olemasolu mõjus tema aktiivsusele aga inhibeerivalt (Wintersberger & Blutsch, 1976).

1986. aastal eraldati *mip1* temperatuuritundlik mutant, mis kaotas kõrgemal temperatuuril mtDNA, muutudes seejuures ρ^0 -ks (Genga *et al.*, 1986). Temperatuuritundlik mutatsioon MIP1 geenis takistas mtDNA replikatsiooni 35°C juures, sealjuures tuuma DNA replikatsioon jäi täiesti normaalseks ning temperatuurist sõltumatuks. Need tulemused osutasid MIP1 geeni produkti vajalikkusele ainult mtDNA replikatsiooniks ning viitasid sellele, et vastav geen kodeerib pärmi mitokondriaalset replikaasi. Alles MIP1 geeni kloonimine, sekveneerimine ja järjestuse analüüs määrasid kindlaks, et selle produkt on pärmi mitokondriaalse polümeraasi katalüütiline subühik (Foury, 1989), mis omab peale DNA polümeraasest domääni ka 3'→5' eksonukleaasest domääni ning kuulub Perekond A DNA polümeraaside hulka (Ito & Braithwaite, 1990).

1.6.1. Mip1 valgu struktuur ning homoloogia teiste DNA polümeraasidega

Mip1 valgu polüpeptiid on 1254 aminohapet pikk ning tema molekulmass on 143,5 kDa. MIP1 oli esimene sekveneeritud mitokondriaalse DNA polümeraasi geen ning Mip1 valgu aminohappelise järjestuse esialgne analüüs näitas, et tal on homoloogseid alasid mitmete eukarüootsete ja viiruste DNA polümeraasidega ning ka pöördtranskriptaasidega (Foury, 1989). Vaatamata nendele sarnasustele erines Mip1 valgu ülejäänud järjestus nendest polümeraasidest üsna tugevalt ning selge homoloogia puudumise tõttu jäi Mip1 fülogeneetilise päritolu küsimus esialgu lahtiseks. Mõni aeg hiljem näidati mitme uurija poolt, et Mip1 primaarjärjestus on regiooniti tugevalt homoloogne Perekond A DNA polümeraaside iseloomulike konserveerunud motiividega: polümeraasse domääni motiividega PolA, PolB, PolC ning 3'→5' eksonukleaasse domääni motiividega Exo I, Exo II ja Exo III (Joonis 4) (Ito & Braithwaite, 1990; Blanco *et al.*, 1991).

```

1   MTKLMVRSEC MLRMVRRRPL RVQFCARWFS TTKNTAEAPR INPVGIQYLG
51  ESLQRQVFGS CGGKDEVEQS DKLMELESKKS LKDHGLWGKK TLITDPISFP
101 LPPLQGRSLD EHFQKIGRFN SEPYKSFCEK KFTEVMARPA EWLKPKGWVK
      Exo I
151 YVPGMAPVEV AY[PDEELVVF DVETLYNVSD YPTLA]TALSS TAWYLWCSPF
      Exo II
201 ICGGDDPAAL IPLNTLNKEQ [VIIGHNVAYD RARVLEEYNE] RDSKAFFLDT
251 QSLHIASFGL CSRQRPMFMK NNKKKEAEVE SEVHPEISIE DYDDPWLNVS
      Exo III
301 ALNSLKDVAK FHCKIDLDKT DRDFFASTDK S[TIIEVFQKL VNYCATDVTA]
351 [TSQVFDEIFF] VFLKKCPHPV SFAGLKSLSK CILPTKLNW NDYLNSSSESL
401 YQQSKVQIES KIVQIIKDIV LLKDKPDFYL KDPWLSQLDW TTKPLRLTKK
451 GVPAKQKLP GFPEWYRQLF PSKDTVEPKI TIKSRIIPIL FKLSWENSPV
501 IWSKESGWCF NVPHEQVETY KAKNYVLADS VSQEEEEIRT HNLGLQCTGV
551 LFKVPHPNGP TFNCTNLLTK SYNHFFKEGV LKSESELAHQ ALQINSSGSY
601 WMSARERIQS QFVVPSCFKP NEFQSLSAKS SLNNEKTND[L AIIIPKIVPM]
      Pol A
651 [GTITRAVEN AWTASNAKA NRIGSELKTQ VKAPPGYCFV GADVDSSEELW]
701 [IASLVGDSIF NVHGGTAIGW MCLEG]TKNEG TDLHTKTAQI [LGCSRNEAKI]
      Pol B
751 [FNYGRIYGAG AKFASQLLKR FN]PSLTDEET KKIANKLYEN TKGKTRSKL
801 FKKFWYGGSE SILFNKLESI AEQETPKTPV LGCGITYSLM KKNLRANSFL
      Pol C
851 PSRINWAIQS SGVDYLHLLC CSMEYIIKKY NLEA[RLCISI HDEIRFLVSE]
901 [KDKY]RAAMAL QISNIWTRAM FCQQMGINEL PQNCAFFSQV DIDS VIRKEV
      CTE
951 NMDCITPSNK TAIPHGEALD INQL[LDKSNS KLGKPNLDID SKVSQYAYNY]
1001 [REPVFEEYNK SYTPEFLKYF LAMQVQSDKR DVNRLEDEYL RECTSKEYAR]
1051 [DGNTAEYSLL DYIKDVEKGK RTKVRIMGSN FLDGTKNAKA DQRIRLPVNM]
1101 [PDYPTLHKIA NDSAIPKQL LENRRKKENR IDDENKKKLT RKKNTTPMER]
1151 [KYKRVYGGK AFEAFYECAN KPLDYTLETE KQFFNIPIDG VIDDVLNDKS]
1201 [NYKKKPSQAR TASSSPIRKT AKAVHSHKLP ARKSSTTNRN LVELERDITI]
1251 [SREY]

```

Joonis 4. Mip1 valgu primaarstruktuur. Exo I, Exo II ja Exo III on Perekonda A kuuluvate DNA polümeraaside eksonukleaase domääni konserveerunud motiivid, Pol A, Pol B ja Pol C – polümeraase domääni konserveerunud motiivid (Ito & Braithwaite, 1990). Tumedalt on tähistatud Perekonnas A hästi konserveerunud aminohapped. CTE (*C-terminal extension*) on Mip1-le iseloomulik järjestus C terminaauses osas.

Ka järgnevalt läbiviidud DNA polümeraaside joondamine nende primaarjärjestuse järgi paigutas Mip1 Perekonda A, mille tuntuimaks liikmeks on *E. coli* DNA polümeraas I ning kuhu kuuluvad ka teised prokarüootsed (näiteks *Thermus aquaticus*'e) ja viiruslikud (näiteks T7 bakteriofaagi) DNA polümeraasid (Ito & Braithwaite, 1991; Braithwaite & Ito,

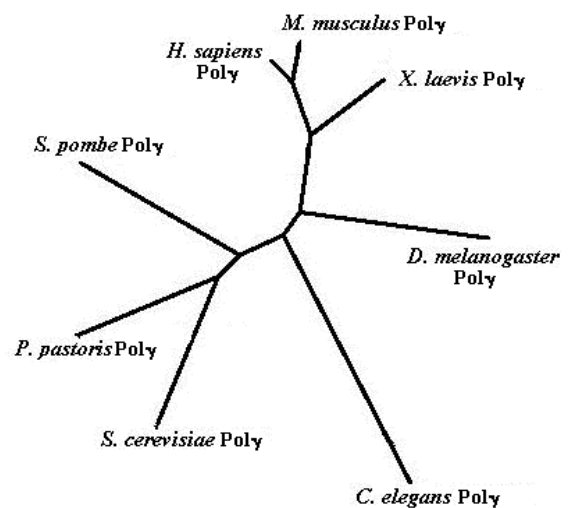
1993). Lisaks järjestuse homoloogia ühendab Mip1 selle polümeraaside perekonnaga ka mõnede omaduste olemasolu, nagu näiteks resistentsus aphidikoliinile ning ddNTP tundlikkus. Mip1 oli esimene eukarüootsest organismist pärinev Perekonna A DNA polümeraaside liige. Mip1 klassifitseerimine prokarüootsete polümeraasidega ühte perekonda on ka kooskõlas mitokondri endosümbiootilise päritolu teooriaga.

Nagu varem juba mainitud kuulub Mip1 Polγ-de hulka. Nii Mip1 kui ka teised Polγ-d on ainukesed DNA polümeraasid eukarüootide mitokondris. Seetõttu arvatakse nad olevat vastutavat kõikide DNA sünteesi reaktsioonide eest mtDNA replikatsioonil, reparaatsioonil ning rekombinatsioonil, erinevalt tuuma DNA polümeraasidest, millele on omane funktsionaalne spetsialiseerumine.

A.

	Identsus Mip1-ga	Sarnasus Mip1-ga
<i>Pichia pastoris</i> Polγ	51%	66%
<i>Schizosacharomyces pombe</i> Polγ	47%	63%
<i>Homo sapiens</i> Polγ	45%	61%
<i>Mus musculus</i> Polγ	44%	60%
<i>Xenopus laevis</i> Polγ	45%	61%
<i>Drosophila melanogaster</i> Polγ	33%	49%
<i>Caenorhabditis elegans</i> Polγ	38%	54%

B.



Joonis 5. Mip1 homoloogsus teiste Polγ-dega. **A.** Joondamise põhjal määratud identsuse ja sarnasuse protsentuaalsed väärtused. **B.** Joondamise andmete alusel saadud Polγ-de juureta fülogeneetiline puu (Karlberg *et al.*, 2000, supplementary material).

Polümeraas γ valkude primaarjärjestuste võrdlemine näitas, et see on üsna konserveerunud DNA polümeraaside rühm (Karlberg *et al.*, 2000). Mip1 valgu ja mõnede teiste Polγ-de joondamise tulemused ning nende alusel tehtud juureta fülogeneetiline puu on ära toodud Joonisel 5. Kõige sarnasemad ning seega fülogeneetiliselt kõige lähedasemad Mip1-le on teiste pärmseente (*P. pastoris*, *S. pombe*) polümeraasid γ. Mip1 homoloogsus selgroogsete (*H. sapiens*, *M. musculus*, *X. laevis*) Polγ-dega on üsna kõrge. Kõige vähem sarnased Mip1-le on aga selgrootute (*D. melanogaster*, *C. elegans*) polümeraasid γ.

Praeguseks on kindlaks tehtud, et nii mõnigi DNA polümeraas γ – *H. sapiens* Polγ, *M. musculus* Polγ, *D. melanogaster* Polγ, *X. laevis* Polγ – omab peale katalüütilise

subühiku ka suuruselt väiksemat lisasubühikut, mida nimetatakse ka protsessiivsufaktoriks (Tabel 1).

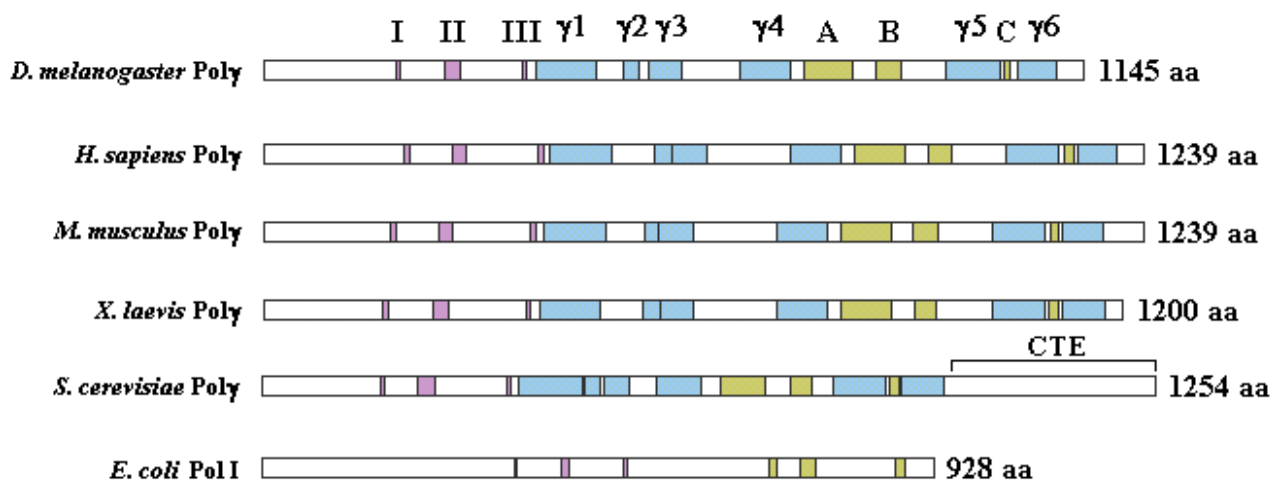
Tabel 1. Poly-de subühikuline kompositsioon.

	subühikute arv	katalüütilise subühiku suurus	lisasubühiku(te) suurus	Viited
<i>S. cerevisiae</i> Mip1	1	143,5 kDa	-	Lucas <i>et al.</i> , 2005
<i>S. pombe</i> Poly	≥ 1	115 kDa	info puudub	Ropp & Copeland, 1995
<i>H. sapiens</i> Poly	3	138,6 kDa	2 x 53,5 kDa	Yakubovskaya <i>et al.</i> , 2005
<i>M. musculus</i> Poly	3	139 kDa	2 x 54 kDa	Mott <i>et al.</i> , 2000 Carrodegua <i>et al.</i> , 2001
<i>X. laevis</i> Poly	2	140 kDa	50 kDa	Insdorf & Bogenhagen, 1989
<i>D. melanogaster</i> Poly	2	125 kDa	35 kDa	Olson <i>et al.</i> , 1995

Nii primaar kui ka tertsiaarstruktuurilt on DNA polümeraas γ lisasubühik homoloogne glütsüül-tRNA süntetaasiga. Kristallstruktuuri uuringud ning deletsioonanalüüsid näitasid, et imetajate protsessiivsufaktorid moodustavad dimeere, mistõttu funktsionaalne Poly vorm on heterotrimeerne (Carrodegua *et al.*, 2001; Yakubovskaya *et al.*, 2005). Inimesel suurendab lisasubühik polümeraasi afiinsust DNA ning dNTP-de suhtes, stimuleerides nii DNA sünteesimise kiirust kui ka protsessiivsust (Lim *et al.*, 1999, Johnson *et al.*, 2000). Erinevalt oma hulkraksetest organismidest pärinevatest homoloogidest, koosneb *S. cerevisiae* mitokondriaalne DNA polümeraas ainult ühest subühikust (Lucas *et al.*, 2005). Teiste organismide Poly-de subühikulise koosseisu kohta aga andmed puuduvad, mistõttu pole teada kas selline monomeerne struktuur on omane ainult pagaripärmile või ka teistele pärmseentele, nagu näiteks *S. pombe* ja *P. pastoris*.

Kõikidele Poly-dele on iseloomulik Mip1-ga sarnane katalüütilise subühiku organisatsioon: kolm konserveerunud 3'→5' eksonukleaasi motiivi (Exo1, Exo2, Exo3) valgu N terminaalses osas ning kolm polümeraasi motiivi (PolA, PolB, PolC) valgu C terminaalses osas (Joonis 6). Peale eelnimetatud motiivide on järjestuste võrdleva analüüsi käigus tuvastatud ka kuus konserveerunud järjestuse elementi ($\gamma 1 - \gamma 6$), mida nimetati Poly-de spetsiifilisteks järjestusteks (Kaguni, 2004). Neli nendest ($\gamma 1 - \gamma 4$) asuvad Exo ja Pol motiivide vahel, nn. *linker*-regioonis, ning kaks ($\gamma 5 - \gamma 6$) ümbritsevad PolC motiivi.

Poly-de *linker*-regioon varieerub suuruselt 337 aminohappe (*S. cerevisiae*'l) ning 482 aminohappe vahel (*H. sapiens*'il) olles kuni kaks korda pikem kui teiste A Perekonna polümeraaside oma (Lecrenier *et al.*, 1997). *Linker*-regiooni funktsioon pole praeguseks täpselt teada, kuid mõnede deletsioonanalüüside andmetele ning Perekont A-st pärit homoloogidele toetudes on oletatud, et ta võiks osaleda subühikute interaktsioonil, DNA sidumisel ja/või eksonukleaaesse ja polümeraasse aktiivsuse funktsionaalsel ühendamisel (Luo & Kaguni, 2005; Doublet *et al.*, 1998).



Joonis 6. Skemaatiline lineaarne Pol γ-de katalüütilise subühiku ja *E. coli* DNA pol I organisatsioon. Roosad ja kollased kastid näitavad vastavalt Exo (I-III) ning Pol (A-C) aktiivsaitide konserveerunud motiivide asukohta. Sinised kastid tähistavad Pol γ-de spetsiifilisi järjestusi (γ1 – γ6) (Kaguni, 2004). CTE tähistab Mip1-le iseloomuliku C terminaalise järjestuse asukohta (Young *et al.*, 2006).

Mip1 struktuuralseks eripäraks on C terminaaelses osas olevale polümeraasi domääni konserveerunud motiividele järgnev suhteliselt pikk (280 ah) järjestus – CTE (*C-terminal extention*) (täpne positsioon Joonis 4, skemaatiline asukoht Joonis 6). CTE järjestuse olemasolu on täheldatud ka teiste kottseente (*Ascomycota*) liikide Poly-del (*P. pastoris*, *C. albicans*, *S. pombe* jt). Kõrgematest eukarüootidest pärinevatel Poly-del selline järjestus aga puudub (Young *et al.*, 2006).

C otsast lühendatud Mip1 valgu mutantide (*mip1Δ176*, *mip1Δ216*, *mip1Δ279* ja *mip1Δ351*) analüüs näitas, et ainult γ6 elemendile järgnev 104 ah pikkune regioon CTE-st (975-1079 ah) on vajalik polümeraasi funktsionaalsuse säilitamiseks (Young *et al.*, 2006). See järjestus ei sisalda aga ühtegi teada olevat motiivi ega oma homoloogiat hulkraksete organismide Pol γ-de lisasubühikutega. Peale selle sisaldavad CTE järjestused palju polaarseid aminohappe jääke (47-71%), mistõttu on oletatud, et CTE regioon võiks osaleda

mtDNA mittespetsiifilisel sidumisel. Ka teised CTE funktsioonid nagu vajalikkus Mip1 valguga pakkimiseks ja stabiliseerimiseks ning valk-valk interaktsioonideks pole välistatud (Young *et al.*, 2006).

1.6.2. Mip1 valguga ensümaatilised aktiivsused

Mip1 DNA polümeraasne aktiivsus

DNA polümeraasina on Mip1 võimeline katalüüsima uue DNA ahela sünteesi, kasutades matriitsina juba olemasolevat DNA molekuli. Mip1 5'→3' DNA polümeraasiks aktiivsuseks on vajalik dNTP-de ja Mg^{2+} ionide manulus. *In vitro* määratud optimaalne Mg^{2+} ionide kontsentratsioon varieerub sõltuvalt reaktsioonil kasutatud substraadist (Tabel 2).

Tabel 2. Mip1 substraadispetsiifilisus.

matriits-praimer (suhe)*	Aktiivsus (%)	Mg^{2+} (mM)
aktiveeritud DNA	5,3	50
poly(dA)·dT ₁₂₋₁₈ (5/1)	100	10
poly(dC)·dG ₁₂₋₁₈ (5/1)	74,2	10
M13 (+) ahel-praimer (1/1)	9,2	5
poly(rA)·dT ₁₂₋₁₈ (5/1)	14,9	5
poly(dA-dT)	0,3	10

* Mip1 aktiivsust igal substraadil testiti erinevatel Mg^{2+} kontsentratsioonidel: 0; 2,5; 5; 10; 20 50 mM. Tabelis on ära toodud optimaalne saadud aktiivsus iga substraadiga (matriits-praimer) ning vastav Mg^{2+} ionide kontsentratsioon. Matriits ahela ja praimeri suhe näitab nende komponentide suhet substraadi valmistamisel (Lucas *et al.*, 2004).

Nagu teistelgi Pol γ -del on ka Mip1 valgul lai DNA substraatide spekter, mida ta on võimeline polümerisatsioonireaktsioonil kasutama. Tema aktiivsust on näidatud nii osaliselt degradeeritud, DNAasI-aktiveeritud vasika tüümuse ja lõhe spermi DNA peal, kui ka praimereeritud tsirkulaarse üksikahelalise faagi M13 DNA peal kui ka sünteetiliste poly(dA)·oligo(dT) ja poly(dC)·oligo(dG) peal (Foury, 1989; Biswas *et al.*, 1995; Lucas *et al.*, 2004). Peale selle on Mip1 võimeline suhteliselt efektiivselt kopeerima ka sünteetilist ribohomopolümeerset substraati – poly(rA)·oligo(dT) (Lucas *et al.*, 2004).

