

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ÜLDISE- JA MIKROOBIBIOKEEMIA

Astrid Salumäe

**Mitokondriaasel helikaasil Hmi1 ja transkriptsioonil on oluline mõju mitokondriaalse
DNA sünteesile *S. cerevisiae rho*⁻ mutantides**

Bakalaureusetöö

12EAP

Prof. Juhan Sedman, PhD Tiina Sedman

TARTU 2018

INFOLEHT

Mitokondriaalsel helikaasil Hmi1 ja transkriptsioonil on oluline mõju mitokondriaalse DNA sünteesile *S. cerevisiae rho⁻* mutantides

Pärmi mitokondri ja mitokondriaalse DNA (mtDNA) uurimiseks kasutatakse *petite* mutante, kuid siiani on teadmata, kuidas toimub mtDNA replikatsiooni nii metsiktüüpi (*rho⁺*) kui defektse mtDNA-ga (*rho⁻*) *petite* mutantides. Selgusetu on ka aktiivse ori-ga *rho⁻* tüvede hüpersupressiivsuse mehhanism. Välja on käidud kaks replikatsiooni initsiatsiooni mudelit: RNA praimerimisega ja rekombinatsioonist sõltuv. Antud töös uuriti kahe *rho⁺* mtDNA säilitamiseks vajaliku mitokondriaalse valgu, RNA polümeraasi Rpo41 ja mtDNA helikaasi Hmi1 deletsiooni mõju *rho⁻* tüvede mtDNA replikatsiooni intermediaatidele.

Märksõnad: mitokondriaalse DNA süntees, *S. cerevisiae*, helikaas Hmi1, RNA polümeraas Rpo41, *rho⁻*, 2D AGE.

CERCS kood: P320 (Nukleiinhappe süntees, proteiini süntees)

Mitochondrial helicase Hmi1 and transcription have important impact on mitochondrial DNA synthesis in *S. cerevisiae rho⁻* mutants

Yeast *petite* mutants are used to research mitochondria and mitochondrial DNA (mtDNA) but it is still unknown how the mtDNA is replicated both in wild-type *rho⁺* and in the *rho⁻* *petite* mutants which have a defected mtDNA genome. There is also insufficient knowledge regarding the mechanism behind *rho⁻* hypersuppressiveness. Two models have been proposed for the replication initiation model of yeast mtDNA: RNA primed and recombination dependent initiation. To study the roles of recombination and transcription on DNA synthesis, the impact of deleting two proteins, helicase Hmi1 and RNA polymerase Rpo41 are studied by analyzing the changes in mtDNA replication intermediates.

Keywords: mitochondrial DNA, *S. cerevisiae*, helicase Hmi1, RNA polymerase Rpo41, *rho⁻*, 2D AGE.

CERCS code: P320 (Nucleic acid synthesis, protein synthesis)

SISUKORD

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
1.2 Mitokonder ja mitokondriaalne DNA	7
1.3 Pärmis <i>petite</i> mutandid	9
1.4 Mitokondriaalse DNA replikatsiooni mudelid	12
1.5 Hmi1 ja Rpo41	15
2 UURIMUS	17
2.1 Töö eesmärgid	17
2.2 Materjal ja metoodika	18
2.2.1 Pärmited ja söötmed	18
2.2.2 EtBr mutagenees <i>petite</i> mutantide tegemiseks	20
2.2.3 PCR-id (<i>polymerase chain reaction</i>) ja plasmiidid	21
2.2.4 Pärmis DNA eraldamine (kiirmeetod)	23
2.2.5 Pärmis totaalse DNA eraldamine	23
2.2.6 Restriksioon	24
2.2.7 Transformatsioon	25
2.2.8 Southern blot	26
2.2.9 Hüpersupressiivsustest	27
2.2.10 Mitokondriaalse DNA eraldamine	28
2.2.11 2-dimensionaalne agarosgeelelektroforees	29
2.2.12 Pärmis rakkude DNA värvimine DAPI-ga	30
2.3 Tulemused	31
2.3.1 <i>Rho</i> ⁻ mutantide valmistamine EtBr mutageneesiga	31
2.3.2 <i>Petite</i> mutantide analüüs PCR meetodil	33
2.3.3 <i>Rho</i> ⁻ mutantide analüüs <i>Southern blot</i> -il ja tüvede valimine	34
2.3.4 Tüvede a1328 ori2 ja a1207 ori6 stabiilsuse kontroll	37
2.3.5 a1328 ori2 ja a1207 ori6 supressiivsuse määramine	38
2.3.6 HMI1 ja RPO41 deleteerimine <i>rho</i> ⁻ tüvedest	39

2.3.7	a1328 ori2 ja a1207 ori6 tüvede mtDNA analüüs 2-dimensionaalse agarosgeelelektroforeesiga	41
2.3.8	Tüvede a1328 ori2 Δ hmi1 ja a1207 ori6 Δ hmi1 2D AGE analüüs	47
2.3.9	Tüvede a1328 ori2 Δ rpo41 ja a1207 ori6 Δ rpo41 mtDNA 2D AGE	49
2.3.10	Tüvede a1328 ori2 Δ rpo41 Δ hmi1 ja a1207 ori6 Δ rpo41 Δ hmi1 mtDNA 2D AGE 50	
2.3.11	a1328 ori2 ja a1207 ori6 Δ hmi1, Δ rpo41 ja Δ rpo41 Δ hmi1 tüvede 2D AGE piltide kvantiteerimine	52
2.3.12	Nukleoidide analüüs DAPI-ga värvimise teel	59
2.4	Arutelu	60
KOKKUVÕTE		64
TÄNUSÕNAD		67
Kasutatud kirjandus		68
LISAD.....		73

KASUTATUD LÜHENDID

mtDNA – miotkondriaalne DNA

bp – aluspaar

kb – tuhat aluspaari

EtBr – etiidiumbromiid

DAPI - 4,6-diamidiino-2-fenüülindool

2D AGE – 2-dimensiooniline agarosgeelelektroforees

totDNA – totaalne DNA

OXPPOS – oksüdatiivne fosforüleerimine

YPD – *yeast extract peptone dextrose* sööde

SCM – *synthetic complete medium* sööde

Ori – *origin of replication*

HS - hüpersupressiivne

S - supressiivne

N – neutraalne

T₁₀E₁ – 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA

hDNA – hargnenud DNA

circDNA – rõngasmolekulid / tsirkulaarne DNA

RI – replikatsiooni intermediaadid

SISSEJUHATUS

Saccharomyces cerevisiae võime jääda ellu ka ilma funktsionaalse mitokondriaalse DNA-ta (mtDNA), teeb temast hea mudelorganismi mitokondri DNA metabolismi uurimisel. Defektse mtDNA-ga (*rho*⁻) mutantidel esineb omapärane fenomen – supressiivsus. Nimelt ei pärandu *rho*⁻ tüvede mtDNA edasi Mendeli seaduste alusel, vaid ori järjestusega *rho*⁻ mutantide mtDNA pärandub edasi suurema sagedusega kui metsiktüübi mtDNA. Aktiivse ori-ga *rho*⁻ tüved on hüpersupressiivsed, mitteaktiivsega supressiivsed. Defektse mtDNA-ga mutantidest saab tihti deleteerida mitokondri valke, mis metsiktüüpi pärmis põhjustaks mitokondriaalse DNA ebastabiilsust ja *rho*⁻ mutantide teket. Sellised mitokondris lokaliseeruvad ja metsiktüüpi pärmile vajalikud valgud on näiteks helikaas Hmi1 ja RNA polümeraas Rpo41.

Pärmi mtDNA replikatsiooni kirjeldamisega on jõutud kahe hüpoteetilise mudelini: transkriptsioonist sõltuva ja rekombinatsioonist sõltuva replikatsiooni initsiatsiooniga mudel. Mõlema hüpoteesi kohaselt jätkub DNA süntees veereva ratta mudelil. Teada on, et metsiktüübi mtDNA säilitamiseks on vajalik transkriptsioon, kuid *rho*⁻ tüvede mtDNA replikatsiooniks mitte. Samas on näidatud mitmete rekombinatsiooniga seotud valkude suurt mõju DNA sünteesile.

Antud töös on esmalt kirjeldatud pärmi *rho*⁻ tüvede valmistamist edasiseks replikatsiooni analüüsiks. Kuna transkriptsioonist sõltuvat initsiatsiooni seostatakse ori-ga, siis oli replikatsiooni mudelite uurimiseks oluline aktiivse ja mitte-aktiivse ori-ga tüve võrdlus. Edasiseks analüüsiks valiti kaks *rho*⁻ tüve: hüpersupressiivne ori2 sisaldava mtDNA-ga tüvi a1328 ori2 ja supressiivne ori6 sisaldava mtDNA-ga tüvi a1207 ori6. Lähtuvalt kahest replikatsiooni mudeli hüpoteesist deleteerisin uuritavatest *rho*⁻ tüvedest mtDNA helikaasi Hmi1 ja / või RNA polümeraasi Rpo41, et uurida nii rekombinatsiooniga seotud valgude kui transkriptsiooni mõju DNA sünteesile. Replikatsiooni uurimiseks on kasutatud 2-dimensionaalset agarosgeelelektroforeesi, mis võimaldab lahutada topoloogia ja suuruse alusel erinevad replikatsiooni intermediaadid. DNA sünteesi käigus tekkivate vaheühendite põhjal on võimalik teha järeldusi replikatsiooni mehhanismide kohta.

Töö eesmärgiks oli uurida mitokondriaalse helikaasi Hmi1 ja RNA polümeraasi Rpo41 mõju DNA sünteesile *S. cerevisiae rho*⁻ mutantides.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae ehk pagaripärm on ainurakne eukarüootne seen. Piisava toitainete ja optimaalse temperatuuri (30-35°C) korral on pagaripärmi lihtne kasvatada ja tema poolestusaeg on ligikaudu 100 minutit, see lihtsustab laboris pärmiga töötamist (Herskowitz, 1988). Pagaripärm on fakultatiivne anaeroob, mistõttu on ta võimeline elama ka ilma funktsionaalse mitokondriaalse DNA (mtDNA) ja hingamisahelata. Seepärast on pärm väga hea mudel ka mitokondri DNA metabolismi uurimisel (Cherry et al., 1997). Tema laialdase kasutamise pärast uurimisobjektina oli pärm ka esimene eukarüoot, kelle genoom sekveneeriti (Goffeau et al., 1996).

Pagaripärmil esineb kolm rakutüüpi: haploidsed paardumistüübid a ja α ning diploidne a/α . Mitootiliselt suudavad paljuned nii haploidsed kui diploidsed rakud, kuid ainult diploidsed on võimelised sporuleeruma ja meiotiliselt jagunema. Erineva paardumistüübiga haploidsed rakud võivad paarduda ja moodustada diploidse raku. Diploidi sporuleerudes tekib 4 haploidset rakku - 2 a ja 2 α paardumistüüpi vastavalt Mendeli seadustele (Herskowitz, 1988).

S. cerevisiae sobib hästi mudelorganismiks teistele päristuumsetele organismidele, kuna pärmis on olemas paljud kõrgemate eukarüootide homoloogsed valgud ja samas on temaga lihtne ning ohutu laboratoorselt töötada (Cherry et al., 1997).

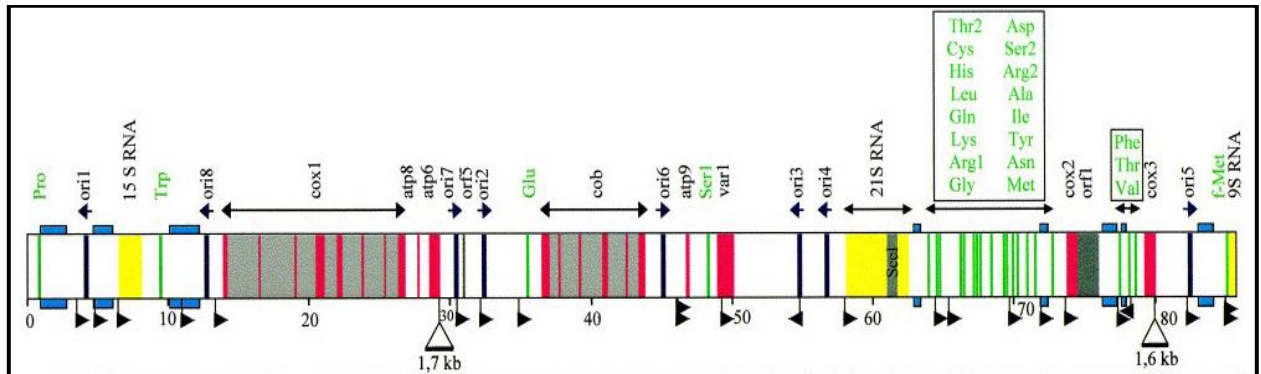
1.2 Mitokonder ja mitokondriaalne DNA

Mitokonder on eukarüootsete rakkude organell, mille sisemembraanis toimub oksüdatiivne fosforüleerimine (OXPHOS) ja seeläbi energia ehk adenosüütrifosfaadi (ATP) tootmine. OXPHOS valgud on kodeeritud nii tuumas kui ka mitokondri enda genoomis (Chen and Butow, 2005). Peale energia tootmise, omab mitokonder rolli ka raku surmas, rakkude diferentseerumises, signalisatsiooniradades ja raku tsükli kontrollis (McBride et al., 2006). Paljud inimese geneetilised haigused on seotud mtDNA või tuumas kodeeritud mitokondriaalsete valkude geenide mutatsioonidega (Zeviani et al., 2004).

S. cerevisiae on võimeline tootma energiat ka kääritamisel, mistõttu ei vaja ta ellu jäämiseks mitokondris toimuvaid energia tootmise protsesse. Mutantse mtDNA-ga pärmid on seega

võimelised kääritatava süsinikuallikaga söötmel ellu jääma ning seetõttu on pärm hea mudel mitokondri genoomi ja funktsiooni uurimiseks.

Pärmi mtDNA on AT-rikas ja selles kodeeritud geenide tihedus on väga madal (Bernardi et al., 1972). Kuigi pärmi mtDNA on 85kb pikk, kodeerib see ainult 8 valku: kolme tsütokroom c oksüdaasi subühikut (Cox1, Cox2 ja Cox3), ATP süntaasi kolme subühikut, apotsütokroom b ja ribosomaalset valku Var1 (võrdluseks on inimese mtDNA ca 16kb, kuid kodeerib 13 valku (Shadel, 1999)). Lisaks hingamisahelaga seotud valkudele kodeerib pärmi mtDNA ka oma tRNA-sid (24), kahte rRNAd, RNAasP 9S RNA komponenti ja olenevalt tüvest 7-8 replikatsiooni *origin*-i sarnast järjestust (edaspidi *ori*) (de Zamaroczy et al., 1984). Mitokondriaalse DNA skeem on toodud Joonisel 1 (Foury et al., 1998).



Joonis 1. *S. cerevisiae* tüve FY1679 mitokondriaalse DNA skeem (Foury et al., 1998). Punasega on märgitud valke kodeerivate geenide eksonid, halliga intronid ja intronitega seotud lugemisraamid, roheliselt on esitatud tRNA-d, kollasega rRNA-d ja RNAasP 9S RNA. Tumesinisega on näha *ori* järjestused ja mustad kolmnurgad on transkriptsiooni initsiatsiooni saidid, $\Delta 1,7\text{kb}$ ja $\Delta 1,6\text{kb}$ on alad, mis antud tüves on deleteerunud, aga eksisteerivad varem sekveneeritud D273-10B tüves (Tzagoloff & Myers, 1986).

MtDNA *ori* järjestused koosnevad kolmest GC-klastrist, mida nimetatakse A, B ja C *box*-iks, ning neljast või viiest AT-rikkast järjestusest. Kaks AT-klastrit (*p* ja *s*) asuvad A ja B *box*-i vahel, *l* klaster asub B ja C *box*-i vahel ning *r* järgneb C *box*-ile. Kokku on sellise klassikalise *ori* järjestuse pikkuseks ligikaudu 280bp, kuid ori4, ori6 ja ori7 puhul on lisaks A, B ja C *box*-ile veel β ja γ GC-klastrid ning r^- -AT-rikas järjestus (de Zamaroczy et al., 1984). Iga *ori* sisaldab RNA polümeraasi promootorit, kuid ainult ori2, ori3 ja ori5 nimetatakse aktiivseteks *ori*-deks ja teisi inaktiivseteks (inaktiivsetes on promootori ala katkestatud insertioonidega) (Zamaroczy et al., 1981). *Ori* regioonid moodustavad juuksenõela struktuure, millel on sarnasusi imetaja mitokondrite replikatsiooni *origin*-i struktuuridega (de Zamaroczy et al., 1984). Varem peeti *ori* järjestust replikatsiooni *origin*-iks ehk replikatsiooni initsiatsiooni järjestuseks, aga mtDNA mutandid, millel pole *ori* järjestust, suudavad säilitada mtDNA, seega

pole pärmi mtDNA ori järjestused erinevalt klassikalisest *origin*-ist hädavajalikud mtDNA replikatsiooniks (Fangman et al., 1989). Samuti on näidatud, et replikatsiooniks pole vajalik ka aktiivsetelt ori-delt initsieeritav transkriptsioon. Seda on tõestatud mitokondriaalse RNA polümeraasi geeni *rpo41* deleteerimisega pärmis (Lisowsky et al., 2002; MacAlpine et al., 2001) ja promootorjärgestuse katkestamisega (MacAlpine et al., 2001).

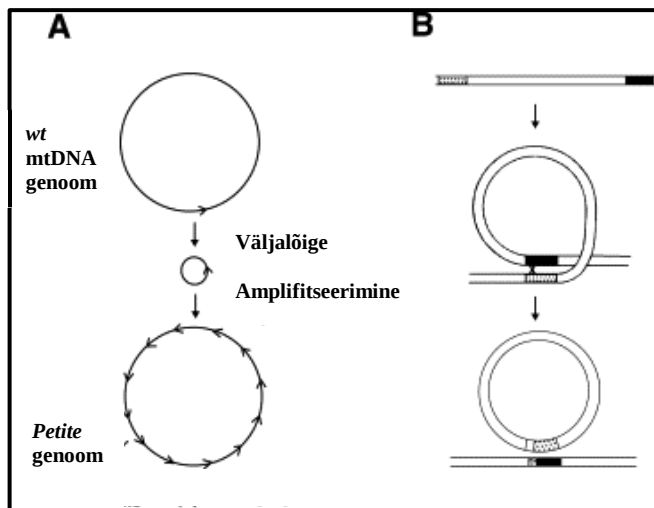
Mitokondriaalne DNA on pärmi mitokondris pakitud valk-DNA kompleksidesse, mida nimetatakse nukleoidideks (Miyakawa et al., 1987). Värvides mtDNA-d DAPI-ga või kasutades elektronmikroskoopiat on nukleoidide morfoloogia põhjal võimalik teha järeldusi nende funktsionaalsuse kohta, näiteks defektse mtDNA-ga respiratoorsete mutantide mitokondriaalsed nukleoidid on tavalisest suuremad ja neid on raku kohta vähem kui aeroobselt kasvavas pärmi rakus (Miyakawa et al., 1988; Shiiba et al., 1997). Anaeroobselt kasvavate mutantide gigantne nukleoid sisaldab aga 10 korda rohkem mtDNA-d kui tavaline mitokondriaalne nukleoid, mistõttu kogu mtDNA kogus rakus püsib samal tasemel (Shiiba et al., 1997). Suurte nukleoidide tekkimine respiratoorsetes mutantides sõltub ka nende mtDNA korduvast järjestusest (Okamoto et al., 2016).

1.3 Pärmi *petite* mutandid

Petite mutandid on pärmi tüved, mis ei ole võimelised kasutama OXPHOS rada ATP sünteesiks. Esmakordselt avastas pärmi respiratoorsed mutandid Boris Ephrussi (Ephrussi, 1953), kes kirjeldas mutante väikeste kolooniatena (1/3-1/2 metsiktüübi diameetrist), mis ei suuda kasvada mitte-fermenteeritava süsinikuallikaga söötmel nagu näiteks glütserool või etanool. Kolooniate väiksemad mõõtmed tulenevad nende võimetusest sünteesida ATP-d hingamisrajas, mistõttu peavad *petite* mutandid kasutama energia tootmiseks vähem efektiivsemat metabolismi rada – kääritamist (Day, 2013). Selliseid mutante tekib spontaanselt 1-2 kolooniat tuhandest (Ephrussi, 1953), laboris kasutatavates tüvedes veidi sagedamalt (Jiménez et al., 1988). *Petite* mutante on võimalik indutseerida ka stressi või mutageneesiga, näiteks etiidiumbromiid sobib selliseks mutageneesiks hästi, kuna madalal kontsentratsioonil kahjustab see mtDNA-d suurema tõenäosusega kui tuumset DNA-d (Jiménez et al., 1988). MtDNA defektid võivad olla põhjustatud mutatsioonidest mtDNAs endas (tsütoplasmaatilised mutandid) näiteks ATP süntaasi subühikute geenides või tuuma geenides (nukleaarsed mutandid), mis mõjutavad OXPHOS rada või mtDNA stabiilsust ja replikatsiooni (Day, 2013)

näiteks töös uuritud mitokondriaalne helikaas Hmi1 (Sedman et al., 2000) ja mitokondriaalne RNA polümeraas Rpo41 (Greenleaf et al., 1986).

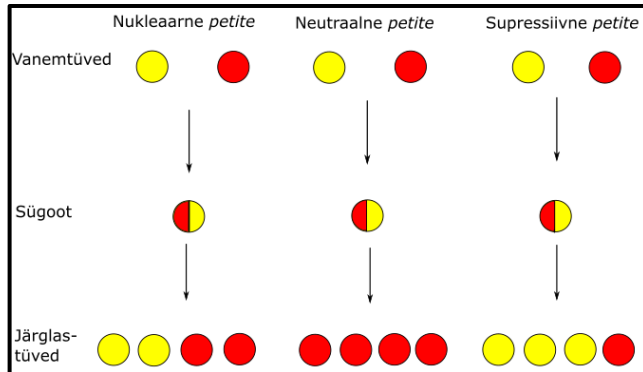
Petite mutantidel võib mtDNA täielikult puududa (neid nimetatakse ρ^0 mutantideks) või on alles jäänud fragment metsiktüübi (wt) mtDNAST (ρ^- mutandid). Funktsionaalse mtDNA-ga metsiktüüpe tähistatakse ρ^+ (MacAlpine et al., 2001). ρ^- puhul alles jäänud mtDNA fragmendi pikkus on ca 1% metsiktüübi genoomist ja kordub tandeemselt pea-saba või saba-saba orientatsioonis (Blanc & Dujon, 1980; Bos et al., 1980). Üheks hüpoteesiks ρ^- mutantide tekkemehhanismile on väljalõike ja amplifitseerimise teooria (Joonis 2). Mutageneesi käigus või spontaanselt toimub wt mtDNA-s väljalõige ja saadud fragment amplifitseeritakse tandeemselt ning sellest saab ρ^- mutandi defektse genoomi ühik. Pärmis mtDNA-s on palju otseseid kordusjärjestusi, kus toimub tihti mtDNA muteerumisel väljalõige (Bernardi, 2005).



Joonis 2. Väljalõike-amplifikatsiooni mehhanismi skeem. (A) Fragment metsiktüübi mitokondri genoomist lõigatakse välja ja amplifitseeritakse. Saadud genoom on defektne ja põhjustab *petite* fenotüüpi. (B) Väljalõige toimub tihti otseste kordusjärjestuste juurest – täpilised ja mustad alad. (Joonis on kohandatud artiklist Bernardi, 2005)

Pagaripärmi mtDNA pärandub erinevalt kõrgematest eukarüootidest edasi biparentaalselt (Dujon, 1981). Siit tuleneb ka nendele mutantidele omapärane fenomen - supressiivsus. Ristates tsütoplasmaatilisi *petite* (ρ^- või ρ^0) mutante metsiktüüpi pärmiga ei pärandu mtDNA Mendeli seaduste järgi (Joonis 3). Kui ρ^- pärmi mitokondriaalse genoomi fragment sisaldab ori või ori sarnast järjestust, siis pärandub ρ^- mtDNA edasi suurema tõenäosusega ja neid nimetatakse supressiivseteks *petite* mutantideks. Ilma ori või ori sarnase järjestuseta *petite* mutandid (ρ^- või ρ^0) on neutraalsed *petite*-d ($N \rho^-$), mille metsiktüübiga ristamisel pärandub edasi ainult ρ^+ mtDNA. Vastavalt ori aktiivsusele ja fragmendi pikkusele jaotatakse

supressiivsus veel kaheks: hüpersupressiivsed (HS ρ^-) omavad mtDNA järjestuses aktiivset ori ja supressiivsed (S ρ^-) inaktiivset ori. Lisaks võib supressiivsust mõjutada ka ρ^- mtDNA fragmendi pikkus, sest mida suurem on mtDNA korduv fragment, seda väiksem on saadav eelis ja seda suurem on tõenäosus, et see asendub metsiktüübiga (Blanc & Dujon, 1980; de Zamaroczy et al., 1984).



Joonis 3. MtDNA pärandumine *petite* mutantide ristamisel metsiktüübiga. *Petite* mutantide (kollased ringid) metsiktüübiga (punased ringid) ristamisel saadavad järglased määravad ära algsete *petite* tüvede supressiivsuse. Tuumsete *petite* mutantide ristamisel metsiktüübiga toimub mtDNA pärandumine Mendeli seaduste järgi. Neutraalsete *petite* tüvede puhul tekivad metsiktüüpi järglased ja supressiivsete puhul on enamus järglastest pärinud *petite* tüüpi mtDNA, hüpersupressiivsetel ligi 100% järglastest, supressiivsetel üle 50 %.

Üheks hüpoteesiks supressiivsuse mehhanismile on, et väiksem mitokondriaalne genoom, millel on rohkem ori piirkondi, annab replikatsioonil eelise metsiktüübi ees, kuna sellele seondub rohkem replikatsiooni masinavärgi valke (MacAlpine et al., 2001). Teisalt on täheldatud et ori-de suurem arv võib anda eelise mtDNA nukleotiidide segregatsioonil tütarakkudesse (Lockshon et al., 1995; Zweifel and Fangman, 1991). Promootorjärjestuse katkestamisega on näidatud, et ori järjestuselt initsieeritav transkriptsioon on vajalik hüpersupressiivsuseks (MacAlpine et al., 2001). See võiks tähendada, et ρ^- mtDNA supressiivsus (ja teoreetiliselt ka replikatsioonil saadav eelis) on transkriptsioonist sõltuv, kuid ρ^- genoomi säilimiseks (Lisowsky et al., 2002) ja supressiivsuseks neutraalse ρ^- mutandiga ristates pole transkriptsioon vajalik (Lorimer et al., 1995).

Ori rolli replikatsiooni initsiatsioonisaidina tõendavad järgmised faktid:

1. Ori palindroomne järjestus on sarnane imetajate mtDNA L-ahela replikatsiooni ori-ga, mis on klassikaline replikatsiooni *origin* (Bernardi, G, 1982).
2. Pärmist on leitud ori alaga komplementaarseid RNA-DNA duplekse (Baldacci, G. et al., 1984).

3. Ori-lt sünteesitavad transkriptid on lõigatavad imetajate mtDNA H-ahela ori praimereid töötleva valguga (Topper, J. N., 1988).
4. Ori promootorjärjestus on sarnane imetajate mtDNA H-ahela promootoriga (Baldacci, G. and Bernardi, G., 1982)

Vastuväiteks jääb siiski oluline tõsiasi, et *petite* mutandid saavad ilma ori-ta replitseerida mtDNA-d (Fangman et al., 1989).

1.4 Mitokondriaalse DNA replikatsiooni mudelid

Mitokondriaalne DNA esineb pärmis suures osas lineaarsete molekulidena (Maleszka et al., 1991), kuigi pikalt arvati, et lineaarsed molekulid tekivad analüüsimisel mehhaaniliste mõjutuste tõttu ja tegelik konformatsioon on suures osas tsirkulaarne (Petes et al., 1973). Laboratoorsete meetodite arenedes on näidatud, et lineaarsed molekulid tõepoolest ei teki mtDNA eraldamisel tsirkulaarsetest vormidest, vaid on olemas juba raku sees. *S. cerevisiae* le lähedasel pärmil *T. galbrata* on elektronmikroskoopiaga märgatud peale superspiraalsete ja relakseerunud rõngasmolekulide ka väiksemas koguses lasso ehk tsirkulaarseid dsDNA sabaga ja ssDNA sabaga struktuure. Kõige domineerivamad on aga pikad lineaarsed molekulid – konkatemeerid (Maleszka et al., 1991). Replikatsiooni mudelite uurimise aluseks on tihti DNA molekulide struktuuride analüüs, sest replikatsiooni vaheühendite struktuuri põhjal saab ennustada nende sünteesi mehhanismi.

Tulenevalt nendest konformatsioonidest, mida oli võimalik näha elektronmikroskoopia ja pulseeriva välja elektroforeesi abil järeldasid Maleszka ja kaasautorid (Maleszka et al., 1991), et peamiseks replikatsiooni skeemiks on pärmi mitokondris veereva ratta mudel. See mudel selgitab nii konkatemeeride teket kui ka lasso struktuure (Maleszka et al., 1991). On näidatud ka, et *E. coli* plasmiid, mis pärmi tuumas on tsirkulaarne, omab mitokondris lineaarset struktuuri ja sama juhtub ka *E. coli*-s kui eemaldada bakterist RecBCD rada (Cohen and Clark, 1986). Seega võib ka pärmi puhul arvata, et olenevalt replisoomi valkudest (tuuma või mitokondri) kasutatakse erinevat replikatsiooni mudelit. (Maleszka et al., 1991). MtDNA replikatsiooni viib läbi DNA polümeraas Mip1. *Rho*⁺ mtDNA sünteesiks vajab Mip1 lisaks Rim1 ssDNA-d siduvat valku ja mtRNA polümeraasi Rpo41 (Shadel, 1999).

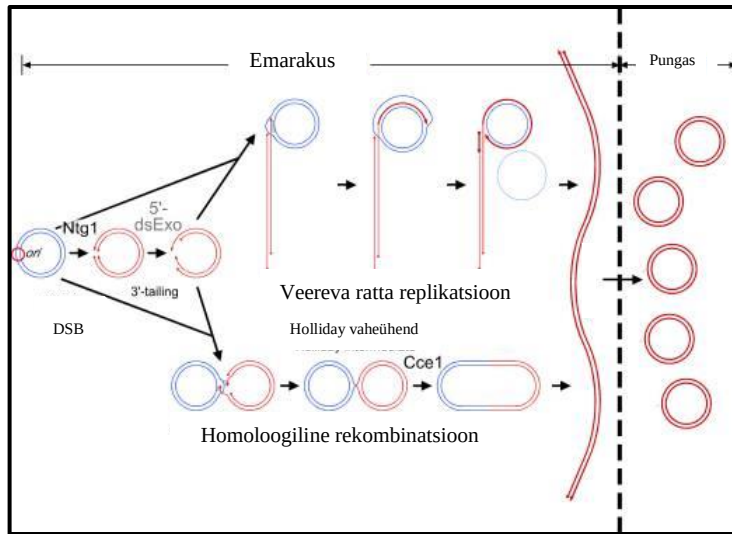
Oluliselt segasem on aga olukord replikatsiooni initsiatsiooni mudeli välja selgitamisega. Üheks mehhanismiks peetakse transkriptsioonilist ehk praimerimisega initsiatsiooni.

