

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ÜLDISE JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Alex Ajangu

**Mitokondriaalse DNA helikaasi Hmi1 III motiivi punktmutatsioonide mõju Hmi1 valgu
suhtelisele kogusele pärmis**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendaja Vlad-Julian Piljukov

TARTU 2021

Mitokondriaalse DNA helikaasi Hmi1 III motiivi punktmutatsioonide mõju Hmi1 valgu suhtelisele kogusele pärmis

Bakalaureuse töö

Alex Ajangu

Pärmi mitokondriaalse genoomi ülalpidamisel on olulisel kohal DNA helikaasid, mis osalevad nii DNA replikatsioonis, rekombinatsioonis kui ka reparatsioonis. Hmi1 on SF1 UvrD/Rep-sarnaste perekonda kuuluv pärmi mitokondriaale DNA helikaas, mis on vajalik *S. cerevisiae* mitokondriaalse genoomi terviklikkuse säilitamiseks. Varasemalt on nii selle kui ka homologiliste valkude puhul mutageneetiliste katsetega näidatud erinevate motiivide tööd nii helikaaside struktuurilise stabiilsuse kui ka funktsionaalsuse tagamisel. Selle töö eesmärk oli uurida Hmi1 valgu seitsme erineva III motiivi mutandi suhtelist kogust pärmis.

Märksõnad: UvrD/Rep-sarnaste perekond, Hmi1, motiiv III, aminohapete vahetus, Western blot

CERCS kood: P310 (Proteiinid, ensüümid)

The effects of point mutations in mitochondrial DNA helicase Hmi1 III motif on the relative amount of Hmi1 protein in yeast

Bachelor's thesis

Alex Ajangu

DNA helicases, which are involved in DNA replication, recombination and repair, play an important role in the maintenance of the yeast mitochondrial genome. Hmi1 is a yeast mitochondrial DNA helicase belonging to the SF1 UvrD/Rep-like family that is required to maintain the integrity of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome. Previously, experiments with both this and homologous proteins have shown the importance of different motifs in both the structural stability and functionality of the helicases. The aim of this study was to investigate the effect of seven different mutations in the III motif of the Hmi1 on the relative amount of Hmi1 protein in yeast.

Keywords: UvrD/Rep-like family, Hmi1, III motif, amino acid changes, Western blot

CERCS code: P310 (Proteins, enzymes)

SISSEJUHATUS

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Pagaripärm mudelorganismina	7
1.2. <i>S. cerevisiae</i> mitokondriaalse genoom ja selle ülalpidamine	7
1.3. Helikaaside üldiseloomustus	8
1.4. Helikaaside superperekond I	10
1.5. SF1 helikaaside motiivid	11
1.6. SF1 helikaaside ruumiline struktuur	13
1.7. Motiiv III tähtsus SF1A helikaasides	15
1.8. SF1 UvrD/Rep-sarnaste perekond	17
1.9. <i>S. cerevisiae</i> mitokondriaalne helikaas Hmi1	18
2. EKSPERIMENTAALOSA	20
2.2. Materjalid ja meetodid	21
2.2.2. Plasmiidid	21
2.2.4. Plasmiidide analüüs agaros geelil	24
2.2.5. <i>HMI1</i> fragmendi vahetus kahe plasmidi vahel restriksiooni meetodil	24
2.2.5. Lineaarsete DNA fragmentide puhastamine agarosgeelist	24
2.2.7. DNA ligeerimine	25
2.2.8. Plasmidse DNA transformatsioon kompetentsetesse bakterirakkudesse	25
2.2.9. Plasmidse DNA eraldamine bakterirakkudest	25
2.2.10. Konstruktide transformeerimine pärmliitiumatsetaadi meetodil	26
2.2.11. Pärmirakkude lüüs klaaskuulide meetodil	27
2.3. Tulemused	30
2.4. Arutelu	37
KOKKUVÕTE	40

SUMMARY	41
TÄNUAVALDUSED	42
KIRJANDUSE LOETELU	43
KASUTATUD VEEBIAADRESSID JA PROGRAMMID.....	51
LIHTLITSENTS	52

KASUTATUD LÜHENDID

nt – nukleotiid(i)

ORF – avatud lugemisraam

ssDNA – üheaheelaline DNA

dsDNA – kaheaheelaline DNA

mtDNA – mitokondriaalne DNA

wt – metsiktüüpi

HS – hüpersupressiivne

SF – superperekond

YPD – *yeast extract peptone dextrose* sööde

SC -Leu – *Synthetic Complete Media* sööde ilma leutsiinita

ddH₂O – kahekordselt destilleeritud vesi

rpm – pöördeid minutis

SISSEJUHATUS

Mitokonder on eukarüootseid rakke ATP-ga varustav kahemembraanne rakuorganell, mis omab poolautonoomset, tuumast eradi seisvat genoomi. Poolautonoomsus seisneb mitokondri vajaduses ka teiste valkude järele selle funktsioonide ja mtDNA ülalpidamiseks. Tähtsal kohal olevateks valkudeks on siin kohal DNA helikaasid, mis oma väga paljude erinevate funktsioonidega mängivad DNA metabolismi vaatenurgast olulist rolli nii replikatsioonil, rekombinatsioonil kui ka reparatsioonil, muutes nad lahutamatuks osaks selles protsessis.

Pärmi võime ellujääda ka ilma tervikliku mitokondriaalse genoomita võimaldab uurida erinevate mitokondriaalsete valkude, sealhulgas helikaaside tööd tervikliku mtDNA säilitamises. *S. cerevisiae*-s on seni kirjeldatud kolme erinevat, mitokondritesse lokaliseeruvat ning otseselt mtDNA metabolismis osalevat helikaasi - Pif1, Irc3 ja Hmi1, millest viimast ka käesolevas töös uuritakse. Hmi1 on superperekond 1 alla kuuluvasse UvrD/Rep-sarnaste perekonda kuuluv DNA helikaas, mis omab olulist rolli mtDNA terviklikkuse säilitamisel (Sedman *et al.*, 2000). Varasemalt on meie uurimisgruppi poolt selle helikaasi puhul näidatud, et ssDNA sidumises ja ATP-ga interakteerumises osalevate III motiivi aminohapete asendused mõjutavad oluliselt Hmi1 helikaasi, põhjustades pärmides mtDNA ebastabiilsust ja mõjutades selliselt nende respiratoorset aktiivsust.

Selle töö eesmärk oli uurida meie uurimisgrupi poolt tehtud Hmi1 valgu seitsme erineva III motiivi aminohappeliste vahetustega mutantide suhtelist valgu kogust pärmis. Homoloogilistes helikaasides on varasemalt nähtud, et aminohappelised asendused selles motiivis vähendasid kas ssDNA-ga seondumist, ATP hüdrolyüüsi ja/või dsDNA lahtiharutamise efektiivsust (Brosh ja Matson, 1996; Korolev *et al.*, 1997; Dillingham *et al.*, 1999; Velankar *et al.*, 1999; Lee ja Yang, 2006).

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Pagaripärm mudelorganismina

Pagaripärmist teeb hea mudelorganismi lisaks tema paljudele inimhaigustega seotud geeni homoloogidele ka selle võime elada nii fermenteeritavatel kui ka mitte fermenteeritavatel süsinikuallikatel (ülevaade Bassett *et al.*, 1996; ülevaade Tzagoloffi ja Dieckmann, 1990). Mitte fermenteeritavatel süsinikuallikatel tekivad pärmide puhul aga hingamisdefektsed mutandid, mis moodustavad metsiktüüpi rakkudest väiksemaid ning aeglasemalt kasvavaid kolooniaid, mis on tingitud glükolüüsi väiksemast energiatootlikusest ning võimetusest metaboliseerida glükoosi käärimise produkti, etanooli. Neid nimetatakse *petite* mutantideks ning eristatakse kahte tüüpi vastavalt mutatsioonide tekke kohale - nukleaarsed ja tsütoplasmaatilised *petite*-d – millest viimase puhul on mutatsioonid tekkinud mitokondriaalses genoomis. Ulatuslike mtDNA deletsioonidega tsütoplasmaatilisi *petite* mutante tähistatakse omakorda ρ^- , täielikult deleteerunud mtDNA-ga mutante ρ^0 (ülevaade Tzagoloff ja Dieckmann, 1990).

Normaalkasvu ja ka mittefermenteeritaval süsinikuallikal kasvavate pärmi tüvede kolooniaid nimetatakse tihti peale ka ρ^+ , mis viitab funktsionaalsele mitokondriaalsele genoomile (ülevaade Tzagoloff ja Dieckmann, 1990). Lisaks on nähtud, et ρ^+ ja erinevate ρ^- tüvede ristamisel tekkinud järglastel võib mtDNA terviklikkus erineda. Neutraalseteks *petite* mutantideks nimetatakse neid tüvesid, mis ρ^+ -ga ristades annab alati tervikliku mtDNA-ga järglasi, supressiivseteks aga neid, mis eelnimetatud ristamisel annavad ka ρ^- järglasi. Hüpersupressiivseteks loetakse mutante siis, kui nende ρ^+ -ga järglaste seas esineb üle 95% *petite* kolooniaid (ülevaade MacAlpine *et al.*, 2001).

1.2. *S. cerevisiae* mitokondriaalse genoom ja selle ülalpidamine

Mitokondrid on vaid eukarüootides esinevad, kahe membraaniga organellid, mis on hädavajalikud rakkudes energia tootmiseks. Mitokondrid on poolautonoomsed: nad omavad tuumast eraldiseisvat genoomi, millelt kodeeritakse vaid osasid mitokondri jaoks vajalikke valke ja transkriptsiooni produkte (ülevaade Westermann, 2014). *S. cerevisiae* (tüve FY1679) mitokondriaalne genoom on 85 kb (tuhande aluspaari) pikkune, geeni vaene ning sisaldab rohkelt korduvaid pikki AT ja lühemaid GC rikkaid, mitte kodeerivaid alasid (Foury *et al.*, 1998). Punguvates pärmides, nagu *S. cerevisiae*, kodeeritakse sellelt kaheksat elektron transportahelas osalevat valku, kolme rRNA-d ja 24 tRNA-d. Need kõik on vajalikud mitokondriaalsete

funktsioonide, sealhulgas oksüdatiivse fosforüülimise teel universaalsete energiarikaste molekulide, adenosiin trifosfaatide ehk ATP tootmiseks rakkudes (ülevaade Tzagoloff ja Myers, 1986).

S. cerevisiae mitokondriaalne genoom on kombinatsioon erineva pikkusega lineaarsetest, konkatemeersetest ning ka vähesel määral tsirkulaarsetest DNA molekulidest, mille ülalpidamiseks on vaja palju erinevaid ensüüme (Maleszka *et al.*, 1991; Sickmann *et al.*, 2003). *Petite* rakkude tekkimine võimaldab uurida tervikliku mitokondriaalse genoomi töö jaoks hädavajalikke geene ning seega ka erinevate valkude päritolu ja funktsioone mitokondriaalse DNA säilitamise võtmes. On teada, et üle 750 erineva, mitokondrist leitava valgu seas tegeleb energia tootmisega vaid ligikaudu 14%, mtDNA ülalpidamisega aga ligi 25%, mis viitab selle keerukusele ja olulisusele (Sickmann *et al.*, 2003). Neist valkudest on valdav enamus aga pärit pärmi tuuma genoomist. Mitokondriaalse DNA ülalpidamise juures on vaja paljud erinevad valgud, nende hulgas DNA helikaasid nagu Pif1 ning ka varasemalt meie uurimisgrupi poolt avastatud Irc3 ja Hmi1 (Sedman *et al.*, 2000; Merz ja Westermann, 2009; Sedman *et al.*, 2014).

1.3. Helikaaside üldisloomustus

Helikaasid on väga mitmekesine nukleiinhapest-sõltuv mootorvalkude rühm, mida leidub nii viirustes, arhedes, bakterites kui ka eukarüootides (Caruthers ja McKay, 2002). Nende peamiseks ülesandeks on NTP (peamiselt ATP) hüdrolüüsist saadud energia abil lahutada DNA, RNA, DNA·RNA hübriidseid kaksikahelaid või ka sulatada üksikahelaid kokku kaksikheeliksiiteks (Singleton *et al.*, 2007; Gorbalenya ja Koonin, 1993; Wu, 2012). Täheldatud on ka mitmeid teisi funktsioone, nende hulgas teiste valkude eemaldamist nukleiinhapetelt, mida on näidatud nii replikatsioonikahvli moodustumisel, Holliday ühenduste liikumisel kui ka kromatiini struktuuride remodelleerimisel (O'Donnell ja Li, 2018; Yamada *et al.*, 2004; Bizard ja Hickson, 2014; Clapier *et al.*, 2017). Nendel ning paljudel teistel viisidel osalevad helikaasid pea kõigis rakus toimuvates nukleiinhapetega seotud reaktsioonides, sealhulgas replikatsioonis, rekombinatsioonis, reparatsioonis, transkriptsioonis, RNA maturatsioonis ja splaisimises, juuksenõelastruktuuride lahutamises, ribosoomide sünteesis, tuumast välja transportimise protsessides ja translatsioonis (Cugusi *et al.*, 2016; Singleton *et al.*, 2007).

Üldised helikaaside süstematiseerimiseks kasutatavad tunnused on järgmised:

Substraat. Helikaase saab laiemalt jaotada kahte rühma, DNA ja RNA helikaasid, vastavalt nende ensümaatilise aktiivsuse tekkele kindla substraadi olemasolul (Gorbalenya ja Koonin, 1993). Esmakordselt kirjeldati helikaase 1976. aastal, mil *Escherichia coli* bakterist isoleeriti DNAs sõltuv ATPaas, mida iseloomustati kui “DNA-d lahtiharutavat ensüümi” (Abdel-Monem *et al.*, 1976). Peatselt pärast seda avastati helikaase ka eukarüootsetes organismides ning viirustes (Hotta ja Stern, 1978; Venkatesan *et al.*, 1982).

Substraadiga seundumine. *In vitro* katsetega on näidatud, et helikaasid võivad translokeeruda nii ühe- kui ka kaheahelalisel oligonukleotiidsel substraadil. Helikaase, mis liiguvad ainult mööda ssDNA-d nimetatakse α tüüpi helikaasideks. Samuti on olemas ka helikaasid, mis jälgivad translokatsioonil mõlemat ahelat ning neid nimetatakse β tüüpi helikaasideks (Singleton *et al.*, 2007).

Polaarsus. Helikaase, mille translokatsioon toimub 3'–5' suunal, nimetatakse A-tüüpi helikaasideks ning 5'–3' suunal translokeeruvaid B-tüüpi helikaasideks (Singleton *et al.*, 2007). Ka mõlemas suunas translokeerumine ehk bipolaarsus on helikaaside seas levinud, näiteks teeb seda *B. anthracis*-e PcrA helikaas (Naqvi *et al.*, 2003).

Nukleiinhapete lahtiharutamise mehhanism. Kuigi võib öelda, et kõik ensüümid, mis kasutavad NTP-d reaktsioonide läbiviimiseks on aktiivsed, saab helikaase jagada aktiivseteks ja passiivseteks nende lahtiharutamise mehhanismi alusel. Helikaasid, mis harutavad ise ahelaid translokatsiooni jooksul lahti, nimetatakse aktiivseteks helikaasideks. Nende vastandiks on aga passiivsed helikaasid, mis ei lahuta nukleiinhappeid ise, vaid ootavad kaksikahelate termilist lahutumist ning liiguvad lahutunud ahela osa vahele, takistamaks nende kokkususulandumist (Lohman ja Bjornson, 1996).

Protsessiivsus. Helikaaside keskmise nukleiinhappe aluspaaride lahtiharutamise koguse alusel (ühe NTP substraadi hüdrolüüsi kohta) jagatakse helikaase protsessiivseteks ja distributiivseteks. Protsessiivsed helikaasid võivad järjest lahti harutada pikki nukleiinhappe ahelaid. Vastandina protsessiivsetele harutavad distributiivsed helikaasid lahti lühikesiprodukte. Kuigi enamus helikaase on mingil määral suuremaks protsessiivsuseks võimelised, on see enamasti reguleeritud teiste ensüümide interaktsioonidega (Singleton *et al.*, 2007).

Helikaasid osalevad pea kõigis DNA ja RNA metabolismi protsessides ning seetõttu on nende uurimine äärmiselt oluline. Nende valkude uurimisel kasutatakse tihti kohtspetsiifilisi mutatsioone, mõistmaks paremini nende mehhanisme ja biokeemilisi omadusi. Defektid helikaaside funktsionaalsetes domäänides ning regulatsioonis võivad põhjustada mitmeid häireid

organismi tasandil (ülevaade Gorbalenya ja Koonin, 1993). On leitud, et mutatsioonid helikaaside geenides võivad inimestes põhjustada mitmeid haigusi, sealhulgas immunpuudulikkust, vaimset alaarengut, enneaegset vananemist ja vähki (ülevaade Modrich, 1994; Brosh ja Bohr, 2007, Andressoo *et al.*, 2005). Näiteks võivad mutatsioonid SF1 perekonna Pif1 helikaasis põhjustada rinnavähi eelsoodumust ning mutatsioonid WRN helikaasis Wernerisündroomi (Chen ja Oshima, 2002; Chisholm *et al.*, 2012).

