

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

Sirelin Sillamaa

**Hmi1 helikaasi järjestuses konserveerunud aminohapete  
roll valgu funktsionaalsuses**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendaja professor Juhan Sedman

TARTU 2018

# **Hmi1 helikaasi järjestuses konserveerunud aminohapete roll valgu funktsionaalsuses**

Magistritöö

Sirelin Sillamaa

Mitokondriaalse DNA säilimises mängivad olulist rolli mitokondriaalsed helikaasid. *S. cerevisiae* mitokondriaalne helikaas Hmi1 kuulub superperekonda 1 ja omab sarnaselt teistele helikaasidele iseloomulikke konserveerunud motiive. Järgneva magistritöö käigus näidatakse, et üksikahelalise DNA sidumisega seotud aminohapete muteerimine Hmi1 valgus mõjutab oluliselt mitokondriaalse DNA stabiilsust. Mutatsioonid aminohappelises järjestuses viivad aja jooksul respiratoorsete rakkude osakaalu vähenemiseni kultuuris, mis väljendab mitokondriaalse DNA ebastabiilsust. Samuti puhastatakse töö käigus nii metsiktüüpi Hmi1 valk, mis omab helikaasset aktiivsust ja mutantsed valgud, mis ei suuda hüdrolüüsida ATP molekule.

CERCS teaduseriala: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

Märksõnad: Hmi1, respiratoorne aktiivsus, helikaaside motiivid, helikaaside superperekond I, mitokonder

## **Functional significance of conserved residues in Hmi1 helicase**

Master's thesis

Sirelin Sillamaa

Mitochondrial DNA helicases play an important role in mitochondrial DNA maintenance. *S. cerevisiae* mitochondrial helicase Hmi1 belongs to the superfamily 1 and possesses similar to other helicases conserved helicase motifs. In the following master thesis it will be shown that the mitochondrial DNA maintenance is strongly affected by mutations in single stranded DNA binding amino acids. Mutations in different motifs lead over time to the loss of respiratory competent cells in the culture which indicates a defect in mitochondrial DNA maintenance. The wild type protein of Hmi1 is purified, and shows an ATP dependent helicase activity. In contrast, the analyzed mutants show no significant activity in ATP hydrolysis.

CERCS research specialization: P320 Nucleic acids, protein synthesis

Keywords: Hmi1, respiratory activity, helicase motifs, helicase superfamily I, mitochondria

# SISUKORD

SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID: .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Helikaaside üldiseloomustus ja põhifunktsioonid .....	7
1.2 <i>S. cerevisiae</i> mitokondriaalne DNA ja selle helikaasid .....	8
1.3 Superperekond 1 helikaasid .....	10
1.4 Superperekond 1 helikaaside ruumiline struktuur .....	12
1.5 Superperekond 1 helikaaside põhilised ATP sidumisega seotud motiivid .....	14
1.6 Superperekond 1 helikaaside DNA sidumisega seotud motiivid.....	15
1.7 Mitokondriaalne DNA helikaas Hmi1 .....	17
2 MATERJALID JA METOODIKA .....	19
2.1 Töö eesmärk.....	19
2.2 Tüved ja vektorid .....	20
2.3 Praimerid.....	24
2.4 Töös kasutatud PCR-i reaktsioonid, geelid ja standardmeetodid .....	27
2.5 Söötmed .....	27
2.6 Lahused ja reagensid .....	29
2.7 Megapraimer 2 mutagenees .....	31
2.8 Pärmivektorite ja valguvektorite valmistamine .....	34
2.9 DNA transformeerimine bakterisse .....	34
2.10 KanMx kasseti sisseviimine pRep 22 vektorisse .....	35
2.11 Pärmis transformatsioon liitium atsetaadi meetodil.....	35
2.12 Pärmitüvede tetraad-analüüs .....	36
2.12.1 Sporulatsioon .....	36
2.12.2 Spooride kontroll .....	36
2.13 Pärmis plasmidi vahetus 5-fluoro-orothapet tundlikuse meetodil.....	37

2.14	Pärmirakkude elumuse mõõtmine madala glükoosisaldusega tassidel .....	37
2.15	<i>E. coli</i> Rosetta tüves Hmi1 valgu ekspressioon ja puhastamine .....	38
2.15.1	Hmi1 valgu ekspressioon bakteriaalses süsteemis .....	38
2.15.2	Väikeses mahus valgu ekspressiooni kontroll.....	38
2.15.3	Suuremahuline Hmi1 valgu puhastus .....	39
2.16	Hmi1 valgu ATP hüdrolüüsi aktiivsuse mõõtmine NADH-ga .....	40
2.17	Hmi1 valgu struktuuri <i>in silico</i> analüüs .....	40
3	TULEMUSED .....	41
3.1	Hmi1 struktuuri modelleerimine.....	41
3.2	Hmi1 mutantide analüüs 5-fluoro-oroothapet (5-FOA) selektsioonil baseerivas plasmiidivahetuskatses .....	42
3.3	Tetraadanalüüs tugeva fenotüübiga mutantidele Y243A ja T587A/H589D.....	46
3.4	Hmi1 valgu mutatsioonid E211Q, Q240E ja Y243A mõjutavad <i>petite</i> ´de tekkimist	48
3.5	Hmi1 valgu ekspressiooni optimeerimine ja valgu puhastamine .....	51
3.6	Hmi1E211Q ja Hmi1Y243A ei oma ssDNA stimuleeritavat ATP hüdrolüüsi aktiivsust.....	53
4	ARUTELU .....	56
	KOKKUVÕTE .....	61
	SUMMARY .....	62
	TÄNUAVALDUSED.....	64
	KASUTATUD KIRJANDUS .....	65
	LIHTLITSENTS.....	73

## KASUTATUD LÜHENDID:

Amp- ampitsilliin

ATP- adenosiin trifosfaat

Cam- kloroamfenikool

bp- aluspaar

DMSO- dimetüül sulfoksiid

DNA- desoksüribonukleiinhape

dsDNA- kaheahelaline DNA (ingl. *double stranded DNA*)

EDTA- etüleen-diamiin-tetraädikhape

IPTG- isopropüül- $\beta$ -D-tiogalaktosiid

mtDNA- mitokondriaalne DNA

PCR- polümeraasi ahelreaktsioon

PEG- polüetüleenglükool

rpm- pööret minutis

SDS- naatriumdodetsüülsulfaat

SF1- superperekond 1

SF2- superperekond 1

ssDNA- üheahelaline DNA (ingl. *single stranded DNA*)

Tris- tris(hüdroksümetüül)aminoetaan

## SISSEJUHATUS

Helikaasid on multifunktsionaalsed valgud, mida leidub kõigis eludomäänides. Nende funktsioonid hõlmavad kõikvõimalikke DNA ja RNA metabolismiga seotud protsesse, sealhulgas osalevad nad nii otseselt replikatsioonil kui ka mitmesuguste teiste protsesside juures, mis on olulised DNA säilitamiseks. Helikaaside ühiseks jooneks on primaarstruktuuris konserveerunud helikaasete motiivide olemasolu, mis omavad tähtsat rolli helikaasi aktiivsuses ja substraadiga seondumisel.

Helikaasid omavad olulist rolli ka *S. cerevisiae* mitokondriaalse DNA (mtDNA) säilimise juures. Mitokondrisse lokaliseeruvaid helikaase on pärmis kirjeldatud kuus, millest kolm on spetsiifiliselt DNA helikaasid ja osalevad mtDNA säilimises. Üheks selliseks helikaasiks on Hmi1, mis on tuntud oma erilise C-terminaalse mitokondriaalse signaaljärjestuse tõttu (Lee *et al.*, 1999). Hmi1 valk on oluline mtDNA säilimiseks ning Hmi1 deletsiooniga kaasneb pikkade DNA molekulide arvu vähenemine (Sedman *et al.*, 2000; Sedman *et al.*, 2005). Meie labori varasemad andmed vihjasid, et valk säilitab osaliselt *in vivo* aktiivsuse ka siis, kui muteerida adenosiin trifosfaadi (ATP) hüdrolüüsil osalevaid aminohappeid (Kuusk *et al.*, 2005; Sedman *et al.*, 2005). Seetõttu on Hmi1 funktsioon siamaani siiski jäänud lahtiseks küsimuseks, sest helikaaside funktsioon peaks olema seotud ATP hüdrolüüsi energia rakendamise ja DNA struktuuri remodelleerimisega.

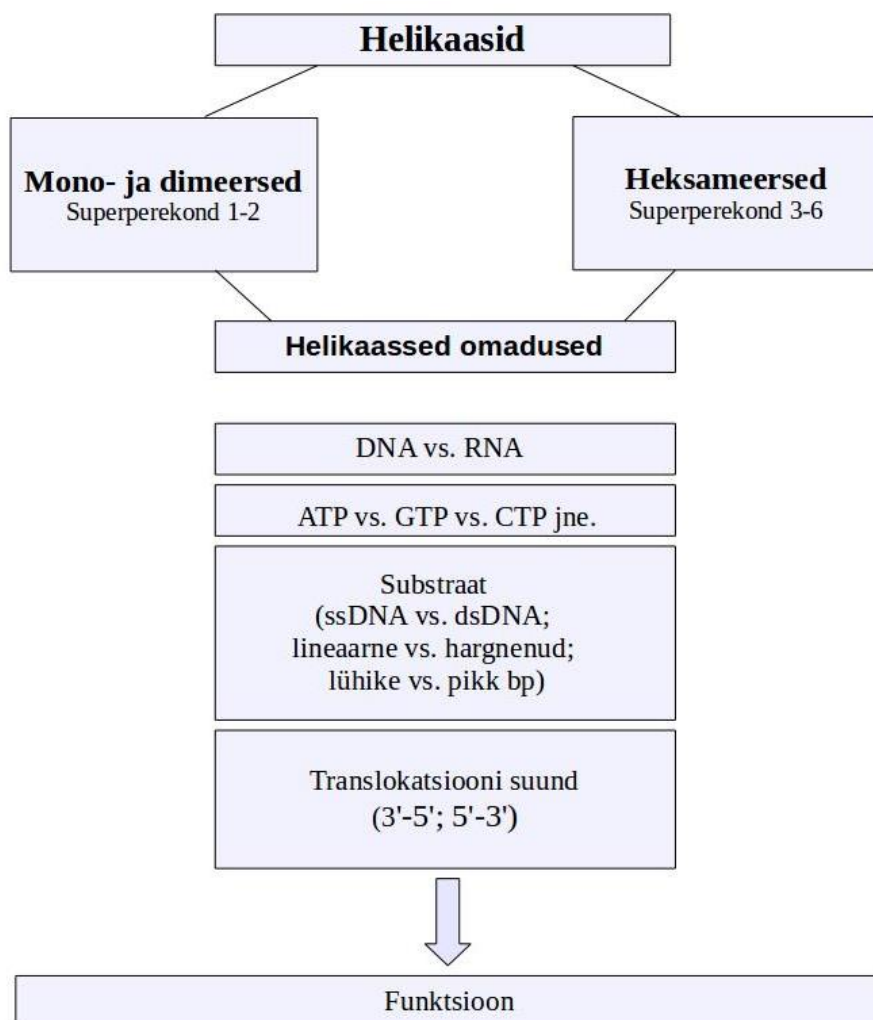
Konserveerunud helikaasi motiivide põhjal on Hmi1 helikaas kõige sarnasem *E. coli* helikaas UvrD ja *S. cerevisiae*'s helikaasiga Srs2 (Fairman-Williams *et al.*, 2010). Selleks et saada parem ülevaade Hmi1 valgustruktuurist ja funktsioonist otsustasin käesoleva magistritöö käigus modelleerida Hmi1 struktuuri, toetudes UvrD homoloogiale ja järgnevalt konstrueerida mutantseid Hmi1 valke ekspresseerivad *S. cerevisiae* tüved, kus punktmutatsioonidega Hmi1 valgus asendati konserveerunud aminohapped, mis struktuuri ennustuse ja konserveerumise põhjal võiksid olla olulised Hmi1 valgu kofaktorite ATP, üheaheelalise DNA (ssDNA) ja kaheaheelalise DNA (dsDNA) sidumises.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Helikaaside üldiseloomustus ja põhifunktsioonid

Helikaasid on laialdaselt levinud ATP energial töötavad valgud, mis liiguvad suunatult ehk translokeeruvad mööda DNA ahelat ja harutavad lahti erinevaid nukleiinhapete struktuure. Helikaase leidub kõigis eludomäänides, alustades tuntuimatest näidetest bakterites nagu nt. UvrD ja Rep ning lõpetades inimeses leiduvate helikaasidega nagu nt. TFIIH (ülevaated Raney *et al.*, 2013; Singleton *et al.*, 2007; Wu ja Spies, 2013).