Transkriptsioonilise praimerimise mudelit kinnitavad järgnevad asitõendid:

1. Ori-d on järjestuselt sarnased imetajate mtDNA oriH-ga, millelt toimub praimerite süntees (Baldacci, G. and Bernardi, G., 1982).
2. Ainult aktiivsete oridega *rho*⁻ tüvedel on metsiktüvega ristates edasipärandumisel eelis, see tähendab et transkriptsioon ori-delt (RNA praimerite süntees) võib olla vajalik replikatsiooniks (MacAlpine et al., 2001).
3. RNAas MRP lõikab oride transkripte selliselt, et nendelt saab toimuda DNA sünteesile üleminek (Stohl and Clayton, 1992).

Seda mudelit kinnitavad mitmed autorid, kuid on ka vastuväiteid, mis muutuvad eriti domineerivaks *rho*⁻ tüvede replikatsiooni uurimisel. Transkriptsioonilist praimerimist viib mitokondris läbi RNA polümeraas Rpo41 koos teiste valkudega (Dyck and Clayton, 1998; Greenleaf et al., 1986), kuid *rho*⁻ tüvede mtDNA säilitamiseks pole Rpo41 vajalik, seega peab eksisteerima ka teine initsiatsiooni mudel (Dyck and Clayton, 1998; FANGMAN et al., 1989; Lecrenier and Foury, 2000). Kaks erinevat replikatsiooni mudelit esineb ka mitokondri valkudega palju homolooge omavas faagis T4, kus DNA süntees toimub nii ori aktiveerimisega kui ka homoloogilisest rekombinatsioonist sõltuvalt (Kreuzer et al., 1988).

Teine hüpotees mtDNA replikatsiooni initsiatsiooniks ongi rekombinatsiooniline praimerimine. Selle mudeli järgi moodustub praimer rekombinatsiooni vaheühenditest ja DNA süntees jätkub kas veereva ratta mudelil või geenikonversiooniga homoloogilisel rekombinatsioonil (Joonis 4) (Ling et al., 2007).



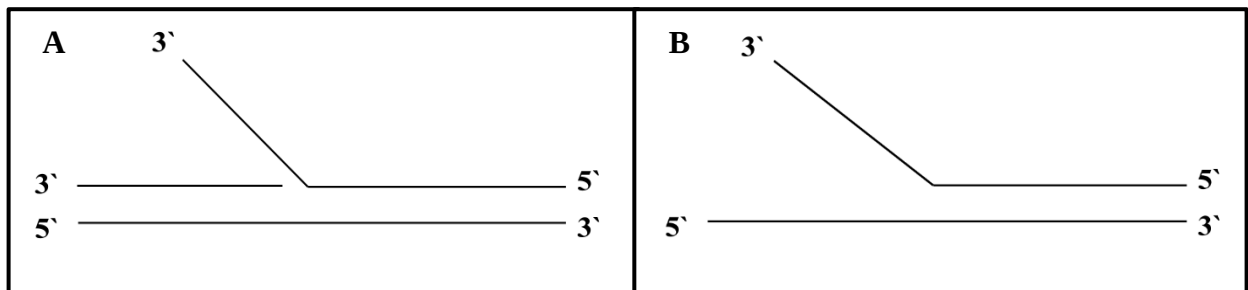
Joonis 4. Pärmi mtDNA kaheaahelalisest katkest indutseeritud ja homoloogsest DNA-st sõltuva veereva ratta replikatsiooni ja ristsiirdega rekombinatsiooni mudel. Ntg1 tekitab ori järjestuses DSB (kaheaahelalise katke), mida protsessib eksonukleas. Kui valk Mhr1 seob ainult ühe tekkinud üheaahelalise 3`saba homoloogilise järjestusega teisel rõngasmolekulil, siis jätkub veereva ratta replikatsioon. Kui Mhr1 seob mõlemad 3` ssDNA sabad samale rõngasmolekulile, siis jätkub homoloogiline rekombinatsioon. Holliday ühendused lahendab valk Cce1. Kuna aga mtDNA täielikuks kadumiseks on vaja nii Mhr1 kui Cce1 deleteerimist, siis peab olema veel mingi alternatiivne rada homoloogiliseks DNA paardumiseks (Joonis muudetud Ling et al., 2007).

Pärmi mtDNAs toimub aktiivselt rekombinatsioon (Lockshon et al., 1995; MacAlpine et al., 1998) ja on näidatud, et mitmete rekombinatsiooniks vajalike valkude puudumisel, on suur mõju nii replikatsioonile kui ka supressivsusele. Sellisteks valkudeks on näiteks Holliday ühendustes osalevad Cce1 ja Abf2 (Kleff et al., 1992; Lockshon et al., 1995; MacAlpine et al., 1998). Valk Mhr1 osaleb D-loop struktuuride ehk ahelavahetuse vaheühendite tekitamises. Mhr1 seob omavahel homoloogilised ssDNA ja dsDNA – selliselt vaheühendilt on võimalik initsieerida veereva ratta mudelil mtDNA replikatsioon (Ling and Shibata, 2002). Mgm101 on mtDNA rekombinatsiooniga seotud valk, mis on vajalik ainult wt ja ilma ori-ta *rho*⁻ mtDNA säilitamiseks, kuid ori-ga *petite* mutantides pole Mgm101 vajalik (Mbantenkhu et al., 2011; Zuo et al., 2002). Samuti on näidatud homoloogilise rekombinatsiooni tähtsust *C. albicans*’i mtDNA replikatsioonil analüüsides mtDNA replikatsiooni intermediaate 2-dimensionaalsel agarosgeelelektroforeesil (2D AGE). Nimelt suuruse ja topoloogia alusel DNA lahutamisel on võimalik näha replikatsioonikahvli vaheühendit – Y-kaart ja *C. albicans*’i mtDNA Y-kaare esinemises on leitud seos rekombinatsiooniliste protsessidega (Gerhold et al., 2010).

1.5 Hmi1 ja Rpo41

Hmi1 (*helicase in mitochondria 1*) on SF1 perekonna helikaas, mis on kodeeritud tuumas, kuid lokaliseerub mitokondrisse C-terminaalse signaaljärjestuse abil. Hmi1 deleteerimisel *S. cerevisiae* genoomist on mtDNA ebastabiilne ja tekivad *rho*⁻ või *rho0* hingamismutandid. Hmi1 homologid *E. coli*-s on reparatsiooniosaleb UvrD ja replikatsiooniga seotud Rep valk. Hmi1 pole *rho*⁻ mtDNA säilitamiseks vajalik, mistõttu ei peeta seda mtDNA replikatiivseks helikaasiks. Samas on välistatud Hmi1 roll transkriptsioonil, seega põhjus, miks Hmi1 deleteerimisel tekib *petite* mutant on seotud siiski replikatsiooni häirimisega (Sedman et al., 2000). Veel enam, on teada, et HMI1 deletsiooniga *rho*⁻ tüvedes on tunduvalt lühemad mtDNA molekulid kui tagasiviidud HMI1 geeniga *rho*⁻ mutantides. Küll aga ei kao Hmi1 valgu pikkade molekulide sünteesi stimuleeriv toime valgu ATPaasse aktiivsuse puudumisel. Samuti pole ATPaasne aktiivsus vajalik *rho*⁺ mtDNA säilitamisel (Sedman et al., 2005).

Hmi1 suudab harutada lahti ainult 3' üleulatuva ssDNA otsaga DNA-d ja vajab selleks kofaktorina ATP-d. Substraadiks sobivad kahvli-sarnased (*forked*) struktuurid, kus on nii 5' kui ka 3' üleulatuv ots, ja *flap* struktuurid, mis kujutavad endast rekombinatsiooni ahela asendamisel tekkivat vaheühendit (Joonis 5).



Joonis 5. Hmi1 helikaasi substraadid. (A) *forked* struktuur ja (B) *flap* struktuur. Substraat jäljendab rekombinatsioonil tekkivat ahela vahetuse vaheühendit.

Sellise rekombinatsiooni vaheühendi lahti harutamine viitab Hmi1 rollile rekombinatsioonilistes protsessides (Kuusk et al., 2005; Monroe et al., 2005).

Rpo41 on pärmi tuumas kodeeritud mtDNA transkriptsiooni läbi viiv RNA polümeraas (Greenleaf et al., 1986). Promootorjärjestusele aktiivselt seondumiseks vajab mtRNA polümeraas transkriptsioonifaktorit Mtf1, mis aitab DNA-d painutada nii, et sellele saaks aktiivselt seonduda Rpo41 (Tang et al., 2011). Lisaks mRNA sünteesile on näidatud Rpo41

vahendusel toimuv praimerite süntees replikatsiooniks (Sanchez-Sandoval et al., 2015). Ramachandran ja kaasautorid kinnitasid ka Rpo41-Mtf1 võimet praimeerda mahajääva ahela sünteesi (Ramachandran et al., 2016). Lisaks ori-dele on ka teisi transkriptsiooni initsiatsioonisaite, seepärast ei saa ori puudumisel välistada transkriptsiooni osalemist replikatsiooni initsiatsioonil (MacAlpine et al., 2001; Zassenhaus et al., 1984).

2 UURIMUS

2.1 Töö eesmärgid

Antud töö eesmärgid võib jaotada kaheks:

- 1) *Saccharomyces cerevisiae* erineva supressiivsusega *rho*⁻ tüvede valmistamine, et neist eraldatud mtDNA-d oleks võimalik kasutada replikatsioonimudeli analüüsiks 2D agarosgeelelektroforeesil (2D AGE). Optimaalne mtDNA fragmendi pikkus 2D AGE analüüsiks on üle 1kb ja alla 3kb.
Eesmärgiks oli saada ka erineva supressiivsusega tüved hüpersupressiivse ja supressiivse tüve replikatsioonimudeli võrdluseks.
- 2) Mitokondriaalsete valkude, DNA helikaasi Hmi1 ja RNA polümeraasi Rpo41 deleteerimise mõju uurimine *rho*⁻ tüvede mtDNA replikatsiooni intermediaatidele (RI). Samuti uuriti Hmi1 ja Rpo41 puudumise koosmõju *rho*⁻ tüvede mtDNA-le. Kogu replikatsiooni uurimine põhines replikatsiooni intermediaatide analüüsil kasutades 2D AGE ja erinevate RI struktuuride kvantiteerimist.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Pärmitüved ja söötmed

Kõik töös kasutatud pärmitüved on tehtud w303a või w303 α baasil. Antud tüved on sobivad *petite* mutantide tegemiseks, kuna need toodavad oksüdatiivsel fosforülatsioonil punast pigmenti, mistõttu hingamisdefektsetel *petite* mutantidel pigment puudub ja on seega kergesti eristatavad *rho*⁺ tüvede kolooniatest.

Kõiki pärmitüvesid kasvatati mitte-selektiivselt YPD (*yeast extract peptone dextrose*) vedelsöötmes või agariga tardsöötmele: 1% pärmiekstrakt, 2% pepton, 2% glükoos ja tardsöötmele lisaks 1,7% agar (Radford, 1991). Selektiivsetel söötmetel KanMX4 kassetiga tüvedel lisati 0,18mg/ml G418 antibiootikumi, HphMX6 kasseti korral 0,3mg/ml hügromütsiin B antibiootikumi. Selektiivsete aminohapetega söötme jaoks kasutasin SC (*Synthetic Complete*) söödet, mis koosneb 0,67% ilma aminohapeteta pärmi lämmastikuallikast (ammooniumsulfaat; 0,2% aminohapete ja nukleosiidide segust, milles puuduvad seleksiooniks vajalikud aminohapped ja nukleosiidid; 2% glükoosist; 1,7% agarist. Vedelkultuurid kasvasid 180rpm loksutil ja agarsöötme tassid termokapis 30°C juures.

Tabel 1 Kasutatud pärmitüved

Tüvi	Genotüüp	Autor, kirjeldus
w303a	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i>	Rothstein 1989
w303 α	<i>MATα ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i>	Rothstein 1989
w303 a1184	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i>	Villemson 2013, mtDNA kogu ori2 ning ori7 A ja B box-iga fragment
w303 a1328 ori2	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i>	Töö autor, mtDNA ori2 fragment 1328bp
w303 a1207 ori6	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i>	Töö autor, mtDNA ori6 fragment 1207bp

w303 a1328 ori2 Δ hmi1	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 hmi1::HphMX6</i>	Töö autor, mtDNA ori2 fragment 1328bp
w303 a1207 ori6 Δ hmi1	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 hmi1::HphMX6</i>	Töö autor, mtDNA ori6 fragment 1207bp
w303 a1328 ori2 Δ hmi1	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 hmi1::KanMX4</i>	Töö autor, mtDNA ori2 fragment 1328bp
w303 a1207 ori6 Δ hmi1	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 hmi1::KanMX4</i>	Töö autor, mtDNA ori6 fragment 1207bp
w303 a1328 ori2 Δ rpo41	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 rpo41::KanMX4</i>	Töö autor, mtDNA ori2 fragment 1328bp
w303 a1207 ori6 Δ rpo41	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 rpo41::KanMX4</i>	Töö autor, mtDNA ori6 fragment 1207bp
w303 a1328 ori2 Δ rpo41; Δ hmi1	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 rpo41::KanMX4; hmi1::HphMX6</i>	Töö autor, mtDNA ori2 fragment 1328bp
w303 a1207 ori6 Δ rpo41; Δ hmi1	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 rpo41::KanMX4; hmi1::HphMX6</i>	Töö autor, mtDNA ori6 fragment 1207bp
w303 a1328 ori2 Δ hmi1; Δ rpo41	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15 trp1-1 leu2-3,-112 can1-100 hmi1::HphMX6; rpo41::KanMX4</i>	Töö autor, mtDNA ori2 fragment 1328bp

w303 a1207 ori6 Δ hmi1; Δ rpo41	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1 leu2-3,-112 can1-100</i> <i>hmi1::HphMX6;</i> <i>rpo41::KanMX4</i>	Töö autor, mtDNA ori6 fragment 1207bp
w303 a1328 ori2 LEU+	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1,-112 can1-100</i>	Töö autor
w303 a1207 ori6 LEU+	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1,-112 can1-100</i>	Töö autor
w303a URA3+	<i>MATa ade2-1 his3-11,-15 trp1-1</i> <i>leu2-3,-112 can1-100</i>	Rothstein 1989, URA3 geeni taastas Silja Kuusk
w303 α URA3+	<i>MAT α ade2-1 his3-11,-15 trp1-1</i> <i>leu2-3,-112 can1-100</i>	Rothstein 1989, URA3 geeni taastas Silja Kuusk
w303 α HS61 LEU+	<i>MATα ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1,-112 can1-100</i>	Silja Kuusk, mtDNA ori2 fragment 829bp
w303a N35 LEU+	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,-15</i> <i>trp1-1,-112 can1-100</i>	Silja Kuusk, mtDNA 21S rRNA fragment 469bp

2.2.2 EtBr mutagenees *petite* mutantide tegemiseks

Petite mutantide valmistamiseks kasutasin etiidiumbromiidiga (EtBr) mutageneesi. Selleks kasvasin *wt* (w303a ja w303 α) pärmikultuuri 20ml YPD vedelsöötmes kuni tiheduseni OD₆₀₀=0,1-0,5. Tsentrifugeisin rakud kokku 3200rpm 5 min ja võtsin rakud üles 10ml 0,1M KHPO₄ (pH=6,5) puhvrts ja lahjendasin tiheduseni OD₆₀₀=0,1. Lisasin 2ml rakkudele EtBr, lõppkontsentratsioonidega : 0,3 μ g/ml; 1 μ g/ml ja 3 μ g/ml. Rakud kasvasid 30°C juures loksutis 180rpm 8 tundi ja vastavalt saadud tihedusele plaatisin igast EtBr kontsentratsiooniga kultuurist kahele YPD agarsöötmele rakke, et saaks tassidele umbes 200 ja 400 kolooniat. Valisin välja edasiseks analüüsiks 72 erinevat *petite* pärmi tüve: 2 eri paardumistüüpi, 3 eri EtBr kontsentratsiooni ja 12 eri kolooniat. Külvasin valitud tüved edasi kolm korda YPD tassidele, et saavutada tüvedes homogeensus.

2.2.3 PCR-id (*polymerase chain reaction*) ja plasmiidid

Töös kasutatud PCR reaktsioonid on toodud Tabelis 2 ja kasutatud praimerite järjestused koos seondumiskohtadega Lisas 1. PCR reaktsioonisegud olid enamasti 20µl, ainult deletsioonide transformatsiooni jaoks resistentsusgeeni amplifitseerimisel 50µl mahus. Reaktsioonisegu koosnes PCR puhvrast (75mM Tris-HCl puhver, pH=8,8; 20mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20), 2,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP-d (desoksüribonukleotiidtrifosfaadid), 10pmol praimerit, 2U-d Pfu/Taq ensüümi (4:1). Lisasin kas 50ng plasmidi, 30ng PCR produkti, 3µl kiirmeetodil puhastatud DNA-d või 1µl totDNA (totaalne puhas DNA) 50-100 x lahjendust. Lõpliku mahuni lisasin mQ (ultrafiltreeritud ja deioniseeritud) vett. Polümeraasi ja PCR puhvri valmistas Maie Loooris.

PCR produkti puhastasin edasiseks ensümaatiliseks töötlemiseks *Favorgen GEL/PCR Purification Kit*-i kasutades. Saadud DNA kontsentratsiooni määramiseks kasutasin *Nanodrop*-i.

Transformatsiooniks puhastasin PCR produkti tõstes mahu 0,2ml-ni ja töödeldes lahust fenool-kloroformiga, seejärel sadestasin lahuse 96% etanooli, Naatriumatsetaati (lõppkontsentratsioon 0,3M, pH=7) ja 60µg dekstraaniga. Pesin DNA-d 70% etanooliga ja võtsin üles mQ vees.

PCR produktid sekveneeriti vajadusel Eesti Biokeskuse tuumiklaboris.

Geenide deleteerimiseks kasutasin hügomütsiin B resistentsusgeeniga Hyg^R plasmidi pFa6a HphMX6 ja antibiootikumi G418-sulfaat resistentsusgeeniga Kan^R plasmidi pFa6a KanMX4, et amplifitseerida nendelt deleteeritava geeniga homoloogiliselt rekombineeruv PCR produkt. Mõlemad plasmiidid on toodetud *Euroscarf* firma poolt.

Tabel 2 PCR reaktsioonid. Tulpades vasakult paremale on toodud PCR-i eesmärk, praimerite nimetused, amplifitseeritava produkti suurus ja programmis on nimetatud ainult muutuvad parameetrid: praimerite seondumise temperatuur, sünteesi aeg ja PCR tsüklite arv.

PCR-i eesmärk	Praimerid	Tulemus	Programm
Ori järjestuse amplifitseerimine (ORI IN PCR)	ORI3IN ja ORI5IN	280bp	Praimerite seondumine 53°C Süntees 35 sek

			30 tsüklit
Orist välja jääva järjestuse amplifitseerimine (ORI OUT PCR)	ORI3OUT ja ORI5OUT	Soovitavalt 1-3kb	Praimerite seondumine 53°C Süntees 1 min 30 sek / 2 min 30 tsüklit
Ori piirkonna radioaktiivne märg	ORI3IN ja ORI5IN	280bp	Praimerite seondumine 53°C Süntees 35 sek 15 tsüklit
Orist välja jääva piirkonna radioaktiivne märg	ORI3OUT ja ORI5OUT	A1207 ori6 – 900bp A1328 ori2 - 1100bp	Praimerite seondumine 53°C Süntees 1 min 35 sek 15 tsüklit
HphMX6 amplifikatsioon plasmiidilt pFA6a Hmi1 deleteerimiseks	HmiS1 ja HmiS2	2kb	Praimerite seondumine 53°C Süntees 35 sek 35 tsüklit
KanMX4 amplifikatsioon plasmiidilt pFA6a Hmi1 deleteerimiseks	HmiS1 ja HmiS2	1,8kb	Praimerite seondumine 54°C Süntees 2min 40 sek 35 tsüklit
Hmi1 deletsiooni kontroll (Hmi1 asendamine HphMX kassetiga)	HmiPSeq ja HmiTermRev	2kb	Praimerite seondumine 53°C Süntees 35 sek 30 tsüklit

Hmi1 deletsiooni kontroll KanMX asendusega	HmiPSeq ja HmiTermRev	1,8kb	Praimerite seondumine 53°C Süntees 35 sek 30 tsükli
Rpo41 deletsiooni kontroll KanMX asendusega	KanMX3 ja Rpo41 5UP		Praimerite seondumine 54°C Süntees 2min 30 tsükli

2.2.4 Pärm DNA eraldamine (kiirmeetod)

PCR-i jaoks (kui edasi polnud PCR produkti vaja kasutada) eraldasin pärm DNA kiirmeetodiga, sest DNA amplifitseerimiseks on selle meetodiga saavutatav DNA puhtus piisav. Kiirmeetodi pärm DNA puhastamiseks töötasid välja Lööke *et al.*, antud töös kasutasin sama protokolliga minimaalsete muudatustega (Lööke *et al.*, 2011). Selles protokollis lõhutakse rakumembraanid LioAc ja naatriumdodetsüülsulfaadi (SDS) koosmõjul. Eraldatud DNA jääb vesifaasi, aga muud raku komponendid tsentrifuugitakse enne kasutamist suures osas põhja. DNA eraldamiseks suspendeerisin 3 kolooniat rakke 100µl 200mM LioAc ja 1% SDS lahuses ja kuumutasin segu 10 minutit 70°C peal. Lisasin 300µl 96% etanooli ja lasin DNA-l sadeneda 2 minutit toatemperatuuril. Tsentrifugeisin 3 minutit 13400rpm kasutades Eppendorf Centrifuge 5415C tsentrifuugi ja pesin DNA-d 500µl 70% etanooliga. Tsentrifugeisin 2 minutit samadel pööretel ja kuivatasin sadet 37°C peal 4 minutit etanooli jääkide eemaldamiseks. Võtsin DNA üles 100µl T₁₀E_{0,1}-s ning PCR-i jaoks tsentrifuugisin muud raku komponendid põhja 1 minut 13400rpm ja kasutasin 3-4µl supernatanti. Selliselt puhastatud DNA-d hoidsin -20°C peal ja kasutasin ära ühe nädala jooksul.

2.2.5 Pärm totaalse DNA eraldamine

Restriktsiooniks, *Southern blot* analüüsiks, transformeeritava fragmendi ja sekveneeritava järjestuse amplifikatsiooniks eraldasin puhtama totaalse DNA (totDNA). Pärm totaalse DNA eraldasin modifitseeritud protokolliga: „Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2005 Edition“ (Amberg, 2005.).

Meetod põhineb Zymolaasiga pärmi rakukestade lüüsimisel, Proteinaas K-ga valkude lagundamisel ja fenooltöötlusega DNA puhastamisel. Eralduseks kasvasin pärmi rakke 4ml vedeleas YPD söötmes 30°C juures 12-16h. Tsentrifugeisin kultuuri 1 minut 13400rpm Eppendorf Centrifuge 5415C toatemperatuuril (edaspidi kasutasin sama tsentrifuugi, samadel pööretel, kui pole kirjas teisiti). Eemaldasın rakkudelt söötme ja kaalusin rakkude kuiva massi zymolaasi koguse arvutamiseks. Suspendeerisin rakud 500µl sorbitooli lahuses (1M sorbitool; 10mM Tris pH 8; 10mM EDTA). Vastavalt rakkude massile lisasin Zymolaasi lahust (20T) nii, et Zymolaasi kontsentratsioon oleks 4mg/1g rakkude kohta. Lüüs toimus 37°C juures 15-20 minutit, seejärel tsentrifuugisin lüüsitud rakud põhja 1 minutiga ja eemaldasın supernatandi. Võtsın sademe üles 500µl T₅₀E₂₀ lahuses (50mM Tris pH 7,5; 20mM EDTA). Täiendavaks lüüsiks lisasin 50µl 10% SDS-i (naatrium dodetsüülsulfaat) ja inkubeerisin segu 30 minutit 65°C juures. Järgnevalt lisasin 200µl jääkülma 5M KoAC ja hoidsın segu jääl 40 minutit kuni 1h. Tsentrifugeisin lüsaadi 4°C juures 3 minutit ja tõstsın supernatandi uude tuubi. Sadestasin DNA võrde ruumala isopropanooliga ja tsentrifuugisin DNA põhja 1 minutiga, eemaldasın supernatandi ja pesın sadet 100µl 80% etanooliga. Järgnevalt viisin läbi Rnaas A töötlust. Selleks lisasin sadestatud DNA-le 100µl T₁₀E₁ lahuses RnaasA-d (10 mM Tris pH 7; 1 mM EDTA; 20 µg/ml RnaasA) ning hoidsın 30 minutit 65°C juures. Valkude lagundamiseks lisasin 100µl 2X Proteinaas K puhvrit (1% SDS; 10 mM Tris pH8; 10 mM EDTA) ja 0,5mg/ml Proteinaas K-d ning inkubeerisin segu 55°C juures 40-50 minutit. DNA puhastamiseks peptiidsetest jääkidest tegin lahusele fenooltöötlust. Lisasin 100µl fenool/kloroformi (pH 7,5), segasin tuubi pidevalt 10 min jooksul ja tsentrifuugisin 1 minut fenooli ja vesifaasi eraldamiseks. Pealmise vesifaasi tõstsın uude tuubi ja sadestasin DNA 2,5-kordse mahu 96% etanooliga. Kui sadenemist oli märgata kohe tuubide pööramisel, siis hoidsın lahust 15 minutit toatemperatuuril, vastasel juhul 15 minutit -20°C juures. Tsentrifugeisin sademe põhja 8000rpm 5 minutit ja pesın sadet 80% etanooliga. Pestud sademe võtsın üles 30-50µl T₁₀E₁ lahuses, olenevalt sademe suuruselt. Hoidsın DNA lahust üleöö 4°C juures, et DNA lahustuks. Enne kasutamist määrasın agarosgeelelektroforeesil või *Nanodrop*-iga DNA kontsentratsiooni.

2.2.6 Restriksioon

Restriksiooni viisin läbi 25µl mahus. Kõik kasutatud ensüümid ja vastavad puhvrid on toodetud firma *Thermo Scientific* poolt. DNA lõikamiseks restriктаasidega jälgisin tootja poolt

ette antud juhendeid. totDNA ja mtDNA-d restrikteerisin 5U (*Unit-i*) restriктаasiga 3 tundi. Restriksioonil saadud fragmentide suurust kontrollisin agarosgeelelektroforeesil 3V/cm.

2.2.7 Transformatsioon

Transformatsiooniks kasutasin liitiumi katioonidega pärmi kompetentseks muutmisel põhinevat protokollit modifitseeritud varianti (Ito et al., 1983). Muudatusena on lisatud protokollit ka dimetüülsulfoksiidi (DMSO) kasutamine (Hill et al., 1991).

Rakud kasvasin 20ml YPD-s kuni $OD_{600}=0,4-0,5$ ja tsentrifuugisin 3 minutit 3200rpm rakud põhja, pesin rakke mQ H₂O-ga. Võtsin rakud üles 0,1M 1ml LioAc/T₁₀E₁ lahuses ja tsentrifuugisin 1 minut 3700rpm. Suspendeerisin rakud uuesti 50µl samas lahuses ja inkubeerisin 20 minutit 30°C. Samal ajal valmistasin ette *carrier*- ehk kandja-DNA transformatsiooni hõlbustamiseks, selleks inkubeerisin DNA-d 95°C 5 minutit, et see denatureeruks ja hoidsin sama kaua jääl. Lisasin rakkudele 100µg denatureeritud kandja-DNA-d ja 0,5-1µg transformeeritavat DNA-d. Segasin DNA rakkudega vortexil ja inkubeerisin rakke uuesti 30°C juures 20 minutit. Lisasin rakkudele 300µl 40% polüetüleenglükooli molekulmassiga 4000, 0,1M LioAc/ T₁₀E₁ lahust ja inkubeerisin vähemalt 30 minutit 30°C juures. Seejärel tegin DNA sisestamiseks rakkudele kuuma šoki inkubeerides neid 10 minutit 42°C peal. Lisasin 35µl 100% dimetüülsulfoksiidi (DMSO). Tsentrifugeerisin rakud põhja 1 minutiga 3700rpm ja võtsin üles 3ml YPD vedelsöötmes. Peale vähemalt 8 tundi kasvatamist 30°C juures plaatin transformeeritud rakud vastava antibiootikumiga söötmetassidele. Selleks tsentrifuugisin rakud põhja 1 minutiga 3700rpm ja võtsin üles 80µl autoklaavitud mQ vees. Plaatimisel kasutasin spaatlit, kuid hõõrdumise minimaliseerimiseks ajasin rakud laiali ühe või kahe tõmbega ja lasin tassidel kuivada.

Hmi1 deleteerimiseks amplifitseerisin plasmiidilt pFa6a HphMX6 hügromütsiin B resistentsusgeeni Hyg^R ja plasmiidilt pFa6a KanMX4 G418 resistentsusgeeni Kan^R. Kasutasin kahte erinevat transformatsiooni markerit, et edaspidi oleks võimalik topelmutantide tegemisel valida erinevate markerite vahel. Amplifitseerimiseks kasutasin Hmi1S1 ja Hmi1S2 praimereid, et amplifitseeritavad KanMX ja HphMX kassetid omaksid Hmi1 geeni äärealadega homoloogilist järjesust transformatsiooni toimumiseks. Produkti suurust (KanMX puhul 1800bp, HphMX puhul 2000bp) kontrollisin agarosgeelelektroforeesil ja puhastasin fenool-kloroform töötlusega ja sadestades 96% etanooliga. RPO41 deleteerimiseks kasutasin RPO41

geeni äärealadega homoloogset KanMX PCR produkti pFA6a KanMX plasmiidilt. Pärast transformatsiooni ja selektiivsel söötmel kasvamist tembeldasin kolooniad ümber, et saada lahti liigsest transformeerumata rakkude massist.

2.2.8 Southern blot

Southern blot meetodit kasutasin agarosgeelilt DNA kandmiseks nailonfiltrile ja sellel mtDNA spetsiifiliseks visualiseerimiseks radioaktiivse prooviga. Enne DNA üle kandmist pildistasin geeli ka UV-valguses, et hiljem oleks võimalik peale märkida DNA suurusmarker. DNA üle kandmiseks nailonfiltrile kasutasin kahte erinevat meetodit – neutraalset ja aluselist. Töö alguses kasutasin nailonfiltreid, mis olid mõeldud neutraalse ülekande jaoks, kuid hiljem läksin üle aluselisele ülekandele, et filtrile ei kanduks RNA.

Neutraalse ülekande puhul loksutasin geeli DNA denatureerimiseks 30 minutit aluselises lahuses Sol A (1,5M NaCl, 0,5M NaOH, $\text{pH} \geq 12$) ja lahuse jääkide eemaldamiseks pesin geeli mQ veega. Neutraliseerimiseks loksutasin geeli 2 korda 15 minutit Sol B lahuses (1M Tris-HCl, 1,5M NaCl, $\text{pH} = 7,5$). DNA denatureerimine soodustab selle ülekannet geelilt filtrile. Edasine ülekanne toimus 10xSSC puhvris (1,5M NaCl, 150mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, $\text{pH} = 7$). Aluselisel ülekandel denatureerisin geelis oleva DNA aluselises puhvris (0,4M NaOH, 0,6M NaCl). Kuna ülekanne toimus samas lahuses, siis ei olnud vaja geeli neutraliseerida.