1.4. Helikaaside superperekond I

Helikaaside põhitunnuseks on nende kõrgelt konserveerunud, lühikesed aminohappelised järjestused – „helikaaside motiivid“, mille põhjal saab neid mootorvalke jagada superperekondadesse (*Superfamilies* – SF) (Gorbalenya ja Koonin, 1993). Praeguseks on kokku avastatud 6 erinevat superperekonda, SF1-6, millest suurimad ja evolutsiooniliselt lähimad on superperekonnad 1 ja 2 (Gorbalenya *et al.*, 1989; Gorbalenya ja Koonin, 1993; Singleton *et al.*, 2007). Superperekonna 1 ja 2 helikaasid on struktuuri poolest mono- või dimeersed helikaasid (Singleton *et al.*, 2007). Neil mõlemal on ka kindlaks tehtud seitse konserveerunud motiivi I, Ia, II-VI, mille aminohappelised järjestused ja eeldatavad paiknemised valgu tertsiaarstruktuuris on üldiselt väga sarnased (Gorbalenya *et al.*, 1989, Singleton *et al.*, 2007). Superperekonnad 3-6 on kahe eelnevaga võrreldes oluliselt väiksema arvu esindajatega, on struktuuri poolest multimeersed ning omavad ka vähem konserveerunud motiive (Singleton *et al.*, 2007).

SF1 ja SF2 helikaasid on paljuski sarnased, seda nii oma mõningatelt funktsioonidelt, ehituselt kui ka mitmetelt motiividelt, millest seitse on mõlemal konserveerunud (Gorbalenya *et al.*, 1989). Suurimat järjestuste konserveerumist on mõlema superperekonna puhul täheldatud motiivides I, Ia, II, V ja VI, mis kõik asuvad relatiivselt sarnastel positsioonidel ja täidavad samu ülesandeid helikaaside töös (Tabel 1). Põhilised erinevused konserveerunud motiivides esinevad aga motiivides III ja IV (Korolev *et al.*, 1998).

SF1 on üks suurimaid helikaaside superperekondi kõigi kuue (SF1-6) seas. Selle liikmed on olemas nii viirustes, pro- kui ka eukarüootides ning nad osalevad pea kõigis DNA ja RNA metabolismi radade sammudes, tihti peale rohkemate ülesannetega, kui ainult nukleiinhapete oligomeeride lahtiharutamine (ülevaade Raney *et al.*, 2013). SF1-s on esindatud ainult üksikahela spetsiifilised α helikaasid ning leidub nii 3' – 5' suunal (SF1A helikaasid) kui ka 5' – 3' suunal translokeeruvaid (SF1B helikaasid) helikaase. Kõigi superperekondade siseselt eristatakse ka alamperekondi ning SF1-te kuulub neid kolm: Rep/UrvD, Pif1/RecD ja Upf1-sarnased. Alamperekondadesse jagatakse helikaasid nende motiivide homoloogia ja paiknemiste

sarnasuste põhjal, kusjuures nime saab alamperekond selle esimese või esimeste avastatud liikmete järgi, millega teisi helikaase võrreldakse sarnasuste leidmiseks (Singleton *et al.*, 2007; Fairman-Williams *et al.*, 2010). Selles töös käsitletav Hmi1 valk kuulub SF1 UvrD/Rep-sarnaste alamperekonda ning kuulub A-tüüpi helikaaside hulka (Sedman *et al.*, 2000; Kuusk *et al.*, 2005; Sedman *et al.*, 2005).

Tabel 1. Tabelis on välja toodud SF1 ja SF2 seitsme konserveerunud motiivi järjestused (Fairman-Williams *et al.*, 2010 andmete põhjal)

SF1 helikaasid	Motiiv	SF2 helikaasid
(G/A)xxGxGKT	I	GxGKT
(T/S)xxA	Ia	PxxL
DExx	II	DEx(H/D)
GDxxQLxx	III	(S/T)(A/G)T
G(V/I)xxPYxx(Q/N)	IV	(I/V)F
(T/S)Y(H/D)	V	(L/V)xTxx(G/A)
VA(L/Y)(T/S)RA(K/R)	VI	(Q/H)(R/A)x(G/D)R(A/T)(G/H)R

Mõlemal superperekonnal on lisaks eelpool mainitule avastatud veel mitmeid, vaid SF siseselt konserveerunud motiive, mõlemas perekonnas vähemalt kuus. Erinevates perekondades võivad lisa motiivid varieeruda nii järjestustelt kui ka funkstioonidelt. Nendeks motiivideks SF1 helikaaside puhul on Q, Ib, Ic, IIIa, Va ja Vb (Fairman-Williams *et al.*, 2010).

1.5. SF1 helikaaside motiivid

Aminohapete järjestuste kõrge konserveeritus helikaasi motiivide seas näitab, et need piirkonnad omavad funktsionaalset tähtsust ning osalevad otseselt helikaaside töös. Esimesed avastatud motiivid I ja II publitseeriti Walker *et al.* 1982. aastal ilmunud töös, kus neid kirjeldati ATP sünteesis osalevate, ATP-d siduvates ensüümides konserveerunud järjestustena. Kuna mõlemad motiivid saavad adeniini siduda, leiti, et need on kohad, mille kaudu substraat ensüümidega seondub. Need järjestused on tuntud ka kui Walker A ka B motiividena ning nad on

konserveerunud erinevates ATP-d siduvates ensüümides (Walker *et al.*, 1982; ülevaade Hall ja Matson, 1999).

Motiiv I. Nagu eelnevalt mainitud, esineb see motiiv paljudes nukleotiide siduvates ensüümides ja moodustab fosfaati siduva silmuse (*ing.* “*P-loop*”). Kõrgelt konserveerunud järjestikku paiknevad aminohapped glütsiin, lüsiin ja treoniin on vajalikud valgu interakteerumiseks kofaktori Mg^{2+} ja ATP fosfaatidega (Walker *et al.*, 1982). Lisaks aitab glütsiin säilitada ka painduva silmuse konformatsiooni, mis on kõrgemat järku struktuuris sellele motiivile omane (Gorbalenya *et al.*, 1989).

Motiiv Ia. Motiiv Ia osaleb üheaahelalise DNA sidumises ja energia ülekandmises ATP seondumiskohast DNA-d siduvasse kohta (Korolev *et al.*, 1997; Velankar *et al.*, 1999). Motiiv Ia asub kõrgemat järku struktuuris ATP-d siduvas vaos ning selle aminohapete proliini, treoniini/seriini ja aspargiini jäägid loovad otseselt kontakte ssDNA fosfaatselgrooga (Korolev *et al.*, 1997). Katsetes UvrD helikaasiga leiti ka, et lisaks teiste motiivide konserveerunud arginiinidega interakteerub Ia motiiv ATP γ -fosfaadiga (Lee ja Yang, 2006). Koostöös motiiv III ja teiste motiividega osaleb Ia otseselt helikaasi translokatsiooni mehhanismismis (Velankar *et al.*, 1999; Saikrishnan *et al.*, 2009).

Motiiv II. See motiiv vastutab primaarselt ATP hüdroolüüsi eest (A E Gorbalenya *et al.*, 1989; Bird *et al.*, 1998). Selle motiivi kõrgelt konserveerunud Aspargiinhappe (D) jäägid kordineerivad ATP-ga seotud kofaktorit Mg^{2+} ja glutamiinhappe jäägid (E) aktiveerivad veemolekuli ATP hüdroolüüsi reaktsiooniks (Pause ja Sonenberg, 1992; Story ja Steitz, 1992). On leitud, et nende jääkide mutatsioon vähendab helikaaside ATP hüdroolüüsi aktiivsust ja helikaaside DNA kaksikheeliksi lahtiharutamise kiirust (Brosh ja Matson, 1995; Weng *et al.*, 1996).

Motiiv III. See motiiv osaleb ssDNA sidumises ja ATP-ga interakteerumises ning on selliselt sillaks translokatsiooni ja helikaasse aktiivsuse vahel (Dillingham *et al.*, 1999b). SF1A helikaasides on täheldatud otsest ssDNA-ga seondumist motiiv III konserveerunud aromaatsse trüptofaani (W) ja türosiini (T) ning elektropositiivse arginiini (R) jääkide vahendusel (Velankar *et al.*, 1999; Korolev *et al.*, 1997; Lee ja Yang, 2006). Lisaks leiti, et *E. coli* UvrD helikaasi III motiivi glutamiin (Q) osaleb ka vee molekuli positsioneerimises ATP hüdroolüüsiks ning selle aminohappe vahetus PcrA helikaasis tõi kaasa vähenenud ATPaase aktiivsuse. Nende aminohapete tööd kinnitab lisaks ka UvrD kristallstruktuur, näidates, et need aminohapped asuvad üheaahelaise DNA sidumise kanalis (Lee ja Yang, 2006). Osad motiiv III aminohapped paiknevad ka kõrgemat järku struktuuris lähestikku motiiv II aspartaate ja glutamaate sisaldava linguga (Korolev *et al.*, 1997).

Motiiv IV. Selle motiivi konsensusjärjestus varieerub SF1 siseselt väga (Fairman-Williams *et al.*, 2010). Motiiv IV konserveerunud arginiin annab ADP adeniinalusele virnastumisplatvormi (*ing. stacking platform*), samuti interakteerub see otseselt γ -fosfaadiga, mis viitab sellele, et see võib samuti olla otseselt seotud ATP hüdroolüüsiga (Korolev *et al.*, 1997, 1998; Velankar *et al.*, 1999; ülevaade Hall ja Matson, 1999).

Motiiv V. See motiiv interakteerub ssDNA fosfaat selgrooga. Ka selle motiivi aminohappejäägid asuvad lähestikku motiiv II aspartaate ja glutamaate sisaldava linguga. Katsetes SF1 UL5 helikaasiga leiti, et motiivi V konserveerunud glütsiini mutantidel oli vähenenud afiinsus üheaheelalise DNA suhtes ning et ATP hüdroolüüsi kiirus vähenes. Lisaks loovad konserveerunud treoniini ja histidiini jäägid kontakte ssDNA-ga. (Graves-Woodward ja Weller, 1996; Korolev *et al.*, 1997; ülevaade Hall ja Matson, 1999).

Motiiv VI. *E. coli* Rep helikaasiga tehtud katsetest selgus, et selle motiivi aminohappete jäägid (glutamiin, arginiin, valiin) puutuvad kokku jääkidega motiivist III ja IV (Korolev *et al.*, 1997). Lisaks oma lähedasele asukohale ATP ja ssDNA seoselistele motiividele helikaaside kõrgemat järku struktuuris ka teistes SF1 helikaasides, leitakse, et see motiiv vahendab ATP-sõltuvaid konformatsioonilisi muutusi ssDNA-ga seondumise piirkonnas, mis on hädavajalikud helikaaside translokatsiooni mehhanismis (Korolev *et al.*, 1997; Velankar *et al.*, 1999). Paljud teised katsed on ka näidanud, et kohtspetsiifilised mutatsioonid VI motiivis on põhjustanud helikaasidel nukleiinhappega seondumise ja ATP hüdroolüüsi defekte. *E. coli* UvrD motiiv VI treoniini ja arginiini mutantidel oli vähenenud ssDNA-ga seondumine, ATP hüdroolüüsi kiirus ja ligandi põhjustatud konformatsioonilised muutused (Hall *et al.*, 1998). UL5 helikaasi motiivi VI mutantidel täheldati valgu ATPaasete ja helikaasete aktiivsuste lahtihaakumist (Graves-Woodward *et al.*, 1997).

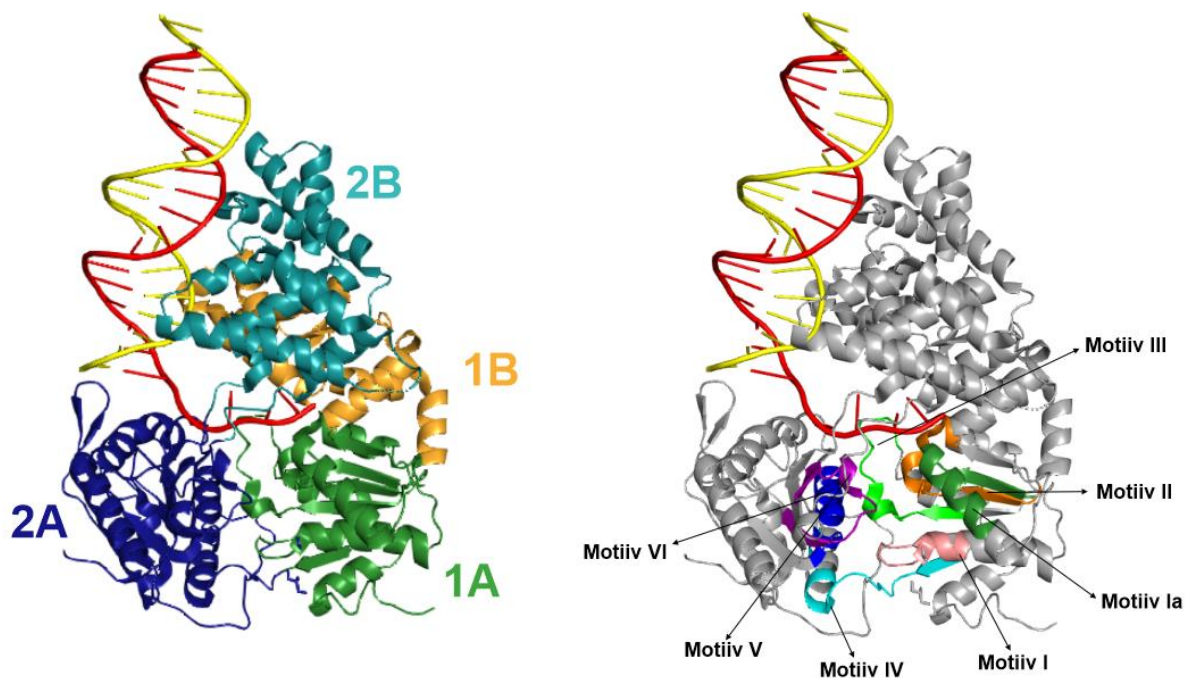
1.6. SF1 helikaaside ruumiline struktuur

Kõiki helikaase ühendavaks lüliks on nende kõrgemat järku struktuurile omased tuumik domäänid, kuhu kõik helikaasi motiivid nii primaarjärjestuses kui ka ruumiliselt kuuluvad. Seetõttu nimetatakse neid domääne helikaasi domäänideks. Koos moodustavad neis domäänides asuvad helikaasi motiivid omavahelise koostööga ATP-d hüdroolüüsiva “mootori”, mis seondub ssDNA-ga ja tagab translokatsiooniks ja DNA lahtiharutamiseks vajaliku energia (ülevaade Hall ja Matson, 1999; Singleton *et al.*, 2007).

ATP seondumine toimub helikaasi motiivide abil 1A ja 2A domäänide vahelises vaos ning neid nimetatakse RecA-sarnasteks, mis tuleneb sarnasusest rekombinatsioonivalgu RecA struktuuriga

(ülevaade Singleton *et al.*, 2007). Üheaahelalise DNA, ATP ning hüdroliüüsiks vajaliku Mg^{2+} ja vee molekuli seondumine toimub täpsemalt nende domäänide vahelises vaos, mis ATP hüdroliüüsi tsükli jooksul sulgub ja avaneb (eristatakse avatud ja suletud struktuurilist vormi), põhjustades translokatsiooni mööda ssDNA-d ühe nukleotiidi võrra ATP molekuli kohta. (Korolev *et al.*, 1997; Velankar *et al.*, 1999).

Lisaks esineb ka kõikides SF1 perekondades tuumik domäänide siseseid insert domääne, mis ei oma erilist mõju Rec-A domäänide voltumisele, kuid mõjutavad helikaaside funktsioone (Fairman-Williams *et al.*, 2010). Seda on nähtud kõikide SF1 helikaasi perekondade puhul (Velankar *et al.*, 1999; Singleton *et al.*, 2004; Saikrishnan *et al.*, 2009; Stelter *et al.*, 2013). UvrD/Rep-sarnaste perekonna puhul on nendeks iseseisvates insert domäänideks 1B ja 2B (Joonis 1). Ka need domäänid muudavad ATP seondumise ajaks teineteise suhtes positsioone ning katsed Rep helikaasiga on näidanud, et helikaasil tõuseb selle jooksul afiinsus dsDNA suhtes (Wong *et al.*, 1992). See konformatsiooniline muutus viib 1B ja 2B domäänid lähemale ka replikatsioonikahvli kaheaahelalisele DNA-le, tekitades sealsete aluspaaride vahel pinget. Domäänid 1B ja 2B loovad DNA-ga esimesed kontaktid ning suunavad seda üheaahelist DNA-d siduva kanali poole, mis asub kõigi nelja (2A, 2B, 1A, 1B) domääni vahel (Velankar *et al.*, 1999; Lee ja Yang, 2006).