Mip1 aktiivsus sünteetilistel homopolümeersetel substraatidel on ligi 8-20 korda suurem kui looduslikel substraatidel (Tabel 2). Samuti on näidatud, et Mip1 polümeraas on üsna tundlik substraadi sekundaarstruktuuride suhtes. Nii tekib DNA sünteesi reaktsioonides mingil määral ka väiksema molekulmassiga vaheprodukte (Foury & Vanderstraeten, 1992).

On näidatud, et KCl lisamine reaktsioonile kontsentratsioonis 40-150mM stimuleerib Mip1 polümeraasset aktiivsust ligi kahekordselt, ent soola kõrgemad kontsentratsioonid mõjuvad Mip1-le inhibeerivalt (Eriksson *et al.*, 1995). Ka 30mM ZnCl₂ juuresolekul suurendab Mip1 aktiivsust kaks korda, tõenäoliselt stimuleerides tema DNA-ga seondumist (Biswas *et al.*, 1995).

Perekond A polümeraasidele iseloomulikult on Mip1 resistentne aphidikoliinile ning tundlik ddNTP-dele (Foury, 1989; Lucas *et al.*, 2004). 100µg/ml aphidikoliini kontsentratsioonil säilitab Mip1 üle 90% oma aktiivsusest ning kaotab poole oma aktiivsusest < 0,1µM ddTTP juuresolekul (Lucas *et al.*, 2004). Mip1 on tundlik ka N-etüülmaleimiidi suhtes, mille < 100 µM kontsentratsioonil jääb aktiivseks ainult 50% Mip1-st (Biswas *et al.*, 1995; Lucas *et al.*, 2004).

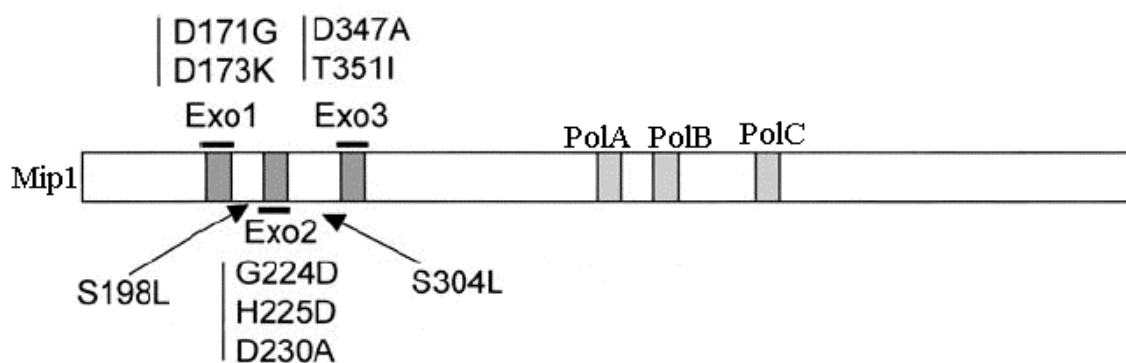
Mip1 on üsna ebastabiilne ja temperatuuritundlik ensüüm (Biswas *et al.*, 1995). Inkubatsioon 42°C juures 10 minuti jooksul vähendab tema polümeraasset aktiivsust ~50 korda. Mitokondriaalse bitsäperon Hsp70-Hsp78 süsteemi valkude juuresolekul reaktiveerub pärast sellist inkubatsiooni ligi 37% esialgsest Mip1 valgust (Germaniuk *et al.*, 2002). Seega, kuigi mtDNA polümerisatsioon *S. cerevisiae*'s on üsna temperatuuritundlik protsess, leidub mitokondris piisavalt efektiivne süsteem kõrgemast temperatuurist tingitud inaktivatsioonist taastumiseks.

Mip1 3'→5' eksonukleasne aktiivsus

Mip1 valgul on ka 3'→5' eksonukleasne aktiivsus, mis täidab DNA sünteesi käigus *proof-reading* funktsiooni, eemaldades ahelast valesti lülitatud nukleotiide (Foury & Vanderstraeten, 1992). Mip1 3'→5' eksonukleasne aktiivsus avaldub eelkõige dsDNA-l valepaardumisega 3' otsas ning sarnaselt teiste Polγ-dega on madal ssDNA-l (Foury & Vanderstraeten, 1992; Vanderstraeten *et al.*, 1998).

Kõikide *proof-reading* funktsiooniga DNA polümeraaside 3'→5' eksonukleasned domäänid sisaldavad kõrgelt konserveerunud aspartaate ja glutamaate, mis koordineerivad kahe metalliooni õiget positsiooni eksonukleasni aktiivsajaks nii, et

katalüütilise reaktsiooni toimumine oleks võimalik (Bernad *et al.*, 1989). Asp171 (ExoI), Asp 230 (ExoII) ja Asp347 (ExoIII) Mip1 valgus asendati koht-suunatud mutageneesi teel glütsiini võialaniiniga (Joonis 7). Vastavatel mutantidel D171G, D230A ja D347A mõõdetud eksonukleasne aktiivsus oli metsiktüüpi Mip1-ga võrreldes $\sim 10^4$ korda väiksem (Foury & Vanderstraeten, 1992; Vanderstraeten *et al.*, 1998). D171G-D230A Mip1 kaksikmutandil puudus aga eksonukleasne aktiivsus täiesti (Vanderstraeten *et al.*, 1998). Defektse eksonukleasne aktiivsusega Mip1 pikendab efektiivselt valepaardumisega substraate ning tema poolt sünteesitud DNA-l on kõrge valede nukleotiidide inkorporatsiooni tase. Selline mutantne Mip1 omab kõrget valepaardumiste spetsiifilisust, tehes kõige sagedamini G:T ja C:A valepaardumisvigu, C:C valepaardumisi seevastu esineb väga vähe (Tabel 3).



Joonis 7. Mip1 eksonukleasne domääni mutandid. Koht-suunatud mutatsioonide asukoht Mip1 lineaarsel skeemil.

Tabel 3. Mip1 valepaardumisvigade sagedus (valepaardumistüübi eelistus)*

Valepaardumine	dNTP (μ M)	Valepaardumisvea sagedus (%)	
		metsiktüüpi Mip1	D171G-D230A Mip1
T:G	0,25	0	51
	5,0	7	87
C:T	0,25	-	26
	5,0	-	50
C:A	0,25	-	72
	5,0	-	84
A:A	0,25	-	13
	5,0	-	64
C:C	25	-	19

* Valepaardumiste tasemed on mõõdetud *in vitro* katses puhastatud Mip1 ja M13 ssDNA-le hübridiseeritud 17 nukleotiidilise praimeriga. Reaktsioonil kasutati ühte nukleotiidi, dGTP, dTTP, dATP või dCTP, mille kontsentratsioon on näidatud tabelis (Vanderstraeten *et al.*, 1998).

In vitro läbiviidud juhusliku mutageneesi abil on tuvastatud ka mitu teist aminohappejääki, mis on samuti olulised Mip1 *proof-reading* funktsiooniks (Hu *et al.*, 1995). Kõikidel nendel Mip1 eksonukleaasse domääni mutante sisaldavatel tüvedel (E173K, S197L, G224D, H225D, S304L, T351I ja eespool nimetatud, vt ka Joonis 7) on mõõdetud spontaansete mutatsioonide tekkimist mtDNA-s. Enamusel neist on mtDNA muteerumise tase suurenenud 100-200 korda metsiktüüpi tüvega võrreldes. D171G-D230A kaksikmutandi puhul on see erinevus ~1500 kordne (Hu *et al.*, 1995). Nende andmete kohaselt mängib Mip1 *proof-reading* funktsioon tähtsamat osa mtDNA veatu replikatsiooni tagamisel.

Mutatsioonid eksonukleaasses domäänis mõjutavad oluliselt ka Mip1 polümeraasset aktiivsust. Nii on näiteks D171G ja D171G-D230A mutantide puhul näidatud DNA sünteesimise efektiivsuse vastavalt 2,5 ja 7 kordset langust (Vanderstraeten *et al.*, 1998). Samuti on täheldatud, et võrreldes metsiktüüpi valguga prevalveeruvad nende mutantide DNA sünteesi reaktsiooni lõpp-produktina väiksema molekulmassiga vaheproduktid täispikkuses elongeeritud DNA asemel. See viitab sellele, et Mip1 3'→5' eksonukleaasne domään avaldab mingit mõju polümeraasi tundlikkusele substraadi sekundaarstruktuuride suhtes (Foury & Vanderstraeten, 1992).

2. TÖÖ EESMÄRK

Käesoleva töö eesmärgiks oli esiteks välja töötada eksperimentaalne skeem *S. cerevisiae* mitokondriaalse DNA polümeraasi, Mip1, puhastamiseks rekombinantsest allikast, *E. coli* bakterist. Teiseks uuriti puhastatud rekombinantse Mip1 polümeraasi ensümaatilist aktiivsust *in vitro*, hindamaks tema protsessiivsust ning teisi kineetilisi parameetreid.

3. MATERJALID JA MEETODID

3.1. Kasutatud rakutüved ja söötmed

MIP1 genoomse kloni eraldamiseks ning Mip1 ekspressioonikonstruktide valmistamiseks kasutati vastavalt *E. coli* **DH10B** tüve [F^- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ (*ara leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*] ja **DH5 α** tüve [F' /*EndA1* *hsdR17* (r_K^- m_K^+) *supE44* *thi-1* *recA1* *gyrA* (Nal^r) *relA1* Δ (*lacZYA-argF*)_{U196} (m80*lacZ* Δ M15)]. Rekombinantse Mip1 valgu ekspressiooniks aga kolme *E. coli* tüve:

1. **BL21(DE3)** [*E. coli* B F^- *ompT* *hsdS*(r_B^- m_B^-) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ (DE3)],
2. **BL21-CodonPlus(DE3)-RIL** [*E. coli* B F^- *ompT* *hsdS*(r_B^- m_B^-) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ (DE3) *endA* Hte (*argU* *ileY* *leuW* Cam^r)],
3. **BL21-CodonPlus(DE3)-RP** [*E. coli* B F^- *ompT* *hsdS*(r_B^- m_B^-) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ (DE3) *endA* Hte (*argU* *proL* Cam^r)] (Stratagene).*

Kõiki *E. coli* tüvesid kasvatati LB söötmel (1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 1% NaCl). CodonPlus tüvesid kasvatati vedelsöötmes 50 μ g/ml klooramfenikooli (Cam) ning

* Lihtsuse mõttes kasutatakse edaspidi ekspressioonitüvedest rääkimisel järgmisi lühendeid: BL21(DE3) tüved (nr1, nr2 ja nr3 tüved), CodonPlus tüved (nr2 ja nr3), BL21 tüvi (nr1), RIL tüvi (nr2) ning RP tüvi (nr3).

tardsöötmel 34µg/ml Cam juuresolekul tRNA geenide lisakoopiaid sisaldava pACYC plasmidi selektsiooniks.

3.2. Kasutatud vektorid ja oligonukleotiidid

Käesolevas töös kasutati pBluescript SK+ (Stratagen), pUC18 (Pharmacia) ja pET24d (Novagen) vektoreid. **pBluescript SK+** plasmidi baasil oli valmistatud *S. cerevisiae* genoomne raamatukogu ning seda kasutati MIP1 genoomse klooni eraldamiseks. **pUC18** vektorit kasutati Mip1 valgu ekspressioonikonstrukti klonerimiseks ning **pET24d** vektorit Mip1 rekombinantseks ekspressiooniks. Bluescript SK+ ning pUC18 plasmiididega transformeeritud rakke kasvatati 100µg/ml ampitsilliiniga söötmel, pET24d plasmiidiga transformeeritud rakke – 50µg/ml kanamütsiiniga (Kan) söötmel.

Kasutatud oligonukleotiididest (DNA Technology A/S) annab ülevaate Tabel 4.

Tabel 4. Kasutatud oligonukleotiidid

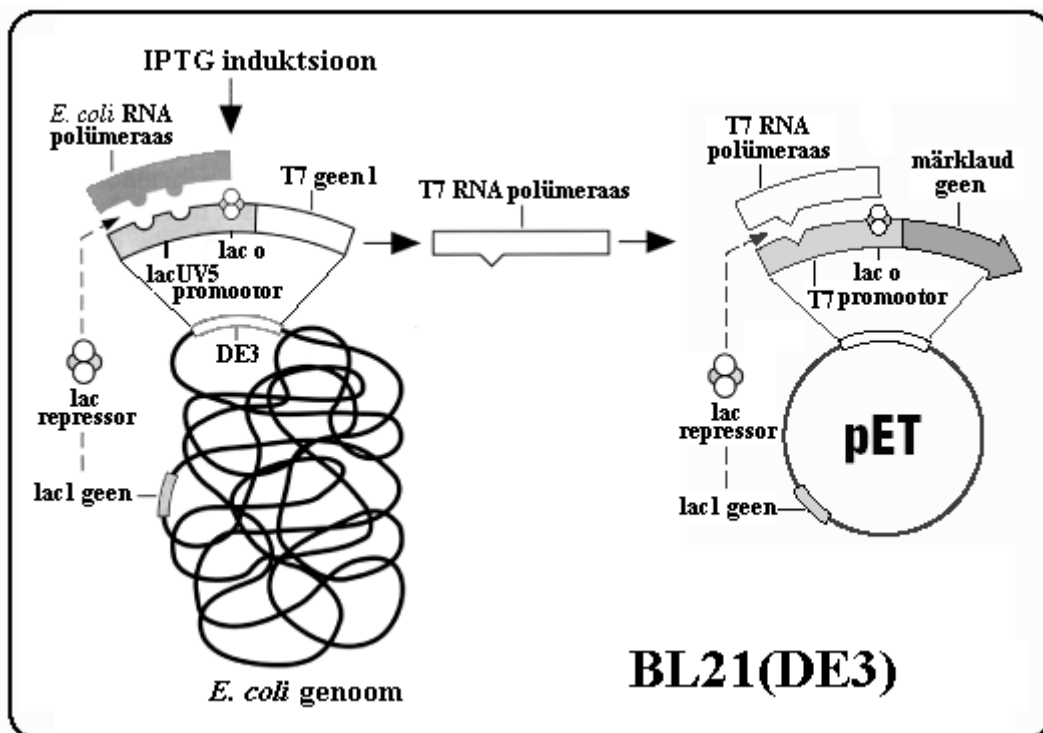
PCR-il kasutatud oligonukleotiidid		
Nimi	Järjestus (5'→3') *	positsioon MIP1 geenil
Mip5Sac	AAT GAG CTC CGA TGA CGA AAT TGA TGG TTA GA	1-21
MipN29Sac	AAT GAG CTC TAT CCA CAA AGA AGA ATA CCG C	88-107
Mip447NBgl	GGA AGA TCT GTT GAA GGA CAA ACC A	1263-1278
Mip928NBgl	GGA AGA TCT GGA CAA ATA CAG AGC TGC T	2703-2721
Mip3Hind	CGG AAG CTT GTA CTC TCT AGA AAT AGT AAT	3762-3742
Mip927CSal	ATC GTC GTC GAC CTT TTC GCT CAC CAA AAA	2703-2686
Mip446CSal	ATC GTC GTC GAC GAT ATC TTT TAT GAT	1257-1243
Mip1 polümeraase aktiivsuse mõõtmiseks kasutatud oligonukleotiidid		
Nimi	Järjestus (5'→3')	substraat
USP	GTA AAA CGA CGG CCA GT	M13/USP; pUC119/USP
D25	GCC TCG CAG CCG TCC AAC CAA CTC A	45/25
D45	GGA CGG CAT TGG ATC GAG GTT GAG TTG GTT GGA CGG CTG CGA GGC	45/25

* PCR-il kasutatud oligonukleotiidide järjestustel on jämeda kirjaga märgitud restriктаasi lõikekoht ning allajoonitult MIP1 geeniga seondumise ala

3.3. pET süsteem rekombinantsete valkude ekspressiooniks *E. coli* rakkudes

Käesolevas töös kasutati Mip1 rekombinantseks ekspressiooniks *E. coli* rakkudes pET süsteemi, mis on laialdaselt kasutatav prokarüootne ekspressioonisüsteem.

pET süsteemi peremeestüve rakud on bakteriofaag λ DE3 lüsogeenid. Nende kromosoomi on inserteeritud *lacUV5* promootori kontrolli all olev T7 RNA polümeraasi geen (T7 geen 1) ning promootori repressorit kodeeriv *lacI* geen (Joonis 8). *lacUV5* promootor on indutseeritav isopropüül-2-tio- β -D-galaktopüranosiidi (IPTG) poolt. Käesolevas töös kasutati peremeestüvena *E. coli* BL21(DE3) tüvesid, millel puuduvad Lon proteaas ja OmpT välismembraani proteaas. pET süsteemi märklaud geen on klooritud pET plasmidi T7*lac* promootori kontrolli alla, milles T7 promootorile järgneb *lac* operaatori (*lac o*) järjestust. *lac* repressori seondumine operaatoralale vähendab efektiivselt transkriptsiooni T7 RNA polümeraasi poolt. pET plasmid kannab oma *lacI* geeni koopiat nii, et repressorit oleks piisavalt.



Joonis 8. pET süsteem valkude ekspressiooniks *E. coli*s.

3.4. MIP1 genoomse kloonu eraldamine

MIP1 geeni sisaldav genoomne kloon eraldati *S. cerevisiae* genoomsest raamatukogust, mis oli eelnevalt valmistatud üldise- ja mikroobibiokeemia laboratooriumis Dr. Tiina Sedman poolt.

S. cerevisiae genoomse DNA raamatukogu sisaldavad kolooniad kanti üle nailon filtrile, lüüsi ning fikseeriti DNA UV abil (1200J/m^2) kovalentselt filtrile (Grunstein & Hogness, 1975; Sambrook & Russel, 2001).

Hübridisatsiooni proov valmistati *random priming* meetodi abil (Freinberg & Vogelstein, 1983; Sambrook & Russel, 2001). MIP1 geen amplifitseeriti PCR abil pärmi genoomse DNA pealt kasutades Mip5Sac ja Mip3Hind praimereid ning meie laboris puhastatud Taq polümeraasi (Sambrook & Russel, 2001). PCR reaktsiooni täispikk produkt puhastati geelist UltraClean™15 DNA Purification Kit From Agarose Gels and Solutions abil (MO BIO Laboratories, Inc). Hübridisatsiooniproovide sünteesiks kasutati Fermentase DecaLabel™ DNA Labeling Kit (#K0622). Lülitumata jäänud nukleotiidid eemaldati sadestamisel etanooli ja ammooniumatsetaadiga (Sambrook & Russel, 2001).

Radioaktiivset proovi hübridiseeriti raamatukogu sisaldavate lüüsitud kolooniatega filtrile ning signaali detekteeriti autoradiograafia abil.

Radioaktiivse prooviga hübridiseerunud kolooniatest eraldati plasmiidne DNA aluselise lüüsi meetodil (Sambrook & Russel, 2001), kontrolliti PCR, restriksioonanalüüsi ning sekveneerimisega. Sekveneerimist viidi läbi DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit protokoll järgi ABI Prism™ 377 DNA sekvenaatoriga.

3.5. Mip1 ekspressioonikonstruktide valmistamine

MIP1 ja $\Delta 29\text{MIP1}$ järjestused amplifitseeriti PCR abil Taq/Pwo polümeraaside (Roche Diagnostics) seguga (proportsioonis 1/4) kasutades vastavalt Mip5Sac/Mip3Hind ja Mip1N29Sac/Mip3Hind praimeripaare ning kloneeriti pUC18 polülinteri SacI ja HindIII (Fermentas) lõikekoha vahele. PaeI ja XbaI restriктаaside lõikekohtade vahele jääv MIP1 järjestus (34-3752 aluspaari, bp) asendati PCR-il amplifitseeritud kloonis *S. cerevisiae* genoomsest raamatukogust eraldatud järjestusega. Asendamata jäänud otste (1-34 bp; 3752-3765 bp) õigsuses veenduti sekveneerimise teel. pUC18 Mip1 ja pUC18 $\Delta 29\text{Mip1}$ konstruktidest lõigati välja SacI ja HindIII restriктаasidega vastavad MIP1 geeni järjestused

ning kloneeriti samade lõikesaitide vahele pET24d ekspressioonivektoris. pET24d Mip1 ja pET24d Δ 29Mip1 konstruktid^{*} õigsust kontrolliti restriksioon- ja PCR analüüsi teel.

3.6. Mip1 ekspressioon BL21(DE3) tüvedes

3.6.1. BL21(DE3) kompetentsete rakkude valmistamine ning transformatsioon

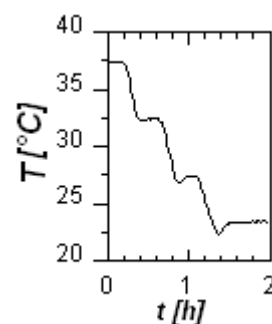
E. coli BL21(DE3) tüvede kompetentseid rakke valmistati CaCl_2 meetodil vahetult enne transformatsiooni *heat-shock* meetodil (Sambrook & Russel, 2001).