Denatureeritud DNA-ga geeli asetasin ülekandeks whatman 3MM filterpaberitega sillale, mis ulatus ülekandepuhvriga vanni nii, et puhver imendus silda. Geeli peale panin mQ vees hoitud nailonfiltri ja selle omakorda katsin whatman 3MM filterpaberi ja paberkäterätikutega. Enne paberkäterätikuid immutasin igat ülekande osa ülekandepuhvris ja eemaldasin *blot*-ile asetamisel tekkinud mullid klaaspipetiga rullides. Paberkäterätikute tekitatud kapillaarsuse toimele imendus ülekandepuhver aina ülemistesse kihtidesse ja koos sellega liikus ka DNA geelilt nailonfiltrile. Ülekanne kestis nii kaua kuni puhver oli jõudnud *blot*-i ülemistesse kihtidesse ehk umbes 18-20h.

Peale ülekannet eemaldasin blotilt nailonfiltri ja aluselisel ülekandel loksutasin Sol-B lahuses 2 korda 10 minutit ning lasin filtritel kuivada. DNA paremaks kinnitumiseks filtrile kiiritasin seda UV-valguses neutraalse ülekande puhul kuni 120mJ 24 sekundit, aluselisel 60mJ 12 sekundit, sest aluselisel ülekandel on DNA osaliselt kinnitunud juba filtrile.

Radioaktiivsete hübridisatsiooniproovide tegemiseks amplifitseerisin dsDNA PCR abil (Sambrook ja Russell, 2001). Märkimiseks kasutasin PCR reaktsioonis radioaktiivse fosforiga (^{32}P) α dCTP nukleotiide. 1-dimensionaalse agarosgeelelektroforeesi puhul amplifitseerisin mitokondriaalselt ori2-lt 280bp suuruse radioaktiivselt märgistatud fragmendi (ori2 proov). 2D AGE jaoks valmistasin hübridisatsiooniproovi, mis kattis kogu *rho*⁻ genoomi mtDNA järjestuse (totaalne proov). Selleks amplifitseerisin radioaktiivselt märgistatud fragmendi nii ori2-lt, ori6-lt kui ka ori-de vahelistelt aladelt ja segasin kahe PCR-i (ORI IN ja ORI OUT) produktid kokku üheks totaalseks prooviks. Radioaktiivsete proovide tegemiseks kasutatud praimerid on näidatud Tabelis 2. Radioaktiivse märgisega PCR produkti tegemist ja puhastamist aitas läbi viia Tiina Sedman kasutades fenool-kloroform töötlust ja ümbersadestamist etanooliga (Sambrook ja Russell, 2001).

Filtreid prehübridiseerisin 30ml *Church* puhvriga (1mM EDTA; 7% SDS; 0,5% BSA; 0,5M NaPO₄ pH 7,5) 65°C juures 30 minutit 9rpm pöörlevates klaastorudes. Seejärel kallasin lahuse minema ja lisasin 25ml uut *Church* puhvrit ning 5 min 95°C juures denatureeritud radioaktiivset proovi ning hübridiseerisin jätkuvalt 65°C vähemalt 6 tundi.

Peale hübridisatsiooni kallasin hübridisatsiooni puhvri 50 ml topsi ning panin radioaktiivsete jäätmete konteinerisse. Lisasin 30ml pesu puhvrit (1mM EDTA; 5% SDS; 40 mM NaPO₄ pH 7,5), keerutasin torusid ning eemaldasın puhvri. Seejärel pesin filtreid 2 korda 15 minutit 65°C 30ml pesu puhvriga. Radioaktiivse töö juures aitas mind minu juhendaja Tiina Sedman.

Kuivatasin filtrid, katsin need kilega ja jätsin olenevalt signaali tugevusest 2 tunniks kuni 3 päevaks *Amersham Biosciences Storage Phosphor* ekraaniga kassetti eksponeerima. Skanneerisin ekraanid *Typhoon Phosphoimager* masinas ja vajadusel tegin filtrist pikema või lühema eksponeerimise.

2.2.9 Hüpersupressiivsustest

Hüpersupressiivsuse testimiseks ristasin teadmata supressiivsusega *rho*⁻ LEU2⁺ tüve wt URA3⁺ tüvega ja kontrolliks ristasin wt URA3⁺ tüvesid ka teadaoleva neutraalse N35 LEU2⁺ tüvega ja hüpersupressiivse HS61 LEU2⁺ tüvega. Selleks kasvasin iga tüve 3ml YPD vedelsöötmes 8 tundi 30°C loksutis 180rpm. Külvasin ristatavad tüved 2ml YPD söötmesse lisades kumbagi tüve 100µl. Ristamiskultuuri inkubeerisin 30°C peal 90 minutit, tsentrifuugisin rakud põhja 5 minutit 2000rpm. Seejärel eemaldasın rakkudelt söötme ja hoidsin 15 minutit

toatemperatuuril. Võtsin rakud uuesti üles 0,5ml YPD-s ja inkubeerisin 2 tundi 30°C juures vahepeal raputades. Lahjendasin 25µl rakke 1ml autoklaavitud mQ vees. Lahjendusest plaatisin -LEU -URA SC tassidele 50µl rakukultuuri (vaata 2.2.1 Pärimistüved ja söötmed). Ilma URA ja LEU-ta söötmel kasvavad ainult ristunud tüved. Saadud kolooniate fenotüübi järgi saab järeldada *petite* tüvede supressiivsuse: metsiktüüpi ehk punased kolooniad viitavad neutraalsusele ja valged *petite* kolooniad *rho⁻* genoomi supressiivsusele.

2.2.10 Mitokondriaalse DNA eraldamine

Kasvatasin 50ml-st vahelahjendusest 0,5-1l pärmikultuuri kuni OD₆₀₀ ~ 0,8. Tsentrifuugisin rakud RC5 tsentrifuugiga, GS3 rootoriga 10 minutit 6000rpm 4°C. Pesin rakke ~ 40ml ddH₂O-ga ja tõstsin vees üles võetud rakud kaalutud 50ml tuubi. Tsentrifuugisin rakke 5 minutit 3200rpm Hettich Universal 32R tsentrifuugis (järgnevad tsentrifuugimised tegin sama fuugiga) toatemperatuuril. Kaalusin rakud ja pesin 1,2M sorbitooli lahusega. Tsentrifuugisin rakud samamoodi nagu eelnevalt ja võtsin üles 1,2M sorbitooli ja 20mM KHPO₄ (pH=7,5) lahuses vastavalt rakkude massile (0,15g rakke/ml). Lisasin zümolaasi (20T), 8mg zümolaasi 1g rakkude kohta. Lüüsimise toimumiseks hoidsin tuube 30°C juures loksutis 30-50rpm 15-20 minutit. Siis jahutasin tuubid jääl ja seejärel tsentrifuugisin rakumassi 3200rpm 5 minutit 4°C peal, eemaldasın supernatandi. Homogeniseerimiseks suspendeerisin rakud 0,6M sorbitooli, 10mM Tris (pH=7,5), 1mM EDTA (etüleendiamiintetraatseethape, pH=8), 0,1% veise seerumi albumiini (BSA) ja 1mM proteaasi inhibiitorit fenüülmetüülsulfonüül fluoriidi (PMSF) sisaldavasse homogenisatsioonipuhvriss vastavalt rakkude massile – 0,15g/ml. Homogenisatsiooniks kasutasin klaasist *dounce*-i ehk uhmrit ja kitsast uhmrinuia (*tight pestle*). Homogeniseerisin 18 tõmbe ja lükkamisega (*strokes*) ja saadud vedeliku tsentrifuugisin mitokondrite põhja sadestamiseks 9000rpm 10 minutit 4°C juures. Eemaldasın supernatandi ja suspendeerisin mitokondrid homogenisatsioonipuhvriss ilma PMSF-i ja BSA-ta, tsentrifuugisin mitokondrid põhja samadel tingimustel. Võtsin mitokondrid üles 0,6ml-s lüüsipuhvriss (75mM NaCl, 50mM EDTA, 1% SDS, 0,5mg/ml Proteinaas K), lõppruumalaks jäi 0,8-1ml. Lüüs toimus 37°C peal 30 minutit. Järgnevalt puhastasın mtDNA lüüsil tekkinud valkudest ja membraanidest. Selleks viisin ruumala 4ml peale T₁₀E₁ lahusega. Viisin läbi fenool/kloroformi töötlust kolmes korduses lisades 2ml fenool/kloroform (pH=7,5), segades tuube 10 minutit ja fuugides 5000rpm 10 minutit. Fenoolijääkide eemaldamiseks viisin läbi ka kloroformi töötlust

lisades 1ml kloroformi, segades tuubi 5 minutit ja fuugides 5000rpm 5 minutit. Sadestasin DNA lahusest 2-kordse mahu 96% etanooliga (ca 6ml). Kui sadet oli kohe näha, siis hoidsin tuube toatemperatuuril 5 minutit, vastasel juhul 20 minutit jääl. Tsentrifuugisin sademe põhja 4500rpm 5 minutit. Pesin sadet 0,5ml 80% etanooliga ja võtsin sademe üles 0,1-0,4ml T₁₀E₁-s vastavalt sademe suurusele. Jätsin sademe lahustuma üleöö 4°C peale. Suspendeerisin lahust restrikteeritud pipetiotsikutega, et mitte kahjustada replikatsiooni intermediaatide struktuure. Määrasin geelelektroforeesil erinevate tüvede mtDNAde kontsentratsiooni suhte ja tegin vastavad lahjendused ja allikvoodid. Säilitasin kuni 20µl allikvoodid -80°C juures.

2.2.11 2-dimensiooniline agarosgeelelektroforees

Replikatsiooni intermediaatide (RI) analüüsiks kasutasin 2-dimensionaalset agarosgeelelektroforeesi (2D AGE). Selleks kasutasin Friedman ja Brewer'i välja töötatud protokoll RI analüüsiks väikeste kohandamistega (Friedman and Brewer, 1995). 2D AGE esimeses dimensioonis (1. D) eraldatakse DNA fragmendid suuruse järgi ja teises dimensioonis (2. D) suuruse ja kuju järgi.

Kõik agarosigeelid valmistasin SeaKem.LE agarosist. 1. D restrikteerimata mtDNA voolutasin 0,5% TAE (40mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 20mM etaanhape) agarosis TAE puhvris ilma EtBr 1V/cm ehk 25V 17h. Järgnevalt loksutasin geeli 20 minutit 400ml TAE puhvris, milles oli 600ng/ml EtBr. Lõikasin geelilt mtDNA geeliribad koos hambaga välja, paigutasin horisontaalselt elektrivoolu suunaga uue 1,2 % TAE agarosgeeli, milles oli 300ng/ml EtBr ning sulatasin riba 0,5% kuuma agarosiga. 2.D forees toimus pingel 125V ehk 5V/cm ja 4°C juures 5h, foreesi TAE puhvrissi lisasin 300ng/ml EtBr. Pildistasin geeli UV valguses koos 1.D geelist välja restrikteeritud markeriga.

Restrikteeritud mtDNA puhul kasutasin geelide valmistamiseks ja voolutamiseks 1x TBE puhvrit (89 mM Tris, 89 mM boraat, 2 mM EDTA). 1. D jaoks kasutasin 0,5% agarosi ja voolutasin 17h ilma EtBr TBE puhvris 25V (1V/cm). 2. D jaoks kasutasin 1,5% agarosgeeli koos 300ng/ml EtBr-ga, voolutasin 125V (5V/cm) 4°C juures 6h. Edasi analüüsisin geele *Southern blot* meetodil.

2.2.12 Pärmirakkude DNA värvimine DAPI-ga

Pärmimikroskoobi preparaatide valmistamiseks fikseerisin rakud alusklaasile etanooliga ja DNA värvimiseks kasutasin DAPI-t (4,6-diamidiino-2-fenüülindool), mis seondub DNA-ga ja fluorestseerub UV-valguse käes siniselt (Williamson and Fennell, 1975). Fluorestsentsi hajumise vähendamiseks lisasin *antifade*-i (90% glütserool, 1mg/ml p-fenüleendiamiini PBS-s). Mikroskoopimiseks kasutasin Olympus BX61 fluorestsentsmikroskoopi.

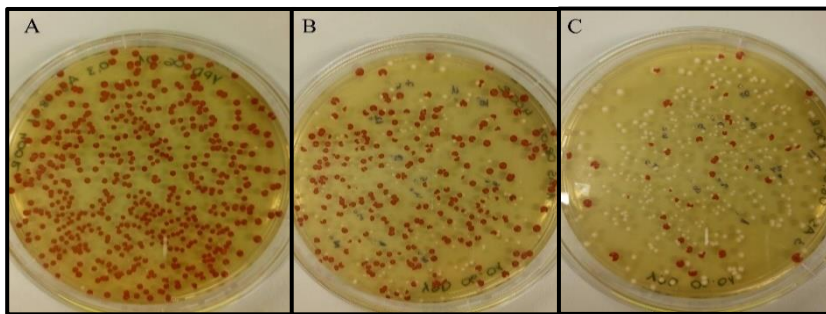
Suspendeerisin 1-2 koloonia jagu pärmirakke (YPD söötmega tassidelt) 100µl mQ H₂O-s. Tsentrifugeerisin rakke 5000rpm 1 minut Eppendorf Centrifuge 5415 C tsentrifuugis (edaspidi samadel tingimustel). Eemaldasın supernatandi, lisasin 100µl 96% etanooli fikseerimiseks ja inkubeerisin 10 minutit -20°C peal. Tsentrifugeerisin rakud põhja ja pesin 100µl mQ H₂O-ga. Peale tsentrifuugimist ja pealmise vedeliku eemaldamist suspendeerisin rakud 50µl DAPI lahuses (1µg/ml) ja hoidsin toatemperatuuril 1 minut. Tsentrifugeerisin, eemaldasın supernatandi ja pesin rakke 4 korda 100µl mQ H₂O-ga. Võtsin rakud üles 50µl mQ H₂O-s ja kandsin 1-2 tilka alusklaasile hõõrudes rakud pipeti otsiku küljega laiali. Kuivatasın alusklaasid 50°C peal 1 minutiga ja lisasin paar tilka *antifade*-i. Katsin rakud katteklaasiga ja hoidsin preparaate pimedas. Pildistamiseks kasutasın fluorestsentsmikroskoopi Olympus BX61 objektiivi 100x suurendust.

2.3 Tulemused

Siiani on veel selgusetu, kuidas toimub replikatsiooni initsiatsioon nii funktsionaalse mtDNA-ga ρ^+ kui mutantsetes ρ^- tüvedes ning millised rollid on selles transkriptsioonil ja rekombinatsioonil. Samuti ei ole teada hüpersupressiivsuse mehhanism. Antud uurimustöö keskendub respiratoorselt defektsete mutantide (ρ^- tüvede) replikatsiooni uurimisele. Selleks uuritakse kahte erineva supressiivsusega ρ^- mutanti – hüpersupressiivne a1328 ori2 ja supressiivne a1207 ori6. ρ^- tüvede mtDNA replikatsiooni intermediaate (RI) analüüsitakse 2-dimensionaalsel agarosgeelelektroforeesil (2D AGE) ja saadud RI-d kvantiteeritakse. Seejärel uuritakse lähtuvalt kahest mtDNA replikatsiooni initsiatsiooni mudelist kahe valguga, mitokondriaalse helikaasi Hmi1 ja RNA polümeraasi Rpo41, mõju RI-de topoloogiale ja hulga. Hmi1 helikaasil on välja käidud roll mtDNA rekombinatsioonilistes protsessides ja RNA polümeraas Rpo41 sünteesib mitokondris mRNA, aga võimalik, et ka replikatsiooni praimereid. Uuritavad valgud deleteeritakse ρ^- tüvedest ja mtDNA replikatsiooni intermediaate analüüsitakse 2D AGE meetodil. Lisaks analüüsitakse mtDNA nukleotide DAPI-ga värvimise teel

2.3.1 ρ^- mutantide valmistamine EtBr mutageenesis

ρ^- tüvede saamiseks kasutasin mtDNA destabiliseerimiseks EtBr mutageenesis. Kasutasin kolme erinevat mutageeni kontsentratsiooni, et kindlustada *petite* kolooniate teke (Joonis 6).



Joonis 6. EtBr mutageenesis saadud kolooniad erinevatel mutageeni kontsentratsioonidel. Kõrgema EtBr kontsentratsiooniga tekib märgatavalt rohkem valgeid *petite* kolooniaid. (A) 0,3µg/ml. (B) 1µg/ml. (C) 3µg/ml.

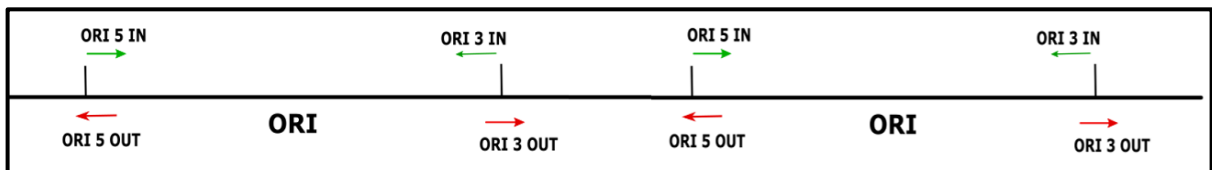
Mutageneesiks valisin tüve w303 a ja α paardumistüübi. Antud tüve fenotüübiks on respiratoorse aktiivsuse korral tekkivad punased kolooniad. Mittefunktsionaalse mtDNA genoomiga *petite* mutandid ei ole võimelised kasutama OXPHOS rada ega tootma punast pigmenti, mistõttu tekivad väikesed valged kolooniad. Tabelis 3 on toodud mutageneesil saadud *petite* fenotüübiga kolooniate osakaal kõigist kolooniatest. Valisin kokku 72 kolooniat, mida analüüsisin edasi.

Tabel 3. EtBr mutageneesi *petite* kolooniate osakaal kogu kolooniate arvust. Esimeses tulbas on toodud mutageneesiks kasutatud pärmi tüve w303 paardumistüüp, järgnevalt on märgitud EtBr kontsentratsioonid, mille juures pärm kasvas mutageneesi käigus. Igast eri EtBr kontsentratsiooniga (0,3µg/ml, 1µg/ml ja 3µg/ml) kultuurist külvasin välja kahele tassile erineva koguse rakke. Viimases tulbas on näidatud *petite* kolooniate arv kogu kolooniate arvust ja sellest saadud *petite* kolooniate osakaal protsentides.

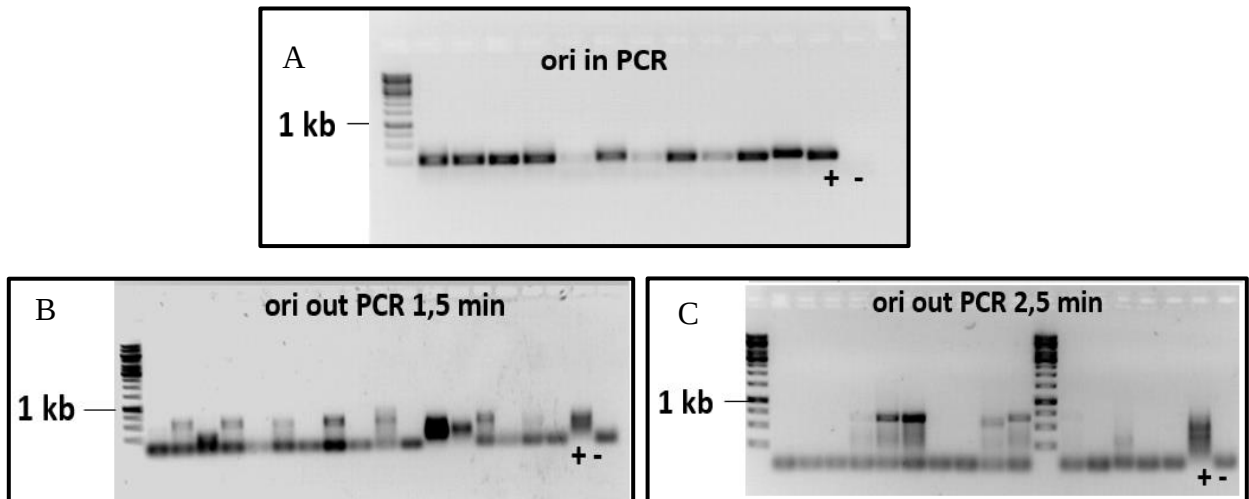
Paardumistüüp	EtBr kontsentratsioon (µg/ml)	<i>Petite</i> kolooniate osakaal % - des (<i>petite</i> kolooniad / kõik kolooniad)
a	0,3	11 / 64 = 17%
a	0,3	8 / 97 = 8%
a	1	17 / 45 = 38%
a	1	22 / 55 = 40%
a	3	65 / 74 = 88%
a	3	73 / 83 = 88%
α	0,3	25 / 61 = 41%
α	0,3	41 / 176 = 23%
α	1	32 / 51 = 63%
α	1	57 / 128 = 44%
α	3	51 / 72 = 71%
α	3	74 / 101 = 73%

2.3.2 *Petite* mutantide analüüs PCR meetodil

Saadud *petite* kolooniate seast *rho*⁻ tüvede leidmiseks puhastasin neist igast (72 tk) totaalse DNA kiirmeetodil ning viisin läbi PCR-i ori järjestuse amplifitseerimiseks kasutades ORI3IN ja ORI5IN praimereid ning orist välja jääva piirkonna amplifitseerimiseks kasutasin ORI3OUT ja ORI5OUT praimereid (Joonis 7). Positiivse kontrollina kasutasin a1184 *rho*⁻ tüve, mille ori pikkus on 276bp ja orist välja jääva piirkonna amplifitseerimisel saab 908bp produkti. Saadud 72 *petite* mutandist 54 tüvel amplifitseerus PCR-ga ori järjestus ja nendest 21 tüvel orist välja jääv ala suurusega 300-900bp (Lisa 2 ja Lisa 4). Seega olid nende 54 koloonia rakkudes säilinud *rho*⁻ mtDNA. Saadud produktide suurust kontrollisin agarosgeelelektroforeesil (Joonis 8).



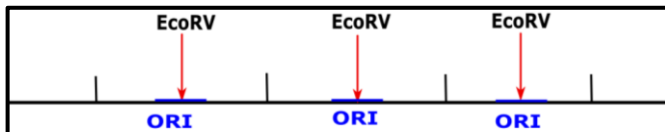
Joonis 7. PCR ori ja orist välja jääva ala amplifitseerimiseks. Ori järjestuse amplifitseerimiseks kasutasin rohelistega märgitud praimereid ORI5IN ja ORI3IN. Orist välja jääva ala jaoks punastega märgitud ORI5OUT ja ORI3OUT praimereid.



Joonis 8. Näited ori ja orist välja jäävate alade amplifitseerimisest. Positiivne kontroll (+) on tüvi a1184 (A) Ori piirkonna amplifitseerimisel peab tekkima veidi alla 300bp suurune produkt. Ori-st välja jääva ala amplifitseerimisel kasutasin erinevaid sünteesiaegu: (B) 1,5min ja (C) 2,5min, sest soovitatav produkti suurus oli ca 1-3kb.

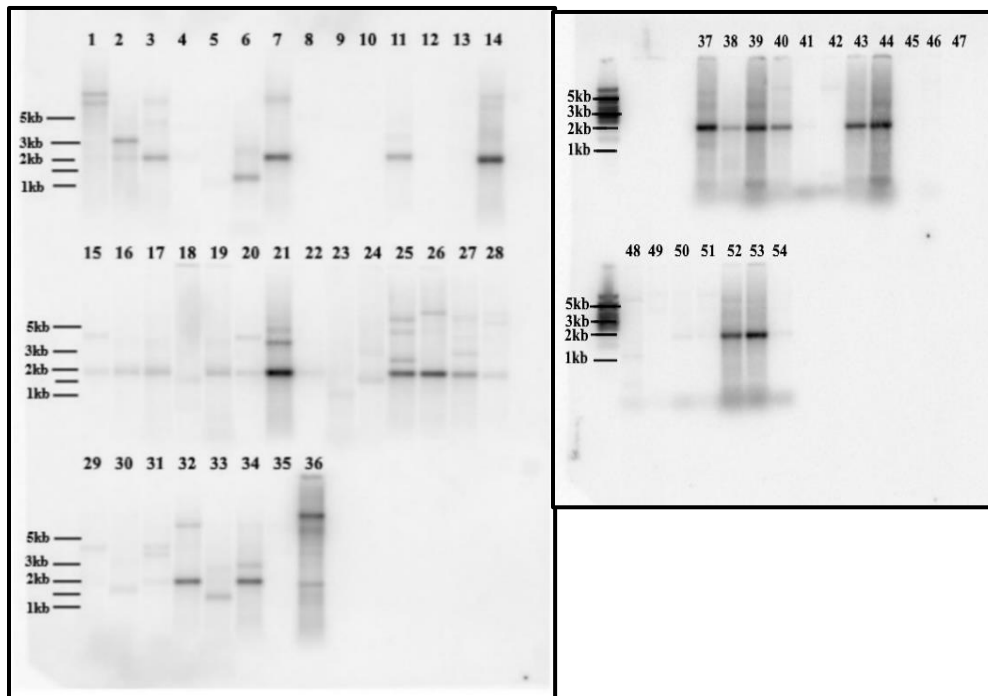
2.3.3 *Rho*⁻ mutantide analüüs *Southern blot*-il ja tüvede valimine

Rho⁻ mtDNA analüüsiks *Southern blot*-il tuli esmalt eraldada puhtam ja suurem kogus totaalset DNA (totDNA). Analüüsiks kasutasin 54 tüve, millel õnnestus amplifitseerida ori järjestus. Restrikteerisin DNA-d ensüümiga EcoRV, mis lõikab mtDNA-d kõigis kaheksas mtDNA-s olevas ori järjestustes (Joonised 1 ja 9) (kontrollisin programmiga Ncbutter V2.0 New England Biolabs). Kui restriктаas lõikab mtDNA-d ainult ühest kohast, siis näeb ära ka 1N fragmendi (*rho*⁻ tüve mtDNA korduva fragmendi ühe ühiku) suuruse.



Joonis 9. EcoRV lõikesait *rho*⁻ genoomis. Mustade joontega on märgitud *rho*⁻ 1N korduv fragment. *Rho*⁻ genoomis, kus on olemas ori järjestus lõikab ensüüm EcoRV mtDNA-d B box-i eest. Nii saab teada mutandi mitokondriaalse genoomi 1N fragmendi suuruse.

Saadud restriksiooni produkte jooksutasin 0,9% agarosgeelelektroforeesil ja mtDNA-spetsiifiliseks visualiseerimiseks kasutasin *Southern blot* meetodit.

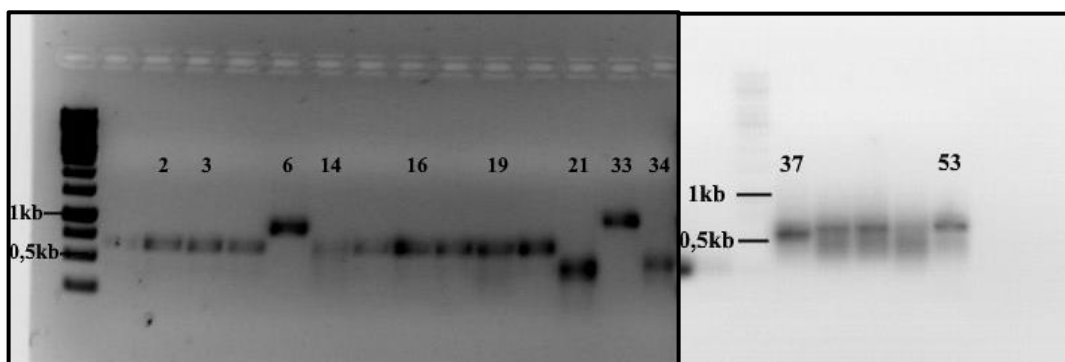


Joonis 10. *Rho*⁻ mutantide (tüved 1-54) totaalse DNA restriksioon EcoRV-ga ja *Southern blot*. Mutageneesil saadud *rho*⁻ tüvedest, millel õnnestus amplifitseerida PCR-ga ori järjestus (54 tüve, igal rajal märgitud tüve number), eraldas totDNA, restrikteerisin EcoRV ensüümiga ja kontrollisin ori olemasolu ka *Southern blot*-iga kasutades mitokondriaalset ori2 spetsiifilist radioaktiivset hübriidisatsiooniproovi.

Kandsin geelilt DNA nailonfiltrile neutraalse ülekandega ja hübridisatsioonil kasutasin mtDNA spetsiifilist ori2 radioaktiivset proovi. *Southern bloti* pildid on toodud Joonisel 10. Sama katse tegin läbi esimese 36 tüve puhul ka teise ensüümiga HpaII, mis lõikab mtDNA-d enamikest ori-dest (va ori6) (Lisa 3).

Saadud restriksioonifragmentide pikkused on toodud Tabelis 4. Enamus fragmente olid 1-3kb suurusel, kuid väga palju domineeris üks kindel 2,1kb fragment, mis tähendas, et tegemist võis olla samat mtDNA fragmenti sisaldava tüvega.

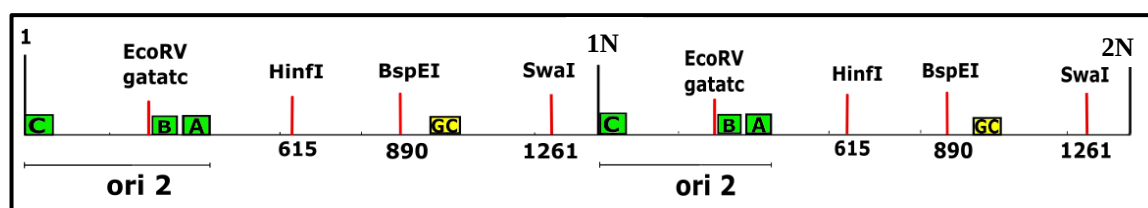
Edasi kasutasin sama totaalset DNA-d uuesti PCR-i jaoks, et proovida uuesti amplifitseerida orist välja jääv ala, kuna paljudel tüvedel ei tulnud lühema protokolliga puhastatud DNA-st PCR reaktsioon välja või oli produkti suurus halvasti määratav (Lisa 2). Proovisin ka erinevaid sünteesiaegu ja DNA lahjendusi kuni leidsin sobivad tingimused. Sobiva fragmendi pikkusega ja selge PCR produktiga tüvede (tüved nr. 2, 3, 6, 14, 16, 19, 21, 33, 34, 37 ja 53) PCR produktid lasin sekveneerida (Joonis 11). Täpselt samasuguse fragmendi pikkusega tüvedest valisin kaks kuni kolm (tüved 2 ja 3 ning 14, 16 ja 19), sest suure tõenäosusega oli tegemist samade tüvedega. Selle töö läbiviimiseks lõikasin agarosgeelilt välja ORI OUT PCR produkti ja puhastasin geelist DNA. Mõõtsin DNA kontsentratsiooni peale puhastamist Nanodropiga ja vajadusel sadestasin DNA ümber, et kontsentratsioon oleks 30-50ng/µl. Sekveneerimiseks kasutasin ORI5OUT praimerit. Sekveneerimistulemuste kvaliteeti ja järjestust analüüsisin programmiga *BioEdit* ja pärmi mtDNA-le vastava järjestuse leidsin kasutades *blast* programmi *Emboss Water (the European Molecular Biology Open Software Suite)*.