Joonis 1. *E.coli* UvrD helikaasi domäänid ning motiivide paigutus kõrgemat järku struktuuris. Vasakpoolsel joonisel on välja toodud *E. coli* UvrD helikaasi kõik neli domääni: 1A – roheline; 2A – tumesinine; 1B – oranž; 2B – tsüaansinine ning valgu domäänide asukoht ssDNA sidumisel. Parempoolsel joonisel on välja toodud kõik helikaaside seitse kõrgelt konserveerunud motiivi I, Ia, II, III, IV, V ja VI noolega tähistatult kõrgemat järku struktuuris. Joonis on tehtud UvrD järjestuse põhjal (PDB: 2IS2, Lee ja Yang, 2006 koordinaatide põhjal).

Kasutatud programmiks oli PyMOL 2.4.1 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4.1 Schrödinger, LLC; <https://pymol.org/2/>).

Lisaks eelnimetatud mehhanismile lahutatakse kaksikahelalist DNA-d ka 2A domääni tipus asuva β -juuksenõel struktuuri aminohapete abil, mis 2A domääni edasi liikumise hetkel virnastub esimese dsDNA dupleksi aluspaariga, katkestades selle vahelised vesiniksidemed. Kõrvalahel jääb helikaasi struktuurist välja ning translokatsioon toimub vaid mööda helikaasi sisenenud ssDNA-d (Korolev *et al.*, 1997; Velankar *et al.*, 1999).

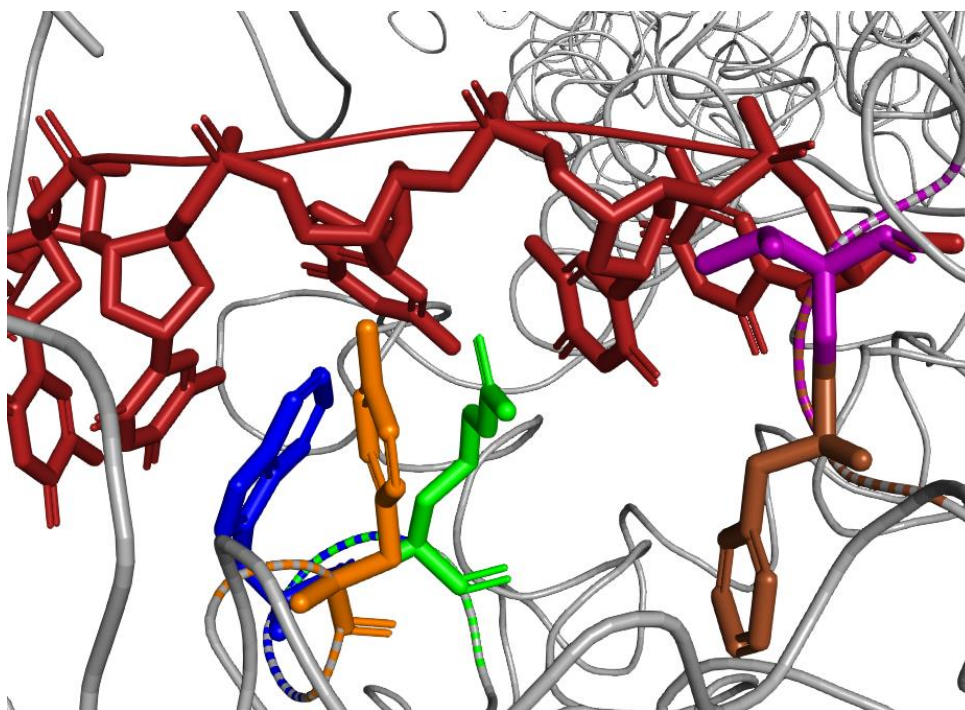
SF1 helikaasides esineb tihti ka mittekonserveerunud N- ja C-terminaalseid alasid valkude järjestuses, mis võivad osade helikaaside puhul sisaldada lisa domääne. Need domäänid vastutavad sageli kas oligomerisatsiooni, teiste valk-valk interaktsioonide, kindlate DNA alade äratundmise või muude spetsiifiliste funktsioonide eest vastavalt valgu adaptatsioonidele organismi. Lisaks esineb ka perekonna spetsiifilisi, tuumik domäänide siseseid insert domääne, mis ei oma erilist mõju Rec-A domäänide voltumisele, kuid mõjutavad helikaaside funktsioone (Fairman-Williams *et al.*, 2010). Seda on nähtud kõikide SF1 helikaasi perekondade puhul (Velankar *et al.*, 1999; Singleton *et al.*, 2004; Saikrishnan *et al.*, 2009; Stelter *et al.*, 2013).

1.7. Motiiv III tähtsus SF1A helikaasides

SF1A helikaaside motiiv III-s on vähemalt neli erinevat, kõrgelt konserveerunud aminohapet, mille jäägid on vajalikud ATP hüdrolyüsi reaktsioonist tingitud helikaasi translokatsiooni ja DNA kaksikheeliksi lahtiharutamise võimaldamiseks (Dillingham *et al.*, 1999). Translokatsioon toimub tänu üheaheelalise DNA lämmastikaluste järjestikuse pööramise ja nende koordineeritud üleandmise erinevate motiive sisaldavate taskute vahel (helikaaside kõrgemat järku struktuuris). See toimub ssDNA-d siduvas kanalis iga ATP hüdrolyüsi tsükli kohta (Velankar *et al.*, 1999; Lee ja Yang, 2006). Üks domäänidest, millel on ssDNA-ga rohkem kontakte (SF1A helikaasides on selleks 2A), jääb sellega tugevamalt seotuks ning teised domäänid (2B, 1B, 1A) pöörduvad ATP sidumisel 2A domäänile lähemale, mis põhjustab ka ühe nukleotiidi võrra edasi liikumise (Lee ja Yang 2006). Selle protsessi jooksul pöörduv selle nukleotiidi lämmastikalus tekkinud III ja Ia motiivi sisaldavasse taskusse 1A domäänis (Velankar *et al.*, 1999; Lee ja Yang, 2006).

Dillingham *et al.* tehtud katsetes *Bacillus stearothermophilus* PcrA helikaasiga leiti, et III motiivi konserveerunud arginiin (R260) stabiliseerib helikaasi translokatsiooni mehhanismis pööratud nukleotiidi fosfaat selgroogu ja türosiin (Y257) virnastub (ing. *stacks*) selle lämmastikalusega. Trüptofaan (W259) virnastub kahe ssDNA nukleotiidi lämmastikalustega ning glutamiin (Q254)

interakteerub ATP γ -fosfaadiga (Dillingham et al., 1999b). Sarnaseid funktsioone täidavad ka UvrD ja Rep helikaaside III motiivis homoloogilistel kohtadel asuvad aminohapped (Korolev et al., 1997; Lee ja Yang, 2006). Lisaks näidati Lee ja Yangi 2006 aasta katsetes, et PcrA R260-le vastav UvrD arginiin (R) interakteerub 1B domäänis Id lisamotiivi aminohappe jäägiga, mis koos takistavad üheaheelalisel DNA-l kanalit välja libiseda. Selliselt moodustab III motiiv ssDNA-d siduva ankru struktuuri (ing. *anchor structure*) (Joonis 2). ATP hüdroolüüsist tulenevalt katkevad kontaktid ATP γ -fosfaadi ning Id motiiviga ning ATP sidumisest põhjustatud konformatsiooniline muutus 1A ja 2A domäänide vahel destabiliseerub, põhjustades 2A domääni edasi liikumist ühe nukleotiidi võrra. Edasi antud nukleotiidid liiguvad aga 1A ja 1B domäänides asuvate motiivide koostööl üheaheelalise DNA kanali väljapääsu poole, helikaasist välja. (Velankar et al., 1999; Dillingham et al., 1999; Lee ja Yang, 2006). Seega leitakse, et III motiiv mängib olulist rolli helikaaside translokatsiooni polaarsuse määramisel (Dillingham et al., 1999b; Velankar et al., 1999; Saikrishnan et al., 2009).



Joonis 2. III motiivi ankur struktuur ssDNA sidumise kanalis. Joonisel on taustal halliga värvitult näha *E. coli* UvrD helikaasi kõrgemat järku struktuuri. Tumepunasega on märgitud ssDNA, mis asub üheaheelalist DNA-d siduvas kanalis. Sellega interakteeruvatest motiividest on välja toodud motiiv III ankur struktuuri kuuluvad aminohapped W256 (sinine), Y254 (oranž), R257 (roheline) ning samas ssDNA-d siduvas taskus asuva motiiv Ia aminohapped F62 (pruun) ja T63 (lilla). Joonis on tehtud UvrD järjestuse põhjal (PDB: 2IS2, Lee ja Yang, 2006 artiklist saadud koordinaatide abil värviti aminohapped). Kasutatud programmiks oli PyMOL 2.4.1 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4.1 Schrödinger, LLC; <https://pymol.org/2/>).

Arginiini (R) ja trüptofaani (W) vahetusedalaniini (A) vastu põhjustasid PcrA helikaasis defektset ssDNA sidumist ning kuigi need mutatsioonid ei mõjutanud ATP hüdrolyüüsi efektiivsust, näitasid sellised mutandid vähenenud helikaaset aktiivsust. Lisaks mitmete teiste asenduste seast paistsid silma neutraalse laenguga glutamiini (Q254) asendus negatiivselt laetud glutamiin happe (E) vastu, mis vähendas oluliselt ATPaaset ja ka helikaaset aktiivsust metsiktüüpi valguga võrrelduna ning asendus neutraalse aspargiini vastu (N), mis oli aga vähesema mõjuga. Kummagi mutandi puhul ei vähenenud ssDNA sidumise võime (Dillingham *et al.*, 1999) *E. coli* UvrD konserveerunud negatiivse laenguga aspargiin happe (D248) asendused neutraalse arginiini vastu ebastabiilse binaarse kompleksi (valk-ssDNA/valk-ATP) moodustamist nii ssDNA kui ka ATP-ga, mõlema olemasolul suutis aga mutant luua metsiktüübiga võrreldes võrdväärse aktiivsusega kompleksi (Brosh ja Matson, 1996). Need tulemused näitavad III motiivi olulisust ATP positsioneerimises ja hüdrolyüüsis ning ssDNA sidumises, mis kõik on vajalik helikaasse aktiivsuse tagamiseks (Brosh ja Matson, 1996; Velankar *et al.*, 1999; Dillingham *et al.*, 1999; Lee ja Yang, 2006).

1.8. SF1 UvrD/Rep-sarnaste perekond

Hmi1 avastamisel leiti, et sellel helikaasil on märkimisväärseid sarnasusi SF1 UvrD/Rep-sarnaste perekonna liikmete *E. coli* UvrD kui ka *S. cerevisiae* Srs2 helikaasiga. Homoloogiat täheldati ka teiste, sealhulgas *E. coli* Rep ja *S. Aureus*-e PcrA-ga (Sedman *et al.*, 2000). UvrD helikaas on vajalik DNA replikatsioonil, reparatsioonil ja UV-kiirguse põhjustatud valepaardumiste parandamisel (ülevaade Washburn ja Kushner, 1993). Srs2 omab paljusid erinevaid funktsioone nii rekombinatsioonil, erinevate DNA vigastuste parandustel kui ka replikatsioonil (Burgess *et al.*, 2009). Rep-valgu põhiline funktsioon on osaleda nii bakteriofaagide, nagu näiteks M13, P2 ja ϕ X174, kui ka *E. coli* ssDNA replitseerimises (Takahashi *et al.*, 1979; Kaguni *et al.*, 1981; Arai ja Kornberg, 1981). PcrA on hädavajalik *S. aureus*-e plasmidi pT181 veereva ratta replikatsioonil ning UV-kiirguse põhjustatud mutatsioonide parandamisel (Chang *et al.*, 2002). Mõlemal valgul, Rep ja UvrD, on 3'–5' aktiivsus, *S. aureus*-e PcrA puhul on 5'–3' helikaasne aktiivsus tugevam, kõigil neil on vajalik ka ssDNA üleulatuva otsa olemasolu (Chang *et al.*, 2002; Washburn ja Kushner, 1993; Takahashi *et al.*, 1979).

UvrD, mis oli algselt tuntud kui DNA helikaas II, on ssDNA-st sõltuv ATPaas, millel on oluline roll metüleeritud DNA valepaardumis- ja nukleotiidide väljalõikereparatsioonil, millest viimane on UvrABC valkude vahendatud (Caron *et al.*, 1985). Tegemist on distributiivse helikaasiga, mis peab DNA valepaardumiste reparatsioonil lahti harutama sadu aluspaare (Zhang *et al.*, 1998).

On leitud, et erinevalt Rep helikaasist osaleb UvrD otseselt vale homoloogilise rekombinatsiooni ärahoidmises ning eemaldab RecA nukleoproteiinide filamente ssDNA-lt, kui nende normaalne töötlemine on häiritud ning nad rakule toksiliseks muutuvad või valepaardumisi tekitavad (Veaute *et al.*, 2003, 2005).

S. cerevisiae 3'–5' suunal translokeeruv tuuma helikaas Srs2 on teada olevalt koos UvrD-ga kõige enam Hmi1 valgule sarnane helikaas, mis omab paljusid erinevaid funktsioone nii rekombinatsioonil, erinevate vigade parandustel kui ka replikatsioonil. Sarnaselt UvrD-le osaleb Srs2 valede homoloogiliste rekombinatsioonide vahepealsete struktuuride parandamises ja selliselt ahelate vahetuse ära hoidmises (Milne *et al.*, 1994; Vaute *et al.*, 2003; Burgess *et al.*, 2009). Srs2 eemaldab ssDNA-lt rekombinatsiooni struktuurides nii RecA kui ka Rad51 nukleoproteiinide filamente ja balansseerib nii Rad52 valguga rekombinatsiooni tegevust (Veaute *et al.*, 2003; Burgess *et al.*, 2009; Ortiz *et al.*, 2011). Srs2 interakteerub ka prolifereriva tuuma antigeeniga (PCNA), mis suunab Srs2 replikatsiooni kahvlitesse ning osaleb eelnevast sõltumatult DNA katkete parandamises Exo1 nukleasiga (Ortiz *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2016).

Arvatakse, et Hmi1 täidab sarnaseid funktsioone DNA replikatsioonil, reparatsioonil ja/või rekombinatsioonil pärmi rakkude mitokondriaalse DNA-ga, mida need teised kirjeldarud helikaasid genoomse DNA-ga täidavad (Sedman *et al.*, 2000; Kuusk *et al.*, 2005; Sedman *et al.*, 2005).

1.9. *S. cerevisiae* mitokondriaalne helikaas Hmi1

Hmi1 on *S. cerevisiae* tuuma genoomi XV kromosoomi avatud lugemisraami YOL095c kodeeritud valk, mille pikkus on 706 aa ja molekulaarmass 80 kDa (Sedman *et al.*, 2000). Tegemist on mitokondriaalse DNA helikaasiga, mis on ATPasse aktiivsusega ning vajab DNA lahtiharutamise reaktsiooni kofaktorina Mg^{2+} . Seostumiseks vajab see helikaas lühikest 3' üksikahelalise DNA üleulatuvat otsa ning eelistatult harutab see helikaas lahti lühikesi kaheahelalisi DNA oligonukleotiide (Kuusk *et al.*, 2005). Hmi1 translokeerub 3'-5' suunal ning sellel on seitse konserveerunud helikaasi motiivi I, Ia, II, III, IV, V, VI. See helikaas on liigitatud SF1 alla (SF1A ehk A tüüpi), täpsemalt UvrD/Rep-sarnaste alam perekonda (Gorbalenya ja Koonin, 1993; Sedman *et al.*, 2000; Kuusk *et al.*, 2005). Erinevalt teistest mitokondrisse transporditavatest valkudest, mis tavaliselt omavad N-terminaalset transpordi signaali, on Hmi1 umbes 36 aminohappe pikkuse C-terminaalse mitokondriaalse sihtmärk signaaliga valk (ülevaade Heijne, 1986; Lee *et al.*, 1999; Sedman *et al.*, 2000).