Helikaase liigitatakse paljude erinevate tunnuste alusel, nii primaarstruktuuri, kõrgemat järku struktuuri kui ka erinevate nukleiinhapete, koensüümide, substraadi kasutuse, aktiivsuse, protsessiivsuse jne. alusel, mille osad näited on toodud joonisel 1 (ülevaateartiklid Lohman ja Bjornson, 1996; Lohman *et al.*, 2008; Raney *et al.*, 2013; Singleton *et al.*, 2007).



**Joonis 1.** Helikaaside biokeemiliste tunnuste jaotus (loodud ülevaateartiklite põhjal Lohman ja Bjornson, 1996; Lohman *et al.*, 2008; Raney *et al.*, 2013; Singleton *et al.*, 2007).

Helikaasid omavad laia spektrit erinevaid funktsioone ja võivad osaleda erinevates protsessides, mille määravad nende biokeemilised omadused. Tuntuimad helikaaside funktsioonid on rollid replikatsioonis, transkriptsioonis, translatsioonis, rekombinatsioonis ja vigade parandamisel, kuid helikaasid omavad ka spetsiifilisemaid funktsioone, kindlate DNA substraatide või struktuuride lahti harutamisel, ribosoomide sünteesis, telomeeride pikkuse regulatsioonis, kromatiini remodelatsioonis ja splaissingus (ülevaated Lohman *et al.*, 2008; Raney *et al.*, 2013; Singleton *et al.*, 2007). Erinevad helikaasid omavad väga erinevaid funktsioone ning mõned neist on spetsialiseerunud üldiselt kindlale ülesandele, nt. *E. coli* RepA helikaas, mis on tuntud kui replikatsiooni stimuleeriv helikaas ja mis osaleb faagi  $\phi$ X174 DNA replikatsioonil. RepA omab selleks ülesandeks vajalikku dsDNA (kaheahelalise DNA) ja replikatsioonil tekkivate iseloomulike kahvikujuliste struktuuride lahtiharutamise võimet (Eisenberg *et al.*, 1976; Kornberg *et al.*, 1978; Raney *et al.*, 2013).

Sageli osalevad või mõjutavad helikaasid erinevaid protsesse nt. *S. cerevisiae*'s leiduv Pif1. Ajalooliselt oli Pif1 esimene mitokondriaalne helikaas mida kirjeldati, olles oluline mitokondriaalse DNA säilimiseks (Lahaye *et al.*, 1991). Hilisemalt avastati ka selle helikaasi tuumavorm, mis sünteesitakse mitokondrisse transpordi signaalita ning mis osaleb veel lisaks telomeeride pikenemise piiramises, DNA replikatsioonil ja Okazaki fragmentide protsessimises (Boule *et al.*, 2005; Budd *et al.*, 2006; Lahaye *et al.*, 1991). Lisaks sellele on viimasel ajal näidatud Pif1 iseäralikku rolli DNA patrullimises (ingl. patrolling). See selgitab biokeemiliselt, kuidas Pif1 osaleb ka R-lingude ja G-kvartettide lahti harutamises, seostudes ise üksikahelalise DNA-ga ja tõmmates 3' otsas DNA-d enda poole. Pif1 suudab G-kvartette lahti harutada sammhaaval tripleksiks, juuksenõelastruktuuriks ja lõpuks täiesti sirgeks. Samaaegselt taastatakse G-kvarteti struktuur koheselt peale Pif1 dissotsiatsiooni, mis tõenäoliselt viitab Pif1 rollile ka transkriptsioonis ja replikatsioonis, kus selliseid struktuure on vaja ajutiselt lahti harutada (Zhou *et al.*, 2014).

## **1.2 *S. cerevisiae* mitokondriaalne DNA ja selle helikaasid**

Nii nagu ülalkirjeldatud Pif1 puhul, kodeeritakse enamuse mitokondriga seotud valke tuuma genoomi poolt, kuid mitokonder omab ka iseseisvat genoomi, mis kodeerib kaheksat mitokondris funktsioneerivat valku. Mitokondriaalse DNA (mtDNA) funktsioneerimise ja säilimisega seotud valgud kodeeritakse tuumagenoomi poolt ja transporditakse mitokondrisse, sealhulgas erinevad replikatsioonis ja rekombinatsioonis osalevad valgud, mida on vaja mtDNA säilitamiseks ja geneetilise informatsiooni ekspressiooniks, kaasaarvatud helikaasid



(ülevaade Westermann, 2013). Mitokondriaalne DNA ise kodeerib aga valke hoopis enda põhilise funktsiooni, oksüdatiivse fosforülatsiooni jaoks. Sellised on näiteks ATP süntaasi subühiku valgud 6, 8 ja 9, mis osalevad ATP tootmises ja hingamisahela komponendid, milleks on kolm tsütokroom c oksüdaasi kompleksi valku ja üks tsütokroom b valk. Selleks, et neid valke oleks võimalik ka transleerida, kodeerib mtDNA ka 3 ribosomaalset RNA-d ja 24 tRNA-d (Foury *et al.*, 1998).

Kuid mitokonder omab veel lisaks laia spektrit funktsioone seoses reaktiivsete hapniku ühendite tootmisega, apoptoosi, kaasasündinud immuunsüsteemi, metaboliitide oksüdatsiooni ja reduktsiooni ning paljude teiste metabolismi reaktsioonidega. Kuna mitokondri DNA roll organellile on oluline, avalduvad selle funktsionaalsed vead tavaliselt inimestel raskete haigustena (ülevaated Freel *et al.*, 2015; Mishra ja Chan, 2014).

Imetajate rakud ei saa hakkama ilma mitokondri või selle täieliku DNA-ta, seetõttu on mitokondri uurimisel tänuväärseks mudelorganismiks *S. cerevisiae*, kes suudab elada ka ilma mitokondriaalse DNA ja hingamiseta, milleks on vaja hingamisahelat. MtDNA osaliselt või täielikult kaotanud pärmi kolooniaid on kerge ära tunda, kuna hingamata suudab *S. cerevisiae* elada ainult fermenteeritaval süsiniku allikal ning tekkivad kolooniad on suuruselt väiksemad, niinimetatud tsütoplasmaatilised *petite* rakud, mida kutsutakse vastavalt kas rho<sup>0</sup>, kui puudub kogu mtDNA ja rho- kui mtDNA koosneb korduvatest väikesest algse mtDNA fragmentidest (Freel *et al.*, 2015; Tzagoloff ja Dieckmann, 1990).

Nagu eelnevalt mainitud, vajab mtDNA enda säilimiseks erinevaid helikaase, lisaks eelpool mainitud DNA helikaasile Pif1 on pärmi mitokondris kirjeldatud DNA helikaase veel kaks Hmi1 ja Irc3. Nii Hmi1 kui ka Irc3 funktsioon ei ole päris lõpuni teada, mõlemad on olulised mitokondriaalse DNA säilitamiseks kuid mitte hädavajalikud (Kuusk *et al.*, 2005; Sedman *et al.*, 2000; Sedman *et al.*, 2014). Irc3 translokeerib mööda dsDNA-d ja tunneb spetsiifiliselt ära hargnemised mitokondriaalses DNA-s ja harutab need lahti (Gaidutsik *et al.*, 2016; Sedman *et al.* 2017). Analoogilise biokeemilise aktiivsusega on *E. coli* RecG helikaas, mis osaliselt komplementeerib Irc3 puudumist rakust. Seega võib eeldada, et Irc3 omab RecG-ga sarnast DNA-le iseloomulike kahvlistruktuuride lahendamise ja harukohtade mööda DNA-d liigutamise võimet (Gaidutsik *et al.*, 2016).

*S. cerevisiae*'s on mitokondriaalseid RNA helikaase kirjeldatud kolm, Mss16p, Mrh4 ja Suv3. Kõiki kolme on varasemalt seostatud mtDNAs leiduvate intronite protsessimise/splaiissimisega, kuid hilisemalt on avastatud ka nende spetsiifilisi rolle teistes mitokondriga seotud protsessides (De Silva *et al.*, 2013; De Silva *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2011). Suv3 on komponent

mitokondriaalses RNA degradeerimise kompleksis ning on potentsiaalselt osaline mitokondriaalse DNA replikatsioonis, Suv3 puudumisel hakkavad kuhjuma intronid (Guo *et al.*, 2011). Mss16p ja Mrh4 osalevad mõlemad mitokondriaalse ribosoomi kokkupanemises, esimene neist pigem protsessi alguses ja teine hilisemas faasis (De Silva *et al.*, 2013; De Silva *et al.*, 2017).

### 1.3 Superperekond 1 helikaasid

Vastavalt struktuurile on helikaasid jagatud superperekondadesse ehk nii öelda ülemperekondadesse, mida on 6. Superperekonda võib kuuluda veel mitu erinevat perekonda helikaase (Gorbalenya ja Koonin, 1993; Singleton *et al.*, 2007; Fairman-Williams *et al.*, 2010).

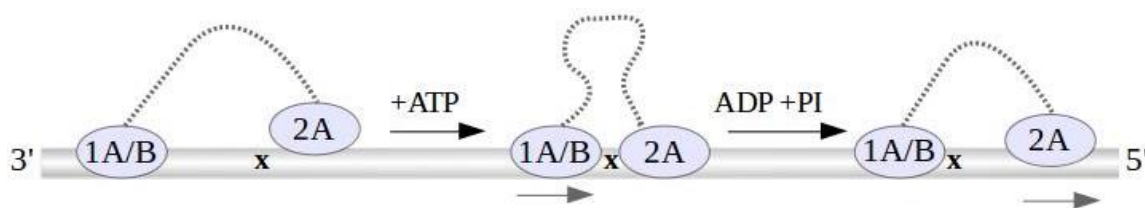
Helikaaside jaotus superperekondadesse toimub aminohappelise järjestuse põhjal ja selles esinevate spetsiifiliste motiivide alusel. Nii superperekond 1 (SF1) kui ka superperekond 2 (SF2) liikmetel on paika pandud 7 põhilist motiivi (motiivid I, Ia ja II-VI) (Gorbalenya *et al.*, 1989; Gorbalenya ja Koonin, 1993).

Antud töö keskendub helikaasile Hmi1, mis on SF1 liige. SF1 on jaotatud omakorda kolmeks erinevaks perekonnaks UvrD/Rep, Pif1 ja Upf1 perekond, mis on paika pandud järjestuste võrdluse alusel (Fairman-Williams *et al.*, 2010). Lisaks neile kolmele perekonnale, mis on defineeritud võttes arvesse baktereid, eukariöote ja arhesid, leidub SF1 koosseisus veel kaks perekonda. Eristatakse viraalseid SF1 helikaase, kuhu kuuluvad + ahela RNA viiruste helikaasid ja lisaks ühte inaktiveeritud helikaaside perekonda (Gilhooly *et al.*, 2013; Gorbalenya *et al.*, 1993;).

Lisaks järjestusel baseeruvale perekondade klassifikatsioonile liigitatakse helikaase ka biokeemiliste omaduste põhjal vastavalt ahela lahti harutamise kui ka translokatsiooni suuna alusel. Ehkki SF1 koosseisus leidub nii klass A ensüüme, mis liiguvad suunas 3'-5' kui ka klass B ensüüme, mille suunaks on 5'-3', on kõik SF1 liikmed  $\alpha$  tüüpi helikaasid, see tähendab, et translokatsioon toimub üheaheelisel DNA-l (Singleton *et al.*, 2007).