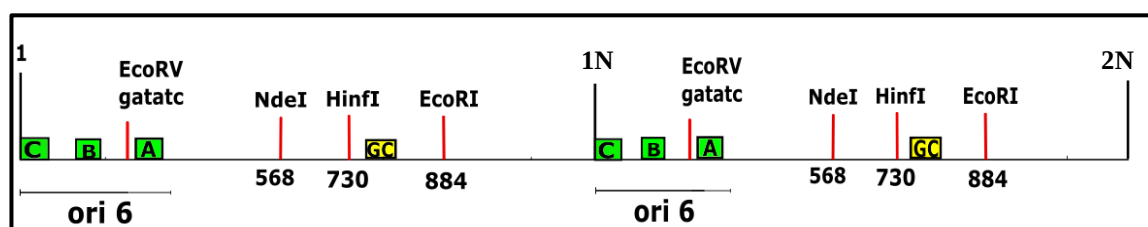
Joonis 11. PCR ORI OUT praimeritega sekveneerimiseks. Nummerdatud tüvede PCR produktid lõikasin geelilt välja ja puhastatud DNA lasin sekveneerida.

Valisin välja kaks tüve, millega töötasin edasi; aktiivse ori2-ga tüvi, mille mtDNA fragmendi pikkuseks on 1328bp ja mitte-aktiivse ori6-ga tüvi pikkusega 1207bp (Joonisel 11 vastavalt

tüvi nr 33 ja 6). Mõlemad tüved on paardumistüübiga a ja sarnase fragmendi pikkusega, kumbki järjestus ei sisalda kodeerivaid alasid ja järjestused on identsed *wt*-ga, mõlemad sisaldavad ka lisa GC-klastrit väljaspool ori järjestust. Edaspidi on paremaks jälgimiseks tüvede nimed a1328 ori2 ja a1207 ori6, kus a on paardumistüüp, 1328 / 1207 on mtDNA 1N fragmendi pikkus (bp) ja lõpus fragmendis esinev ori. Joonistel on parema mahutavuse pärast märgitud tüved vastavalt ori2 ja ori6, deletsioonidega tüvedel näiteks ori2 Δ hmi1. Ori2 järjestuses asub promootorjärjestus, millelt toimub aktiivne transkriptsioon, kuid ori6 järjestuses on see promootor katkestatud *r*⁻ AT-klastri ning β ja γ GC-klastritega. Selles peitub tüvede oluline erinevus, a1328 ori2 tüve mitokondris toimub promootorilt aktiivne transkriptsioon, a1207ori6 tüves mitte. Tüvede järjestused on toodud lisades (Lisa 5). Oluline oli silmas pidada, et tüvedel oleks piisavalt erinevaid restriksioonisaite, mida on võimalik kasutada mtDNA analüüsil. Joonisel 12 ja 13 on vastavalt a1328 ori2 ja a1207 ori6 restriksioonikaardid koos ori regiooni ja lisa GC-klastritega.



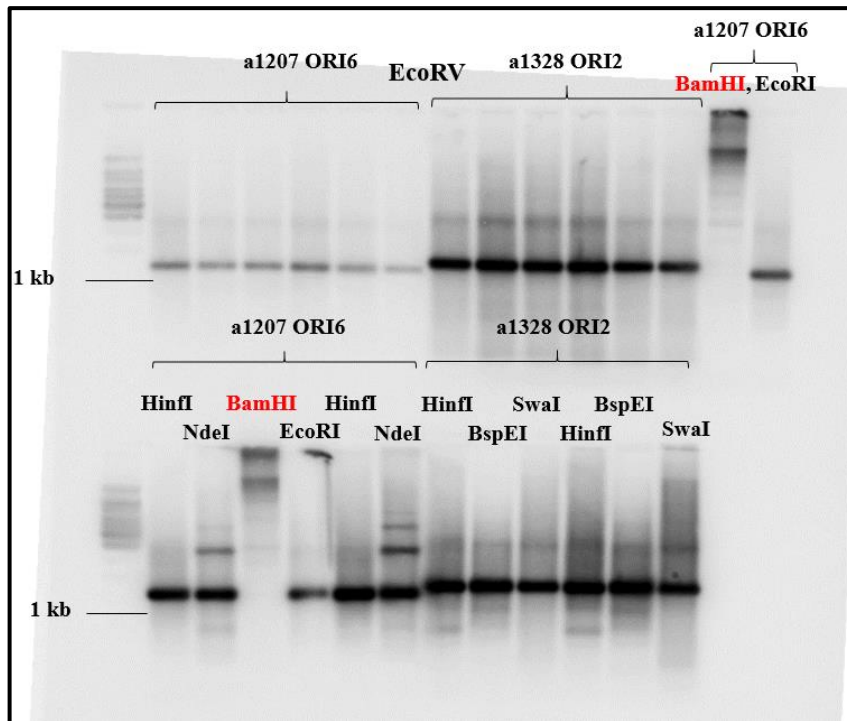
Joonis 12. *Rho*⁻ tüve a1328 ori2 mtDNA fragmendi 2N restriksioonikaart. Rohelisega on märgitud ori A, B ja C *box*-id, punasega restriksiooni saidid koos vastava restriктаasiga ja kollasega ori-st välja jäävad GC-klastrid. Numbrid on koordinaadid *rho*⁻ genoomi fragmendis, kus



Joonis 13. *Rho*⁻ tüve a1207 ori6 mtDNA fragmendi 2N restriksioonikaart. Rohelisega on märgitud ori A, B ja C *box*-id, punasega restriksiooni saidid koos vastava restriктаasiga ja kollasega ori-st välja jäävad GC-klastrid. Numbrid on koordinaadid *rho*⁻ genoomi fragmendis, kus esimene nt on ori algus.

2.3.4 Tüvede a1328 ori2 ja a1207 ori6 stabiilsuse kontroll

Tulenevalt *rho*⁻ mutantide mtDNA genoomi suurtest muutustest, võib neis toimuda ka peale mutageneesi ümberkorraldused, sest *rho*⁻ mtDNA ei ole alati stabiilne. Tüvede stabiilsuse kontrolliks külvasin kummagist tüvest 6 kolooniat ümber YPD tassidele 7 korda. Eraldasid neist totaalse DNA ja selleks, et teada saada, kas fragmendi suurus on jäänud samaks, restrikteerisin saadud DNA-d erinevate ensüümidega, mille lõikesaidid esinevad antud tüvede DNA järjestuses. EcoRV lõikusega analüüsisin mõlema tüve 6 kolooniast eraldatud DNA-d. Lisaks restrikteerisin a1207 ori6 tüve kahest kolooniast eraldatud DNA-d BamHI, EcoRI, HinfI, NdeI restriktasididega ning a1328 ori2 tüvest samuti kahest kolooniast eraldatud DNA-d HinfI, BspEI, SmaI restriktasididega (Joonis 14).



Joonis 14. a1207 ori2 ja a1328 ori6 tüvede stabiilsuse kontrolli Southern blot. Edasi külvatud tüvede totaalse DNA restriksioon erinevate ensüümidega. Ülemisel real on kummagi tüve kuuest kolooniast eraldatud DNA lõikus EcoRV-ga. Sellele järgneb ori6 tüve totDNA restriksioon BamHI, EcoRI, HinfI ja NdeI-ga kahes korduses. Ori2 tüve restrikteerisin HinfI, BspEI ja SmaI-ga samuti kahes korduses. Kõik lõikesaidid peale BamHI, mis w303a tüvel puudub, on uuritud *rho*⁻ tüvedes olemas ja tekkinud mtDNA 1N fragmendi suurus näitab, et tüved on stabiilsed.

Kuigi lõikuse produktid olid juba pisut näha etiidumbromiidiga agarosgeelil, tegin kindluse mõttes geelile ka Southern blot analüüsi. Kasutasin neutraalset ülekannet nailonfiltrile ja

märkena ori2 radioaktiivset proovi, seetõttu on a1207 ori6 tüve mtDNA vähem hübridiseerunud.

Jooniselt 14 on näha, et ainult BamHI ensüümiga pole restriksioon õnnestunud, aga teiste ensüümide puhul on saadud fragmendi suurus võrdne sekveneerimisel saadud tulemusega – ori6 sisaldaval tüvel on fragmendi pikkus 1207bp ja ori2-ga tüvel pisut suurem fragment 1328bp. Kuna kasutatavad restriктаasid valisin Foury ja kaasautorite poolt kirjeldatud pagaripärmi tüve FY1679 mtDNA järjestuse (Foury et al., 1998) pealt, siis w303 tüve mtDNA järjestus võib veidi erineda. Nagu Jooniselt 14 on näha, ei esine a1207 ori6 mtDNA genoomis BamHI lõikesaiti.

2.3.5 a1328 ori2 ja a1207 ori6 supressiivsuse määramine

Saadud *rho*⁻ tüvede supressiivsuse määramiseks tegin nad esmalt LEU2⁺ tüvedeks ja ristasin neid metsiktüüpi w303α URA3⁺ tüvega. Kontrolliks ristasin wt tüvesid ka teadaoleva neutraalse *petite* tüvega N35 LEU2⁺ ja hüpersupressiivse HS61 LEU⁺ tüvega. Kõiki *rho*⁻ tüvedega ristamisi tegin kahes korduses. Lugesin üle punased (*rho*⁺) ja valged (*rho*⁻) kolooniad ja arvutasin *petite* genoomi edasi pärandumise protsendid ning võrdlesin neid kontrolltüvedega. Tulemused on toodud Tabelis 4. Nagu oligi arvata, on aktiivse ori-ga a1328 ori2 tüvi hüpersupressiivne, kuna ligi 100% kolooniatest on *petite* fenotüübiga ehk *rho*⁻ tüve mtDNA genoom kandub edasi. Mitte-aktiivse ori-ga a1207 ori6 tüve ristamisel *rho*⁺ tüvega oli suurem osa kolooniatest samuti valged, kuid tegemist on supressiivse tüvega – *petite* genoom pärandus edasi ca 70-73% kolooniatele (Lisa 6).

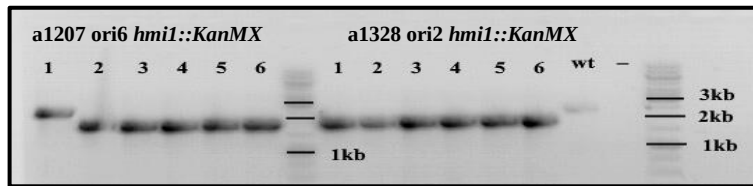
Tabel 4. Hüpersupressiivsustesti tulemused. Vasakul on toodud wt-ga ristatava tüve nimi, sulgudes supressiivsuse tase ja uuritavate *rho*⁻ tüvede korduskatsete puhul ka katse nr. Paremal on punaste ehk *rho*⁺ kolooniate osakaal kõigist saadud kolooniatest protsentides. N – neutraalne (eeldatav *rho*⁺ osakaal ligi 100%), S – supressiivne (eeldatav *rho*⁺ osakaal alla 50%), HS – hüpersupressiivne (eeldatav *rho*⁺ osakaal ligi 0%). Kogu loetud kolooniate arv oli kõigil ristamistel vahemikus 100-200.

<i>Petite</i> tüve nimi (supressiivsus)	<i>rho</i> ⁺ kolooniate osakaal
N35 (N)	100%
HS61 (HS)	2%
A1328 ori2 (HS) I	2,1%
A1328 ori2 (HS) II	0,7%
A1207 ori6 (S) I	26,8%
A1207 ori6 (S) II	29,6%

2.3.6 HMI1 ja RPO41 deleteerimine *rho*⁻ tüvedest

Rekombinatsiooni ja transkriptsiooni rolli uurimiseks *rho*⁻ tüvede DNA sünteesil, deleteerisin a1328 ori2 ja a1207 ori6 tüvedest kaks valku, mis võivad omada funktsiooni mtDNA replikatsioonil – mitokondriaalse helikaasi Hmi1 ja RNA polümeraasi Rpo41. Lisaks valmistasin ka topeltmutandid deleteerides kõigepealt Hm1 valgu ja seejärel Rpo41 (Δ hmi1 Δ rpo41) ning vastupidi, deleteerides enne Rpo41 ja pärast Hmi1 valgu (Δ rpo41 Δ hmi1), et uurida kahe valgu deleteerimise mõju mtDNA RI-dele.

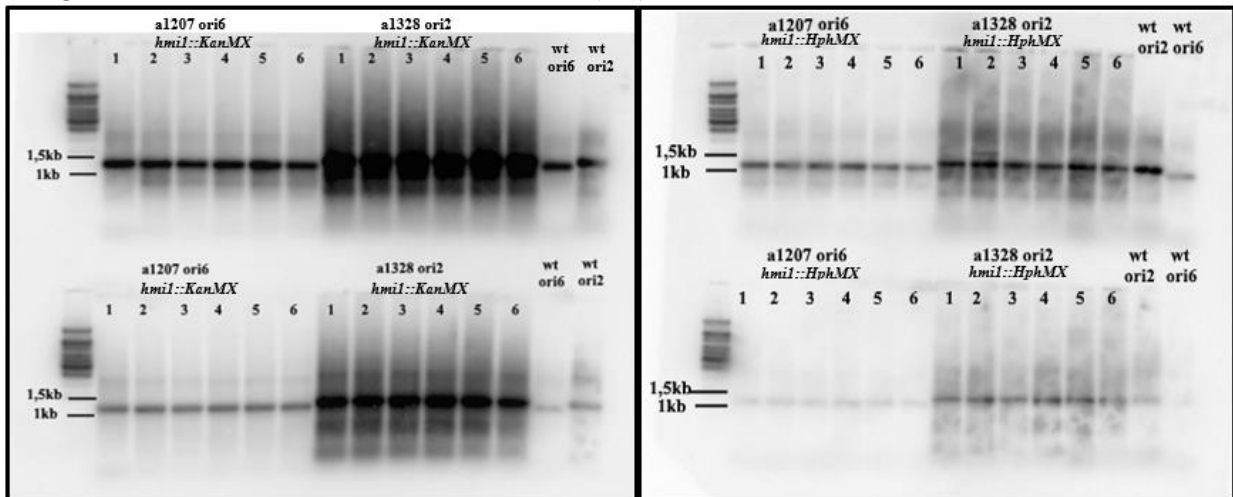
HMI1 deletsiooniks kasutasin geeni asendava markerina nii KanMX kui ka HphMX kasseti, topeltmutantidel HphMX kasseti. Pärast transformatsiooni valisin selektiivse söötmega tassidelt 6 kolooniat, mis külvasin ümber edasiseks analüüsiks. HMI1 geeni asendust kontrollisin PCR-ga kasutades praimeritena oligoid Hmi1 TERM REV ja Hmi1 PSeq (Joonis 15).



Joonis 15. Näide HMI1 deletsiooni kontrollist PCR meetodil

Hmi1TERMREV ja Hmi1PSeq praimeritega. Deletsiooniga tüvedel amplifitseerub KanMX kassett (1,8kb), deletsioonita tüvedel *HMI1* geen (2,4kb).

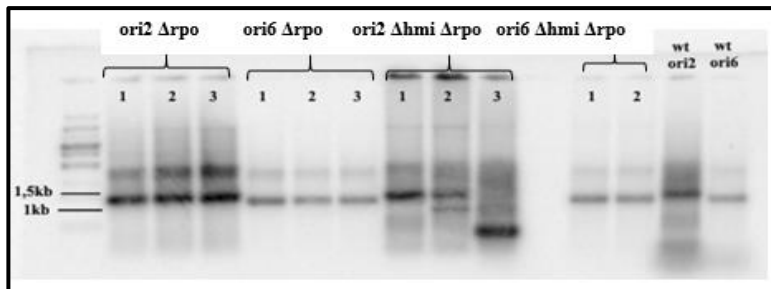
Märgitud on analüüsiks valitud koloonia number (1-6) kummastki *rho*⁻ tüvest.



Joonis 16. Δ hmi1 tüvede stabiilsuse kontroll *Hinf*I (ülemine rida) ja *Eco*RV (alumine rida) restriksiooni analüüsiga *Southern blot*-il. Kõikidest tüvedest analüüsisin 6.-st kolooniast eraldatud DNA-d. (Joonisel tähistatud 1 - 6). Võrdluseks on viimastel radadel ka a1328 ori2 ja a1207 ori6 tüvede totDNA proov. Kuna hübridiseerimiseks kasutasin ori2 radioaktiivset proovi mõlema tüve jaoks, siis a1207 ori6 tüve signaal on veidi nõrgem väiksema komplementaarsuse tõttu.

Antud töös kasutasin edasi ainult HphMX6 kassetiga asendatud tüvesid (*hmi1::HphMX6*). Sama HphMX produkti kasutasin ka *rpo41::KanMX* tüvedest *HMI1* deleteerimisel. Saadud tüvede *rho*⁻ mtDNA 1N fragmendi säilumist analüüsisin ORI OUT ja ORI IN PCR-ga, lisaks totDNA EcoRV ja HinfI restriksiooniga ning saadud fragmentide *Southern blot* analüüsiga (Joonis 16). Topeltmutante kontrollisin ainult EcoRV restriksiooniga ja kõik Δ rpo41 Δ hmi1 tüved olid stabiilse mtDNA-ga.

Rpo41 deleteerimiseks a1328 ori2, a1207 ori6, a1328 ori2 Δ hmi1 ja a1207 ori6 Δ hmi1 tüvedest kasutasin KanMX kasseti. Uuritava geeni deletsiooni õnnestumist kontrollisin Rpo41 5UP ja KanMX3 praimeritega, millest esimene seondub RPO41 geeni ette ja teine KanMX kasseti 3'otsa. Peale transformatsiooni ja tembeldamist valisin kontrollimiseks igast tüvest 4 kolooniat, millest eraldas kiirmeetodiga DNA, et kontrollida deletsiooni toimumist PCR-iga. Deletsioonita tüvedel ei amplifitseerunud PCR prooviga midagi, sest KanMX3 praimer seondub KanMX kassetile (Lisa 7). Eraldasin stabiilsuse kontrolliks transformeerunud tüvede totDNA. a1328 ori2 Δ hmi1 Δ rpo41 tüvedel oli *Southern blot*-il näha, et 2 tüvel kolmest on mtDNA fragmenteerunud (Joonis 17). Edasiseks mtDNA 2D AGE analüüsiks kasutasin stabiilse mtDNA-ga tüve (Joonisel 17 ori2 Δ hmi1 Δ rpo41 tüvi nr 1).

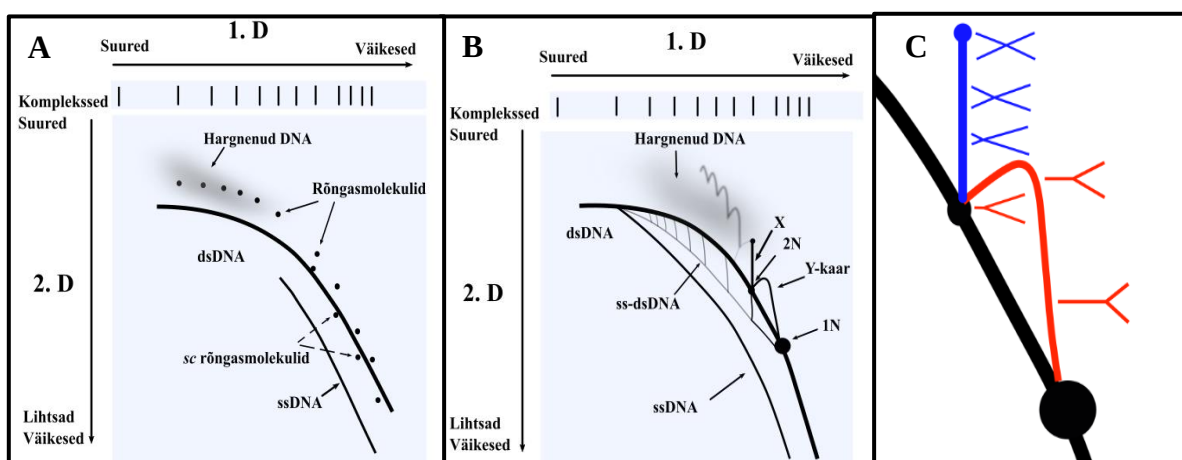


Joonis 17. RPO41 deletsiooniga tüvede stabiilsuse kontroll EcoRV lõikuse *Southern blot*-il. a1328 ori2 Δ hmi1 Δ rpo41 tüvel on mtDNA fragmenteerunud 2 tüvel 3-st. Ülejäänud tüved on stabiilse mtDNA-ga. Võrdluseks on viimastel radadel ka a1328 ori2 ja a1207 ori6 tüvede totDNA proov (wt ori2 ja wt ori6).

2.3.7 a1328 ori2 ja a1207 ori6 tüvede mtDNA analüüs 2-dimensionaalse agarosgeelelektroforeesiga

Esimesena eraldasini a1328 ori2 ja a1207 ori6 tüvedest mtDNA ning analüüsisin replikatsiooni intermediaate (RI) 2D AGE meetodiga. MtDNA eraldasini selleks, et nukleaarne DNA ei segaks mtDNA liikumist foreesil, sest mtDNA osakaal kogu raku DNA-st on ainult ~10%. Eraldasini a1328 ori2 ja a1207 ori6 tüvedest mtDNA vähemalt kaks korda ja analüüsisin 2D AGE meetodiga, et kinnitada katse reprodutseeritavust.

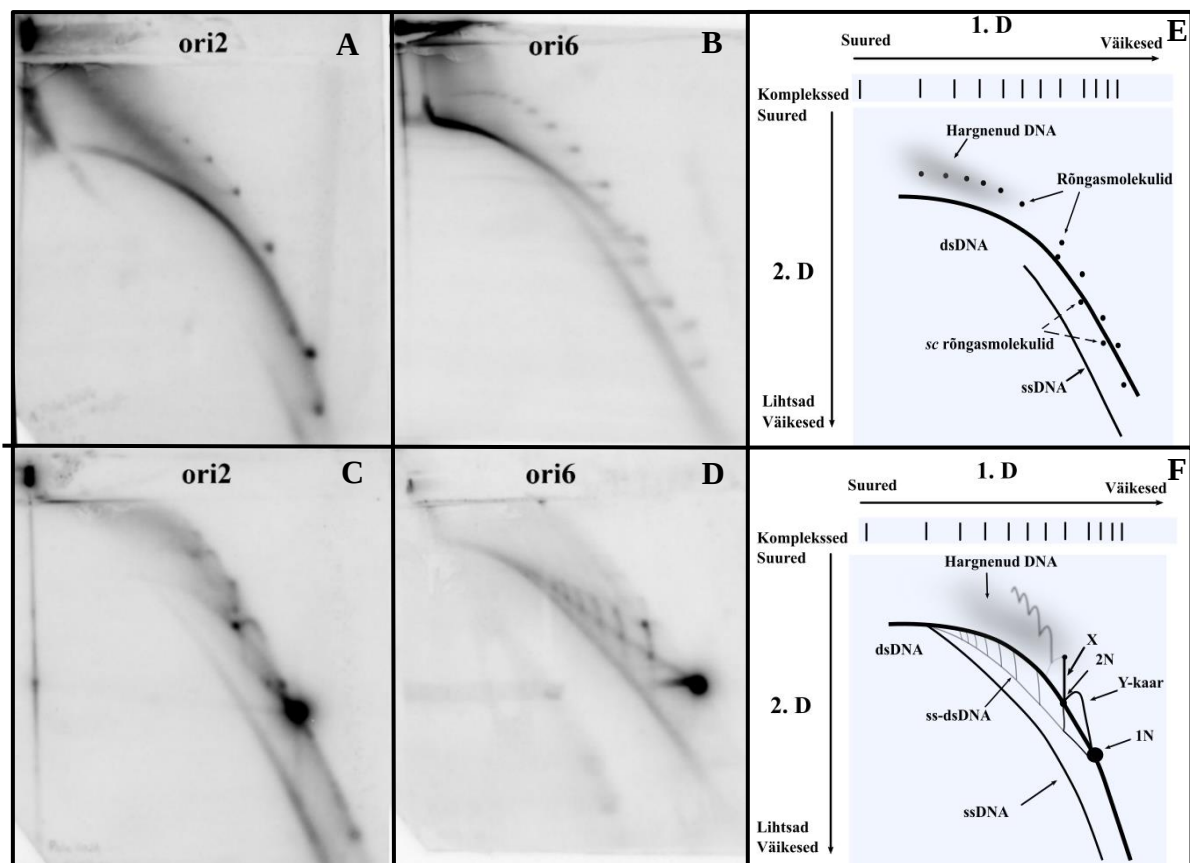
Iga tüve puhul kasutasin hübridiseerimiseks vastava tüve ori regiooni (ORI IN praimeritega) ja orist välja jääva piirkonna (ORI OUT praimeritega) radioaktiivselt märgitud PCR produkte. Saadud pildidel olevad erinevad RI kvantiteerisin ja arvutasin erinevate DNA struktuuride osakaalu, kus kogu-DNA on analüüsitavate intermediaatide summa ehk arvesse pole võetud hambasse jäänud DNA-d ja teadmata struktuure.



Joonis 18. Replikatsiooni intermediaatide skeem 2D AGE analüüsil. (A) Skeem restrikteerimata mtDNA ja (B) restrikteeritud mtDNA replikatsiooni intermediaatide liikumisest 2D AGE-l. 1.D ja 2.D näitavad DNA liikumissuunda agarosgeelis. Üleval on märgitud DNA marker. 1. D-s liigub DNA suuruse järgi 2. D foreesil toimub DNA molekulide lahutamine nii suuruse kui ka topoloogia alusel. Tuvastatavad topoloogilised vormid on restrikteerimata mtDNA puhul (A) dsDNA, ssDNA, relakseerunud ja superspiraliseerunud rõngasmolekulid ja hDNA. Restrikteeritud mtDNA foreesil (B) on näha dsDNA, ssDNA, ss-dsDNA hübriidid, hDNA, 1N ja 2N fragmendid, Y-kaar ning X-struktuur. Halliga on märgitud ka kõrgemad struktuurid. (C) Y-kaare (punane) ja X-struktuuri (sinine) liikumine 2D AGE-l.

Restrikteerimata mtDNA 2D AGE-lt (Joonis 18. A) on võimalik näha lineaarset dsDNA-d, ssDNA-d, relakseerunud ja *supercoiled* (sc) rõngasmolekule ning hargnenud DNA (hDNA) tekitatud pilve suuremate rõngasmolekulide kohal. Restrikteerimata mtDNA dsDNA-lt saab teha järeldusi molekulide suuruse jaotuse kohta. hDNA tugevus võib tuleneda

rekombinatsioonil tekkinud hDNA molekulidest, seega rekombinatsiooni aktiivsusest. Restrikteeritud mtDNA analüüsil (Joonis 18. B) on nähtav samuti lineaarne dsDNA ning sellest restriktsoonil tekkinud 1N ja 2N fragmendid. Näha on ka ssDNA ja hDNA molekulid. Lisaks jookseb restrikteeritud mtDNA puhul 1N ja 2N fragmendi vahel klassikalise replikatsioonikahvli vaheühend – Y-kaar. 2N fragmendist ülespoole jääb rekombinatsiooni vaheühend – X-struktuur, mis ilmselt kujutab endast Holliday ühendustes tekkivat neljaahelalist rekombineerunud DNA-d. hDNA sees on võimalik märgata ka komplekssemaid struktuure,



Joonis 19. Tüvede a1328 ori2 ja a1207 ori6 mtDNA 2D-AGE. (A) a1328 ori2 restrikteerimata mtDNA, (B) a1207 ori6 restrikteerimata mtDNA, (C) a1328 ori2 EcoRV restrikteeritud mtDNA, (D) a1207 ori6 EcoRV restrikteeritud mtDNA. 2D-AGE replikatsiooni intermediaatide skeem (E) restrikteerimata ja (F) restrikteeritud mtDNA jaoks.

mida antud töös ei käsitleta. ssDNA ja dsDNA molekulide vahel jooksevad ss-dsDNA hübriidsed molekulid. Replikatsiooni intermediaatide asukoht geelil on kujutatud Joonisel 18 A. (restrikteerimata mtDNA), B. (restrikteeritud mtDNA) ja C. (Y-kaare ja X-struktuuri liikumine 2D AGE-l). Esmalt on toodud Joonisel 19 a1328 ori2 ja a1207 ori6 tüvede 2D AGE pildid koos 2D AGE skeemiga.

Uuritavate tüvede 2D-AGE *Southern*-i piltidelt (Joonis 19) on näha drastilisi erinevusi kahe tüve RI vahel. Restrikteerimata mtDNA analüüsilt selgus, et

1. a1207 ori6 tüvel on pikemaid dsDNA molekule märgatavalt rohkem kui a1328 ori2 tüvel.
2. a1207 ori6 tüvel on näha rohkem ssDNA molekule.
3. a1328 ori2 tüve suuremad rõngasmolekulid katab tugev hDNA signaal, mis a1207 ori6 tüvel ei ole nii domineeriv.
4. Rõngasmolekulide jaotus pikkuse järgi on kahes tüves erinev.

Restrikteeritud mtDNA analüüsilt selgus, et

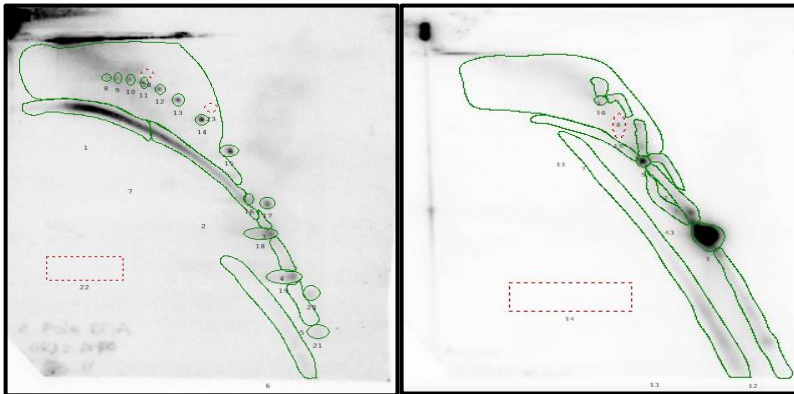
1. a1207 ori6 tüvel puudub märgatav Y-kaar ja X-struktuur, mis on selgelt näha a1328 ori2 tüvel.
2. a1207 ori6 tüvel on aga väga domineerivad ss-dsDNA hübriidsed molekulid, mida a1328 ori2 analüüsil on ainult 1N-2N piirkonnas (edaspidi 1N ss-dsDNA).
3. Tähelepanuväärne on ka väikeste (alla 1N) molekulide täielik puudumine a1207 ori6 tüvel.
4. Samuti on märgatav erinevus hDNA koguses, mis on a1328 ori2 tüvel domineerivam kui a1207 ori6 mutandil.

Edasises analüüsis kvantiteerisin kõik eelnimetatud molekulaarsed vormid jättes välja teadmata struktuurid ja lahustumata DNA. Kvantiteerimise tulemused aitavad selgelt välja tuua tüvede vahelisi erinevusi. Eri tüvede tulemuste võrdlemiseks koostasın tulpdigrammid, milles on toodud intermediaatide jaotus 2D AGE piltidel, kusjuures vaheühendite osakaalud on saadud kogu vaheühendite summast kaasa arvatud suuruse jaotusel.

