

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÜLDISE JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Sirelin Sillamaa

Mitokondriaalse DNA helikaasi Irc3 funktsionaalne analüüs

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendaja: professor Juhan Sedman

TARTU 2016

Mitokondriaalse DNA helikaasi Irc3 funktsionaalne analüüs

Bakalaureusetöö

Sirelin Sillamaa

Lühikokkuvõte. Mitokondrid omavad eraldi genoomi, mille funktsioneerimises ja säilimises omavad olulist rolli erinevad valgud, nende hulgas ka helikaasid. *S. cerevisiae* on kirjeldatud kolm mitokondriaalset DNA helikaasi Pif1, Hmi1 ja Irc3. Irc3 on SF2 helikaas ja osaleb hargnenud DNA metabolismis. Käesolevas bakalaureusetöös näidatakse, et RecG suudab osaliselt komplementeerida Irc3 deletsiooni. Analüüsisin samuti reaalse qPCR-i kasutades Irc3 ja Cce1 deletsiooniga hüpersupressiivse a11 tüve mutante ja viisin läbi *in silico* katsed, mis näitavad, et bakteriofaag T4 helikaas UvsW on Irc3 kõige lähedasem homoloog.

CERCS teaduseriala: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

Märksõnad: Irc3, RecG, Cce1, helikaaside superperekond II, mitokondrid

Functional analysis of the mitochondrial DNA helicase Irc3

Bachelor's thesis

Sirelin Sillamaa

Abstract. DNA helicases play an important role in mitochondrial DNA maintenance. There are three DNA helicases in the mitochondria of the yeast *S. cerevisiae*: Pif1, Hmi1 and Irc3 and all of them are directly involved in mitochondrial genome maintenance. Superfamily 2 helicase Irc3 is known to participate in branched mitochondrial DNA metabolism. In this thesis work I demonstrated that RecG partially complements Irc3 deletion. I also analyzed mitochondrial DNA in Irc3 and Cce1 deletion mutants by quantitative real-time PCR and performed *in silico* analyses which indicate that the bacteriophage T4 helicase UvsW is the closest homologue of Irc3.

CERCS research specialization: P320 Nucleic acids, protein synthesis

Keywords: Irc3, RecG, Cce1, helicase superfamily II, mitochondria

Sisukord

Kasutatud lühendid:.....	5
Sissejuhatus.....	6
1. Kirjanduse ülevaade.....	7
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mitokondriaalne genoom ja põhimehhanismid.....	7
1.2 Helikaaside üldisloomustus.....	8
1.3 Helikaaside superperekond II.....	9
1.4 Superperekond II helikaaside motiivid.....	10
1.5 Helikaaside ruumiline struktuur.....	12
1.6 Mitokondriaalsed DNA helikaasid.....	14
1.7 Irc3 üldisloomustus.....	15
1.8 RecG üldisloomustus.....	16
2. Materjalid ja meetodika.....	18
2.1 Töö eesmärk.....	18
2.2. Tüved ja vektorid.....	19
2.3. Praimerid.....	20
2.4. Söötmed.....	21
2.5. Lahused ja reagentid.....	22
2.6. Pärmirakkude elumuse mõõtmine glütserooli ja glükoosi sisaldavates söötmetes.....	22
2.7 Totaalse pärmid DNA eraldamine.....	23
2.8. qPCR-i katseskeem.....	24
2.9. <i>In silico</i> analüüs.....	25
3. Tulemused.....	27
3.1. Bakteriaalne RecG suudab osaliselt komplementeerida Irc3.....	27
3.2. Kvantitatiivne reaalaaja PCR Irc3 ja Cce1 deletsioonidega tüvedele.....	29
3.3. Irc3 on kõige sarnasem T4 bakteriofaagi helikaasile UvsW.....	32
3.3.2. Irc3 võrdlus sarnase funktsiooniga SF2 helikaasidega 7 konserveerunud motiivi põhjal.....	32
3.3.1 Irc3 ja teiste lähedaste helikaaside võrdlus MEGA6 programmiga.....	34
3.3.3. Irc3, T1R perekonna ja UvsW võrdlus ja joondamine.....	35
4. Arutelu.....	37
Kokkuvõte.....	41
Summary.....	42

Kasutatud kirjandus.....	44
Lisad.....	55

Kasutatud lühendid:

ah- aminohape

Cp- qPCRi ühik, ületus punkt

EtOH- etanool

ddH₂O- kahekordselt destilleeritud vesi

dsDNA- kaheaheelaline DNA

NTP- nukleotiid trifosfaat

mtDNA- mitokondriaalne DNA

qPCR- kvantitatiivset reaalaaja PCR-i

SF- superperekond

SC- täissünteetiline sööde

ssDNA- üheaheelaline DNA

Sissejuhatus

Mitokonder on rakuorganell, mis omab eraldi genoomi ning mille oluliseks funktsiooniks on raku ATP-ga varustamine. Mitokondri metabolismis on oluline roll nii mitokondriaalse DNA enda poolt kui ka raku tuuma genoomi poolt kodeeritud valkudel. Üheks selliseks näiteks on helikaasid, mis on laialdaselt levinud erinevate organismide seas, omavad väga palju erinevaid funktsioone ja mängivad rolli näiteks replikatsiooni, reparatsiooni, translatsiooni juures. Seetõttu on helikaasid oluliseks osaks raku funktsionaalsuse ja genoomi terviklikkuse säilimise juures.

Pärmi mitokondriaalsetest helikaasidest on kirjeldatud Pif1, Hmi1 ja Irc3, mis kõik osalevad otseselt *Saccharomyces cerevisiae* rakkude mitokondri DNA metabolismis. Irc3 on superperekond (SF) 2 helikaas, mille täpne funktsioon ja superperekonna sisene perekondlik kuuluvus ei ole veel lõplikult teada. On näidatud, et Irc3 valk on oluline kaksikahelaliste katkete ärahoidmisel (Sedman *et al.*, 2014), mis andis esmakordselt aimu Irc3 tähtsast rollist täieliku mitokondriaalse DNA säilimise juures.

Lisaks Irc3-le leidub nii pärmis kui ka teistes organismides väga palju SF2 erinevaid esindajaid, mis kasutavad substraadina erinevaid DNA molekule. Üheks selliseks valguks on bakteriaalne RecG (Lloyd ja Rudolph, 2016), mille üheks ülesandeks on DNA hargnenud struktuuride modelleerimine. RecG homoloog avastati hiljuti ka taimedest, kus ta mõjutab mitokondriaalse DNA säilumist. Kuna hiljuti näidati meie laboris, et Irc3 mõjutab otseselt DNA hargnenud struktuure on võimalik (Gaidutšik *et al.*, 2016, Lisa 3), et Irc3 on RecG pärmi analoog, sest teisi hargnenud DNA spetsiifilisi helikaase pärmi mitokondrites pole teada.

Selleks, et saada täpsemat ülevaadet Irc3-st, tema funktsioonist ja seosest teiste sarnaste valkudega, uuriti käesolevas töös bakteriaalse RecG võimet komplementeerida Irc3 deletsiooni ja uuriti võimalikke interaktsioone Irc3 ja Cce1 vahel, mis on ainuke teadaolev x-struktuure lõikav mitokondriaalne endonukleaas (Kleff *et al.*, 1992). Ajendatud selle bakalaureusetöö eksperimentaalsetest tulemustest ja samaaegselt tehtud Irc3 ensümoloogilise spetsiifika analüüsist, viisime läbi Irc3 võrdluse teiste SF2 valkudega, mis omavad sarnast funktsiooni tuumas ja prokarüootsetes rakkudes, et selgitada välja Irc3 perekondlik kuuluvus.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalne genoom ja põhimehhanismid

Mitokonder on eukariootne membraanne rakuorganell, mis omab iseseisvat mitokondriaalset genoomi. Mitokondri poolt kodeeritud valkudest ei piisa, et iseseisvalt replitseeruda ja vajab selleks paljude tuuma genoomi poolt kodeeritud valkude abi. Mitokondrid on olulised energiatootmiseks rakus, seal toimub oksüdatiivne fosforülatsioon, mille käigus tekib adenosiin trifosfaat ehk ATP (Westermann, 2013).

Pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* (tüve FY1679) mitokondriaalne genoom on umbes 85kb (tuhande aluspaari) suurune ning selle DNA järjestust iseloomustab adeniini ja tümiini rikkus, guaniini ja tsütosiini esineb vähem, kuid teatud regioonides, mida kutsutakse GC rikasteks saarekesteks on guaniini ja tsütosiini aluspaarid tihedamalt. Mitokondriaalne genoom kodeerib kolme erinevat ribosomaalset RNAd, 24 tRNAd ja kaheksat mitokondriaalset valku, mis kodeerivad hingamisahela osi, täpsemalt apotsütokroomi, ATPsüntaasi ja tsütokroom c oksüdaasi alamühikuid. (Foury *et al.*, 1998).

Mitokondriaalse DNA poolt kodeeritud valkudest ei piisa mitokondri täielikuks funktsioneerimiseks, seega osalevad mitokondriaalse DNA-ga seotud protsessides ka tuuma valgud, millest enamus on vajalikud mitokondriaalse genoomi säilitamiseks ja kaheksa mitokondriaalse genoomi poolt kodeeritud valgu sünteesiks, samuti erinevate transpordi ja muude regulatoorsete ülesannete täitmiseks. Seega tagavad mitokondri elujõulisuse väga paljud erinevad valgud, neist kõigist ainult umbes 14% tegelevad otseselt energia tootmisega (Sickmann *et al.*, 2003).

Heaks mudelorganismiks muudab *S. cerevisiae* tema võime elada ilma hingamiseta. Tegemist on fakultatiivse anaeroobiga, kes suudab hingamata elada fermenteeritaval süsinikuallikal. Tavalisest metsiktüüpi pärmi kolooniatest väiksemaid kolooniaid moodustavaid mutante nimetatakse petite mutantideks. Eristatakse kahte tüüpi petite mutante, tsütoplasmaatilised ja nukleaarsed petite-d, vastavalt sellele, kas muteerunud on mitokondriaalne või tuuma genoom. Tsütoplasmaatilised petite mutandid jagatakse omakorda rho- ja rho⁰, kellest esimesed omavad ainult väikeseid fragmente mitokondriaalsest DNAST (mtDNA) ja teistel puudub mtDNA täielikult. Tavalist kasvu metsiktüüpi pärmi tüvesid, mis moodustavad normaalsuurusega kolooniaid nimetatakse ka tihti rho⁺, mis viitab mitokondriaalse täisgenoomi olemasolule (Tzagoloff ja Dieckmann, 1990; Westermann, 2013).

S. cerevisiae tsütoplasmaatiliste petite mutantide tekkimise alusel on võimalik määrata, millised geenid on mitokondri töötamiseks ja säilimiseks eluliselt tähtsad ja omakorda mõista erinevate valkude ülesandeid ning tähtsust mitokondriaalse DNA säilimise juures. Hädavajalikku rolli omavad mitokondriaalse DNA säilimise juures valgud, mis osalevad mtDNA metabolismis, näiteks mitokondriaalne DNA polümeraas Mip1, aga ka helikaasid Pif1 ja Hmi1 (Merz ja Westermann, 2009).

1.2 Helikaaside üldisloomustus

Helikaasid on üldlevinud ensüümid, mis suudavad lahti harutada kaheahelalisi DNA, RNA ja RNA·DNA hübriidmolekule, lõhkudes aluspaaride vahelisi vesiniksidemeid. Vajalik energia saadakse 5'-nukleosiid trifosfaatide hüdrolyüüsil ja erinevad helikaasid on võimelised lisaks ATP-le kasutama ka teisi NTP substraate. Helikaasid on olulised replikatsiooni, reparatsiooni, rekombinatsiooni ja transkriptsiooni, translatsiooni, ribosoomi sünteesi, RNA maturatsiooni ja splaissingu, tuumast välja transportimise protsesside ja DNA konjugatsiooni juures (Matson ja Kaiser-Rogers, 1990, Lohman ja Bjornson, 1996, Singelton *et al.* 2007).

Helikaase jaotatakse ja iseloomustatakse erinevate struktuursete ja biokeemiliste tunnuste alusel:

- a. Helikaase jaotatakse laiemalt DNA ja RNA helikaasideks, olenevalt sellest, millise nukleiinhappe olemasolul esineb valgul helikaasne aktiivsus. (Lohman ja Bjornson, 1996)
- b. Primaarjärjestuse alusel jagatakse helikaasid superperekondadesse (SF). Igal SF-l on kindel arv motiive, mille aminohappelised järjestused on kõigil perekonna liikmetel konserveerunud. Aminohappelise järjestuse jaotuse alusel on suurimateks SF1 ja SF2, mille puhul on kindlaks tehtud 7 peamist konserveerunud järjestust, motiivid I, Ia, II-VI. Lisaks on teada 3 väiksemat, SF 3-5, mis omavad väiksemal arvul konserveerunud motiive (Gorbalenya ja Koonin, 1993). Hilisemalt on jaotusesse juurde arvatud ka SF6, kuhu kuuluvad AAA⁺ (*ATPases associated with diverse cellular Activities*) ehk mitmekülgse raku aktiivsusega seotud valgud (Singelton *et al.*, 2007).
- c. Translokatsiooni liikumise suund määrab helikaasi polaarsuse. Kuna substraadiks võib olla nii üheahelaline kui ka kaheahelaline DNA, määrab translokatsiooni suuna ära see, millise ahelaga seostub helikaas tugevamalt. Helikaas seondub ahelale, millel liigub kas 5'-3' (A tüüpi helikaasid) või 3'-5' suunas (B tüüpi helikaasid) (Singelton *et al.*, 2007).

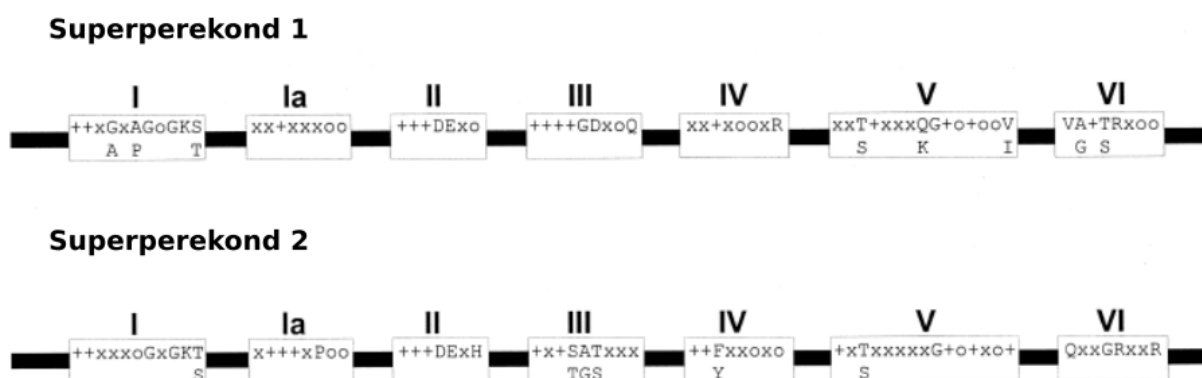
d. Kõrgemat järku struktuuri alusel on kirjeldatud oligomeerseid ja heksameerseid helikaase. SF1 ja SF2 liikmed on kõik enamasti oligomeersed helikaasid ja SF 3-5 on kirjeldatud ainult heksameerseid helikaase (Singelton *et al.*, 2007).

e. Protsessiivsuse alusel jagatakse helikaase distributiivseteks ja protsessiivseteks, esimese puhul on tegemist helikaasidega, mis harutavad lahti lühemaidprodukte ja seejärel seostuvad uue substraadiga. Protsessiivsed helikaasid aga harutavad lahti pikki produkte. (Singelton *et al.*, 2007)

Helikaase on kirjeldatud nii bakterites, eukarüootides, viirustes kui ka arhedes. SF1 ja SF2-te kuuluvaid helikaase leidub kõikides organismides. SF3 perekonnale on aga näiteks iseloomulikud ainult viiruste helikaasid (Caruthers ja McKay, 2002).

1.3 Helikaaside superperekond II

Helikaaside SF1 ja SF2 omavad mõlemad 7 konserveerunud motiivi, mis on ära toodud joonisel 1. Siiski on SF1 ja SF2 jagatud kahte perekonda, kuna omavad silmapaistvaid erinevusi I, II, V ja VI motiivis, kuid ühe SF-de siseselt on need sarnased (Gorbalenya *et al.*, 1989).



Joonis 1. Joonisel on toodud SF1 ja SF2 seitsme motiivi järjestused, vasakul N-terminaalne ja paremal C-terminaalne ots. Tähed vastavad aminohapetele, mis on perekonna siseselt konserveerunud vähemalt 75% liikmetest. 'o' märgib aminohappeid, mis on hüdrofiilsed ja '+' hüdrofoobseid ning 'x' on tähistatud aminohapped, mis varieeruvad. (modifitseeritud Hall ja Matson, 1999)

SF2 on suurim superperekond, kuhu kuulub väga erinevaid liikmeid, sealhulgas nii RNA kui ka DNA helikaase. SF2-s on esindatud nii üksik- kui ka kaksikahela spetsiifilised helikaasid. Enamus kirjeldatud SF2 helikaasidest on klass A ensüümid ehk liiguvad suunas 3'-5', kuid leidub ka mõni erand ja on kindlaks tehtud ka klass B ensüüme, mille suunaks on 5'-3'

(ülevaade Singelton *et al.*, 2007). SF siseselt eristatakse ka perekondi, seejuures SF2-te kuulub kümme perekonda: RecG, RecQ, Ski2 ja RIG-I-sarnased perekonnad, DEAD-box, Swi/Snf, DEAH/RHA, RAD3/XPD, T1R, NS3/NPH-II perekonnad, mis on paika pandud nende järjestuste võrdluse alusel (Fairman-Williams *et al.*, 2010).

SF1 ja SF2 puhul on hilisemalt järjestuste joondamise alusel välja pakutud 14 konserveerunud motiivi, kus lisaks seitsmele eelpool nimetatud motiividele on ära toodud ka lisamotiivide Q, Ib, Ic, IIIa, IVa, Va, Vb konserveerunud järjestused. SF2-le on omapärased III ja Va motiiv, unikaalne motiiv IVa, mida teistel helikaaside SF ei leidu; samas puudub SF2 liikmetel motiiv IIIa (Fairman-Williams *et al.*, 2010).

1.4 Superperekond II helikaaside motiivid

Motiiv I ja II nimetatakse ka Walker A ja B motiivideks (Hall ja Matson, 1999). Need olid esimesed motiivid, mida Walker *et al.* 1982. aastal iseloomustasid kui ATP süntaasi iseloomulikke motiive, mis on konserveerunud erinevates ATP sidumisega seotud ensüümides. Konserveerunud motiividest järeldati, et need on kohad, mille kaudu substraat seondub ensüümiga. Need kaks motiivi omavad ka omavahel homoloogiat, mis tuleneb sellest, et mõlemad suudavad siduda adeniini.