SF1 kolmel perekonnal on igaühel ühiseid ja ka perekondi eristavaid tunnuseid. Ühisteks joonteks on ATP eelistamine kofaktorina ja DNA-spetsiifilisus (va. Upf1- sarnaste helikaaside perekond, mis kasutab substraadina ka RNA-d) (Fairman-Williams *et al.*, 2010). UvrD/Rep perekond erineb ülejäänud kahest perekonnast omades liikmeid, mis on A klassi helikaasid (SF1A $\alpha$ ), kahe ülejäänud perekonna- Pif1 ja Upf- sarnaste helikaaside ensüümid on kõik B klassi helikaasid (SF1B $\alpha$ ) (Singleton *et al.*, 2007; Fairman-Williams *et al.*, 2010).

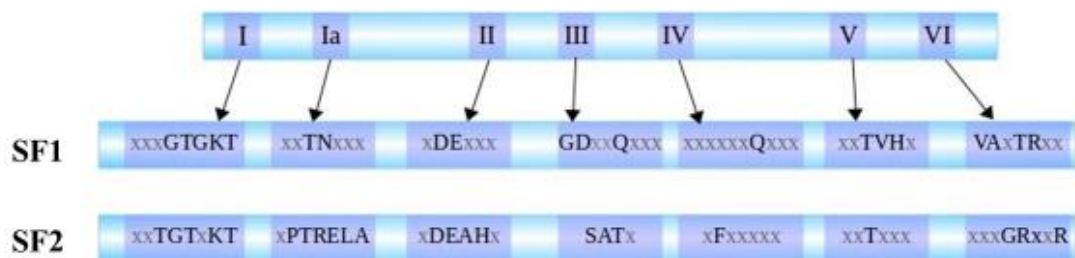
Kõik SF1 valgud on kas mono- või dimeersed ning neile peetakse iseloomulikuks *inchworm* ehk vaksamise laadset liikumist, mida on kirjeldatud näiteks helikaaside Rep, PcrA ja UvrD puhul (Lee ja Yang 2006; Singleton *et al.*, 2007; Velankar *et al.*, 1999; Yarraton ja Gefter, 1979). Esimest korda kirjeldasid ja postuleerisid sellise vaksamise laadse liikumise Yarraton ja Gefter 1979 aastal uurides *E. Coli* Rep helikaasi, mis sel ajal oli tuntud kui ssDNAst sõltuv ATPaas. Katsed faagi  $\phi$ X174 DNA-l näitasid, et ühe lämmastikaluste paari lahti keeramine nõuab kahe ATP hüdrolüüsi energiat: üks ATP edasi liikumiseks ja teine Rep-i konformatsiooni muutmiseks (Yarraton ja Gefter, 1979). Tegemist on liikumisega, kus valgu üks alamühik hoiab DNAst kinni ja teine liigutab ennast selle poole või sellest eemale. SF1A valkudel nagu näiteks UvrD ja PcrA, seondub domään 2A ATP-ga seondumisel tugevamalt DNA-ga ja tõmbab domääne 1A ja 1B enda suunas. ATP hüdrolüüsil see side nõrgeneb ja 2A domään saab võimaluse libiseda üle ssDNA, joonis 2 (Lee ja Yang, 2006; Velankar *et al.*, 1999). SF1B perekonna liikmetel toimub sarnane protsess, kuid seoses liikumisega vastasuunas seondub ATP sidumisel tugevamini domään 1A, mis tõmbab enda poole domääne 2A ja 2B ning seejärel libiseb hüdrolüüsil edasi domään 1A (Saikrishnan *et al.*, 2009).



**Joonis 2.** *Inchworm* ehk vaksamise laadne helikaasi liikumine DNA ahelal. Valgu domäänid 1A, 1B ja 2A (hele lillad) liiguvad mööda ssDNA (hall) ahelat. Edasi liikumine toimub tänu ATP sidumise energiale, mille tõttu 2A seostub tugevamini ssDNA ahelaga ja tõmbab domääne 1A ja 1B enda suunas. Energia vabanedes muutub domääni 2A side ssDNA ahelal nõrgemaks ja domään libiseb edasi (joonistatud Singleton *et al.*, 2007 informatsiooni põhjal).

SF1 ja SF2 liikmetel on mõlemal kirjeldatud seitset konserveerunud põhimotiivi, seetõttu saab kahte perekonda eristada spetsiifiliste erinevustega motiivide struktuuris, joonis 3. SF1 helikaasidele peetakse iseloomulikuks IIIa motiivi olemasolu ja IVa motiivi puudumist võrreldes SF2 helikaasidega. Ehkki SF1 helikaasidel eristatakse osades artiklites ka IVa motiivi, peetakse seda eksliku definitsiooni küsimuseks, kus IIIa motiiv on nimetatud IV-ndaks motiiviks ja IV motiiv IVa-ks. (Lee ja Yang, 2006; Fairman-Williams *et al.*, 2010). Samuti on silmapaistvad erinevused kahel superperekonnal motiiv III osas näiteks SF1 GdxxQ järjestus, mis erineb SF2 SAT järjestusest silmnähtavalt ja motiiv Va osas, mis erineb samuti aminohappelise järjestuse poolest (Fairman-Williams *et al.*, 2010). UvrD/Rep sarnaste

heliikaaside puhul on postuleeritud ka mitmed lisa-motiivid Q, Ib, Ic, Id, IVb, IVc, Va, VIa (Lee ja Yang, 2006). Oluline aspekt on, et iga järjestuse motiiv on oluline valgu struktuuriliste omaduste määramisel ja oluline heliikaaside funktsiooni saavutamisel (Korolev *et al.*, 1997; Lee ja Yang, 2006; Soultanas *et al.*, 2000; Velankar *et al.*, 1999;).



**Joonis 3.** SF1 ja SF2 heliikaaside seitsme põhilise motiivi võrdlus. Joonisel on toodud seitsme motiivi konserveerunud järjestused. Tähtedega on välja toodud konserveerunud aminohapped ja hallid x-id väljendavad mitte nii tugevasti konserveerunud aminohappete positsioone selles motiivis (koostatud Fairman-Williams *et al.*, 2010 põhjal).

## 1.4 Superperekond 1 heliikaaside ruumiline struktuur

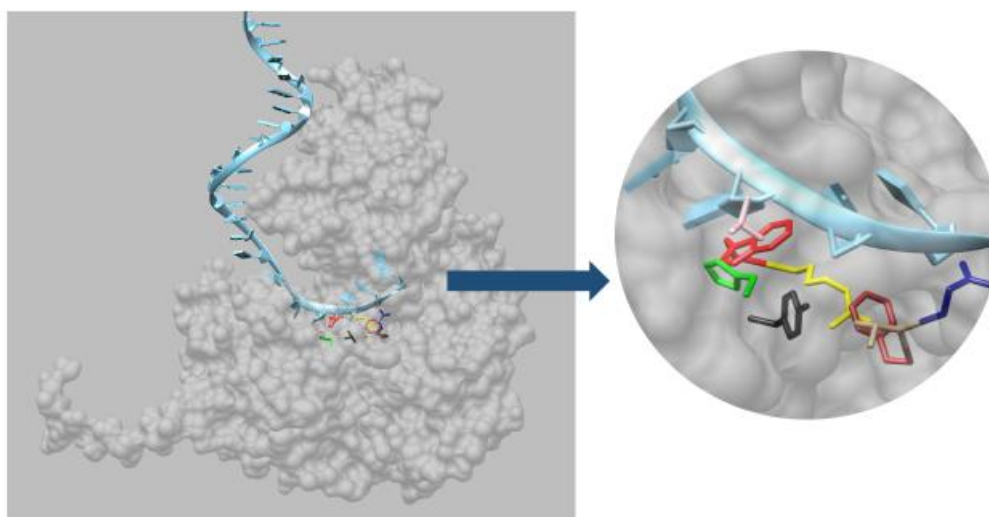
Superperekond 1 liikmetest on kristallstruktuurid kirjeldatud näiteks Rep, PcrA, UvrD, RecBCD ja Pif heliikaasidel (Korolev *et al.*, 1997; Lee ja Yang, 2006; Lu *et al.*, 2018; Singleton *et al.*, 2004; Subramanya *et al.*, 1996; Velankar *et al.*, 1999).

Esimene heliikaasi kristallstruktuur *Bacillus stearothermophilus* PcrA heliikaasist, mis kuulub SF1 valkude hulka, andis põhjaneva teadmise heliikaasi tertsaarstruktuurist. Heliikaas koosneb kahest struktuurilisest domäänist, mis jagunevad kumbki veel kaheks alamdomääniks (1A, 2A, 1B ja 2B). Valkude struktuur koosneb  $\alpha$ -heeliksistest ja  $\beta$ -lehtedest ning heliikaasi struktuuris ümbritsevad  $\alpha$ -heeliksid keskset  $\beta$ -lehte. Domäänide keskel asub lõhe, mis seob DNA-d (Subramanya *et al.*, 1996). Heliikaasi DNA-ga seostudes tekivad konformatsioonilised muutused ja domään 2B liigub ülejäänud kolme domääni suhtes ning katab kinni DNA sidumise vao. Seetõttu eristatakse heliikaasil kahte struktuurilist olekut, avatud ja suletud (ingl. *open and close*) (Korolev *et al.*, 1997).

Domään 2B ei sisalda ühtegi seitsmest heliikaasi põhimotiivist, jäädes motiivide IV ja V vahele ning seetõttu ei ole ajalooliselt selle domääni funktsiooni ülemäära tähtsaks peetud. Lisamotiivide defineerimine on aga selgeks teinud, et sinna alasse jäävad motiivid Ic, IVb ja IVc, millest viimane sisaldab tugevalt konserveerunud kahte glütsiini ja ühte treoniini, mis

struktuuris seovad kaheaheelalist DNA-d. PcrA helikaasil on lisaks 2B kontaktidele näidatud ka 1B domäänis asuvad lüsiinid, mis seovad samuti kaheaheelalist DNA-d. Kõik need kontaktid on olulised, et valk säilitaks enda helikaasse aktiivsuse (Lee ja Yang, 2006; Soultanas *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002). Huvitaval kombel säilitab *in vitro* helikaasse aktiivsuse mutant, kus puudu on terve 2B domään, pigem on selle mutandi aktiivsus isegi suurem. Tõenäoliselt võib eeldada, et 2B domään on oluline pigem struktuurselt, et tagada mingite kindlate funktsioonide täpsus ja regulatsioon, kuid mitte niivõrd helikaasne aktiivsus (Cheng *et al.*, 2002).

Kui dsDNA suunatakse tänu 2B ja 1B domääni kontaktidele edasi üheaheelalise DNA vao poole, lahutatakse DNA ahelad 2A domääni juures, kus osadel helikaasidel on kirjeldatud eraldusnõela struktuur (ingl. *separation pin*), mis surub kaks DNA ahelat lahku. Üks ahel liigub peale eraldumist kanalisse, alustades 2A domääni ülemisest osast kuni 1A domääni üheaheelalise DNA korgini (ingl. *ssDNA cap*). Kanalis kontrollib DNA liikumist ankur (ingl. *anchor*)-struktuur, mille moodustavad motiiv IIIs leiduvad aminohapped (Lee ja Yang, 2006; Velankar *et al.*, 1999). Üheaheelalise DNA sidumisega tegelevad kanalis peamiselt aminohapped motiividest Ia, III ja V (Lee ja Yang, 2006). Kanalis asuvad ssDNA-d siduvad aminohapped on suhteliselt konserveerunud erinevate helikaaside lõikes nagu näiteks Ia motiivis asuvad fenüülalaniin, treoniin ja aspargiin; III motiivi türosiin, trüptofaan ja arginiin; V motiivi histidiin ja treoniin, näidatud joonisel 4 (Korolev *et al.*, 1997; Krajewski *et al.*, 2014; Lee ja Yang, 2006; Velankar *et al.*, 1999).