Kuna ssDNA ja dsDNA suuremad molekulid jooksevad foreesil väga lähestikku, siis need on kvantiteerimisel võetud arvesse eraldi suurte ss-dsDNA molekulidena. dsDNA molekulid jagasin kolmeks suuruse järgi. Restrikteerimata geelil kvantiteerisin eraldi üle 10kb dsDNA molekulid, 3-10kb ja alla 3kb dsDNA. Restrikteeritud geelidel jaotasın suurused 1N ja 2N fragmendi järgi: suuremad kui 2N, 1-2N ja alla 1N suurused dsDNA molekulid. Siin tuleb tähele panna, et restrikteeritud piltide dsDNA arvestusse lähevad alad, ilma 1N ja 2N fragmentideta (Joonis 20). 1N ja 2N fragmendid näitavad täielikult lõpetatud replikatsiooni ja

vahepealsed alad tekivad, kui restriктаas ei pääse ligi dsDNA-le või lõikesaidis on DNA-RNA dupleks või lühike ssDNA lõik.

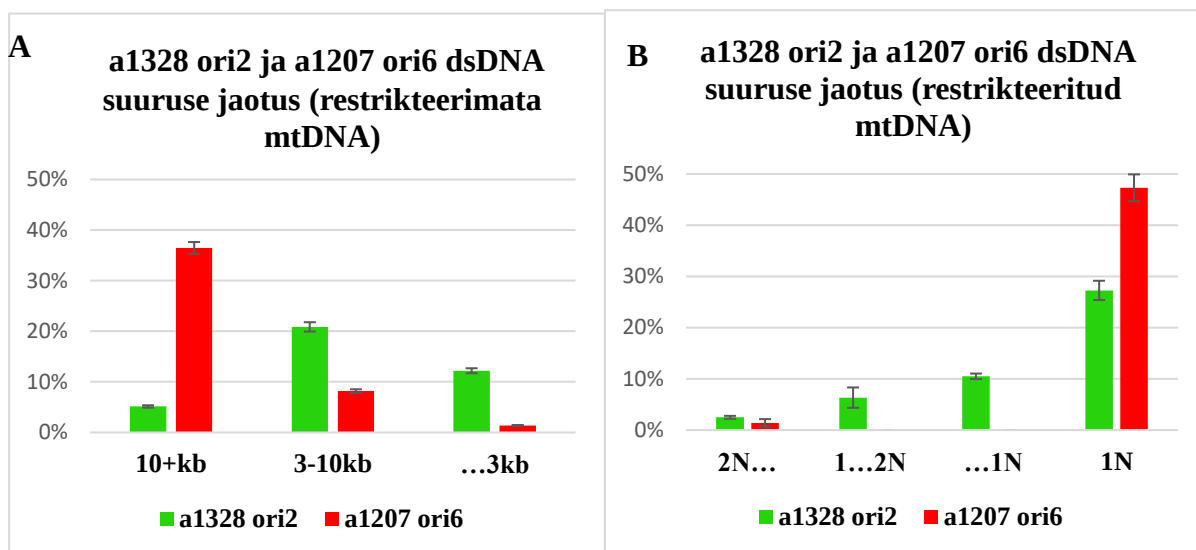
Iga tüve puhul analüüsisin kahte bioloogilist replikaati, ehk eraldas in mtDNA kahel korral. Korduskatsete 2D AGE pildid on toodud lisades (Lisa 8). Kõik analüüsitud tulemused reprodutseerusid, ühe erandina võib välja tuua restrikteeritud mtDNA hDNA jaotuse, mida tulemuste arutelus arvesse ei võeta. See võis tuleneda mtDNA-ga töötamisel nõutud ettevaatlikkusest, mis raskendas DNA lahustamist või hDNA suuremate molekulide halvast lahutuvusest 2D AGE-l.



Joonis 20. Näide kvantiteerimisest. Vasakul on restrikteerimata mtDNA ja paremal restrikteeritud mtDNA kvantiteerimine. Rohelisega on piiritletud kvantiteeritavad üksused, kusjuures dsDNA on piiritletud kolmes osas, ja punasega taust, mille lahutas imager quant programm valitud intermediaatide kvantitatiivsest väärtusest maha. Nagu näha, võib tausta signaal olla kahel pildil üsna erinev.

Lisaks erinevustele bioloogiliste replikaatide vahel võib ka kvantiteerimisel tekkida mõõtmispiirkonna ja tausta valimisel mõõtmisviga, seega kordasin iga pildi kvantiteerimist 3 korda ja mõõtmisveaks märkisin saadud tulpdiaagrammidele kolme mõõtmise standardhälve. Arvutasin P väärtused võrreldes iga tüve omavahel ja arutelus välja toodud erinevustel on P väärtus alla 0,01. hDNA sees asuvatele molekulidele valisin taustaks molekuli lähedal asuva hDNA. Tausta suuruse valisin vastavalt intermediaadi suurusele ja selle lahutas programm valitud intermediaadi kvantitatiivsest väärtusest maha.

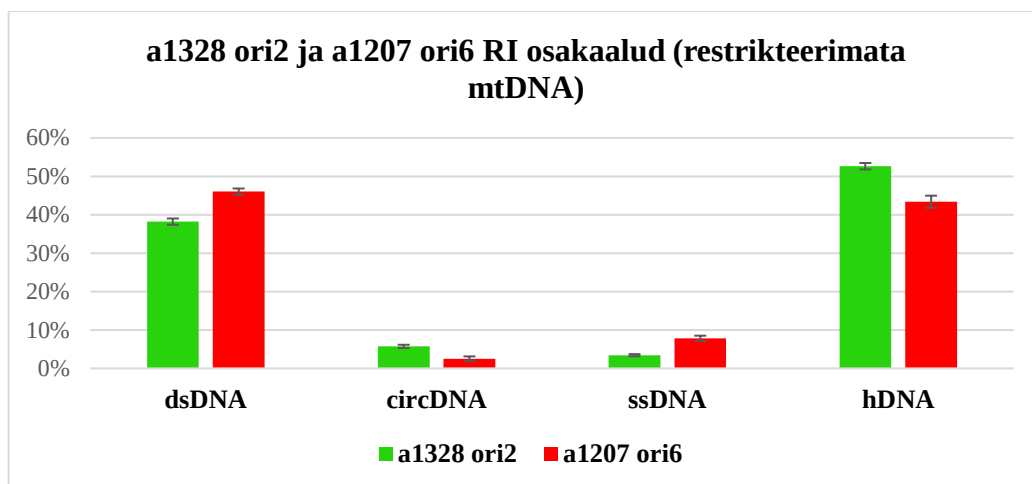
Tüvedest a1328 ori2 ja a1207 ori6 eraldatud mtDNA kvantiteerimise tulemused on toodud Joonistel 21, 22 ja 23. Tulpdiaagrammidelt on näha selged erinevused HS a1328 ori2-ga tüve ja supressiivse a1207 ori6-ga tüve mtDNA vahel. Restrikteeritud mtDNA piltide kvantiteerimisel ei olnud võimalik ühelgi mõõtmisel detekteerida a1207 ori6 tüve DNA X-struktuuri, Y-kaart ega ka väikeseid dsDNA molekule. Suuruste jaotus on kahe tüve mtDNA-l selgelt erinev.



Joonis 21. a1328 ori2 (roheline) ja a1207 ori6 (punane) dsDNA molekulide jaotus restrikteerimata (A) ja restrikteeritud (B) mtDNA 2D-AGE analüüsil. Välja on toodud restrikteerimata mtDNA puhul üle 10kb, 3-10kb ja kuni 3kb molekulide osakaal kogu dsDNA-st. Restrikteeritud mtDNA on jaotatud 2N fragmendist suuremateks, 1-2N suurusteks ja 1N-st väiksemateks molekulideks, võrdluseks on toodud ka 1N osakaal. Standardhälve on saadud kolme kvantiteerimise erinevusest.

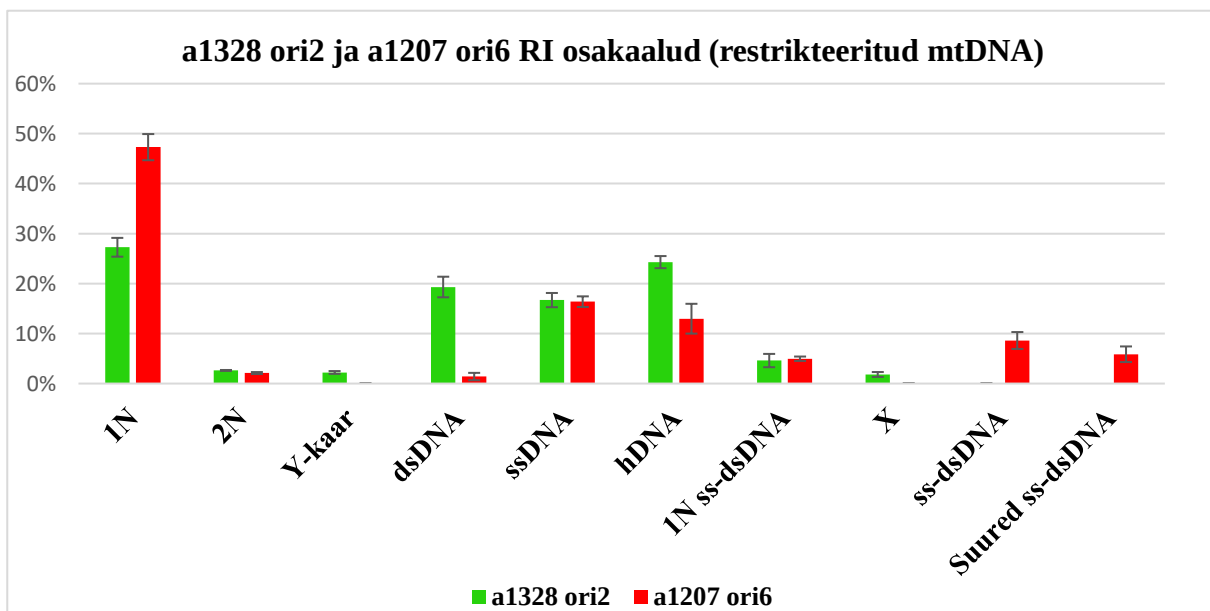
a1328 ori2 puhul on enamus restrikteerimata dsDNA-st 3-10kb ja alla 3kb suurusel, a1207 ori6 tüvel on dsDNA-st ligi 80% pikemad kui 10kb. Restrikteeritud dsDNA piltidelt sain kvantiteerides sarnase tulemuse, kus a1207 ori6 tüvel 2N-st väiksemad molekulid puudusid täiesti ja a1328 ori2 dsDNA moodustasid enamiku 1-2N ja alla 2N suurusel molekulid. Seega kinnitavad kvantiteerimise tulemused, et a1207 ori6 tüvel on rohkem pikemaid dsDNA molekule ja seega sünteesitakse antud tüves efektiivsemalt regulaarse kaksikahelalise struktuuriga konkatemeerset DNA-s.

Kvantiteerides restrikteerimata mtDNA teisi replikatsiooni intermediaate (Joonis 22), ei olnud näha nii drastilisi erinevusi kahe tüve vahel kui mtDNA suurusel. Kuigi üldiselt arvatakse, et DNA on rakus dsDNA lineaarse molekulina, siis antud tüvede mitokondris moodustab see vähem kui poole analüüsitud mtDNA molekulidest. Umbes sama palju on preparaadis hargnemisi sisaldavaid molekule (hDNA) ja 10% moodustavad rõngasmolekulid (circDNA) ja ssDNA. A1328 ori2 tüvel on veidi suurem rõngasmolekulide osakaal ja väiksem ssDNA kogus. a1207 ori6 tüvel on rohkem dsDNA ja vähem hDNA molekule.



Joonis 22. a1328 ori2 ja a1207 ori6 restrikteerimata mtDNA 2D AGE replikatsiooni intermediaatide osakaalude tulpdiagramm. Välja on toodud peamiste replikatsiooni intermediaatide jaotus: dsDNA lineaarsed molekulid, rõngasmolekulid (circDNA), ssDNA ja hDNA. Kogu-DNA on intermediaatide summa ja standardhälve on saadud kolme kvantiteerimise erinevustest

Joonisel 23 on tulpdiagrammina näidatud restrikteeritud mtDNA intermediaatide osakaalud analüüsitud intermediaatide summast. Kahe tüve vahel on näha drastilised erinevused (Joonis 20).



Joonis 23. a1328 ori2 ja a1207 ori6 restrikteeritud mtDNA replikatsiooni intermediaatide osakaalude tulpdiagramm. Välja on toodud peamiste replikatsiooni intermediaatide jaotus: 1N ja 2N fragmendid, dsDNA, ssDNA ja hDNA, 1N ss-dsDNA kaar, ori2 puhul Y-kaar ja X-struktuur ning ori6 puhul ss-dsDNA molekulid (suuremate molekulide puhul on raske määrata, kas tegemist on dsDNA, ssDNA või ss-dsDNA-ga).

a1207 ori6 tüvel on märgatavalt suurem 1N osakaal, mis on kooskõlas detekteeritud pikkade dsDNA molekulide suure fraktsiooniga restrikteerimata mtDNA 2D AGE piltidel. Nagu juba mainitud puuduvad a1207 ori6 tüve mtDNA-s Y-kaar ja X-struktuur ning a1328 ori2 mtDNA-l ss-dsDNA molekulid, mis on suuremad kui 2N. ssDNA ja dsDNA ühinemiskohast alates, ei ole neid võimalik eristada, mistõttu on need võetud eraldi arvesse kui suured ss-dsDNA molekulid. Nagu ka restrikteerimata mtDNA analüüsil on näha a1328 ori2 restrikteeritud preparaadis suurem hDNA osakaal.

2.3.8 Tüvede a1328 ori2 Δ hmi1 ja a1207 ori6 Δ hmi1 2D AGE analüüs

Kõigi HMI1 deletsioonidega tüvede mtDNA replikatsiooni intermediaatide uurimiseks eraldasini igast tüvest 2 korduses mtDNA ja *Southern blot*-i jaoks kasutasin aluselist ülekannet. Edasi toimsin täpselt samamoodi nagu lähtetüvedega a1328 ori2 ja a1207 ori6. Saadud 2D AGE pildid Δ hmi1 tüvedest (Joonis 24) on oluliselt erinevad ρ ho⁻ lähtetüvedest (Joonis 19).

Restrikteerimata mtDNA analüüsist võib näha, et:

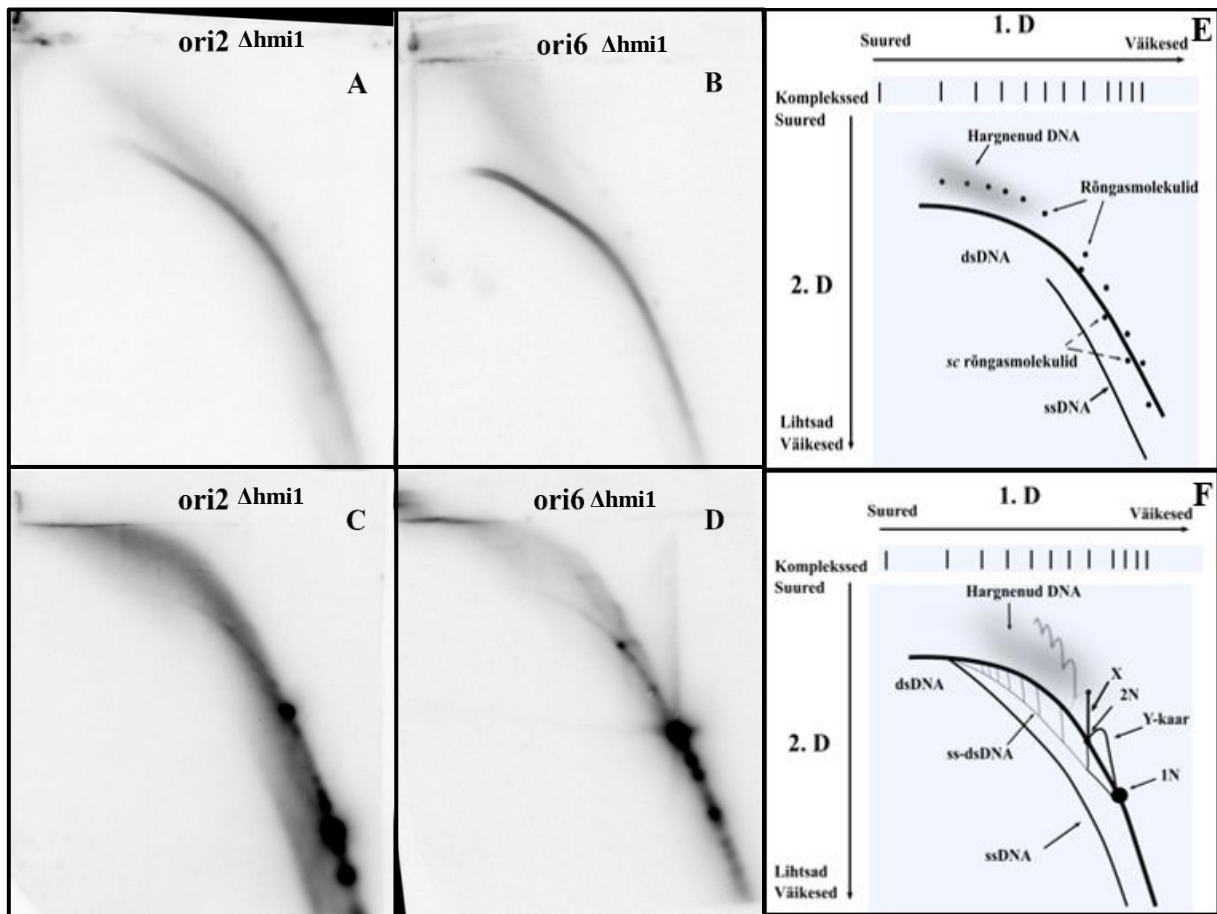
1. Suurte dsDNA molekulide lühenemist Δ hmi1 tüvedes
2. Rõngasmolekulide hulk on vähenenud Δ hmi1 tüvedes
3. Endiselt võib konstateerida, et a1207 ori6 Δ hmi1 tüvel võib märgata rohkem suuremaid dsDNA molekule ja veidi nõrgemaid rõngasmolekule kui a1328 ori2 Δ hmi1 tüvel.
4. a1207 ori6 tüvel on kadunud ssDNA.

HMI1 deletsiooni korral erinevad a1328 ori2 ja a1207 ori6 restrikteeritud mtDNA pildid aga oluliselt nii a1328 ori2 ja a1207 ori6 tüvedega võrreldes kui ka a1328 ori2 Δ hmi1 ja a1207 ori6 Δ hmi1 omavahel.

Restrikteeritud mtDNA analüüsi tulemused:

1. a1328 ori2 Δ hmi1 tüvel on väga palju väikeseid molekule ja tugev hDNA. Ka a1207 ori6 Δ hmi1 tüvel on palju väikeseid molekule võrreldes lähtetüvega.
2. Üllatuslikult paistavad puuduvat a1328 ori2 Δ hmi1 tüvel Y-kaar ja X-struktuur, mis olid selgelt eristatavad a1328 ori2 tüvel.

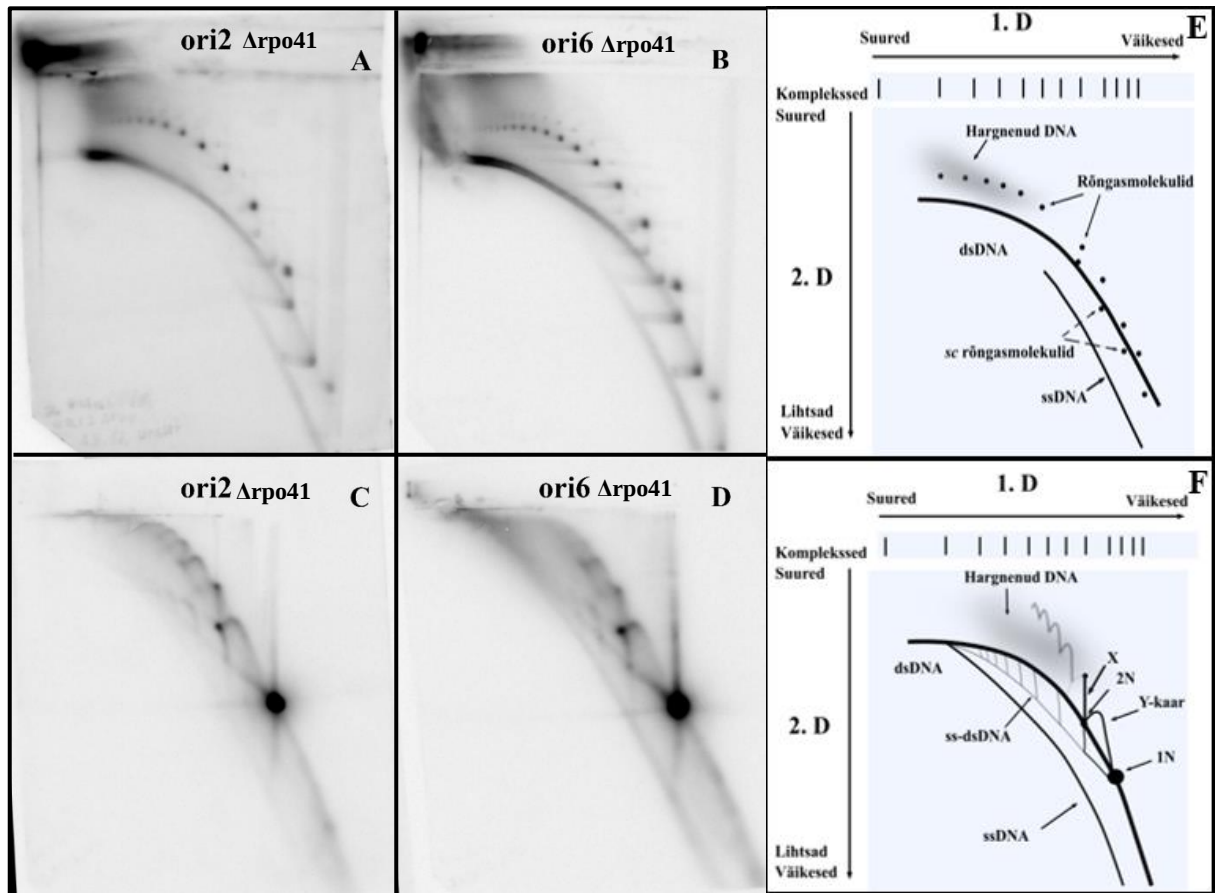
3. Lisaks ei ole a1207 ori6 tüves Hmi1 valgu deletsiooni järgselt detekteeritavad ss-dsDNA üleminekuvormid ja ka lihtsad ssDNA molekulid, mis olid dominantsed struktuurid a1207 ori6 tüves.
4. Samas on tekkinud Hmi1 deletsiooni tulemusel a1207 ori6 Δ hmi1 tüves selgelt eristatavad Y-kaar ja X-struktuur.
5. Koheselt võib märgata nii a1328 ori2 Δ hmi1 kui ka a1207 ori6 Δ hmi1 tüves HMI1 geeni deletsiooni tulemusena olulist keerukamate RI-de vähenemist ja väiksemate kui 1N mtDNA molekulide tekkimist. Hmi1 valgu deletsiooni efekt paistab olema suurem a1328 ori2 ehk aktiivselt transkripteeritava ori-ga tüves.



Joonis 24. Tüvede a1328 ori2 Δ hmi1 ja a1207 ori6 Δ hmi1 mtDNA 2D AGE. (A) a1328 ori2 Δ hmi1 restrikteerimata, (B) a1207 ori6 Δ hmi1 restrikteerimata, (C) a1328 ori2 Δ hmi1 restrikteeritud, (D) a1207 ori6 Δ hmi1 restrikteeritud mtDNA, (E) restrikteerimata ja (F) restrikteeritud mtDNA 2D AGE skeem.

2.3.9 Tüvede a1328 ori2 Δ rpo41 ja a1207 ori6 Δ rpo41 mtDNA 2D AGE

Mitokondriaalse RNA polümeraasi Rpo41 deleteerimisel saadud tüvede a1328 ori2 Δ rpo41 ja a1207 ori6 Δ rpo41 mtDNA 2D AGE pildid on toodud Joonisel 25 koos 2D AGE skeemidega.



Joonis 25. Tüvede a1328 ori2 Δ rpo41 ja a1207 ori6 Δ rpo41 mtDNA 2D AGE. (A) a1328 ori2 Δ rpo41 restrikteerimata, (B) a1207 ori6 Δ rpo41 restrikteerimata, (C) a1328 ori2 Δ rpo41 restrikteeritud, (D) a1207 ori6 Δ rpo41 restrikteeritud mtDNA, (E) restrikteerimata ja (F) restrikteeritud mtDNA 2D AGE skeem.

Rpo41 deletsiooniga tüvede RI kooslus on täiesti erinev lähtetüvedest (Joonis 23) ja ka Δ hmi1 tüvedest (Joonis 24).

Restrikteerimata piltidel hakkab silma:

1. Rõngasmolekulide suur arv võrreldes lähtetüvede ja Δ hmi1 tüvedega
2. Suurte dsDNA molekulide tugev signaal võrreldes lähtetüvede ja Δ hmi1 tüvedega.
3. hDNA kogus ei ole väga suur ja ssDNA molekulid on sarnaselt lähtetüvedega.

Restrikteeritud mtDNA RI-d on Rpo41 valgu deleteerimisel osaliselt sarnased nii a1328 ori 2 kui ka a1207 ori6 RI-dega.

1. Δ rpo41 tüvedel on nii a1207 ori6-le omased ss-dsDNA intermediaadid.
2. Δ rpo41 tüvedel on a1328 ori2-le omased selged Y-kaar, X-struktuur ja 1N-st väiksemad dsDNA molekulid.
3. Erinevalt lähtetüvest on a1328 ori2 Δ rpo41 tüvel muutunud selgemaks kõrgemad RI-d (vaata Joonis 18. B kõrgemad struktuurid).

a1328 ori2 Δ rpo41 ja a1207 ori6 Δ rpo41 tüvede mtDNA-d on üksteisega sarnased. See näitab, et erinevused a1328 ori2 ja a1207 ori6 tüvedes on Rpo41 sõltuvad. Kui kummagil tüvel transkriptsioon inhibeerida (deleteerida Rpo41), näevad nende 2D AGE pildid välja väga lähedased.

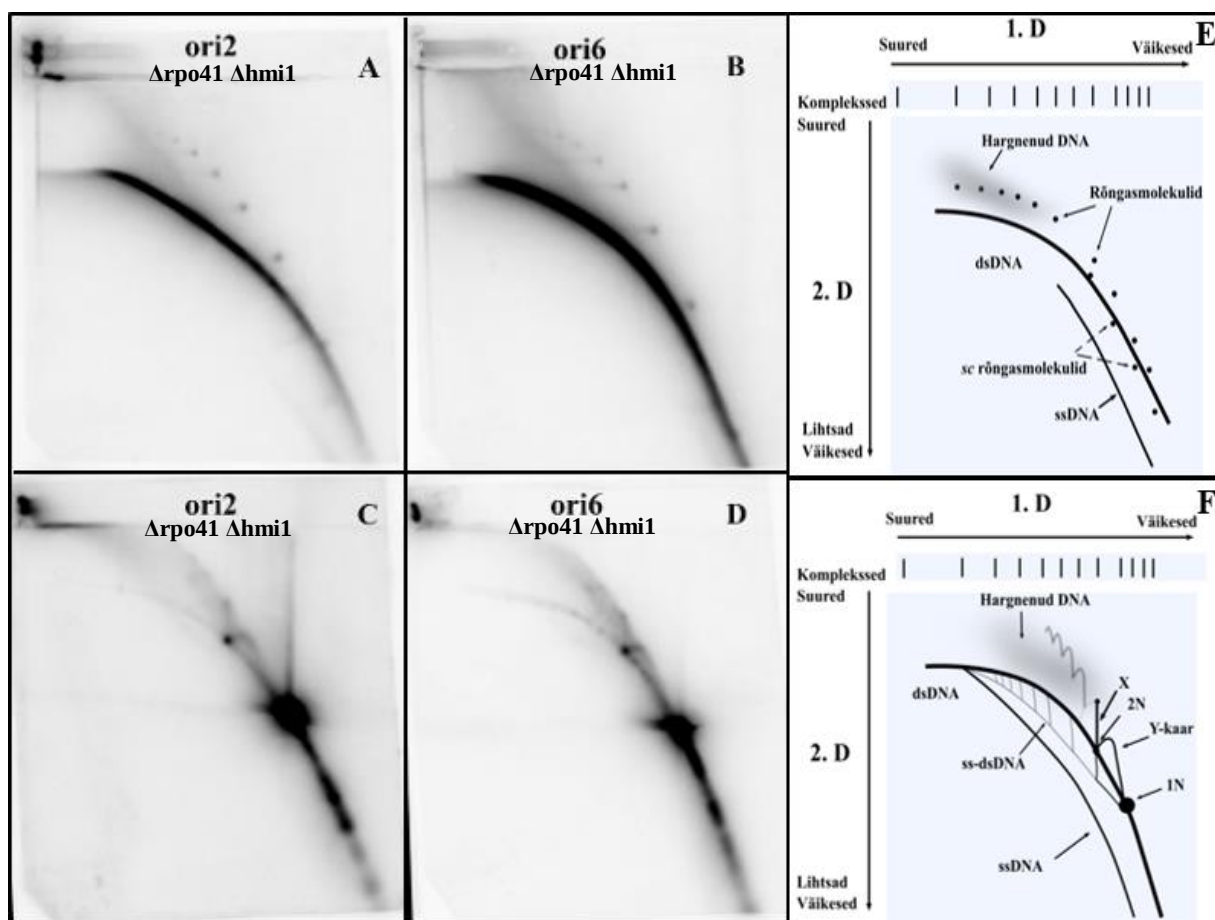
2.3.10 Tüvede a1328 ori2 Δ rpo41 Δ hmi1 ja a1207 ori6 Δ rpo41 Δ hmi1 mtDNA 2D AGE

Topeltmutantide tegemisel deleteerisin nii Rpo41 valgu Δ hmi1 tüvedest (Δ hmi1 Δ rpo41) kui Hmi1 valgu Δ rpo41 tüvedest (Δ rpo41 Δ hmi1) ja analüüsisin mõlemas järjekorras deleteeritud valkudega tüvede mtDNA RI-d 2D AGE-l. Kuna mõlemal juhul nägid saadud 2D AGE pildid samasugused välja ja ka kvantiteerimise tulemused olid väga sarnased, siis kajastan tulemustes ainult Δ rpo41

Δ hmi1 tüvede 2D AGE analüüsi. Δ hmi1 Δ rpo41 tüvede mtDNA 2D AGE pildid on toodud lisades (Lisa 9), Δ rpo41 Δ hmi1 tüvede pildid Joonisel 26.

Tüvede a1328 ori2 Δ rpo41 Δ hmi1 ja a1207ori6 Δ rpo41 Δ hmi1 restrikteerimata mtDNA 2D AGE pildid nägid ori-st sõltumata sarnased välja.

1. dsDNA molekule on nii väikeseid nagu Δ hmi1 tüvedel kui suuri nagu Δ rpo41 tüvedel.
2. Rõngasmolekulide arv on mõlemas tüves sarnane a1328 ori2 tüvega ehk rohkem kui Δ hmi1 tüvedes ja vähem kui Δ rpo41 tüvedes.
3. Mõlemal tüvel on kadunud ssDNA
4. Suhteliselt vähe on hDNA molekule.