3.6.2. Väikeses mahus BL21(DE3) Mip1 ja Δ 29Mip1 tüvede kasvatamine ning Mip1 ekspressiooni induktsioon

Mip1 ja Δ 29Mip1 konstruktidega transformeeritud BL21(DE3) tüvede kolooniaga inokuleeriti LB söödet (+ 50 $\mu\text{g/ml}$ Cam, 50 $\mu\text{g/ml}$ Kan) ning kasvatati 37°C juures statsionaarsesse faasi jõudmiseni. Seejärel lahjendati 40 $\times$ värskesse söötmesse ning kasvatati kultuuri tiheduseni $\text{OD}_{600}=0,2, 0,4, 0,8, 1,2$ või 1,6. Mip1 valgu ekspressioon indutseeriti 0,1, 0,2, 0,5 või 1mM IPTG abil. Pärast indutseerimist kasvatati kultuuri 2, 4, 8 või 16 tundi temperatuuridel 23°C, 30°C või 37°C..

3.6.3. RIL Δ 29Mip1 tüve kasvatamine fermenteris ning Mip1 ekspressiooni induktsioon

37°C juures kasvatatud RIL Δ 29Mip1 statsionaarses faasis kultuur lahjendati 40 $\times$ ning kasvatati 37°C tiheduseni $\text{OD}_{600}=0,8$. Seejärel lahjendati kultuur 8 $\times$ 8l fermenterisse ning kasvatati langetades astmeliselt 1,5h jooksul temperatuuri 23°C-ni (Graafik 1). Kultuuri jõudmisel tiheduseni $\text{OD}_{600}=1,6$ indutseeriti Mip1 ekspressioon 0,5mM IPTG-ga 4h.



Graafik 1. Temperatuuri langetamine fermenteris enne induktsiooni.

^{*} Lihtsuse mõttes jäetakse järgnevalt konstruktidest rääkides plasmidi nimi ära nii, et pET24d Mip1 konstrukti on Mip1 konstrukti ning pET24d Δ 29Mip1 konstrukti Δ 29Mip1.

3.7. Rekombinantse Mip1 valgu puhastamine

3.7.1. Rakkude kogumine, lüüs ja sonikeerimine

Indutseerimise lõppedes koguti rakud tsentrifuugimisega 20min 4500 rpm 4°C (Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Sorvall® GS-3 Rotor). Rakke pesti vähese jääkülma TBS puhvriga [25mM tris(hüdrosümetüül)aminoetaan(Tris)-HCl pH 8, 137mM NaCl, 3mM KCl], resuspendeeriti 100x väiksemas mahus jääkülmas lüüsipuhvris [300mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8, 10% glütserool, 1mM fenüülmetsüülsulfonüül floriid (PMSF)] ning külmutati läbi vedelas lämmastikus.

Lüüsimiseks sulatati rakkude suspensioon jääl üles, lisati võrdne kogus jääkülma lüüsipuhvrit koos 2mg/ml lüütsüümiga (AppliChem). Rakke lüüsi jääl 1h jooksul ning külmutati läbi vedelas lämmastikus säilitades vajadusel -80°C juures kuni pool aastat.

Puhastamiseks sulatati lüüsitud rakud jääl üles ning sonikeeriti 3×10sek Bandelin Sonopuls sonikaatoriga 70%-lisel võimsusel. Sonikeerimiste vahepeal inkubeeriti rakke jääl vähemalt 60sek. Seejärel tsentrifuugiti sonikeeritud rakulüsaat 4°C 20min 15000 rpm (Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Sorvall® SS-34 Rotor) ning kasutati supernatanti kohe valgu puhastamiseks.*

Mip1 optimaalsete ekspressioonitingimuste väljaselgitamisel valmistati indutseerimata ja indutseeritud proovid tsentrifuugides 200µl kultuuri 8000 rpm 1min, lahustades rakkude sadet 20µl 1×SDS puhvris (50mM Tris-HCl pH 6,8, 100mM DTT, 2% SDS, 0,1% bromofenoolsinine, 10% glütserool) ning denatureerides 5min 100°C ja 5min 0°C.

3.7.2. Mip1 puhastamine Ni-NTA maatriksi abil

Väikeses mahus kiire puhastamine analüüsideks

Väikeses mahus puhastamiseks kasutati 1ml-st rakukultuurist valmistatud tsentrifuugitud rakulüsaati, millele lisati 100µl MQ veega pestud ning lüüsipuhvriga 50%-liseks tasakaalustatud Ni-NTA agaroozi (Qiagen). Pärast 3h loksutamist *end-over-end*

* Kõik järgnevad tööd valgu puhastamiseks viidi läbi 4°C juures kasutades jääkülmi lahuseid.

masinal (Intelli-Mixer RM-2, Elmi) pesti maatriks 1ml lüüsi puhvriga, 1ml 10mM imidasooliga lüüsi puhvriga, 0,5ml pesu puhvriga (1M NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8, 10% glütserool, 1mM PMSF, 10mM imidasool) ning 0,5ml 10mM imidasooliga lüüsi puhvriga. Maatriksiga seondunud valgud elueeriti 50µl elueerimispuhvriga (50mM Tris-HCl pH 6,8, 300mM NaCl, 10% glütserool, 1mM PMSF, 500mM imidasool).

Suures mahus puhastamine Ni-NTA kolonnil

Suures mahus puhastamiseks kasutati 4l fermenteri kultuurist valmistatud sonikeeritud ja tsentrifuugitud rakulüsaati (80ml). 3ml Ni-NTA maatriksit** pesti MQ veega ning tasakaalustati lüüsi puhvriga 50%-listeks suspensiooniks, lisati 80ml rakulüsaati ning loksutati 3h *end-over-end* masinal. Maatriks pesti lüüsi puhvriga ning kanti kolonnile. Kolonnis pesti maatriksit 45ml 10mM imidasooliga lüüsi puhvriga, 9ml pesu puhvriga ning 9ml 10mM imidasooliga lüüsi puhvriga. Maatriksiga seondunud valk elueeriti 9ml elueerimispuhvriga kogudes 750µl suuruseid fraktsioone (12tk).

3.7.3. Geelfiltratsioon Sephacryl-S200 kolonnil

Suures mahus rekombinantse Mip1 valgu puhastamiseks geelfiltratsioonil kasutati 16mm läbimõõduga ning 550mm kõrgusega kolonni, mille ruumala oli 110cm³. Sellisele kolonnile optimaalne pealekantava proovi kogus (30-100 korda väiksem kui kolonni maht) ning maksimaalne läbivoolutamise kiirus (kolonni ristlõike pindala x 30ml/ cm² x h) olid vastavalt 1,1-3,7ml ning 34ml/h (Scopes, 1982).

S-puhvriga [100mM NaCl, 25mM Hepes(N-2-hüdoksü-etüülpiperasiin-N'-2-etaansulfoonhape)-NaOH pH 7,5, 10% glütserool, 0,5mM EDTA (etüleendiamiin-tetraädikhape), 1mM ditiotreitol (DTT), 1mM PMSF] tasakaalustatud Sephacryl-S200 (Pharmacia Fine Chemicals) kolonnile kanti 3,7ml Ni-NTA kolonni fraktsioone ning puhverdati 110ml S-puhvriga. Esimesed 35ml koguti ühte fraktsiooni ning järgnevad 2ml suurustesse fraktsioonidesse (40tk).

** Ni-NTA kolonni maht oli valitud vastavalt Ni-NTA agaroozi seondumismahtuvusele – max 5-10mg valku 1ml maatriksi kohta (Scopes, 1982).

3.7.4. Katioonvahetus S-Sepharose kolonnil

Mip1 puhastamisskeemi väljatöötamisel kasutati 0,5ml S-Sepharose (Pharmacia Biotechnology) kolonni, mida pesti 5ml MQ veega, 2ml 1M NaCl-ga, 2ml MQ veega ning 2ml S-puhvriga. Kolonnile kanti S-puhvrissi dialüüsitud Ni-NTA kolonni fraktsioonid, pesti 2ml S-puhvriga ning elueeriti S-puhvritega, mille NaCl sisaldus suurenes järkjärgult: 150mM, 200mM, 250mM, 300mM, 350mM, 400mM, 500mM, 600mM, 700mM, 1M. 0,5ml iga puhvrit kanti kolonnile ning koguti 5 fraktsiooni 100µl kaupa. Geelil analüüsimiseks võeti kolmandat fraktsiooni.

Suures mahus Mip1 puhastamisel pesti 2ml-st S-Sepharose kolonni 20ml MQ veega, 8ml 1M NaCl-ga, 8ml MQ veega ning 16ml S-puhvriga. Kolonnile kanti Sephacryl-S200 fraktsioonid, pesti 8ml S-puhvriga, elueeriti 6ml 250mM NaCl-ga S-puhvriga ning 6ml 500mM NaCl-ga S-puhvriga kogudes 500µl suuruseid fraktsioone.

3.7.5. Anioonvahetus Q-Sepharose kolonnil

0,5ml Q-Sepharose (Pharmacia Biotechnology) kolonni tasakaalustati samamoodi nagu S-Sepharose kolonni, kuid S-puhvri asemel kasutati Q-puhvrit (100mM NaCl, 25mM Tris-HCl pH 7,5, 10% glütserool, 0,5mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF). Peale kantavad Ni-NTA kolonni fraktsioonid olid dialüüsitud Q-puhvrissi. Kolonn elueeriti analoogselt S-Sepharose kolonniga järjest suureneva NaCl sisaldusega Q-puhvritega kogudes iga puhvriga 5×100µl fraktsiooni (vt 3.7.4. protokoll).

3.7.6. Dialüüs

Dialüüsiks kasutati SpectraPor nr 4 dialüüsimembraani (läbilaskmise piir 12-14kDa). Dialüüsipuhvri (25mM Hepes-NaOH pH 7,5, 100mM NaCl, 50% glütserool, 0,5mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF) kogus oli ligikaudu 100 korda suurem dialüüsitava proovi kogusest ning seda vahetati iga 3h järel 3 korda.

3.8. Valgu analüüsi meetodid

3.8.1. Kontsentratsiooni määramine Bradfordi meetodil

Kromatograafia fraktsioone analüüsiks kasutati Bradfordi meetodit (Bradford, 1976). 100µl Bradfordi lahusega (0,01% Coomassie brilliant blue G-250, 5% etanool, 4,25% fosforhape) Elisa plaadi üksiksüvendisse lisati uuritavat valgulahust. Valgu kontsentratsiooni määrati mõõtes optilist tihedust OD₆₀₀ juures Elisa lugejas (Titertek Multiscan MCC/340) kasutades standardina veise seerumalbumiini (BSA).

3.8.2. SDS-polüakrüülamiidgeel (SDS-PAAG)

Valkude lahutamiseks suuruse järgi kasutati 10% akrüülamiid/bisakrüülamiid (AA/bis) SDS-PAAG elektroforeesi (Sambrook & Russel, 2001). Valgu proovid denatureeriti 5x SDS puhvris (250mM Tris-HCl pH 6,8, 500mM DTT, 10% SDS, 0,5% bromofenoolsinine, 50% glütserool), kanti geelile ning voolutati 90V 3h. Geeli voolutamise puhvrina kasutati Tris-glütsiini elektroforeesipuhvrit (125mM Tris, 960mM glütsiin, 0,5% SDS).

3.8.3. SDS-PAAG värvimine Coomassie brilliant sinisega

SDS-PAAG inkubeeriti 4h värvilahuses (25% etanool, 7% atseethape, 2,5mg/ml Coomassie brilliant blue R-250) ning 2h 3 vahetusega värvi mahavõtmise lahuses (25% etanool, 7% atseethape).

3.8.4. SDS-PAAG värvimine hõbenitraadiga

PAAG inkubeeriti 2x15min 250ml 50% etanoolis*, 15min 250ml 5% etanoolis ning 15min 250ml MQ vees, kuhu oli lisatud 8µl 1M DTT. Geel pesti kaks korda lühidalt (5-10sek) MQ veega, loputati vähese hulga hõbenitraadi lahusega (0,25g AgNO₃

* Kõik inkubeerimised viidi läbi toatemperatuuril kergelt loksutades kiikuval platvormil. Kõik lahused olid valmistatud vahetult enne kasutamist.

lahustatuna 250ml MQ vees), ning inkubeeriti 15min ülejäänud hõbenitraadi lahusega. Seejärel pesti geel kaks korda lühidalt MQ veega, kaks korda vähese hulga ilmutamislahusega (7,5g Na₂CO₃ lahustati 250ml MQ vees, lisati 125µl formaldehüüdi ning segati 2 minuti jooksul) ning inkubeeriti ülejäänud ilmutamislahusega seni, kuni valgud muutusid nähtavaks. Reaktsioon peatati sidrunhappega, inkubeeritdes sidrunhappe lahuses 5min ning 3x15min MQ vees (Morrissey, 1981).

3.9. Mip1 polümeraasse aktiivsuse mõõtmine pUC119/USP substraadil

Mip1 polümeraasset aktiivsust mõõdeti üksikahelalisel tsirkulaarsel pUC119 DNA-l, millele oli hübridiseeritud USP oligonukleotiid (järjestuse jaoks vt Tabel 4). Substraat valmistati lisades pUC119 ssDNA-le kuuekordses molaarses ülehulgas USP praimerit, inkubeerides 5min 90°C ning jahutades aeglaselt toatemperatuurini.

DNA sünteesi reaktsioon viidi läbi 5nM pUC119/USP substraadi, 50nM Mip1, 20mM Tris-HCl pH 8, 40mM KCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 0,1µg/µl BSA, 100µM dATP, 100µM dTTP, 100µM dGTP, 5µM dCTP ja 16,7nM [α -³²P]-dCTP tingimustes. Reaktsioon algatati ensüümi lisamisega. Peale inkubeerimist 30min 30°C juures lisati võrdses mahus 20mM EDTA, 1% SDS ja 0,4µg/µl Proteinaas K (Amresco, Inc.) lahust, inkubeeriti 30min 37°C, ekstraheeriti fenooliga ning sadestati etanooli ja NaCl-ga. DNA sade lahustati formamiidvärvis (25mM EDTA, 95% formamiid, bromofenoolsinine), denatureeriti 10min 90°C, inkubeeriti 10min jääl ning kanti eelnevalt voolutatud 10% AA/bis-6M uurea-1xTBE geelile. Pärast voolutamist geel kuivatati ning produktid visualiseeriti autoradiograafia abil.

3.10. Mip1 polümeraasse aktiivsuse mõõtmine M13/USP substraadil

3.10.1. DNA-substraadi valmistamine

USP oligonukleotiid märgistati [γ -³²P]-dATP-ga T4 bakteriofaagi polünukleotiidi kinaasi (PNK) abil Fermentase standardprotokolli järgi. PNK inaktiveeriti 10min 70°C.

Märgistatud USP-le lisati M13mp18 ssDNA kaks korda väiksemas molaarses kontsentratsioonis, inkubeeriti 5min 90°C ning jahutati aeglaselt toatemperatuurini. M13mp18 ssDNA oli eelnevalt valmistatud nii nagu kirjeldatud Sambrook & Russel, 2001.

M13/USP substraat puhastati seondumata oligonukleotiidist ning [γ - ^{32}P]-dATP-st Sephacryl-S400 geelfiltratsiooni kolonnil. Hübridiseerimisegu ekstraheeriti fenooliga ja 50 μl proovi kanti kolonnile (1,6ml). Kolonni voolutati $\text{S}_{100}\text{T}_{10}\text{E}_{0,1}$ puhvriga (100mM NaCl, 10mM Tris pH 8, 0,1mM EDTA) kogudes ~60 μl suuruseid fraktsioone, mida analüüsiti 10%AA/bis-1 $\times$ TBE (90mM Tris-boraat, 1mM EDTA) natiivsel geelil. Geelile kanti kõrvuti denatureeritud ja denatureerimata proovid. M13/USP substraadi kontsentratsioon fraktsioonides määrati Liquid Scintillation Counter (Wallac Winspectral 1414) abil. Saadud cpm (counts per minute) väärtused konverteeriti esmalt dpm (disintegrations per minutes) väärtusteks kasutades isotoop-standardite mõõtmisi ja hiljem molaarseteks kontsentratsioonideks arvestades ^{32}P poolestusaega ja polünukleotiidi kinaasi reaktsiooni stõhhiomeetriat.

3.10.2. Mip1 aktiivsuse mõõtmine M13/USP substraadil

DNA sünteesi reaktsiooniks valmistati ette kaks võrdse mahuga segu, millest esimene sisaldas 1,6nM M13/USP substraati, 20nM Mip1, 15mM Tris pH8, 1mM DTT, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA. Teine segu sisaldas 500 μM dNTP, 5mM MgCl_2 , 15mM Tris pH8, 1mM DTT, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA. Mip1/DNA-substraadi segu inkubeeriti jääl 5min, dNTP/ MgCl_2 segu inkubeeriti samal ajal 29°C. Vahetult enne reaktsiooni alustamist võeti Mip1/DNA-substraadi segust null ajapunkti proov. Reaktsioon käivitati kahe segu kokku segamisega ning viidi läbi 29°C juures. Reaktsiooni peatamiseks eemaldati soovitud ajavahemike järel (10sek-3min) 10 μl reaktsioonisegu ja lisati 20 μl -le jääkülmale formamiidvärville. Proovid denatureeriti inkubeerides 10min 90°C ning 10min 0°C juures. Denatureeritud proovid kanti eelnevalt voolutatud 10%AA/bis - 6M urea - 1 $\times$ TBE geelile. Pärast voolutamist geel kuivatati ning DNA visualiseeriti autoradiograafia teel. Signaal kvantiteeriti Phosphor Imager SI (Molecular Dynamics) skänneri ning ImageQuant programmi abil.

3.10.3. Tulemuste analüüsil kasutatud meetodid

Vaheproduktide pikkust hinnati nende liikumise kõrvutamisel marker DNA liikuvusega. Selleks kasutati kaliiberkõverat kujul:

$$\ln(\text{DNAnt}) = -a \times \text{liikuvus}(\text{mm}) + b,$$

kus a ja b on regressioonanalüüsil leitavad. DNA liikuvus geelis oli proportsionaalne naturaallogaritmiga DNA pikkusest.

3.11. Polümeraase aktiivsuse mõõtmine 45/25 substraadil

Mip1 polümeraaset aktiivsust mõõdeti 45nt ja 25nt pikkustest oligonukleotiididest koosneval substraadil (45/25) (järjestuse jaoks vt Tabel 4).

25nt praimerit märgistamine ning hübridiseerimine 45nt matriitsahelale tehti samamoodi nagu M13/USP substraadi puhulgi (3.10.1) selle vahega, et hübridiseerimiseks võeti matriitsahelat ja praimerit võrdses koguses. Vaba $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ eemaldamiseks sadestati hübridisatsioonisegu etanooli ja ammooniumatsetaadiga (Sambrook & Russel, 2001).

DNA sünteesi reaktsioon viidi läbi analoogselt M13/USP substraadiga (3.10.2) selle vahega, et 45/25 substraadi lõppkontsentratsioon reaktsioonisegus oli 200nM, Mip1 – 25nM ning MgCl_2 – 10mM. Reaktsiooni peatamiseks eemaldati soovitud ajavahemike järel (20sek-4min) 10 μl reaktsioonisegu ja pipeteeriti 90 μl -le jääkülmale formamiidvärville. Null ajapunkti jaoks eemaldati 5 μl 5min 0°C juures eelinkubeeritud Mip1/DNA-substraat segust ja pipeteeriti 45 μl -le jääkülmale formamiidvärville.

Proovid denatureeriti ning kanti eelnevalt voolutatud 14% AA/bis - 6M urea - 1 $\times$ TBE geelile. Pärast voolutamist PAAG kuivatati ning DNA visualiseeriti nagu kirjeldatud 3.10.2 peatükis.

4. TULEMUSED

4.1. MIP1 genoomse kloonu eraldamine pärmi genoomse DNA

raamatukogust

Mip1 valgu ekspressioonikonstruktide valmistamiseks eraldati MIP1 geen *S. cerevisiae* genoomsest DNA raamatukogust.

MboI-ga lõigatud pärmi genoomse DNA fragmendid olid inserteeritud pBluescript SK+ plasmidi polülimerise BamHI restriktiooni lõikekohta. Raamatukoguga plasmid oli transformeeritud *E. coli* DH10B rakkudesse ning saadud kolooniaid analüüsiti koloonia hübridisatsiooni meetodiga. Positiivse tulemuse andnud kolooniatest eraldati plasmidne DNA ja analüüsiti saadud kloonide järjestusi sekveneerimise, restriktiooni ning PCR teel.