SF2 esindajatest on üks paremini kirjeldatud imetaja translatsiooni initsiaatorvalk eIF-4A. Kasutades erinevaid kohtspetsiifilisi mutatsioone, on kindlaks tehtud erinevates motiivides konserveerunud aminohapete roll. **Motiiv I** on tähtis ATP-sidumisel, kuna motiivides konserveerunudalaniini ja lüsiini muteerimise järel ei suuda helikaas enam ATP-d siduda ja väheneb ka helikaasne aktiivsus. Samal ajal ei oma konserveerunud glütsiin ATP sidumisel nii suurt tähtsust, kuid võib olla siiski kaudselt oluline hüdrofüüsil (Rozen *et al.*, 1989; Pause ja Sonenberg, 1992).

Motiiv Ia tähtsust on uuritud UL9 puhul, mis on SF2 kuuluv replikatsiooni originile seonduv DNA helikaas (Bruckner *et al.*, 1991). Motiiv Ia osaleb üheaheelalise DNA sidumises, millega on seotud tugevalt konserveerunud kaks kõrvuti asetsevat arginiini ja fenüülalaniini, lisaks sellele on motiivis konserveerunud seriin, mille muteerumise tõttu kaotab valk helikaasse aktiivsuse. Kõikidel mutantidel säilib ATPaasne aktiivsus, kuid võime siduda ssDNA-d ja selle poolt stimuleeritud ATPaasne aktiivsus säilib ainult mutandis, kus seriin on asendatud treoniiniga. Seega osalevad motiivis Ia asuvad arginiin ja fenüülalaniin ssDNA-ga seotud

protsessides, kuna vastav topeltmutant omas kõige madalamaid aktiivsusi (Marintcheva ja Weller, 2003).

Motiiv II järjestuses esineb konserveerunud aspargiin-glutamiin-alaniin-aspargiin, seejuures kõige suuremat efekti annab esimese aspargiini ja glutamiini muteerimine, kuna nende negatiivse laenguga seondub positiivse laenguga Mg^{2+} . Võimetus siduda magneesiumi vähendab valgu aktiivsust ja viib omakorda ATP hüdrolüüsi võime vähenemiseni (Pause ja Sonenberg, 1992).

Motiiv III-le on väga iseäralik aminohappeline SAT motiiv, milles asuvad seriin ja treoniin on väga konserveerunud. Asendades mõlemad aminohapped alaniinide vastu, säilitab valk ATPasse aktiivsuse, mis on sarnane metsiktüüpi valguga ja suudab jätkuvalt siduda RNA-d, kuid kaotab RNA helikaasse aktiivsuse, millest võib järeldada, et motiiv III on tugevalt seotud ahela lahtiharutamise protsessidega. (Pause ja Sonenberg, 1992)

Motiiv IV-s on iseloomulik tugevalt konserveerunud fenüülalaniin, millele eelneb järjestuses tavaliselt kaks alifaatset aminohapet. Fenüülalaniin omab olulist rolli ATP sidumise ja hüdrolüüsi juures, mille vähenemisel halveneb ka RNA sidumise võime. Näiteks valk Prp28 omandab temperatuuritundlikkuse, kui asendus on tehtud glütsiini või seriiniga, samas kui valgu Prp22 mutant, millel oli fenüülalaniin asendatud alaniiniga ei olnud võimeline kasvama madalal temperatuuril. Sellised temperatuuri taluvusega seotud muutused viitavad struktuuri muutustele valgus (Banroques *et al.*, 2008). Pärsi initsiatsioonifaktori 4A kristallstruktuuri põhjal on näidatud IV motiivis tugevalt konserveerunud arginiini, mis on RNA helikaasidel oluline RNA sidumiseks. (Caruthers *et al.*, 2000)

Plum box potyvirus CI RNA helikaasiga on näidatud, et **motiiv V** on oluline NTP hüdrolüüsil. Motiivis on tugevalt konserveerunud valiin ja treoniin, mille mutantidel puudub helikaasne aktiivsus ja väheneb NTPaasne võime. Ükski mutant ei kaota võimet siduda RNA-d, millest võib eeldada, et motiiv V ei ole otseselt oluline substraadi lahtiharutamise juures (Fernández *et al.* 1997). SF1 esindaja UvrD puhul on aga näidatud motiiv V-s asuva glütsiini olulist rolli üheaheelalise DNA sidumisel (Graves-Woodward ja Weller, 1996).

Motiiv VI on iseloomulik histidiini ja arginiini olemasolu, mis on olulised helikaasse aktiivsuse säilimiseks. Motiiv VI seostatakse konformatsiooniliste muutustega, mille puhul on väljapakutud hüpotees, kus koos motiiv VI ja II määravad, kas helikaas on avatud või suletud konformatsioonis. Konformatsioonilised muutused võimaldavad ka helikaasil seonduda

paremini substraadiga ja liikuda mööda seda, seetõttu on motiivil VI oluline roll ATP hüdroolüüsil (Pause ja Sonenberg, 1992; Kim *et al.* 1997; Tuteja ja Tuteja 2004).

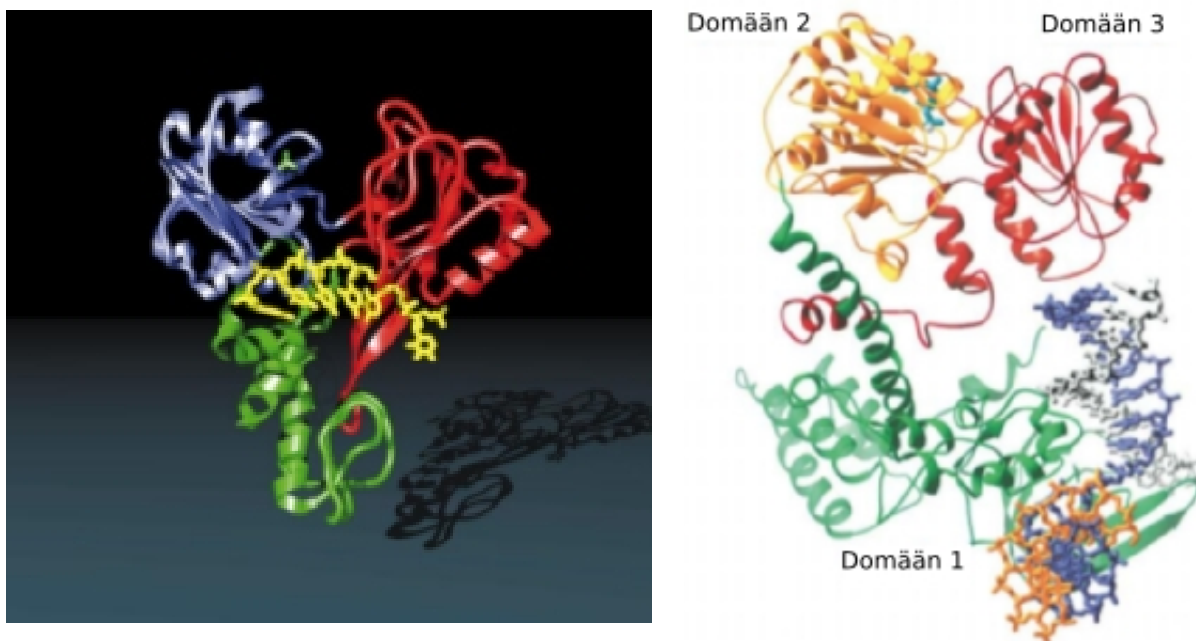
Tuntuim lisa motiiv on **Q motiiv**, mis asub I motiivist N-terminuse suunas ja mida iseloomustab hästi konserveerunud glutamiin ja fenüülalaniin. Q motiiv omab olulist rolli ATP sidumise juures (Tanner *et al.*, 2003).

1.5 Helikaaside ruumiline struktuur

Lisaks primaarstruktuuri motiividele, mis on igale SF-le unikaalsed omavad helikaasid ka universaalsed kõrgemat järku struktuuri. Neid nimetatakse tuumik domäänideks ja neid kirjeldavad helikaaside kristallstruktuurid (Singelton *et al.*, 2007). Esimene helikaasi kristallstruktuur avaldati PcrA kohta, mis on termofiilse bakteri *Bacillus stearothermophiluse* DNA helikaas, mis näitas selgelt, et helikaassed valgud koosnevad mitmest domäänist, mis mängivad olulist rolli helikaasi funktsioneerimises (Subramanya *et al.*, 1996). SF2 liikmetest on kristallstruktuur kõige paremini kirjeldatud hepatiit C viiruse NS3-l ehk mitte strukturealne valk 3, *S. cerevisiae* eIF4A ehk eukarüootne initsiatsioonifaktor 4A ja RecG-l, mis on eraldatud *Thermotoga maritima*st (Kim *et al.*, 1997; Caruthers *et al.*, 2000; Singelton *et al.* 2001).

SF2 liikmed omavad kolme struktuurset domääni. NS3-l asuvad konserveerunud helikaasi motiivid domäänides 1 ja 2 ning RecG-l domäänides 2 ja 3 (Joonis 2). Need on sarnaselt konserveerunud kõigil helikaasidel, seega kutsutakse neid domääne ka helikaasi domäänideks. Mittekonserveerunud domään on varieeruvam erinevatel helikaasidel, vastavalt helikaasi funktsioonile ja omab olulist rolli DNA sidumisel (Kim *et al.* 1997; Singelton *et al.*, 2001).

RecG puhul on tegemist valguga, mis omab erilist „wedge” domääni ehk kiildomääni, mistõttu on RecG-l iseloomulik pikem N-terminaalne saba struktuuris. Kaksikahelalise DNA eraldamine kaheks üksikahelaliseks toimub tänu kiildomääni struktuurile. Ühelt poolt seostub DNA substraat β -juuksenõela struktuuriga ja teiselt poolt toimuvad interaktsioonid kiildomääniga. DNA kaksikahelaline substraat interakteerub nende kahe domääniga ja kiildomääni struktuur sunnib mahajääva ahela liikuma läbi nende kahe domääni ning juhtiva ahela teiselt poolt kiildomääni (Kim *et al.*, 1997).



Joonis 2. Vasakpoolsel pildil on näidatud NS3 kristallstruktuur, siniselt on kujutatud domään 1, punaselt domään 2 ja roheliselt domään 3. Valk moodustab kompleksi üheaahelalise DNA-ga, mis on näidatud kollaselt ja sulfaat ioon on näidatud heleroheliselt (modifitseeritud Kim *et al.*, 1997 järgi). Paremal pool on näidatud RecG kristallstruktuur, kus on ära toodud 3 domääni ja seondunud DNA, mis omab kahvikujulist struktuuri. Magneesiumioon on hõbedane ja ADP tsüaansinine (modifitseeritud Singelton *et al.*, 2001 järgi).

NS3 puhul seondub üheaahelaline DNA domäänide vahelisse vaku, tänu millele saavad domäänid 1 ja 2 siduda DNA-d läbi erinevate silmusekujuliste sekundaarstruktuuride. Seega on DNA ahel, mis eraldab 3.-ndat domääni domäänist 1 ja 2 pidevates interaktsioonides erinevate helikaasi motiividega. Näiteks domään 1 ja 2 vahel asub motiiv II, mille asukoht laseb struktuuriliselt siduda nukleotiidtrifosfaati (Singelton *et al.*, 2001).

Domäänide struktuur annab ülevaate konserveerunud helikaasi motiivide paiknemisest ja sellest tulenevatest motiivide funktsioonidest. NS3-l asub motiiv I ja Ia esimeses domäänis, motiiv II esimese ja teise domääni vahel ja tema vastas asub vaos VI motiiv, mille põhjal võib oletada, et need kaks motiivi teevad üksteisega koostööd. Nii V, III kui ka IV motiiv asuvad kahe domääni vahel, et interakteeruda seonduva substraadiga (Singelton *et al.*, 2001).

1.6 Mitokondriaalsed DNA helikaasid

S. cerevisiae mitokondriaalseid DNA helikaase, mis on kodeeritud tuuma genoomi poolt on praeguseks hetkeks kirjeldatud kolm. Hmi1 omab olulist rolli mitokondriaalse DNA säilimises ja hingamisahela aktiivsuses. Pif1 osaleb rekombinatsioonis ja mtDNA parandamisel. Irc 3 puhul on tegemist ATPst sõltuva helikaasiga, mis on oluline mitokondriaalse DNA täielikuks säilimiseks ja kaheaaheliste DNA katkete ära hoidmiseks (Lahaye *et al.*, 1991; Sedman *et al.*, 2000; Sedman *et al.*, 2014).

Pif1 oli esimene avastatud mitokondriaalne DNA helikaas, kuid Pif1 on kirjeldatud ka tuuma DNA helikaasina. Tegemist on ssDNAst sõltuva ATPaasiga, mis tuumas kindlustab selle, et telomeerid ei muutuks liiga pikaks ja eemaldab selleks telomeraasi DNA telomeeride otstest. (Lahaye *et al.*, 1993; Boule *et al.*, 2005) Mitokondriaalne Pif1 omab olulist rolli rekombinatsioonis ja suudab lühikest dupleks DNA-d lahti harutada 5'-3' suunas. Pif1 omab olulist rolli mtDNA termostabiilsuses ja parandamises ning tema üleekspressioon on rakkudele toksiline (Lahaye *et al.*, 1991). Tegemist on distributiivse helikaasiga, mis eelistab substraadina ATP-d, dATP-d ja harutab lahti kahvlikujulisi struktuure (Lahaye *et al.*, 1993).

Pif1 omab väga palju erinevaid funktsioone, näiteks on tõestatud, et lisaks kahvlikujulisele struktuurile suudab Pif1 ka lahti harutada G-kvartetid, mis moodustuvad 4 guaniini interaktsioonil ja osaleb ka komplementaarsel kaksikahelalise DNA kokkusulamisel (Paeschke *et al.*, 2013; Ramanagoudr-Bhojappa *et al.*, 2014).

Hmi1 on mitokondriaalne DNA helikaas, mis omab ATPaaset aktiivsust ning vajab Mg^{2+} , ATP ja üheaahelalise DNA olemasolu, et viia läbi lahti harutamise reaktsiooni. Hmi1 omab 3'-5' suunalist translokaasset võimet, mis harutab lahti lühikesi kaheaahelisi DNA osasid. Helikaasi seostumiseks on vaja lühikest 3' üksikahelalise DNA üleulatuvat otsa (Kuusk *et al.*, 2005).

Hmi1 on tähelepanuväärne, kuna erinevalt tavalistest N-terminaalsetest valkudest on Hmi1 üks esimesi kirjeldatud valke, mis omab umbes 36 aminohappe pikkust C-terminaalset sihtmärk signaali (Lee *et al.*, 1999; Sedman *et al.*, 2000).

Inimese mitokondriaalsetest helikaasidest on tuvastatud TWINKLE, mis on 5'-3' suunaline NTP-sõltuv DNA helikaas, mis eelistab kaasfaktorina UTP-d (Korhonen *et al.*, 2003). TWINKLE on oma struktuurilt heksameerne ja stabiilsuse juures on tähtis kõrge soola kontsentratsioon (Millan *et al.*, 2015). Mutatsioonid TWINKLE-is viivad mtDNA deletsioonideni, mis viitab sellele olulisusele mtDNA replikatsioonis ja tema aktiivsust

stimuleerib mtSSB (mitokondriaalne üheaahelalist DNA-d siduv valk). Helikaas vajab aktiivsuseks kahvikujulise struktuuri ja üleulatava üheaahelise DNA olemasolu (Korhonen *et al.*, 2003).

1.7 Irc3 üldiseloomustus

Irc3 on tuuma genoomi poolt kodeeritud valk, mille pikkuseks on 689 aminohapet ja molekulaarmass on umbes 79 kDa. Tegemist on kaheaahelalisest DNAst sõltuva ATPasse aktiivsusega valguga, mis lokaliseerub mitokondriaalsesse maatriksisse tänu N-terminaalses otsas paiknevale 28 aminohappe pikkusele järjestusele. Irc3 peetakse helikaasiks, mis omab otsest rolli mitokondriaalse DNA metabolismis. Helikaasid motiivid asuvad N-terminaalses otsas, võttes enda alla umbes poole valgu järjestuse pikkusest, peale 380 nukleotiidi järgneb C-terminaalne domään, mille täpne ülesanne on veel hetkel teadmata (Sedman *et al.*, 2014).

Irc3 (*Increased Recombination Centers*) ehk nime poolest rekombinatsiooni tseentrite arvu suurendav helikaas tehti kindlaks koos 21 tundmatu valguga, mis kõik kannavad nimetust Irc. Tegemist on valkudega, mis avastati ülegenoomse Rad52 fookuste uurimise projekti käigus (Alvaro *et al.*, 2007). Rad52 puhul on tegemist valguga, mis vastuseks välistele või ka spontaansetele mutatsioonidele lokaliseerub ise koos teiste valgu kompleksidega ühte fookusesse ja viib läbi homoloogilise rekombinatsiooniga sisse parandused mutatsiooni kohas. Kuna sinna asukohta koondub aga rohkelt valke, on võimalik tänu fluorestsentsmärgistusele kindlaks teha selle tekkimist. Sellest ka nimi, et Irc3 deletsiooni puhul suureneb oluliselt rekombinatsiooni tseentrite osakaal rakus. Irc3 kuulub selle liigituse alusel IV klassi, mis tähendab, et tema mutandid ei oma rekombinatsioonilist fenotüüpi ja tõenäoliselt osalevad rekombinatsioonis ainult teatud kindlates regioonides. Lisaks sellele määrati kindlaks, et tegemist on tõenäoliselt mitokondriaalse helikaasiga, sarnanedes struktuurilt DEAD/DEAH tüüpi helikaasidega (Alvaro *et al.*, 2007).

Fenotüübilised katsed on näidanud, et Irc3 mängib olulist rolli mitokondriaalse DNA täieliku säilimise juures, kuid ei ole eluliselt vajalik, kuna *ircΔ* tüved on eluvõimelised rho- tüvedena, mis tähendab, et nad omavad osalist mitokondriaalset DNA-d. Irc3 täielikuks funktsioneerimiseks on vajalik ATP olemasolu. Irc3 mutantidel, kel on esimesse või kuuendasse motiivi sisse viidud ATP hüdrolüüsiga seotud aminohappelised punktmutatsioonid, langeb elumus tunduvalt. Samuti viib Irc3 eemaldamine kaksikahelaliste katkete kuhjumiseni, mis viitab sellele, et Irc3 on seotud nende katkete parandamisega (Sedman *et al.*, 2014).

1.8 RecG üldiseloostus

RecG on *E. colis* avastatud 76 kDa bakteriaalne valk, mis on oluline rekombinatsiooni ja DNA parandamise juures, tänu millele omab bakter tugevamat kaitset kiirituse ja ultraviolet valguse ning mitomütsiin C poolt tekitatavate kahjustuste vastu (Lloyd ja Buckman, 1991). Tegemist on DNAsst sõltuva ATPaasse helikaasiga, mis omab väga palju erinevaid funktsioone, nende hulgas võime liigutada harukohti mööda DNA-d. Lisaks suudab RecG lahti harutada erinevaid replikatsiooni R- ja D- linge ning *Holliday* ja kahvlikujulisi struktuure. DNA struktuuride lahti harutamise puhul on tähtis Mg^{2+} ja vähemalt kahe dupleksi haru olemasolu (Lloyd ja Sharples, 1993; Fukuoh *et al.*, 1997; McGlynn *et al.*, 1997; Whitby ja Lloyd, 1998, Lloyd ja Rudolph, 2016).