Joonis 26. Tüvede a1328 ori2 Δ rpo41 Δ hmi1 ja a1207ori6 Δ rpo41 Δ hmi1 mtDNA 2D AGE. (A) a1328 ori2 Δ rpo41 Δ hmi1 restrikteerimata, (B) a1207 ori6 Δ rpo41 Δ hmi1 restrikteerimata, (C) a1328 ori2 Δ rpo41 Δ hmi1 restrikteeritud, (D) a1207 ori6 Δ rpo41 Δ hmi1 restrikteeritud mtDNA, (E) restrikteerimata ja (F) restrikteeritud mtDNA 2D AGE skeem.

Restrikteeritud mtDNA:

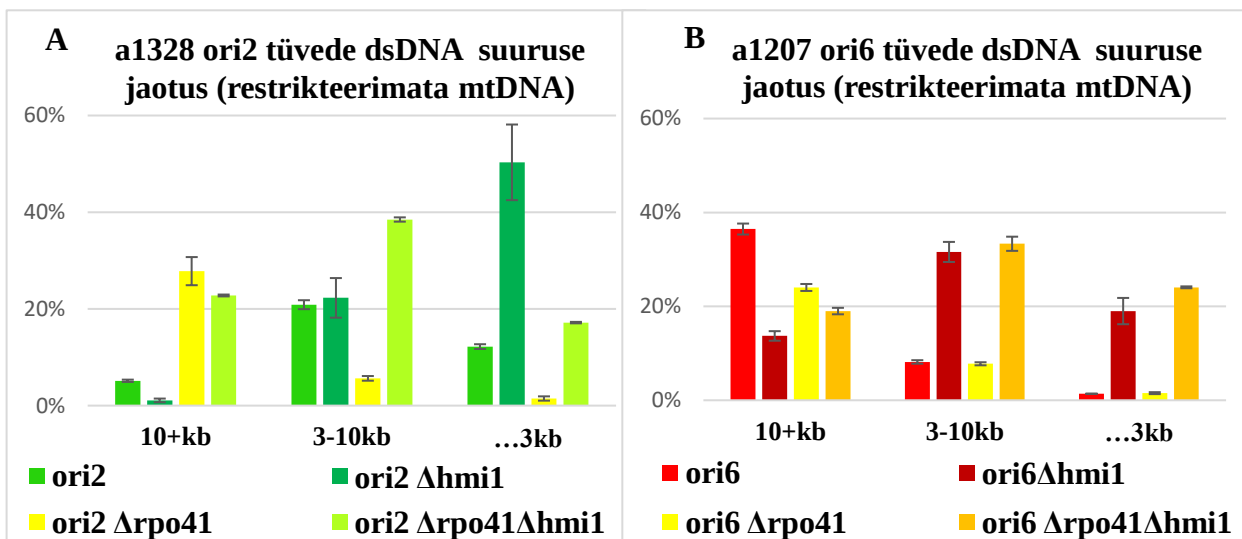
1. dsDNA molekulides on nagu Δ hmi1 puhulgi märgata palju ds-mtDNA molekule, mis on väiksemad kui 1N.
2. Samas on küllaltki hästi detekteeritavad pikad molekulid, mis liiguvad dsDNA kaarel.
3. Selgelt on olemas ka Y-kaar ja X-struktuur.
4. Puuduvad Δ rpo41 tüvedele ja a1207 ori6 tüvele omased ss-dsDNA molekulid ja ssDNA.

2.3.11 a1328 ori2 ja a1207 ori6 Δ hmi1, Δ rpo41 ja Δ rpo41 Δ hmi1 tüvede 2D AGE piltide kvantiteerimine

Ühel diagrammil on esitatud koos sama lähtetüve 2D AGE tulemused, roheliste värvidega diagrammid kuuluvad aktiivse ori-ga a1328 ori2 tüvedele ja inaktiivse ori-ga a1207 ori6 tüvede diagrammid on punastes toonides.

Oluline on märkida, et suuruste osakaalud on nii restrikteeritud kui restrikteerimata mtDNA puhul arvatud kõigi RI-de summast ehk arvesse on võetud näiteks restrikteerimata mtDNA puhul ka rõngasmolekulid (circDNA), ssDNA ja hDNA.

Esmalt on toodud diagrammid dsDNA suuruse jaotusest restrikteerimata mtDNA analüüsil (Joonis 27).



Joonis 27. a1328 ori2 (A) ja a1207 ori6 (B) tüvede dsDNA suuruse jaotus restrikteerimata mtDNA 2D AGE kvantiteerimisel. Mõõtmisviga on kolme kvantiteerimise standardhälve.

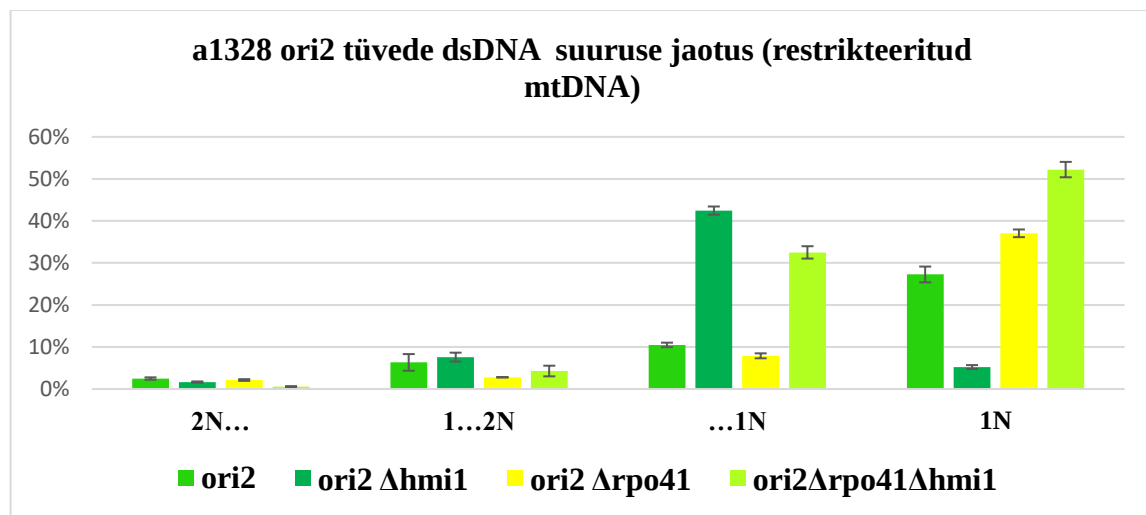
Aktiivse ori-ga tüvedel hakkab silma kaks olulist efekti. Esiteks on Rpo41 deletsiooniga tüvedel (nii üksikdeletsioonil kui ka topeltmutantidel) rohkem üle 10kb dsDNA molekule. Teiseks, Hmi1 deletsioonil tõuseb väikeste dsDNA molekulide osakaal drastiliselt, samas topeltmutandil tasakaalustab selle efekti Rpo41 deleteerimine.

Erinevalt a1328 ori2 tüvest on a1207 ori6 tüvedest kõige rohkem suuri dsDNA molekule siis kui rakkudes on nii Rpo41 kui Hmi1 valk. Sarnaselt a1328 ori2 tüvega, tõuseb Hmi1 deletsiooniga a1207 ori6 tüvedes samuti väiksemate molekulide osakaal (nii 3-10kb kui alla 3kb molekulid). Kuna aga restrikteeritud piltidelt näeb, et a1207 ori6 tüves on väga palju ss-

dsDNA-d (Joonis 35), siis võib suurte dsDNA molekulide osakaal tõusta ka selle arvelt, sest ss-dsDNA suuremad molekulid jooksevad foreesil samas kohas kus dsDNA.

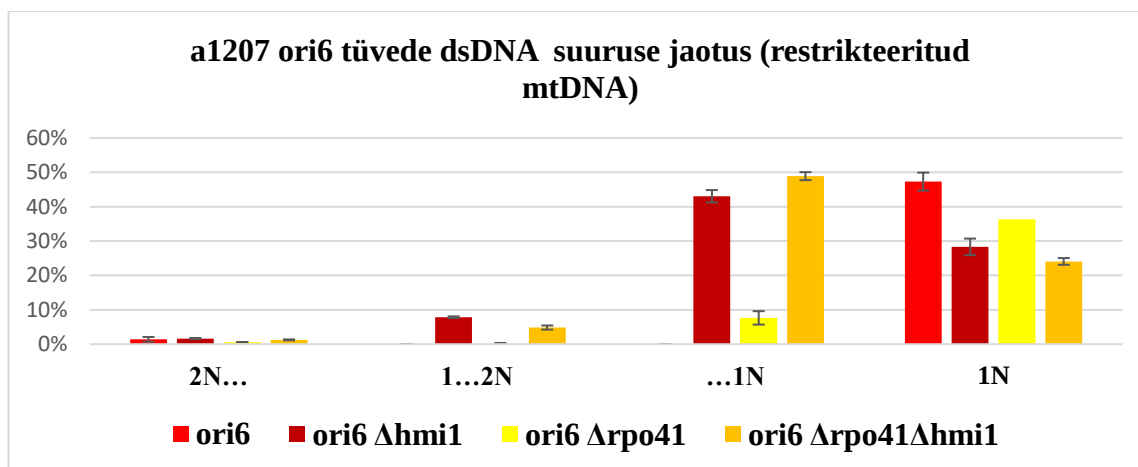
Restrikteeritud mtDNA dsDNA suuruse jaotusel on hea võrrelda kuni 1N, 1-2N ja üle 2N suuruseid molekule 1N fragmendiga, mida tegelikult pole RI jaotuses dsDNA hulka arvestatud, sest see on replikatsiooni valmis produkt.

Restrikteeritud mtDNA 2D AGE dsDNA suuruse jaotusest võib a1328 ori2 tüvede puhul (Joonis 28) näha samamoodi nagu restrikteerimata mtDNA-l, et Hmi1 deleteerimine tekitab väga väikeseid molekule – alla 1N fragmendi suuruseid molekule. See tähendab, et mtDNA-s tekivad dsDNA katked. Suuremate molekulide kvantiteerimise põhjal täpsemaid järeldusi teha on keeruline, sest nende osakaal kogu-DNA-st on väike.



Joonis 28. a1328 ori2 tüvede dsDNA suuruse jaotus restrikteeritud mtDNA 2D AGE kvantiteerimisel. Mõõtmisviga on kolme kvantiteerimise standardhälve. Viimasena on toodud võrdluseks 1N osakaal.

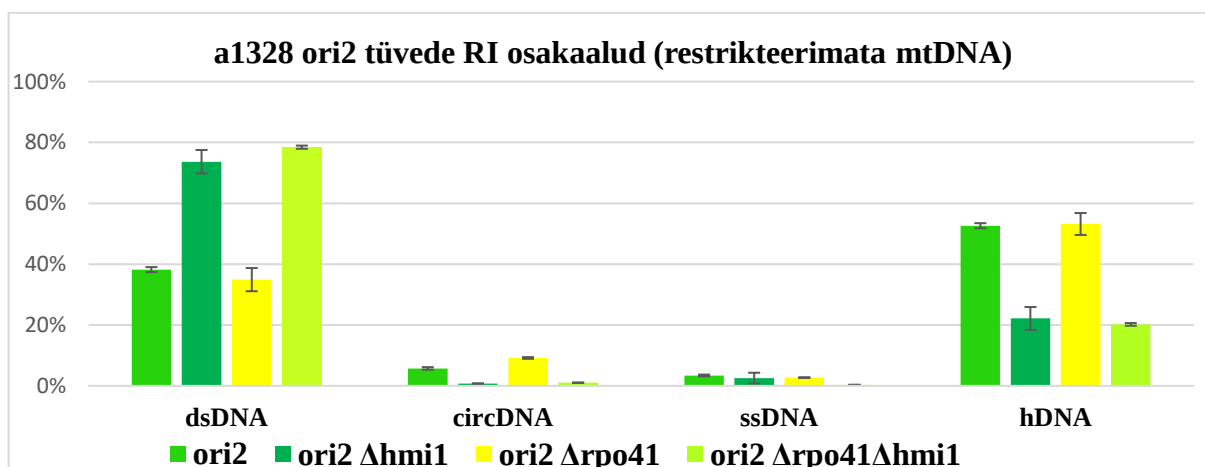
a1207 ori6 tüvede restrikteeritud dsDNA jaotusest (Joonis 29) on samuti näha Hmi1 deleteerimisega kaasnevat väikeste molekulide teket, kusjuures topeltmutantidel on väikeste molekulide osakaal isegi suurem kui ainult Hmi1 deletsiooniga tüvedel. Kui võrrelda väikeste dsDNA-de kogust 1N-ga, siis on Hmi1 deletsiooniga tüvedel selgelt rohkem väikeseid molekule kui topeltmutantidel.



Joonis 29. a1207 ori6 tüvede dsDNA suuruse jaotus restrikteeritud mtDNA 2D AGE kvantiteerimisel. Mõõtmisviga on kolme kvantiteerimise standardhälve. Viimasena on toodud võrdluseks 1N osakaal.

Võrreldes a1328 ori2-ga on a1207 ori6 tüvest Hmi1 deleteerimisel 1N osakaal vähem langenud. a1207 ori6 ja Δ rpo41 tüvede puhul puudub 1...2N dsDNA ja tüvel ka alla 1N suurused molekulid.

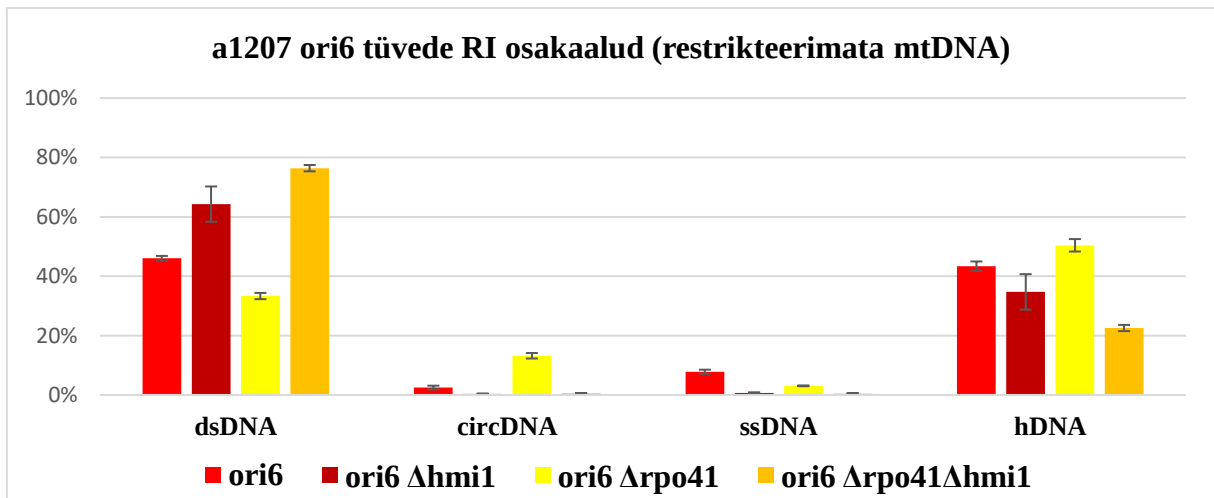
Järgnevalt on toodud diagrammid kõigi RI osakaalude kohta. Restrikteerimata mtDNA kvantiteeritavad vaheühendid on dsDNA, rõngasmolekulid, ssDNA ja hDNA. a1328 ori2 tüvede tulpdiagrammilt (Joonis 30) tuleb esile Δ hmi1 tüvede suurem dsDNA osakaal, mis koosneb Δ hmi1 puhul suures osas väikestest molekulidest (Joonis 27 A).



Joonis 30. a1328 ori2 tüvede RI osakaalud restrikteerimata mtDNA 2D AGE kvantiteerimisel. Mõõtmisviga on kolme kvantiteerimise standardhälve.

See-eest on aga vähenenud nende hDNA osakaal. Δ rpo41 tüves erineb lähtetüvest rõngasmolekulide suurema osakaalu poolest. Rõngasmolekule on aga vähem Δ hmi1 tüvel ja Δ rpo41 Δ hmi1 topeltmutandil. Topeltmutandis ei ole detekteeritav ssDNA, mis on üsna madala signaaliga ka Δ hmi1 tüvel, kuid siiski olemas.

a1207 ori6 tüvede 2D AGE kvantiteerimisel (Joonis 31) on näha Hmi1 deleteerimisel sama efekti dsDNA-le kui a1328 ori2 tüvedes, kuigi efektid on veidi väiksemad. Sama on ka hDNAga, kus selgelt on vähenenud hDNA osakaal topeltmutandis, kuid Δ hmi1 tüves ei ole hDNA muutus nii suur. Nii nagu a1328 ori2 tüvedel on ka a1207 ori6 Δ rpo41 tüvel näha suuremat rõngasmolekulide osakaalu. Nii rõngasmolekulid kui ssDNA pole aga detekteeritavad Δ hmi1 tüves ja topeltmutandis.

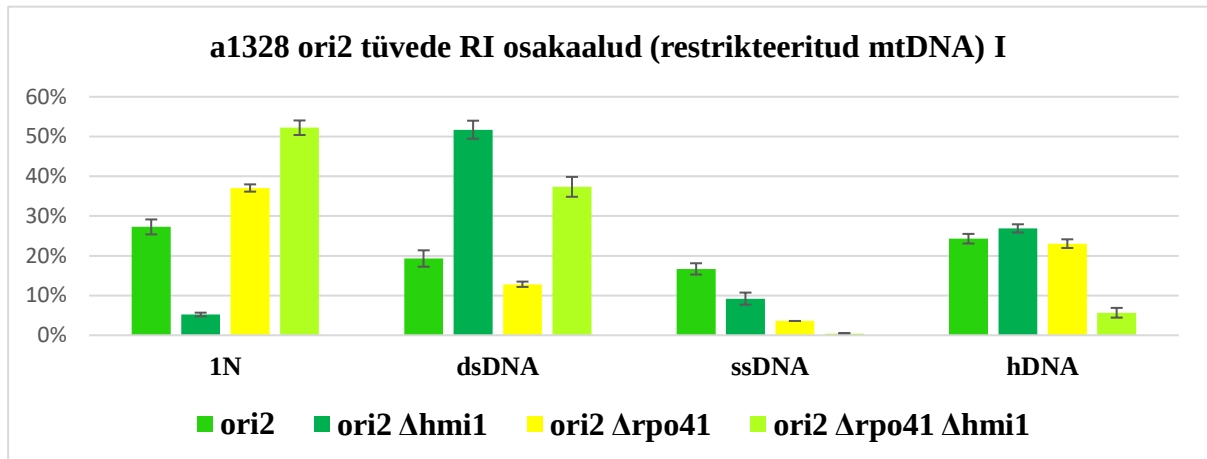


Joonis 31. a1207 ori6 tüvede RI osakaalud restrikteerimata mtDNA 2D AGE kvantiteerimisel. Mõõtmisviga on kolme kvantiteerimise standardhälve.

Restrikteeritud mtDNA 2D AGE kvantiteerimise tulemused jaotasin vastavalt intermediaatide osakaalule paremaks visualiseerimiseks kahte tulpdiagrammi. Esmalt on toodud 1N, dsDNA, ssDNA ja hDNA osakaalud (I), seejärel alla 10% osakaaluga Y-kaar, X-struktuur, 1N ss-dsDNA ja suuremad ss-dsDNA molekulid (II). Tulpdiagrammidel pole näidatud 2N analüüsi, kuna selle osakaal oli väike ja jäi kõigil tüvedel suhteliselt muutumatuks. hDNA osakaalu puhul ei saanud korduskatsete kvantiteerimisel sama korrelatsiooniga tulemusi.

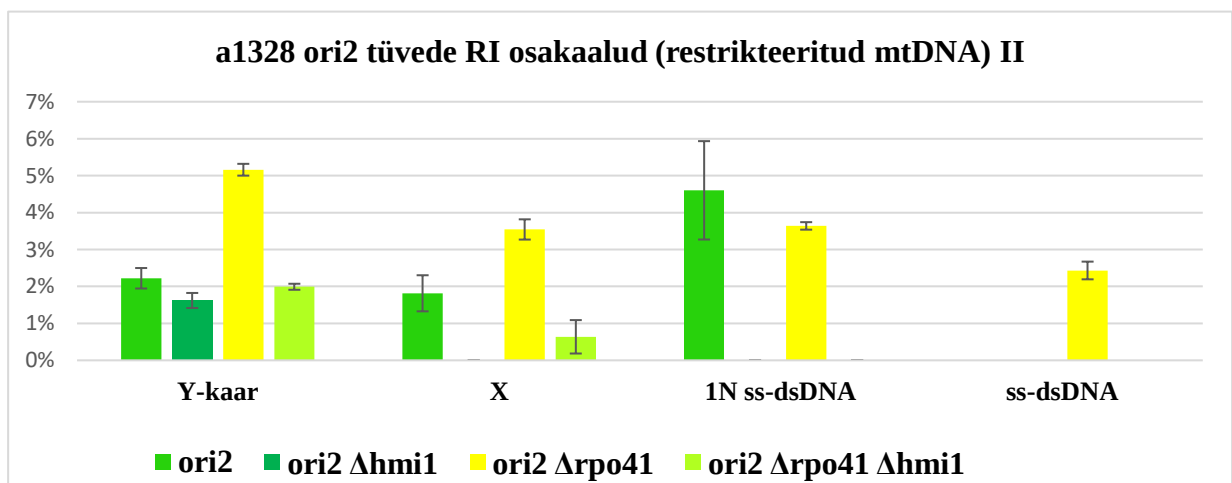
a1328 ori2 tüvede restrikteeritud mtDNA RI osakaalude tulpdiagrammid on väga kõnekad (Joonis 32 ja 33). Jooniselt 32 on näha Δ hmi1 tüve väga väike täielikult restrikteeritud dsDNA (1N) ja suur ülejäänud pikkustega dsDNA molekulide osakaal (dsDNA). Rpo41 deleteerimise

tasakaalustavat efekti topeltmutandis näitab 1N fragmendi osakaalu märgatav tõus. Samas dsDNA kogus on topeltmutandil endiselt lähtetüvest kõrgem, kuna esineb palju väikseid molekule. ssDNA molekulid puuduvad topeltmutandil ja on vähenenud Rpo41 deleteerimisel, samas on Δ rpo41 tüvel palju ss-dsDNA vaheühendeid (Joonis 33).



Joonis 32. a1328 ori2 tüvede RI osakaalud restrikteeritud mtDNA 2D AGE kvantiteerimisel. Mõõtmisviga on kolme kvantiteerimise standardhälve. Joonisel on välja toodud 1N, dsDNA, ssDNA ja hDNA osakaalud.

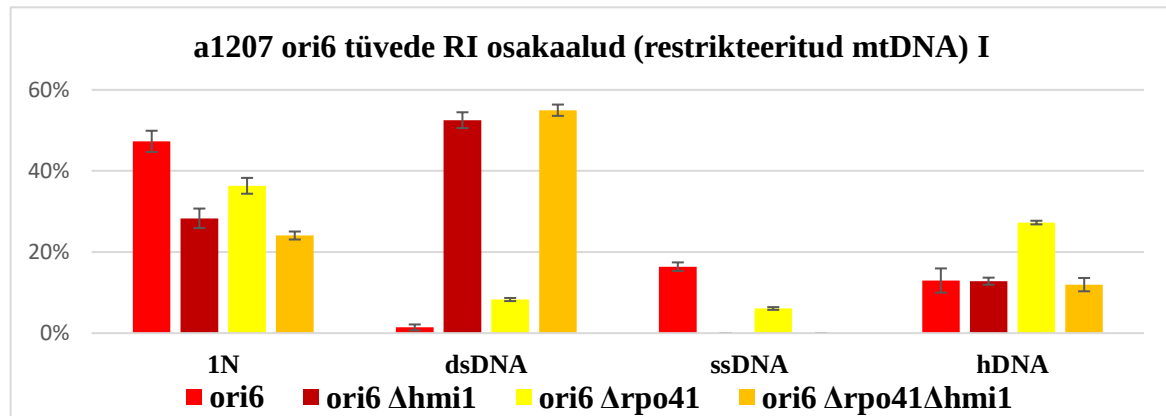
Erinevalt restrikteerimata mtDNA analüüsist (Joonis 30) on restrikteeritud mtDNA puhul vähenenud hDNA ainult topeltmutandis, aga mitte a1328 ori2 Δ hmi1 tüves. Kuna uuritavate tüvede restrikteeritud mtDNA 2D AGE kvantiteerimisel hDNA osakaalude muutused ei reprodutseerund korduskatsetes, siis antud parameetri muutusi töös ei arvestata.



Joonis 33. a1328 ori2 tüvede RI osakaalud restrikteeritud mtDNA 2D AGE kvantiteerimisel. Mõõtmisviga on kolme kvantiteerimise standardhälve. Joonisel on välja toodud Y-kaar, X-struktuur, 1N ss-dsDNA ja ss-dsDNA osakaalud.

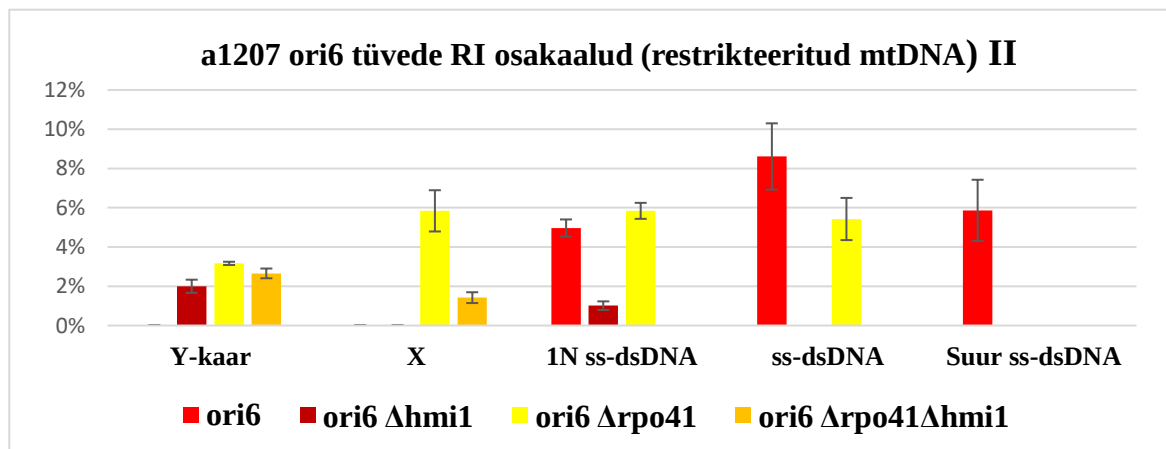
Kõige tugevama signaaliga Y-kaar ja X-struktuur on Δ rpo41 tüvedel, neil on rohkelt ka ss-dsDNA molekule, mida a1328 ori2 ja a1207 ori6 tüvedes esineb ainult 1N-2N piirkonnas. Tähelepanuväärne on ka X-struktuuride puudumine Δ hmi1 tüvedel ja selle vähenemine topeltmutandis.

a1207 ori6 tüvede restrikteeritud mtDNA 2D AGE kvantiteerimise tulemustest (Joonis 34 ja 35) on näha sarnaseid tendentse a1328 ori2 tüvedega, samas tulevad välja ka erinevused aktiivse



Joonis 34. a1207 ori6 tüvede RI osakaalud restrikteeritud mtDNA 2D AGE kvantiteerimisel. Mõõtmisviga on kolme kvantiteerimise standardhälve.

ja mitte-aktiivse ori-ga tüvede vahel. Hmi1 valgu deletsiooniga tüvede analüüsilt on näha, et helikaasi deleteerimine ei oma nii suurt efekti mitte-aktiivse ori-ga tüvedes kui aktiivse ori-ga tüvedes. 1N on pisut vähenenud ja dsDNA kogus on tõusnud hüppeliselt, samas kui a1328 ori2 Δ hmi1 tüves on 1N vähenemine tunduvalt drastilisem.



Joonis 35. a1207 ori6 tüvede RI osakaalud restrikteeritud mtDNA 2D AGE kvantiteerimisel. Mõõtmisviga on kolme kvantiteerimise standardhälve.

ssDNA molekulid puuduvad lisaks topeltmutandile ka $\Delta hmi1$ tüves, ent a1328 ori2 tüves puudub ssDNA ainult mõlema valgu deletsioonil. hDNA analüüsil saadud tulemused ei olnud reprodutseeritavad nagu ka a1328 ori2 tüvede puhul.

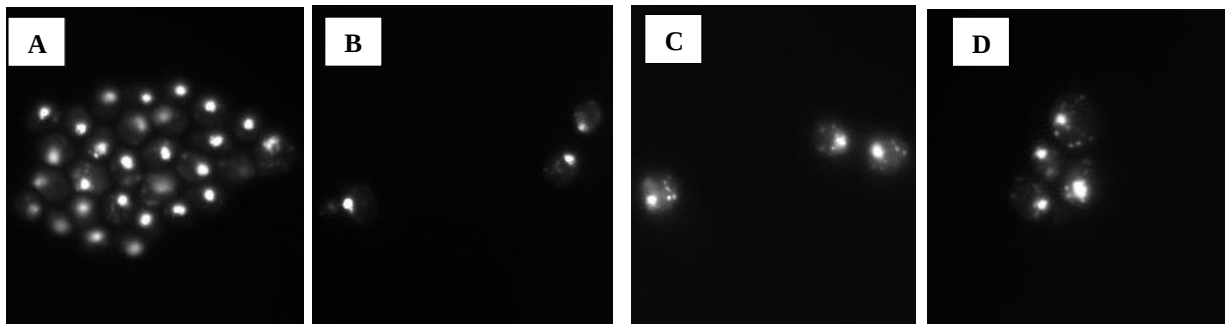
Erinevalt a1328 ori2 tüvest on a1207 ori6 tüvel puudu Y-kaar ja X-struktuur, kuid kõigis Hmi1 ja Rpo41 valkude deletsiooniga tüvedes esineb Y-kaar, X-struktuur on täielikult puudu veel ainult $\Delta hmi1$ tüves ja väga õrnalt näha ka topeltmutandil. a1207 ori6 tüvele olid väga iseloomulikud rohked ss-dsDNA molekulid, need esinesid ka Rpo41 deleteerimisel ja 1N piirkonnas ka veidi Hmi1 deletsiooniga tüves.