Erinevate katsetega on tõestatud, et Hmi1 helikaas lokaliseerub mitokondrites ja on vajalik pärmi mitokondriaalse genoomi säilitamiseks. *HMII/hmi1Δ* diploidised tüved kasvasid normaalsel

kasvutemperatuuril (30°C) fermenteeritavatel ja mittefermenteeritavatel süsinikuallikatel ühtlaselt hästi, tõestamaks, et nähtud efekt pole dominantne. Geeniproducti suhtes haploidsed tüved jäid küll elama fermenteeritaval süsinikuallikal, nagu glükoos, kuid surid mittefermenteeritavatel süsinikuallikatel, nagu glütserool või glütserool/etanool. Nende saadud raku järglastel esines ka *petite*-koloonia fenotüüp – mtDNA oli kas ulatuslike deletsioonidega (ρ^-) või täielikult puuduv (ρ^0). Seda fenotüüpi seostatakse tavaliselt mitokondrite talitlushäirete ja võimetusega oksüdeeriva fosforüülimise teel ATP-d genereerida (ülevaade Chen ja Clark-Walker, 2000; Sedman *et al.*, 2000). Enamiku rakkude mtDNA oli ka hüpersupressiivne, mis tähendab, et ρ^- mitokondriaalse genoomiga mutantide ristamisel *wt* ρ^+ rakkudega pärivad enamik järglasi täpselt selle sama ρ^- mutandi genoomi (Sedman *et al.*, 2000).

Kokkuvõttes näitavad need tulemused, et Hmi1 helikaas on metsiktüüpi pärmi ρ^+ mtDNA stabiilsuse ning seega ka respiratoorse võimekuse seisukohalt hädavajalik, kuid ei mängi olulist rolli ρ^- mtDNA säilitamises, sest seda hoitakse stabiilsena ka funktsionaalse valgu puudumisel. Samuti saab *hmi1* Δ tüvedes säilitada nii hüpersupressiivseid (HS) kui ka neutraalseid ρ^- genome, kuigi leiti, et Hmi1 valgu puudumisel on HS kolooniade konkatemeersed mtDNA molekulid oluliselt lühemad kui valgu olemasolul. Selgus ka, et Hmi1 ATPaasne aktiivsus ei ole ρ^+ mtDNA ülalpidamiseks ega HS pikkade konkatemeeride sünteesiks hädavajalik. Seda tõestasid katsed motiivide I ja II aminohappelist vahetustega (vastavalt K32M ja E211Q). Selles katses kaotasid Hmi1 mutandid võime hüdrolyüsida ATP-d ja kasvas *petite* kolooniade tekkesagedus, kuigi mõlemat mutanti sisaldavad pärmi kolooniad jäid veel pikaks ajaks mittefermenteeritaval süsinikuallikal ellu (Kuusk *et al.*, 2005; Sedman *et al.*, 2005). K32M mutandi puhul oli ka ekspressioon pärmis E211Q mutandi ja *wt*-ga võrreldes veidi väiksem ning E211Q puhul oli ATP hüdrolyüsi puudumine eelnevalt bakteriaalse ekspressiooni süsteemiga puhastatud valgu puhul *in vitro* katsetega tõestatud (Kuusk *et al.*, 2005; Sedman *et al.*, 2005).

2. EKSPERIMENTAALOSA

Käesoleva bakalaureuse töö eesmärgiks oli uurida valgu Hmi1 III motiivi aminohappeliste vahetuste mõju valgu suhtelisele kogusele pärmis. Selle eesmärgi täitmiseks oli vaja:

- 1) Konstrueerida mutatsioonidega Hmi1 pärmis spetsiifilised ekspressioonivektorid. Nendes vektorites oli vaja asendada iga mutandi kohta *HA-HMI1* geeni sisene fragment mutatsioone sisaldava *HMI1* geeni fragmendi vastu.
- 2) Detekteerida Western bloti meetodi abil mutantsete Hmi1 valkude olemasolu *S. cerevisiae* haploitsetes rakkudes.

Minu töö on osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on *S. cerevisiae* mitokondriaalse helikaasi Hmi1 funktsiooni uurimine.

2.2. Materjalid ja meetodid

2.2.1. Tüved

Tabel 2. Töös kasutatud tüved.

Tüvi	Genotüüp	Päritolu
<i>E. coli</i> Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>S. cerevisiae</i> W303 a	Mat-a; <i>ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp-1, leu2- 3, 112 can1-100</i> (rho ⁺)	Wallis <i>et al.</i> , 1989

2.2.2. Plasmiidid

Tabel 3. Töös kasutatud plasmiidid

Plasmiid	Genotüüp	Autor/päritolu
pRep22	Plasmiid pBLUESCRIPT KS (+), millesse on BamHI lõikekohta sisestatud pärmi w303 tüve genoomsest raamatukogust pärit MboI fragment (3236 nt). Fragment sisaldas <i>HMI1</i> geeni (2118 nt) koos 762 nt pikkuse ülesvoolu ja 354 nt pikkuse allavoolu alaga	Sedman <i>et al.</i> , 2000

pRep22 -E211Q -D237N -Q240E -Q240N -S241A -Y243A -F245A -L246A	Kaheksa erinevat pRep22 plasmidi, kuhu on <i>HMI1</i> geeni sisse viidud üks aminohappe vahetused	Sirelin Sillamaa
Katsetes kontrollidena kasutatud plasmiidid		
pRS315	pBLUESCRIPT + LEU2 marker, CEN6 tsentromeerne järjestus, ARS4 autonoomne replikatsiooni järjestus	Sikorski ja Hieter, 1989
pRS315- <i>HMI1</i>	pRS315 + <i>HMI1</i> geen koos külgnivate aladega	Sedman <i>et al.</i> , 2005
Katsetes kasutatud kontrollina ja vektorplasmidina		
pRS315- <i>HA-HMI1</i>	+ pRep22 plasmidist pärit <i>HMI1</i> koos külgnivate alade ja N-terminaalse <i>HA tag</i> -iga (hemaglutiniin, antigeen)	Sedman <i>et al.</i> 2000
Motiiv I mutatsiooni sisaldav plasmid, katsetes kasutatud kontrollina		
pRS315- <i>HA-HMI1</i> -K32M	lüsiin 32 → metioniin	Sirelin Sillamaa
Motiivide välist mutatsiooni sisaldav plasmid, katsetes kasutatud kontrollina		
pRS315- <i>HA-HMI1</i> -F75A	fenüülalaniin 75 →alaniin	Sirelin Sillamaa

Tabel 4. Töö käigus konstrueeritud plasmiidid

Plasmiid	Genotüüp
Motiiv II mutatsiooni sisaldav plasmiid, katsetes kasutatud kontrollina	
pRS315-HA-HMI1-E211Q	glutamiinhape 211 → glutamiin
Uuritavaid Motiiv III mutatsioone sisaldavad rekombinantsed plasmiidid	
pRS315-HA-HMI1-D237N	aspargiinhape 237 → aspargiin
pRS315-HA-HMI1-Q240E	glutamiin 240 → glutamiinhape
pRS315-HA-HMI1-Q240N	glutamiin 240 → aspargiin
pRS315-HA-HMI1-S241A	seriin 241 → alaniin
pRS315-HA-HMI1-Y243A	türosiin 243 → alaniin
pRS315-HA-HMI1-F245A	fenüülalaniin 245 → alaniin
pRS315-HA HMI1-L246A	leutsiin 246 → alaniin

2.2.3. Söötmed

Luria-Bertani (LB) vedelsööde. Koostis: 0,5% pärmiekstrakt; 1% trüptoon; 1% NaCl (tardsöötme tegemisel lisati 1,7% agarit)

Yeast extract peptone dextrose (YPD). Koostis: 1% pärmiekstrakt; 2% peptoon; 2% glükoos (tardsöötme tegemisel lisati 1,7% agarit)

Synthetic complete (SC) – Leu glükoosiga. Koostis: 0,67% Pärmilämmastikalus (ilma aminohapeteta); 0,2% aminohapete ja nukleosiidide segu (ilma leutsiinita); 2% Glükoos (tardsöötme saamiseks lisati 1,7% agarit).

2.2.4. Plasmiidide analüüs agarosgeelil

Kõiki restriksiooni, lüüsimis- ja DNA puhastuste produkte kontrolliti geelelektroforeesi abil agarosgeelil (kui ei ole teisi tingimusi eraldi väljatoodud):

Valmistati 0,8% agarosgeel (0,8g agarosi, 100 ml TAE (40mM Tris-atsetaat; 1mM etüleen-diamiin-tetraäädikhape (EDTA) (pH 8)), millele lisati etiidümbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,5 µg/ml. Markerina kasutati alati *Thermo Fisher 1 kb DNA Ladder*. Proovidele lisati 6x TAE laadimisvärvi (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA (pH 8); 50% glütserool; 0,25% broomfenoolsinine), need kanti geeli hammastesse ning jooksutati 50 V pingel ~1,5 h.

2.2.5. *HMI1* fragmendi vahetus kahe plasmidi vahel restriksiooni meetodil

pRS315-*HA-HMI1* mutantide saamiseks restrikteeriti nii vektorplasmidi pRS315-*HA-HMI1* kui ka pRep22-*HMI1* mutantide (Tabel 2, 3) *HMI1* geeni NsiI ja SphI restriктаasidega (restriksioonisaaidid olid *HMI1* geeni sisesed). Restriksioonid viidi läbi 37°C juures 1,5 h. Restriksioonisegu (20 µl) sisaldas 1500 ng lõigatavat plasmidi, 5 U-d NsiI ja SphI restriктаase, 10x Tango puhvrit (*Thermo Scientific*) ja T₁₀E_{0,1}-te (10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,1 mM EDTA). Kontrolliks võeti pRS315-*HA-HMI1* plasmid, mida lineariseeriti NsiI restriктаasiga. Reaktsiooni lõppedes lisati segudele juurde 0,5 µl 0,5M EDTA-d ning neid säilitati -20°C juures.

2.2.5. Lineaarsete DNA fragmentide puhastamine agarosgeelist

Restrikteeritud pRep22-*HMI1* (Tabel 3) proovid jooksutati 0,8% agarosgeelil elektroforeesiga, mille lõppedes lõigati geelist steriilse skalpelliga UV all (UVITEC CAMBRIDGE FireReader V10) *HMI1* restrikteeritud fragment välja. Mutatsioone sisaldavad *HMI1* fragmendid puhastati geeli tükkidest välja kasutades *Favorgen Gel/PCR Purification Mini Kit*-i vastavalt tootjapoolsele juhendile ning võeti üles 40 µl T₁₀E_{0,1}-s.

2.2.7. DNA ligeerimine

NsiI ja SphI restriктаasidega lõigatud vektorplasmiid (pRS315-*HA-HMI1*) ja mutatsiooni sisaldavate *HMI1* fragmentide ligatsiooni segu (10 µl) sisaldas 5 µl *HMI1* fragmenti (150 ng/ µl) plasmidi sisestamiseks, 2 µl vektorplasmidi, 10 U-d T4 DNA ligaasi ning 10x T4 DNA ligaasi puhvrit (*Thermo Scientific*) ning lahus viidi lõppruumalani ddH₂O-ga. Ligatsiooni segusid inkubeeriti 45 min toatemperatuuril. Kontrolliks tehti segu, kuhu fragmendi asemele lisati vastav kogus ddH₂O-d. Saadud ligeerimissegusid kasutati transformatsiooniks.

2.2.8. Plasmidse DNA transformatsioon kompetentsetesse bakterirakkudesse

Rekombinantsete plasmiidide paljundamiseks viidi läbi plasmiidide transformatsioon bakteritesse. *E. coli* Top 10 rakkudele lisati 1 µl ligatsioonisegu. Rakke hoiti 20 min jääl, millele järgnes 2 min kuumašokk 37°C juures. Proovid jahutati uuesti jääl ning lisati 500 µl LB söödet + 20 mM MgSO₄, segati kerge vorteksiga. Proove inkubeeriti 37°C juures 45 min. Inkubatsiooni järgselt tsentritsentrifugeeriti segu 3200 rpm (pööret minutis) (Eppendorf Minispinn, rootor F45-12-11) toatemp 3 min ning eemaldati 400 µl söödet. Rakud resuspendeeriti allesjäänud söötmes ning külvati (100 µg/ml) ampitsilliini sisaldava LB söötmega plaatidele. Rakke kasvatati üleöö 37°C juures.

2.2.9. Plasmidse DNA eraldamine bakterirakkudest

Ampitsilliini sisaldavatel selektiivplaatidel kasvanud *E. coli* Top 10 kolooniatest valiti välja 3, mida kasvatati üleöö 3 ml LB + (100 µg/ml) ampitsilliini söötmes loksutil (Eppendorf® New Brunswick™ Innova® 44 Incubator Shaker) 180 rpm 37°C juures.

Rakud tsentrifugeeriti kokku 1,5 ml tuubi 2x 1 min 8000 rpm lauafuugis (Eppendorf “Minispinn”, rootor F45-12-11) ning sööde eemaldati. Rakud suspendeeriti 100 µl SOL I-s (50 mM glükoos, 25 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA), segati kerge vorteksi abil ning asetati jääle. Järgmiseks lisati 200 µl SOL II-te (0,2 M NaOH, 1% SDS), segati käes üles-alla raputades ning hoiti jääl 10 min. Seejärel lisati segule 150 µl SOL III-e (3 M KOAc, 11,5% jää-äädikhape), segu segati vorteksil, seejärel tsentritsentrifugeeriti 5 min 13400 rpm. 450 µl supernatanti võeti uude tuubi ning sellele lisati 300 µl 100% isopropanooli, segati käes ning inkubeeriti 5 min toatemperatuuril. Fuugimist korrati samadel tingimustel (5 min 13400 rpm), isopropanool eemaldati ning tekkinud sadet pesti 200 µl 70% EtOH-ga (segati käes). Seejärel inkubeeriti segu 5 min RT ning tsentrifugeeriti 3 min 13400 rpm. Tsentrifugeerimise järgselt eemaldati EtOH ning sade

resuspendeeriti 100 µl T₁₀E₁ (10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA) + RNAas A-s (20 µg/ml). Segu inkubeeriti 30 min 65°C juures. 30 min möödudes segu jahutati jääl ning lisati 2 µl 5M NaCl, 50 µl fenool kloroformi (7,5 pH) ning aeg-ajalt segades inkubeeriti 10 min RT. Segu tsentrifuugiti 1 min 13400 rpm, vesifaas (plasmiidse DNA-ga) tõsteti uude tuubi, sellele lisati koguseliselt 2,5x mahtu 96% EtOH, segu segati käes ning seda sadestati 15 min -20°C juures. Sadestuse järgselt tsentrifuugiti segu 5 min 13400 rpm. Sademelt eemaldati supernatant ning sadet pesti 200 µl 70% EtOH-ga (segati käes) ning inkubeeriti 10 min RT. Viimaks tsentrifuugiti segu 3 min 13400 rpm, supernatant eemaldati, sade võeti üles 25 µl T₁₀E_{0,1}-s ja hoiustati -20°C juures.

Kõiki rekombinantseid plasmide kontrolliti sekveneerimisega, et kinnitada nendes mutatsiooni sisaldava *HMI1* olemasolu.

2.2.10. Konstruktide transformeerimine pärmi liitiumatsetaadi meetodil

Hmi1 valgu ekspressiooni ja stabiilsuse kontrollimiseks transformeeriti konstrueeritud plasmiidid esmalt pärmi. *S. cerevisiae* w303 a (Tabel 1) säilituskultuuri rakke kasvatati YPD söötmetassidel 3 ööpäeva 30°C juures. Petri tassilt korjati üks üles kasvanud koloonia, mis suspendeeriti 20 ml-s YPD vedelsöötmes ning kasvatati 30°C juures 180 rpm loksutil (Eppendorf® New Brunswick™ Innova® 44 Incubator Shaker). Rakkude tihedust mõõdeti lainepikkusel OD₆₀₀ ning korjati tihedusel OD₆₀₀=0,6. Iga transformatsiooni kohta tsentrifuugiti 2 ml rakkudega vedelsöödet 2000 rpm (Eppendorf Minispin, rootor F45-12-11) 5 minutit RT. Sadenenud rakkudelt eemaldati sööde ja neid pesti steriilse ddH₂O-ga vorteksi abil. Rakud sadestati uuesti 2000 rpm-i juures 5 minutit tsentrifuugides (Eppendorf Minispin, rootor F45-12-11) ja supernatant eemaldati. Rakud resuspendeeriti iga transformatsiooni kohta 1 ml LiOAc/TE lahusega (0,1M LiOAc; 10mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA) ja tsenritsentrifuugiti seejärel 5 min 2000 rpm RT. Supernatant eemaldati sademelt ja resuspendeeriti iga transformatsiooni kohta 50 µl LiOAc/TE-s. Saadud segu inkubeeriti 20 min 30°C juures. Segule lisati 10 µl (10 mg/ml) 5 min 95°C juures denatureeritud ja seejärel jääl jahutatud kandja DNA-d (lõhe spermi DNA, ing. *carrier DNA*) ja 200 ng plasmidi.