Täispikk MIP1 geeni järjestusega kloonu ei suudetud raamatukogust leida, arvatavasti MIP1 üsna suure pikkuse tõttu (3765 bp). Parimaks tulemuseks osutus aga 3746 aluspaari pikkune MIP1 geeni fragment, millel puudus 5' otsast 19 nukleotiidi (20-3765 bp).

4.2. MIP1 ekspressioonikonstruktide valmistamine

4.2.1. Mip1 valgu mitokondrisse lokaliseerimise signaali ennustamine

Mitokondrisse lokaliseeruvatel valkudel on tavaliselt N-terminuses proteolüütiliselt eemaldatav hüdfoobsetest ja aluselistest aminohapetest koosnev signaaljärjestus. Mitokondriaalse valgu ekspressioonil rekombinantsest allikast on hea selline signaaljärjestus eelnevalt eemaldada, et vältida valgu agregeerumist valesti pakkumise tõttu.

Eespool nimetatud põhjustel otsustati ekspresseerida nii eemaldatud mitokondrisse lokaliseerimis-signaaliga kui ka täispikk Mip1 valg. Et Mip1 signaaljärjestus polnud eelnevalt teiste uurijate poolt kindlaks tehtud, siis viidi Mip1 N-terminuse analüüs läbi käesoleva töö raames ennustades potentsiaalset mitokondrisse lokaliseerimise signaali

nii käsitsi kui ka MITOPROT programmi abil (Claros & Vincens, 1996; <http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>). Analüüside tulemusena otsustati eemaldada Mip1 valgu N-terminusest 29 aminohappeline lõik, mis sisaldas 8 aluselist aminohapet, 16 hüdrofoobset ning ainult ühte happelist aminohapet (Joonis 9). MITOPROT programmi järgi on sellisel järjestusel 99,5%-line tõenäosus moodustada amfipaatset heeliksit.

$\Delta 29$ Mip1 molekulmass on tänu eemaldatud N terminaalsete otsale täispika Mip1 molekulmassiga võrreldes 3,7 kDa võrra väiksem (Mip1 molekulmass on 143,5 kDa, $\Delta 29$ Mip1 – 139,8 kDa).



M – hüdrofoobsed aminohapped (M, L, I, V, W, F, Y, A, C)

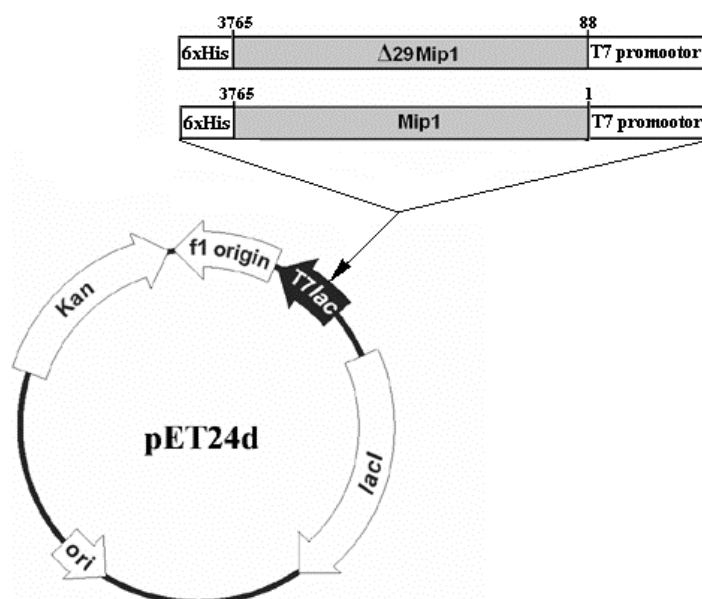
K – aluselised aminohapped (R, H, K)

D – happelised aminohapped (D, E)

Joonis 9. Mip1 valgu N terminus. Vertikaalse noolega on tähistatud oletatava mitokondrisse lokalisatsiooni signaalita Mip1 valgu N-terminuse algus $\Delta 29$ Mip1 ekspressioonikonstruktid.

4.2.2. Ekspressioonikonstruktide valmistamine

pET24d Mip1 ja $\Delta 29$ Mip1 konstruktid (Joonis 10) olid valmistatud nagu kirjeldatud peatükis 3.5. pET24d vektori polülinkerisse kloneeritud MIP1 on bakteriofaag T7 RNA polümeraasi promootori kontrolli all. Transkriptsioonil sünteesitakse MIP1 mRNA koos C-terminaalse 6×His epitoobiga, mille omadust seonduda Ni^{2+} katiooniga kasutatakse Mip1 valgu puhastamisel kogu rakulüsaadist Ni-NTA agaroosiga.



Joonis 10. Mip1 ja $\Delta 29$ Mip1 ekspressioonikonstruktid.

4.3. Rekombinantse Mip1 valgu ekspressioon

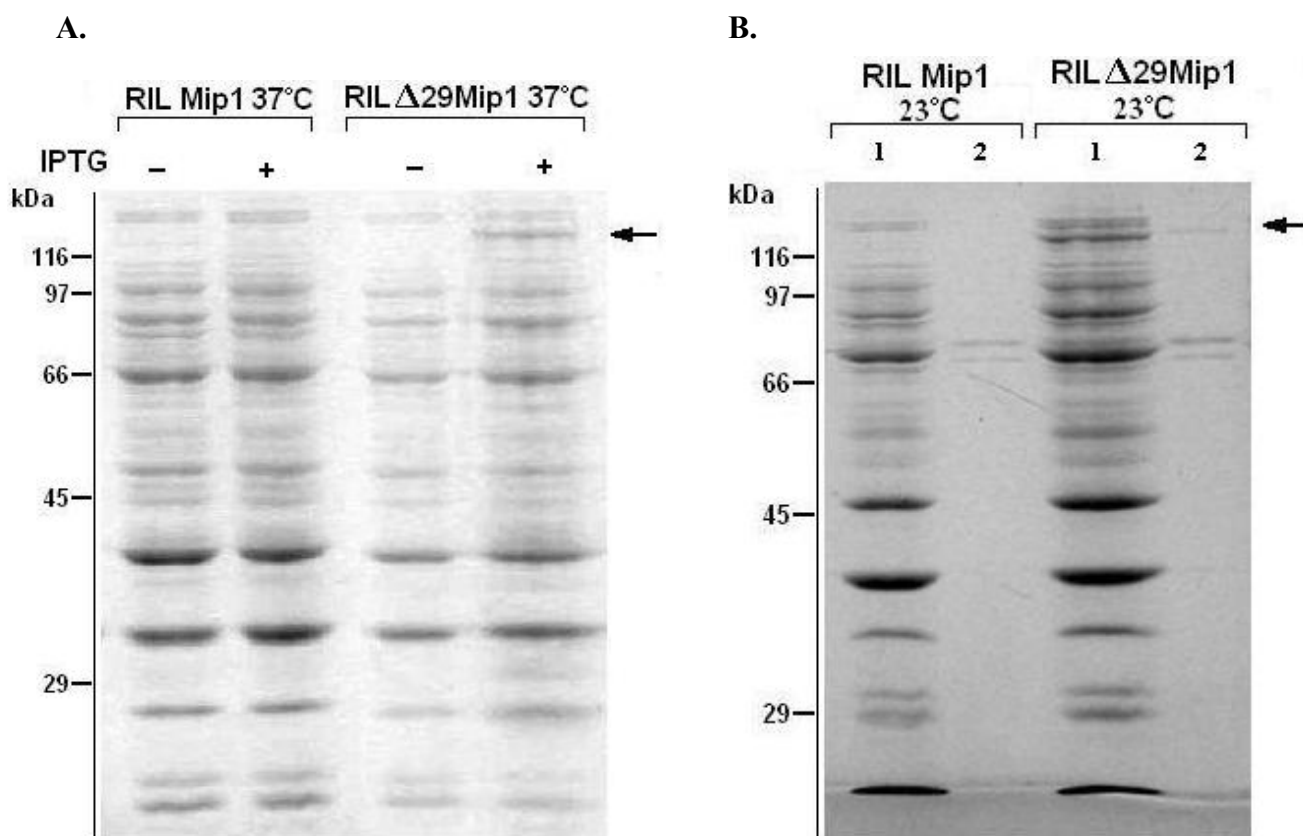
4.3.1. Optimaalsete tingimuste valik rekombinantse Mip1 ekspressiooniks

Enne rekombinantse Mip1 puhastamist oli vaja välja selgitada optimaalsed ekspressioonitingimused. Muudeti järgmiseid parameetreid:

- tüvi [BL21, RIL või RP]
- konstrukti [Mip1 või $\Delta 29$ Mip1]
- indutseerimistemperatuur [37°C , 30°C või 23°C]
- indutseerimiseks kasutatava IPTG kontsentratsioon [0,1; 0,2; 0,5 või 1mM]
- indutseerimise aeg [2h, 4h, 8h või 16h]
- kultuuri tihedus indutseerimise hetkel [$\text{OD}_{600}=0,2$; 0,4; 0,8; 1,2 või 1,6]

Optimaalse tüve, konstrukti ja indutseerimistemperatuuri välja selgitamiseks transformeeriti BL21, RIL ja RP tüved Mip1 ja $\Delta 29$ Mip1 konstruktidega nii, et saadi 6 erineva kombinatsiooniga ekspressioonitüve (BL21 Mip1, BL21 $\Delta 29$ Mip1, RIL Mip1, RIL $\Delta 29$ Mip1, RP Mip1 ja RP $\Delta 29$ Mip1). Saadud tüvedes indutseeriti Mip1 ekspressioon kolmel erineval temperatuuril (37°C , 30°C või 23°C) 0,5mM IPTG-ga kultuuri tihedusel $\text{OD}_{600}=0,3$ 8 tunni jooksul. Mip1 valgu ekspressiooni analüüsimiseks võrreldi indutseerimata proove indutseeritud proovidega (Joonis 11 A). Indutseeritud kultuuri lüsaate puhastati väikeses mahus Ni-NTA maatriksiga ning jälgiti Mip1 olemasolu eluaatides (Joonis 11 B).

Mip1 valgu ekspressiooni induktsiooni täheldati ainult RIL $\Delta 29$ Mip1 ning RP $\Delta 29$ Mip1 tüvedes kõikidel testitud temperatuuridel (Tabel 5). Täispikk konstrukti ei ekspresseerunud üldse, mistõttu võib järeldada, et mitokondrisse lokaliseerimise signaali eemaldamine Mip1 N-terminusest on ekspressiooniks hädavajalik. Samuti on oluline ka koodonvaeguse kompenseerimine tRNA-de lisakooptide näol, kuna BL21 tüves ei ekspresseerunud ükski konstrukti.



Joonis 11. A. Indutseeritud ja indutseerimata proovide võrdlus Coomassie brilliant sinisega värvitud SDS-PAAG-il. Vastavate proovide rakulüsaadid kanti radadele ning võrreldi omavahel. Vasakul on valgu molekulmassi marker, noolega on tähistatud Mip1 asukoht geelil. **B.** Indutseeritud proovide rakulüsaat (1) ja Ni-NTA maatriksi eluaat (2). Joonistel on ainult näiteks toodud mõne katse proovid. Ülejäänud proovide analüüsiandmed on Tabelis 5.

Tabel 5. Tüve, konstrukti ja kasvatamistemperatuuri valik Mip1 rekombinantseks ekspresiooniks.

Kasvatamis- temperatuur	Tüvi	Konstrukt	
		pET24d Mip1	pET24d $\Delta 29$ Mip1
37°C	BL21(DE3)	-/- *	-/-
	BL21(DE3)-RIL	-/-	+/-
	BL21(DE3)-RP	-/-	+/-
30°C	BL21(DE3)	-/-	-/-
	BL21(DE3)-RIL	-/-	+/-
	BL21(DE3)-RP	-/-	+/-
23°C	BL21(DE3)	-/-	-/-
	BL21(DE3)-RIL	-/-	+/+
	BL21(DE3)-RP	-/-	+/+

* Esimene „+“ või „-“ märk näitab, kas vastava konstruktiga transformeeritud ning vastaval temperatuuril kasvatatud tüves ekspresseerus rekombinantne Mip1 või mitte. Teine märk näitab, kas Mip1 valk seondus Ni-NTA maatriksile või mitte.

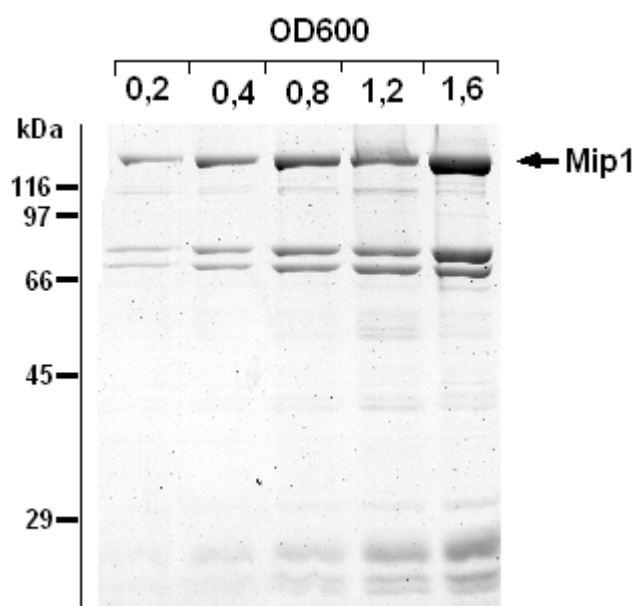
Ni-NTA maatriksiga oli võimaline seonduma ainult 23°C juures kasvatatud RIL $\Delta 29$ Mip1 ja RP $\Delta 29$ Mip1 tüvedest pärit Mip1 valg. Arvatavasti pakitakse kõrgematel temperatuuridel kasvatatud rakkudes ekspresseeritav Mip1 inklusioonkehadesse, vähendades nii tsütoplasmas lahustuva Mip1 hulka, mis on võimaline seonduma Ni-NTA maatriksiga.

Kui tüvi, konstrukt ja indutseerimistemperatuur olid välja valitud, optimeeriti teisi Mip1 ekspressiooni indutseerimise tingimusi. Uuritigi Mip1 valgu ekspressiooni RIL $\Delta 29$ Mip1 tüves varieerides IPTG kontsentratsiooni ning indutseerimise aega. $\Delta 29$ Mip1 ekspressiooni testiti erinevatel IPTG kontsentratsioonidel: 0,1mM, 0,2mM, 0,5mM ja 1mM. Et BL21(DE3) tüvedes on rekombinantset valku transkribeeriv T7 RNA polümeraas lekkiva lacUV5 promootori all, siis sünteesiti RIL $\Delta 29$ Mip1 tüves rekombinantset Mip1 väga vähesel määral ka ilma IPTG-ta, kuid selle lisamine tõstis tunduvalt ekspresseeritava Mip1 hulka. 0,5mM IPTG kontsentratsioon oli piisav Mip1 ekspressiooni maksimaalseks indutseerimiseks.

Indutseerimise aega varieeriti 2, 4, 8 ja 16 tunni vahel ning jälgiti $\Delta 29$ Mip1 hulka Ni-NTA eluaatides. Indutseerimise optimaalseks kestvuseks osutus 4h. Kui indutseeriti 8h, siis oli nähtav väike Mip1 hulga vähenemine ning 16h induktsooniaja puhul oli Mip1 Ni-NTA eluaadist peaaegu kadunud. Nende tulemuste kohaselt otsustati kasutada suuremahulise kasvatamise jaoks 4h pikkust induktsooniaega.

Viimasena optimeeriti RIL $\Delta 29$ Mip1 kultuuri tihedust enne indutseerimist. Kultuuri indutseeriti tihedusetel $OD_{600}=0,2$; 0,4; 0,8; 1,2 ja 1,6 0,5mM IPTG-ga 4 tunni jooksul ning vastavad Ni-NTA väikemahulise puhastamise eluaadid on ära toodud Joonisel 12. Eksperimendi eesmärgiks oli jälgida kui kõrgele saab minna kultuuri tihedusega nii, et Mip1 ekspressioon ei langeks. Nagu tulemusest näha ei mõjunud kultuuri tiheduse tõstmine Mip1 ekspressioonile negatiivselt ning kõige rohkem Mip1 saadi $OD_{600}=1,6$ kultuuri kasutades.

Joonis 12. Mip1 ekspressiooni induktsoon erinevatel kultuuri tihedustel. RIL $\Delta 29$ Mip1 kultuur indutseeriti erinevatel $OD_{600}=0,2$; 0,4; 0,8; 1,2 ja 1,6. Pildil on Coomassie brilliant blue'ga värvitud SDS-PAAG koos erinevatel tihedustel indutseeritud kultuuride Ni-NTA eluaatidega.



Kokkuvõtteks otsustati kirjeldatud Mip1 ekspressiooni tingimuste optimeerimiskatsete tulemustele toetudes kasutada Mip1 rekombinantseks ekspressiooniks *E. coli*'s BL21-CodonPlus(DE3)-RIL tüve ning pET24d $\Delta 29$ Mip1 konstrukti. Mip1 indutseerimist otsustati läbi viia 23°C juures kultuuri optilisel tihedusel $OD_{600}=1,6$, IPTG lisada söötmele 0,5mM kontsentratsioonini ning indutseerimine lõpetada 4h möödumisel rakkude kogumisega tsentrifuugimise teel.

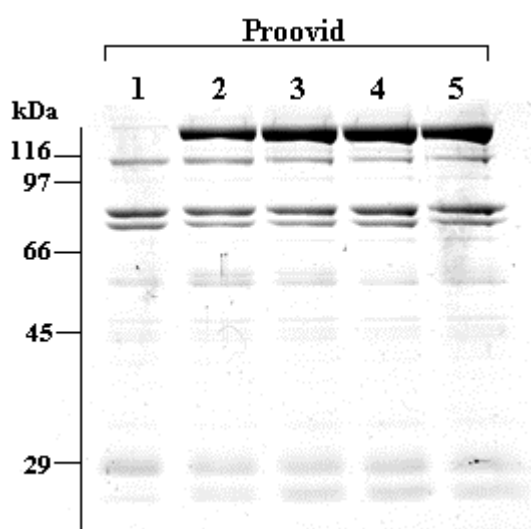
4.3.2. RIL $\Delta 29$ Mip1 tüve kasvatamine ning $\Delta 29$ Mip1 ekspressiooni induktsioon fermenteris

Suures mahus valgu puhastamiseks ekspresseeriti rekombinantset $\Delta 29$ Mip1 8l fermenterit kasutades nagu kirjeldatud peatükis 3.6.3. Pärast induktsiooni jälgiti rakkude kasvu ning Mip1 ekspressiooni võttes 10ml suuruseid proove. Proovide optilise tiheduse mõõtmine näitas, et bakteri kultuuri tihedus kasvas 2 tunni jooksul pärast indutseerimist ning siis hakkas vaikselt langema (Joonis 13 A). Ni-NTA maatriksi eluaadi järgi hinnati Mip1 ekspressiooni, mis tõusis üsna oluliselt esimese tunni jooksul pärast induktsiooni, suurenedes veidi teise tunni möödudes ning jäädes seejärel praktiliselt muutumatuks (Joonis 13 B).

A.

Proovi nr	indutseerimise aeg	OD_{600}
1	0h	1,76
2	1h	2,49
3	2h	2,87
4	3h	2,65
5	4h	2,39

B.

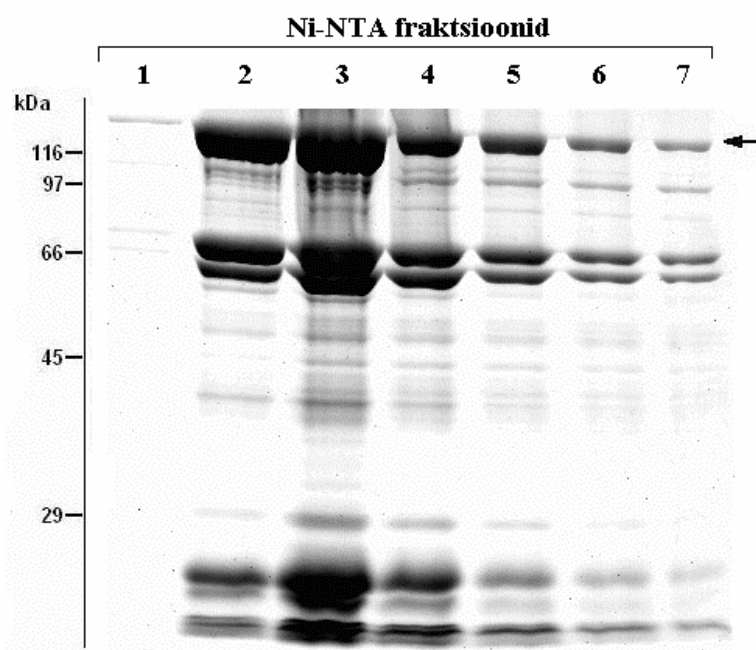


Joonis 13. Fermenteri kultuuri proovide analüüs. A. Proovide võtmise aeg alates induktsioonist IPTG-ga ning mõõdetud OD_{600} . B. Võetud proovide Ni-NTA eluaatid Coomassie brilliant sinisega värvitud SDS-PAAG-il.