Bakteriaalsel RecG-l on varasemalt avastatud viraalne analoog UvsW, mis on bakteriofaag T4 helikaas ja kuulub SF2. Ehkki UvsW ei sarnane struktuuri poolest RecG-ga on nad mõlemad funktsionaalselt sarnased, suutes lahti harutada harulist DNA-d. Lisaks sellele suudab UvsW komplementeerida ka RecG ja rnhA topeltmutanti, mis tänu UvsW-le kaotab enda letaalsuse (Carles-Kinch *et al.*, 1997; Nelson ja Benkovic, 2007).

UvsW on B tüüpi DNA helikaas, mis omab ssDNAsst ja dsDNAsst sõltuvat ATPaasset võimet. UvsW osaleb rekombinatsiooni ja reparatsiooni protsessides ja sarnaselt RecG-le suudab lahti harutada Y-kujulisi DNA kahvleid, R-linge ning liigutada harukohti mööda DNA-d edasi kuni tuhande aluspaari võrra. Lisaks sellele suudab ta kokku panna ja lahti harutada ssDNAd ja võimalik, et omab rolli ka DNA replikatsioonis (Carles-Kinch *et al.*, 1997; Nelson ja Benkovic 2007; Webb *et al.*, 2007).

Hiljuti avastati taimedes RecG homoloog RECG, kus geen mõjutab nii mitokondreid kui kloroplaste. RECG suudab osaliselt komplementeerida bakteriaalset RecG-d ja omab bakteriaalsele homoloogile sarnast ülesannet, osaledes rekombinatsioonis. RECG on taimedes tähtis mitokondriaalse DNA säilimiseks ja surub maha ebavajalikke rekombinatsioone, mis avaldavad mõju DNA korrektsele säilimisele (Odashara *et al.* 2015).

Kuna taimede ja pagaripärmi mitokondriaalsed DNA-d on sarnased (Gerhold *et al.*, 2010; Oldenburg ja Bendich, 2015), on väga tõenäoline, et ka pagaripärmi mtDNA säilimises mängib olulist rolli seni teadmata helikaas, mis tegeleb haruliste DNA struktuuridega. Kuna Irc3 osaleb DNA kaksikahelaliste katketega seotud protsessides (Sedman *et al.*, 2014), on just Irc3 üks võimalikest kandidaatidest. Seni on teada ainult mitokondriaalne endonukleaasne

resolvaas Cce1, mis mängib olulist rolli pärmis mitokondriaalses kaksikahelalises DNAs tekkivate x-struktuuride lõikamises (Kleff *et al.*, 1992).

2. Materjalid ja metoodika

2.1 Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureuse töö eesmärgiks oli

- 1) Analüüsida, kas RecG on võimeline komplementeerima Irc3-e deletsiooni.
- 2) Kasutada kvantitatiivset reaalaja PCR-i mitokondriaalse DNA analüüsiks Irc3 ja Cce1 deletsiooniga a11 hüpersupressiivses pärimi tüves.
- 3) Näidata *in silico* katsete abil Irc3 perekondlikku kuuluvust SF2-s.

Minu töö on osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on *S. cerevisiae* mitokondriaalse helikaasi Irc3 funktsiooni uurimine.

2.2. Tüved ja vektorid

Tabel 1. Töös kasutatud tüved

Tüvi	Genotüüp	Päritolu
<i>S. cerevisiae</i> tüved		
W303 a	<i>Mat-a ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100</i> rho ⁺	Wallis <i>et al.</i> , 1989
W303 α	<i>Mat-α ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100</i> rho ⁺	Wallis <i>et al.</i> , 1989
W303 α <i>irc3Δ</i> +pRS315 RecG	W303 <i>Mat-α ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100; irc3Δ::HphMX6 ;</i> pRS315 RecG	Valmistatud Tiina Sedmani ja Ilja Gaidutšiku poolt
W303 α <i>irc3Δ</i> +pRS315 IRC3	W303 <i>Mat-α ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100; irc3Δ::HphMX6 ;</i> pRS315 IRC3	Valmistatud Tiina Sedmani ja Ilja Gaidutšiku poolt
W303 α <i>irc3Δ</i> +pRS315	W303 <i>Mat-α ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100; irc3Δ::HphMX6 ;</i> pRS315	Valmistatud Tiina Sedmani ja Ilja Gaidutšiku poolt
a11	W303a rho ⁻ hüpersupressiivne mitokondriaalne genoom 1791 bp (nukleotiidid 53757-55547 referentstüve FY1679 mitokondriaalse genoomi struktuuris), sisaldab ori3 elementi	Sedman <i>et al.</i> , 2014
a11 <i>irc3Δ</i>	a11 <i>irc3Δ::HphMX6</i>	Sedman <i>et al.</i> , 2014
a11 <i>cce1Δ</i>	<i>cce1Δ::KanMX4</i>	Valmistatud Tiina

		Sedmani poolt
a11 <i>cce1Δ/irc3Δ</i>	<i>cce1Δ::KanMX4; irc3Δ::HphMX6</i>	Valmistatud Tiina Sedmani poolt
Plasmiidid		
pRS315	pBLUESCRIPT KS + Leu2 marker, CEN6 tsentromeerne järjestus, ARSH4 autonoomse replikatsiooni järjestus	Sikorski ja Hieter, 1989
pRS315-IRC3	pRS315+ <i>Irc3</i> genoomne järjestus ±400 aluspaari	Valmistatud D. Lubentsi poolt
pRS315-RecG	pRS315+ RecG <i>E. coli</i> , täispikk RecG genoomne järjestus CYC1 valgu promootor (290 nukleotiidi ülesvoolu ATG startkoodonist) ja terminaator järjestus (279 nukleotiidi CYC 1 valgu terminaatorist) mitokondrisse lokaliseerumise signaal (117 nt CIT1 valgu N-terminusest)	Valmistatud Tiina Sedmani poolt

2.3. Praimerid

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid

Praimeri nimi	Järjestus	Päritolu
TOS1_RT_left	5'-TGG TAC TCA AGA TTA CTT CGA GAG A-3'	Disainitud Anu Auna poolt
TOS1_RT_right	5'-CCG GAC TTG CTC AAC CAT TGG-3'	
a11_55285_Forv	5'-GTA TCG TAA AAA ACG GGT GAC T-3'	
a11_55464_Rev	5'-AAA AGG GGT TCG GAC TCC T-3'	

2.4. Söötmed

Tabel 3. Töös kasutatud söötmed

Söötme nimetus	Koostis	Allikas
YPG	1% pärmiekstrakt, 2% peptoon, 3% glütserool (Tardsöötme saamiseks lisati 1,7% agarit)	Sherman, 1991
YPD	1% pärmiekstrakt, 2% peptoon, 2% glükoos (Tardsöötme saamiseks lisati 1,7% agarit)	Sherman, 1991
Synthetic complete (SC) -Leu Glütserooliga	0,67% Pärimi lämmastikalus (ilma aminohapeteta) 0,2% aminohapete ja nukleosiidide segu (Välja jäetud leutsiin) 3% glütserool (Tardsöötme saamiseks lisati 1,7% agarit)	Sherman, 1991
Synthetic complete (SC) -Leu Glükoosiga	0,67% Pärimi lämmastikalus (ilma aminohapeteta) 0,2% aminohapete ja nukleosiidide segu (Välja jäetud leutsiin) 2% Glükoos (Tardsöötme saamiseks lisati 1,7% agarit)	Sherman, 1991

2.5. Lahused ja reagentid

Tabel 4. Töös kasutatud lahused

Lahuse nimi	Koostis
T ₁₀ E _{0,1}	10 mM Tris-HCl (pH 8), 0,1 mM EDTA
T ₁₀ E ₁	10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA
T ₁₀ E _{0,1} +Rnaas A	10 mM Tris-HCl (pH 8), 0,1 mM EDTA, Rnaas A 20 µg/ml
Sorbitool/Tris/EDTA lahus	1M sorbitool, 10mM Tris-HCl (pH 8), 10mM EDTA
Tris/EDTA lahus pärmi totaalse DNA eraldamiseks	50mM Tris (pH 7,5)/ 20mM EDTA

2.6. Pärimi rakkude elumuse mõõtmine glütserooli ja glükoosi sisaldavates söötmetes

Analüüsitavate tüvede ettekasvatamiseks külvati säilituskultuuridest tüved YPG tassidele. Piisava suurusega kolooniate saamiseks kasvatati W303 *irc3Δ* tüve YPG tassil 6 päeva ja W303 *irc3Δ*+IRC3 ning W303 *irc3Δ*+RecG tüvesid 3 päeva

Igast tüvest valiti välja kolm erinevat kolooniat ja pandi need 100 ml-sse SC -Leu glütserooliga söötmesse kasvama. *irc3Δ* pandi vedelsöötmesse kasvama umbes 40 tundi enne katse algust ja *irc3Δ*+IRC3 ning *irc3Δ*+RecG kolooniad 16-18 tundi enne katse algust.

Katse alguses (t=0) mõõdeti kultuuri optiline tihedus lainepikkusel 660 nm (OD₆₆₀) ja tehti lahendus SC -Leu glükoosiga söötmesse, lõpptiheduseni OD₆₆₀=0,05. 5 ja 10 tunni möödudes korrati mõõtmist ja lahjendati seejärel kultuur. Viimane 10 tunni ajapunkti lahendus tehti OD₆₆₀=0,01 ja kultuuri kasvatati veel 10 tundi.

Vastavalt saadud optilise tiheduse mõõtmise tulemusele tehti kultuurist igas ajapunktis väljakülvi lahjendused (kahekordselt destilleeritud vesi) ddH₂O-sse, et saada loendatav arv kolooniaid. Tüüpiliselt tehti OD₆₆₀=0,5 kultuurist kaks järjestikku lahjendust (100- ja 50-kordne). Teisest lahjendusest külvati paralleelselt ühele SC-Leu glütserooliga ja SC-Leu glükoosiga tassile 100 µl rakke.

Kõiki kultuure kasvatati 30°C juures ja väljakülvatud tassidelt oli võimalik kolooniaid lugeda 2-6 päeva peale väljakülvi.

2.7 Totaalse pärmi DNA eraldamine

Totaalse DNA eraldamiseks pärmist kasutati *Methods in Yeast Genetics* (Rose *et al.*, 1990) kirjeldatud protokoll, mida on kohandatud väikeses mahus efektiivsemaks DNA eraldamiseks. Antud eksperimentides kasutati Tiina Sedmani poolt eraldatud DNA proove.

Selleks, et eraldada DNA-d qPCR-i analüüsiks kasvatati vedelkultuure YPG söötmes üle öö 30°C juures, tiheduseni OD₆₆₀=0,4-0,8. Katses kasutati nelja erinevat tüve a11, a11 *irc3Δ*, a11 *cce1Δ* ja a11 *irc3Δ/cce1Δ*. (Tabel 1). Igast tüvest kasvatati kolm individuaalset kultuuri.

Vedelkultuuri rakud tsentrifuugiti 5 minutit 3200 rpm (Hettich Universal 32R, rootor 1617 *swing out*) põhja. Rakkudelt eemaldati sööde, suspendeeriti rakke 1 ml MQ ddH₂O-s, tõsteti ümber väikestesse reaktsioonituubidesse ja fuugiti uuesti 1 minut 4000 rpm-i juures (Eppendorf „Minispin”, rootor F-45-12-11). MQ ddH₂O eemaldati rakkudelt ja rakud suspendeeriti vastavalt kaalule sorbitool/Tris/EDTA lahuses (koostis toodud peatükkis 2.5.) arvestusega 1ml lahust 0,15g rakkude kohta.

Rakkude suspensioonile lisati 20T zümolaasi (Nacalai Tesque) 4mg, 1mg rakkude kohta ja lasti reaktsioonisegul inkubeerida 30 minutit 37°C juures. Seejärel fuugiti rakud kokku 13 400 rpm-i juures 1 minut ja eemaldati supernatant. Sade resuspendeeriti 0,5 ml Tris/EDTA lahuses (koostis toodud peatükkis 2.5.) ja lisati 50 µl 10% SDSi ning segati reaktsioonisegu õrnalt, kuid hoolikalt ja inkubeeriti 65°C juures 15 minutit.

Peale inkubeerimist jahutati reaktsioonisegud jääl ja lisati jahtunud proovidele 200 µl 5M kaaliumatsetaadi lahust ja inkubeeriti õrnalt segatud reaktsioonisegu 30 minutit jääl. Peale inkubatsiooni tsentrifuugiti suspensiooni maksimum kiirusel 13400 rpm-i 5 minutit, saadud supernatant kanti üle uude tuubi, lisati võrdne ruumala isopropanooli ja lasti DNA-l 5 minutit sadeneda toatemperatuuril. Seejärel fuugiti segu 1 minut 13400 rpm-i ja eemaldati isopropanool. Saadud sadet pesti 100 µl 80% etanooliga mõne minuti jooksul ja seejärel fuugiti proovi 5 min 13400 rpm-i ja eemaldati supernatant. Saadud sade lahustati üles 400µl-s T₁₀E₁-s ja hoiustati -20°C juures.

2.8. qPCR-i katseskeem

qPCR-i läbiviimiseks kasutati tuuma DNA spetsiifilisi praimereid TOS1_RT_left, TOS1_RT_right ja mitokondriaalse a11 DNA spetsiifilisi praimereid a11_55285_Forv ja a11_55464_Rev.

Totaalse pärmi DNA eraldamise protokoll järgi puhastati a11, a11 *irc3Δ*, a11 *cce1Δ* ja a11 *irc3Δ/cce1Δ* DNA-d kolmes korduses ja saadud preparaatidest tehti neli järjestikust lahjendust. Esimeseks lahjenduseks oli sajakordne lahjendus algsest DNA eralduse produktist (5 µl DNA-d 495µl-s T₁₀E_{0,1}-s), edasised kolm lahjendust olid kõik kaheksakordsed (62,5 µl DNA-d 437,5µl-s T₁₀E_{0,1}-s).

Individuaalsed PCR-i reaktsioonid ruumalaga 10µl sisaldasid järgmisi komponente; 5µl Maxima SYBR Green/Rox qPCR master mix (2x) (tootja ThermoFisher Scientific), 4 µl DNA lahust ja 0,5µl + 0,5µl-t 10mM praimerit). Negatiivsetes proovides asendati 4 µl-t DNA-d 4 µl ddH₂O-ga. Reaktsioonid segati kokku jääl, kasutades 384 auguga valget qPCR-i plaati. Kõigi DNA lahjendustega tehti reaktsioonid mõlema praimeri paariga eraldi reaktsioonisegus kolmes korduses.

Enne qPCR-i läbiviimist suleti plaadil olevad proovid kilega, tsentrifuugiti proovid põhja kiire tsentrifuugimisega (Sigma 4K15, rootor 11150) viies pöörded kuni 1000rpm-ni minutis, seejärel tehti tugev vorteks (Scientific Industries, Vortex-Genie 2 Mixer) ja fuugiti proove veel kord samadel tingimustel. Katses kasutati reaalaja PCR-i masinat Roche Lightcycler 480.

Tabel 5. Töös kasutatud PCR-i programm

Etapp		Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
1	Algne denaturatsioon	95°C	15 min	1
2	Denaturatsioon	95°C	10 sek	45
3	Ekstensioon	56°C	1 min	

qPCR-i andmete analüüs

qPCR-i reaktsiooni käigus mõõdetakse SYBR Greeni fluorestsentsi, mis sõltub sünteesitud DNA hulgast. Masina tarkvara abil arvutatakse igale reaktsioonile vastav Cp väärtus, mis vastab tsüklite arvule, kui signaal ületab müra lävendi.

Praimeritepaari amplifikatsiooni efektiivsuste määramiseks analüüsiti Cp väärtuste muutumist sõltuvalt DNA proovi kontsentratsioonist. Praimeripaaride efektiivsused on arvatud graafiku tõusust, kus y-teljel on Cp väärtused ja x-teljel logaritmi proovi kontsentratsioonist.

Efektiivsuse valem (Pfaffl, 2004) : $E = 10^{(-1/tõus)}$

2.9. *In silico* analüüs

In silico analüüsis kasutati järjestusi Uniprot andmebaasist (<http://www.uniprot.org/> 10.11.15) ja võrreldi 24 erinevat SF2 liiget (Lisas 2). Vastavad valgud valiti välja sarnasuste järgi helikaasi motiivides või nende sarnase funktsiooni alusel, kuivõrd on näidatud, et nad kasutavad substraadina hargnenud DNA molekule .

Eraldi on lisatud joondusesse tüüp I perekonna restriктаaside R subühiku ATPaasset aktiivsust omavad valgud, mis omavad Irc3-ga sarnasusi aminohappelises järjestuses ning DNA hargnenud ahela spetsiifiline bakteriofaag T4 helikaas UvsW, mis omab RecG-ga sarnaseid funktsioone ja suudab seda osaliselt komplementeerida. (Carles-Kinch *et al.*, 1997)

Seitsme motiivi (I, Ia, II-VI) edaspidiseks võrdlemiseks kasutati varasemalt avaldatud konserveerunud motiivide järjestusi, kus oli võrreldud inimese, pärmi ja *E. coli* valke (Fairman-Williams *et al.*, 2010). UvsW motiivide kindlaks tegemiseks kasutati Clustal O joondust (Sievers *et al.* 2011, Li *et al.* 2015, McWilliam *et al.* 2013)

Saadud järjestuste joonduse põhjal konstrueeriti fülogeneesipuu, kasutades MEGA 6.0. programmi (Tamura *et al.* 2013), mille puhul kasutati standardparameetritega MUSCLE joondust (Edgar R.C. 2004) valgu täisjärjestustega ning järjestusi ei elimineeritud, lisatud ega modifitseeritud, muutmaks joonduse väljanägemist. Puu konstrueerimisel kasutati *Neighbor-Joining* meetodit (Saitou ja Nei, 1987). Puu peal on näha väljaarvutatud *bootstrapi* väärtused, mis näitavad lahknemise tõenäosust, omades maksimaalselt väärtust 100 (Felsenstein, 1985), samuti ka evolutsioonilisi kaugusi, mille arvutamiseks on kasutatud JTT- maatriksit (Jones *et al.* 1992).

Fülogeneesi puult saadud Irc3 kõige lähemate valkude võrdluseks kasutati blastp programmi (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgiPROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch) BLASTP 2.3.1 versiooni (Altschul *et al.* 1997, Altschul *et al.* 2005), kus võrreldi Irc3 järjestust üks haaval kõigi kolme ülejäänud järjestuse vastu, võrdlemaks antud järjestuste skoori, identsust, vahede suurusi joonduses ja hulka ning positiivseid aminohappe tulemusi. Positiivseks loetakse tulemus, kus joondatud aminohapped

ei ole identsed, aga annavad siiski positiivse skoori maatriksis, mis tähendab, et aminohapped on sarnased.