Saadud transformatsioonisegud segati vorteksil ning aeg-ajalt segades inkubeeriti 20 min 30°C juures. Inkubatsiooni lõppedes lisatati segudele 500 µl 40% PEG/LiOAc/Te-d (50% PEG4000 (Polüetüleenglükooli); 0,1 M LiOAc, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA), segati vorteksil ja inkubeeriti 30°C juures 30 minutit, samuti aeg-ajalt segades. Sellele järgnes 5 min kuumašokki

42 °C juures. Rakke sadestati lauafuugis 2000 rpm-i juures 5 min, eemaldati supernatant ning võeti üles 100 µl ddH₂O-s.

Rakud plaaditi välja selektiivsetele SC -Leu tardsöötme tassidele ning neid kasvatati piisava suurusega kolooniate saamiseks 30°C juures kaks ööpäeva (üles kasvasid need kolooniad, mis sisaldasid LEU2 geeni). Igast tüvest valiti välja kaks erinevat kolooniat ja need plaaditi lahjenduskülviga uutele SM -leu tassidele kasvama 30°C juurde kaheks ööpäevaks. Lahjenduskülvidelt valiti 1 koloonia, mis viidi 2 ml-sse SC -Leu vedelsöötmesse 180 rpm ja 30°C juurde (Eppendorf® New Brunswick™ Innova® 44 Incubator Shaker) kasvama, ülejäänud rakkudest tassidelt tehti säilituskultuurid.

Kokku kasvatati rakke 12 ml loksutil (Eppendorf® New Brunswick™ Innova® 44 Incubator Shaker) lõpptiheduseni OD₆₀₀=0,5-0,6. Saadud kolooniate rakud jagati kolmeks 3 ml prooviks, seejärel rakke tsentritsentrifugeeriti 3 min 4500 rpm (Hettich Zentrifugen Mikro 200R) RT. Saadud rakud külmutati otse vedel lämmastiku abil ning säilitati -80°C juures.

2.2.11. Pärmirakkude lüüs klaaskuulide meetodil

Külmutatud rakud võeti jääle sulama. Neile lisati 250 µl 20% TCA (trikloroäädikhape) lahust valkude sadestamiseks ja 250 µl 1 mm läbimõõduga klaaskuulikesi ning hoiti jääs 5 min. Sellele järgnevalt lüüsi rakke klaaskuulikestega 3x 1 min vorteksil (1 min pausidega vorteksite vahel). Lüüsimise järgselt tõsteti rakulüsaadi segud uude epsi. Klaaskuule pesti 2x 500 µl 5% TCA-ga, pesude vahel vorteksides ning vedel faas tõsteti rakulüsaadi segudele ja suspendeeriti. Seejärel tsentrifugeeriti segud 14000 rpm (Heraeus Instruments “Biofuge Fresco“) 10 min 4°C. Tsentrifugeerimise lõppedes eemaldati supernatant ning sadet pesti 750 µl 96% 3 min (-20°C juures) jahutatud EtOH-ga, segati käes. Supernatant eemaldati, sade suspendeeriti 40 µl 1M Tris-HCl-is (pH 8.0). Lisati juurde 80 µl 5x SDS laadimisvärvi (250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 50% glütserool, 10% SDS, 0,5% broomfenoolsinine, 250 mM ditiotreitol) (SDS molekulid seonduvad valkudega, andes neile ühtlase negatiivse laengu, mille tugevus sõltub valgu suurusest (seondub rohkem SDS molekulide)) millele järgnes kiire vortex ning segusid hoiti 5 min 95°C juures, denatureerides kõik kõrgemat järku struktuurid. Sellele järgnes 14000 rpm RT 5 min tsentrifugeerimine ning supernatant (SDS-ga kompleksis valgud) korjati uude tuubi.

2.2.12. SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforees

SDS-polüakrüülamiidgeel, millele pärmi lüüsi proovid kanti (20 µl), koosnes kolmest erinevast osast:

- Kontsentreeriva geeli osa (2,7 ml geeli kohta) (5,2% akrüülamiid (AAm)/NN-metüleen(bis)akrüülamiid (BAAm) (29:1) lahus, 0,1% Naatriumdodetsüülsulfaat (SDS), 0,13 M Tris-HCl puhver (pH 6,8); polümerisatsiooni reaktsiooni toimumiseks lisati 27 µl 10% Naatriumpersulfaati (NAPS) ja 3,5 µl tetrametüül-etüleen-diamiini (TEMED));
- Separeeriv geeli osa (Geelipuhver (1,73 ml geeli kohta): 1,44 M Tris-HCl puhver (pH 8,8), 0,4% SDS; 13,8% AAm/BAAm lahus (5 ml geeli kohta); 66,5 µl 10% NAPS ja 7 µl TEMED)
- Kork (1 ml separeeriva geeli lahusest)

Markerina kasutati alati *PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa*. Proove jooksutati 90 V juures kuniks SDS-valgukompleksid läbisid kontsentreeriva geeli osa (~45 min) ning seejärel 150 V juures kuniks värvi frondi jõudmiseni geeli korgini (~2 h). Seejärel lisati geel (eemaldati kork ja kontsentreeriv osa) *Semi-dry* puhvrise (19 mM Tris; 20 mM Glütsiin; 19% EtOH) ning proove loksutati (Biometra Rocking Platform) 15 min.

2.2.13. Western Blot

Whatman filterpaberid ja nitrotselluloos membraanid (AppliChem “Pure Nitrocellulose unupoorted 0,45 µm Transfer membrane“) leotati *Semi-dry* puhvrise eraldi anumates. 15 minuti möödudes laotati Biometra „Fastblot B 44“ aparaadile 1 geeli kohta teineteise peale:

- 3 leotatud filterpaberit
- leotatud membraan,
- leotatud geel,
- 3 leotatud filterpaberi

(õhumullid eemaldati iga elemendi puhul). Valkude elektroforeetilisel ülekanne viidi läbi 10 V (200 mA) juures 1 h.

Seejärel värviti membraanid *Ponceau* värvimislahusega (0,14 mM *Ponceau* punane värv; 5% äädikhape) esmaseks valkude visualiseerimiseks (ülekandumise kontroll) ning loksutati (Biometra Rocking Platform) 5 min.

Seejärel eemaldati ebaspetsiifiliselt seondunud värv membraanilt pestes seda ddH₂O-ga ja hinnati silma järgi hinnates valkude olemasolu. Värv täielikuks eemaldamiseks pesti

membraane 1x TBS/0,2% Tween-20 lahusega (TBS (50 mM Tris-HCl (pH 7,6); 150 mM NaCl); 20x Tween20) 3x 15 min samal loksutil. Viimase pesu järel loksutati membraane (Biometra Rocking Platform) blokeerimislahuses (3% lõssipulber, 0,4% Tween 20, 1x TBS) 1 h.

Blokeerimise lõppedes asetati membraanid eraldi kiletaskutesse, kuhu lisati ka 1 ml blokeerimislahust + 1,5 µl (1:667) hiire Anti-HA-peroksidaas konjugeeritud antikeha (3F10). Suletud kiletaskus loksutati (Biometra Rocking Platform) membraane üleöö (16 h) 4°C. Membraani pesti 1x TBS/0,05% Tween-20 lahusega 3x 15 min, eemaldamaks mittespetsiifiliselt seondunud antikehad.

Seondunud antikehaga Hmi1 valgu visualiseerimine toimus *Cytiva Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagentkit*-i Sol A ja Sol B (tootja protokoll järgi) abil, mis segati 1/1 koguses kokku (kokku 2 ml membraani kohta) ning kanti 5 minutiks membraanile. Seejärel ilmutati ja visualiseeriti tulemus (Bio-Rad Molecular Imager ChemiDoc XRS+ masinas ja Image Lab tarkvaraga, kasutades optimaalse pikkusega säriaega). Anti-HA antikeha eemaldati membraanilt antikeha eemalduslahusega (100 mM beeta-merkaptotetanool, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl (6,8 pH)) 50°C juures 30 min ning pesti 3x 15 min 1x TBS/0,05% Tween-20 lahusega. Blokeerimist korrati 0,2% Tween blokeerimisseguga ning seejärel lisati 1 ml blokeerimislahust koos 0,5 µl (1:2000) hiire fosfoglutseraati kinaasi ensüümi (PGK1) primaarne antikehaga. Anti-PGK1 membraane loksutati (Biometra Rocking Platform) üleöö 4°C kiletaskus. Seejärel koguti antikeha membraanilt tuubi ning membraani pesti 1x TBS/0,05% Tween-20 lahusega 3x 15 min, tehti viimane blokeerimine 0,2% Tween blokeerimisseguga ning lisati sekundaarne konjugeeritud antikeha Anti-Mouse HRP 0,5 µl (1:5000) + 2,5 ml blokeerimislahust ning loksutati (Biometra Rocking Platform) 4°C juures 4 h. Mittespetsiifiliselt seondunud antikeha pesti maha samadel tingimustel ning visualiseerimine toimus sarnaselt Anti-HA antikehaga.

2.2.14. Kvantifikatsioon

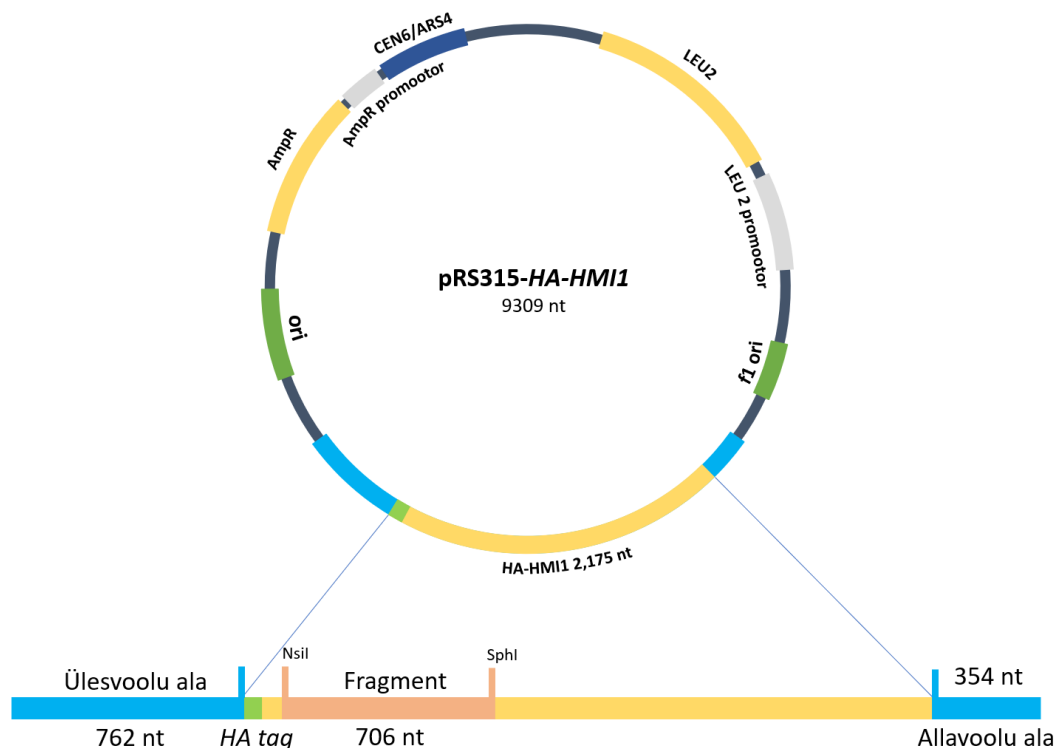
ImageJ programmi abil võrreldi Western blot meetodiga detekteeritud Hmi1 valgu mutantidele ja metsiktüüpi kontrollidele (Tabel 2, 3) vastavad signaalid. Kvantifitseerimisel arvestati maha tausta signaal (Schneider *et al.*, 2012). Sarnaselt kvantifitseeriti ka laadimiskontrollina kasutatud PGK signaal. Metsiktüüpi Hmi1 kontrollide ja Hmi1 mutantidele vastavad signaalid normaliseeriti PGK signaali vastu ning iga rea jaoks arvutati välja selle signaali suhe metsiktüüpi Hmi1 valgu signaali vastu. Saadud tulemused esitati tulpdiagrammina.

2.3. Tulemused

2.3.1 Mutatsiooniga pärmi ekspressioonivektorite konstrueerimine

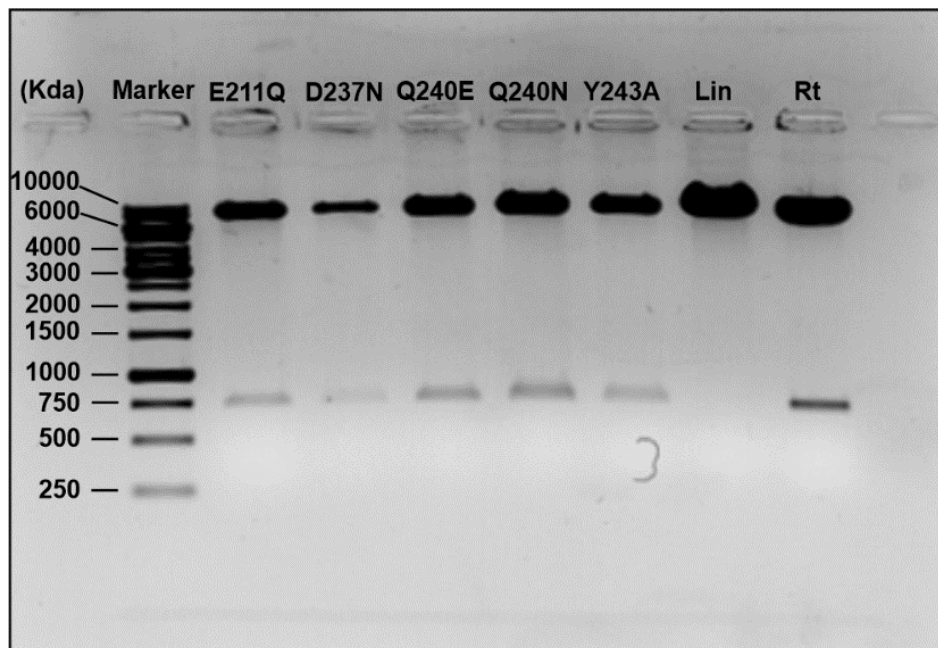
Selleks, et täpsemalt uurida Hmi1 helikaasi III motiivi mõju selle valgu stabiilsusele otsustati konstrueerida pärmi spetsiifilised plasmiidid, mis sisaldaks erinevaid mutantseid Hmi1 helikaasi variante ning N-terminaalset *HA tag*-i, mis võimaldaks valkude taset uurida Western bloti meetodiga kasutades *HA tag*-i vastaseid antikehi. Kokku konstrueeriti üks II motiivi ja seitse erinevat Hmi1 III motiivi mutatsiooni sisaldavat plasmidi. Lisaks kasutasin Sirelin Sillamaa poolt tehtud I motiivi mutanti (K32M) ning ühte mutanti, mille mutatsioon paiknes väljaspool Hmi1 konserveerunud helikaasi motiive (F75A). Mutantide tegemiseks lõigati kaheksast pRep22 plasmiidist (Tabel 3) välja 706 nt pikkune fragment, millest iga üks sisaldas varasemalt Sirelin Sillamaa poolt tehtud aminohappelist vahetust põhjustavaid mutatsioone *HMI1* II ja III motiivi järjestuses. Lõikamiseks kasutati unikaalseid restriksioonisaite NsiI ja SphI, mille vahele ka mutatsioone sisaldavad alad jäid (võimaldamaks töötada väiksema fragmendiga kui terve *HMI1* geen). Saadud mutatsioonidega fragmendid kloneeriti pärmi spetsiifilisesse plasmidi pRS315-*HA-HMI1*, millest oli eelnevalt eemaldatud samade restriктаasidega lõigatud fragment. Kõik plasmiidid kontrolliti üle sekveneerimisega. Selliselt saadi ekspressioonivektorid kujul, mis tänu tsentrosoomsele järjestusele (CEN6) ja autonoomsele replikatsiooni järjestusele (ARS4) (Tabel 3) sobivad pärmis paljundamiseks.

pRS315 on madala koopiaruga plasmiid, millesse on varasemalt sisestatud *HMI1* geen (2118 nt) koos seda ümbritsevate aladega (762 nt ülesvoolu ja 354 nt allavoolu) ning lisati ka *HMI1* järjestuse suhtes N-terminaalse *HA tag* - inimese gripiviiruse glükoproteiin (hemaglutiniin; antigeen), millest on võetud 57 nt pikkune järjestus - sellele seondub antikeha Anti-HA-peroksidaas, võimaldades valgu detektsiooni (joonis 3). Varasemad katsed meie laboris on näidanud, et *HA tag* ei mõjuta Hmi1 valgu ekspressiooni (Sedman *et al.*, 2000).