4.4. Rekombinantse Mip1 valgu puhastamine

Indutseerimise lõppedes rakud koguti, pesti TBS puhvriga, lüüsi ning sonikeeriti nii nagu kirjeldatud peatükis 3.5.1. Saadud supernatant, mis sisaldas rakkude tsütoplasmas lahustunud valke, kanti Ni-NTA kolonnile. Puhastamiseks võeti pool fermenteris kasvatatud 8l kultuuri lüsaadist ning sellest puhastamiseks valitud Ni-NTA kolonni maht oli 3ml. Kolonni pesti erinevate puhvritega (vt 3.5.2) ning elueeriti 500mM imidasooli sisaldusega eluatsioonipuhvriga kogudes 12 fraktsiooni mahuga 750µl. Esimesed seitse fraktsiooni on kujutatud Joonisel 14. Nagu SDS-PAAG-ilt on näha, elueerub enamus valgust esimestes fraktsioonidest (2-4).

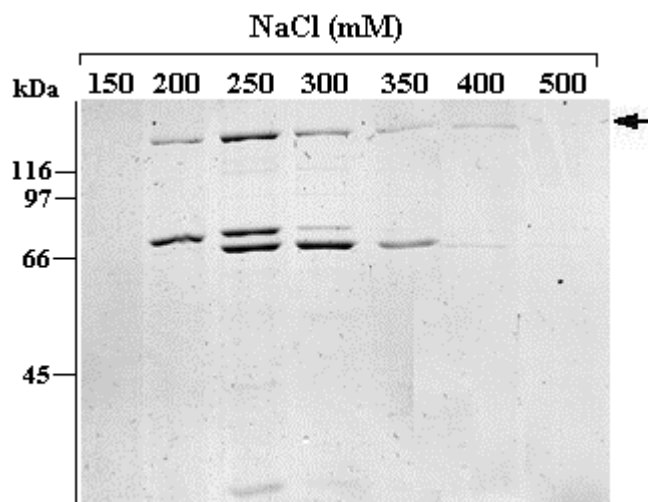
Joonis 14. Ni-NTA kolonnilt elueeritud esimesed 7 fraktsiooni 12-st. SDS-PAAG-ile on laetud 10µl igast fraktsioonist. Vasakul on valgu molekulmassi marker. Noolega on tähistatud Mip1 asukoht geelil.



Ni-NTA kolonni eluaadid sisaldasid peale Mip1 valgu ka üsna palju teisi valke (Joonis 14). Nende eraldamiseks otsustati proovida puhastada Ni-NTA eluaate ioonvahetuskolonnidega (Q- ja S-Sepharose) eemaldamaks Mip1-st erineva pinnalaenguga kontaminante.

Q-Sepharose ioonvahetuskolonnile kanti peale Ni-NTA kolonni fraktsioonid pärast seda, kui nad olid dialüüsitud 100mM NaCl-ga Q-puhvrissi, ning elueeriti 150mM, 200mM, 250mM, 300mM, 350mM, 400mM, 500mM, 600mM, 700mM ja 1M NaCl-ga Q-puhvritega (Joonis 15).

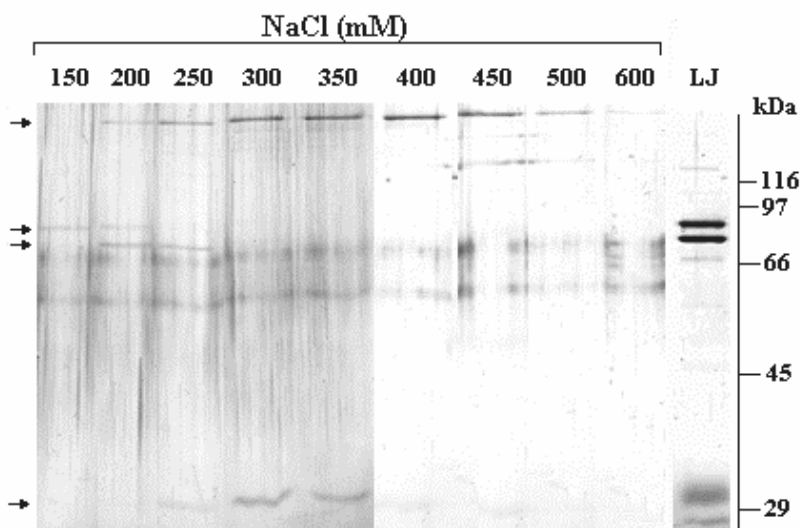
Joonis 15. Q-Sepharose kolonni fraktsioonid. Coomassie brilliant sinisega värvitud SDS-PAAG-il on lahutatud erineva NaCl sisaldusega puhvritega elueerunud fraktsioonid. Noolega on tähistatud Mip1 asukoht.



Mip1 seondus nendes tingimustes Q-Sepharose maatriksile, kuna pärast Ni-NTA eluaadi pealekandmist kogutud läbijooks ei sisaldanud praktiliselt üldse Mip1 valku. Nii Mip1 kui ka kaks suuremat kontaminanti (molekulmass vahemikus 60-70 kDa) elueerusid kõige paremini 250mM NaCl kontsentratsiooniga Q-puhvriga, mistõttu selget lahutuvust Mip1 ja ebaspetsiifiliselt seondunud valkude vahel ei täheldatud arvatavasti nende üsna sarnase negatiivse pinnalaengu tõttu ning Q-Sepharose kolonni otsustati puhastamiseks mitte kasutada.

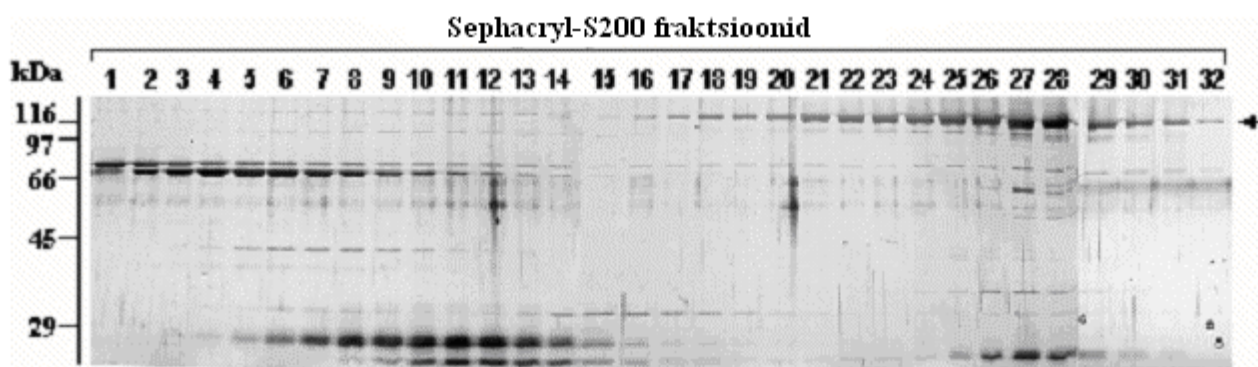
Järgnevalt prooviti peale kanda Ni-NTA kolonni eluaadid S-Sepharose kolonnile. Ni-NTA eluaatide puhver vahetati dialüüsi teel 100mM NaCl-ga S-puhvri vastu, kanti peale S-Sepharose kolonnile ning elueeriti erineva NaCl sisaldusega S-puhvritega (Joonis 16). Lahutuvus S-Sepharose kolonnil oli parem kui Q-Sepharose kolonnil, kuna enamus domineerivaid kontaminante ei seondunud S-Sepharose kolonniga erinevalt Mip1-st. Ja needki ebaspetsiifilised valgud, mis seondusid S-Sepharose maatriksiga elueerusid juba 150-250mM NaCl juures, samal ajal kui Mip1 eluatsiooni piik oli alles 400-450mM NaCl juures.

Joonis 16. S-Sepharose kolonni fraktsioonid. Hõbenitraadiga värvitud SDS-PAAG erineva NaCl kontsentratsiooniga puhvritega S-Sepharose kolonni eluaatidest. LJ – kolonni läbijooks peale valgu peale kandmist. Nooltega on tähistatud Mip1 asukoht ja domineerivate kontaminantide asukoht.



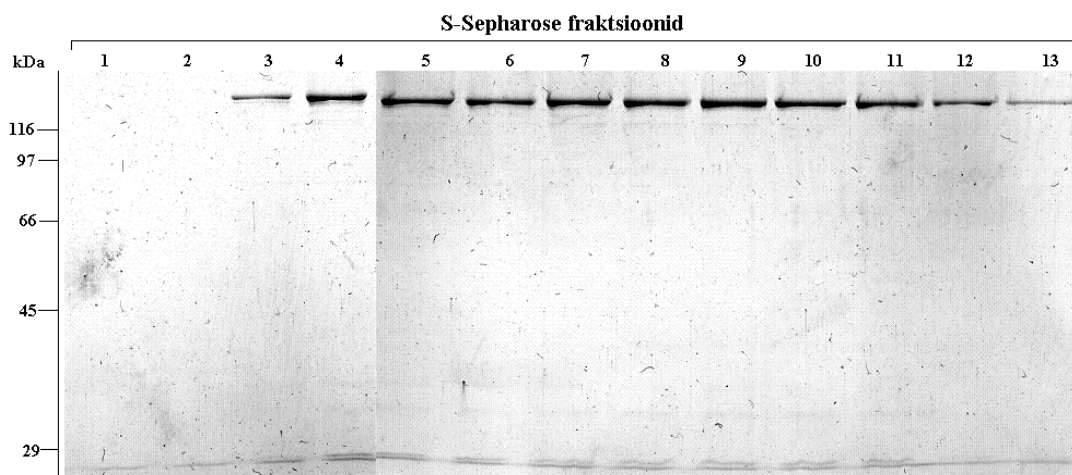
Kuigi S-Sepharose kolonni abil oli võimalik eemaldada mõned Ni-NTA eluaadi suuremad kontaminandid, elueerusid väiksema massiga (<40kDa) kontaminandid kolonnilt sama soola kontsentratsiooni juures nagu Mip1 (Joonis 16). Nende eemaldamiseks otsustati kasutada Sephacryl-S200 geelfiltratsiooni kolonni, mis on mõeldud 5-250 kDa valkude lahutamiseks suuruse järgi. Kuna nende väikeste valkude molekulmass erineb Mip1 omast üsna tugevalt, siis nende lahutumine geelfiltratsioonil peaks olema üsna hea.

Geelfiltratsiooni Sephacryl-S200 maatriksil tehti 110ml mahuga kolonnis. Sellisele kolonnile kanti peale 3,7ml Ni-NTA eluaati, mis on maksimaalne soovitatud proovi peale kandmise kogus sellise ruumalaga geelfiltratsiooni kolonni jaoks, ning voolutati S-puhvriga. Pärast 1/3 kolonni mahust (35ml) kogumist ühte fraktsiooni, jätkati fraktsioonide kogumist 2ml kaupa. Fraktsioone analüüsiti SDS-PAAG-il (Joonis 17).



Joonis 17. Sephacryl-S200 geelfiltratsiooni fraktsioonide hõbenitraadiga värvitud SDS-PAAG analüüs.

Geelfiltratsioon osutuski üsna efektiivseks Ni-NTA eluaatides sisalduvate valkude lahutamisel. Tema ainukeseks puuduseks oli valgu lahjenemine kromatograafia käigus. Kui pealekantava Mip1 lahuse maht oli 3,75ml, siis pärast geelfiltratsiooni oli Mip1 sisaldavate fraktsioonide maht peaaegu 10 korda suurem. Selle probleemi lahendamiseks otsustati kontsentreerida Mip1 S-Sepharose kolonnil, mis peale selle võiks eemaldada ka mõned alles jäänud kontaminandid. Mip1 sisaldavad geelfiltratsiooni fraktsioonid (kogu maht 30-40ml) kanti 2ml S-Sepharose kolonnile. Alguses voolutati kolonni 100mM NaCl-ga ja 250mM NaCl-ga S-Sepharose puhvritega maatriksiga seostunud kontaminantide elueerimiseks. Seejärel elueeriti Mip1 kolonnilt 500mM NaCl-ga S-Sepharose puhvriga kogudes fraktsioone (Joonis 18).

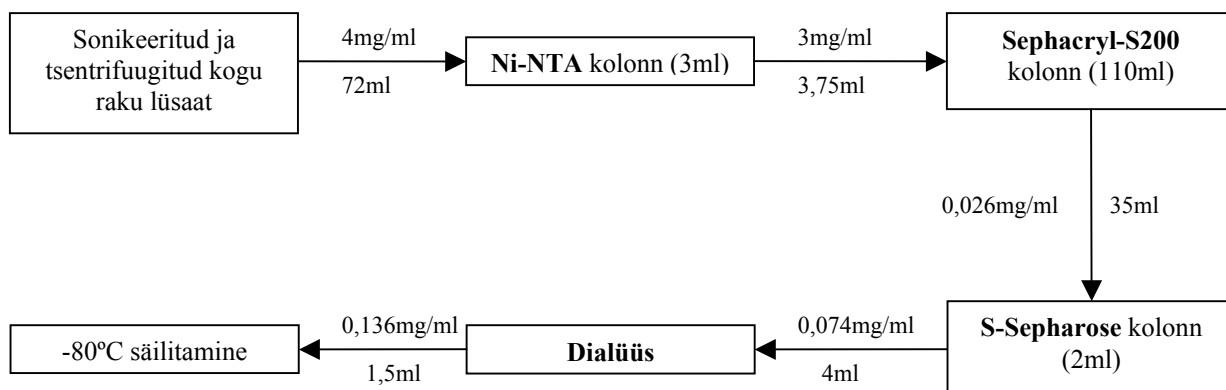


Joonis 18. S-Sepharose kolonni fraktsioonide analüüs. 500mM NaCl-ga S-Sepharose puhvriga kolonnilt elueeritud fraktsioonid analüüsiti SDS-PAAG-il. Pildil olev geel on värvitud Coomassie brilliant sinisega.

Geelfiltratsioonile järgneva S-Sepharose kolonniga kontsentreeriti Mip1 lahust umbes 10 korda. Saadud fraktsioonid tõsteti kokku ning dialüüsiti 100mM NaCl ning 50% glütserooliga S-puhvri vastu. NaCl kontsentratsiooni otsustati langetada, et kõrge soola kontsentratsioon ei mõjutaks Mip1 aktiivsust, kuna *in vitro* katsed Mip1-ga näitasid tema aktiivsuse langust üle 150mM soola kontsentratsiooni juures (Eriksson *et al.*, 1995). Et Mip1 puhul on varem täheldatud üsna suur kuumatundlikkus ja ebastabiilsus (Biswas *et al.*, 1995; Germaniuk *et al.*, 2002), siis otsustati teda säilitada 50% glütserooli lahuses -80°C juures. Dialüüsil kasutati <12-14 kDa molekule läbilaskvat membraani, mis võimaldas vähendada vastava molekulmassiga kontaminantide hulka Mip1 preparaates. Dialüüsil kontsentreerus valgu lahus umbes 2 korda ning lõpuks saadi ligikaudu 1,5ml Mip1 valgu lahust.

Arvestades läbiviidud puhastamiskatsete tulemusi töötati välja lõplik rekombinantse Mip1 valgu puhastamise meetod *E. coli* bakterist (Skeem 1). Lüüsitud ja sonikeeritud bakterirakud tsentrifuugiti lahustumatutest rakukomponentide eemaldamiseks. Saadud supernatant kanti Ni-NTA afiinsuskolonnile, kuhu rekombinantne Mip1 seondus tänu oma C-termnaalsele 6×His epitoobile. Ni-NTA kolonni eluaat kanti Sephacryl-S200 geelfiltratsiooni kolonnile massi järgi lahutamiseks. Geelfiltratsioonkromatograafia käigus lahjenenud Mip1 kontsentreeriti S-Sepharose kationivahetaja kolonnile ning -80°C juures säilitamiseks dialüüsiti Mip1 50%-lise glütseroolisisaldusega puhvrissi.

Sellist puhastamisskeemi kasutades saadi üsna puhas Mip1 valk, mille puhtus võiks olla S-Sepharose kolonni fraktsioonide analüüsi järgi SDS-PAAG-il otsustades 90-95% (Joonis 18).



Skeem 1. Rekombinantse $\Delta 29$ Mip1 puhastamine *E. coli*'st. Kolonnide taga on sulgudes ära märgitud nende maht. Noolte juures olevad numbrid tähistavad ühest puhastamisetapist järgmisesse üle kantud Mip1 lahuse ruumala ning kontsentratsiooni.

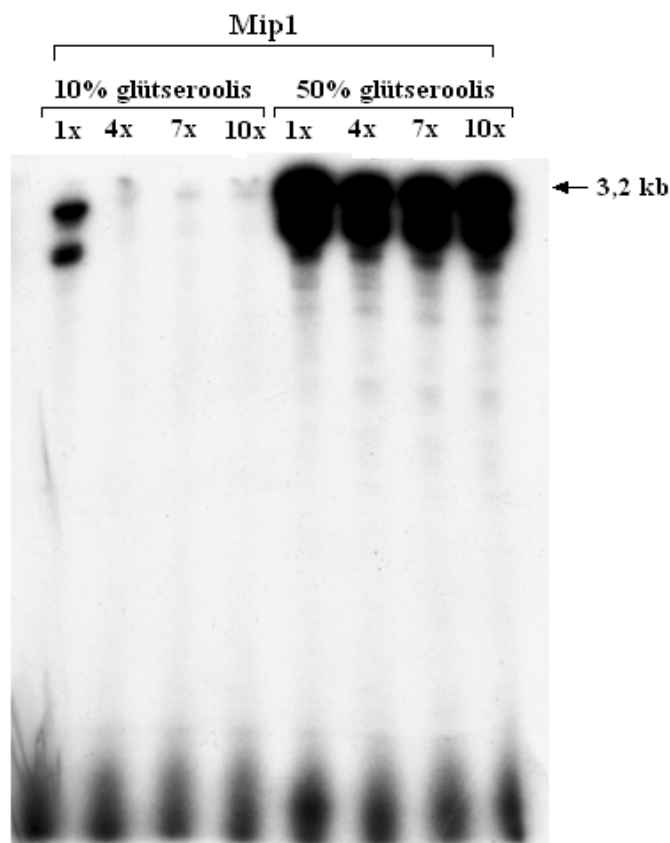
4l fermenteris kasvatatud kultuurist puhastati seda skeemi kasutades 204 μ g rekombinantset Mip1. Bradfordini meetodiga mõõdetud Mip1 lõppkontsentratsioon dialüüsitud preparaates oli 0,14 μ g/ μ l, arvastades Mip1 140kDa suurust 0,97pmol/ μ l.

4.5. Rekombinantse Mip1 valgu ensümaatilise aktiivsuse mõõtmine

E. coli'st puhastatud rekombinantne Mip1 oli aktiivne kõigil kasutatud substraatidel, milleks olid M13/USP, pUC119/USP ja 45/25 (ükskikahelaline matriits/praimer).

Mip1 pidas hästi vastu säilitamisele 50%-lises glütseroolilahuses -80°C juures ning isegi pärast 10 ülessulatamis-taaskülmutamis tsüklit jäi tema aktiivsus samale tasemele (Joonis 19). 10%-lises glütserooli lahuses kaotas aga Mip1 enamuse oma aktiivsusest juba esimese läbikülmutamistsükli järel.

Joonis 19. Mip1 polümeraasne aktiivsus pUC119/USP substraadil. Kõrvuti on 10%-lises ja 50%-lises glütserooli lahuses Mip1 aktiivsus pärast 1 $\times$, 4 $\times$, 7 $\times$ ja 10 $\times$ vedelas lämmastikus läbikülmutamist ja jääl ülessulatamist. DNA sünteesi reaktsioonil kasutati [α -³²P]dCTP. Produktid lahutati 10%AA/bis - 6M urea - 1 $\times$ TBE geelis. Joonisel on autoradiograafia filmi pilt.