3. Tulemused

3.1. Bakteriaalne RecG suudab osaliselt komplementeerida Irc3

Selleks, et uurida, kas bakteriaalne *E. coli* helikaas RecG on võimeline komplementeerima enda funktsiooniga Irc3 deletsiooni, kasutati katses varasemalt T. Sedmani ja I. Gaidutšiku poolt konstrueeritud tüvesid w303 *irc3Δ*, w303 *irc3Δ*+RecG ja w303 *irc3Δ*+IRC3, mida oli säilitatud glütseroolis -80 kraadi juures. Tüvede täpsem kirjeldus peatükis materjalid ja meetodid (peatükk 2.2).

Tüve w303α *irc3Δ* on IRC3 geen deleteeritud ja selle asemele on sisse viidud antibiootikumi Hph resistentsusgeen. Tüvede w303 *irc3Δ*+RecG ja w303 *irc3Δ*+IRC3 saamiseks on w303α *irc3Δ* sisse viidud plasmiidid pRS315 IRC3 ja pRS315 RecG ning negatiivse kontrollina pRS315 (2.2 Tabel 1). w303 *irc3Δ*+IRC3 puhul on plasmidi lisatud funktsionaalne IRC3 geenijärjestus ja w303 *irc3Δ*+RecG puhul bakteriaalse *E. coli* *recG* geen, koos pärmi CYC1 promootori ja terminaatorjärjestusega ning pärmi mitokondriaalse Cit1 valgu signaaljärjestusega, et geen lokaliseeruks mitokondrisse.

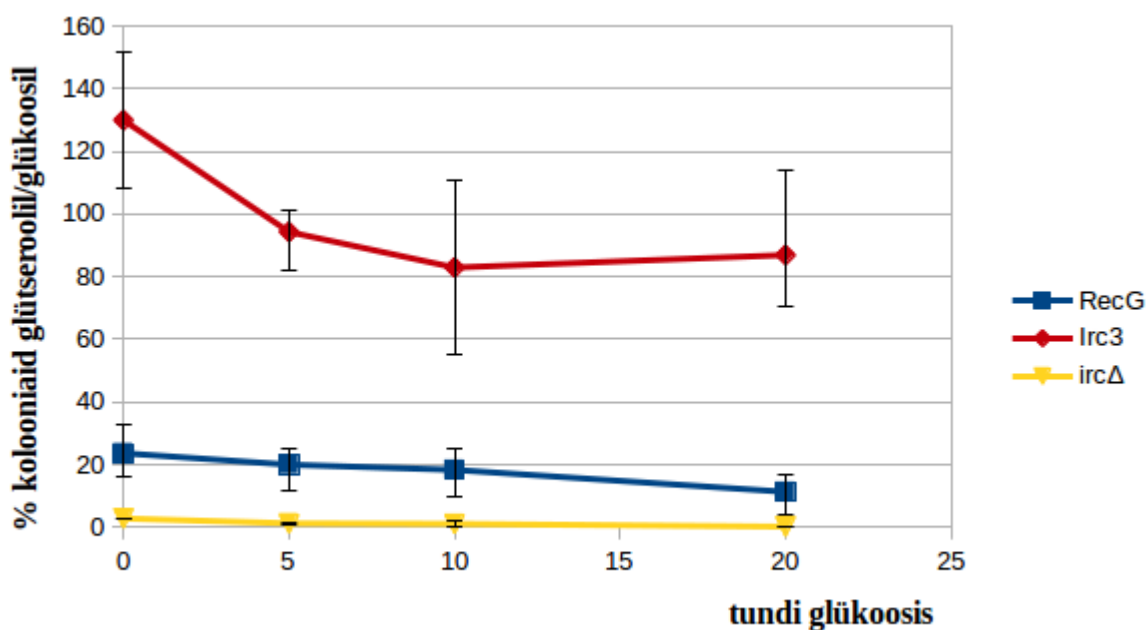
Selleks, et uurida, kas RecG suudab komplementeerida Irc3 deletsiooni kasvatati w303 *irc3Δ*, w303 *irc3Δ*+RecG ja w303 *irc3Δ*+IRC3 tüvesid, kõiki kolmes korduses ette SC -Leu söötmes, kuhu oli lisatud 3% glütserooli. Selles söötmes on rakud sunnitud aeroobselt hingama ja peavad säilitama funktsionaalse hingamisahela kompleksi.

Eelkasvatatud kultuurist külvati SC -Leu söötme tassidele, millest üks sisaldab 3% glütserooli ja teine 2% glükoosi umbes 100-200 rakku. w303α *irc3Δ* pRS315 tüve puhul külvati SC -Leu söötme tassile, mis sisaldab 3% glütserooli, rakke 10 korda rohkem, kuna eelnevates katsetes on w303α *irc3Δ* näidanud glütserooliga söötmel kasvades nõrgemat elumust (Sedman *et al.*,2014), seega tuleb välja külvata rohkem rakke, et saada glütseroolil loendatav arv kolooniaid. Antud väljakülvamise punkti loetakse 0 tunni punktiks. Edasi kasvatamiseks lahjendati kultuur SC -Leu söötmesse, mis sisaldab 2% glükoosi ja järgnevad väljakülvid tehti peale seda, kui rakud on kasvanud glükoosiga söötmes 5, 10 ja 20 tundi. SC -Leu söötmes, mis sisaldab glükoosi, saavad rakud kasutada süsinikuallikana glükoosi ning ei pea kasutama selleks hingamisahela kompleksi ja ei pea seetõttu omama täielikku mitokondriaalset genoomi. Väljakülvatud rakkudega tassid kasvasid 3-5 päeva 30° C juures. Loendatud kolooniate keskmine arvukus on toodud tabelis 6, kus on näidatud kõigi kolme tassi keskmine kolooniate arv. Joonisel 3 on kujutatud graafikut, mis näitab erinevates

ajapunktides väljakülvatud SC -Leu söötme glütseroolil ja glükoosil üleskasvanud kolooniate suhet.

Tabel 6. w303 *irc3Δ*, w303 *irc3Δ*+RecG ja w303 *irc3Δ*+IRC3 tüvede respiratoorse aktiivsuse dünaamika kasvatamisel mitteselektiivsel söötmel.

	irc3Δ		Rec G		Irc 3	
	Glükoos	Glütserool	Glükoos	Glütserool	Glükoos	Glütserool
0h	148,7	4,1	91,3	22	71	92
5h	127,7	1,075	148	30,6	106,7	100
10h	88,3	0,8	98	16,3	153,3	124,7
20h	161,3	0,2	94,7	10,3	165,3	142,7



Joonis 3. SC- Leu glütserooli söötmel kasvanud ja SC -Leu glükoosi söötmel kasvanud kolooniate suhtarv. RecG tähistab *irc3Δ*+RecG, Irc3 w303α *irc3Δ*+IRC3 ja *ircΔ* w303α *irc3Δ* tüve. Joonisel on toodud veapiiridena eksperimendis mõõdetud maksimaalsed ja minimaalsed väärtused.

w303α *irc3Δ* pRS315 tüve puhul jääb kolooniate suhtarv nulli lähedale ja ei ületa 2% (Joonis 3). Samal ajal ei lange w303α *irc3Δ*+IRC3 tüvel suhtarv alla 80% ja w303α *irc3Δ*+RecG

tüve suhtearv on 0 tunni punktis 23,6 % ja langeb siis ajaga kuni 11%-ni. $w303\alpha$ *irc3Δ* tüve elumus on tunduvalt nõrgem kui $w303\alpha$ *irc3Δ*+IRC3 ja $w303\alpha$ *irc3Δ*+RecG-1. Kuid $w303\alpha$ *irc3Δ*+RecG suudab parandada Irc3 deletsiooniga tüve elumust nii glütserooli, kui ka glükoosi sisaldava söötmega tassidel.

3.2. Kvantitatiivne reaalaaja PCR Irc3 ja Cce1 deletsioonidega tüvedele

Mitokondriaalset DNA-d on rakkudes mitu koopiat, kuid siamaani ei ole suudetud kindlaks määrata selle täpset hulka ühe pärmiraku kohta. mtDNA koopiaarvu võivad mõjutada mitmed eri faktorid, näiteks helikaasid. RecG on tuntud kui hargnenud DNA struktuuridega tegelev helikaas ja tõenäoliselt omab sarnast ülesannet ka Irc3. Cce1 on siiani ainuke teadaolev ensüüm, mis spetsiifiliselt mõjutas hargnenud DNA struktuuri (Kleff *et al.*, 1992).

Cce1 suudab lõigata neljasuunalisi rekombinatsiooni struktuure, tagades seejuures tervikliku mtDNA säilimise. Juhul kui CCE1 geen deleteerida pärmirakus, hakkavad ristikujulised struktuurid rakus kuhjuma ja moodustuvad omavahel ühenduses oleva võrgustiku, mis lõpuks toob kaasa pärilikkusmaterjali ebaühtlase jagunemise ja defektsete tütarakkude tekke. (Kleff *et al.*, 1992, Lockshon *et al.*, 1995)

Oma töös küsisime, kuidas mõjutab mtDNA stabiilsust ja koopiaarvu kahe mitokondriaalse valgu Irc3 ja Cce1 deleteerimine. Selleks võrreldi mtDNA koopiaarvu hüpersupressiivsetes pärmi tüvedes a11, a11 *irc3Δ*, a11 *cce1Δ* ja a11 *irc3Δ/cce1Δ*. a11 tüvi on $w303\alpha$ rho⁻ derivaat ja omab 1791 aluspaari pikkust mitokondriaalset genoomi ja ori3. a11 *irc3Δ* mutant on saadud IRC3 geeni asendamisel a11 tüves *hph* geeniga, mis annab resistentsuse hügromütsiin B vastu. a11 *cce1Δ* tüvel on geen asendatud kanamütsiini resistentsusgeeniga ja a11 *irc3Δ/cce1Δ* saamisel on a11 tüves IRC3 geen asendatud hügromütsiin B ja CCE1 kanamütsiini resistentsusgeeniga.

Mitokondriaalse ja tuuma DNA võrdlemiseks kasutati kahte praimerite paari (TOS_RT_left ja TOS_RT_right, produkti suurus 159 nukleotiidi). Tuuma genoomi amplifitseerimiseks kasutati spetsiifilist *Tos1* geenile asetuvat praimerite paari. Mitokondriaalse DNA amplifitseerimiseks kasutati a11 mitokondriaalse genoomi spetsiifilist praimerite paari (a11_55285_Forv ja a11_55464_Rev, produkti suurus 192 nukleotiidi), mis seostub a11 1791 aluspaarilisele järjestusele, ülesvoolu ori3st. Erinevaid primereid testiti töö autori poolt eelkatsete käigus, kus tehti kindlaks amplifikatsiooni efektiivsused ja valiti välja antud katse jaoks kõige kõrgema efektiivsusega praimerid.

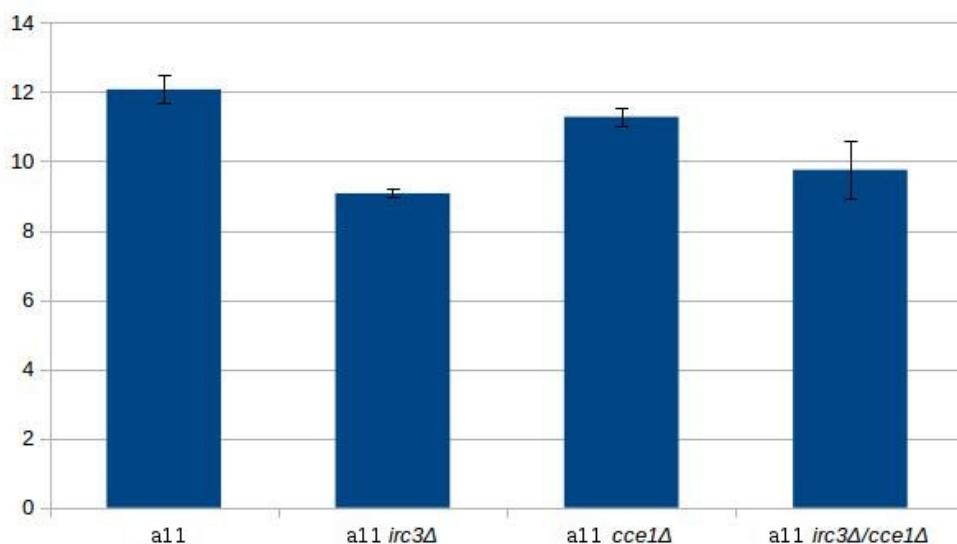
Optimeeritud DNA amplifikatsiooni katse tulemused on toodud tabelis 7. DNA amplifikatsiooni efektiivsused on näidatud tuuma ja mitokondriaalse reaktsiooni kohta, mille arvutamiseks võeti iga proovi kolme korduse keskmine C_p . C_p on ületuspunkt, kus proov ületab kindlaks määratud fluorestsentsi taset (Pfaffl, 2004). Kontrollreaktsioonides, kuhu oli lisatud kõik komponendid välja arvatud DNA, oli C_p suurem kui 32, mis lubab uskuda katsetulemuste tõepärasust, kuna signaal on hilisem kui ülejäänud proovidel. qPCR on väga tundlik, tuleb ette ka negatiivsete proovide hilist signaali, kuid kui signaal detekteeritakse hiljem kui kõikide lahjenduste C_p väärtus, võib tulemuse siiski lugeda usaldusväärseks. Tabelis 7 on võrdlemiseks ära toodud 1:64-le tehtud DNA lahjenduse C_p -d ehk tegemist on orginaalproovist tehtud kolmas 1/8-le lahjendusega. Lahjendused on täpsemalt ära toodud materjalid ja meetodid osas, peatükk 2.8. Tabelis toodud ΔC_p iseloomustab tuuma ja mitokondriaalse amplifikatsiooni C_p vahet.

Tabel 7. Tuuma ja mitokondriaalse DNA analüüs reaalaaja kvantitatiivse PCR-iga.

Tüvi	Bio- loogiline kordus	Tuuma amplifikatsiooni efektiivsus*	Mitokondriaalse amplifikatsiooni efektiivsus*	Tuuma Cp	Mitokond- riaalne Cp	Δ Cp
a11	1	1,97	1,86	27,53	15	12,53
	2	1,9	1,83	26,57	14,63	11,93
	3	2,15	1,94	26,5	14,74	11,75
a11 <i>irc3</i> Δ	1	1,95	1,83	27,37	18,2	9,18
	2	1,96	1,8	27,81	18,7	9,1
	3	1,98	1,86	27,34	18,4	8,94
a11 <i>cce1</i> Δ	1	1,91	1,85	26,74	15,74	11,0
	2	1,97	1,83	27,42	15,96	11,46
	3	2,01	1,85	27,47	16,09	11,38
a11 <i>irc3</i> Δ / <i>cce1</i> Δ	1	1,95	1,83	27,2	17,79	9,38
	2	1,95	1,83	27,18	16,48	10,70
	3	2,05	1,88	27,6	18,43	9,18

* Efektiivsuste arvutamine on ära toodud meetodika osas, peatükk 2.8.

Mitokondriaalse amplifikatsiooni efektiivsus jääb kahjuks soovitud madalamaks, milleks võib olla erinevaid põhjuseid, mida kajastatakse arutelus. Siiski on saadud Δ Cp väärtused, mille keskmised on toodud joonisel 4 usaldusväärseks poolkvantitatiivseks hinnanguks mtDNA hulga kohta konkreetses tüves, kuna võrreldud on DNA lahjendust, kus tuuma Cp väärtused erinevad minimaalselt. Tulemused näitavad, et metsiktüüpi a11 ja a11 *cce1* Δ tüved omavad lähedast Δ Cp väärtust (üle11). a11 *irc3* Δ /*cce1* Δ ja a11 *irc3* Δ puhul on Δ Cp silmnähtavalt madalam (ligikaudu 9). Seega võib öelda, et mtDNA süntees on oluliselt häiritud tüvedes, kus puudub Irc3. Statistiliselt ei ole võimalik meie andmetele baseerudes öelda, kas Cce1 deleteerimine muudab *irc3* Δ tüves mitokondriaalse DNA koopia arvu.



Joonis 4. a11, a11 *irc3Δ*, a11 *cce1Δ*, a11 *irc3Δ/cce1Δ* tüvede tuuma ja mitokondriaalse DNA amplifikatsiooni ΔC_p keskväärtused ja standardhälve.

3.3. Irc3 on kõige sarnasem T4 bakteriofaagi helikaasile UvsW

Irc3 on algselt peetud järjestuse põhjal RNA helikaasiks, kuna ta omab RNA helikaasidele omast II motiivi, kus on konserveerunud DEAH järjestus (de la Cruz *et al.*, 1999). Hilisemalt on näidatud, et tegemist on siiski DNA helikaasiga (Sedman *et al.*, 2014). Irc3 perekondlikust kuuluvusest on siiski vähe teada ja teda ei ole lisatud suurde SF1 ja SF2 valgujärjestuse võrdlusesse, kus on joondatud teada olevad *S. cerevisiae*, *Homo sapiens*'i ja *E. coli* valgud (Fairman-Williams *et al.*, 2010). Kuna tekkis küsimus, millisesse perekonda võiks kuuluda Irc3, otsustati järgnevalt läbi viia *in silico* katsed, kus kasutati MEGA6 programmi fülogeneesipuu konstrueerimiseks ja hiljem blastp-d, et võrrelda Irc3 lähedasi järjestusi.

3.3.2. Irc3 võrdlus sarnase funktsiooniga SF2 helikaasidega 7 konserveerunud motiivi põhjal

Joonduse konstrueerimiseks kasutati eelnevalt välja valitud 23 valku lisaks Irc3-le, mis järjestuste konserveeruvuse alusel sarnanesid Irc3-le või omasid sarnast funktsiooni. Kõik joondusesse lisatud valgud, välja arvatud RuvB on SF2 esindajad. Tegemist on helikaasidega, mille funktsioonid on seotud haruliste DNA struktuuridega ja lisaks tüüp I restriктаaside perekonna valgud, mis omavad sarnasusi Irc3-le konserveerunud motiivide poolest. Täpsemad funktsioonid on toodud materjalides ja meetodites, peatükk 2.9.