Joonis 3. pRS315-HA-HMI1 geen koos külgnevate aladega. Pärmi w303 tüve genoomsest raamatukogust pärit MboI väljalõige, mis sisaldab *HMI1* geeni (kollane) koos 762 nt pikkuse ülesvoolu ja 354 nt pikkuse allavoolu alaga (helesinine). Juurde on lisatud *HMI1* N-terminaalne *HA tag* (heleroheline) (kokku 3291 nt) (Sedman *et al.*, 2000). Beežiga on tähistatud *HMI1* geeni sisene fragment külgnevate restriksioonisaatidega (NsiI ja SphI), milles asuvad kõik töös käsitletud mutatsioonid. Lisaks on joonisel välja toodud pRS315 plasmidi pikkus, promootoralad, replikatsiooni alguspunktid, ampitsiliini resistentsus geen, CEN6 ja ARS4 järjestused ja LEU2 geen.

Vektorplasmide (pRS315-HA-HMI1) restrikteeriti samade restriктаasidega, mis võimaldas neisse ligeerimise abil fragmentide sisestamist (fragmentide vahetamine plasmidide vahel). Ligatsioonisegud transformeeriti kompetentsetesse *E. coli* Top10 (Tabel 2) rakkudesse, puhastati paljundatud plasmidid välja ning tehti kontrollrestriksioonid (Joonis 4). Kõik plasmidid kontrolliti üle sekveneerimisega. Selliselt saadi ekspressioonivektorid kujul, mis tänu tsentrosoomsele järjestusele (CEN6) ja autonoomsele replikatsiooni järjestusele (ARS4) (Tabel 2) sobivad pärmis paljundamiseks.



Joonis 4. pRS315-*HA-HMI1* mutantide kontrollrestriktsioon. Joonisel on välja toodud agarosegeelil analüüsitud plasmiidid pRS315-*HA-HMI1* asendatud mutatsioone sisaldava *HMI1* fragmendiga. Tehtud on kontrollrestriktsioon fragmendi olemasolu kontrolliks. Välja on toodud järgmised mutandid: E211Q, D237N, Q240E, Q240N, Y243A. „Lin“ tähistab lineariseeritud plasmidi (kontroll), „Rt“ tähistab restrikteeritud wt plasmidi (kontroll). Markerina on kasutatud *Thermo Fisher 1 kb DNA Ladder*.

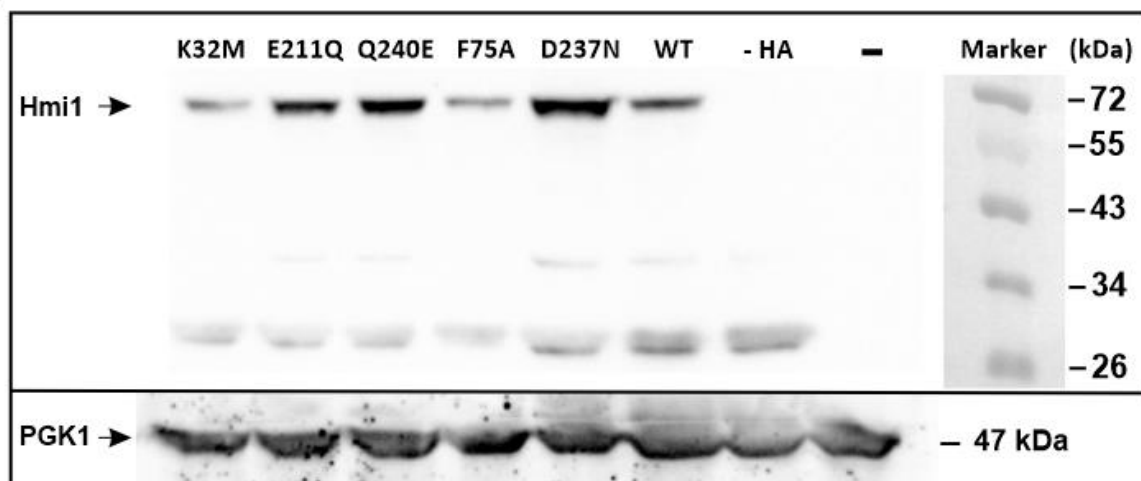
2.3.2. Hmi1 mutantide ekspressiooni ja stabiilsuse analüüs *S. cerevisiae* haploidsetest rakkudes

Töös konstrueeritud plasmiidid transformeeriti pärmi rakkudesse ning külvati SC – Leu tardsöötmetele, kus elujõulised said olla vaid LEU2 geeniga ekspressioonivektoreid sisaldavad pärmid. Iga transformatsiooni kohta valiti kaks kolooniat (kaks bioloogilist koopiat), mis kasvatati üles ning lüüsiiti kasutades klaaskuulide meetodit. Saadud lüsaat denatureeriti SDS laadimisvärvis ning analüüsiti 10% SDS-polüakrüülamiidgeelil.

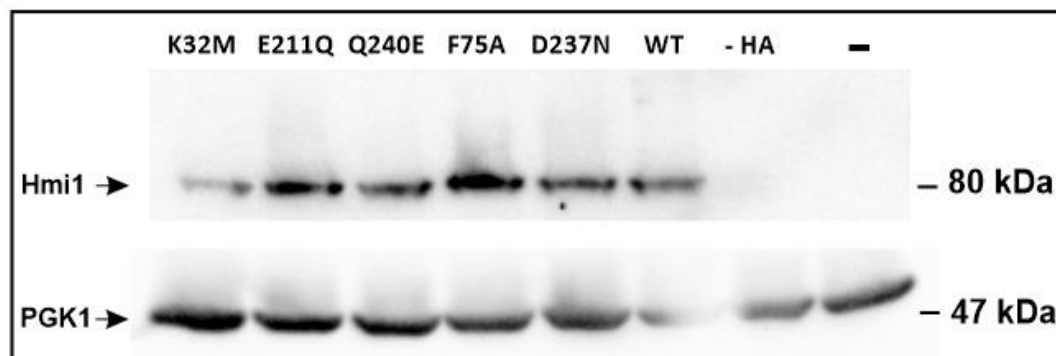
Western bloti meetodil *HA tag*-iga märgistatud Hmi1 valkude detekteerimiseks kanti valgud 10% SDS-polüakrüülamiidgeelilt sobiva poorisuurusega nitrotselluloos membraanile üle. Valkude ülekandumist kontrolliti *Ponceau*-ga värvimisel. Kasutatud antikehade seas olid konjugeeritud *HA tag*-i vastane *Anti-HA*-peroksidaasi ja PGK1 sekundaarne antikeha *Anti-Mouse* HRP, mis tähendab, et neile oli lisatud Mädarõika peroksüdaas (*ing. Horseradish peroxidase*), mis tootis tulemuste visualiseerimiseks vajalikku detekteeritavat valgust kemoluminotsentsi reaktsiooniga, reageerides *Western Blotting Detection Reagentkit*-i Sol A ja Sol B-ga. Joonistel 5 ja 6 on näidatud Hmi1 kõigi mutantide ja kontrollide analüüs *Western blot* meetodiga. Kõikidel radadel, kus plasmidi pealt eeldatavalt Hmi1 valku peaks tehtama, on näha, et Hmi1 valk on

ekspresseerunud ja valgu suurus vastab markeri suurusele. PGK1 on *housekeeping* valk, mida kasutati peale kantud valkude hulga kontrollina ning ka kõigil nendel radadel on näha valgu ekspressiooni. Joonistel on näha ka ebaspetsiifikat, mis polnud üheski katses sama intensiivsusega kui uuritavad produktid. Üllataval kombel oli seda näha kõikides, ka *HA-HMI1* valku mitte sisaldavas proovis, millest järeldati, et antikeha võis seonduda näiteks mõne *HA tag*-iga sarnast järjestust omavale valgule. Ebaspetsiifika polnud aga igas katses sama tugev, mis võib viidata ka ebapiisavale blokeerimisele – rakkudes on väga palju erinevaid valke, millest nii mõnigi teine võis omada *HA tag*-iga sarnast järjestust (millele antikeha seonduda sai). Hmi1 valgu laguprodukte nendes katsetes ei detekteeritud.

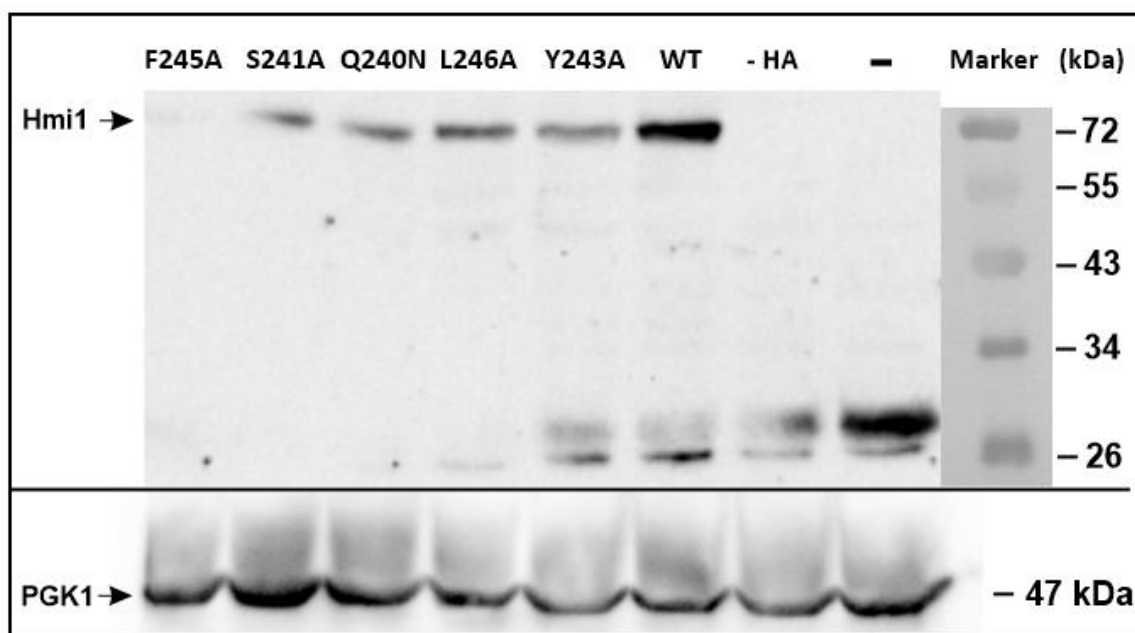
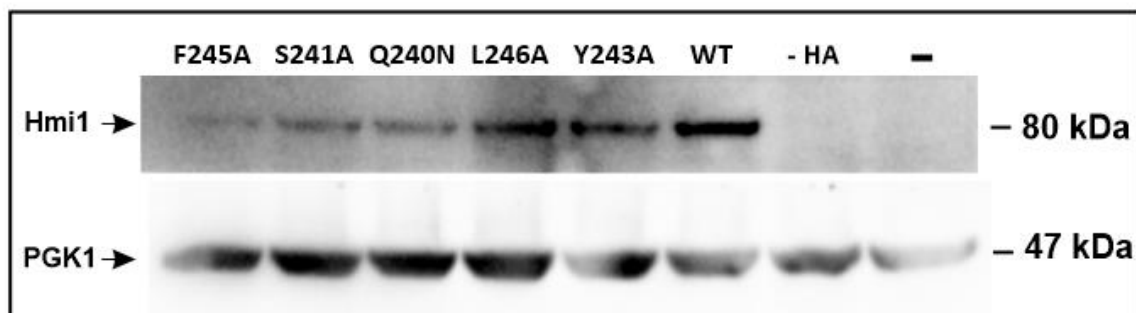
A



B



Joonis 5. Hmi1 mutantide K32M, E211Q, Q240E, F75A, D237N detekteerise tulemused Western blot-i meetodi abil. Joonistel A ja B on (kahes korduses) välja toodud kõigis katses kontrollitud valkude kogused. Mõlemal joonisel on noolega tähistatult välja toodud detekteeritud valk. Vasakult paremale: *HA tag*-iga Hmi1 mutandid K32M, E211Q, Q240E, F75A, D237N; “WT” tähistab metsiktüüpi *HA tag*-iga Hmi1 valku, “-HA” tähistab ilma *HA tag*-ita wt Hmi1 valgu veergu (pärmi transformeeriti plasmiid pRS315-HMI1) ning “-” tähistab ilma *HA*-Hmi1 valguta veergu (pärmi transformeeriti plasmiid pRS315). PGK1 valk oli detekteeritud kontrolliks. Markerina kasutati PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa.

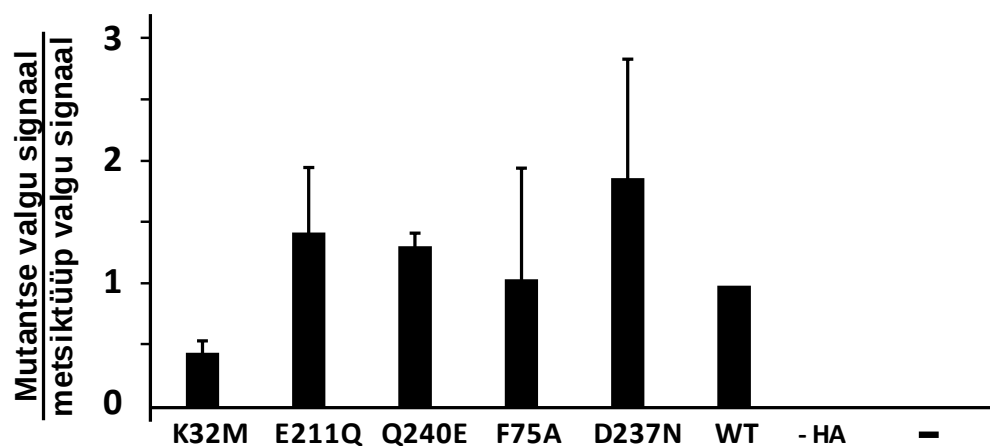
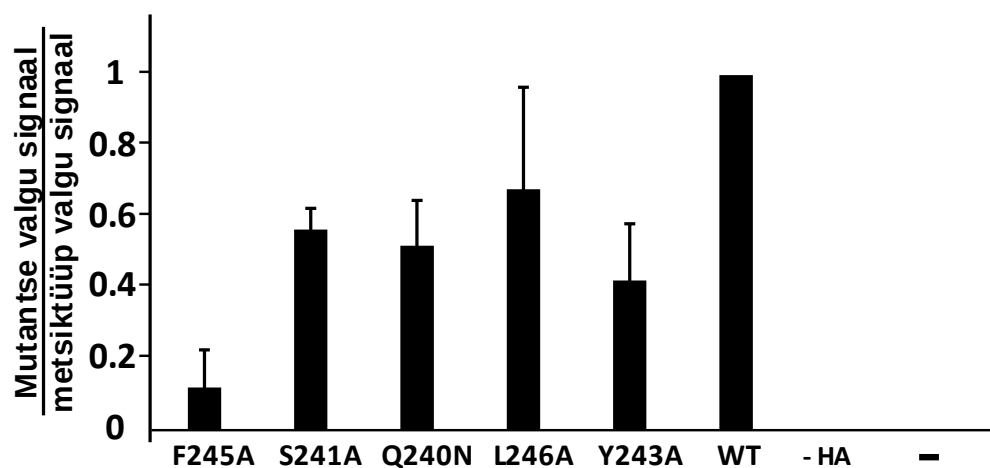
A**B**

Joonis 6. Valgu HA-Hmi1 mutantide mutantide F245A, S241A, Q240N, L246A ja Y243A detekteerise tulemused Western blot-i meetodi abil. Joonistel A ja B on (kahes korduses) välja toodud kõigis katses kontrollitud valkude kogused. Mõlemal joonisel on noolega tähistatud detekteeritud valk. Vasakult paremale: HA tag-iga Hmi1 mutjaid F245A, S241A, Q240N, L246A ja Y243A; “WT” tähistab metsiktüüpi HA tag-iga Hmi1 valku, “-HA” tähistab ilma HA tag-ita wt Hmi1 valgu veergu (pärmi transformeeriti plasmiid pRS315-HMI1) ning “-” tähistab ilma HA-Hmi1 valguta veergu (pärmi transformeeriti plasmiid pRS315). PGK1 valk oli detekteeritud kontrolliks. Markerina kasutati *PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa*.