**Joonis 4.** ssDNA sidumise kanal. Joonisel on hallilt näha taustal *E. coli* UvrD helikaasi struktuur (PDB: 2IS4 kordinaatide põhjal; Lee ja Yang, 2006). Helesiniselt on märgitud ssDNA. Suurendatud pildil on ära toodud ssDNA seondumisega seotud motiivide Ia, III ja V aminohapped. F62 (punakas-pruun), T63 (helepruun), N64 (tume sinine), Y254 (must), W256

(punane), R257 (kollane), T558 (roosa), H560 (roheline). Pilt tehtud kasutades programmi Chimera 1.12 (Pettersen *et al.*, 2004; [www.cgl.ucsf.edu/chimera](http://www.cgl.ucsf.edu/chimera)).

Helikaasi funktsioneerimiseks ja ahelate lahti harutamiseks on vajalik energia, milleks tuleb siduda nukleotiidne kofaktor ja see hüdrolüüsida. SF1 helikaasidel toimub see vaos, mis asub domäänide 1A ja 2A vahel. ATP sidumisega on seotud üksikud aminohapped kõikidest helikaaside peamistest motiividest, moodustades kontakte fosfaadi, adeniini ja reaktsiooniks vajalikku  $Mg^{2+}$  iooniga (Korolev *et al.*, 1997; Lee ja Yang, 2006; Velankar *et al.*, 1999).

## 1.5 Superperekond 1 helikaaside põhilised ATP sidumisega seotud motiivid

**Motiiv Q** on lisamotiiv, millele on iseloomulik konserveerunud glutamiin, mis kristallstruktuuri uuringutes on paigutatud ATP sidumise vaku. On näidatud, et glutamiin interakteerub spetsiifiliselt ATP homoloogide koosseisus oleva lämmastikaluse adeniiniga, mis viitab tema võimalikule olulisusele ATP sidumisel (Lee ja Yang, 2006). Kuigi SF1 liikmetel ei ole selle motiivi funktsionaalsusest palju teada, on seda motiivi uuritud algselt SF2 *S. cerevisiae* hädavajalike DEAD box RNA helikaaside perekonna liikmetel eIF4A, Ded1, Fal1, ja Prp5. Mutatsioonid nende valkude antud motiivis on letaalsed. Samas teiste SF2 perekondadesse kuuluvaid helikaase nagu Rad3, Sth1, Dna2 ja Mtr4, antud motiivi muteerimine nii drastiliselt ei mõjuta (Tanner *et al.*, 2003).

**Motiiv I ehk Walker A** motiiv oli üks esimesi kirjeldatud helikaasid motiive, milles asub väga konserveerunud G-K-T/S (glütsiin-lüsiin-treoniin/seriin) järjestus, mis osaleb ATP sidumises (Walker *et al.*, 1982). Motiiv I on suhteliselt hästi kirjeldatud helikaasi motiiv, milles asuvate kolmest väga konserveerunud aminohappest ükskõik millise muteerimine vähendab valgu ATP sidumisega seotud aktiivsust (Graves-Woodward *et al.*, 1997; Soultanas *et al.*, 1999). Esimese motiivi treoniin on spetsiifiliselt osaline  $Mg^{2+}$ iooni sidumises ja lüsiin  $\beta$ -fosfaadi sidumises (Krajewski *et al.*, 2014; Lee ja Yang, 2006; Soultanas *et al.*, 1999; Velankar *et al.*, 1999).

**Motiiv II ehk Walker B** motiivis asuvad hästi konserveerunud aminohapped asparagiinhape ja glutamiinhape on olulised ATP hüdrolüüsil, asparagiinhape suudab siduda reaktsiooniks vajalikku  $Mg^{2+}$ iooni ja glutamiinhape on osaline vee molekuli aktiveerimises (Brosh ja Matson, 1995; Lee ja Yang, 2006; Soultanas *et al.*, 1999; Velankar *et al.*, 1999). Kuna negatiivselt laetud aminohapete vahetamine vastavalt aspargiini ja glutamiini vastu omab

drastilist mõju eelmainitud funktsioonidele, kuid ei mõjuta üksikahelalise DNA sidumist, peetakse motiiv II spetsiifiliselt ATP-ga seondumise motiiviks. UvrD helikaasest ja ATPaasest võimet peegeldab näiteks tema DNA defektide parandamise võime. Motiiv II mutandid ei suuda asendada puuduvaid nukleotiide DNA ahelas ega parandada metüül-suunatud kahjustusi. Eriline on asjaolu, et topeltmutant, kus muteeritud on mõlemad positsioonid, on kõrgema aktiivsusega kui valk, kus on muteeritud ainult glutamiinhape, mis viitab teatavale kompensatoorsele efektile, kui mõlemad aminohapped on muteerunud (Brosh ja Matson, 1995).

**III motiivis** paiknevad konserveerunud glutamiin, trüptofaan, arginiin ja türosiin (Lee ja Yang, 2006). ATPaasseks aktiivsuseks on oluline just glutamiin, see polaarne aminohape seob ATP  $\gamma$ - fosfaati paiknedes ruumilises sobivas positsioonis ja omades vajalikku polaarset kõrvalahelat (Dillingham *et al.*, 1999; Lee ja Yang, 2006). Helikaas PcrA peal on näidatud, et Q254 vahetus negatiivse (Q254E) või neutraalse külghelaga (Q254A) aminohappe vastu vähendab märgatavalt helikaasi ATPaasest võimet, kuid positiivsete ja polaarsete aminohapetega asendusel (Q254R, Q254K, Q254N) säilib helikaasne võime, kuigi see ei ole võrreldav metsiktüüpi valguga (Dillingham *et al.*, 1999).

**Motiiv IV** peetakse oluliseks nukleotiidide sidumisel. SF1 liikmetel asuvad IV motiivis väga konserveerunud arginiin ja türosiin, mis UvrD valgul on olulised ATP sidumiseks (Hall ja Matson, 1997; Korolev *et al.*, 1997; Lee ja Yang, 2006). Arginiini vahetaminealaniini vastu toob kaasa helikaasse aktiivsuse kadumise, mille tõttu väheneb ja kaob võime kaheahelalist DNA-d lahti harutada. Selliste mutantsete UvrD valkude DNA parandamise võime on vähenenud, millega *in vivo* katsetes kaasneb suurem UV tundlikus (Hall ja Matson, 1997).

**VI motiiv** omab pigem struktuurset tähtsust, toetades valgustruktuuri ja konformatsioonilisi muutusi tänu kontaktidele IV ja III motiiviga (Korolev *et al.*, 1997). Siiski osaleb konserveerunud arginiin otseselt ATP sidumises, kontakteerudes  $\gamma$ - fosaadiga (Lee ja Yang, 2006; Soultanas *et al.*, 1999).

## 1.6 Superperekond 1 helikaaside DNA sidumisega seotud motiivid

**Motiiv Ia** on üks vähem uuritud põhimotiive SF1 helikaaside puhul, kristallstruktuurile toetudes peetakse seda oluliseks üksikahelalise DNA sidumises, kuna antud motiivi aminohapped paiknevad üksikahelalise DNA kanalis (Lee ja Yang, 2006; Velankar *et al.*, 1999).

**III motiiv** omab olulist rolli nii ATP  $\gamma$ - fosfaadiga interakteerumisel kui ka üheaheelalise DNA sidumisel ning seda peetakse oluliseks lüliks valgus struktuuris, mis ühendab neid kahte protsessi omades kontrolli selle üle, kas mõlemad ligandid on olemas ja milline on nende ruumiline paigutus (Brosh ja Matson, 1996; Dillingham *et al.*, 1999). Konserveerunud *E. coli* UvrD D248 asparagiinhape asenduste peal on näidatud nende kahe protsessi üksteisest sõltuvust. Asendades antud aminohappe neutraalse laenguga aspargiiniga (D248N) tekib mutantne valk, mis ei suuda siduda ei ATP-d ega ssDNA-d sama tugevalt kui metsiktüüpi valk. Siiski suudab mutatsiooniga UvrD D248N valk moodustada stabiilise valk-ssDNA-ATP kompleksi, kui mõlemad ligandid on seotud ja omab sellisena metsiktüüpi UvrD valguga (D248) võrdset aktiivsust (Brosh ja Matson, 1996). Samuti ei ole kolmanda motiivi D248N asendus niivõrd suure mõjuga UvrD UV tundlikkusele, kui seda on näiteks II motiivi mutandid (Brosh ja Matson, 1995; Brosh ja Matson, 1996).

Konserveerunud trüptofaan, türosiin ja arginiin mängivad olulist rolli üheaheelalise DNA sidumise juures, nende muteerimisel kaotab helikaas ssDNA sidumise efektiivsuses (Dillingham *et al.*, 1999). UvrD kristallstruktuur kinnitab seda näidates, et III motiivi trüptofaan, türosiin ja arginiin paiknevad üksikahelalise DNA sidumise kanalis (Lee ja Yang, 2006).

**V motiivi** peetakse oluliseks üheaheelalise DNA sidumiseks sest motiivi erinevad aminohapped loovad kontakte üheaheelalise DNA-ga. Ruumiliselt asuvad ssDNA kanalis konserveerunud histidiin ja treoniin (Korolev *et al.*, 1997; Lee ja Yang, 2006; Velankar *et al.*, 1999). Herpes simplex viiruse helikaas primaasi kompleks UL5/UL52 motiiv V-s asuva glütsiini suunatud mutageneesiga asendusalaniiniks mõjutab *in vivo* katsetes DNA replikatsiooni, kuid samal ajal ei esine seda efekti *in vitro* katsetes (Graves-Woodward ja Weller, 1996; Graves-Woodward *et al.*, 1997; Zhu ja Weller, 1992). Treoniini muteerimine toob kaasa vähenenud helikaasse aktiivsuse, samuti on alanenud sellel mutandil võime lahti harutada spetsiifilisi kahvikujulisi DNA struktuure. Vastuoluliselt arvamusele, et tegemist on ssDNA-d siduvate aminohapetega, mis muteerituna peaks kaotama DNA sidumise võime, ei vähene mõlema V motiivi mutandi DNA sidumise võime (Graves-Woodward *et al.*, 1997).

2A domääni kuuluv **VIa motiiv** on seotud kaheaheelalise DNA sidumisega, moodustades koos külgnevate aminohapetega nii-nimetatud eraldusnõela (ingl. *separation pin*), mis tekitab silmuse, kus türosiin interakteerub kaheaheelalise DNA-ga. Eraldusnõel surub kaks lämmastikalust laiali ja nii tekib kahe ahela eraldudes üheaheelaline DNA ahel, mis suunatakse ssDNA vaku (Lee ja Yang, 2006). PcrA helikaasil on kirjeldatud samasuguse stabiliseeriva ülesandega fenüülalaniini positsioonis 626, mis jääb tänapäevase klassifikatsiooni järgi samuti



motiivi VIa (Velankar *et al.*, 1999). Huvitavat eraldusnõela struktuuri on kirjeldatud ka RecBCD ensüümil, kus see ei kuulu helikaasse alamühiku struktuuri, vaid eraldi RecC subühiku koosseisu. Antud struktuur surub DNA ahela laiali, suunates ühe ahela helikaas RecB ja teise helikaas RecD suunas (Singleton *et al.*, 2004).

## 1.7 Mitokondriaalne DNA helikaas Hmi1

Käesolev magistritöö keskendub mitokondriaalsele helikaasile Hmi1, mis kuulub superperekond 1 helikaaside hulka, omab samuti helikaasidele iseloomulikke konserveerunud järjestusi ja on liigitatud UvrD/Rep sarnaste valkude perekonda (Sedman *et al.*, 2000; Fairman-Williams *et al.*, 2010).