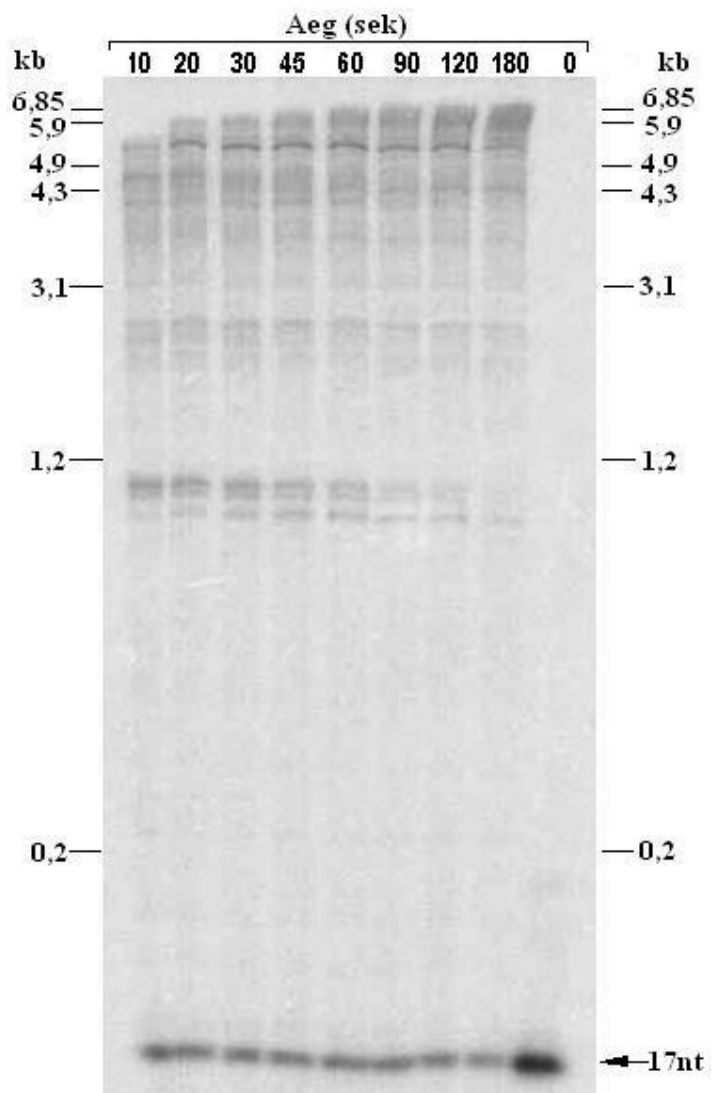
4.5.1. Mip1 polümeraasne aktiivsus M13/USP substraadil

Mip1 katalüüsitud polümerisatsioonireaktsiooni kiiruse hindamiseks mõõdeti tema aktiivsust üksikahelalisest tsirkulaarsest M13mp18 DNA-st ja sinna hübridiseeritud $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ -ga märgistatud 17nt USP praimerist koosneval substraadil. Substraadi ja Mip1 lõppkontsentratsioon reaktsioonisegus oli vastavalt 0,8nM ja 10nM. DNA sünteesireaktsioon alustati 5min jääl inkubeeritud DNA-substraat/Mip1 segule samas mahus dNTP/MgCl₂ segu lisamisega. Reaktsioon peatati 10sek-3min pikkuste ajavahemike järel. Saadud proovid analüüsiti denatureerival PAAG-il (Joonis 20).

Geelil on peale täispikka (7249 nt) lõpp-produkti näha ka üsna palju lühemaid vaheprodukte. Vaheproduktide pikkus jäi samaks kõikides katsetes M13mp18/USP substraadiga. Juhul kui Mip1 dissotsiatsiooni tõenäosus (P_d) oleks sõltumatu tema positsioonist DNA-l, siis peaks eeltoodud katse tulemuseks olema ühtlane produktide „redel“, kusjuures DNA hulk kahaneks sujuvalt lühemast produktist pikema suunas. Akumuleeruma peaks ainult lõpp-produkt.

Teatud pikkusega vaheühendite akumulereerumine viitab asjaolule, et nendes positsioonides sisaldab M13 DNA Mip1-le raskesti läbitavaid kohti. Võimalik et nendeks on M13 DNA-l moodustunud sekundaarstruktuurid, mis põhjustavad Mip1 eelistatud dissotsiatsiooni DNA ahela nendes positsioonides. M13 DNA sekundaarstruktuuride uuringud nendes positsioonides ning vastavad DNA sünteesi terminatsiooni tõenäosused nendes on uurimisel.

Joonis 20. DNA süntees Mip1 poolt. Substraadiks on radioaktiivselt märgistatud USP, mis on hübridiseeritud üksikahelalise M13mp18 DNA-le. Reaktsiooniproduktid analüüsiti denatureeriva PAAG abil. Noolega on märgistatud pikendamata jäänud 17 nt pikkuse USP asukoht. Kõrval on märgitud DNA molekulmassi markeri asukoht. Joonisel on PhosphorImager abil saadud pilt.



Arvestades kõrget ensüüm/substraat suhet vähenes lühemate vaheproduktide hulk reaktsiooni käigus, ilmselt läbi Mip1 taasseondumise nendele poolikult pikendatud vaheproduktidele ning DNA sünteesi jätkamise. Et kirjeldatud katse polnud teostatud *single-turnover* tingimustes, kus kord DNA pealt dissotsieerunud Mip1 ei saa uuritava DNA-ga enam seonduda, siis on Mip1 protsessiivsust selle järgi raske hinnata. Küll aga saab pikima vaheprodukti tekkimise järgi otsustada polümerisatsiooni reaktsiooni katalüütilise kiiruskonstandi väärtuse üle. Joonisel 20 on näha, et täispikk produkt ilmub ≈ 60 sekundi pärast. Juba 10 sekundi jooksul on aga tekkinud vaheprodukt pikkusega $\approx 5,5$ kb, mis annab polümerisatsioonireaktsiooni katalüütilise konstandi (k_{pol}) hinnanguks $5500/10=550 \text{ s}^{-1}$. Tegemist on siisli k_{pol} miinimumhinnanguga ja seda järgmistel põhjustel:

- i. produkt ei pruukinud tekkida ühe protsessiivse tsükli tulemusena
- ii. DNA-l esineb mitmeid Mip1 jaoks raskesti läbitavaid positsioone
- iii. kuigi 10 sekundit ei ole veel piisav kogu täispika tsükli läbimiseks, jääb see ajavahemik ilmselt välja katalüüsi lineaarsest faasist (20 sekundi jooksul tekkinud 6 kb produkt annab k_{pol} hinnanguks ainult 300 s^{-1}).

4.5.2. Mip1 polümeraasne aktiivsus 45/25 substraadil

Mip1 aktiivsust mõõdeti ka kahest oligonukleotiidist koosneval 45/25 substraadil, millest matriitsina oli kasutatud 45nt pikkust ning praimerina 25nt pikkust oligonukleotiidi:

5' GCCTCGCAGC CGTCCAACCA ACTCA 3'
3' CGGAGCGTCG GCAGGTTGGT TGAGTTGGAG CTAGGTTACG GCAGG 5'

Sellise substraadi kasutamine võimaldas tõsta DNA-substraat/Mip1 suhet piisavalt kõrgele, nii et praktiliselt kogu Mip1 oleks DNA-ga seotud. Katsed viidi läbi 200nM 45/25 substraadi ja 25nM Mip1 juuresolekul. Arvestades Johnson *et al.*, 2000 poolt mõõdetud $K_D(\text{DNA})$ inimese Pol γ jaoks ($\sim 10\text{nM}$) ning ka Foury *et al.*, 2004 poolt määratud näilist $K_D(\text{DNA})$ Mip1 jaoks ($\sim 0,2\text{nM}$) peaks sellistes tingimustes olema substraadiga seotud vähemalt 95% Mip1-st.

Ensüümi protsessiivsus (P_r) on seotud tema dissotsiatsiooni tõenäosusega DNA-lt (P_d) vastavalt seosele

$$P_r = -1 / \ln(1-P_d),$$

mis lihtsustub kujule

$$P_r = 1/P_d, \text{ kui } P_d \ll 1.$$

Et P_d on antud suhtena

$$P_d = k_{\text{off}} / (k_{\text{off}} + k_{\text{pol}}),$$

siis on protsessiivsuse arvuline väärtus leitav suhtest

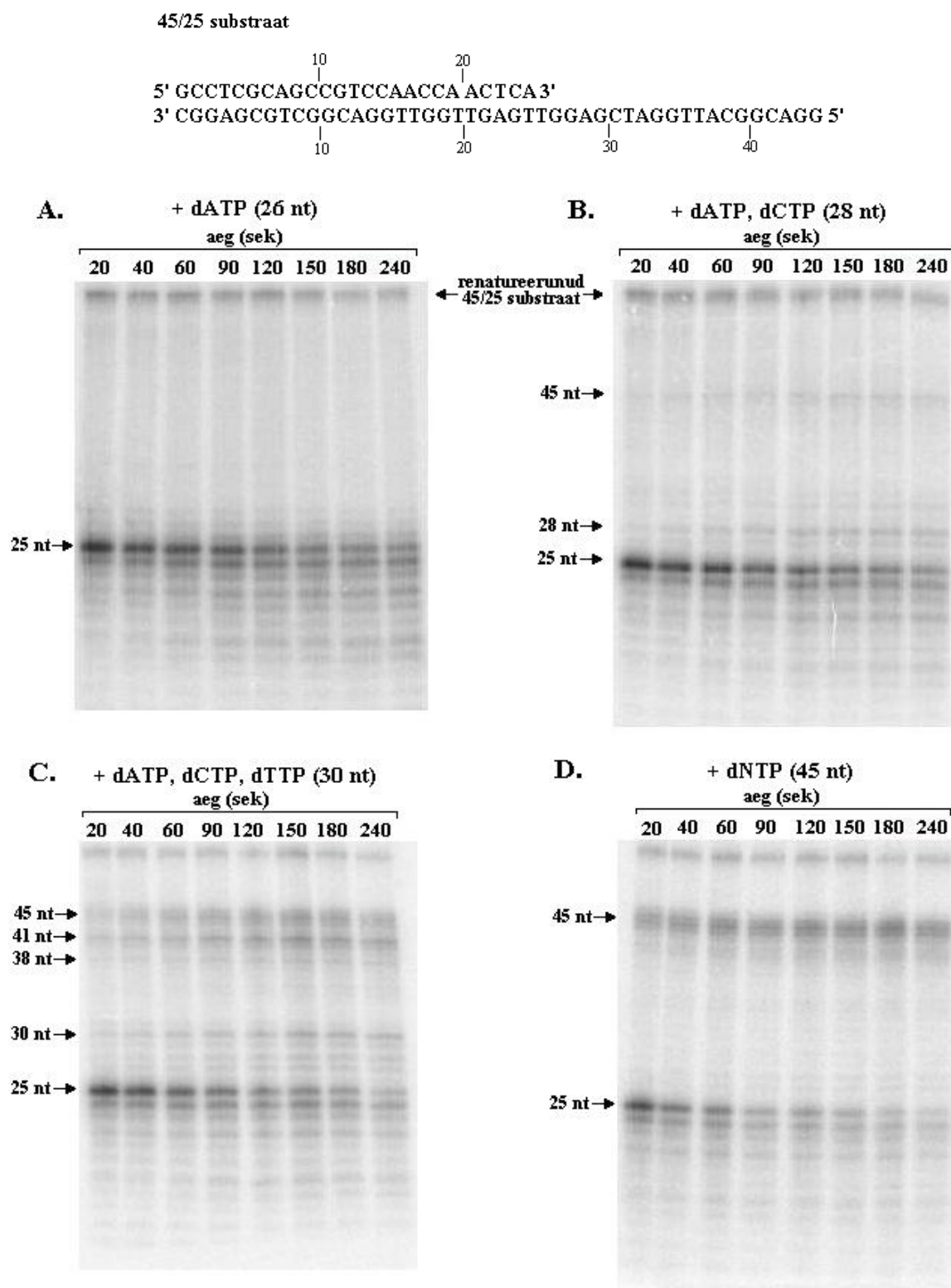
$$P_r = k_{\text{pol}} / k_{\text{off}}$$

(on ilmne, et protsessiivsete ensüümide puhul on $k_{\text{off}} \ll k_{\text{pol}}$ ja $k_{\text{off}} + k_{\text{pol}} \approx k_{\text{pol}}$).

Et k_{pol} hinnang Mip1 jaoks oli leitud eelnevas katses M13/USP substraadiga ($k_{\text{pol}}=550 \text{ s}^{-1}$) siis oleks Mip1 protsessiivsuse hindamiseks vaja teada tema DNA-lt dissotsieerumise kiiruskonstanti – k_{off} . Selle eksperimentaalseks määramiseks valiti ühe nukleotiidi sisselülitamise katse 45/25 substraadil. Lisades reaktsioonisegule ühte dNTP-d saaks tagada ainult ühe nukleotiidi sisselülitamist ning 26nt pikkuse produkti tekke järgi saaks hinnata Mip1 k_{off} väärtust. Et protsessiivse polümeraasi $k_{\text{off}} \ll k_{\text{pol}}$, siis on 26nt pikkuse produkti tekkimine statsionaarses faasis määratud k_{off} poolt, sest sellistes tingimustes jääb Mip1 DNA-lt dissotsieerumine kogu reaktsiooni limiteerivaks astmeks. Üheks oluliseks eeltingimuseks vastava katse jaoks on ka 3'→5' eksonukleaasse aktiivsuse väike osakaal polümeraasse aktiivsusega võrrelduna.

Ühe nukleotiidi sisselülitamise katse tulemus oli aga oodatust hoopiski erinev (Joonis 21 A). 26nt pikkuse produkti hulk oli väga väike ning jäi ajas suhteliselt muutumatuks. 25nt pikkuse substraadi hulk vähenes ühtlaselt ning eksonukleaasse reaktsiooni produktide hulk ajas suurenes, mis tähendab seda, et vastavates tingimustes on Mip1 eksonukleasne aktiivsus tunduvalt suurem polümeraasest aktiivsusest.

Järgnevalt testiti Mip1 aktiivsust 45/25 substraadil 2 ja 3 nukleotiidi juuresolekul (Joonis 21 B ja C). Mip1 eksonukleasne aktiivsuse osakaal jäi nendes tingimustes veidi väiksemaks kuid siiski märkimisväärsele tasemele. Kuigi täheldati oodatud lõpp-produktide (vastavalt 28nt ja 30nt) mõningast akumulereerumist esines (eriti dATP, dCTP, dTTP katses, Joonis 21 C) üsna olulisel määral ka oodatust pikemaidprodukte. Viimaste pikkus oli heas kooskõlas nukleotiidide järjestusega 45nt substraadis. Reaktsioonides akumulereerusid eelistatult need produktid, millele oli vaja järgmisena lülitada puudu olevat nukleotiidi (vt Joonis 21 B ja 45/25 substraadi järjestust). Saadud tulemuse kohaselt lülitab Mip1 antud tingimustes üsna suure tõenäosusega õigete nukleotiidide puudumisel DNA ahelasse sisse ka valesid nukleotiide.

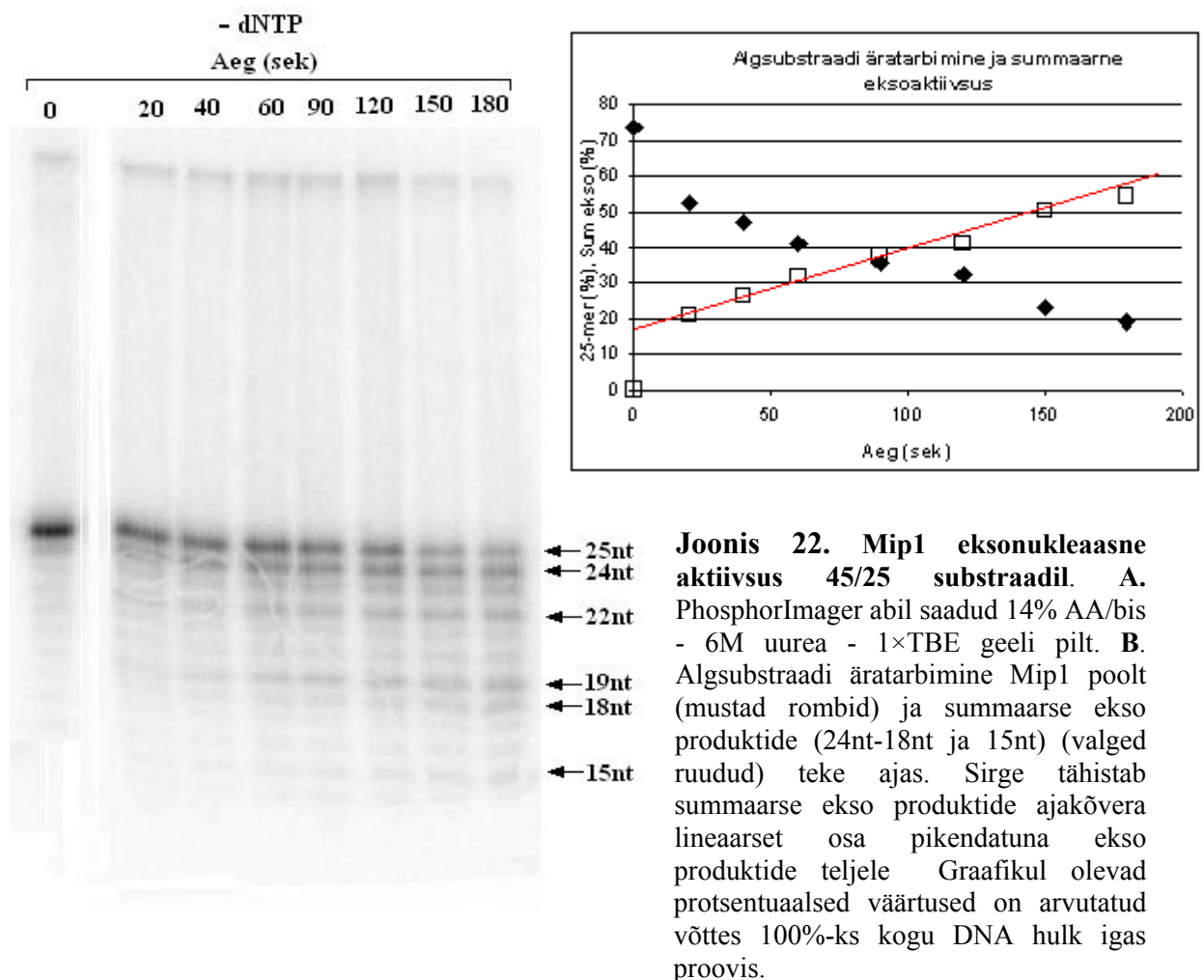


Joonis 21. Mip1 aktiivsus 45/25 substraadil. A. ühe, B. kahe, C. kolme ja D. nelja nukleotiidi juuresolekul. Reaktsioon peatati näidatud aja möödudes ning tekkinud produktid lahutati 14%AA/bis - 6M urea - 1×TBE geelil. Sulgudes olev nt arv tähistab sellistes tingimustes oodatud lõpp-produkti pikkust.

Kõikide nukleotiidide juuresolekul on Mip1 polümeraasne aktiivsus üsna suur ning juba esimese 1,5 minutiga kasutab ta ära enamuse 45/25 substraadist elongeerides ka eksonukleaasse aktiivsuse poolt lühendatudprodukte, sest neid jääb ajas vähemaks (Joonis 21 D).

Mip1 eksonukleaasse aktiivsuse mõõtmiseks viidi läbi katse 200nM 45/25 substraadiga ja 25nM Mip1 jättes lisamata dNTP ning käivitades reaktsiooni $MgCl_2$ lisamisega.

Geelil on näha eksonukleaasse reaktsiooni produktide (ekso produktide) osakaalu suurenemist ajas (Joonis 22 A), kusjuures on täheldatav teatud pikkustega ekso produktide (24nt, 22nt, 19nt, 18nt ja 15nt) akumulereerumine võrreldes teistega. Akumuleeruvaidprodukte iseloomustab 3' terminaalne C nukleotiid. Teistel ekso produktidel on 3' terminuses A või T nukleotiidid. Selle tulemuse järgi eemaldab Mip1 eksonukleaasne aktiivsus A-T paarist nukleotiidi kiiremini kui G-C paarist.