Western bloti tulemused on enda olemuse poolest semi-kvantitatiivsed: tulemused võimaldavad erinevate radade võrdlusel näha erinevusi valkude hulgas, kuid mitte absoluutset hulka. See on tingitud variantsioonidest SDS geelile lisatud proovide hulgast ning membraanile laadumise efektiivsusest. ImageJ programmi abil viidi läbi kvantifikatsioon, milles võeti iga valgu raja signaali tugevus ning eemaldati taust. Western blotil nähtud Hmi1 valgu mutantide ja kontrollide (Tabel 3, 4) signaali tugevust võrreldi samade proovide pärmi glükolüüsi raja fosfoglutseraat

kinaas (PGK1; *housekeeping* valk) ensüümi laadimiskontrolli saadud signaali hulgaga (peatükk 2.2.14.). Selliselt võrreldi *HA tag*-iga valkude hulka pärmi rakkudes, mis normaliseeriti metsiktüüpi Hmi1 valgu suhtes.

Kõik kontrollid ja III motiivi mutatsioonidega Hmi1 valgud olid detekteeritavad ning nähtavad konkreetse kogumina, mis näitas, et valke ekspresseeriti. Kõikidest proovidest oli kõige vähem mutante F245A, Y243A, K32M ja (joonised 5, 6, 7A ja B), vastavalt 12%, 43% ja 45% metsiktüübi võrreldes (100% ehk normaal hulgast). E211Q (144%), Q240E (133%) ja D237N (188%) mutante (joonis 7A) detekteeriti isegi rohkem kui metsiktüüpi Hmi1 valku (D237N varieeruvus oli aga suurim kõigist mutantidest). Q240N ja S241A aga ligi kaudu poole vähem kui *wt*, vastavalt 52% ja 56% (joonis 7B). L246A (68%) puhul oli kahe katse jookusl näha suurt kõikumist, mis varieerus nii metsiktüübiga sarnase koguse kui ka madalama vahel (joonis 7B). Metsiktüübiga oli kõige lähedasem mutant F75A (105%) (joonis 7B), kuigi ka selle varieeruvus oli katsete jookusl väga suur.

A**B**

Joonis 7. Mutantsete Hmi1 valkude hulk pärmis metsiktüüpi Hmi1 valgu suhtes. Tulpdiagramm ImageJ programmiga kvantifitseeritud HA-Hmi1 mutantide signaalidest, mida võrreldi koduhoidja valgu PGK1 signaaliga ning normaliseeriti metsiktüüpi (WT) HA-Hmi1 suhtes (peatükk 2.2.14.). “-HA” tähistab ilma *HA tag*-ita metsiktüüpi Hmi1 valku (pärmis transformeeriti plasmiid pRS315-*HMI1*) ning “-” tähistab ilma HA-Hmi valguta veergu (pärmis transformeeriti plasmiid pRS315). Tulpadena on tähistatud kõigi provide kahe *Western blot*-i katse keskmine valgu hulk metsiktüübiga võrrelduna, veapiir tähistab standardhälvet.

2.4. Arutelu

Varasemalt oli meie laboris näidatud, et mutatsioonid Hmi1 valgu I, II ja III motiivis põhjustavad pärmi respiratoorse funktsiooni kadu (Sedman *et al.*, 2000, Sillamaa 2018). Sealjuures näitasid III motiivi mutandid kõigi teiste motiivi mutantidega võrreldes kõige tugevamat respiratoorse võimekuse kadumise fenotüüpi.

Selles töös käsitletud Hmi1 aminohapetega K32, F75, E211, D237, Q240 ja Y243 on varasemalt katseid teinud Sirelin Sillamaa enda 2018 aasta magistritöös, milles ta näitas, et osade nende aminohapete vahetus alandab pärmi rakkude respiratoorset võimekust. Lisaks on osade nende aminohapetega tehtud asendusi ka varasemates töödes (Brosh ja Matson, 1996; Korolev *et al.*, 1997; Dillingham *et al.*, 1999; Velankar *et al.*, 1999; Lee ja Yang, 2006). F75 on oletatavalt motiivide väline aminohape, mille fenotüüp S. Sillamaa töö katsetes oli peaaegu olematu ning siin töös on seda kasutatud kontrollina. E211, D237, Q240 ja Y243 vastavad para- ja homoloogides samuti samadele aminohapetele (on konserveerunud) ning nende detailsem kirjeldus ja varasemate katsete tulemused on välja toodud kirjanduse ülevaates (peatükk 1.4., 1.5., 1.7.). Lisaks käsitleti ka aminohappeid S241, F245 ja L246. S241 on küll kõrgelt konserveerunud, kuid sellega pole varem katseid tehtud. Fenüülalaniin F245, mis teistes homoloogiliste valkude motiiv III sarnases positsioonis trüptofaanina (W) konserveerunud, on Hmi1 valgu paraloogis, Srs2 valgus sama mis Hmi1 valgu puhul. Põnevaks asjaoluks on see, et kõigis teistes Hmi1-ga sarnastes valkudes on Hmi1 246. positsiooni leutsiin (L) homoloogilises asukohas konserveerunud arginiinina (R), mis on leutsiinist veidi suurem ning positiivse laenguga aminohape. Võimalik, et see aminohape täidab siin siiski sarnast funktsiooni, kuigi välistatud pole, et seda täidab Hmi1 puhul mõni teine aminohape. F245 ja L246 relatiivset funktsiooni on detailsemalt kirjeldatud kirjanduse ülevaates (peatükk 1.7.). Antud töö tulemuste kontekstis on oluline mõista nii aminohapete ehitust ja tööd sarnastes valkudes kui ka Hmi1 mutantidega nähtud fenotüüpe, mis kõik aitavad neid *Western blot*-i tulemusi tõlgendada.

Nähtud tulemustel on mitmeid võimalusi nende interpretatsiooniks. Esiteks oli standardhälve teatud mutantsete valkude hulkade vahel relatiivselt suur, mis võib viidata rakkude lüüsi ebaühtlusele neis proovides. Tulevastes katsetes saaks eeldatavasti paremaid tulemusi, kui optimeerida rakkude lüüsi või kontrollida analüüsitud valkude ekspressiooni pärmi mitkokondrites. Pärmi mitokondrite valkude puhastamisel on samuti ka lüüsi tingimused õrnemad ning saadud preparaat on puhtam ja kontsentreeritum, millest tulenevalt oleks kätte saadav valkude hulk katsete vahel tõenäoliselt ühtlasem.

Üks mutantidest, mida oli kahe katse keskmiselt rohkem kui *wt* oli Hmi-D237. Selle negatiivselt laetud aminohappe asendusega neutraalse vastu (N) ei ole UvrD helikaasis nähtud

märkimisväärseid funktsionaalseid muutuseid (Brosh ja Matson, 1996). S. Sillamaa katsetes oli ka selle mutatsiooni mõju rakkude respiratoorsele võimekusele väike. Arvestades selle valgus hulga suurt kõikumist ja selle piire katsete vahel (joonis 7A) võib oletada, et seda mutanti oli metsiktüübiga siiski võrdlemisi sarnases koguses ning seega pole ka D237N vahetusel olulist mõju valgus kogusele rakus. E211Q puhul on varasemalt nähtud järsku rakkude respiratoorse võimekuse langust aja jooksul madala glükoosisisaldusega söötmetel kasvades. Samuti on sellise aminohappe vahetuse puhul nähtud ATP-hüdrolüüsi kadumist, ka Hmi1 jaoks olulise kofaktori, ssDNA, sidumisel (Sillamaa, 2018; Kuusk *et al.*, 2005). Selle töö katsetes nähtud valgus koguse suur kõikumine võrreldes *wt* kogusega (joonis 7A) viitab sarnaselt D237N puhul nähtule, sellele, et see mutatsioon ei mõjuta niivõrd palju valgus kogust rakus kui et funktsioon. Ei saa aga täielikult välistada nende mutantsete valkude valesti voltumist ja raskesti degradeeritavate kompleksite tekkimist. Sellest tulenevalt võidi ka detekteerida paljusid valke, mis teiste seas ei täida oma funktsioone, kuid mida pole veel degradeeritud ning millest tulenevalt ka suuremat valkude kogust katsetes kohati nähti (ülevaade Jackson ja Hewitt, 2016).

Q240E puhul on E211Q-ga S. Sillamaa 2018 magistr töö samas katses samuti nähtud tugevat mõju rakkude respiratoorsele võimekuse kaotusele. Kuigi antuud töö katsetes detekteeriti seda mutanti küll keskmisena veidi rohkem kui *wt*, saab varieeruvat ebaefektiivset lüüsi arvestades oletada, et selle relatiivne kogus *wt*-ga on võrdlemisi sama. Sama aminohappe vahetus arginiini (N) vastu tõi kaasa aga pea poole väiksema mutandi valgus koguse *wt*-ga võrreldes. Kuigi need aminohapped (Q, N) pole väga erinevad, tõi see kaasa sellise suure muutuse, mis viitab glutamiini põhjendatud suurele konserveeritusele (ka teistel UvrD/Rep-sarnaste liikmetel on glutamiin homoloogilises kohas konserveerunud). Tulenevalt Q240E asukohast ja interaktsioonidest ATP-d siduvas vaos võib oletada, et nähtud fenotüüpi ei mõjuta valgus kogus vaid häiritud funktsioon, mida võivad põhjustada negatiivse glutamiinhappe laengu interaktsioonid vee molekuli ja ATP γ -fosfaadiga. Q240N puhul võib probleem olla aga struktuurne ning on võimalik, et valku degradeeritakse sagedamini kui ekspresseeritakse.

Ka teiste mutantide puhul, mida nähti *Western blot*-il vähem kui metsiktüüpi valku, saab tulemusi mitmeti tõlgendada. Kuigi PGK1 ekspressioon näitas, et rakke oli sama palju lüüsitud kui teisi, oli näha Hmi1-K32M mutandi madalamat kogust teiste mutantide ja *wt*-ga (joonis 5, 7A). Kuna K32M suhtelist vähesemat kogust on ka varasemates *Western blot*-i katsetes nähtud, võib oletada, et ka siin katses pole see ka juhuslik (Sedman *et al.*, 2000). Viimase nelja kontrollitud aminohappe (S241, Y243, F245, L246) puhul tehti vahetusedalaniini vastu. See on väiksem ning mittepolaarne aminohape, mille asendusega kontrollitakse üldiselt aminohappe vahetusest tingitud valkude funktsioonide ja struktuuri häiritust, mida võivad üldiselt põhjustada asendatud

aminohappe kõrvalahela jääkide puudumine. S241A ja L246A mutante oli küll *wt*-ga võrreldes ligi poole vähem, kuid kahe ülejäänuga võrreldes oli neid rohkem (joonis 7B). See võib teistega võrdluses viidata nende mutantide paremale valgu struktuuri stabiilsusele. Kuigi L246, mille teistes Hmi1 perekonna helikaasides homoloogilises kohas asuv aminohape on asendamatuks osaks ssDNA sidumise kanalist, ei olnud selle aminohappe vahetus nii drastilise tulemusega kui F245- ja Y243A (joonis 7B). F245A-d detekteeriti III motiivi mutantidega võrdluses ja kõikidest kontrollidest kõige vähem, mis oli peaaegu detekteerimatu osades Western bloti kordustes. Hmi1-Y243A näitas eelnevates S. Sillamaa katsetes tugevaimat respiratoorse defekti fenotüüpi ja sarnaselt E211Q-le täielikult puuduvat ATP hüdrolyüsi aktiivsust ka ssDNA olemasolul. Ka selle mutandi valgu suhteline tase oli *wt*-ga võrreldes madal. Need aminohapped, fenüülalaniin (F) ja trürosiin (Y) omavad aromaatsset kõrvalahelat ning interakteeruvad ssDNA kanalis üheaahelalise DNA nukleotiidide lämmastikalustega, olles teistes Hmi1 homoloogides lahutamatuks osaks ankur struktuuris (peatükk 1.7.). Oluliselt väiksemat suhtelist detekteeritud valgu hulka näidanud tulemused ning nende viie aminohappe arvatav asukoht kahe liikuva domääni, 1A ja 2A, vahel kõrgemat järku struktuuris võib seega viidata tekkinud struktuurilistele ebastabiilsustele, mille tagajärjel degradeeritakse neid *wt* valgust oluliselt rohkem (ülevaade Hipp *et al.*, 2014).

Kokkuvõttes said püstitatud eesmärgid täidetud, küll aga oleks tulevastest töodes vaja kindlasti neid katseid korrata efektiivsema lüüsi meetodiga, tagamaks usaldusväärsemaid ja ühtlasemaid andmeid. Kindlasti oleks põnev ka uurida nende ja teiste motiivide mutantide ekspressiooni mitokondrites ja pärmis üldiselt. Hmi1 projekti raames oleks väga olulisel kohal selle valgu kristallstruktuuri tegemine, eelneva kinnitamine ja edasine biokeemiliste omaduste ja funktsioonide uurimine. Nähes, et teised para- ja homoloogilised helikaasid töötavad koos paljude teiste valkudega, oleks ka Hmi1 interaktsioonide uurimine teiste valkudega huvitav. Kõigi varasemate, küsimusi tekitavate tulemuste valguses, kus Hmi1 valku oli kas väga raske või võimatu puhastada või kus Hmi1 helikaas ei vajanud ATP-d oma siiani teadaolemata spetsiifilisema funktsiooni ellu viimiseks, võib näiteks Hmi1 valgu kompleksis olemine mõne teise valguga aidata seletada varem nähtut ning lihtsustaks selle omapärase valgu funktsiooni mõistmist pärmis rho⁺ mtDNA stabiilsuse tagamisel (Sedman *et al.*, 2000; Kuusk *et al.*, 2005; Sedman *et al.*, 2005, Sirelin Sillamaa 2018 aasta magistritöö).

KOKKUVÕTE

S. cerevisiae võime ellu jääda ka puuduliku mitokondriaalse genoomiga võimaldab uurida erinevate valkude, sealhulgas helikaaside tähtsust ja rolli täisväärtusliku mtDNA metabolismil. Hmi1 on SF1 UvrD/Rep-sarnaste perekonda kuuluv mitokondriaalne helikaas, mille puhul on varasemates katsetes näidatud tema olulisust ρ^+ mtDNA stabiilsuse säilitamisel (Sedman *et al.*, 2000). Varasemates katsetes on toodud välja Hmi1 homoloogides III motiivi aminohapete rollid ssDNA sidumise ning ATP ja helikaasse aktiivsuse võtmes (Subramanya *et al.*, 1996; Korolev *et al.*, 1997; Velankar *et al.*, 1999; Dillingham *et al.*, 1999; Lee ja Yang, 2006). Ka meie uurimisgruppi liige, S. Sillamaa, on varasemalt oma magistriöö katsetega näidanud selle motiivi tähtsust Hmi1 funktsiooni säilitamisel mitokondris, kus aminohapete vahetused selles motiivis põhjustasid pärmide mtDNA ebastabiilsust ja sellest tulenevat respiratoorse võimekuse langust.

Selle bakalaureuse töö eesmärgiks oli uurida nende seitsme erineva III motiivi mutandi ja kahe teise motiivi (I ja II) mutantide suhtelist kogust pärmis. Selleks asendati iga mutatsiooni kohta pärmis paljuneva plasmidi *HA-HMI1* geeni fragment varasemalt S. Sillamaa poolt tehtud mutatsioone sisaldava *HMI1* geeni fragmendiga. Seejärel analüüsiti ekspresseeritud valkude suhtelist kogust lüüsitud pärmi rakkude kõigi valkude hulgast *Western blot*-i meetodiga.

Kuigi saadud tulemuste veapiirid olid suured, oli nende põhjal näha aminohapete vahetuste Q240N, S241A, Y243A, F245A ja L246A oletatava kõrgemat järku struktuuris paiknemise asukoha, funktsiooni ning valgu vähesema koguse (metsiktüübiga võrrelduna) vahelist korrelatsiooni, mis Q240N ja Y243A puhul aitavad mõista ka nende varasemalt nähtud respiratoorset fenotüüpi.

The effects of point mutations in mitochondrial DNA helicase Hmi1

III motif on the relative amount of Hmi1 protein in yeast

Alex Ajangu

Summary

The ability of *S. cerevisiae* to survive with a defective mitochondrial genome allows us to study the important roles of different proteins, including helicases, in the preservation of fully functional mtDNA. Hmi1 is a yeast mitochondrial helicase which belongs to the SF1 UvrD/Rep-like family, and has been shown in previous experiments to have a crucial role in maintaining the stability of rho⁺ mtDNA (Sedman *et al.* 2000). The roles of motif III amino acids in Hmi1 homologues have been previously linked with ssDNA binding, ATPase and helicase activity (Subramanya *et al.* 1996; Korolev *et al.* 1997; Velankar *et al.* 1999; Dillingham *et al.* 1999; Lee and Yang 2006). A member of our research group, S. Sillamaa, has also previously shown in her master's thesis the importance of this motif in maintaining the function of Hmi1 in the mitochondria, where amino acid changes in this motif caused yeast mtDNA instability and consequent decreased respiratory capacity.