Hmi1 muudab silmapaistvaks 36 aminohappe pikkune C-terminaalne sihtmärksignaali, mis suunab valgud mitokondrisse. Kuigi reeglina omavad mitokondriaalsed valgud N-terminaalset signaali, siis Hmi1 oli esimene valk, mille puhul suudeti kirjeldada C-terminaalset mitokondrisse lokaliseerumise signaali (Lee ja Yang, 1999; Sedman *et al.*, 2000). Hmi1 on 80 kDa suurune mitokondriaalne valk, mis koosneb 706 aminohapest ning mida kodeerib *S. cerevisiae* tuumagenoomi 15-es kromosoom (Kuusk *et al.*, 2005; Sedman *et al.*, 2000). Tegemist on mitokondriaalse DNA helikaasiga, mis omab ATPaasset aktiivsust ning vajab funktsionaalsuseks  $Mg^{2+}$ , ATP ja üheaahelalise DNA olemasolu (Kuusk *et al.*, 2005).

Hmi1 omab olulist rolli tervikliku mtDNA säilimises ja stabiilsuses. Hmi1 deleteerimisel pärmis, ei suuda rakud aeroobselt hingata, kuid defektse hingamisahelaga rho- mutanttüvedel ei ole Hmi1 olemasolu mtDNA säilimiseks vajalik. Hmi1 puudumisel väheneb pikemate DNA konkatemeeride (ing. concatemer) hulk. Mutatsioonid ATP sidumise ja hüdroolüüsiga seotud positsioonides, K32M ja E211Q, mis asuvad vastavalt helikaasi motiivides I ja II (vaata joonis 3) ei mõjuta konkatemeeride pikkust ning ei ole vajalikud täieliku mtDNA säilimiseks *in vivo*. *In vitro* tehtud katsed on näidanud, et Hmi1 mutant E211Q ei ole võimeline ATP-d hüdroolüüsima ja sellel mutandil puudub ka helikaasne aktiivsus (Kuusk *et al.*, 2005; Sedman *et al.*, 2000; Sedman *et al.*, 2005). Kõige efektiivsemalt harutab Hmi1 lahti 30 nukleotiidilisi kaheaahelalisi fragmente, millel on vähemalt 19 nukleotiidi pikkune üksikahelaline üleulatuv 3' ots, mis on kooskõlas sellega, et tegemist on A tüüpi helikaasiga ja valgul on 3'-5' suunaline translokaasne võime (Kuusk *et al.*, 2005).

Hmi1 funktsiooni üle on spekuleeritud, et antud omaduste põhjal võiks Hmi1 osaleda kas DNA rekombinatsioonis või replikatsioonis, sarnaselt homologilistele helikaasidele teistes organismides (Kuusk *et al.*, 2005; Sedman *et al.*, 2000; Sedman *et al.*, 2005). Järjestuse põhjal

peetakse Hmi1-le kõige lähedasemateks helikaasideks UvrD/Rep perekonda kuuluvaid *E. coli* UvrD, Rep ja RecB helikaase ning *S. cerevisiae* Srs2- te (Fairman-Williams *et al.*, 2010).

Neist ainuke *S. cerevisiae* helikaas Srs2 on tuuma helikaas, mis omab väga palju erinevaid funktsioone nii replikatsioonil, rekombinatsioonil kui ka erinevate vigastuste parandamisel. Srs2 valk interakteerub paljude erinevate teiste valkudega, nt. Rad51-ga ja PCNA-ga (Burgess *et al.*, 2009; ülevaade Niu ja Klein, 2017; Ortiz *et al.*, 2011; Potenski *et al.*, 2014). Võimalik, et Hmi1 funktsioon sarnaneb mõne Srs2 rekombinatsioonil või replikatsioonil esineva funktsiooniga (Kuusk *et al.*, 2005; Sedman *et al.*, 2005).

Srs2 üheks peamiseks funktsiooniks peetakse anti-rekombinaasset võimet. Srs2 on oluline osaline rekombinatsioonil, kus ta osaleb Rad51 poolt indutseeritud rekombinatsiooni filamentide tekkimise takistamises, balansseerides Rad52 rekombinatsiooni soodustavat tegevust (Burgess *et al.*, 2009; Ortiz *et al.*, 2011). Srs2 omab ka helikaasest aktiivusest sõltumatut rolli replikatsioonil, kus ta interakteerub PCNA ehk prolifereruva raku tuuma antigeeniga, mis on hädavajalik replikatsiooni toimumiseks (Ortiz *et al.*, 2011). Srs2 saab replikatsioonil osaleda tänu domäänile, mis seondub sumoüleeritud PCNA-ga. Lisaks replikatsiooni kahvlisse lokaliseerumisele ja rekombinatsiooni mahasurumisele, osaleb Srs2 ka DNA katkete parandamisel koos nukleas Exo1-ga (Potenski *et al.*, 2014).

## 2 MATERJALID JA METOODIKA

### 2.1 Töö eesmärk

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli

- 1) Konstrueerida Hmi1 valgu konserveerunud helikaasi motiivide mutandid valgu struktuuri ennustuse põhjal ja kontrollida nende mõju mitokondriaalse DNA säilimisele.
- 2) Puhastada Hmi1 metsiktüüpi valku ja *in vivo* katsetes tugevat fenotüüpi näidanud mutatsioonidega valke ja kontrollida nende aktiivsust.

## 2.2 Tüved ja vektorid

Tabel 1. Töös kasutatud tüved

Tüvi	Genotüüp	Päritolu
<i>S. cerevisiae</i> tüved		
W303 a/α	<i>MAT-a/MAT-α ade2-1/ade2-1 ura3-1/ ura3-1 his3-11,15/his3-11,15 trp-1/ trp-1 leu2-3,112/leu2-3,112 can1-100/ can1-100 rho<sup>+</sup></i>	Wallis <i>et al.</i> , 1989
W303 a	<i>Mat-a; ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100 rho<sup>+</sup></i>	Wallis <i>et al.</i> , 1989
W303 α	<i>Mat-α ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100 rho<sup>+</sup></i>	Wallis <i>et al.</i> , 1989
W303a/α <i>hmi1Δ</i>	<i>MAT-a/MAT-α ade2-1/ade2-1 ura3-1/ ura3-1 his3-11,15/his3-11,15 trp-1/ trp-1 leu2-3,112/leu2-3,112 can1-100/ can1-100; HMII/hmi1::TRP1 rho<sup>+</sup></i>	Sedman <i>et al.</i> , 2000
W303 <i>hmi1Δ</i> +pRS316 <i>HMII</i>	W303 <i>Mat-α ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100; hmi1::TRP1 ; + plasmiid pRS316-HMII rho<sup>+</sup></i>	Sedman <i>et al.</i> , 2000

W303 $\alpha$ KanMx <i>hmi1E211Q</i>	<i>Mat-<math>\alpha</math> ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100 KanMx4 hmi1-E211Q rho<sup>+</sup></i>	Valmistatud Joachim Matthias Gerholdi poolt
<b>Töö käigus konstrueeritud <i>S. cerevisiae</i> tüved</b>		
W303a/ $\alpha$ KanMx	<i>MAT-a/MAT-<math>\alpha</math> ade2-1/ade2-1 ura3-1/ ura3-1 his3-11,15/his3-11,15 trp-1/ trp-1 leu2-3,112/leu2-3,112 can1-100/ can1-100 KanMx4 rho<sup>+</sup></i>	
W303a/ $\alpha$ KanMx <i>hmi1E211Q</i>	<i>MAT-a/MAT-<math>\alpha</math> ade2-1/ade2-1 ura3-1/ ura3-1 his3-11,15/his3-11,15 trp-1/ trp-1 leu2-3,112/leu2-3,112 can1-100/ can1-100 KanMx4 hmi1-E211Q rho<sup>+</sup></i>	
W303a/ $\alpha$ KanMX <i>hmi1D237N</i>	<i>MAT-a/MAT-<math>\alpha</math> ade2-1/ade2-1 ura3-1/ ura3-1 his3-11,15/his3-11,15 trp-1/ trp-1 leu2-3,112/leu2-3,112 can1-100/ can1-100 KanMx4 hmi1-D237N rho<sup>+</sup></i>	
W303a/ $\alpha$ KanMx <i>hmi1Y243A</i>	<i>MAT-a/MAT-<math>\alpha</math> ade2-1/ade2-1 ura3-1/ ura3-1 his3-11,15/his3-11,15 trp-1/ trp-1 leu2-3,112/leu2-3,112 can1-100/ can1-100 KanMx4 hmi1-Y243A rho<sup>+</sup></i>	
W303a/ $\alpha$ KanMx <i>hmi1Q240E</i>	<i>MAT-a/MAT-<math>\alpha</math> ade2-1/ade2-1 ura3-1/ ura3-1 his3-11,15/his3-11,15 trp-1/ trp-1 leu2-3,112/leu2-3,112 can1-100/ can1-100 KanMx4 hmi1-Q240E rho<sup>+</sup></i>	
W303a/ $\alpha$ KanMx <i>hmi1</i> <i>T587A/H589D</i>	<i>MAT-a/MAT-<math>\alpha</math> ade2-1/ade2-1 ura3-1/ ura3-1 his3-11,15/his3-11,15 trp-1/ trp-1 leu2-3,112/leu2-3,112 can1-100/ can1-100 KanMx4 hmi1- T587A/H589D rho<sup>+</sup></i>	
W303a KanMx	<i>Mat-<math>\alpha</math> ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100 KanMx4 rho<sup>+</sup></i>	
W303a KanMx <i>hmi1Y243A</i>	<i>Mat-<math>\alpha</math> ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100 KanMx4 hmi1-Y243A rho<sup>+</sup></i>	

W303a KanMx <i>hmi1Q240E</i>	<i>Mat-α ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp-1 leu2-3,112 can1-100</i> KanMx4 <i>hmi1-Q240E rho<sup>+</sup></i>	
<b>Plasmiidid</b>		
pRS315	pBLUESCRIPT + Leu2 marker, CEN6 tsentromeerne järjestus, ARSH4 autonoomse replikatsiooni järjestus (Kasutatav nii bakteris kui pagaripärmis)	Sikorski ja Hieter, 1989
pRep22	pBLUESCRIPT KS (+) + <i>HMI1</i> geen koos külgneva 762 nukleotiidiga ülesvoolu ja 354 nukleotiidiga allavoolu olev fragment on sisestatud BamHI restriktsioonisaiti	Sedman <i>et al.</i> , 2000
pRep22 Kan Mx	pRep22, millele on lisatud SmaI lõikekohta Kan Mx 4	Valmistatud Tiina Sedmani poolt
pRS315- <i>HMI1</i>	pRS315 plasmiid + 3,3-kb SacI/SalI fragment pRep22-st	Sedman <i>et al.</i> , 2005
pRS315- <i>hmi1</i> -K32M	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 32 positsioonis lüsiin metioniini vastu	Sedman <i>et al.</i> , 2005
pRS315- <i>hmi1</i> -E211Q	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 211 positsioonis glutamiinhape glutamiini vastu	Sedman <i>et al.</i> , 2005
pRS315- <i>hmi1</i> -Q8E	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 8ndas positsioonis glutamiin glutamiinhappe vastu	Valmistatud Astrid Salumäe poolt
pRS315- <i>hmi1</i> - F75A	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 75ndas positsioonis fenüülalaniinalaniini vastu	Valmistatud Astrid Salumäe poolt

pRS315- <i>hmi1</i> - N77D	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 77ndas positsioonis aspargiin aspargiinhappe vastu	Valmistatud Astrid Salumäe poolt
pGex4T-TEV	pGex4T-1 plasmiid, milles trombiini järjestus on asendatud TEV proteaasi järjestusega Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln/Ser	Valmistatud Alvin Meltsovi poolt
<b>Töö käigus konstrueeritud plasmiidid</b>		
pRS315- <i>hmi1</i> - D210N/E211Q	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 210ndas positsioonis aspargiinhape aspargiini vastu ja 211ndas positsioonis glutamiinhape glutamiini vastu	
pRS315- <i>hmi1</i> - D237N	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 237ndas positsioonis aspargiinhape aspargiini vastu	
pRS315- <i>hmi1</i> - Q240E	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 240ndas positsioonis glutamiin glutamiinhappe vastu	
pRS315- <i>hmi1</i> -Y243A	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 243ndas positsioonis türosiinalaniini vastu	
pRS315- <i>hmi1</i> -F274A	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 274ndas positsioonis arginiinalaniini vastu	
pRS315- <i>hmi1</i> -R275A	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 275ndas positsioonis fenüülalaniinalaniini vastu	
pRS315- <i>hmi1</i> - K397E	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 397ndas positsioonis lüsiin glutamiinhappe vastu	
pRS315- <i>hmi1</i> - G434T	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 434ndas positsioonis glütsiin türosiini vastu	
pRS315- <i>hmi1</i> - S437T	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 243ndas positsioonis seriin türosiini vastu	