Algprodukti (25nt) ja Mip1 eksonukleasse aktiivsuse produktide (24nt-18nt +15nt) hulk kvantiteeriti PhosphorImager abil. Kompenseerimaks proovi geelile kandmisest tulenevaid erinevusi ajapunktide vahel avaldati tulemused konkreetse produkti suhtelise hulga kaudu (% kogu DNA-st). Jooniselt 22 B on näha, et algsubstraadi äratarbimine ja summaarne ekso produktide (24nt-18nt ja 15nt) teke ajas on lineaarne. Siiski ei lõika ajakõvera lineaarne osa pikendamisel ekso produktide teljele viimast koordinaatide alguspunktis või substraadi teljele substraadi alghulga väärtuse juures (73%) vaid jääb nendest väärtustest vastavalt kas kõrgemale või madalamale. Selline algselt „hüppeline” produkti moodustumine ajas on iseloomulik mitmeastmelistele reaktsioonidele juhul, kui vaadeldav produkt tekib enne kogureaktsiooni kiirust limiteerivat etappi. Juhul, kui vaadeldava produkti teke on kiirust limiteerivast etapist oluliselt kiirem ja ensüüm on substraadiga küllastunud peaks ajakõvera lineaarne osa lõikama produkti telge väärtusel, mis võrdub summaarse ensüümi kontsentratsiooniga (E_0). Summaarse ekso produktide kõvera lineaarse osa pikendamine produktide teljele annab aga väärtuse 18,3%. Arvestades 200nM substraadi algkontsentratsiooni annab see E_0 väärtuseks

$$E_0 = 200\text{nM} * 18,3\% / 100\% = 37\text{nM}.$$

Nn „hüppekineetika” ilmnemine viitab asjaolule, et eeltoodud katses on kiirust piiravaks etapiks Mip1 dissotsieerumine DNA-lt (k_{off}) mitte tema eksonukleasne aktiivsus. Nii substraadi kadumise kui summaarse ekso produktide tekke kiirus lineaarses faasis on leitav vastava sirge tõusust, mis oli 0,2 %/s ehk

$$t_{\text{õus}} = 0,2 \text{ \%/s} * 200\text{nM} / 100\% = 0,4\text{nM/s}$$

Eeldades, et kogu Mip1 oli DNA-ga kompleksis saame k_{off} hinnanguks

$$k_{\text{off}} = 0,4\text{nM/s} / 25\text{nM} = 0,016 \text{ s}^{-1}.$$

5. ARUTELU

Käesoleva töö esimeses osas töötati välja rekombinantse *S. cerevisiae* mitokondriaalse DNA polümeraasi, Mip1, ekspresseerimise ja puhastamise meetodika bakterist *E. coli*.

Vältimaks mutatsioone, mis võivad tekkida pikkade geenide ülesamplifitseerimisel, kasutati ekspressioonikonstruktide valmistamisel Mip1 genoomset kloon. Et Mip1 N-terminuses asuv mitokondrisse transportimise signaaljärjestus võib põhjustada valgu valet pakkumist ning agregeerumist, siis otsustati kloneerida ka ilma signaaljärjestuseta $\Delta 29$ Mip1 konstrukt.

Rekombinantse Mip1 valgu ekspressiooniks kasutati pET ekspressioonisüsteemi, kus Mip1 ekspresseeritakse pET24d vektorilt T7 RNA polümeraasi promootori alt lisades talle transkriptsiooni käigus 3' otsa 6×His epitoopi kodeerivat järjestust. 6×His epitoobi C-terminaalne asukoht oli valitud eelkõige selleks, et vältida lõpuni sünteesimata jäänud Mip1 valgu Ni-NTA maatriksi külge sidumist, mis oleks võimalik N-terminaalse epitoobi puhul.

Rekombinantse Mip1 ekspressiooniks kasutati kolme erinevat *E. coli* tüve: BL21(DE3), BL21-CodonPlus(DE3)-RIL ja BL21-CodonPlus(DE3)-RP. Valik nendele tüvedele langes peamiselt seetõttu, et nad on laialdaselt kasutatavad tüved valkude kõrgetasemeliseks ekspressiooniks kasutades T7 RNA polümeraasil põhinevat süsteemi ning nende tüvede kasutamisel on edukalt ekspresseeritud ka suuri *S. cerevisiae* valke nagu näiteks Rpo41 (153 kDa) (Matsunaga *et al.*, 2004). *E. coli* BL21(DE3) tüvedel puudub Lon proteaas ja OmpT välismembraani proteaas, mis vähendab ekspresseeritava valgu lagundamist puhastamisel.

Geenide ekspressioon rekombinantsetes allikates on tihtipeale raskendatud geeni päritolu organismi ja ekspressiooniks kasutatava organismi erineva koodonkasutuse tõttu. Et käesoleva töö raames ekspresseeriti eukarüootse *S. cerevisiae* valku Mip1 prokarüootses organismis – *E. coli*'s, siis oli koodonkasutusest tingitud koodonvaeguse probleemide esilekerkimine küllaltki tõenäoline (Tabel 6).

Selle probleemi lahendamiseks kasutati CodonPlus tüvesid. RIL tüvi sisaldab *argU*, *ileY* ja *leuW* tRNA geenide lisakoopiaid pACYC plasmiidil, mis tunnevad ära vastavalt

koodoneid AGA/AGG, AUA ja CUA ning see tüvi on sobilik eelkõige AT rikaste geenide ekspressiooniks. RP tüvi sisaldab *argU* ja *proL* tRNA geenide lisakooptiaid pACYC plasmiidil, mis tunnevad ära vastavalt koodoneid AGG/AGA ja CCC ning see tüvi on sobilik eelkõige GC rikaste geenide ekspressiooniks. MIP1 GC sisaldus on 41% ning päris AT rikaste geenide hulka teda lugeda ei saa, kuid nagu tulemused näitasid ekspresseerus Mip1 valk RIL tüves veidi paremini kui RP tüves.

Tabel 6. *S. cerevisiae* ja *E. coli* koodonkasutus*

Organism	AGG arginiin	AGA arginiin	CUA leutsiin	AUA isoleutsiin	CCC proliin
<i>E. coli</i>	1,2	2,1	3,9	4,4	5,5
<i>S. cerevisiae</i>	9,3	21,3	13,4	17,8	6,8

* Tabelis on ära toodud nende koodonite kasutuse võrdlus pärmis ja bakteris, mille tRNA lisakooptiaid sisaldasid BL21(DE3)-CodonPlus-RIL ja RP tüved (www.kazusa.or.jp/codon).

Mip1 ei ekspresseerunud üldse BL21 tüves. Küll aga ekspresseerus Mip1 mõlemas kasutatud CodonPlus tüves ja seda kõikidel uuritud temperatuuridel (23°C, 30°C, 37°C). Ni-NTA maatriksiga seondus aga ainult 23°C juures kasvatatud rakkudest pärit Mip1. Kuidas avaldab kasvatamistemperatuuri alandamine mõju rekombinantse Mip1 ekspressioonile pole täpselt teada, kuid paremat ekspressiooni madalamatel temperatuuridel on täheldatud ka teiste valkude puhul.

Katsete tulemused näitasid, et ainult mitokondrisse transportimise signaaljärjestuseta Mip1 konstrukti oli võimeline ekspresseeruma ning seonduma Ni-NTA maatriksiga. Täispika Mip1 puhul ei täheldatud ekspressiooni üldse, sõltumata tüvest ja kasvatamistemperatuurist.

Katseliselt määratud optimaalsetes tingimustes oli ekspresseeritava Mip1 hulk siiski üsna tagasihoidlik. Selle võimalikuks põhjuseks võib pidada rekombinantse Mip1 valgu suurust. Enamus *E. coli* endogeensetest valkudest on sellest väiksemad. Samuti on üsna tõenäoline rekombinantse Mip1 toksiline mõju teda ekspresseeritavatele bakterirakkudele.

Mip1 puhastati rakulüsaadist 6×His epitoobi abil Ni-NTA kolonnile sidudes. Ni-NTA eluaat sisaldas aga peale Mip1 üsna suurel määral ka kontamineerivaid valke. Nende eemaldamiseks osutus parimaks Sephacryl-S200 geelfiltratsiooni kolonn. Mip1 ja osade teiste valkude elueerumine sellelt ei vastanud massi järgi lahutamisel oodatule. Enamus

kontaminante väljusid juba pärast 1/3 kolonni mahu puhvriga elueerides ning tundusid geeli pildi järgi olevat lahutatud massi järgi. Mip1 väljus aga tagapool, alates 2/3 kolonni mahu puhvri läbivoolutamisel. Sellise käitumise põhjuseks võib olla Mip1 spetsiifiline interaktsioon kolonni maatriksiga. Mip1 elueerus kolonnilt ühe väiksema (<25 kDa) valguga koos nii, et nende eluatsiooni piigid ühtisid. See väike kontaminant on arvatavasti Mip1-ga üsna tugevalt seotud kompleksis ning temast ei õnnestunud puhastamise käigus lahti saada.

Geelfiltratsioonil lahjenenud Mip1 valgu proov kontsentreeriti S-Sepharose ioonvahetajal ning dialüüsiiti 50%-lise glütserooli sisaldusega puhvrissi ja säilitati -80°C juures. Eksperimentaalselt näidati, et valgu proovi 10× ülessulatamine ja taas külmutamine ei avaldanud Mip1 aktiivsusele märgatavat mõju ning ensüümi oli võimalik sellisel kujul hästi säilitada ja kasutada.

Sellist puhastamisskeemi kasutades saadi 4l bakterikultuurist 204µg Mip1 valku, mille lõppkontsentratsioon oli 0,15µg/µl (1pmol/µl).

Mip1 on eelnevalt puhastatud mitmete uurimisgruppide poolt nii *S. cerevisiae* mitokondritest (Lucas *et al*, 2004; Biswas *et al.*, 1995) kui ka Mip1 üleekspresseeriva *S. cerevisiae* tüve rakulüsaadist (Eriksson *et al*, 1995) (Tabel 7). Rekombinantsel kujul *E. coli*'st puhastati Mip1 esmakordselt käesoleva töö raames.

Tabel 7. Võrdlus teiste uurimisgruppide poolt läbiviidud Mip1 puhastamistega

Mip1 puhastamine	Lucas <i>et al</i> , 2004	Biswas <i>et al.</i> , 1995	Eriksson <i>et al</i> , 1995	Käesolev töö
allikas	endogeenne	endogeenne	üleekspressioon pärmis	rekombinantne
organism	<i>S. cerevisiae</i> BY4742 tüvi	<i>S. cerevisiae</i> D273/10B tüvi	pYES2.0 plasmiidil MIP1 lisakooptiga <i>S. cerevisiae</i> tüvi	pET24d plasmiidil MIP1 geeniga <i>E. coli</i> BL21(DE3)-RIL tüvi
puhastamiseks kasutatud materjal	eraldatud mitokondrite lüsaat	eraldatud mitokondrite lüsaat	rakulüsaat	rakulüsaat
puhastamisetappid	mitok.-te eraldamine + 6 kolonni	mitok.-te eraldamine + 3 kolonni + glütserooligradient	4 kolonni	3 kolonni
saagis (µg valku l kultuuri kohta)	0,7	0,8	7	51

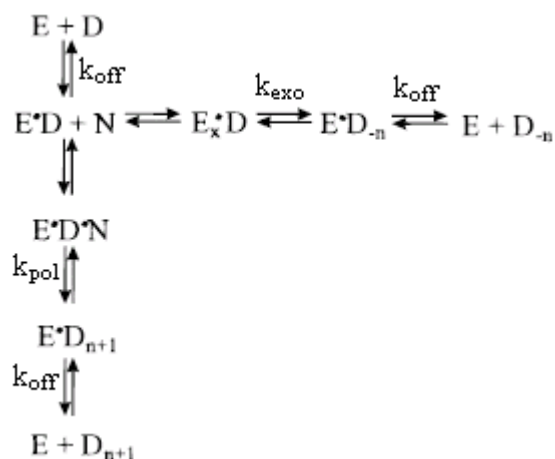
Rekombinantse valgu puhastamise peamiseks eeliseks endogeenest allikast puhastamise ees on eelkõige tunduvalt suurem valgu saagis. 1l bakterikultuuri kohta saadi käesolevas töös puhastamisel 51µg rekombinantset Mip1. Selline saagis on võrreldav ka

teiste meie laboris puhastatud *S. cerevisiae* mitokondriaalse DNA metabolismi valkudega. Näiteks mitokondriaalse DNA helikaasi, Hmi1, puhastamisel saadi keskmiselt 35-50µg valku 11 kultuuri kohta (Kuusk *et al*, 2005). Puhastamisviiside võrdlusest on näha, et Mip1 puhastamise viisidest on kõige väiksema saagisega *S. cerevisiae* mitokondritest isoleerimine (Tabel 7). Üleekspressioon *S. cerevisiae*'s on sellega võrreldes tunduvalt efektiivsem (~10× suurem saagis), kuid jääb siiski Mip1 rekombinantsele puhastamisele alla (~7,5× väiksem saagis). Arvestada tuleks ka puhastamisprotsessi keerukust ja ajakulu. *S. cerevisiae* rakkudest on Mip1 puhastamine raskendatud endogeensete proteaaside suure aktiivsuse tõttu ja seega on Mip1 lagundamise vältimiseks vaja kasutada tervet rida proteaaside inhibiitoreid. Pärmi mitokondritest Mip1 isoleerimine nõuab ka eelnevat mitokondrite eraldamist rakkudest. Samuti erineb Mip1 puhastamiseks tehtavate etappide arv. Käesolevas töös puhastati Mip1 kasutades 3 kolonnkromatograafia etappi, Lucas ja kolleegid kasutasid oma töös aga 6 kromatograafiaetappi.

Kokkuvõtteks annab rekombinantse Mip1 valgu puhastamine endogeensega võrreldes mitmeid märkimisväärsed eeliseid, millest tähtsamateks on protseduuri lihtsus, väikem ajakulu ning tunduvalt suurem saagis.

Käesoleva töö teises osas iseloomustati Mip1 ensümaatilisi aktiivsusi. Joonisel 23 on toodud Graves *et al.*, 1998 poolt välja pakutud 3'→5' eksonukleaasset aktiivsust omava DNA polümeraasi lihtsustatud reaktsiooniskeem.

Mip1 oli aktiivne kõigil kasutatud ssDNA/praimer substraatidel (pUC119/USP, M13/USP, 45/25). Mip1 DNA sünteesimise kiiruse määramiseks kasutati M13/USP, mis on substraatidest pikim ning võimaldas anda minimaalse hinnangu Mip1 DNA sünteesi kiiruskonstandile (k_{pol}). Juba 10 sekundi möödudes oli näha 5500 nt produkti, mis annab k_{pol} hinnanguks 550 s^{-1} (Joonis 20). Ei saa siiski välistada, et Mip1 DNA polümeriseerimise kiirust M13/USP substraadil takistasid ensüümi dissotsiatsiooni



Joonis 23. 3'→5' eksonukleaasset aktiivsust omava DNA polümeraasi lihtsustatud reaktsiooniskeem. E – ensüüm, D – DNA substraat, N – dNTP substraat, k_{pol} – polümerisatsiooni reaktsiooni kiiruskonstant, k_{exo} – eksonukleasse reaktsiooni kiiruskonstant, k_{off} – DNA-lt dissotsieerumise kiiruskonstant (Graves *et al.*, 1998).

põhjustavad raskesti läbitavad sekundaarstruktuurid, mille olemasolule M13 DNA-l viitab reaktsiooni täispikast produktist lühemate vaheproduktide akumulatsioon. Mistõttu ei pruukinud reaktsiooni produkt tekkida ühe protsessiivse tsükli tulemusena. Seda arvestades on $550 \text{ s}^{-1} k_{\text{pol}}$ minimaalseks hinnanguks. Arvestades polümerisatsiooni-reaktsiooni suurt kiirust ei ole paraku k_{pol} täpne määramine võimalik ilma eriaparatuuri (*quenched flow instrument*) kasutamata.

DNA sünteesimise kiirus 550 nt/s on võrreldav teiste replikatiivsete polümeraasidega seal hulgas ka Mip1 bakteriofaagse homoloogi T7 DNA polümeraasiga ($k_{\text{pol}}=300 \text{ s}^{-1}$) (Wong *et al.*, 1991). Mip1 inimese homoloogi DNA sünteesimise kiirus jääb aga sellele suuresti alla ($k_{\text{pol}}=50 \text{ s}^{-1}$) (Johnson *et al.*, 2000).

Mip1 eksonukleaase aktiivsuse katses 45/25 substraadiga täheldati ekso produktide lineaarset moodustumist ajas (Joonis 22). Ekso produktide moodustumine vastavalt „hüppekineetikale” lubab oletada, et selles reaktsioonis on kiirust limiteerivaks etapiks Mip1 dissotsieerumine DNA-lt mitte eksonukleaase reaktsiooni kiirus ($k_{\text{off}} \ll k_{\text{exo}}$). Eeltoodust lähtuvalt leiti Mip1 k_{off} väärtust ($k_{\text{off}} = 0,016 \text{ s}^{-1}$) ning aktiivse ensüümi kontsentratsiooniks (E_0) hinnati 37 nM . Kõrvalekalle teoreetilisest väärtusest (25 nM) võib olla tingitud vigadest ensüümi kontsentratsiooni määramisel Bradfordini meetodiga, ensüümi pipeteerimisel või mingil muul põhjusel.

Saadud k_{off} ja k_{pol} hinnangud lubavad anda hinnangu ka Mip1 protsessiivsuse kohta. Kuna protsessiivsus (P_r) on antud suhtena $P_r = k_{\text{pol}}/k_{\text{off}}$ võib Mip1 protsessiivsus olla hinnanguliselt ≈ 35000 . Selline protsessiivsus on võrreldav replikatiivsete tuuma polümeraaside omaga. Inimese Poly protsessiivsus (≈ 2250) on aga sellest tunduvalt väiksem (Johnson *et al.*, 2000). Mip1 protsessiivsusele pole varem arvulist hinnangut antud, küll aga on Mip1 protsessiivsust varasemate uurijate poolt hinnatud üsna kõrgeks (Eriksson *et al.*, 1995).

Mip1 kõrge protsessiivsus on märkimisväärne veel selle poolest, et Mip1 funktsioneerib monomeerina. Tuumas polümeraasid kasutavad kõrge protsessiivsuse tagamiseks abifaktoreid nn „libisevaid klambreid” (*sliding clamps*). Ka inimese mitokondriaalse Poly protsessiivsus ≈ 2250 on saavutatud vaid kompleksis abifaktoriga, katalüütilise subühiku protsessiivsus on kõigest ≈ 116 (Graves *et al.*, 1998).

Muidugi saadud Mip1 protsessiivsuse hinnang on ainult esialgsete ensümaatilise aktiivsuse katsete tulemus ning vajab veel kinnitamist. Et aga *S. cerevisiae* rakud jagunevad tunduvalt kiiremini ($\geq 1,5 \text{ h}$) kui inimese rakud ($\geq 24 \text{ h}$) ning *S. cerevisiae* mtDNA

on inimese omast ligi 5 korda pikem, siis tundub loogiline, et pärm vajab oma mtDNA sünteesimiseks tunduvalt kiiremat ja protsessiivsemat ensüümi.

45/25 substraadil läbiviidud Mip1 aktiivsuse mõõtmised näitasid ka, et Mip1-l on üsna tugev eksonukleaasne aktiivsus, mille osakaal on polümeraasest aktiivsusest isegi suurem juhul, kui viimane on mingi nukleotiidi puudumise tõttu takistatud (Joonis 21). Ühe nukleotiidi sisselülitamise katse tingimustes tekkinud polümeraasse reaktsiooni produktide hulk on tühine ekso produktidega võrreldes. Kõikide nukleotiidide juuresolekul jääb aga eksonukleaasse aktiivsuse osakaal polümeraasse aktiivsusega võrreldes tagaplaanile. On võimalik, et Mip1 vajab pikemat praimerit DNA sünteesimise reaktsiooni alustamiseks. Katses kolme nukleotiidi juuresolekul (Joonis 22 C) on näha, et 30 nt pikusele produktile eelneb väiksemate produktide redel, mis on arvatavasti tekkinud 25 nt algsubstraadi elongeermise järel käivitunud eksonukleaassel reaktsioonil. Samas 38 nt pikkusele produktile sellist redelit ei eelne.

45/25 substraadil mõõdetud Mip1 polümeraasele aktiivsusele osutus olevat iseloomulik ka valede nukleotiidide sisselülitamine õigete nukleotiidide puudumisel. Arvestada tuleks siiski katse tingimustes kasutatud kõrget dNTP kontsentratsiooni (250µM). *S. cerevisiae* rakus on dNTP kontsentratsioon hinnanguliselt ≈5µM ning inimese mitokondris võiks see olla ≈20µM (Zhao *et al.*, 1998; Rampazzo *et al.*, 2003). Seega reaktsioonil kasutatud dNTP kontsentratsioon on mitokondri tegelikust dNTP kontsentratsioonist tunduvalt suurem. Teiste uurijate poolt on näidatud, et valede nukleotiidide sisselülitamise tõenäosus sõltub suuresti nukleotiidide kontsentratsioonist (Tabel 3) (Vanderstraeten *et al.*, 1998) ning seega *in vivo* tingimustes ei pruugi DNA süntees Mip1 poolt olla nii ebatäpne ja vigaderohke, kui käesoleva töö *in vitro* katsete tulemused näitavad.