Kvantiteerimise tulemuste kokkuvõte:

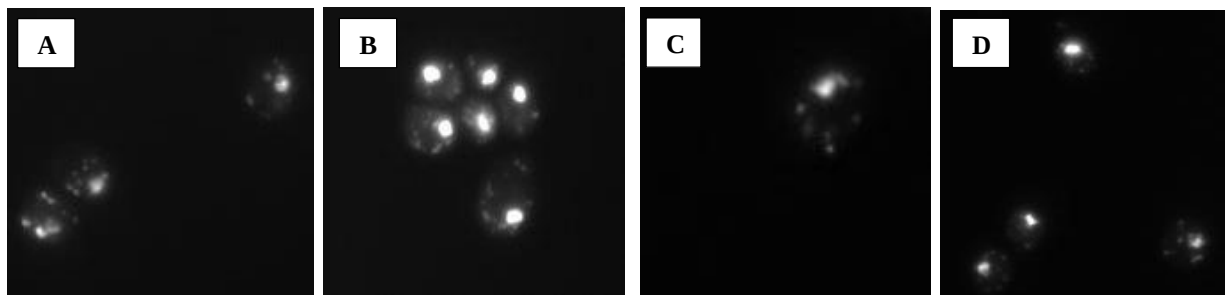
1. Hmi1 valgu deletsioonil tõuseb lühemate dsDNA molekulide ja langeb 1N osakaal, a1207 ori6 tüvedes on efekt väiksem. a1328 ori2 topeltmutandis on Hmi1 deleteerimisel väiksem efekt kui $\Delta hmi1$ tüves, a1207 ori6 topeltmutandis jääb dsDNA suuruste jaotus samaks.
2. a1328 ori2 tüvedest on kõige rohkem suuri dsDNA molekule $\Delta rpo41$ ja $\Delta rpo41 \Delta hmi1$ tüvedel, a1207 ori6 tüvedest oli kõige rohkem suuri dsDNA molekule lähtetüves. Kusjuures lähtetüvedest oli suurem dsDNA molekulide osakaal a1207 ori6 tüvel.
3. a1207 ori6 ja a1207 ori6 $\Delta rpo41$ tüvedes puudub 1-2N dsDNA ja a1207 ori6 tüves ka alla 1N suurused molekulid.
4. Hmi1 deleteerides väheneb hDNA osakaal võrreldes lähtetüvedega, kuigi efekt on veidi väiksem aktiivse ori puudumisel tüves. Tõusnud on a1207 ori6 $\Delta rpo41$ hDNA
5. Rõngasmolekulide osakaal on suurem $\Delta rpo41$ tüvedes, väiksem $\Delta hmi1$ ja $\Delta rpo41 \Delta hmi1$ tüvedes.
6. Topeltmutantides ja a1207 ori6 $\Delta hmi1$ tüves puuduvad ssDNA molekulid, teistes deletsiooniga tüvedes on ssDNA osakaal vähenenud.
7. ss-dsDNA vaheühendeid on palju $\Delta rpo41$ ja a1207 ori6 tüvedes, 1N-2N piirkonnas on ss-dsDNA-d ka a1328 ori2 tüves ja veidi a1207 ori6 $\Delta hmi1$ tüves.
8. a1207 ori6 tüves puudub Y-kaar. Kõige dominantsem Y-kaar ja X-struktuur on $\Delta rpo41$ tüvedes, eriti a1328 ori2 $\Delta rpo41$ tüves. See näitab, et a1207 ori6 lähtetüve ja $\Delta rpo41$ vahel on suur erinevus.
9. X-struktuur puudub $\Delta hmi1$ tüvedes ja selle vähenemine on toimunud topeltmutantides.

2.3.12 Nukleoidide analüüs DAPI-ga värvimise teel

Selleks, et võrrelda mtDNA nukleoidide suuruse ja arvu sõltuvust DNA topoloogiast värvisin kõiki tüvesid DAPI-ga. Joonisel 36 ja 37 on vastavalt a1328 ori2 ja a1207 ori6 lähtetüved, Δ hmi1, Δ rpo41 ja Δ rpo41 Δ hmi1 tüvede mikroskoopimise pildid neile iseloomulikest rakkudest. Kõige paremini olid DAPI-ga värvimisel näha Δ rpo41 ja a1207 ori6 tüvede mtDNA nukleoidid. Nagu eelnev 2D AGE analüüs näitas, on vastavates tüvedes pikad DNA molekulid, mis nähtavasti tekitavad suuri üksikuid nukleoidide. Väga hästi fluorestseerusid ka topeltmutantide mtDNA nukleoidid, mis ei olnud nii suured kui Δ rpo41 tüvedel ja neid oli ka märgatavalt rohkem raku kohta. Kõige halvemini on nähtavad a1328 ori2 ja a1328 ori2 Δ hmi1 tüvede mtDNA, mis 2D AGE analüüsi põhjal sisaldasid väikesed mtDNA molekulid. Nähtavasti tekib väikestest mtDNA molekulides palju halvasti värvuvaid väikeseid nukleoidide, mis tekitavad ühtlase kuma.



Joonis 36. Mikroskoobi pildid a1328 ori2 tüvede DAPI-ga värvimisest. a1328 ori2 tüved: (A) a1328 ori2, (B) Δ hmi1, (C) Δ rpo41, (D) Δ rpo41 Δ hmi1. DAPI-ga värvub nii tuumne DNA (suur nukleoid) kui mtDNA (väiksemad nukleoidid).



Joonis 37. Mikroskoobi pildid a1207 ori6 tüvede DAPI-ga värvimisest. a1207 ori6 tüved: (A) a1207 ori6, (B) Δ hmi1, (C) Δ rpo41, (D) Δ rpo41 Δ hmi1. DAPI-ga värvub nii tuumne DNA (suur nukleoid) kui mtDNA (väiksemad nukleoidid).

2.4 Arutelu

Siiani pole teada, kuidas toimub pärmi mtDNA replikatsioon nii funktsionaalse mtDNA-ga ρ^+ ega ka mutantsetes ρ^- tüvedes. MtDNA replikatsiooni initsiatsiooni mudeleid on välja käidud kaks: rekombinatsioonilise (Ling et al., 2007) ja RNA praimerimisega (Maleszka et al., 1991). Selge on, et ρ^+ ja ρ^- mtDNA replikatsiooniks on vaja erinevaid valke ja seetõttu võib eeldada ka erinevusi replikatsiooni mudelis (Dyck & Clayton, 1998; Fangman et al., 1989; Sedman et al., 2000).

ρ^- mtDNA replikatsiooniks pole vajalik RNA polümeraas Rpo41, mis sünteesib mitokondris nii mRNA-d kui ka RNA praimereid (FANGMAN et al., 1989). Samuti pole ρ^- mtDNA säilitamiseks vajalik helikaas Hmi1 (Sedman et al., 2000), mille rolliks mitokondris peetakse rekombinatsioonilistes protsessides osalemist näiteks replikatsiooni initsiatsioonil või reparatsioonil (Monroe et al., 2005; Sedman et al., 2005). Antud töös analüüsisin ρ^- tüvede mtDNA sünteesi, et uurida nimetatud valkude deletsiooni ja aktiivse transkriptsiooni mõju mtDNA replikatsioonile. Rpo41 ja Hmi1 valgu deleteerimisega HS a1328 ori2 ja S a1207 ori6 ρ^- tüvedest oli näha tõsiseid muutusi mtDNA replikatsiooni intermediaatides. Need muutused on reprodutseeritavad (va. restrikteeritud mtDNA hDNA osakaalu muutus) erinevate bioloogiliste replikaatide vahel ning nende visuaalne inspekteerimine ja kvantitatiivne analüüs võimaldab teha mitmeid otseseid järeldusi.

Minu töö tulemustest on näha Hmi1 olulist rolli rekombinatsioonilistes protsessides. Seda väidet tõendab mitme RI osakaalu muutumine Hmi1 valgu puudumisel. Esmalt pole Hmi1 deletsioonil detekteeritavad X-struktuuriga molekulid. Nende rekombinatsiooni vaheühendite puudumine võib olla tingitud näiteks rekombinatsioonilise reparatsiooni vähenemisest, sest see selgitaks ka $\Delta hmi1$ tüvede mtDNA fragmenteerumist.

Varasemalt on välja pakutud, et Hmi1 võiks olla oluline rekombinatsioonist sõltuval reparatsioonil, sest ρ^- mtDNA säilitamiseks pole Hmi1 vajalik ja seda seletadab ρ^- mutantide väiksem mtDNA genoom, milles võiks teoreetiliselt toimuda vähem replikatsioonikahvli seisakuid ja seega ei vajaks ρ^- mtDNA nii tihti reparatsioonimehhanismide kasutamist (Sedman et al., 2005).

Seda hüpoteesi kinnitavad ka antud töös saadud tulemused transkriptsiooni mõju kohta Hmi1 deletsioonil. Hmi1 deleteerimisel aktiivselt transkribeeritava ori-ga tüvest on mtDNA fragmenteerumine tugevam kui inaktiivset ori sisaldavast tüvest. Rpo41 deletsiooniga a1328

ori2 tüvest Hmi1 deleteerimise efekt on aga väiksem kui lähtetüvest Hmi1 deleteerimisel. Nimelt aktiivse transkriptsiooniga tüvedes võib tekkida rohkem transkriptsiooni ja replikatsiooni masinavärgi kokkupõrkeid, mis tekitavad DNA-s kahjustusi. Samuti on lähtetüvega võrreldes vähenenud Hmi1 deletsioonil rõngasmolekulide osakaal, mis võivad tekkida rekombinatsiooni abil.

Lisaks transkriptsiooni destabiliseerivale mõjule Hmi1 deletsiooniga tüvedes võib osutada aktiivse transkriptsiooni replikatsiooni inhibeerivale toimele ka pikkade dsDNA molekulide suur osakaal aktiivse transkriptsioonita tüvedes. Kuna mtDNA süntees toimub kogu rakutsükli vältel, mitte ainult S-faasis, siis võivad transkriptsiooni- ja replikatsioonimasinavärgi kokkupõrked tekkida tihedamini kui tuumses DNA-s. See võib põhjustada näiteks replikatsiooni seisakuid, rekombinatsiooni või genoomi ebastabiilsust (Helmrich et al., 2013; Mori and Shirahige, 2007).

Vastupidine efekt on Hmi1 deleteerimisel, kus suured dsDNA molekulid kaovad. See kinnitab ka varem saadud tulemusi Hmi1 deleteerimisel wt pärmist (Sedman et al., 2005). See näitab, et DNA süntees on Hmi1 valgu puudumisel häiritud.

Sellest tulenevalt võiks Hmi1 helikaasil olla roll replikatsiooni initsiatsioonil. Kusjuures üllataval kombel pole tema ATPaasne lahti harutamise aktiivsus vajalik mtDNA säilitamiseks. Sellisel juhul seisneks Hmi1 hädavajalik funktsioon mtDNA säilitamisel teiste replikatsiooniga seotud valkude assambleerimisel (Monroe *et al.*, 2005; Sedman *et al.*, 2005). Edasiseks Hmi1 funktsioonide uurimiseks DNA sünteesil olen analüüsinud ka Hmi1 ATPaasse aktiivsuse ja teiste Hmi1 valgu domeenide mõju *rho*⁻ mtDNA sünteesile ja replikatsiooni intermediaatidele, kuid korduskatsete puudumise tõttu ei lisanud saadud tulemusi antud töösse.

Drastiliselt erineb kõigist teistest restrikteeritud mtDNA piltidest a1207 ori6 tüve 2D AGE pilt, millel domineerivad ss-dsDNA üleminekumolekulid. Võiks öelda, et kuna ss-dsDNA molekulid esineb peamiselt ainult Δ rpo41 ja a1207 ori6 tüvedes, siis see viitab transkriptsioonist sõltumatu replikatsioonile näiteks isepaimeerumisel või rekombinatsiooni teel initsiatsiooniga, kuid see ei seleta a1207 ori6 tüve erinevusi Rpo41 deletsiooniga tüvedest. Samuti ei saa välistada ka alternatiivsete transkriptsioonisaite olemasolu. Olgugi, et a1207 ori6 tüves puudub aktiivne ori, on tüves alles Rpo41 valk ja sellisel juhul on võimalik, et RNA paimeerimiseks kasutatakse teisi transkriptsiooni initsiatsioonisaite. Samuti on märkimisväärne, et ss-dsDNA molekulid puuduvad Δ rpo41 Δ hmi1 topeltmutantides. See

toetaks pigem teooriat, mille kohaselt a1207 ori6 tüve replikatsioon toimub rekombinatsioon-sõltuva praimeerimisega, kuid endiselt jääks sellisel juhul selgusetuks, miks erinevad a1207 ori6 ja a1207 ori6 Δ rpo41 tüved teineteisest. Samuti on tähelepanuväärne, et a1207 ori6 tüve restrikteeritud mtDNA-s puudub Y-kaar, kuid selle analüüsiks tuleks lõigata mtDNA-d ka erinevate restriктаasidega.

Arvatakse, et hüpersupressiivsuseks metsiktüübiga ristates on vajalik transkriptsioon ori järjestustelt paiknevalt promootorilt, sest RNA praimeerimise mudeli järgi annaks see ori tiheduse tõttu eelise kiiremini replitseeruvale *rho*⁻ genoomile (MacAlpine et al., 2001). Replikatsiooni lõpp-produktiks on aga pikk konkatemeerne dsDNA molekul, mille osakaal antud töö tulemustes oli suurim just aktiivse transkriptsioonita tüvedes. Kõige rohkem pikki molekule leidub supressiivsel a1207 ori6 tüvel ja Rpo41 deletsiooniga tüvedel.

Ori promootorilt toimuva transkriptsiooni olulisust hüpersupressiivsuseks on näidatud intaktse promootori katkestamisega (MacAlpine et al., 2001). Kuid promootori modifitseerimine võib mõjutada ka teiste valkude interaktsioone ori-ga ja läbi selle mõjutada supressiivsust. Veel peaks selle hüpoteesi järgi *rho*⁻ mtDNA supressiivsus olema transkriptsioonist sõltuv, kuid supressiivsuseks neutraalse *rho*⁻ mutandiga ristates pole supressiivsel tüvel vaja Rpo41 valku (Lorimer et al., 1995). Seega põhjanevad tõendid transkriptsiooni rollist hüpersupressiivsusel puuduvad ning antud töö tulemustest järeldub, et arvatavasti määrab supressiivsuse ori element ise, mitte sellelt toimuv transkriptsioon. Teine hüpotees ori funktsiooniks hüpersupressiivsusel võiks olla efektiivsema segregatsiooni tagamine tütarakkudesse rekombinatsiooni abil.

Seda on pakutud välja ka varem Cce1 valgu põhjal, mis lahendab rekombinatsioonil tekkivaid Holliday ühendusi, toimides ori järjestustel. Kui HS *rho*⁻ mutandil deleteerida Cce1 valk, siis tema hüpersupressiivsus kaob, seega võib supressiivsus olla seotud just rekombinatsiooniga (Lockshon et al., 1995; Zweifel and Fangman, 1991). Mgm101 on mtDNA rekombinatsiooniga seotud valk, mis on vajalik ainult wt ja ilma ori-ta *rho*⁻ mtDNA säilitamiseks, kuid ori-ga *rho*⁻ mutantides pole Mgm101 vajalik (Mbantenkhu et al., 2011; Zuo et al., 2002). See näitab, et sõltuvalt ori olemasolust võib replikatsiooniks vajalik rekombinatsioon toimuda erinevate valkude abil. Kuid seni pole täheldatud aktiivse ja inaktiivse ori erinevust rekombinatsiooniga seotud valkudega interakteerumisel. Antud töö tulemustest selgus aga, et inaktiivse ori-ga a1207 ori6 tüves puudub X-struktuur. Sellest järeldub, et rekombinatsiooniga seotud protsessid võivad sõltuda ori aktiivsusest.

Replikatsiooni ja rekombinatsiooni intermediaatide põhjalikumaks analüüsiks tuleks edaspidi *rho*⁻ tüvede mtDNA-d lõigata restriктаasidega, mille lõikesait on erineval kaugusel ori-st, mis võimaldaks uurida täpsemalt ori rolli ja replikatsiooni initsiatsiooni *rho*⁻ mutantides.

Lõpuks, DAPI-ga värvitud *rho*⁻ tüvede mikroskoopimisel selgus, et nukleoidide suurus ja arv koreleeruvad mtDNA topoloogia 2D AGE analüüsil saadud tulemustega. Rpo41 valgu puudumisel on a1207 ori6 ja a1328 ori2 tüvede mtDNA nukleoidid suured ja harvemad. Δ hmi1 tüvede mtDNA nukleoidide on palju ja need on väikesed. Seega kinnitavad meie andmed, et esineb otsene seos mtDNA suuruse ja nukleoidide morfoloogia vahel. Tüvedes, kus mtDNA on fragmenteerunud väikesteks molekulideks, on nukleoidid väikesed, kuid neid on palju. Vastupidi, tüvedes kus mtDNA molekulid on pikad, on vähesed ent suured nukleoidid. Need tulemused on hästi kooskõlas Cce1 valgu põhjal saadud tulemustega, kus ilma Cce1 valguta jäävad rekombinatsiooni vaheühendid lahendamata ja tekivad suured omavahel ühendatud DNA agregaadid. Nende üksikute mtDNA agregaatide pärandumine on häiritud (Lockshon et al., 1995). See seletab ka hüpersupressiivsuse fenomeni, kuna aktiivse transkriptsioonita tüvedes on pikemad mtDNA molekulid puudub neil suurte nukleoidide tõttu eelis tütarakkudesse segregeerumisel. Hmi1 deletsiooniga tekkivad väikesed arvukad mtDNA nukleoidid tõendavad jällegi antud helikaasi rolli rekombinatsiooni protsessides.

Praeguseks avaldatud teadusartiklites on uuritud ainult aktiivse promootoriga HS *rho*⁻ tüvede mtDNA-d kasutades 2D AGE meetodit. Antud töös uuriti kahe erineva *rho*⁻ tüve mtDNA replikatsiooni sünteesi ja intermediaate kasutades sama meetodit. See on esimene uuring, mis näitab, et *rho*⁻ mtDNA replikatsiooni intermediaatid on HS *rho*⁻ ja S *rho*⁻ tüvedes erinevad.

KOKKUVÕTE

Olgugi, et *S. cerevisiae* on tänu oma võimele kasvada ilma OXPHOS rada kasutamata mtDNA uurimiseks väga hea mudelorganism, ei ole teada, kuidas toimub mtDNA replikatsiooni nii metsiktüüpi (ρ^+) kui defektse mtDNA-ga (ρ^-) *petite* mutantides. Välja on käidud kaks replikatsiooni initsiatsiooni mudelit: RNA praimerimisega ja rekombinatsioon-sõltuv. Lähtuvalt hüpoteetilistest replikatsiooni mudelitest uuriti antud töös kahe ρ^+ mtDNA säilimiseks vajaliku mitokondriaalse valgu, RNA polümeraasi Rpo41 ja mtDNA helikaasi Hmi1 deletsiooni mõju ρ^- tüvede mtDNA replikatsiooni intermediaatidele. Kuna selgusetu on ka aktiivse ori-ga ρ^- tüvede hüpersupressiivsuse mehhanism ja aktiivse ori mõju replikatsioonile, siis deleteeriti nimetatud valgud nii supressiivses ori6 sisaldavas tüves kui hüpersupressiivses ori2-ga tüves. mtDNA sünteesi uurimiseks analüüsiti algtüvede a1328 ori2 ja a1207 ori6 ning neist tehtud deletsiooniga tüvede $\Delta hmi1$, $\Delta rpo41$, $\Delta hmi1\Delta rpo41$ ja $\Delta rpo41\Delta hmi1$ replikatsiooni intermediaate 2D AGE meetodil.

Saadud tulemused tõendasid Hmi1 valgu rolli rekombinatsioonis ja mtDNA stabiliseerimises. Nimelt Hmi1 deletsiooniga tüvedes ei ole detekteeritav X-struktuur ja mtDNA on fragmenteerunud. X-struktuuri puudumine võib olla tingitud näiteks rekombinatsioonilise reparatsiooni vähenemisest, mis põhjendaks ka $\Delta hmi1$ tüvede mtDNA fragmenteerumist.

Topeltmutantide, $\Delta rpo41$ tüvede ja ka inaktiivse ori-ga algtüve analüüsist selgus, et aktiivne transkriptsioon inhibeerib pikkade lineaarsete dsDNA molekulide sünteesi. Seda võib põhjustada replikatsiooni ja transkriptsiooni masinavärgi kokkupõrgetest tingitud probleemid DNA sünteesil. Samuti on sellega seletatav Hmi1 deletsiooni väiksem efekt topeltmutantide mtDNA-le. Rpo41 puudumisel ei teki replikatsiooni ja transkriptsiooni masinavärgi kokkupõrkeid ja mtDNA on stabiilsem ning seetõttu ei oma Hmi1 deletsiooniga vähenenud reparatsioon nii suurt mõju topeltmutandis.

Antud töö tulemused seadsid kahtluse alla ka transkriptsiooni rolli ρ^- mtDNA supressiivsuse tagamisel. Arvatakse, et RNA praimerite süntees ori järjestuselt tagab suurema ori sagedusega ρ^- mtDNA kiirema replikatsiooni. Kuid aktiivse transkriptsioonita ρ^- tüvede pikemate dsDNA molekulide osakaal käib sellele hüpoteesile vastu. Pigem on saadud tulemustest näha rekombinatsiooni ja mtDNA segregatsiooni rolli hüpersupressiivsusel.

Mitochondrial helicase Hmi1 and transcription have important impact on mitochondrial DNA synthesis in *S. cerevisiae* *rho*⁻ mutants

Astrid Salumäe

Summary

S. cerevisiae is a good model organism for the research of mitochondrial DNA (mtDNA) metabolism due to its ability to survive without the OXPHOS metabolic pathway. Respiratory-deficient yeast containing a small tandemly repeated mtDNA fragment are called *rho*⁻ mutants. The model for mtDNA replication is still unclear both in the wild-type *rho*⁺ and in the *rho*⁻ mutant strains. Two models have been proposed for the replication initiation model of yeast mtDNA: RNA primed and recombination dependent initiation.

There is also insufficient knowledge regarding the mechanism behind *rho*⁻ hypersuppressiveness (HS) – a phenomenon in which *rho*⁻ mtDNA is preferentially inherited in crosses with *rho*⁺ strains. HS mutants contain a transcriptionally active ori site and are inherited to almost 100% of the offsprings, suppressive (S) strains have an insertion in their ori sequence so that these ori sites are inactive and there's a weaker preference of the *rho*⁻ mtDNA than in HS strains

To study the roles of recombination and transcription on DNA synthesis, two proteins essential for *rho*⁺ strains, helicase Hmi1 and RNA polymerase Rpo41 were deleted from HS and S *rho*⁻ strains a1328 ori2 and a1207 ori6 accordingly. The changes in mtDNA synthesis were studied by analyzing the replication intermediates in *rho*⁻ mtDNA 2-dimensional agarose gel electrophoresis and quantifying their Southern blot signals. In addition, the mtDNA nucleoids were studied by microscoping DAPI-stained cells in UV light.

Results were obtained from 10 different strains in two biological replicas: a1328 ori2, a1207 ori6 and the deletions made in these two strains were Δ hmi1, Δ rpo41, Δ rpo41 Δ hmi1 and Δ hmi1 Δ rpo41, whereas the last two deletions had the same impact. The outcome of the analysis was significant for understanding the roles of transcription and Hmi1 in DNA synthesis but also for the research of mtDNA replication model and *rho*⁻ hypersuppressivity.

The results further confirmed the role of Hmi1 in recombination and maintaining the integrity of mtDNA. Namely in $\Delta hmi1$ strains the recombination intermediate X-spike was not detectable and mtDNA was fragmented. The loss of X-spike could result from the decrease of recombinational repair activity. This would also explain the fragmentation of the mtDNA.

By analyzing the strains with Rpo41 deletion and a1207 ori6 initial strain, I concluded that active transcription inhibits the synthesis of long linear dsDNA molecules. This indicates replication and transcription machinery collisions which cause replication fork stalling and mtDNA instability. Furthermore, the milder impact of Hmi1 deletion in $\Delta rpo41 \Delta hmi1$ strains could then be explained with the more stable genome in the absence of Rpo41. Without the collisions of replication and transcription machinery the need for recombinational repair is reduced.

Also, the results obtained from this study question the role of transcription in *rho*⁻ mtDNA hypersuppressivity. It has been suggested that the synthesis of RNA primers from the ori promoter provides more efficient replication of the *rho*⁻ mtDNA because of its high density of ori sequences. Results in the given paper show that strains lacking active transcription have a larger fraction of long dsDNA molecules in their mtDNA, therefore this hypothesis for hypersuppressiveness is unlikely. By comparing HS a1328 ori2 and S a1207 ori6 *rho*⁻ mtDNA intermediates the more likely process involved in hypersuppressiveness is recombination and mtDNA segregation to daughter cells.

Finally, the analysis of mtDNA nucleoids show a correlation between mtDNA topology and the number and size of nucleoids. Strains that contained more small fragmented molecules have an increased number of nucleoids that are much smaller in size. Yeast cells that have mainly long mtDNA molecules seem to have a small number of large nucleoids in their mitochondria.

All in all, this study showed the important impact of transcription and helicase Hmi1 in *rho*⁻ mtDNA synthesis. Although, more research is needed and other proteins need to be studied for the understanding of replication mechanisms in yeast mtDNA, this analysis gives a good base for additional research on mtDNA replication intermediates.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin kiirustades väga tänada lõputöö valmimise eest oma juhendajaid Tiina Sedmani ja Juhan Sedmani igakülgse juhendamise eest ja võimaluse eest töötada laboris ka suvel ja öötundidel. Suureks abiks olid ka Maie Loorits, Natalja Garber ja Sirelin Sillamaa. Huumorisoont aitas säilitada Pavel Volõnkin. Tänan ka alati abivalmsat ja ja mind järje peal hoidvat Katrin Orrot, kes tundis muret ka mu 24-tunniste tööpäevade pärast. Suured-suured tänud mu vanematele toetuse ja mõistva suhtumise eest kui nädalavahetustel maale ei jõudnud. Tänan Marvininit, kes usaldades mind, uskus, et pidin tõesti kell 22 laborisse minema.

Kasutatud kirjandus

- Amberg, D.C. (c2005.). *Methods in yeast genetics : a Cold Spring Harbor Laboratory course manual* / (Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press,).
- Baldacci, G., and Bernardi, G. (1982). Replication origins are associated with transcription initiation sequences in the mitochondrial genome of yeast. *EMBO J* 1, 987–994.
- Baldacci, G., Cherif-Zahar, B., and Bernardi, G. (1984). The initiation of DNA replication in the mitochondrial genome of yeast. *EMBO J* 3.
- Bernardi, G. (2005). Lessons from a small, dispensable genome: The mitochondrial genome of yeast. *Gene* 354, 189–200.
- Bernardi, G., Piperno, G., and Fonty, G. (1972). The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. I. Preparation and heterogeneity of mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 65, 173–189.
- Bernardi, G (1982). The origins of replication of the mitochondrial genome of yeast. *Trends Biochem Sci* 7.
- Blanc, H., and Dujon, B. (1980). Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA responsible for suppressiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 3942–3946.
- Bos, J.L., Heyting, C., Van der Horst, G., and Borst, P. (1980). The organization of repeating units in mitochondrial DNA from yeast petite mutants. *Curr. Genet.* 1, 233–239.
- Chen, X.J., and Butow, R.A. (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* 6, 815–825.
- Cohen, A., and Clark, A.J. (1986). Synthesis of linear plasmid multimers in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 167, 327–335.
- Day, M. (2013). Yeast petites and small colony variants: for everything there is a season. *Adv. Appl. Microbiol.* 85, 1–41.
- Dujon, B. (1981). Mitochondrial genetics and functions. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 505–635.
- Dyck, E.V., and Clayton, D.A. (1998). Transcription-Dependent DNA Transactions in the Mitochondrial Genome of a Yeast Hypersuppressive Petite Mutant. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2976–2985.
- Ephrussi, B. (1953). Nucleo-cytoplasmic relations in micro-organisms. Their bearing on cell heredity and differentiation. *Nucleo-Cytoplasmic Relat. Micro-Org. Their Bear. Cell Hered. Differ.*

Fangman, W.L., Henly, J.W., Churchill, G., and Brewer, B.J. (1989). Stable maintenance of a 35-base-pair yeast mitochondrial genome. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1917–1921.

FANGMAN, W.L., HENLY, J.W., and BREWER, B.J. (1989). RP041-Independent Maintenance of [rho-] Mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *MOL CELL BIOL* 10, 6.

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

Friedman, K.L., and Brewer, B.J. (1995). Analysis of replication intermediates by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 262, 613–627.

Gerhold, J.M., Aun, A., Sedman, T., Jöers, P., and Sedman, J. (2010). Strand invasion structures in the inverted repeat of *Candida albicans* mitochondrial DNA reveal a role for homologous recombination in replication. *Mol. Cell* 39, 851–861.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563–567.

Greenleaf, A.L., Kelly, J.L., and Lehman, I.R. (1986). Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 3391–3394.

Helmrich, A., Ballarino, M., Nudler, E., and Tora, L. (2013). Transcription-replication encounters, consequences and genomic instability. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 412–418.

Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52, 536–553.

Hill, J., Donald, K.A., Griffiths, D.E., and Donald, G. (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* 19, 5791.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163–168.

Jiménez, J., Longo, E., and Benítez, T. (1988). Induction of petite yeast mutants by membrane-active agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 3126–3132.

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

Kreuzer, K.N. (1988). Tertiary Initiation of Replication in Bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* 263, 11348–11357.

- Kreuzer, K.N., Yap, W.Y., Menkens, A.E., and Engman, H.W. (1988). Recombination-dependent replication of plasmids during bacteriophage T4 infection. *J. Biol. Chem.* 263, 11366–11373.
- Kuusk, S., Sedman, T., Jöers, P., and Sedman, J. (2005). Hmi1p from *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is a structure-specific DNA helicase. *J. Biol. Chem.* 280, 24322–24329.
- Lecrenier, N., and Foury, F. (2000). New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene* 246, 37–48.
- Ling, F., and Shibata, T. (2002). Recombination-dependent mtDNA partitioning: in vivo role of Mhr1p to promote pairing of homologous DNA. *EMBO J.* 21, 4730–4740.
- Ling, F., Hori, A., and Shibata, T. (2007). DNA Recombination-Initiation Plays a Role in the Extremely Biased Inheritance of Yeast [rho⁻] Mitochondrial DNA That Contains the Replication Origin ori5. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1133–1145.
- Lisowsky, T., Wilkens, D., Stein, T., Hedtke, B., Börner, T., and Weihe, A. (2002). The C-terminal region of mitochondrial single-subunit RNA polymerases contains species-specific determinants for maintenance of intact mitochondrial genomes. *Mol. Biol. Cell* 13, 2245–2255.
- Lockshon, D., Zweifel, S.G., Freeman-Cook, L.L., Lorimer, H.E., Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1995). A role for recombination junctions in the segregation of mitochondrial DNA in yeast. *Cell* 81, 947–955.
- Lööke, M., Kristjuhan, K., and Kristjuhan, A. (2011). EXTRACTION OF GENOMIC DNA FROM YEASTS FOR PCR-BASED APPLICATIONS. *BioTechniques* 50, 325–328.
- Lorimer, H.E., Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1995). A test of the transcription model for biased inheritance of yeast mitochondrial DNA. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4803–4809.
- MacAlpine, D.M., Perlman, P.S., and Butow, R.A. (1998). The high mobility group protein Abf2p influences the level of yeast mitochondrial DNA recombination intermediates in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6739–6743.
- MacAlpine, D.M., Kolesar, J., Okamoto, K., Butow, R.A., and Perlman, P.S. (2001). Replication and preferential inheritance of hypersuppressive petite mitochondrial DNA. *EMBO J.* 20, 1807–1817.
- Maleszka, R., Skelly, P.J., and Clark-Walker, G.D. (1991). Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *EMBO J.* 10, 3923–3929.
- Mbantenkhu, M., Wang, X., Nardoizzi, J.D., Wilkens, S., Hoffman, E., Patel, A., Cosgrove, M.S., and Chen, X.J. (2011). Mgm101 Is a Rad52-related Protein Required for Mitochondrial DNA Recombination. *J. Biol. Chem.* 286, 42360–42370.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Curr. Biol.* 16, R551–R560.