pRS315- <i>hmi1</i> -T587A/H589D	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 587ndas positsioonis treoniin alaniini vastu 589ndas positsioonis histidiin aspartaathappe vastu
pRS315- <i>hmi1</i> -G593A	pRS315- <i>HMI1</i> + sisseviidud asendus 593ndas positsioonis glütsiin alaniini vastu
pRS315- <i>hmi1</i> -Y617A	pRS315- <i>HMI1</i> + isseviidud asendus 617ndas positsioonis türosiin alaniini vastu
pRS315- <i>hmi1</i> - R622A	pRS315- <i>HMI1</i> + isseviidud asendus 622ndas positsioonis arginiin alaniini vastu
pGex4T-TEV-Hmi1	pGex4T-TEV BamHI ja SalI restriksioonisaidi vahele sisse viidud <i>HMI1</i> geen
pGex4T-TEV-Hmi1-E211Q	pGex4T-TEV-Hmi1 + sisseviidud asendus 211ndas positsioonis glutamaathappe glutamiini vastu
pGex4T-TEV-Hmi1-Q240	pGex4T-TEV-Hmi1 + sisseviidud asendus 240ndas positsioonis glutamiin glutamaathappe vastu
pGex4T-TEV-Hmi1-Y243A	pGex4T-TEV-Hmi1 + sisseviidud asendus 243ndas positsioonis türosiin alaniini vastu
pGex4T-TEV-Hmi1-T587A/H589D	pGex4T-TEV-Hmi1 + sisseviidud asendus 587ndas positsioonis treoniin alaniini vastu 589ndas positsioonis histidiin aspartaathappe vastu
pGex4T-TEV-Hmi1-Y617A	pGex4T-TEV-Hmi1 + isseviidud asendus 617ndas positsioonis türosiin alaniini vastu

## 2.3 Praimerid

**Tabel 2.** Töös kasutatud praimerid

Primeri nimi	Järjestus
<b>Mutageneesi praimerid</b>	



HmiI Q8E forward	5'-GCT AAC TCC ATC TGA ATG GAA GG-3'
HmiI F75A forward	5'-CAT TGC CGA AAA CTC GCA TAC-3'
HmiI N77D forward	5'-CCA TTT TCG AAG ACT CGC ATA C-3'
HmiI D210N/E211Q forward	5'-GGT TGT TCT TAT CAA TCA ATT TCA GGA CC-3'
HmiI D237N forward	5'-GCA GCT CAT TAT GTT TGG TAA TAC-3'
HmiI Q240E forward	5'-TGG TGA TAC AAA TGA AAG CAT ATA CG-3'
HmiI Y243A forward	5'-GCA TAG CCG GAT TTT TGG GGA G-3'
HmiI F274A reverse	5'-G GGG GTA GAC CTA GCA TTA TCA AAT-3'
HmiI R275A reverse	5'-G GGG GTA GAA GCA AAA TTA TCA AAT-3'
HmiI 1182 K397E forward	5'-TAT TCT AGA AGT GTG TTC TTT AGC C-3'
HmiI 1288 G434T forward	5'-CTC AAA GGG ATT ACC GAT GCT TCA-3'
HmiI 1302 S437T forward	5'-CGA TGC TGC AAT ACA AGC CTT-3'
HmiI 1752 T587A/H589D forward	5'-ACT ATC TGC CAT CGA TTC TGC A-3'
HmiI 1769 G593A forward	5'-CTG CAA AGG CCT TAG AAT TTC CC-3'
HmiI Y617A forward	5'-CCT TGC TGT GGG GAT AAC TAG G-3'
HmiI R622A forward	5'-GG ATA ACT GCT GCA AGA AAC TTG-3'
HmiI 572 NsiI forw	5'-CAG ATG CAT CGT CTT TTA CTC AAG-3'
HmiI 595 NsiI rev	5'-CTT GAG TAA AAG ACG ATG CAT CTG-3'
HmiI 1322 SphI forw	5'-TGT ATA AAG CAT GCA GCC TGA-3'
HmiI 1319 SphI rev	5'-CAG GCT GCA TGC TTT ATA CAA GG-3'
USP	5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'

RSP	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
KanMx3	5'-GAATTCGAGCTCGTTTTTCGACAC-3'
KanMx5	5'-CGTACGCTGCAGGTCGAC-3'
<b>Valgu ekspressiooni vektorite konstrueerimise praimerid</b>	
Q8E+ BamHI forward	5'-ACT GGA TCC GAC AAG CTA ACT CCA TCT GAA TG-3'
HMI1-5BAM	5'-ACT GGA TCC GAC AAG CTA ACT CCA TCT CAA TG-3'
HMI1-3D15STOP-SAL	5'- TCA CGT CGA CCT ATG CTC TAT AAA ATC CAA AAT TTT TAC G-3'
<b>HMI1 geeni ja insertiooni kontrolli praimerid</b>	
BKAN forward	5'-AAAGTACAGTAGCAGGACACGGTTT-3'
Hmi 48 reverse	5'-CTT TTA TCG TAG ACG CTG GTT CA-3'
<b>Sekveneerimise praimerid</b>	
Hmi 48 forward	5'-TGA ACC AGC GTC TAC GAT AAA AG-'3
Hmi310	5'-AAT GAG GGG ATG ATA AAC-3'
Hmi679	5'-TGC AAA GGC AAG CAG CT-3'
Hmi1068	5'-AAA TTC ACA TCT AAC GGC-3'
Hmi1451	5'-TGA TCG AAA ATG ATC AAG-3'
Hmi1831	5'-ATG GAT ACA AAC GCC CTT-3'

## 2.4 Töös kasutatud PCR-i reaktsioonid, geelid ja standardmeetodid

Polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) reaktsiooni segu (20µl): 1x PCRi puhver (75mM tris(hüdrosümetüül)aminoetaan (Tris)-HCl (pH 8,8); 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1% Tween 20), 0,2mM nukleotiidid (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2U-d (ühikut) Taq DNA polümeraasi kontroll PCR-ides ja 2U-d Pfu polümeraasi (Puhastatud TÜ MRI üldise ja mikroobibiokeemia õppetooli laboris) preparatiivsetes PCR-i reaktsioonides, 5 pmol edaspidist ja 5 pmol tagasivaatavat praimerit, 30-50 ng DNA-d ja ddH<sub>2</sub>O kuni 20µl-ni.

PCR-i programm oli alati järgnev, kui ei ole kirjeldatud teisiti. Algne denaturatsioon oli 3 minutit ja iga tsükli alguses kestis denaturatsioon 30 sekundit. Praimerite seondumine kestis alati 30 sekundit, kuid temperatuur varieerus vastavalt praimerite paarile ja on välja toodud eraldi iga PCR-i katse juures. Elongatsioon viidi läbi 72°C juures ja aeg varieerus vastavalt produkti pikkusele ning on samuti kirjeldatud iga katse juures eraldi.

Kõiki PCR-i, ligeerimis ja DNA puhastuste produkte kontrolliti agarosgeelil (kui ei ole eraldi väljatoodud teised tingimused):

0,8% agarosgeel (0,8g agarosi 100 ml TAE (40mM Tris-atsetaat; 1mM etüleen-diamiin-tetraädikhape (EDTA) (pH8)) puhvri kohta), mis sisaldas 0,5µg/ml etiidium bromiidi. Proove jooksutati 50V pingega. Proovile lisati visualiseerimise 6x TAE laadimisvärvi (10mM, Tris-Hcl (pH 7,5), 5 mM EDTA (pH8); 50% glütserool; 0,25% broomfenoolsinine) mille lõppkontsentratsioon proovis oli 1x.

Valgu proove kontrolliti alati 10% naatriumdodetsüülsulfaat (SDS) poliakrüülamiid geelil (Sambrook ja Russel, 2001).

## 2.5 Söötmed

**Tabel 3.** Töös kasutatud söötmed

Söötme nimetus	Koostis	Allikas
YPG	1% pärmiekstrakt, 2% pepton, 3% glütserool  (Tardsöötme saamiseks lisati 1,7% agarit)	Sherman, 1991

YPD	1% pärmiekstrakt, 2% peptoon, 2% glükoos  (Tardsöötme saamiseks lisati 1,7% agarit)	Sherman, 1991
YPDG	YPG sööde + 0,1% glükoosi	Sherman, 1991
Luria-Bertani (LB) sööde	0,5% pärmiekstrakt, 1% trüptoon, 1%NaCl  (Tardsöötme saamiseks lisati 1,7% agarit)	Sambrook ja Russel, 2001
Sporulatsiooni sööde	1% Kaalium-atsetaat, 0.05% glükoos, 0,1% pärmiekstrakt  1x sporulatsiooni segu (0,05 mg/ml adeniin sulfaati, 0,125 mg/ml uratsiili, 0,25 mg/ml histidiini ja 0,25 mg/ml trüptofaani ja 0,625 mg/ml leutsiini), destilleeritud vesi  (Tardsöötme saamiseks lisati 1,7% agarit)	Sherman, 1991
Synthetic complete (SC)  -Ura -Trp  Glütserooliga	0,67% Pärmilämmastikalus (ilma aminohapeteta)  0,2% aminohapete ja nukleotiidide segu (Välja jäetud uratsiil ja trüptofaan)  3% glütserool  (Tardsöötme saamiseks lisati 1,7% agarit)	Sherman, 1991
Synthetic complete	0,67% Pärmilämmastikalus (ilma aminohapeteta)	Sherman, 1991

(SC) -Ura -Trp -Leu Glükoosiga	0,2% aminohapete ja nukleotiidide segu (Välja jäetud uratsiil, trüptofaan ja leutsiin)  2% Glükoos  (Tardsöötme saamiseks lisati 1,7% agarit)	
Synthetic complete (SC) -Leu -Trp Glükoosiga	0,67% Pärmilämmastikalus (ilma aminohapeteta)  0,2% aminohapete ja nukleosiidide segu (Välja jäetud trüptofaan ja leutsiin)  2% Glükoos  (Tardsöötme saamiseks lisati 1,7% agarit)	Sherman, 1991
M9 minimaalsööde kasaminohapetega (M9 CA)	1,28% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 0,3% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,05% NaCl; 0,1% NH <sub>4</sub> Cl; 0,4% glükoosi; 100 µM CaCl <sub>2</sub> ; 1mM MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 0,01% tiamiin; 0,5% kasaminohapped  + Ampitsilliini (Amp) lõppkontsentratsiooniga 0,1 mg/ml ja kloroamfenikooli 0,025 mg/ml	Sambrook ja Russel, 2001

Selektiivsöötmete saamiseks lisati vastavatele söötmetele antibiootikume. +Amp söötmele ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 0,1 mg/ml +Cam ehk kloroamfenikooli 0,025 mg/ml. YPG ja YPD- G418 tardsöötmele G418-t lõppkontsentratsiooniga 0,35mg/ml.

## 2.6 Lahused ja reagentid

**Restriktsioonid:** Kõik restriktsioonid viidi läbi Thermo Fisher Scientific restriктаasidega, vastavalt tootja soovitude järgi. Reaktsioon segati kokku järgneva protokollil alusel, kui ei ole

kirjeldatud teisiti. 20 µl-le DNA lahusele lisati 2,2 µl vastavat restriктаasi puhvrit ja 1,5 U restriктаasi.