The aim of this study was to investigate the relative amount of seven different mutants of the III motif Hmi1 protein in yeast. For each mutation, a *HA-HMI1* gene fragment from a yeast-propagating plasmid was switched with an equivalent *HMI1* gene fragment containing the mutations previously made by S. Sillamaa, and the signal of mutant proteins of interest were detected from the total protein of the lysed yeast cells by Western blot method.

Although the margins of error were large, they showed a correlation between the putative higher order location, function, and lower protein amount (compared to wild-type) of Q240N, S241A, Y243A, F245A, and L246A, which also help to understand the previously seen respiratory phenotype of Q240N and Y243A.

TÄNUAVALDUSED

Soovin siin kohal tõesti südamest tänada enda juhendajat, Vladi, kes aitas mind sõna otseses mõttes iga kell ja iga võimaliku asjaga aitas ning kellest on selle seiklusterohke teekonna jooksul saanud ka hea sõber. Sirelini, kes oli karm, aga õiglane alustala kogu selle töö valmimise protsessis, laskmata mul end lõdvaks lasta ning kes aitas nõu ja jõuga. Tiinat, kes oli alati abivalmis ja vastutulelik ning tänu kellele sain palju häid nõuandeid ja mõtteid. Sooviks tänada ka kõiki teisi inimesi meie laboris, kes aitasid alati millega oskasid. Viimaks sooviks tänada enda vanemaid, kes mind alati mõistsid ning tegid kõik endast oleneva, et ma saaks alati õppida ning oma sõpru, kes tuju rõõmsana hoidsid.

KIRJANDUSE LOETELU

- Ali, J. A., Maluf, N. K. ja Lohman, T. M. (1999). An oligomeric form of E. coli UvrD is required for optimal helicase activity¹¹Edited by D. E. Draper. *Journal of Molecular Biology*, 293(4), 815–834. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3185>
- Arai, N. ja Kornberg, A. (1981). Rep protein as a helicase in an active, isolatable replication fork of duplex phi X174 DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(10), 5294–5298.
- Bassett, D. E., Boguski, M. S. ja Hieter, P. (1996). Yeast genes and human disease. *Nature*, 379(6566), 589–590. <https://doi.org/10.1038/379589a0>
- Bird, L. E., Subramanya, H. S. ja Wigley, D. B. (1998). Helicases: A unifying structural theme? *Current Opinion in Structural Biology*, 8(1), 14–18. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(98\)80004-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(98)80004-3)
- Brosh, R M ja Matson, S. W. (1995). Mutations in motif II of Escherichia coli DNA helicase II render the enzyme nonfunctional in both mismatch repair and excision repair with differential effects on the unwinding reaction. *Journal of Bacteriology*, 177(19), 5612–5621. <https://doi.org/10.1128/JB.177.19.5612-5621.1995>
- Brosh, Robert M. ja Matson, S. W. (1996). A Partially Functional DNA Helicase II Mutant Defective in Forming Stable Binary Complexes with ATP and DNA: A ROLE FOR HELICASE MOTIF III*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(41), 25360–25368. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.41.25360>
- Burgess, R. C., Lisby, M., Altmannova, V., Krejci, L., Sung, P. ja Rothstein, R. (2009). Localization of recombination proteins and Srs2 reveals anti-recombinase function in vivo. *Journal of Cell Biology*, 185(6), 969–981. <https://doi.org/10.1083/jcb.200810055>
- Caron, P. R., Kushner, S. R. ja Grossman, L. (1985). Involvement of helicase II (uvrD gene product) and DNA polymerase I in excision mediated by the uvrABC protein complex.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(15), 4925–4929.
<https://doi.org/10.1073/pnas.82.15.4925>
- Chang, T.-L., Naqvi, A., Anand, S. P., Kramer, M. G., Munshi, R. ja Khan, S. A. (2002). Biochemical Characterization of the *Staphylococcus aureus* PcrA Helicase and Its Role in Plasmid Rolling Circle Replication. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 45880–45886. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207383200>
- Chen, X. J. ja Clark-Walker, G. D. (2000). The petite mutation in yeasts: 50 years on. *International Review of Cytology*, 194, 197–238. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62397-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62397-9)
- Dillingham, M. S., Soultanas, P. ja Wigley, D. B. (1999). Site-directed mutagenesis of motif III in PcrA helicase reveals a role in coupling ATP hydrolysis to strand separation. *Nucleic Acids Research*, 27(16), 3310–3317. <https://doi.org/10.1093/nar/27.16.3310>
- Fairman-Williams, M. E., Guenther, U.-P. ja Jankowsky, E. (2010). SF1 and SF2 helicases: Family matters. *Current opinion in structural biology*, 20(3), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.03.011>
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. ja Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 440(3), 325–331. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01467-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01467-7)
- Gorbalenya, A E, Koonin, E. V., Donchenko, A. P. ja Blinov, V. M. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Research*, 17(12), 4713–4730.
- Gorbalenya, Alexander E. ja Koonin, E. V. (1993). Helicases: Amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current Opinion in Structural Biology*, 3(3), 419–429. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(05\)80116-2](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(05)80116-2)
- Graves-Woodward, K. L., Gottlieb, J., Challberg, M. D. ja Weller, S. K. (1997). Biochemical Analyses of Mutations in the HSV-1 Helicase-Primase That Alter ATP Hydrolysis, DNA

- Unwinding, and Coupling Between Hydrolysis and Unwinding. *Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 4623–4630. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.7.4623>
- Graves-Woodward, K. L. ja 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. *Journal of Biological Chemistry*, 271(23), 13629–13635. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13629>
- Hall, M. C. ja Matson, S. W. (1999). Helicase motifs: The engine that powers DNA unwinding. *Molecular Microbiology*, 34(5), 867–877. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01659.x>
- Hall, Mark C, Özsoy, A. Z. ja Matson, S. W. (1998). Site-directed mutations in motif VI of Escherichia coli DNA helicase II result in multiple biochemical defects: Evidence for the involvement of motif VI in the coupling of ATPase and DNA binding activities via conformational changes. *Journal of Molecular Biology*, 277(2), 257–271. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1614>
- Heijne, G. von. (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *The EMBO Journal*, 5(6), 1335–1342. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04364.x>
- Hipp, M. S., Park, S.-H. ja Hartl, F. U. (2014). Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends in Cell Biology*, 24(9), 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.05.003>
- Hotta, Y. ja Stern, H. (1978). DNA unwinding protein from meiotic cells of Liliun. *Biochemistry*, 17(10), 1872–1880. <https://doi.org/10.1021/bi00603a011>
- Jackson, M. P. ja Hewitt, E. W. (2016). Cellular proteostasis: Degradation of misfolded proteins by lysosomes. *Essays in Biochemistry*, 60(2), 173–180. <https://doi.org/10.1042/EBC20160005>

- Kaguni, L. S., Kaguni, J. M. ja Ray, D. S. (1981). Replication of M13 oriC bacteriophages in *Escherichia coli* rep mutant is dependent on the cloned *Escherichia coli* replication origin. *Journal of Bacteriology*, 145(2), 974–979.
- Korolev, S., Hsieh, J., Gauss, G. H., Lohman, T. M. ja Waksman, G. (1997). Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of *E. coli* Rep helicase bound to single-stranded DNA and ADP. *Cell*, 90(4), 635–647. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80525-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80525-5)
- Korolev, Sergey, Lohman, T. M., Waksman, G., Yao, N. ja Weber, P. C. (1998). Comparisons between the structures of HCV and Rep helicases reveal structural similarities between SF1 and SF2 super-families of helicases: Comparison study of the HCV and Rep helicase structures. *Protein Science*, 7(3), 605–610. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070309>
- Krajewski, W. W., Fu, X., Wilkinson, M., Cronin, N. B., Dillingham, M. S. ja Wigley, D. B. (2014). Structural basis for translocation by AddAB helicase–nuclease and its arrest at χ sites. *Nature*, 508(7496), 416–419. <https://doi.org/10.1038/nature13037>
- Kuusk, S., Sedman, T. ja Jöers, P. (2005). Hmi1p from *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria Is a Structure-specific DNA Helicase. *The Journal of biological chemistry*, 280, 24322–24329. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500354200>
- Lee, C. M., Sedman, J., Neupert, W. ja Stuart, R. A. (1999). The DNA Helicase, Hmi1p, Is Transported into Mitochondria by a C-terminal Cleavable Targeting Signal. *Journal of Biological Chemistry*, 274(30), 20937–20942. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.20937>
- Lee, J. Y. ja Yang, W. (2006). UvrD Helicase Unwinds DNA One Base Pair at a Time by a Two-Part Power Stroke. *Cell*, 127(7), 1349–1360. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.049>
- León Ortiz, A. M., Reid, R. J. D., Dittmar, J. C., Rothstein, R. ja Nicolas, A. (2011). Srs2 overexpression reveals a helicase-independent role at replication forks that requires diverse cell functions. *DNA Repair*, 10(5), 506–517. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.02.004>

- Lohman, T. M. ja Bjornson, K. P. (1996). Mechanisms of Helicase-Catalyzed DNA Unwinding. *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), 169–214. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.001125>
- MacAlpine, D. M., Kolesar, J., Okamoto, K., Butow, R. A. ja Perlman, P. S. (2001). Replication and preferential inheritance of hypersuppressive petite mitochondrial DNA. *The EMBO Journal*, 20(7), 1807–1817. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1807>
- Maleszka, R., Skelly, P. J. ja Clark-Walker, G. D. (1991). Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *The EMBO Journal*, 10(12), 3923–3929. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04962.x>
- Maluf, N. K., Fischer, C. J. ja Lohman, T. M. (2003). A Dimer of Escherichia coli UvrD is the Active Form of the Helicase In Vitro. *Journal of Molecular Biology*, 325(5), 913–935. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01277-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01277-9)
- 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 Biology*, 10(9), R95. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-9-r95>
- Milne, G. T., Ho, T. ja Weaver, D. T. (s.a.). *Modulation of Saccharomyces certwkie DNA Double-Strand Break Repair by SRS2 and RAD5*. 11.
- Modrich, P. (1994). Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science*, 266(5193), 1959–1961.
- Naqvi, A., Tinsley, E. ja Khan, S. A. (2003). Purification and Characterization of the PcrA Helicase of Bacillus anthracis. *Journal of Bacteriology*, 185(22), 6633–6639. <https://doi.org/10.1128/JB.185.22.6633-6639.2003>
- Niu, H., Potenski, C. J., Epshtein, A., Sung, P. ja Klein, H. L. (2016). Roles of DNA helicases and Exo1 in the avoidance of mutations induced by Top1-mediated cleavage at

- ribonucleotides in DNA. *Cell Cycle*, 15(3), 331–336.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1128594>
- Pause, A. ja Sonenberg, N. (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: The mammalian translation initiation factor eIF-4A. *The EMBO Journal*, 11(7), 2643–2654.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05330.x>
- Raney, K. D., Byrd, A. K. ja Aarattuthodiyil, S. (2013). Structure and Mechanisms of SF1 DNA Helicases. *Advances in experimental medicine and biology*, 767.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5037-5_2
- Saikrishnan, K., Powell, B., Cook, N. J., Webb, M. R. ja Wigley, D. B. (2009). Mechanistic basis of 5'-3' translocation in SF1B helicases. *Cell*, 137(5), 849–859.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.036>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. ja Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sedman, T., Gaidutšik, I., Villemson, K., Hou, Y. ja Sedman, J. (2014). Double-stranded DNA-dependent ATPase Irc3p is directly involved in mitochondrial genome maintenance. *Nucleic Acids Research*, 42(21), 13214–13227. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1148>
- Sedman, T., Jõers, P., Kuusk, S. ja Sedman, J. (2005). Helicase Hmi1 stimulates the synthesis of concatemeric mitochondrial DNA molecules in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 47(4), 213–222. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0566-4>
- Sedman, T., Kuusk, S., Kivi, S. ja Sedman, J. (2000). A DNA Helicase Required for Maintenance of the Functional Mitochondrial Genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 20(5), 1816–1824. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.5.1816-1824.2000>
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N. ja Meisinger, C. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), 13207–13212. <https://doi.org/10.1073/pnas.2135385100>

- Sikorski, R. S. ja 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.
- Singleton, M. R., Dillingham, M. S., Gaudier, M., Kowalczykowski, S. C. ja Wigley, D. B. (2004). Crystal structure of RecBCD enzyme reveals a machine for processing DNA breaks. *Nature*, 432(7014), 187–193. <https://doi.org/10.1038/nature02988>
- Singleton, M. R., Dillingham, M. S. ja Wigley, D. B. (2007). Structure and Mechanism of Helicases and Nucleic Acid Translocases. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 23–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052305.115300>
- Stelter, M., Acajjaoui, S., McSweeney, S. ja Timmins, J. (2013). Structural and Mechanistic Insight into DNA Unwinding by *Deinococcus radiodurans* UvrD. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077364>
- Story, R. M. ja Steitz, T. A. (1992). Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature*, 355(6358), 374–376. <https://doi.org/10.1038/355374a0>
- Subramanya, H. S., Bird, L. E., Brannigan, J. A. ja Wigley, D. B. (1996). Crystal structure of a DExx box DNA helicase. *Nature*, 384(6607), 379–383. <https://doi.org/10.1038/384379a0>
- Zhang, G., Deng, E., Baugh, L. ja Kushner, S. R. (1998). Identification and Characterization of *Escherichia coli* DNA Helicase II Mutants That Exhibit Increased Unwinding Efficiency. *Journal of Bacteriology*, 180(2), 377–387. <https://doi.org/10.1128/JB.180.2.377-387.1998>
- Takahashi, S., Hours, C., Chu, A. ja Denhardt, D. T. (1979). The rep mutation. VI. Purification and properties of the *Escherichia coli* rep protein, DNA helicase III. *Canadian Journal of Biochemistry*, 57(6), 855–866. <https://doi.org/10.1139/o79-105>
- Tzagoloff, A. ja Myers, A. M. (1986). Genetics of Mitochondrial Biogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, 55(1), 249–285. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.001341>

- Tzagoloff, A. ja Dieckmann, C. L. (1990). PET Genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *MICROBIOL. REV.*, 54, 15.
- Veaute, X., Delmas, S., Selva, M., Jeusset, J., Cam, E. L., Matic, I., Fabre, F. ja Petit, M.-A. (2005). UvrD helicase, unlike Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filaments in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 24(1), 180–189. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600485>
- Veaute, X., Jeusset, J., Soustelle, C., Kowalczykowski, S. C., Le Cam, E. ja Fabre, F. (2003). The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature*, 423(6937), 309–312. <https://doi.org/10.1038/nature01585>
- Velankar, S. S., Soultanas, P., Dillingham, M. S., Subramanya, H. S. ja Wigley, D. B. (1999). Crystal Structures of Complexes of PcrA DNA Helicase with a DNA Substrate Indicate an Inchworm Mechanism. *Cell*, 97(1), 75–84. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80716-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80716-3)
- Venkatesan, M., Silver, L. L. ja Nossal, N. G. (1982). Bacteriophage T4 gene 41 protein, required for the synthesis of RNA primers, is also a DNA helicase. *Journal of Biological Chemistry*, 257(20), 12426–12434. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)33731-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)33731-1)
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. ja 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), 945–951. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01276.x>
- Wallis, J. W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M. ja Rothstein, R. (1989). A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell*, 58(2), 409–419. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90855-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90855-6)
- Washburn, B. K. ja Kushner, S. R. (1993). Characterization of DNA helicase II from a uvrD252 mutant of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 175(2), 341–350. <https://doi.org/10.1128/JB.175.2.341-350.1993>

- Weng, Y., Czaplinski, K. ja Peltz, S. W. (1996). Genetic and biochemical characterization of mutations in the ATPase and helicase regions of the Upf1 protein. *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), 5477–5490. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.10.5477>
- Westermann, B. (2014). Mitochondrial inheritance in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(7), 1039–1046. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.005>
- Wong, I., Chao, K. L., Bujalowski, W. ja Lohman, T. M. (1992). DNA-induced dimerization of the Escherichia coli rep helicase. Allosteric effects of single-stranded and duplex DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 267(11), 7596–7610. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42558-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42558-6)

KASUTATUD VEEBIAADRESSID JA PROGRAMMID

Valkude andmebaas valgu kristallstruktuuridele (PDB): www.rcsb.org 30.05.21

Valgu struktuuri kordinaatide visualiseerimiseks kasutati PyMOL 2.4.1 programmi. PyMOL on avatud lähtekoodiga kasutajate poolt toetatud molekulaarse visualiseerimise süsteem, mida haldab ja levitab Schrödinger. <https://pymol.org/2/> alla laetud 30.05.21.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Alex Ajangu,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Mitokondriaalse DNA helikaasi Hmi1 III motiivi punktmutatsioonide mõju Hmi1 valgu suhtelisele kogusele pärmis“,

mille juhendaja on Vlad-Julian Piljukov,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **01.06.23** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Alex Ajangu

31.05.21