- Miyakawa, I., Sando, N., Kawano, S., Nakamura, S., and Kuroiwa, T. (1987). Isolation of morphologically intact mitochondrial nucleoids from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* *88* (Pt 4), 431–439.
- Miyakawa, I., Tsukamoto, T., Sakoda, M., Kuroiwa, T., and Sando, N. (1988). Inhibition of yeast mitochondrial nucleoid fusion by ethidium bromide and respiration inhibitors. *J. Gen. Appl. Microbiol.* *34*, 485–492.
- Monroe, D.S., Leitzel, A.K., Klein, H.L., and Matson, S.W. (2005). Biochemical and genetic characterization of Hmi1p, a yeast DNA helicase involved in the maintenance of mitochondrial DNA. *Yeast* Chichester Engl. *22*, 1269–1286.
- Mori, S., and Shirahige, K. (2007). Perturbation of the activity of replication origin by meiosis-specific transcription. *J. Biol. Chem.* *282*, 4447–4452.
- Okamoto, S., Inai, T., and Miyakawa, I. (2016). Morphology of mitochondrial nucleoids in respiratory-deficient yeast cells varies depending on the unit length of the mitochondrial DNA sequence. *FEMS Yeast Res.* *16*.
- Petes, T.D., Byers, B., and Fangman, W.L. (1973). Size and Structure of Yeast Chromosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *70*, 3072–3076.
- Radford, A. (1991). *Methods in yeast genetics — A laboratory course manual* by M Rose, F Winston and P Hieter. pp 198. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1990. \$34 ISBN 0-87969-354-1. *Biochem. Educ.* *19*, 101–102.
- Ramachandran, A., Nandakumar, D., Deshpande, A.P., Lucas, T.P., R-Bhojappa, R., Tang, G.-Q., Raney, K., Yin, Y.W., and Patel, S.S. (2016). The Yeast Mitochondrial RNA Polymerase and Transcription Factor Complex Catalyzes Efficient Priming of DNA Synthesis on Single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* *291*, 16828–16839.
- Sanchez-Sandoval, E., Diaz-Quezada, C., Velazquez, G., Arroyo-Navarro, L.F., Almanza-Martinez, N., Trasviña-Arenas, C.H., and Briebe, L.G. (2015). Yeast mitochondrial RNA polymerase primes mitochondrial DNA polymerase at origins of replication and promoter sequences. *Mitochondrion* *24*, 22–31.
- Sedman, T., Kuusk, S., Kivi, S., and Sedman, J. (2000). A DNA helicase required for maintenance of the functional mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1816–1824.
- Sedman, T., Jöers, P., Kuusk, S., and Sedman, J. (2005). Helicase Hmi1 stimulates the synthesis of concatemeric mitochondrial DNA molecules in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* *47*, 213–222.
- Shadel, G.S. (1999). Yeast as a Model for Human mtDNA Replication. *Am. J. Hum. Genet.* *65*, 1230–1237.

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

Stohl, L.L., and Clayton, D.A. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* contains an RNase MRP that cleaves at a conserved mitochondrial RNA sequence implicated in replication priming. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2561–2569.

Tang, G.-Q., Deshpande, A.P., and Patel, S.S. (2011). Transcription Factor-dependent DNA Bending Governs Promoter Recognition by the Mitochondrial RNA Polymerase. *J. Biol. Chem.* 286, 38805–38813.

Topper, J. N., D.D.C., and R. P. Fisher (1988). Initiation and processing of mitochondrial displacement loop transcripts. *Cancer Cells* 6, 207–212.

Tzagoloff, A., and Myers, A.M. (1986). Genetics of Mitochondrial Biogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 249–285.

Williamson, D.H., and Fennell, D.J. (1975). The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA. *Methods Cell Biol.* 12, 335–351.

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

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

Zassenhaus, H.P., Martin, N.C., and Butow, R.A. (1984). Origins of transcripts of the yeast mitochondrial var 1 gene. *J. Biol. Chem.* 259, 6019–6027.

Zuo, X.M., Clark-Walker, G.D., and Chen, X.J. (2002). The mitochondrial nucleoid protein, Mgm101p, of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the maintenance of rho(+) and ori/rep-devoid petite genomes but is not required for hypersuppressive rho(-) mtDNA. *Genetics* 160, 1389–1400.

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

Kasutatud veebiaadressid:

<http://www.yeastgenome.org>

LISAD

Lisa 1. Praimerite järjestused ja seondumiskohad

Praimeri nimi	Praimeri järjestus	Praimeri seondumiskoh t
ORI3IN	TAGGGGGAGGGGGTGGGT	Ori järjestuse 3` ots
ORI5IN	GGGGGTCCCAATTATTATTTTC	Ori järjestuse 5` ots
ORI3OUT	ACCCACCCCCTCCCCCTA	Ori järjestuse 3` ots
ORI5OUT	GAAAATAATAATTGGGACCCCC	Ori järjestuse 5` ots
HmiS1	TAATATGTAGAAAAAATATAGAGAAGGTATACG T CGTTCGTTGAAGACAGCGTACGCTGCAGGTCGA C	HMI1 geeni ees
HmiS2	ATTATGTAAAAGGGTGATAATACATTATGAAAG G TAAGTAAAAAACTATTATCGATGAATTCGAGCT CG	HMI1 geeni taga
Hmi1 PSeq	CTTCCCTTGTGATGTGTCAG	HMI1 promootor
HmiTERMrev	ATGCCTTTTAGCATACTTTACC	HMI1 terminus
KanMX3	GAATTCGAGCTCGTTTTTCGACAC	Kan kasseti 3
Rpo41 5UP	GCAGATCTCCTGTTTCATATACC	RPO41 geeni 5` ots

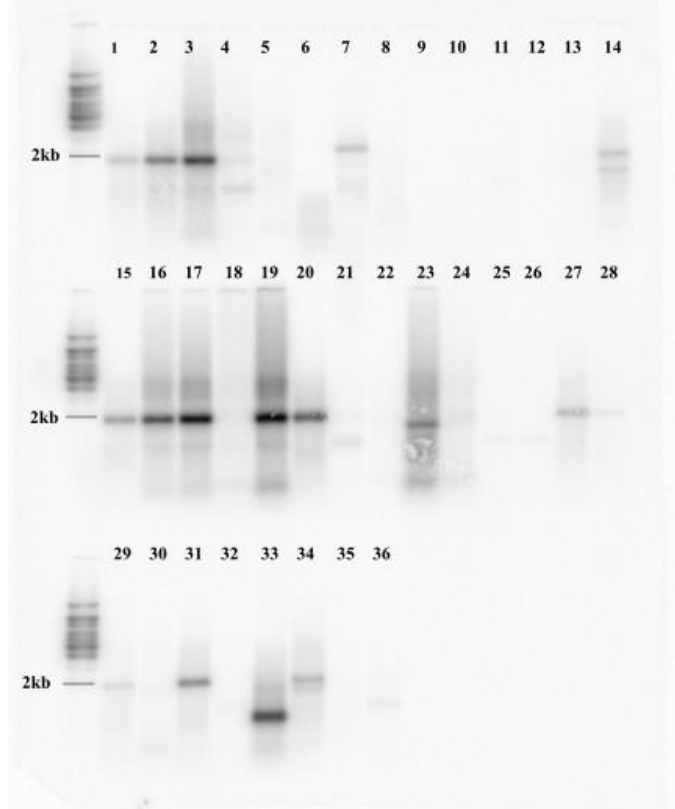
Lisa 2. Ori järjestusega *petite* tüvede analüüsi tulemused. Sinisega on märgitud valitud tüved edasiseks 2D AGE analüüsiks.

Tüve nr, EtBr (mg/ml), paardumistüüp, CFU nr	PCR OUT LioAc / Zymolaasi puhastusest (bp)	Southern blot EcoRV fragmendi suurus (kb)	Southern blot HpaII (kb)	Sekveneerimise tulemused
1. 0,3 _a (2)	550 / 700	-	1,9	
2. 0,3 _a (4)	550 / 700	3,1 / 2,1	1,9	ori7
3. 1 _a (5)	650 / 700	2,1	1,9	ori7
4. 1 _a (6)	650 / 700	-	1,3 / 1,9	
5. 3 _a (2)	750 / 300	-	1,7	

6. 3a (11)	900 / 1000	1,2	-	ori6
7. 0,3a (1)	- / -	2,1	1,3 / 2,1	
8. 0,3a (5)	- / -	-	-	
9. 1a (7)	- / -	-	-	
10. 1a (1)	- / -	-	-	
11. 3a (7)	- / -	2,1	1,3	
12. 3a (9)	- / -	-	-	
13. 0,3a (3)	250 / 350	-	-	
14. 1a (2)	600 / 700	2,1	1,3 / 1,9	ori7
15. 1a (4)	600 / 700	4,2 / 1,9	1,9	
16. 3a (10)	300 / 700	1,9	1,3 / 1,9	ori7
17. 3a (12)	700 / 700	1,9	0,8 / 1,9	
18. 0,3a (3)	250 ja 500 / 300	1,5	-	
19. 0,3a (4)	300 / 650	1,9	0,8 / 1,9	ori7
20. 1a (1)	500 / 650	4 / 1,9	1,9	
21. 1a (3)	350 / 500	5 / 3,5 / 1,9	1	ori3
22. 1a (8)	400 / 300-400	1,9	-	
23. 0,3a (10)	300 / 300-400	0,9	1,9	
24. 3a (11)	300 / 300-400	1,6	1,7	
25. 0,3a (6)	- / -	5 / 2,5 / 1,9	1,6	
26. 0,3a (7)	- / -	1,9	1,6	
27. 0,3a (8)	- / 350-400	3 / 1,9	2,1	
28. 1a (3)	- / -	1,9	1,9	
29. 1a (10)	- / -	4,2	1,9	
30. 1a (12)	- / 300-400	1,7	-	
31. 0,3a (9)	- / -	2	1,9	
32. 0,3a (10)	- / -	2	-	
33. 0,3a (11)	- / 1100	1,3	0,8-1,3	ori2
34. 0,3a (12)	- / 500	3 / 2	1,5/1,7	ori2 ja ori3
35. 0,3a (1)	- / -		-	
36. 3a (1)	- / -	1,8	1	
37. 0,3a (5)	600 / 600 ja 1500	2		-
38. 0,3a (6)	700 / -	2		
39. 0,3a (7)	300 / 700	2		-
40. 0,3a (8)	- / -	2,1		
41. 0,3a (9)	- / -	-		
42. 0,3a (11)	- / -	-		
43. 0,3a (12)	- / -	2,1		
44. 0,3a (4)	- / 700	2,1		-
45. 1a (2)	- / -	-		
46. 1a (5)	- / -	-		
47. 1a (11)	- / -	-		
48. 1a (12)	- / -	-		
49. 3a (3)	- / -	-		
50. 3a (7)	- / -	-		

51. 3 α (8)	- / -	-		
52. 3 α (9)	- / 400	1,9		-
53. 3 α (10)	- / 900	1,9		-
54. 3 α (12)	- / -	-		

Lisa 3. totDNA HpaII restriksioon (tüved 1-36) *Southern blot*

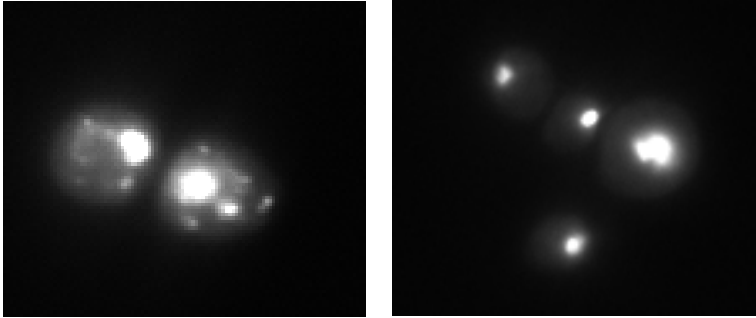


Joonis 38. ρ^- mutantide (tüved 1-36) totaalse DNA restriksioon HpaII-ga ja *Southern blot*. Mutageneesil saadud ρ^- tüvedest, millel õnnestus amplifitseerida PCR-ga ori järjestus (neist 36 tüve, igal rajal märgitud tüve number), eraldasini totDNA, restrikteerisin HpaII ensüümiga ja kontrollisin ori olemasolu ka *Southern blot*-iga kasutades mitokondriaalset ori2 spetsiifilist radioaktiivset hübridisatsiooniproovi.

Lisa 4. Neutraalsed ρ^- tüved

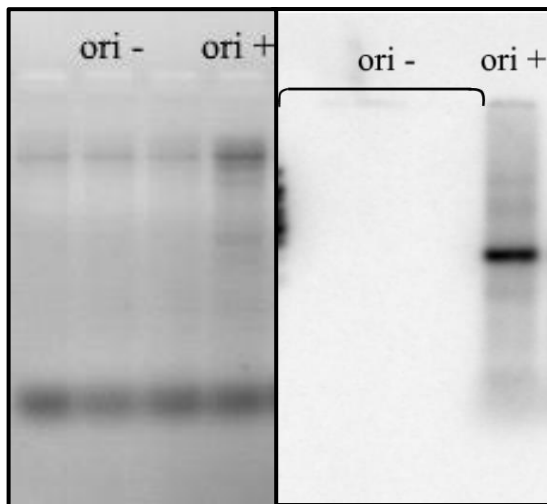
Lisaks ori-ga ehk supressiivsetele ρ^- tüvedele analüüsisin ka tüvesid, mille ori piirkonna PCR produkti ei andnud, et leida neutraalseid ρ^- mutante. Selleks valmistasin antud tüvedest mikroskoobi preparaadid värvides neid DAPI-ga. DAPI-ga värvimisel on näha nii mitokondriaalne kui tuumne DNA, seega sain selle meetodiga eristada ρ^0 mutante neutraalsetest ρ^- mutantidest. Mikroskoopimisel leidsin palju heterogeenseid kultuure, kuid

peale ümber külvamist suutsin tuvastada kolm tüve, kus oli homogeeniselt mtDNA nukleoidid näha.



Joonis 39. Ori järjestuseta tüvede värvimine DAPI-ga. Neutraalsed petite mutandid, millel puudub ori, kuid mikroskoopimisel on näha mitokondriaalsed nukleoidid (vasakul). *Rho*⁰ mutandid, millel puudub mtDNA täielikult (paremal).

Nendest tüvedest eraldasini totaalse DNA, restrikteerisin EcoRV-ga ja tegin *Southern bloti* neutraalse ülekandega. Ori2 märgi ei hübridiseerunud kolme tüve totaalse DNA-ga (Joonis 10), seega on tegemist neutraalsete petite mutantidega.



Joonis 40. Kolme neutraalse petite mutandi Southern blot. Antud tüvedel ei õnnestunud amplifitseerida ori järjestust, kuid mikroskoobis on näha mitokondriaalne DNA. *Southern blotil* (paremal) on näha, et ori2 märgi ei hübridiseeru nende totaalse DNA-ga (ori-), kuigi EtBr geelil on DNA nähtav (vasakul), kõrval on tüvi, millelt on võimalik saada PCR-ga ori produkt (ori+).

Lisa 5. *Rho*⁻ tüvede mtDNA korduva fragmendi järjestused

A1207 ori6 mtDNA järjestus:

```

                                ggggatc cctcactcct ccggcgctcct
44521 actcacccta tttattaatc attaataaga aattattatt aaaaaaatta taatttactc
44581 aaagttaatt ataaatatat ttttaaatat ctattttatt aatcttttat aaaatttaaa
44641 ttaattgtaa ttaattaata ttataataat tattcttagg aaggatattt atttatttta
44701 attatgaatt cctgacatag agacaattaa ttagaacttc ttattattat tatagtaata
44761 ataaaaatat tctaaatata ttatatatat tattattttt tttattatta ataaaaatatt
44821 ataataaatt taaataagtt tataattttt gataagtatt gttatatttt ttatttccaa
44881 atatataggt cccggtttct tacgaaaccg ggacctcgga gacgtaatag ggggaggggg
44941 tgggtgataa gaaccaaact attcaataaa tatagagcac acattagtta atattttaata
45001 atataactaa tatataataa ttataaaata attaattata taatataata taaagtcccc
45061 gccccggcgg ggaccccaaa ggagtattaa caatataata tattgtataa aataaattat
45121 aaatattaaa taaaaaccaa ataaataata taataaatga taaacaagaa gatatcggg
45181 tcccaataat aattattatt gaaaataata attgggaccc ccatctaaa tatatatata
45241 actaataata tattatatat attaatatat aataatatta ttaaaatata atattattaa
45301 aaaaaagta tatataaaat aagatatata tatataaata tatatatctt taataaatat
45361 tatataaat aataataaat tatttcataa taaattattt ctttttatta taaaaaatta
45421 cttatctcct tcgaccggac tattaaatat taaatattta atatttaata tttaattttt
45481 tattctatag atattcatat gaaaaataat aagtatataa ttatgataat gaatatattt
45541 ttatttataa tttattatta taaaaatatt ttaatttaat aataataata aatcattata
45601 ttaattcttt taagaattta taattgtcat tattttattat atactcctta ttaaaagga
45661 ttcggtttcc ctcatcctca tgggtatccc tcactccttc

```

a1207 ori6 tüve mtDNA järjestuses on märgitud punasega ori2 regioon ja paksu joonitud kirjaga on tähistatud selles esinev EcoRV lõikesait. Sinise paksu kirjaga on tähistatud BamHI lõikesaidiks vajalik G nukleotiid FY1679 tüves, mis puudub w303 tüvel.

a1328 ori2 mtDNA järjestus:

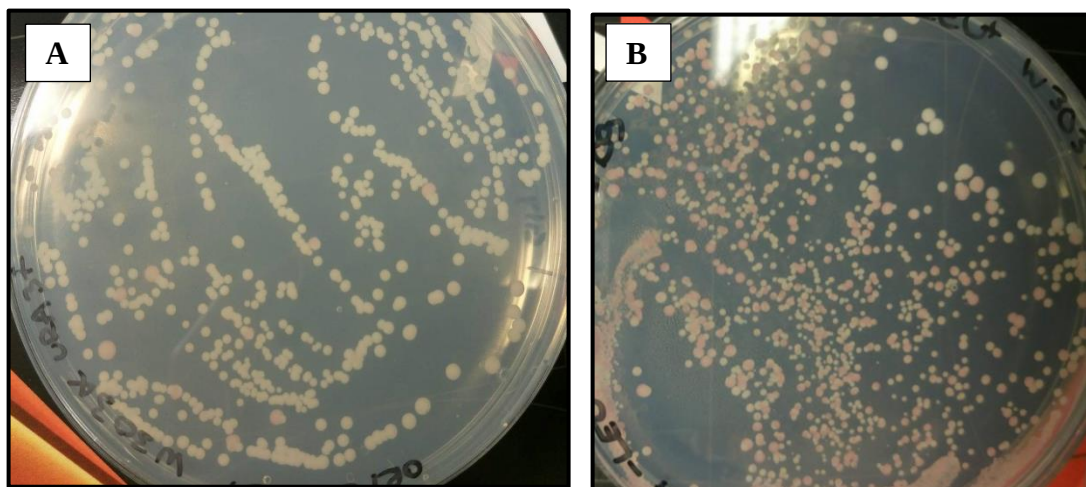
```

                                aattt atataaaaaa agttttatta aaaaatatta
31981 ttaaaaaatat aatattaata ataaaaaaa ataataattat actcttaata gaatttataa
32041 tgataaaaaat taagatgaag actttttttt ataattatta taaatttata taaaaataat
32101 atatatatat ttatattttat tttattaata tatataatat atttatgtat attaaaaaga
32161 tatattttaa tttttttatt ttttttttat aagataattt ttgtaaatat ataagtaata
32221 aattaagttt tataggggga gggggtgggt gattagaaac ttaactgaat aatatatata
32281 aagcatacat tagttaatat ttaataatat aatcaatata taataattat aaaataatta
32341 attatataat aataataatg tataaacaat ataataaatt gtataaaata aaatataaat
32401 cataaataaa gctaaattaa taaaataata aatgataaac aagaagatat ccgggtccca
32461 ataataatta ttattgaaaa taataattgg gaccccatat agaataataa taattaaata
32521 tatatatata aataataatt tatataatat attataaata aataataata aatattatta
32581 atctataata attataaata ttttattaat ataaatttaa taattatata tatttttata
32641 ataactccga aagagtaagg agatattaat ttcttataaa aattttattaa taataataat
32701 atataaaata tataaataat atatttatata taaaataaaaa taaaataaat aatatattaa
32761 aaatattgaa agtattttta taaataataa attttaaatt catattttata ataataaata
32821 aataaataaa taaataagta aatatttaga ttctcattaa tattaatatt tatatttctt
32881 tttttttata ataataaaaa tatcatatat aaatataata taatataata taataaatta
32941 ttatatataa ataataaata ttaaatataa tatataataa tatataatct tacaatttat
33001 aatttaataa agaaggaaat aaataataat aactcctttt ggggttccgg tggggttcac
33061 acctttataa ataataaata aagatgttta ctctcttcg ggggttccgg cccctttttg
33121 ggttccggaa ctaatttaata ttttatataa taataataat atattaatat aatttcatta
33181 ttaataaata tctcctgcgg ggttcggttc cccccgtaa ggggggggtc cctcactcct
33241 tcggagcgta ctattattat aaataattat ata

```

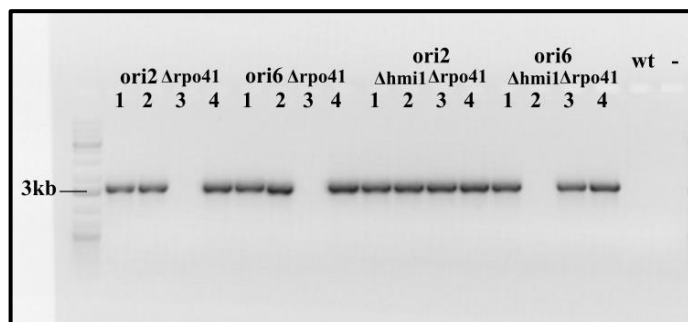
a1328 ori2 tüve mtDNA järjestuses on märgitud punasega ori6 regioon ja paksu joonitud kirjaga on tähistatud selles esinev EcoRV lõikesait.

Lisa 6. Hüpersupressiivsustest



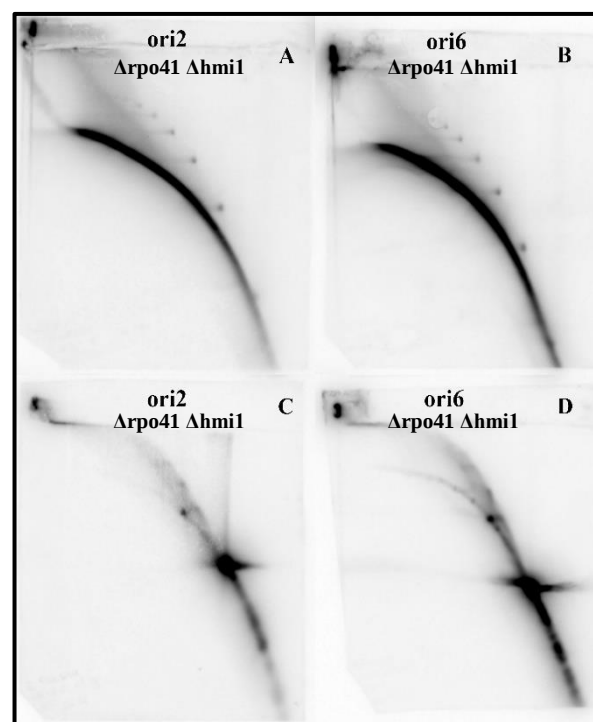
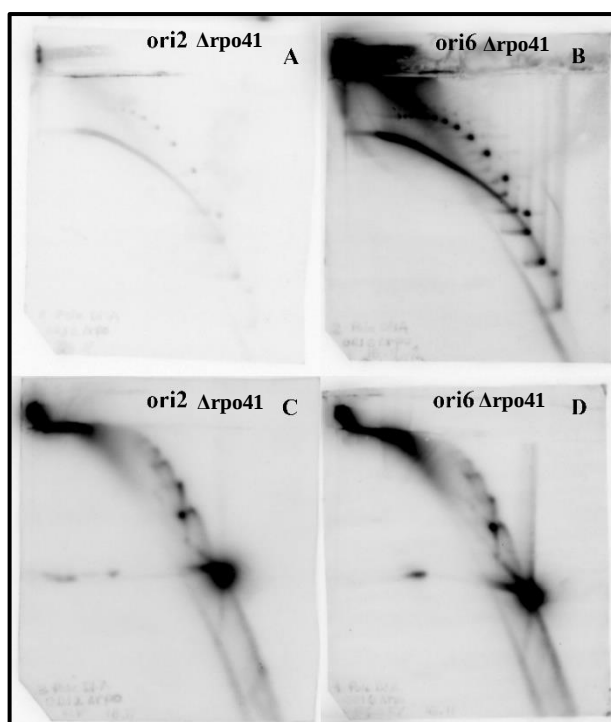
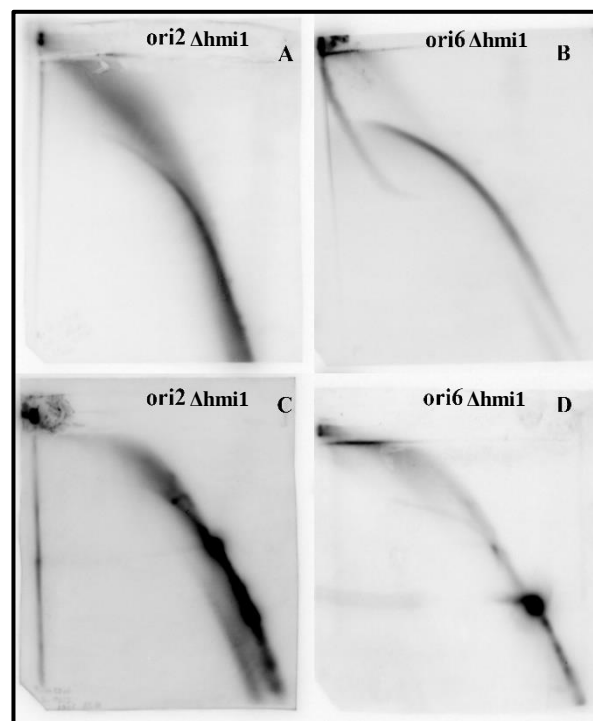
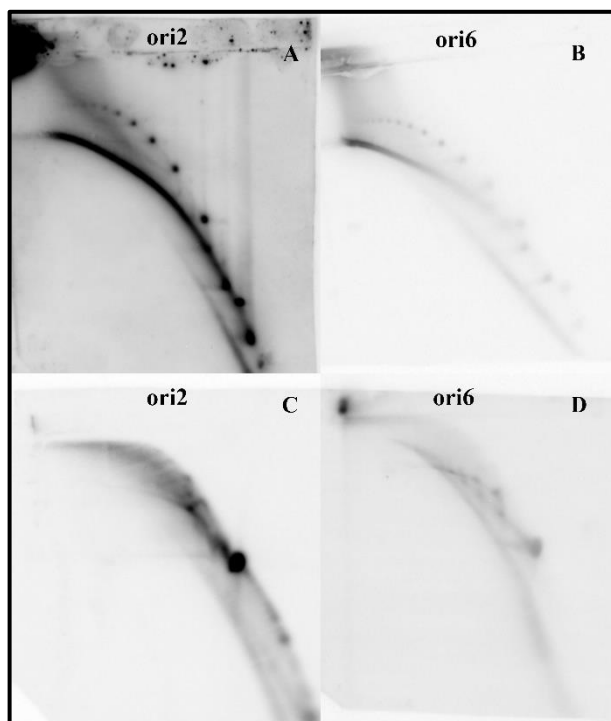
Joonis 41. Hüpersupressiivsustestil saadud (A) a1328 ori2 x w303α ja (B) a1207 ori6 x w303α kolooniad. HS a1328 ori2 tüvel on näha peaaegu 100% valged *petite* kolooniad, S a1207 ori6 tüvel on ligi kolmveerand kolooniatest valged.

Lisa 7. RPO41 deletsiooni kontroll PCR-ga

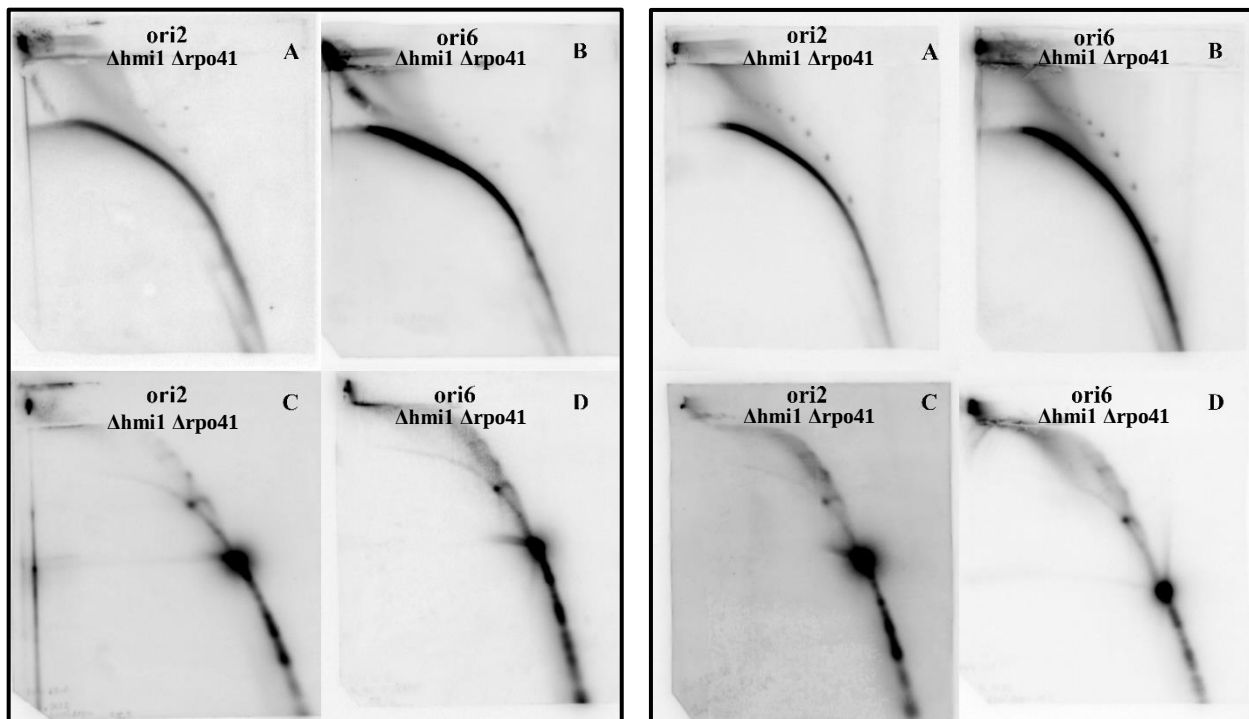


Joonis 42. RPO41 deletsiooni kontroll PCR-ga Rpo41 5UP ja KanMX3 praimeritega. Deletsioonita tüvedel ei amplifitseerunud PCR prooviga midagi, sest KanMX3 praimer seondub KanMX kassetile. Numbritega on toodud tüvede numbrid (1-4).

Lisa 8. 2D AGE korduskatsed



Lisa 9. a1328 ori2 Δ hmi1 Δ rpo41 ja a1207 ori6 Δ hmi1 Δ rpo41 2D AGE pildid



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Astrid Salumäe
(sünnikuupäev: 24.07.1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Mitokondriaalsel helikaasil Hmi1 ja transkriptsioonil on oluline mõju mitokondriaalse DNA sünteesile *S. cerevisiae rho⁻* mutantides“, mille juhendajateks on Juhan Sedman ja Tiina Sedman,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 25.05.2020 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018