**Ligeerimised:** Ligeerimisreaktsioonid viidi läbi Thermo Fisher Scientific T4 ligaasiga, vastavalt tootja soovitude järgi. 10,3 µl reaktsiooni segu sisaldas 6µl DNA-d (plasmidi ja sisestatavat fragmenti vastavalt kontsentratsiooni suhtele 1:2-le), 1µl 10x T4 ligaasi puhvrit, 3µl ddH<sub>2</sub>O-d ja 1.5 U T4 DNA ligaasi. Ligeerimine toimus toatemperatuuril 1 tund.

**Tabel 4.** Töös kasutatud lahused

Lahus	Koostis
T <sub>10</sub> E <sub>0,1</sub>	10 mM Tris-HCl (pH 8), 0,1 mM EDTA
10x LiOAc/Te	1M LiOAc, 100mM TrisHCl (pH8), 10mM EDTA
1x LiOAc/TE	0,1M LiOAc, 10mM TrisHCl (pH8), 1mM EDTA
40% PEG/LiOAc/TE	800 µl 50% Polüetüleenglükooli (PEG) lahusele (50g PEG4000, 100 milliliitris ddH <sub>2</sub> O-s ja autoklaavitud), 0,1 ml 10xLiOAc/TE-d, 0,1 ml ddH <sub>2</sub> O-d.
<b>Valgu puhastuse lahused</b>	
S <sub>100</sub> T <sub>10</sub> E <sub>1</sub>	0,1M NaCl, 10mM TrisHCl (pH 7,5), 1mM EDTA (pH 8)
Puhver A Hmi1	10% glütserool; 50mM Tris-HCl (pH 8); 300mM NaCl; 1mM EDTA (pH 8); 1mM DTT; 1mM PMSF
Puhver B Hmi1	20% glütserool; 20mM Tris-HCl (pH 8); 300mM NaCl; 0,1mM EDTA (pH 8); 1mM DTT
Puhver Q <sub>0</sub> Hmi1 (Puhver Q <sub>100</sub> Hmi1)	20% glütserool; 20mM Tris-HCl (pH 8); 0,1mM EDTA (pH 8); 1mM DTT; 1mM PMSF (100mM NaCl)
Puhver S Hmi1	2% glütserool; 25mM Tris-HCl Mes-NaOH; 0,1mM EDTA (pH 8); 1mM DTT; 1mM PMSF + vastavalt puhvrile x mM NaCl

## 2.7 Megapraimer 2 mutagenees

Mutatsiooniga järjestuse saamiseks, kasutati kaheastmelist megapraimeri meetodit, (kohandatud Sailen Bariku järgi, 1993) kus amplifitseeritakse kahe erineva PCR-i käigus fragment, mis sisaldab keskel mutatsiooni ja mõlemas fragmendi otsas asub restriktiooni lõikekoht, mis on algses metsiktüüpi konstruktis olemas. Vastavalt mutatsiooni asukohale, disainiti mutageneesi praimerid, mis on ära toodud punktis 2.3. Restriktiooni lõikekohtadeks valiti geeni algusesse ja lõppu jäävatel mutatsiooni fragmentidel plasmidi polükloonimissaiti vastavalt algusest SallI ja lõpust SacII ja geeni keskelt vastavalt unikaalsed NsiI ja SphI. Geeni keskel asuvad mutatsiooni kohad jäid kahe nimetatud keskmise restriktiooni lõikekoha vahele. Mutantse fragmendi saamiseks viidi läbi kaks PCR-i reaktsiooni, standartse protokoll järgi (Sambrook ja Russel 2001), kasutades Pfu DNA polümeraasi.

PCR-i segu valmistati vastavalt punktis 2.4 kirjeldatule, alusmaterjalina kasutati 10ng pRep22 plasmidi. PCR-i programm varieerus vastavalt mutantsele praimerile, kuid kõikidel juhtudel oli algse denaturatsiooni temperatuuriks 95°C ja pikkuseks 3 minutit, iga tsükli alguses toimus samal temperatuuril denaturatsioon 30 sekundit. Praimerite seondumine kestis alati 30sekundit ja elongatsioon toimus 72°C juures. PCR kestis kas 25 või 30 tsükli. Ülejäänud erinevused on välja toodud tabelis 5.

**Tabel 5.** Mutageneesi 1 PCR-i praimerite paarid, praimerite seondumise temperatuur ja elongatsiooni aeg.

Praimeri paar 1 PCRis	Praimerite seondumise temperatuur	Elongatsiooni aeg
Hmi1 Q8E forward + Hmi1 595 NsiI rev	54°C	50 sekundit
Hmi1 F75A forward + Hmi1 595 NsiI rev	50°C	45 sekundit
Hmi1 N77D forward + Hmi1 595 NsiI rev	50°C	45 sekundit
Hmi1 D210N/E211Q forward + HmiI SphI 1319 rev	54°C	1 minut 30 sekundit
Hmi1 D237N forward + HmiI SphI 1319 rev	50°C	45 sekundit
Hmi1 Q240E forward + HmiI SphI 1319 rev		45 sekundit
Hmi1 Y243A forward + HmiI SphI 1319 rev	54°C	50 sekundit

Hmi1 F274A reverse + HmiI SphI 1319 rev	50°C	45 sekundit
Hmi1 R275A reverse + HmiI SphI 1319 rev		45 sekundit
Hmi1 1182 K397E forward + USP	54°C	1 minut 30 sekundit
Hmi1 1288 G434T forward + USP		
Hmi1 1302 S437T forward + USP		
Hmi1 1752 T587A/H589D forward + USP		
Hmi1 1769 G593A forward + USP		
Hmi1 Y617A forward + USP	54°C	50 sekundit
Hmi1 R622A forward + USP	50°C	45 sekundit

Peale esimest megaprimeriga PCR-i kontrolliti DNA fragmendi pikkust 0,8% agarosgeelil ja lõigati õige suurusega produkt välja ning puhastati FavorPrep GEL/PCR Purification Kit-iga.

Teise PCR-i reaktsiooni jaoks kasutati esimese PCRi produkti, mis sisaldas mutatsiooniga järjestust ja ühte restriksiooni lõikekohta ning ühte uut praimerit, millega amplifitseeriti vajaminevale fragmendile juurde teine restriksiooni lõikekoht.

PCR-i segu vastab punktis 2.4 kirjeldatule, järgnevate erisustega: ühe praimeri asemel kasutati 1/4 esimese PCR-i produkti ja reaktsioon viidi läbi 30µl-s.

Teise PCR-i praimerite seondumise temperatuur ja elongatsiooni aeg varieerusid vastavalt mutandile. Algne denaturatsiooni temperatuur oli 95°C ja pikkuseks 5 minutit, iga tsükli alguses toimus samal temperatuuril denaturatsioon 1 minut. Praimerite seondumine kestis alati 1 minut ja elongatsioon toimus 72°C juures, PCR kestis 30 tsükli. Ülejäänud erinevuse on välja toodud tabelis 6.

**Tabel 6.** Mutageneesi 2 PCR-i praimerite paarid, praimerite seondumise temperatuur ja elongatsiooni aeg.

Praimeri paar 2 PCRis	Praimerite seondumise temperatuur	Elongatsiooni aeg
-----------------------	-----------------------------------	-------------------



1. PCR-i Hmi1 Q8E produkt + RSP		1 minut 40 sekundit
1. PCR-i Hmi1 F75A produkt + RSP		1 minut 40 sekundit
1. PCR-i Hmi1 N77D produkt + RSP	54°C	1 minut 40 sekundit
1. PCR-i Hmi1 D210N/E211Q produkt + NsiI forward		2 minut 30 sekundit
1. PCR-i Hmi1 D237N produkt + NsiI forward		50 sekundit
1. PCR-i Hmi1 Q240E produkt + NsiI forward		50 sekundit
1. PCR-i Hmi1 Y243A produkt + NsiI forward	50°C	50 sekundit
1. PCR-i Hmi1 F274A produkt + NsiI forward		50 sekundit
1. PCR-i Hmi1 R275A produkt + NsiI forward		50 sekundit
1. PCR-i Hmi1 1182 K397E produkt + NsiI forward		2 minut 30 sekundit
1. PCR-i Hmi1 1288 G434T produkt + NsiI forward		
1. PCR-i Hmi1 1302 S437T produkt + NsiI forward		1 minut 30 sekundit
1. PCR-i Hmi1 1752 T587A/H589D produkt + SphI forward	54°C	
1. PCR-i Hmi1 1769 G593A produkt + SphI forward		1 minut 30 sekundit
1. PCR-i Hmi1 Y617A produkt + SphI forward		1 minut 40 sekundit
1. PCR-i Hmi1 R622A produkt + SphI forward		1 minut 40 sekundit

Lõplik fragment puhastati fenool/kloroformi meetodil (Sambrook ja Russel, 2001).

## 2.8 Pärmivektorite ja valguvektorite valmistamine

Kõik töö käigus konstrueeritud mutatsioonid sisaldavad pärmi- ja valgu ekspressioonivektorid saadi metsiktüüpi *HMI1* geeniga plasmide modifitseerides, asendades metsiktüüpi järjestuse mutatsiooni sisaldava restriksioonifragmentiga. Algne mutatsiooniga järjestus konstrueeriti pRep22 plasmidi.

Pärmivektorid pRS315- *HMI1* ja pRep22 metsiktüüpi geeniga plasmidi restrikteeriti vastavalt mutatsiooni asukohale kas SallI-NsiI-ga (geeni alguses paiknevad mutandid, enne 192-t aminohapet), NsiI-SphI (geeni keskel paiknevad mutandid), SphI-SacII-ga (geenis peale 445ndat aminohapet asuvad mutandid). Geeni lõpus asuvad mutatsioonid viidi pRep22 asemel otse pRep22 KanMx plasmidi mis sisaldab *HMI1* geeni ees asuvat G-418 resistentsust kodeerivat järjestust pärmi transformatsiooni selektiivsuseks. Restriksioon ja ligeerimisreaktsioon viidi läbi nagu kirjeldatud punktis 2.6. erinevusega, et restriksiooniks võeti 5U restriктаasi.

Valguvektorite saamiseks konstrueeriti kõigepealt pGex4T-TEV-Hmi1 plasmid, mille saamiseks viidi pGex4T-TEV plasmidi sisse metsiktüüpi *HMI1* geen, mille lõpust puudus 14 aminohappelist signaaljärjestust kodeeriv geenijärjestus. Hmi1 vastava järjestuse saamiseks kasutati PCR-i meetodit milles kasutati praimerid HMI1-5BAM ja HMI1-3D15STOP-SAL, ja matriitsina pRep22. Praimerite seostumise temperatuuriks oli 53°C ja elongatsiooni pikkuseks 3 minutit ja 20 sekundit.

Konstrueeritud pGex4T-TEV-Hmi1 valguvektorisse, positsioonidesse E211Q; Q240E; Y243A; T587A/H589D mutatsioonide saamiseks asendati mutatsiooniga järjestus ülal kirjeldatud restriksiooni lõikekohtade abil. T587A/H589D sisseviimiseks kasutati SacII restriктаasi asemel restriктаasi BsrGI.

Kõiki valgu ekspressioonivektoreid kontrolliti sekveneerimisega, et kinnitada nendes mutatsioonide olemasolu.

## 2.9 DNA transformeerimine bakterisse

Saadud plasmidsete vektorite paljundamiseks viidi läbi bakteri transformatsioon, mille protokoll on optimeeritud Sambrook ja Russeli põhjal ning oli kõikides katsetes samasugune, kui ei ole kirjeldatud teisiti. Transformatsiooniks kasutati 20µl DH5α kompetentseid rakke, millele lisati 1 µl plasmidi. Segu segati ja inkubeeriti 20 minutit jääs ja kuumašokk viidi läbi 37°C juures 2 minutit ning jahtunud segule lisati 300µl LB söödet, millele oli lisatud MgSO<sub>4</sub> lõppkontsentratsiooniga 20mM. Vastava antibiootikumiga selektiivsöötmel, külvati madala

koopiarvuga plasmiidide puhul 100µl transformatsiooni segu ja kõrge koopiarvuga plasmiidide puhul 50µl segu. Plasmiidne DNA eraldati 2.5 ml vedelkultuurist, standardprotokolli järgi, väikese mahu leeliselise lüüsi ja SDS meetodil koos RNAaas A töötlusega (Sambrook ja Russel, 2001).