Eksonukleaasse aktiivsuse katses täheldati ka seda, et Mip1 eksonukleaasne aktiivsus eemaldab A/T paarist nukleotiide tunduvalt kiiremini kui G/C paarist (Joonis 22). Nii domineerisid teatud ekso produktid teiste üle. Mip1 eksonukleaasse aktiivsuse selline käitumine võib olla põhjendatud sellega, et A/T aluspaari nt vahel on 2 vesiniksidet ja G/C aluspaari nt vahel aga 3 vesiniksidet. Nii peaks kuluma Mip1-l G/C vaheliste sidemete lõhkumiseks rohkem energiat kui A/T vaheliste sidemete puhul.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö raames töötati välja eksperimentaalne skeem rekombinantse *S. cerevisiae* mitokondriaalse polümeraasi, Mip1, ekspresseerimiseks ning puhastamiseks *E. coli* bakterist. Rekombinantse Mip1 ekspresseerimiseks kasutati bakteriaalset pET süsteemi. Ekspresseerimiseks oli konstrueeritud pET24d Δ 29Mip1 konstrukt, kuhu kloneeritud MIP1 geenil puudus 29 N-terminaalset aminohapet kodeeriv järjestus (oletatav mitokondrisse transportimise signaaljärjestus). Mip1 ekspresseeriti BL21(DE3)-CodonPlus-RIL tüves, mis sisaldab *argU*, *ileY* ja *leuW* tRNA geenide lisakopioide koodonvaeguse kompenseerimiseks. Mip1 ekspressiooni indutseeriti bakteri kultuuri tihedusel $OD_{600}=1,6$ 0,5mM IPTG-ga. Indutseerimist viidi läbi 23°C juures 4h jooksul.

Mip1 puhastati *E. coli* rakulüsaadist sidudes teda C-terminaalse 6×His epitoobi abil Ni-NTA agaroozi kandjale. Seejärel lahutati Ni-NTA kolonnilt elueerunud valgud Sephacryl-S200 geelfiltratsioonil saades selle abil lahti enamusest ebaspetsiifiliselt Ni-NTA-ga seostunud valkudest. Järgnevalt kontsentreeriti geelfiltratsiooni eluaat S-Sepharose kolonnil. Selliselt puhastatud Mip1 dialüüsiiti 50% glütserooliga puhvrise ning säilitati -80°C juures.

1l fermenteris kasvatatud kultuurist puhastati kirjeldatud metoodikat kasutades 51µg rekombinantset Mip1. Bradfordi meetodiga mõõdetud Mip1 lõppkontsentratsioon dialüüsitud preparaates oli 0,14µg/µl, arvestades Mip1 140kDa suurust 0,97pmol/µl.

Töö teises osas iseloomustati puhastatud rekombinantse Mip1 aktiivsust erinevatel ssDNA/praimer substraatidel. Mip1 polümerisatsioonireaktsiooni kiiruskonstandi (k_{pol}) miinimumhinnanguks võib lugeda 550 s⁻¹. Mip1 DNA-lt dissotsiatsioonikonstandi (k_{off}) hinnanguliseks väärtuseks saadi aga 0,016 s⁻¹. Nende parameetrite järgi võib Mip1 protsessiivsuseks hinnata ≈ 35000 ($P_r=k_{pol}/k_{off}$), mis on Mip1 monomeerset kompositsiooni arvestades märkimisväärselt kõrge.

Saadud esialgsed Mip1 biokeemilise analüüsi tulemused vajavad aga veel kinnitust ning edasine Mip1 kineetiline iseloomustamine on järgnevate uuringute eesmärgiks.

SUMMARY

In the present study the experimental scheme for expression and purification of a recombinant protein, the mitochondrial DNA polymerase Mip1 from *S. cerevisiae*, was developed using the *E. coli* pET expression system.

For expression of recombinant Mip1, a pET24d Δ 29Mip1 construct was developed. This contained a MIP1 gene copy lacking the region encoding the 29 N-terminal amino acids of the protein (putative mitochondrial localisation signal). Mip1 was expressed in a BL21-CodonPlus(DE3)-RIL host strain containing extra copies of *argU*, *ileY* and *leuW* tRNA genes, which most frequently limit translation of heterologous proteins in *E. coli*. Expression of Mip1 was induced at culture OD₆₀₀=1,6 adding 0,5mM IPTG. Induced cells were grown for 4 hours at 23°C.

Recombinant Mip1 was purified from whole cell lysate of *E. coli* by the use of Ni-NTA agarose beads binding C-terminally 6×His tagged Mip1. Proteins from Ni-NTA column eluates were separated according to their size by Sephacryl-S200 gel filtration and Mip1 containing fractions were then concentrated by S-Sepharose ion exchange chromatography. Purified Mip1 was dialysed against 50% glycerol containing buffer and stored at -80°C.

Using this expression and purification scheme, 51µg of recombinant Mip1 were obtained from 1l of bacterial culture. The final concentration of recombinant Mip1 in dialysed preparation was 0,14µg/µl (0,97pmol/µl).

In the second part of this study enzymatic activities of purified recombinant Mip1 were tested using different ssDNA/primer substrates. The calculated minimal value of the Mip1 polymerization constant (k_{pol}) was 550 s⁻¹. The approximate value of the Mip1 DNA dissociation constant (k_{off}) was found to be 0,016 s⁻¹. According to these experimentally determined catalytic constants the approximate value for the processivity of the polymerase Mip1 equals to ≈ 35000 ($Pr=k_{pol}/k_{off}$), which is remarkably high considering the monomeric composition of Mip1. Further characterization of the enzyme kinetics should be performed to verify the initially obtained enzymatic characteristics of Mip1.

KASUTATUD KIRJANDUS

Baldacci G, Cherif-Zahar B, Bernardi G.

The initiation of DNA replication in the mitochondrial genome of yeast. *EMBO J.* 1984 Sep;3(9):2115-20.

Bernad A, Blanco L, Lazaro JM, Martin G, Salas M.

A conserved 3'----5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell.* 1989 Oct 6;59(1):219-28.

Bernardi G.

Organization and evolution of the mitochondrial genome of yeast. *J Mol Evol.* 1976 Dec 31;9(1):25-35.

Biswas TK, Sengupta P, Green R, Hakim P, Biswas B, Sen S.

Properties of mitochondrial DNA polymerase in mitochondrial DNA synthesis in yeast. *Acta Biochim Pol.* 1995;42(3):317-24.

Blanc H, Dujon B.

Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA responsible for suppressiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Jul;77(7):3942-6.

Blanco L, Bernad A, Salas M.

MIP1 DNA polymerase of *S. cerevisiae*: structural similarity with the *E. coli* DNA polymerase I-type enzymes. *Nucleic Acids Res.* 1991 Feb 25;19(4):955.

Bopenhagen D, Clayton DA.

Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell.* 1977 Aug;11(4):719-27.

Boldogh IR, Nowakowski DW, Yang HC, Chung H, Karmon S, Royes P, Pon.

A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol Biol Cell.* 2003 Nov;14(11):4618-27. Epub 2003 Sep 17.

Bradford MM.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

Braithwaite DK, Ito J.

Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 1993 Feb 25;21(4):787-802.

Brown WM, George M Jr, Wilson AC.

Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Apr;76(4):1967-71.

Carrodegua JA, Theis K, Bopenhagen DF, Kisker C.

Crystal structure and deletion analysis show that the accessory subunit of mammalian DNA polymerase gamma, Pol gamma B, functions as a homodimer. *Mol Cell.* 2001 Jan;7(1):43-54.

Chi NW, Kolodner RD.

The effect of DNA mismatches on the ATPase activity of MSH1, a protein in yeast mitochondria that recognizes DNA mismatches. *J Biol Chem.* 1994 Nov 25;269(47):29993-7.

- Claros MG, Vincens P.**
Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem.* 1996 Nov 1;241(3):779-86.
- Croteau DL, Stierum RH, Bohr VA.**
Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat Res.* 1999 Jul 30;434(3):137-48.
- Donahue SL, Corner BE, Bordone L, Campbell C.**
Mitochondrial DNA ligase function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 2001 Apr 1;29(7):1582-9.
- Doublie S, Tabor S, Long AM, Richardson CC, Ellenberger T.**
Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution. *Nature.* 1998 Jan 15;391(6664):251-8.
- Eriksson S, Xu B, Clayton DA.**
Efficient incorporation of anti-HIV deoxynucleotides by recombinant yeast mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem.* 1995 Aug 11;270(32):18929-34.
- Fangman WL, Dujon B.**
Yeast mitochondrial genomes consisting of only A.T base pairs replicate and exhibit suppressiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Nov; 81(22):7156-60.
- Fangman WL, Henly JW, Churchill G, Brewer BJ. 1989a.**
Stable maintenance of a 35-base-pair yeast mitochondrial genome. *Mol Cell Biol.* 1989 May;9(5):1917-21.
- Fangman WL, Henly JW, Brewer BJ. 1989b.**
RPO41-independent maintenance of [rho-] mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1990 Jan; 10(1):10-5.
- Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J.**
Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol.* 2003 Jan;88(1):41-56.
- Feinberg AP, Vogelstein B.**
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1983 Jul 1;132(1):6-13.
- Foury F.**
Cloning and sequencing of the nuclear gene MIP1 encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem.* 1989 Dec 5;264(34):20552-60.
- Foury F, Hu J, Vanderstraeten S.**
Mitochondrial DNA mutators. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Nov;61(22):2799-811.
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B.**
The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1998 440(3):325-31.
- Foury F, Vanderstraeten S.**
Yeast mitochondrial DNA mutators with deficient proofreading exonucleolytic activity. *EMBO J.* 1992 Jul;11(7):2717-26.
- Genga A, Bianchi L, Foury F.**
A nuclear mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in mitochondrial DNA replication and polymerase activity. *J Biol Chem.* 1986 Jul 15;261(20):9328-32.
- Germaniuk A, Liberek K, Marszalek J.**
A bichaperone (Hsp70-Hsp78) system restores mitochondrial DNA synthesis following thermal inactivation of Mip1p polymerase. *J Biol Chem.* 2002 Aug 2;277(31):27801-8. Epub 2002 May 21.

- Graves T, Dante M, Eisenhour L, Christianson TW.**
Precise mapping and characterization of the RNA primers of DNA replication for a yeast hypersuppressive petite by in vitro capping with guanylyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 1998 Mar 1; 26(5):1309-16.
- Graves SW, Johnson AA, Johnson KA.**
Expression, purification, and initial kinetic characterization of the large subunit of the human mitochondrial DNA polymerase. *Biochemistry.* 1998 Apr 28;37(17):6050-8.
- Greenleaf AL, Kelly JL, Lehman IR.**
Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986 May;83(10):3391-4.
- Grunstein M, Hogness DS.**
Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 Oct;72(10):3961-5.
- Hu JP, Vanderstraeten S, Foury F.**
Isolation and characterization of ten mutator alleles of the mitochondrial DNA polymerase-encoding MIP1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 1995 Jul 4;160(1):105-10.
- Insdorf NF, Bogenhagen DF.**
DNA polymerase gamma from *Xenopus laevis*. I. The identification of a high molecular weight catalytic subunit by a novel DNA polymerase photolabeling procedure. *J Biol Chem.* 1989 Dec 25;264(36):21491-7.
- Ito J, Braithwaite DK.**
Yeast mitochondrial DNA polymerase is related to the family A DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 1990 Nov 25;18(22):6716.
- Ito J, Braithwaite DK.**
Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Res.* 1991 Aug 11;19(15):4045-57.
- Johnson AA, Tsai Y, Graves SW, Johnson KA.**
Human mitochondrial DNA polymerase holoenzyme: reconstitution and characterization. *Biochemistry.* 2000 Feb 22;39(7):1702-8.
- Karlberg O, Canback B, Kurland CG, Andersson SG.**
The dual origin of the yeast mitochondrial proteome. *Yeast.* 2000 Sep 30;17(3):170-87. Supplementary material at <http://artedi.ebc.uu.se/cfg2000/>
- Kaufman BA, Newman SM, Hallberg RL, Slaughter CA, Perlman PS, Butow.**
In organello formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jul 5;97(14):7772-7.
- Kumar A, Cheung KH, Tosches N, Masiar P, Liu Y, Miller P, Snyder M.**
The TRIPLES database: a community resource for yeast molecular biology. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jan 1;30(1):73-5.
- Kuusk S, Sedman T, Joers P, Sedman J.**
Hml1p from *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is a structure-specific DNA helicase. *J Biol Chem.* 2005 Jul 1;280(26):24322-9. Epub 2005 Apr 25.
- Lahaye A, Stahl H, Thines-Sempoux D, Foury F.**
PIF1: a DNA helicase in yeast mitochondria. *EMBO J.* 1991 Apr;10(4):997-1007.
- Lascaris R, Bussemaker HJ, Boorsma A, Piper M, van der Spek H, Grivell L, Blom J.**
Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome Biol.* 2003;4(1):R3. Epub 2002 Dec 17.

- Lee CM, Sedman J, Neupert W, Stuart RA.**
The DNA helicase, Hmi1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. *J Biol Chem.* 1999 Jul 23;274(30):20937-42.
- Lecrenier N, Foury F.**
New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene.* 2000 Apr 4;246(1-2):37-48.
- Lecrenier N, Van Der Bruggen P, Foury F.**
Mitochondrial DNA polymerases from yeast to man: a new family of polymerases. *Gene.* 1997 Jan 31;185(1):147-52.
- Lim SE, Longley MJ, Copeland WC.**
The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase gamma enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance. *J Biol Chem.* 1999 Dec 31;274(53):38197-203.
- Lorimer HE, Brewer BJ, Fangman WL.**
A test of the transcription model for biased inheritance of yeast mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol.* 1995 Sep;15(9):4803-9.
- Lucas P, Lasserre JP, Plissonneau J, Castroviejo M.**
Absence of accessory subunit in the DNA polymerase gamma purified from yeast mitochondria. *Mitochondrion.* 2004 Jun;4(1):13-20.
- Luo N, Kaguni LS**
Mutations in the spacer region of *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase affect DNA binding, processivity, and the balance between Pol and Exo function. *J Biol Chem.* 2005 Jan 28;280(4):2491-7. Epub 2004 Nov 10.
- Maleszka R, Skelly PJ, Clark-Walker GD.**
Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *EMBO J.* 1991 Dec;10(12):3923-9.
- Matsunaga M, Jang SH, Jaehning JA.**
Expression and purification of wild type and mutant forms of the yeast mitochondrial core RNA polymerase, Rpo41. *Protein Expr Purif.* 2004 May;35(1):126-30
- Meeusen S, Nunnari J.**
Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *J Cell Biol.* 2003 Nov 10;163(3):503-10
- Miyakawa I, Sando N, Kawano S, Nakamura S, Kuroiwa T.**
Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci.* 1987 Nov;88 (Pt 4):431-9
- Morrissey JH.**
Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem.* 1981 Nov 1;117(2):307-10.
- Mott JL, Denniger G, Zullo SJ, Zassenhaus HP.**
Genomic structure of murine mitochondrial DNA polymerase-gamma. *DNA Cell Biol.* 2000 Oct;19(10):601-5.
- Ohlmeier S, Kastaniotis AJ, Hiltunen JK, Bergmann U.**
The yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth. *J Biol Chem.* 2004 Feb 6;279(6):3956-79. Epub 2003 Nov 3.
- Olson MW, Wang Y, Elder RH, Kaguni LS.**
Subunit structure of mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila* embryos. Physical and immunological studies. *J Biol Chem.* 1995 Dec 1;270(48):28932-7.

- Pflieger D, Le Caer JP, Lemaire C, Bernard BA, Dujardin G, Rossier J.**
Systematic identification of mitochondrial proteins by LC-MS/MS. *Anal Chem.* 2002 May 15;74(10):2400-6.
- Preiser PR, Wilson RJ, Moore PW, McCready S, Hajibagheri MA, Blight KJ, Strath M, Williamson DH.**
Recombination associated with replication of malarial mitochondrial DNA. *EMBO J.* 1996 Feb 1;15(3):684-93.
- Prokisch H, Scharfe C, Camp DG, Wenzhong X, David L, Andreoli C, Monroe ME, Moore RJ, Gritsenko MA, Kozany C, Hixson K, Mottaz HM, Zischka H, Ueffing M, Herman ZS, Davis RW, Meitinger T, Oefner PJ, Smith RD, Steinmetz LM.** Integrative Analysis of the Mitochondrial Proteome in Yeast *PLoS Biology*, Volume 2, Issue 6, June 2004
- Rampazzo C, Ferraro P, Pontarin G, Fabris S, Reichard P, Bianchi V.**
Mitochondrial deoxyribonucleotides, pool sizes, synthesis, and regulation. *J Biol Chem.* 2004 Apr 23;279(17):17019-26. Epub 2004 Jan 26.
- Reenan RA, Kolodner RD.**
Isolation and characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding homologs of the bacterial HexA and MutS mismatch repair proteins. *Genetics.* 1992 Dec;132(4):963-73.
- Ropp PA, Copeland WC.**
Characterization of a new DNA polymerase from *Schizosaccharomyces pombe*: a probable homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase gamma. *Gene.* 1995 Nov 7;165(1):103-7.
- Sambrook J, Russel DW.**
Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd Labmn edition, 2001.
- Sanyal A, Getz GS.**
Import of transcription factor MTF1 into the yeast mitochondria takes place through an unusual pathway.. *J Biol Chem.* 1995 May 19; 270(20): 11970-6.
- Scopes R.**
Protein purification. Principles and practice. 1st edition. Springer-Verlag, New York Heidelberg Berlin, 1982.
- Sedman T, Kuusk S, Kivi S, Sedman J.**
A DNA helicase required for maintenance of the functional mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 2000 Mar;20(5):1816-24.
- Shiiba D, Fumoto S-I, Miyakawa I, Sando N.**
Isolation of giant mitochondrial nucleoids from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Protoplasma, Nr. 198/ 3-4, 1997
- Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schonfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C.** The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Nov 11;100(23):13207-12. Epub 2003 Oct 23
- Stohl LL, Clayton DA.**
Saccharomyces cerevisiae contains an RNase MRP that cleaves at a conserved mitochondrial RNA sequence implicated in replication priming. *Mol Cell Biol.* 1992 Jun;12(6):2561-9.
- Stratagene**
Instruction Manual: BL21-CodonPlus® Competent Cells, <http://www.stratagene.com/manuals/230240.pdf>

Van Dyck E, Foury F, Stillman B, Brill SJ.

A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB. *EMBO J.* 1992 Sep;11(9):3421-30.

Vanderstraeten S, Van den Brule S, Hu J, Foury F.

The role of 3'-5' exonucleolytic proofreading and mismatch repair in yeast mitochondrial DNA error avoidance. *J Biol Chem.* 1998 Sep 11;273(37):23690-7.

Williamson D.

The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat Rev Genet.* 2002 Jun;3(6):475-81.

Williamson DH, Fennell DJ.

The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA. *Methods Cell Biol.* 1975;12:335-51

Wintersberger U, Wintersberger E

Studies on deoxyribonucleic acid polymerases from yeast. 2. Partial purification and characterization of mitochondrial DNA polymerase from wild type and respiration-deficient yeast cells. *Eur J Biochem.* 1970 Mar 1;13(1):20-7.

Wintersberger U, Blutsch H.

DNA-dependent DNA polymerase from yeast mitochondria. Dependence of enzyme activity on conditions of cell growth, and properties of the highly purified polymerase. *Eur J Biochem.* 1976 Sep;68(1):199-207.

Wong I, Patel SS, Johnson KA.

An induced-fit kinetic mechanism for DNA replication fidelity: direct measurement by single-turnover kinetics. *Biochemistry.* 1991 Jan 15;30(2):526-37.

Xu B, Clayton DA.

A persistent RNA-DNA hybrid is formed during transcription at a phylogenetically conserved mitochondrial DNA sequence. *Mol Cell Biol.* 1995 Jan;15(1):580-9.

Yakes FM, Van Houten B.

Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jan 21;94(2):514-9.

Yakubovskaya E, Chen Z, Carrodegua JA, Kisker C, Bogenhagen DF.

Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer. *J Biol Chem.* 2006 Jan 6;281(1):374-82. Epub 2005 Nov 1.

Young MJ, Theriault SS, Li M, Court DA.

The carboxyl-terminal extension on fungal mitochondrial DNA polymerases: identification of a critical region of the enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 2006 Jan 30;23(2):101-16.

Zamaroczy M, Faugeron-Fonty G, Baldacci G, Goursot R, Bernardi G.

The ori sequences of the mitochondrial genome of a wild-type yeast strain: number, location, orientation and structure. *Gene.* 1984 Dec;32(3):439-57.

Zhao X, Muller EG, Rothstein R.

A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell.* 1998 Sep;2(3):329-40.