	Q	I	Ia	II	III	IV	V	VI
IRC3 <i>S. cerevisiae</i>	RDYQ	TGGGKT	HRRELALQ	DEAH	SAT	LLFGVD	TEVLM	QMIGRGLR
RECG <i>E. coli</i>	FKPTGAQ	VGSGKT	PTELLAEQ	DEQH	TAT	QAYWVC	LLVAT	QLRGRVGR
MFD <i>E. coli</i>	FETTPDQ	VGFGKT	PTLLLAQQ	DEEH	TAT	QVYYLY	VLVCT	QLRGRVGR
PRIA <i>E. coli</i>	LRLNTEQ	TGSGKT	PEIGLTPQ	DEEH	SAT	QVILFL	ILIGT	QVAGRAGR
BLM <i>Homo sapiens</i>	FRTNQ	TGGGKS	PLRSLIVD	DEAH	TAT	IIYCLS	VICAT	QESGRAGR
RECQ1 <i>Homo sapiens</i>	FRPLQ	TGGGKS	PLISLMED	DEVH	TAT	IIYCFS	VVVAT	QESGRAGR
RECQ4 <i>Homo sapiens</i>	FRPGQ	TGAGKS	PLLSLMDD	DEAH	TAT	IIYCNR	VVVAT	QAVGRAGR
RECQ5 <i>Homo sapiens</i>	FKTFLQ	TGAGKS	PLIALIQD	DEAH	TAT	IVYCRT	VIVAT	QESGRAGR
WRN <i>Homo sapiens</i>	FKPVQ	TGYGKS	PLISLMED	DEAH	TAT	IIYCPS	CVIAT	QEIGRAGR
HRQ1 <i>S. cerevisiae</i>	FYSHQ	TSSGKS	PTKALAQD	DELH	SAT	IAFCYV	AVIST	QOSGRAGR
SGS1 <i>S. cerevisiae</i>	FRPNQ	TGGGKS	PLISLMQD	DEAH	TAT	IIYCHS	VICAT	QETGRAGR
RECQ <i>E. coli</i>	FGYQQ	TGGGKS	PLISLMKD	DEAH	TAT	IIYCNS	IVVAT	QETGRAGR
HLTF <i>Homo sapiens</i>	LYYN	MGLGKT	PLSVLSNW	DEGH	TGT	LVVSQF	MLLSL	QCFDRCHR
RAD54 <i>Homo sapiens</i>	RPHQ	MGLGKT	PSSLVKNW	DEGH	SGT	SNYTQT	FMLSS	QAMARVWR
RA54B <i>Homo sapiens</i>	RPHQ	MGLGKT	PGSLVNNW	DEGH	TGT	SNYTQT	FLLSS	QAMSRVWR
SMAL1 <i>Homo sapiens</i>	MPFQ	MGLGKT	PSSVRFTW	DESH	SGT	IEYILD	VAVLS	QAEDRVHR
RAD54 <i>S. cerevisiae</i>	DEKA	MGLGKT	PSSLVNNW	DEGH	SGT	SNYTQT	FLLSS	QALARVWR
RDH54 <i>S. cerevisiae</i>	NPDI	MGLGKT	PVTLIGNW	DEGH	TGT	SNYTQT	FLLSA	QAMSRIHR
RAD5 <i>S. cerevisiae</i>	ANLH	MGLGKT	PMSLLTQW	DEGH	TGT	VIFSQF	LLLSL	QAIDRLHR
T1RA <i>E. coli</i>	RYYQ	TGTGKT	DRNILVDQ	DECH	TAT	IVFCND	VIATT	QIIIGRTR
T1RE <i>E. coli</i>	RYYQ	TGTGKT	DRNILVDQ	DECH	TAT	IVFCND	VIATT	QIIIGRTR
T1RK <i>E. coli</i>	RYYQ	TGTGKT	DRRSLGEQ	DEAH	TAT	LVFCVT	NIVVT	QMKGTRTR
RUVB <i>E. coli</i>	YVGQ	PGLGKT	PVLEKAGD	DEIH	SLT			LQRTPRGR
UVSW <i>E. phage T4</i>	HWYQ	TSAGKS	PTTALTTQ	DECH	SGS	FVMFKH	IIIVA	QTIGRVLR

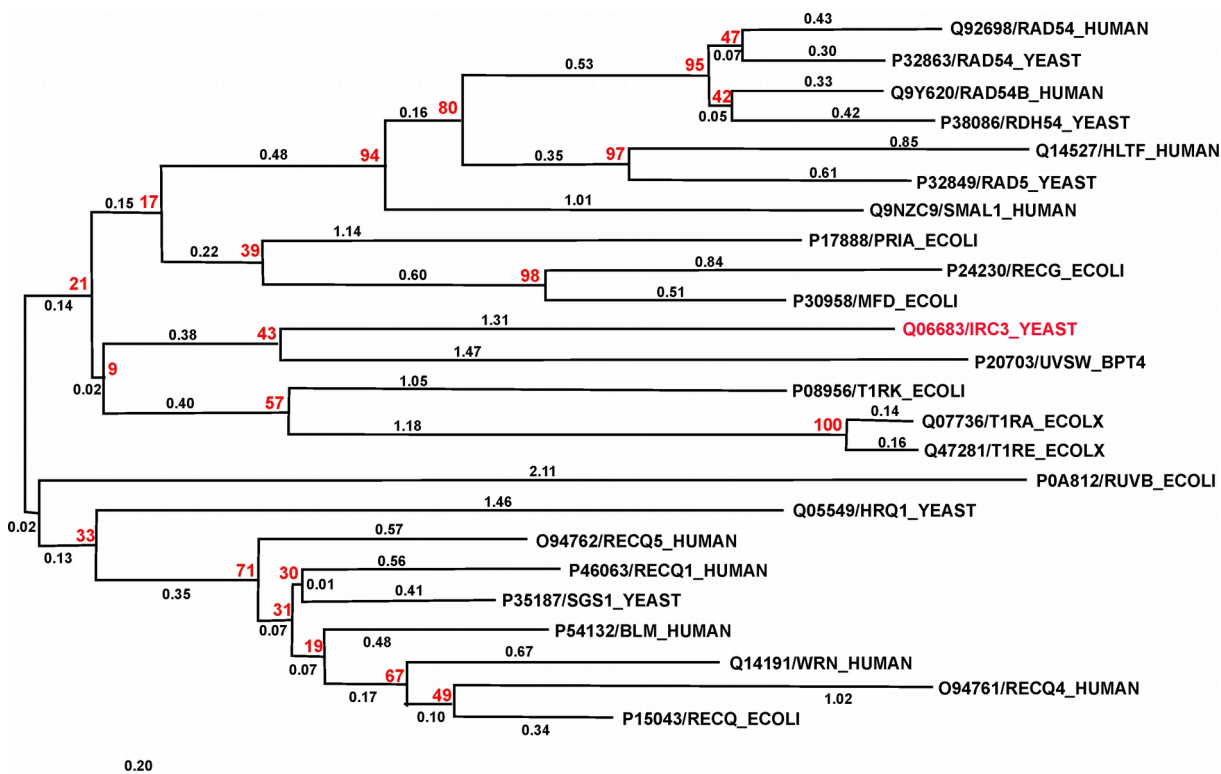
Joonis 5. Seitsme põhimotiivi joondus, mis põhineb 24 helikaasi aminohappelisel järjestusel. Irc3 motiivid on võetud artiklist (Sedman *et al.*, 2014), UvsW ja RuvB motiivid on kohandatud töö autori poolt artiklitest ja blastp abil (Iwasaki *et al.*, 2000; Kerr *et al.*, 2007). Ülejäänud joonduse järjestused on saadud artiklist (Fairman-Williams *et al.*, 2010).

Erinevate valkude helikaasi motiivide joondamisel selgub (Joonis 5), et Irc3 omab ühiseid motiive erinevate helikaasi perekondade esindajatega (vastavalt Fairman-Williams *et al.*, 2010 klassifikatsioonile). I ja II motiiv on kõigil järjestustel sarnaselt konserveerunud ja on terve SF-i piires üsna sarnased, seega erineb enamikel järjestustel motiiv ühe või kahe aminohappe võrra Irc3 I motiivist. Teine motiiv varieerub SF siseselt ainult ühe aminohappe võrra ja seal omab Irc3 identset motiiv II RecQ sarnaste valkude perekonda kuuluva inimese BLM, RecQ4, RecQ5 ja WRN, *S. cerevisiae* SGS1 ja *E. coli* RecQ valkudega ning tüüp I

restriktaaside perre kuuluva *E. coli* T1RK valguga. III motiivis konserveerunud SAT järjestus on identne RecG sarnaste helikaaside perre kuuluva *E. coli* PRIA valguga ja RecQ sarnaste valkude perre kuuluva *S. cerevisiae* valgu HRQ1-ga. Ülejäänud motiivid on perekondade piires suurema varieeruvusega ja ükski ei oma võrreldes ülejäänud järjestustega suuremat sarnasust Irc3-ga. Siiski on UvsW VI motiivi järjestus kahe aminohappelise erinevusega väga sarnane Irc3 vastavale struktuurile. (Valkude perekondliku kuuluvuse tabel Fairman-Williams *et al.*, 2010, Lisa 2)

3.3.1 Irc3 ja teiste lähedaste helikaaside võrdlus MEGA6 programiga

Järgnevalt kasutati kõigi 24 täisvalgu järjestusi, et konstrueerida fülogeneesipuu. Joonisel 6 on toodud arvutuste ja joonduse põhjal konstrueeritud fülogeneesipuu, mis näitab, et kõige lähedasem on Irc3 järjestuse poolest bakteriofaag T4 valk UvsW ja T1R perekonna valgud. Tegemist on juurimata puuga, mida iseloomustab välisgrupi puudumine, mille tõttu ei ole võimalik puult välja lugeda ühist eellast ja seega saab teha järeldusi ainult sarnasuse kohta.



Joonis 6. Tegemist on juurimata fülogeneesipuuga, mis näitab 24 väljavalitud valgu evolutsioonilist lahknemist. Punaselt on näidatud *bootstrapi* väärtused, mis näitab lahknemise tõenäosust selles punktis kahe lahkneva valgu suhtes ja annab maksimaalselt väärtuse 100 (Felsenstein, 1985). Mustad arvud puu harudel näitavad harude pikkust ja seega ka erinevate

valkude kaugust üksteisest. Puu konstrueerimise täpsemad parameetrid on ära toodud materjalis ja meetodis, peatükk 2.x . Joonisel on iga valgu puhul esimesena näidatud Uniproti andmebaasi kood, seejärel valgu nimi ja organism, kust valk pärineb (Yeast- tähistab *S. cerevisiae*-t, Human- *Homo sapiensi*, BPT4 märgib bakteriofaag T4, ECOLI- *E. coli*).

Fülogeneesipuu juures on tähelepanuväärne, et T1R ja Irc3 ja UvsW lahknemine annab tulemuseks üheksa, mis viitab asjaolule, et Irc3 ja T1R perekonna liikmed on siiski väga lähedased üksteisele. RecG, mis varasemas katses näitas võimet Irc3-st deletsiooni osaliselt komplementeerida, jääb puu peal Irc3 kaugemale, kuid on siiski evolutsiooniliselt lähedasem Irc3-ga kui enamik teisi SFII valke.

3.3.3. Irc3, T1R perekonna ja UvsW võrdlus ja joondamine

Kontrollimaks ja edasi uurimaks Irc3 sarnasust UvsW ja T1R perekonnaga, kasutati blastp ja võrreldi kõiki valke eraldi Irc3 vastu. Tabelis 8 on ära toodud valgu aminohappelised pikkused, mis on olulised võrdluses ja suurendavad vahede osakaalu, kuna lühikese ja pika valgu võrdlemisel jääb joondusesse sisse väga palju vahesid, mis üldiselt viitab valkude erinevusele. Lisaks sellele on tabelis ära toodud positiivsete ja identsete aminohapete ning vahede arv, joondatud aminohapete suhtes ja antud suhe protsentides.

Tabel 8. Irc3 võrdlus T1R ja UvsW perekonna suhtes.

Blastp	Valgu pikkus	Positiivne	Identsus	Vahed
Irc3	680 ah	-	-	-
T1RK	1170 ah	162/396 (40%)	101/396 (26%)	66/396 (16%)
T1RE	813 ah	190/484 (39%)	114/484 (24%)	79/484 (16%)
T1RA	810 ah	182/462 (39%)	104/462 (23%)	83/462 (17%)
UvsW	587 ah	167/373 (44%)	88/373 (24%)	33/373 (8%)

Tabeli koostamiseks kasutati andmeid Blastp-d: (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome 29.04.16)

Tulemustest selgub, et kõik 5 järjestust on väga sarnased. Kõige rohkem identsust esineb Irc3 võrreldes T1RK, kuid see erineb ainult 2% UvsWst, mis omab 4% suuremat positiivsete aminohapete arvu. Joonduse puhul on tähtis võrrelda ka vahede protsenti, mis annab parima tulemuse võrdluses UvsW-ga. Mida rohkem erineb kahe valgu aminohapete arv ja mida suurem vahede hulk, seda suurem on tõenäosus, et joondamisel tekkivad identsused ja positiivsed tulemused on juhuslikud. Seega võib välistada, et T1RE ja T1RA on nende andmete põhjal kõige lähedasemad Irc3-ga, kui võrd joonduses osaleb umbes sada aminohapet rohkem. Identseid ja positiivseid tulemusi andvaid aminohappeid ei ole samuti oluliselt rohkem ja vahede arv on suurem, kui T1RK-l ja UvsW-l. Antud tulemuste põhjal omavad nii T1RK kui UvsW suuremat sarnasust Irc3-le. UvsW homoloogia on tähelepanuväärseim kui võrd ta on tunduvalt lühem ja vahede arv on poole väiksem. Tuleb lisada, et Irc3 joondatakse kõigil juhtudel kuni 390.-nda aminohappeni, kust hakkab Irc3 unikaalne C-terminaalne järjestus. Viie valgu ühine joondus on ära toodud Lisa 1.-s ja näitab valkude täisjärjestuses esinevaid sarnasusi viie valgu lõikes.

4. Arutelu

Antud töö eesmärgiks oli *S. cerevisiae* mitokondriaalse helikaasi Irc3 funktsionaalne analüüs. Esiteks näitasime, et mitokondrisse suunatud RecG võimaldab osaliselt kompenseerida Irc3 helikaasi puudumist pärmirakkudes. Teiseks uurisime kahe teadaoleva hargnenud DNA metabolismis osaleva valgu, Cce1 ja Irc3 deletsiooni mõju mtDNA koopiaarvule. Kolmandaks demonstreerisime, et Irc3-ga omab kõige suuremat sarnasust bakteriofaag T4 helikaas UvsW-ga. Käesoleva töö katsed on osa suuremast projektist ja osaliselt on antud töö tulemusi kasutatud hiljuti avaldatud artiklis, mis näitab, et Irc3 on helikaas, mis suudab liigutada harukohti mööda DNA ahelat (Gaidutšik *et al.*, 2016).

Varasemalt on kindlaks tehtud, et mitokondriaalse helikaasi Irc3 deleteerimine genoomis tekitab kaksikahelaliste katkete kuhjumist rakus ja on võimalik, et osaleb rekombinatsiooniga seotud parandusmehhanismides ning seetõttu on Irc3 vajalik mitokondriaalse DNA terviklikuks säilimiseks (Sedman *et al.*, 2014). Meie uurimisgrupi hiljutiste eksperimentide tulemused näitavad, et Irc3 on helikaas, mis osaleb hargnenud DNA metabolismis (Gaidutšik *et al.*, 2016). Hargnenud mtDNA on iseloomulik nii pärmidele kui ka taimedele (Gerhold *et al.*, 2010; Oldenburg ja Bendich, 2015). Irc3 helikaasi ei ole taimedest leitud, kuid hiljuti tehti kindlaks bakteriaalse RecG valgu homoloog, RECG, mis lokaliseerub taimedes mitokondritesse ja osaleb seal rekombinatsiooni ning DNA stabiilsusega seotud protsessides (Odahara *et al.* 2015). Seetõttu oli võimalik oletada, et Irc3 omab RecG-ga sarnast funktsiooni pärmis.

Antud töös on näidatud, et kui sisestada *irc3Δ* tüvesse bakteriaalne RecG koos mitokondrisse suunamise signaaliga, suudab mittefermenteeritavat süsinikuallikat sisaldavas vedelsöötmes kasvanud umbes 24% pärmirakkudest säilitada enda elumuse glütserooli sisaldaval tardsöötmel, kui lugeda 100%-ks glükoosi sisaldaval tardsöötmel moodustunud kolooniate arv. Seetõttu on võimalik oletada, et need rakud omavad täielikku funktsionaalset mitokondri genoomi ja suudavad respireerida, kuna rakud on võimelised elama glütserooliga söötmel. Võrdluseks, *irc3Δ* tüvest pärit rakkude elumus jääb alla 2% ning peale ühe ööpäevast kasvumist glükoosi sisaldavas vedelsöötmes langeb respiratsiooniks võimeliste rakkude arv praktiliselt nulli. Sellest võib oletada, et vaid vähestel *irc3Δ* tüve rakkudel on populatsioonis täielik mitokondriaalne genoom, kuna rakud ei suuda elada glütserooli sisaldaval söötmel, kus respiratsiooniks on vajalik hingamisahela olemasolu, mida kodeeridakse osaliselt mitokondriaalse genoomi poolt (Foury *et al.*, 1998).

Bakteriaalne RecG suudab kasvades glütserooli sisaldaval tardsöötmel asendada ainult teatud määral Irc3 võimalikku funktsiooni või funktsioone, seetõttu ei saa pidada RecG-d Irc3 täiuslikuks funktsionaalseks homoloogiks. Seda tulemust toetavad ka *in silico* katse tulemused, kus selgub, et RecG on enda järjestuse poolest tunduvalt erinev Irc3st. Sellegipoolest on RecG võimeline mingil määral Irc3 deletsiooni komplementeerima, mida näitavad ka teised artikli Gaidutšik *et al.*, 2016 jaoks tehtud katsed, mille kohaselt *irc3Δ* tüve poolestusaeg on 8 tundi YPG (glütserooli sisaldaval) söötmel. Samal ajal RecG sisestusega tüve rakud poolduvad 4 tunniga ja tagasi viidud Irc3-ga rakutüvi 3 tunni jooksul. Lisaks sellele on näidatud, et RecG vähendab analoogiliselt Irc3-le mtDNA fragmenteerumist (Gaidutšik *et al.*, 2016). Sellest võib järeldada, et RecG omab vähemalt ühte Irc3 biokeemilist aktiivsust, mis on seotud DNA terviklikkuse säilitamisega ja mõjutab pärmirakkude kasvu ning DNA fragmenteerumist.

Helikaas Irc3 ja endonukleaas Cce1 on ainukesed kaks teadaolevat valku, mis otseselt osalevad haruliste mitokondriaalsete struktuuride metabolismis. Cce1 puhul on näidatud, et see lõikab x-struktuure ja tänu sellele vähendab otseselt hargnenud struktuure mitokondris. (Kleff *et al.*, 1992; Lockshon *et al.*, 1995). Irc3 on osaline kaksikahelaliste katkete metabolismis (Sedman *et al.*, 2014) ja meie sellel aastal ilmunud andmed näitavad, et see valk osaleb harukohtade liigutamises mööda DNA ahelat (Gaidutšik *et al.*, 2016). Siiski ei ole Irc3 roll pärmirakus üheselt teada ja võib spekuloida erinevate võimaluste üle. Irc3 võib sarnaselt RecG-le teha kahvlikujulisest struktuurist kanajalakujulise struktuuri (Lloyd ja Rudolph, 2016), aga ka inhibeerida valerekombinatsiooni või siis liigutada x-struktuure, et Cce1 saaks neid seejärel lõigata optimaalsest järjestusest (5'-CT) (White ja Lilley, 1996). Olemas olevate andmete põhjal ei ole võimalik öelda, milline on *cce1* ja *irc3* mutantide koosmõju. Üheks võimaluseks selle välja selgitamiseks on muutuste jälgimine mtDNA koopiaarvus ja topoloogias vastavates tüvedes.

Reaalaja kvanitatiivse PCR võimaldab detekteerida väiksemaid muutusi DNA koopiaarvus ja eeldatavasti ka topoloogias, kui viimane mõjutab amplifikatsiooni efektiivsust. Võib eeldada, et qPCR-is peaks olema DNA süntees tugevamalt häirunud, kui matriits DNAs leidub palju erinevaid risti- ja kahvlikujulisi struktuure, mis võivad segada DNA polümerisatsiooni. Sellised struktuurid akumulereeruvad suuremal hulgal *cce1Δ* tüves (Lockshon *et al.*, 1995)

Antud töös viidi läbi qPCR-i analüüs tüvedega a11, a11 *cce1Δ*, a11 *irc3Δ* ja a11 *irc3Δ/cce1*. Mõõtmise käigus esinesid probleemid mtDNA amplifikatsiooni efektiivsustega, mis jäid võrreldes tuuma amplifikatsiooniga märgatavalt väiksemaks. Antud probleem on esinenud ka

varasemates katsetes mitokondriaalsete praimeritega ning vajab edasist uurimist ja võimalik, et sõltumatu referentssüsteemi loomist. Siiski on amplifikatsiooni efektiivsus ühe praimeripaariga kõikides proovides piisavalt sarnane, et teha semikvantitatiivseid järeldusi. Tuuma DNA amplifikatsioon püsis samuti konstantne olenemata analüüsitava tüvest. Seega on võimalik kasutada tuuma DNA Cp ja mitokondriaalse amplifikatsiooni Cp vahet (Δ Cp) erinevate tüvede mitokondriaalse DNA amplifikatsiooni efektiivsuse hindamiseks. Mida suurem on Δ Cp, seda efektiivsem on mtDNA amplifikatsioon, mis omakorda lineaarse DNA korral tähendaks kõrgemat koopiaarvu.

Analüüs näitas, et tüvega a11 *cce1* Δ ei ole Δ Cp statistiliselt oluliselt muutunud võrreldes a11 tüvega. Seega kui topoloogia muutused ka mõjutavad qPCRi amplifikatsiooni, ei ole seda võimalik antud katses usaldusväärselt näidata või kompenseeritakse see efekt koopiaarvu suurenemisega keerukama topoloogiaga tüvedes. Selle tõestamiseks tuleks analüüsida koopiaarvu sõltumatu meetodiga, näiteks hübriidisatsiooniga. Antud katses näitasin ka, et a11 *irc3* Δ ja a11 *irc3* Δ /*cce1* Δ mitokondriaalse genoomi amplifikatsiooni produkti süntees on võrdselt häirunud. Seega, Cce1 nukleaasi deletsioon ei kompenseeri mitokondriaalse DNA amplifikatsiooni vähenemist pärmis, kus puudub helikaas Irc3.

Mitokondriaalsed helikaasid, mis on praeguseks avastatud erinevad Irc3st nii funktsionaalse aktiivsuse kui ka struktuuri poolest. Ehkki Pif1 osaleb samuti DNA metabolismis, ei ole siiani näidatud, et ta suudaks harukohti mööda DNA-d liigutada ning struktuuri poolest on Pif1 SF1 helikaas. Samuti kuulub SF1-te kolmas teadaolev mitokondriaalne helikaas Hmi1, mis mõjutab hingamisahelat (Lahaye *et al.*, 1991; Sedman *et al.*, 2000; Fairman-Williams *et al.*, 2010)

Irc3 kuulub SF 2 helikaaside hulka, kuid senimaani ei ole teda liigitatud ühtegi kindlasse perekonda (Sedman *et al.*, 2014). Antud töös selgub, et Irc3 ei liigitu tõepoolest SF2s ühtegi olemasolevasse perekonda. Irc3-l puuduvad otsesed teadaolevad homoloogid, välja arvatud teistes pärmis liikides kindlaks tehtud Irc3 helikaasid ning talle võib kõige lähedasemaks pidada bakteriofaagi T4 valku UvsW. Väga lähedasteks on osutunud üllataval kombel ka T1R perekonna liikmed, mis on tüüp I restriктаasid ja omavad endonukleaasid ja ATPaasid võimet, kuid nende seotust haruliste DNA struktuuridega ei ole näidatud. (Davies *et al.*, 1999).

Lisaks sellele, et UvsW on järjestuselt väga sarnane Irc3-ga, omavad mõlemad ka funktsioonilist sarnasust, olles võimelised liigutama harukohti mööda DNA-d edasi ja olles

seega olulised hargnenud DNA metabolismis (Webb *et al.*, 2007, Gaidutšik *et al.*, 2016). Teiseks oluliseks sarnasuseks Irc3 ja UvsW vahel võib pidada seda, et RecG suudab komplementeerida nii Irc3 kui ka UvsW funktsiooni (käesolev töö, Gaidutsik *et al.* 2016, Carles-Kinch *et al.*, 1997). Edasised katsed on vajalikud selgitamiseks UvsW ja Irc3 funktsionaalset sarnasust, millest võib olla abi teiste Irc3 võimalike funktsioonide täpsustamiseks.

Üheks huvitavaks aspektiks on see, et Irc3 primaarjärjestuses leiduvad motiivid sobituvad erinevatesse perekondadesse. Erinevad motiivid on iseloomuliku struktuuriga eri perekondades. Tulenevalt sellest, et võrreldud SF2 helikaaside I ja II motiivid on kõikide perekondade lõikes sarnased vaid mõne aminohappelise erinevusega, võib eeldada, et eri perekondade valgud kasutavad sarnast mehhanismi ATP hüdroolüüsiks. Irc3 valgu III motiiv on sarnane RecQ ja RecG perekonna kolmandale motiivile, mis võib olla põhjendatud sellega, et kõik nimetatud valgud on DNA helikaasid (Fairman-Williams *et al.*, 2010) ja teadaolevalt määrab III motiiv RNA helikaasidel spetsiifiliselt RNA lahtiharutamise (Pause ja Sonenberg, 1992). Seega võib eeldada, et DNA helikaasidel on see vajalik DNA substraadi lahtiharutamiseks ja on seetõttu sarnaselt konserveerunud DNA helikaasidel. Viimane ehk VI motiiv omab Irc3 valgul suurimat sarnasust UvsW-ga. Konserveerunud motiivide võrdlusest võib järeldada, et iga üksiku motiivi alusel saaks Irc3 jaotada erinevasse perekonda, aga üle terve primaarjärjestuse ei leidu perekonda, mis omaks Irc3ga kõikides motiivides piisavalt homoloogilisi sarnasusi.

Irc3 võrdlusest üle terve järjestuse T1R perekonna liikmetega ja UvsW-ga selgub samuti, et sarnasus on, kuid on väga raske kindlalt väita, millisesse perekonda võiks Irc3 kuuluda. T1RK ja UvsW on identsuse ja sarnaste aminohapete olemasolu tõttu kõige paremad vasted Irc3-le, aga tänu lühemale järjestusele ja suuremale sarnasusele võib siiski pidada kõige lähemasemaks UvsW-d. Tuleb tõdeda, et tegemist ei ole siiski tugeva homoloogiaga. Väga silmapaistev on fakt, et erinevad valgud joonduvad ainult Irc3 N-terminaalse otsaga, mis sisaldab helikaasi motiive. Irc3 helikaasil on aga pikk C-terminaalne ots, kuhu kuuluvad aminohapped 380-689, mille funktsioon on siia maani teadmata (Sedman *et al.*, 2014). Võib spekuloida, et valgu C-terminaalne ots omab homoloogiat mõne valgu, näiteks RecG-ga kolmemõõtmelise struktuuri tasemel, mis seni on veel kirjeldamata ja on vajalik mõne bioloogilise funktsiooni täitmisel.

Kokkuvõte

Irc3 on SF2 kuuluv mitokondriaalne DNA helikaas, mis hiljuti ilmunud tulemuste põhjal liigutab harukohti mööda DNA ahelat. Antud bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates käsitleti helikaaside, ning kitsamalt SF2 helikaaside omadusi erilise fookusega Irc3 ja RecG valkudel. Töö eksperimentaalses osas analüüsiti mõningaid Irc3 funktsionaalseid omadusi.

Antud töös võrreldi *irc3Δ* tüve elumust tüvedega, kus on sisse viidud bakteriaalse RecG või IRC3 geen tsentromeerse plasmidi koosseisus. Tüvede võimet säilitada funktsionaalne mitokondriaalne genoom analüüsiti väljakülvidega glütserooli ja glükoosi sisaldavatele söötmetele ning üleskasvanud kolooniaid analüüsiti. Selles töös esitatud tulemuste ja meie töögrupi poolt äsja ilmunud artiklis näidatud täiendava informatsiooni põhjal võib öelda, et bakteriaalne RecG suudab komplementeerida osaliselt Irc3 helikaasi *S. cerevisiae* rakkudes.

Teiseks viidi läbi katsed mitokondriaalse helikaasi Irc3 ja endonukleaasi Cce1-ga, kuna mõlemad on teada olevalt ainukesed mitokondriaalse DNA haruliste struktuuridega tegelevad valgud. Antud katses deleteeriti hüpersupressiivsest pärmi tüvest a11 *IRC3* ja *CCE1* geenid, või mõlemad korraga ja teostati reaalkvaantitatiivse PCR-iga mtDNA mõõtmised. Antud tulemustest võib järeldada, et Cce1 valgu deleteerimine a11 pärmi tüvest ei tekita olulisi muudatusi mtDNA amplifikatsioonis võrreldes tuuma DNA-ga, küll aga amplifitseeritakse mtDNA vähem tüvedest, kus on deleteeritud kas Irc3 või Irc3 ja Cce1 ühiselt. Nendest tulemustest saab järeldada, et Irc3 mõjutab mitokondriaalset DNA amplifikatsiooni, mis võib olla tingitud nii mtDNA hulga vähenemisest kui ka struktuuri muutustest, kuid täpsemad järeldused nõuavad uue katsesüsteemi loomist.

Viimasena näidati antud töös *in silico* analüüsi abil, et Irc3-le on kõige lähedasem bakteriofaag T4 helikaas UvsW, mis tegeleb samuti DNA liigutamisega mööda harukohti. Antud tulemuste saamiseks võrreldi 24 sarnase funktsiooniga või aminohappelise järjestusega helikaasi ja konstrueeritud valkude täisjärjestuse põhjal fülogeneesipuu. Antud tulemuste põhjal võrreldi Irc3 helikaasi temaga kõige sarnasemate valkudega ükshaaval. Nendeks olid helikaas UvsW ja perekond T1R esindajad, mille liikmed on esimest tüüpi restriктаasid, millel on ATPasse aktiivsusega subühik.

Functional analysis of the mitochondrial DNA helicase Irc3

Sirelin Sillamaa

Summary

Helicases play important role in the cells and are essential for maintaining functional mitochondrial DNA. There are three DNA helicases in mitochondria of the yeast *S. cerevisiae*: Pif1, Hmi1 and Irc3 and all of them are directly involved in mitochondrial genome maintenance. Irc3 belongs to the superfamily 2 (SF2) and has recently been described as a mitochondrial branch migration enzyme.

In this work we focused on Irc3 on its function and its family matters. Lately a plant homologue for RecG was discovered, which localizes into the mitochondria and is important for mitochondrial DNA maintenance. Up to now there are no Irc3 homologues found in the plant and bacterial cells, so we assumed, that maybe the RecG position in yeast. We therefore asked if bacterial RecG could complement the deletion of Irc3 in a viability assay on glycerol containing media. compare viability of the *ircΔ* strain survival compared to strains, which had centromeric plasmid inserted either with IRC3 gene or with RecG. The strains containing IRC3 or RecG on a centromeric plasmid were compared to *irc3Δ* strain and the respiratory competent cell fraction was found by counting yeast colonies on glycerol and glucose containing media. We found out that RecG partially complements the loss of Irc3, so we can conclude that RecG shares at least some functions with Irc3.

Since the helicase Irc3 and endonuclease Cce1 are the only described proteins dealing with branched DNA in yeast mitochondria we decided to analyze interactions between both of them. Cce1 is known for its ability to cut cruciform DNA structures, so we wanted to test, whether Irc3 and Cce1 have synergetic functions. We analyzed a hypersuppressive yeast strains a11 which had deletion in IRC3 or CCE1 genes or in both of them and performed a quantitative real-time PCR analysis of mtDNA. DNA amplification signals were significantly lower in the strains where Irc3 was deleted, but the wt a11 and a11 strain with deleted Cce1 were similar. Furthermore, the lower mtDNA signals *irc3Δ* strain did not change significantly when additionally Cce1 was deleted.

Finally, since Irc3 has not been classified into specific helicase family, we selected 23 different helicases members, based on similar function or common motives with Irc3 and

performed *in silico* analysis. First, we aligned their helicase motifs and then constructed a phylogenetic tree from full-length protein sequence. As a result, type I restriction enzymes and the bacteriophage T4 helicase UvsW were identified as the most similar ones to Irc3. We then analyzed their sequences one on one against Irc3 and concluded that UvsW is the closest homologue of Irc3. Obviously, future experiments are needed to find out whether UvsW and Irc3 can complement each other better.

Kasutatud kirjandus

1. Achar, Y.J., Balogh, D., Haracska, L. (2011). Coordinated protein and DNA remodeling by human HLTF on stalled replication fork. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(34): 14073-8.
2. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1;25(17): 3389-402.
3. Altschul, S.F., Wootton, J.C., Gertz, E.M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schäffer, A.A., Yu Y.K. (2005). Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* 272(20): 5101-9.
4. Alvaro, D., Lisby, M., Rothstein, R.(2007). Genome-wide analysis of Rad52 foci reveals diverse mechanisms impacting recombination. *PloS Genet.* 3(12):e228.
5. Ahne, F., Jha, B., Eckardt-Schupp, F. (1997).The RAD5 gene product is involved in the avoidance of non-homologous end-joining of DNA double strand breaks in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic. Acids. Res.* 25(4): 743-9.
6. Banroques, J., Cordin, O., Doere, M., Linder, P., Tanner, N.K. (2008). A conserved phenylalanine of motif IV in superfamily 2 helicases is required for cooperative, ATP-dependent binding of RNA substrates in DEAD-box proteins. *Mol Cell Biol.* 28(10): 3359-71
7. Bansbach, C.E.,Bétous, R., Lovejoy, C.A., Glick, G.G, Cortez, D. (2009). The annealing helicase SMARCAL1 maintains genome integrity at stalled replication forks *Genes. Dev.* 23(20): 2405–2414.
8. Bennett, R.J., Sharp, J.A., Wang, J.C. (1998). Purification and characterization of the Sgs1 DNA helicase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273(16): 9644-50.
9. Bickle, T.A.,Krüger, D.H. (1993). Biology of DNA restriction. *Microbiol. Rev.* 57(2): 434–450.
10. Boule, J.B., Vega, L.R., Zakian, V.A. (2005). The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. *Nature.* 438(7064): 57-61.

11. Bruckner, R. C., Crute, J.J., Dodson, M.S., and Lehman, I.R. (1991). The herpes simplex virus 1 origin binding protein: a DNA helicase. *J. Biol. Chem.* 266:2669-2674.
12. Bugreev, D.V., Brosh, R.M., Jr., Mazin, A.V. (2008). RECQ1 possesses DNA branch migration activity. *J. Biol. Chem.* 283:20231–20242
13. Burkovics, P., Sebesta, M., Balogh, D., Haracska, L., Krejci, L. (2014). Strand invasion by HLTF as a mechanism for template switch in fork rescue. *Nucleic. Acids. Res.* 42(3): 1711-20.
14. Carles-Kinch, K., George, J.W., Kreuzer, K.N. (1997). Bacteriophage T4 UvsW protein is a helicase involved in recombination, repair and the regulation of DNA replication origins. *EMBO J.* 16(13): 4142-51.
15. Caruthers, J.M., Johnson, E.R., McKay, D.B. (2000). Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(24): 13080-5.
16. Caruthers, J.M. ja McKay, D.B.(2002) Helicase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol.* 12: 123-133.
17. Chi, P., Kwon, Y., Seong, C., Epshtein, A., Lam, I., Sung, P., Klein, H.L. (2006). Yeast recombination factor Rdh54 functionally interacts with the Rad51 recombinase and catalyzes Rad51 removal from DNA. *J. Biol. Chem.* 281(36): 26268-79.
18. Clever B, Interthal, H., Schmuckli-Maurer, J., King, J., Sigrist, M., Heyer, W.D. (1997). Recombinational repair in yeast: functional interactions between Rad51 and Rad54 proteins. *EMBO J.*16(9): 2535-44
19. Compton, S.A., Tolun, G., Kamath-Loeb, A.S., Loeb, L.A, Griffith, J.D. (2008). The Werner syndrome protein binds replication fork and holliday junction DNAs as an oligomer. *J. Biol. Chem.* 283(36): 24478-83.
20. Davies, G.P., Kemp, P., Molineux, I.J., Murray, N.E. (1999). The DNA translocation and ATPase activities of restriction-deficient mutants of Eco KI. *J. Mol. Biol.* 292(4): 787-96.

21. Davies, G.P., Martin, I., Sturrock, S.S., Cronshaw, A., Murray, N.E., Dryden, D.T. (1999). On the structure and operation of type I DNA restriction enzymes. *J. Mol. Biol.* 290(2): 565-79.
22. de la Cruz, J., Kressler, D., Linder, P. (1999). Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends. Biochem. Sci.* 24(5):192-8.
23. Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792–1797.
24. Fairman-Williams M.E., Guenther, U.P., Jankowsky, E. (2010). SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20(3): 313-324.
25. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
26. Fernández, A., Guo, H.S., Sáenz, P., Simón-Buela, L., Gómez de Cedrón, M., García, J.A.(1997). The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic. Acids. Research* 25: 4475-4480.
27. Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 440(3): 325-31.
28. Fukuoh, A., Iwasaki, H., Ishioka, K., Shinagawa, H. (1997). ATP-dependent resolution of R-loops at the *ColE1* replication origin by *Escherichia coli* RecG protein, a Holliday junction-specific helicase. *EMBO J.* 16(1): 203-9.
29. Gaidutšik I., Sedman, T., Sillamaa, S., Sedman, J. (2016). Irc3 is a mitochondrial DNA branch migration enzyme. *Sci. Rep.* 6: 26414.
30. Gerhold, J., Aun, A., Sedman, T., Jõers P., 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(6):851-61.
31. Gorbalenya, A. E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., Blinov, V.M. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 17(12): 4713-4730.

32. Gorbalenya, A. E. ja Koonin, E.V. (1993) Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 419–429.
33. Graves-Woodward, K.L., Weller, S.K. (1996). Replacement of Gly815 in helicase motif V alters the single-stranded DNA-dependent ATPase activity of the Herpes Simplex Virus Type 1 helicase-primase. *J. Biol. Chem.* 271: 13629-13635.
34. Hall, M.C. ja Matson, S.W. (1997). Mutation of a Highly Conserved Arginine in Motif IV of *Escherichia coli* DNA Helicase II Results in an ATP-binding Defect. *J. Biol. Chem.* 272: 18614-18620.
35. Hall, M.C. ja Matson, S.W. (1999). Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. *Molecular Microbiology* 34(5): 867-877.
36. Hishida, T., Han, Y.-W., Shibata, T., Kubota, Y., Ishino, Y., Iwasaki, H., Shinagawa, H. (2004) Role of the *Escherichia coli* RecQ DNA helicase in SOS signaling and genome stabilization at stalled replication forks. *Genes. Dev.* 18: 1886–1897.
37. Iwasaki, H., Han, Y.W., Okamoto, T., Ohnishi, T., Yoshikawa, M., Yamada, K., Toh, H., Daiyasu, H., Ogura, T., Shinagawa, H. (2000). Mutational analysis of the functional motifs of RuvB, an AAA+ class helicase and motor protein for holliday junction branch migration. *Mol. Microbiol.* 36(3): 528-38.
38. Janscak, P., Sandmeier, U., Bickle, T.A. (1999). Single amino acid substitutions in the HsdR subunit of the type IB restriction enzyme EcoAI uncouple the DNA translocation and DNA cleavage activities of the enzyme. *Nucleic. Acids. Res.* 27(13): 2638-43.
39. Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275-282.
40. Jones, J.M., Nakai, H. (2001). *Escherichia coli* PriA helicase: fork binding orients the helicase to unwind the lagging strand side of arrested replication forks. *J. Mol. Bio.* 312(5): 935-47.
41. Karow, J.K., Chakraverty, R.K, Hickson (1997). The Bloom's Syndrome Gene Product Is a 3'-5' DNA Helicase. *J. Biol. Chem.* 272(49): 30611-4.

42. Kerr, I.D., Sivakolundu, S., Li, Z., Buchsbaum, J.C., Knox, L.A., Kriwacki, R., White, S.W. (2007). Crystallographic and NMR analyses of UvsW and UvsW.1 from bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* 282(47): 34392-400.
43. Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Griffith, J.P., Dwyer, M.D., Thomson, J.A., Murcko, M.A., Lin, C., Caron, P.R. (1997). Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure.* 6(1): 89-100.
44. Kleff, K., Kemper, B., Sternglanz, R. (1992). Identification and characterization of yeast mutants and the gene for a cruciform cutting endonuclease. *EMBO J.* 11(2): 699-704.
45. Klein, H.L. (1997). RDH54, a RAD54 homologue in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for mitotic diploid-specific recombination and repair and for meiosis. *Genetics* 147(4): 1533-43.
46. Kwon, S.H., Choi, D.H., Lee, R., Bae, S.H. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* Hrq1 requires a long 3'-tailed DNA substrate for helicase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427(3): 623-8
47. Korhonen, J.A., Gaspari, M., Falkenberg, M. (2003). TWINKLE Has 5' → 3' DNA Helicase Activity and Is Specifically Stimulated by Mitochondrial Single-stranded DNA-binding Protein. *J. Biol. Chem.* 278: 48627-48632.
48. Kuusk, S., Sedman, T., Jõers, P., Sedman, J. (2005). Hmi1p from *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria Is a Structure-specific DNA Helicase. *J. Biol. Chem.* 280 (26): 24322-24329.
49. Lahaye, A., Leterme, S., Foury, F., (1993). PIF1 DNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 268(35): 26155-61.
50. Lahaye, A., Stahl, H., Thines-Sempoux, D., Foury, F., Pif1: a DNA helicase in yeast mitochondria. *EMBO J.* 10(4): 997–1007.
51. Langeland, G., Elliott, J., Li, Y., Creaney, J., Dixon, K., Groden, J. (2002). The BLM helicase is necessary for normal DNA double-strand break repair. *Cancer Res.* 62(10): 2766-70.

52. Lee, C. M., Sedman, J., Neupert, W., Stuart, R. A. (1999). The DNA Helicase, Hmi1p, Is Transported into Mitochondria by a C-terminal Cleavable Targeting Signal. *J. Biol. Chem.* 274 (30): 20937-20942.
53. Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Lopez, R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic acids research* 43 (W1) : W580-4.
54. Lockshon, D., Zweifel, S.G., Freeman-Cook, L.L., Lorimer, H.E., Brewer, B.J., Fangman, W.L. (1995). A role for recombination junctions in the segregation of mitochondrial DNA in yeast. *Cell*, 81: 947-955.
55. Lohman, T.M. ja Bjornson, K.P. (1996). Mechanisms of helicase-catalysed DNA unwinding. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 169-214.
56. Lloyd, R.G. ja Buckman, C. (1991) Genetic analysis of the *recG* locus of *Escherichia coli* K-12 and of its role in recombination and DNA repair. *J. Bacteriol.* 173: 1004–1011.
57. Lloyd, R.G., Rudolph, C.J. (2016). 25 years on and no end in sight: a perspective on the role of RecG protein. *Curr. Genet.* doi: 10.1007/s00294-016-0589-z
58. Lloyd, R.G. ja Sharples, G. (1993). Dissociation of synthetic Holliday junctions by *E. coli* RecG protein. *EMBO J.* 12(1): 17–22.
59. Macris, M.A., Krejci, L., Bussen, W., Shimamoto, A., and Sung, P. (2006). Biochemical characterization of the RECQ4 protein, mutated in Rothmund-Thomson syndrome. *DNA Repair* 5: 172–180.
60. Marintcheva, B. Ja Weller, S.K. (2003). Helicase Motif Ia Is Involved in Single-Strand DNA-Binding and Helicase Activities of the Herpes Simplex Virus Type 1 Origin-Binding Protein, UL9. *J Virol.* 77(4): 2477–2488.
61. Masai, H., Deneke, J., Furui, Y., Tanaka, T., Arai, K.I. (1999). *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* PriA proteins essential for recombination-dependent DNA replication: involvement of ATPase/helicase activity of PriA for inducible stable DNA replication. *Biochimie.* 81(8-9): 847-57.

62. Mazina, O.M., Rossi, M.J., Deakyne, J.S, Huang, F., Mazin, A.V. (2012). Polarity and bypass of DNA heterology during branch migration of Holliday junctions by human RAD54, BLM, and RECQ1 proteins. *J. Biol. Chem.* 287(15): 11820–11832.
63. Matson, S.W. ja Kaiser-Rogers, K.A. (1990). DNA Helicases. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 289-329.
64. McGlynn, P., Al-Deib, A.A., Liu, J., Marians, K.J., Loyd, R.G. (1997) The DNA replication protein PriA and the recombination protein RecG bind D-loops. *J. Mol. Biol.* 270: 212–221.
65. McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P., Lopez R. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research* 41 (Web Server issue): W597-600.
66. Merz, S. ja Westermann, B. (2009). Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol.* 10(9): R95.
67. Millan, P.F., Lazaro, M., Cansiz-Arda, S., Gerhold, J.M., Rajala, N., Schmitz, C.-A., Silva-Espina, C., Gil, D., Bernado, P., Valle, M., Spelbrink, J.N., Sola, M. (2015). The hexameric structure of the human mitochondrial replicative helicase Twinkle. *Nucleic Acids Res.* 43(8): 4284–4295.
68. Miyagawa, K., Tsuruga, T., Kinomura, A., Usui, K., Katsura, M., Tashiro, S., Mishima, H., Tanaka, K. (2002). A role for *RAD54B* in homologous recombination in human cells. *EMBO J.* 21(1-2): 175–180.
69. Muller, B., Tsaneva, I. R., West, S. C. (1993). Branch migration of Holliday junctions promoted by the *Escherichia coli* RuvA and RuvB proteins. I. Comparison of RuvAB- and RuvB-mediated reactions. *J. Biol. Chem.* 268: 17179–84.
70. Nelson, S.W., Benkovic, S.J. (2007). The T4 Phage UvsW Protein Contains Both DNA Unwinding and Strand Annealing Activities. *J. Biol. Chem.* 282: 407-416.
71. Odahara, M., Masuda, Y., Sato, M., Wakazaki, M., Harada, C., Toyooka, K., Sekine, Y. (2015). RECG maintains plastid and mitochondrial genome stability by suppressing

- extensive recombination between short dispersed repeats. *Plos Genet.* 11(3): e1005080.
72. Oldenburg, D.J., Bendich, A.J. (2015). DNA maintenance in plastids and mitochondria of plants. *Front Plant Sci.* 6: 883.
73. Opresko, P.L., Sowd, G., Wang, H. (2009). The Werner syndrome helicase/exonuclease processes mobile D-loops through branch migration and degradation. *Plos. One.* 4(3): e4825.
74. Paeschke, K., Bochman, M.L., Garcia, P.D., Cejka, P., Friedman, K.L., Kowalczykowski, S.C., Zakian, V.A. (2013). Pif1 family helicases suppress genome instability at G-quadruplex motifs. *Nature* 497(7450): 458-62.
75. Paliwal, S., Kanagaraj, R., Sturzenegger, A., Burdova, K., Janscak, P. (2014). Human RECQ5 helicase promotes repair of DNA double-strand breaks by synthesis-dependent strand annealing. *Nucleic. Acids. Res.* 42(4): 2380-90.
76. Pause, A. ja Sonenberg, N. (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor Eif-4a. *EMBO J.* 11(7): 2643-54.
77. Petukhova G, Stratton. S., Sung, P. (1998). Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature* 393(6680):91-4
78. Pike, A.C., Gomathinayagam, S., Swuec, P., Berti, M., Zhang, Y., Schnecke, C., Marino F, von Delft F, Renault L, Costa A, Gileadi O, Vindigni A. (2015). Human RECQ1 helicase-driven DNA unwinding, annealing, and branch migration: Insights from DNA complex structures *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*112(14): 4286-91.
79. Ramanagoudr-Bhojappa, R., Byrd, A.K., Dahl, C., Raney, K.D. (2014). Yeast Pif1 Accelerates Annealing of Complementary DNA Strands. *Biochemistry.* 53(48): 7659-69.
80. Rozen, F., Pelletier, J., Trachsel, H., Sonenberg, N. (1989). A lysine substitution in the ATP binding site of eucaryotic initiation factor 4A abrogates nucleotide-binding activity. *Mol. Cell. Biol.* 9: 4061-4063.
81. Saitou, N. ja Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

82. Selby, C.P., Sancar, A. (1995). Structure and function of transcription-repair coupling factor. I. Structural domains and binding properties. *J. Biol. Chem.* 270(9): 4882-9.
83. Selby, C.P., Witkin, E.M., Sancar, A. (1991). *Escherichia coli* mfd mutant deficient in "mutation frequency decline" lacks strand-specific repair: in vitro complementation with purified coupling factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88(24): 11574–11578.
84. Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., Meisinger, C.(2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(23): 13207–132.
85. Sikorski R.S., Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 122(1): 19-27.
86. Singleton, M.R., Dillingham, M.S., Wigley, D.B. (2007). Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 23-50.
87. Singleton, M.R., Scaife, S., Wigley, D.B. (2001). Structural Analysis of DNA Replication Fork Reversal by RecG. *Cell.* 107: 79–89.
88. Sedman, T., Gaidutšik, I., Villemson, K., Hou, YJ., Sedman, J.(2014). Double-stranded DNA-dependent ATPase Irc3p is directly involved in mitochondrial genome maintenance. *Nucleic Acids Res.* 42(21): 13214–13227.
89. Sedman, T., Kuusk, S., Kivi, S., Sedman, J. (2000). A DNA Helicase Required for Maintenance of the Functional Mitochondrial Genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 20(5): 1816-1824.
90. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7: 539.
91. Subramanya, H.S., Bird, L.E., Brannigan, J.A., Wigley, D.B. (1996). Crystal structure of a DExx box DNA helicase. *Nature* 384(6607): 379-83.

92. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
93. Tanaka, K., Kagawa, W., Kinebuchi, T., Kurumizaka, H., Miyagawa, K. (2002). Human Rad54B is a double-stranded DNA-dependent ATPase and has biochemical properties different from its structural homolog in yeast, Tid1/Rdh54. *Nucleic. Acids. Res.* 30(6): 1346-53.
94. Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques, J., Doere, M., Linder, P. (2003) The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol Cell* 11: 127–138.
95. Tzagoloff, A. ja Dieckmann, C.L. (1990). PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* 54(3): 211–225.
96. Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal* 1(8): 945-51.
97. Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M., Rothstein, R. (1989). A hyper-recombination in *S. cerevisiae* identifies a novel eucaryotic topoisomerase. *Cell* 58: 409-419.
98. Webb, M.R., Plank, J.L., Long, D.T., Hsieh, T.S., Kreuzer, K.N. (2007). The Phage T4 Protein UvsW Drives Holliday Junction Branch Migration. *J. Biol. Chem.* 282(47): 34401-11.
99. Westermann, B. (2013). Mitochondrial inheritance in yeast. *Biochim. Biohys. Acta.* 1837(7): 1039-46.
100. Williamson, D. (2002). The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat. Rev. Genet.* 3(6): 475-81.
101. Whitby, M.C., Lloyd, R.G. (1998). Targeting Holliday junctions by the RecG branch migration protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273(31): 19729-39.

102. White, M.F., Lilley, D.M. (1996). The structure-selectivity and sequence-preference of the junction-resolving enzyme CCE1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 257(2): 330-41.

Raamatud:

Pfaffl, M.W.,(2004). Quantification Strategies in Real-Time PCR. Bustin, S.A. (ed.). *A-Z of Quantitative PCR*, p. 103,105. 1th ed., International University Line, California.

Sherman, F. (1991). Getting started with yeast. C., Fink, R. G. (ed.) *Methods in Enzymology: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Euthrie, p.15,17., vol. 194. Academic Press, San Diego, California.

Rose, M. D., Winston, F., Hieter, P., (1990). *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kasutatud veebiaadressid:

Blastp, valgu võrdlemise andmebaas:

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgiPROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch

Valgu andmebaas Uniprot: <http://www.uniprot.org/>

Lisad

Lisa 1.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```
SP|Q06683|IRC3_YEAST -----  
SP|P08956|T1RK_ECOLI MMNKSNFELKGVNDFTYAIACAAENNYPPDDPNTTLIKMRMFGEATAKHLGLLLNI  
60  
SP|Q47281|T1RE_ECOLX -----  
SP|Q07736|T1RA_ECOLX -----  
SP|P20703|UVSW_BPT4 -----
```

```
SP|Q06683|IRC3_YEAST -----  
SP|P08956|T1RK_ECOLI NQHDLRELKIAFVDDNII SVFHKLRRIQAVHEYHNDLND AQMCLRLGFR  
120  
SP|Q47281|T1RE_ECOLX -----  
SP|Q07736|T1RA_ECOLX -----  
SP|P20703|UVSW_BPT4 -----
```

```
SP|Q06683|IRC3_YEAST -----  
SP|P08956|T1RK_ECOLI LVT KDYDFPVPFVLP ERGENLYHQEVLTLKQQL EQVREKAQTQAEVEA  
180  
SP|Q47281|T1RE_ECOLX -----  
SP|Q07736|T1RA_ECOLX -----  
SP|P20703|UVSW_BPT4 -----
```

```
SP|Q06683|IRC3_YEAST -----  
SP|P08956|T1RK_ECOLI YIAILEGKQ QETEAQTQARLAAL EAQLAEKNAELAKQTEQERKAYHKEITD  
240  
SP|Q47281|T1RE_ECOLX -----MAG----V-----NKTHLTE  
11  
SP|Q07736|T1RA_ECOLX -----MAE----L-----NLSNLTE  
11  
SP|P20703|UVSW_BPT4 -----
```

```
SP|Q06683|IRC3_YEAST -----  
SP|P08956|T1RK_ECOLI SEEESRFLIDAQLRKAGWQADSKTLRFSK GARPEPGVNKAI AEWPTGKDE  
300  
TGNQGFADYV
```

SP|Q47281|T1RE_ECOLX TDIITK-FILPAVKDAGWDVMSQIRQEVKLRDGGKIVVRGKLAS-----RIKVK SADIV
63
SP|Q07736|T1RA_ECOLX ADIITK-CVMPAILNAGWDNTTQIRQEVKLRDGGKIVVRGKVAA-----RRTVKSADIV
63
SP|P20703|UVSW_BPT4 -----

SP|Q06683|IRC3_YEAST -----
SP|P08956|T1RK_ECOLI LF-VGLKPIAVVEAKRNNIDVPARLNESYRYSKCFDNGFLRETLLEHYSPPDEVHEAVPEY
359
SP|Q47281|T1RE_ECOLX LYHKPNLPLAVIEAKANKHAIKGMQGLDYAS-----
96
SP|Q07736|T1RA_ECOLX LYHKPGIPLAVIEAKANKHEIGKGMQGGIEYAR-----
96
SP|P20703|UVSW_BPT4 -----MDIKVHFHDF
10

SP|Q06683|IRC3_YEAST -----MTSTLA----- 6
SP|P08956|T1RK_ECOLI ETSWQDTSGKQRFKIPFCYSTNGREYRATMKTSGIWRDVRDTRNMSKALPEWHRPEEL
419
SP|Q47281|T1RE_ECOLX -----LLDVPFVFASNGDGFIFHDKTNP-----QQLESEIALSDFPTPEQL
137
SP|Q07736|T1RA_ECOLX -----LLDVPFVFATNGDGFIFRDATAAEG-----ECLEKQITLDDFPSPAEL
139
SP|P20703|UVSW_BPT4 SHVRIDCEESTFHELDRFFSFEADGYRFNPRFRYGNWDGRIRLLD-YNRLLP-FGL-VGQ
67

*

SP|Q06683|IRC3_YEAST -TRLST-----YSISLILQR-----IK---IIKRCYSAPVLRDYQQDAIDACVN
46
SP|P08956|T1RK_ECOLI LEML-----GSEPQKQNQ-----WF---ADNPGMSELGLRYYQEDAVRAVEK
458
SP|Q47281|T1RE_ECOLX WQKYCAWKGFTQEQLPVISQD-----YF---DDGSG---KAPRYYQM QAINRTVD
181
SP|Q07736|T1RA_ECOLX WQKFCLWKGYTQAQLPVITQD-----YY---DDGSG---KSPRYYQLQAINKTIE
183
SP|P20703|UVSW_BPT4 IKKFCDNFGYKAWIDPQINEKEELSRKDFDEWLSKLEIYSGNKRIEPHWYQKDAVFEG-L
126

: ** :*

SP|Q06683|IRC3_YEAST SIRQGTKRIGVS LATGGGKT VIFSNLINQLRQNYFKERQGNFK-SLILVHRRELALQATA
105
SP|P08956|T1RK_ECOLI AIVKGQQEILLAMATGTGKTRTAIAMMFRLIQSQ-----RFKRILFLVDRRSLGEQALG
512

SP|Q47281|T1RE_ECOLX AVSAGKNRILLV**MATGTGKT**YTAFQIIWRLWKAK-----NKKRILFLA**DRNILVD**QTKR
235
SP|Q07736|T1RA_ECOLX AVSNGQNRVLLV**MATGTGKT**YTAFQIIWRLWKS-----NKKRILFLA**DRNILVD**QTKN
237
SP|P20703|UVSW_BPT4 --V--NRRRILN**LPTSAGKS**LIQALLARYYLENY-----EGKILIIIV**PTTALTT**QMAD
175

. . : : * . ** : : : * : : * *

SP|Q06683|IRC3_YEAST T--LKKIFPDLKVHIEMGYDC-----DIEDSDVIVASVQTL**IRRL**-----HK
146
SP|P08956|T1RK_ECOLI A-----F--EDTRINGDTFNSIFDIKGLTDKFPEDSTKIHVATVQSL**VKRT**--LQSDPE
562
SP|Q47281|T1RE_ECOLX N--DFQPFGNAMTKVTGRTIDPAY-----EVHLALYQAI**TGPE**EHQKAYKQ
279
SP|Q07736|T1RA_ECOLX N--DFQPFGTAMTKVSGRTIDPAY-----EIHLYALYQAI**TGPE**EDQKAFKQ
281
SP|P20703|UVSW_BPT4 DFVDYRLFHAMIKKIGGGASK-----DDK-YKNDAPVVVGTWQTV**VKQP**KE-----
221

* : . : : * : :

SP|Q06683|IRC3_YEAST YDTNSVNLIII**DEAHHSVA**-----NSYRSILDHFKASTAETKIPVI
187
SP|P08956|T1RK_ECOLI MPVARYDCIVV**DEAHRGYILDKEQTEGELQFRSQLDYVSAYRRILDHFDA**-VK-----I
615
SP|Q47281|T1RE_ECOLX VAPDFFDLIVI**DECHRG**SASED-----SAWREILEYFGSATQ-----V
317
SP|Q07736|T1RA_ECOLX VAPDFFDLIVI**DECHRG**SASED-----SAWREILDYFSSATQ-----I
319
SP|P20703|UVSW_BPT4 -WFSQFGMMMN**DECH**LATGKSI-----SSIISGLNNCM-----FKF
256

: : * . * . * : : .

SP|Q06683|IRC3_YEAST G**SAT**FE--RADKRALSMVMDKIVYHRGILEMIDDKWLCEAKFTSVKIEADLS-----
238
SP|P08956|T1RK_ECOLI AL**TAT**P-----ALHTVQIFGEPVYRYTYRTAVIDGFLIDQDPPIQIITRNAQEGVYLSK
669
SP|Q47281|T1RE_ECOLX GL**TAT**PK--ETEDVSNIDYFGEPVYTYSLKEGIEDGFLAPYKVVVRVDIDVD-VQGWRPVK
374
SP|Q07736|T1RA_ECOLX GL**TAT**PK--ETHEVSSTDYFGDPVYVYSLKEGIEDGFLAPYKVVVRVDIDVD-LQGWRPTK
376
SP|P20703|UVSW_BPT4 GL**SGS**LRDGKANIMQYVGMFGEIFKPVTTSKLMEDGQVTELKINSIFLRYPDE-FTTKLK
315

. : : : : : * : : .

SP|Q06683|IRC3_YEAST -----DVKSTADDFQLAPLSSLMNTKEINEVI---LKTYLHKKQEKSLKS
 280
 SP|P08956|T1RK_ECOLI GEQVERISPQGEVINDTLEDDQDFEVADFNRGLVIPAFNRAVCNELTNYLDP--TG-SQK
 726
 SP|Q47281|T1RE_ECOLX G----QLDKYGEEI-----EDRIYNLKDFDRTLVIDERTMLVAQTITDYLKR--TNPMDK
 423
 SP|Q07736|T1RA_ECOLX G----QTDLNGEVI-----DDRIYNQKDFDRTMVIDERTELVAQTITDYLKR--TNPMDK
 425
 SP|P20703|UVSW_BPT4 GK-----TYQEEI-----KIITGLSKRNKWI AKL-AIKLAQ----KDEN
 349

. . : * ..

SP|Q06683|IRC3_YEAST **TLLFGVD**KAHVQSLHKL----FKD--NGINTDYVTS-----DTKQIERDNIIQKFKNG-E
 328
 SP|P08956|T1RK_ECOLI **TLVFCVT**NAHADMVVEELRAAFKKKYPQLEHDAIKITGDADKDARKVQTMITRFNKERL
 786
 SP|Q47281|T1RE_ECOLX **TIVFCND**IDHADMRHALVVLNP-EQVLKNEKYVMKITGDDDIGKAQLDNFIN--PKKAY
 480
 SP|Q07736|T1RA_ECOLX **TIVFCND**IDHAERMRRALVNLNP-EQVKKNDKYVMKITGDDEIGKAQLDNFIN--PKKPY
 482
 SP|P20703|UVSW_BPT4 **AFVMFKH**VSHGKAIFDLIKN-----EYDKVYYVSGEVDTETRNIMK--TLAENGKG
 398

:::: * . : : . : : . :

SP|Q06683|IRC3_YEAST **TEVLMNCGIF****TEGT**DMPNIDC**ILL**CRPTKSRSLLI**QMI**GRGLRLHHSKD--HCHIIDFIG
 386
 SP|P08956|T1RK_ECOLI **PNIVV**TVDLL**TTGVD**DIPSICN**IIVF**LRKVRSRILYE**QMKGRATR**LCPEVNKTSFKIFDCVD
 846
 SP|Q47281|T1RE_ECOLX **PVIATT**SELMT**TTGVD**AQTCKL**VVL**DQNIQSMTKFK**QIIGRGTRI**NEKHGKLWFTILDFKK
 540
 SP|Q07736|T1RA_ECOLX **PVIATT**SELMT**TTGVD**AKTCKL**VVL**DQNIQSMTKFK**QIIGRGTRI**IDERYGKLWFTILDFKK
 542
 SP|P20703|UVSW_BPT4 **IIIVASYGVF****STGIS**VKNLHH**VVL**AHGVSKIIVL**QTIGRVL**RKHGSKT--IATVWDLID
 456

: . ::: * . . ::: : : * * * * : *

SP|Q06683|IRC3_YEAST ASSVGVVSAPTLLGIRSDDIEFDDATVEDLKAIQGEIIAKQQKIDERLRALFQTDEA-AM
 445
 SP|P08956|T1RK_ECOLI IYST--LES--VDTMRPVVVR----PKVELQTLVNEITDSETY-----KITEADGR-SF
 891
 SP|Q47281|T1RE_ECOLX ATEL--FADPRFDGLPE-----KVLVVKPGDISDKDSDFNEQLDAENNADGG-DN
 587
 SP|Q07736|T1RA_ECOLX ATEL--FADERFDGIPE-----KVMDDTPEDIADPESDFEELKEEISEHDEE-QV
 589
 SP|P20703|UVSW_BPT4 SAGVKPKSANT----KKKYVHLN-----YLLKHGIDRIQRYADEKFNVMKTVNLISF
 505

* : :

SP|Q06683|IRC3_YEAST ENVTERNSVADWIHSANSVDLTLCSFDSFRNFTQSNNSYPSGKEFDEASEAVKEMELLMN
505
SP|P08956|T1RK_ECOLI AEHSHEQLVAKLQ----R-IIGLATFN-----RDRSE-TIDKQVRRLELCLQ
932
SP|Q47281|T1RE_ECOLX DASEAREDVADYQVNRDK-QAGNGEFH-----DDDEN-----KVRK-----
622
SP|Q07736|T1RA_ECOLX TGV-DEPPAPPYQVTD---TDDVGPLP-----EEDEK-----KIRK-----
621
SP|P20703|UVSW_BPT4 GPL-EKKMLLEFKQ-----FLYEASIDEFMG-----
530

. :

SP|Q06683|IRC3_YEAST SQYPWVKFASNAWGLPLKGNHLRIYKEKSEDK--LSMVYHLKMYRQLPCFIT-----
556
SP|P08956|T1RK_ECOLI DA-AGVNFNGFASRLREKGP-----HWSAEVFNKLPGFARLEKLT
973
SP|Q47281|T1RE_ECOLX -----FYVNGVDVKV-----
632
SP|Q07736|T1RA_ECOLX -----FHVNGVAVGV-----
631
SP|P20703|UVSW_BPT4 -----KIASCQTLEGLEEEAAYYKRVKETELKDTDDISVRDALAG-----
571

SP|Q06683|IRC3_YEAST -----NKYA
560
SP|P08956|T1RK_ECOLI DINNLNDAPIFLDIDDEVSVKSLYGDYDTPQDFLEAFDSLVRSPNAQPALQAVINRPR
1033
SP|Q47281|T1RE_ECOLX ----LAKRVQYYDSGKLV--TESF-----Q
652
SP|Q07736|T1RA_ECOLX ----IAQRVQYYDADGKLV--TESF-----K
651
SP|P20703|UVSW_BPT4 -----KRAELEDSDDEVE---ESF-----
587

SP|Q06683|IRC3_YEAST DYVPKSIKIDANLWNVMSKVEKIINTLNSDLEGQTMQYQAISSKYSKWRQTVPTS-----
615
SP|P08956|T1RK_ECOLI DLTRKGLVELQEFDR-----QHFEESLRKAWKETRNEDIA---
1070
SP|Q47281|T1RE_ECOLX DYTRKTMLKDSEYASL-----DSFVRKWQDAPRKQVIIEE
687
SP|Q07736|T1RA_ECOLX DYTRKTLLK--EYASL-----DDFTRKWQDADRKEAIIHE
684

SP|P20703|UVSW_BPT4 -----

SP|Q06683|IRC3_YEAST -KQRDFVFRKLLKKVYGESSKDFIRLSLDDVTTYVNTKMT-----KGD-----ASN
659

SP|P08956|T1RK_ECOLI ---ARLIGHIRRAAVGDALKPFEERVDH---ALT-----RI-----KGENE---WSSEQ
1110

SP|Q47281|T1RE_ECOLX LEQLGILWDVLAEEVKGKDLDPFDLLCHV---VYGQPPLTRQERVANVRKRNYFTKYAEP
744

SP|Q07736|T1RA_ECOLX LEQQGIIWEVLAEEVKGKDLDPFDMLCHV---VYGQPPLTRKERAENVRKRNYFTKYSEAA
741

SP|P20703|UVSW_BPT4 -----

SP|Q06683|IRC3_YEAST LIFASSLAPVYPLKSLLRIL-----EYQKRRSF---IK-----
689

SP|P08956|T1RK_ECOLI LSWLDRLAQALKEK---VVLDDVFKTGNFHRRGGKAM-LQRTFDDN--LDLTLGKFSDY
1164

SP|Q47281|T1RE_ECOLX QQVLNLLDKYADEGVQEIEDVQVLKLPFDLGRPIEIIKTRFGDKKAYEQAVNELENE
804

SP|Q07736|T1RA_ECOLX QAVLDNLLDKYADAGVQEIESIQVLKLPFDSMGTLPETIKTGFGRNGYNQALSELENE
801

SP|P20703|UVSW_BPT4 -----

SP|Q06683|IRC3_YEAST -----

SP|P08956|T1RK_ECOLI IWDELA--- 1170

SP|Q47281|T1RE_ECOLX IYQLPPRSA 813

SP|Q07736|T1RA_ECOLX IYQLPPRSA 810

SP|P20703|UVSW_BPT4 -----

LISA 2. Fülogeneesipuu tegemisel kasutatud valgud

Helikaasi andmebaasi kood, nimi ja organism järjestuse pikkus	Funktsioon	Allikas
Q06683 IRC3 <i>S. cerevisiae</i> 1-689	Mitokondriaalse DNA metabolismis osalev helikaas, mis suudab harukohti liigutada mööda DNA ahelat.	Sedman <i>et al.</i> , 2014 Gaidutšik <i>et al.</i> , 2016
P24230 RECG <i>E.coli/1-693</i>	Bakteriaalne helikaas, mis suudab lahti harutada R- ja D-linge ning Holliday struktuure. RecG liigutab mööda ahelat edasi harukohti.	Loyd ja Sharples, 1993 Fukuoh <i>et al.</i> , 1997 McGlynn <i>et al.</i> , 1997 Whitby ja Lloyd, 1998 Lloyd ja Rudolph, 2016
P30958 MFD <i>E.coli/1-1148</i>	Omab ATP sidumise ja hüdrolyüüsi võimet ning suudab seonduda RNA polümeraasiga. Selle tõttu suunab DNA parandamise protsesse.	Selby <i>et al.</i> , 1991 Selby ja Sancar, 1995
P17888 PRIA <i>E.coli/1-732</i>	Osaleb seiskunud replikatsioonikahvli lahti harutamises. Suudab seonduda haruliste D-linge struktuuridega.	Masai <i>et al.</i> , 1999 Jones ja Nakai, 2001
P54132 BLM <i>H. sapiens</i> 1-1417	Tegemist on helikaasiga, mis suudab harutada lahti DNA-d ja osaleb kaheahelaliste katkete parandamisega seotud protsessis	Karow <i>et al.</i> , 1997 Langland <i>et al.</i> , 2002
P46063 RECQ1 <i>H. sapiens</i> 1-649	Tegeleb harukohtade liigutamisega mööda DNA ahelat ja suudab lõhkuda D-linge.	Bugreev <i>et al.</i> , 2008 Pike <i>et al.</i> , 2015
O94761 RECQ4	DNA-sõltuv ATPaas, mis omab üheaahelalise DNA ahelate kokku	Macris <i>et al.</i> , 2006

<i>H. sapiens</i> 1-1208	sulatamise aktiivsust.	
O94762 RECQ5 <i>H. sapiens</i> 1-991	Helikaas osaleb homoloogilises rekombinatsioonis ja mõjutab kaheaheelaliste katkete parandamist.	Paliwal <i>et al.</i> , 2014
Q14191 WRN <i>H. sapiens</i> 1-1432	WRN geen kodeerib nii helikaasi kui eksonukleaasi. Valk seondub Holliday ja replikatsioonikahvlite struktuuridele. Helikaas omab harukohtade liigutamise võimet DNA järjestusel.	Compton <i>et al.</i> , 2008 Opresko <i>et al.</i> , 2009
Q05549 HRQ1 <i>S. cerevisiae</i> 1-1077	<i>S. cerevisiae</i> helikaas, mis osaleb lahti harutamise ja kokku panemise protsessides. Harutab lahti kahvli struktuure ja vajab helikaasseks aktiivsuseks pikka 3' otsaga substraati.	Kwon <i>et al.</i> , 2012
P35187 SGS1 <i>S. cerevisiae</i> 1-1447	RecQ perekonna DNA helikaas, mis harutab efektiivselt lahti kahvlikujulisi substraate.	Bennet <i>et al.</i> , 1998
P15043 RECQ <i>E.coli</i>/1-609	Harutab lahti ja seondub kahvlikujuliste struktuuridega. Osaleb peatunud replikatsioonikahvli aktiveerimises.	Hishida <i>et al.</i> , 2004
Q14527 HLTF <i>H. sapiens</i> 1-1009	Tegemist on Rad5 homoloogiga inimeses, mis suudab katalüüsida D-aasa tekkimist. Samuti suudab valk eemaldada peatunud replikatsioonikahvlilt valke ja sellega seostuda.	Achar <i>et al.</i> , 2011 Burkovics <i>et al.</i> , 2014
Q92698 RAD54	Liigutab kolme- ja neljaheelalisi harukohti mööda DNA ahelat.	Mazina <i>et al.</i> , 2012

<i>H. sapiens</i> 1-747		
Q9Y620 RA54B <i>H. sapiens</i> 1-910	Kaheaheelalisest DNA-st sõltuv ATPaas, mis on Rad54 homoloog. Osaleb rekombinatsiooni protsessides.	Miyagawa <i>et al.</i> , 2002 Tanaka <i>et al.</i> , 2002
Q9NZC9 SMAL1 <i>H. sapiens</i> 1-954	Tegeleb DNA kahjustuste vältimisega interakteerudes peatunud replikatsioonikahvliga	Bansbach <i>et al.</i> , 2009
P32863 RAD54 <i>S. cerevisiae</i> 1-898	Osaleb rekombinatsioonilises kaheaheelaliste katkete parandamises.	Petukhova <i>et al.</i> , 1998 Clever <i>et al.</i> , 1997
P38086 RDH54 <i>S. cerevisiae</i> 1-958	Tegeleb homoloogilise rekombinatsiooniga, DNA parandamisega ja on seotud rekombinatsiooniliste kaheaheelaliste katkete parandamisega	Klein, 1997 Chi <i>et al.</i> , 2006
P32849 RAD5 <i>S. cerevisiae</i>/1- 1169	Helikaas suudab ilma ATP abita moodustada D-aasasid. On oluline korrektsetes kaheaheelaliste DNA katkete parandamises.	Burkovics <i>et al.</i> , 2014 Ahne <i>et al.</i> , 1997
Q07736 T1RA <i>E.coli</i>/1-810	EcoAI R alamühik. Endonukleaas, mille R alamühik omab helikaasi struktuuri motiive, ATPaasset ja translaokatsiooni võimet.	Janscak <i>et al.</i> , 1999
Q47281 T1RE <i>E.coli</i>/1-813	EcoEI R alamühik, kuulub klass I restriктаaside hulka ja omab endonukleaasset aktiivsust.	Bickle ja Krüger, 1993
P08956 T1RK	EcoKI R alamühik. Tegemist on endonukleaasiga, mille R domään	Davies <i>et al.</i> , 1999

<i>E.coli</i>/1-1170	omab helikaasi struktuuri motiive, ATP-aasset aktiivsust ja translokatsiooni võimet.	
P0A812 RUVB <i>E.coli</i>/1-336	Suudab liigutada hargnemiskohti mööda DNA ahelat. Hargnemiskohtade liigutamine on efektiivsem RuvB-RuvA kompleksi puhul.	Muller <i>et al.</i> 1993
P20703 UVSW bakteriofaag T4 1-587	Bakteriofaag T4 helikaas, mis suudab lahti harutada R-aasasid ja kahvlikujulisi DNA substraate. Suudab liigutada harukohti mööda DNA-d.	Carles-Kinch <i>et al.</i> , 1997 Nelson ja Benkovic, 2007 Webb <i>et al.</i> , 2007

Lisa 3.

Gaidutšik I., Sedman, T., Sillamaa, S., Sedman, J. (2016). Irc3 is a mitochondrial DNA branch migration enzyme. *Sci. Rep.* 6: 26414.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Sirelin Sillamaa

(sünnikuupäev: 05.12.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„ Mitokondriaalse DNA helikaasi Irc3 funktsionaalne analüüs”

mille juhendaja on professor Juhan 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 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.16