## **2.10 KanMx kasseti sisseviimine pRep 22 vektorisse**

G-418 kasseti fragment saadi PCR-i abil kasutades matriitsina pRep22 KanMx konstrukti, mis sisaldas vastavat järjestust. PCR-is kasuti kineeritud primereid KanMx3 ja KanMx5. 10µl reaktsioonisegusse lisati 30 pmol primereid, 1x Kinaasi puhvrit A, 10 ühikut polünukleotiidkinaasi (10u/µl) (Thermo Fischer Scientific) ja ATP-d 1mM. Reaktsioonisegu inkubeeriti 1h 37°C juures.

Produkt puhastati fenool-kloroform töötlusega (Sambrook ja Russel, 2001) ja saadud primereid kasutati PCR läbiviimiseks standardtingimustel, primerite seondumise temperatuuriga 54°C ja elongatsiooni pikkuseks oli 1 minut ja 50 sekundit. Saadud produkt puhastati uuesti fenool-kloroformi meetodil.

G-418 kasseti insertiooniks, restrikteeriti muteeritud *HMI1* geeni sisaldavaid pRep 22 vektoreid restriктаasi SmlI-ga (10 ühikut) 1 tund 30°C ning fosfaatide eemaldamiseks järgnevalt: 1 U FastAP-i ehk aluselise fosfataasiga (Thermo Fischer Scientific) ja inkubeeriti veel 10 minutit 37°C juures. Ensüümid inaktiveeriti 5 minutit 75°C.

Lineariseeritud vektor puhastati 0,8% geelil, kasutades FavorPrep GEL/PCR Purification Kit (Favorgen Biotech Corp.) komplekti standardse tootjapoolse protokoll järgi. Seejärel ligeeriti plasmiid ja G-418 kasseti fragmendid ja transformeeriti DH5α rakkudesse ja puhastati samadel tingimustel nagu on kirjeldatud punktis 2.9.

## **2.11 Pärimi transformatsioon liitium atsetaadi meetodil**

Pärimi transformeerimiseks kasutati kohandatud liitium atsetaadi meetodit (Rose *et al.*, 1990).

30°C juures YPD söötmetassil üles kasvanud *S. cerevisiae* W303a/a 1-3 kolooniat suspendeeriti YPD vedelsöötmes ning kasvatati loksutis 30°C juures, tiheduseni OD600 0.4-0.5. Iga transformatsiooni kohta kasvatati 20ml kultuuri. Rakud tsentrifugeeriti (Hettich Universal 32R, rootor 1617 swing out) 3200 pöördega minutis (rpm) juures 3 minutit. Sademelt eemaldati sööde ja resuspendeeriti steriilse ddH<sub>2</sub>O-ga vorteksi abil. Rakud koguti uuesti 3200 rpm-i juures 3 minutit tsentrifugeerides ja ddH<sub>2</sub>O eemaldati. Rakud resuspendeeriti iga transformatsiooni kohta 1ml 1x LiOAc/TE lahusega ja tsentrifugeeriti seejärel 3200 rpm-iga, 1 minut. Supernatant eemaldati sademelt ja resuspendeeriti iga transformatsiooni kohta 50 µl LiOAc/TE-s. Saadud

segu inkubeeriti 30°C juures 20 minutit. Segule lisati 100 µg kandja DNA-d (milleks oli lõhe spermi DNA, mida denatureeriti enne lisamist 5 minutit 95°C juures ja jahutati jääl, 1 µg restriктаaside KpnI ja SacII-ga lineariseeritud plasmiidset DNA-d. Saadud segu segati vorteksil ja inkubeeriti 20 minutit 30°C juures, aeg-ajalt segades.

Peale 20 minutit lisati reaktsioonile 300 µl 40% PEG-LiOAc/Te-d, segati vorteksil ja inkubeeriti 30°C juures 1 tund. Transformatsioonisegule lisati 35 µl dimetüül sulfoksiidi (DMSO) ja sellele järgnes kuumašhokk 42° juures 10 minutit. Rakud koguti kokku lauafuugis (Eppendorf "Minispin", rootor F45-12-11) 3700 rpm-i juures 1 minutiga ja eemaldati supernatant.

Rakud suspendeeriti 2,5 ml YPD steriilses söötmes ja pandi kasvama 10 tunniks loksutisse 30°C juurde. Peale inkubatsiooni tsentrifuugiti rakud kokku 1 minuti jooksul lauafuugis 3700 rpm-i juures, sööde eemaldati ja rakud resuspendeeriti 100 µl YPD steriilses söötmes. Rakud plaaditi välja selektiivsetele YPD-G418 tardsöötme tassidele.

## **2.12 Pärimüvede tetraad-analüüs**

### **2.12.1 Sporulatsioon**

Värsked transformeeritud diploidsed rakud külvati YPG tassilt sporulatsiooni tardsöötmele, lahjenduskülvi meetodil. Seejärel kasvasid tassid 3-4 päeva 30°C kapis. Värskelt sporulatsiooni tassilt võeti väikene hulk kultuuri, mis suspendeeriti 30 µl-s ddH<sub>2</sub>O-s ning seejärel lisati 20 µl-t zümolaasi (0,5mg/ml), segu inkubeeriti toatemperatuuril 3-4 minutit ning seejärel kanti 15 µl-t segu YPD ja YPG tassile. Sporulatsioonil tekkinud tetraadid eraldati Singer MSM series 300 mikromanipulaatoriga. Tardsöötme tasse kasvatati 3 päeva 30°C juures kuni kolooniate tekkimiseni.

### **2.12.2 Spooride kontroll**

Tetraadide laialiajamisel saadud haploidsed spoorid külvati edasi YPD, YPG ja YPD+G418 tassidele, kus kontrolliti nende kasvu mõlemal süsinikuallikal ja antibiootikumi resistentsust. Pärimüvede kontrollimiseks PCR-iga, kasutati YPD-G418 tassil üleskasvanud kolooniaid ja eraldati nendest genomne DNA. DNA eraldamiseks kasutati standardset LiOAc-SDS lüüsi protokollit pärmidele (Lõoke *et al.*, 2011). Mutatsiooni integreerumist kontrolliti PCR-i praimeritega BKAN forward ja Hmi 48 reverse, mis annavad erineva pikkusega produkti, vastavalt sellele, kas KanMx kassett on integreerunud *HMI1* geeni ette või mitte. PCR viidi läbi standardmeetodil, praimerite seondumise temperatuuriks oli 50°C ja elongatsioon kestis 72°C juures 2min ja 20 sekundit. Kõikide mutatsioonide olemasolu kinnitati sekveneerimisega.

## 2.13 Pärmis plasmiidi vahetus 5-fluoro-oroothapet tundlikuse meetodil

W303 *Δhmi1*:: TRP + pRS 316 *HMI1* tüvesse transformeeriti pRS315 plasmiid. Transformatsioon viidi läbi sarnaselt punktis 2.9. kirjeldatud liitium atsetaadi meetodile, kuid iga transformatsiooni kohta kasvatati 2ml rakke, transformeeriti 0,25 µg plasmiidi, DMSO-t ei lisatud ja kõik transformeeritud kultuur külvati välja peale kuumašhokki.

Tasse inkubeeriti 48 tundi 30°C juures, seejärel külvati 2ml-sse SC -Ura -Trp -Leu vedelsöötmesse üks koloonia, mis oli respiratoorselt aktiivse fenotüübiga ehk punased ja nii iga mutandi kohta kolmes korduses. Kultuure kasvatati 30°C juures 4-7h.

Vastavalt kultuuri optilisele tihedusele tehti väljakülvi lahjendus ddH<sub>2</sub>O-sse, et saada loetav arv kolooniaid. Väljakülvid viidi läbi põhimõtte alusel, et OD<sub>600</sub>=0,35 juures tehakse kultuurile kaks järjestikust 10 kordset lahjendust ja külvatakse välja SC -Leu -Trp 5-fluoro-oroothapet (1% lõppkontsentratsioon) sisaldavatele tardsöötme tassidele. Kolooniatel lasti kasvada 30°C juures 3 päeva ja seejärel toatemperatuuril 3 päeva. Saadud kolooniad loeti kokku ja eristades fenotüübilt punaseid, valgeid ja sektoritega kolooniaid (punased kolooniad, valge sektoriga.)

## 2.14 Pärmirakkude elumuse mõõtmine madala glükoosisisaldusega tassidel

Säilituskultuuridest välja külvatud tüved W303α, W303a KanMx, W303α KanMx *hmi1E211Q*, W303a KanMx *hmi1Y243A*, W303a KanMx *hmi1Q240E*, külvati edasi YPG söötmetassidele ning neid kasvatati 3 päeva 30°C juures. Seejärel külvati eelkultuuri saamiseks igast tüvest kolm kordust 4ml-sse YPG+G418 (va W303α) vedelsöötmesse. Kultuurid kasvasid siin ja edaspidi 30°C juures, loksutis 180rpm-iga.

48 tundi kasvanud eelkultuur lahjendati 20ml-sse YPG vedelsöötmesse. 24 tunni möödudes, kui tüved olid kasvanud eksponentsiaalsesse faasi, tehti uus lahjendus 20ml-sse värskesse YPG söötmesse.

Katse alguseks loeti (t=0), kus kultuuride OD<sub>600</sub> oli vahemikus 0,2 kuni 0,4 ning igast kultuurist tehti lahjendus YPD söötmesse OD<sub>600</sub>= 0,1-ni, mida korrati järgnevalt iga 5 tunni tagant lõpptiheduseni OD<sub>600</sub>= 0,05. Katse alguses (t=0), 10 ning 20 tunni möödudes tehti vedelkultuuridest YPDG tassidele väljakülv. Loetava arvu kolooniate saamiseks tehti kultuurist 150 kordse lahjendusega väljakülv. YPDG tardsöötmele tekkinud koloonia loeti kokku peale 3 päeva kasvamist 30°C termostaadikapis.

## **2.15 *E. coli* Rosetta tüves Hmi1 valgu ekspressioon ja puhastamine**

### **2.15.1 Hmi1 valgu ekspressioon bakteriaalses süsteemis**

pGex4T-TEV plasmiidil baseeruvad Hmi1 ekspressioonikonstruktid transformeeriti *E. coli* Rosetta tüve kompetentsetesse rakkudesse. Kompetentsed rakud saadi kaltsiumkloriidi meetodil standardprotokolli järgi (Sambrook ja Russel, 2001) järgneva erinevusega, et rakke kasvatati 20°C juures ja söötmele lisati MgSO<sub>4</sub> lõppkontsentratsiooniga 20mM. Rakud transformeeriti nagu kirjeldatud punktis 2.9 ning väljakülvatud baktoreid kasvatati 37°C kraadi juures üleöö LB + Cam, Amp tardsöötmetassidel.

Valguekspressiooni optimeerimiseks, võrreldi erinevaid indutseerimise temperatuure ja indutseerimisaja pikkust. 5ml LB (+Amp ja Cam) eelkultuuri üksikust kolooniast kasvatati 37°C kraadi juures 12 tundi. Eelkultuur lahjendati 300ml-sse M9+CA söötmesse optilise tiheduseni 0,025 ja jätkati kasvatamist 37°C kraadi juures, kuni optiline tihedus jõudis umbes 0,1ni. Edasi tõsteti kultuur 25°C juurde kasvama kuni OD oli 0,25. Selles katsepunktis jagati kultuur kolmeks ning pandi kasvama erinevatele temperatuuridele, nimelt 20°C, 18°C või 16°C. Optilise tiheduse jõudmisel 0,5-ni indutseeriti 8 tundi 0,2 mM IPTG (isopropüül-β-D-tiogalaktosiid) lisamisega. Ekspressiooni aja optimeerimise katses kasvatati kõiki kultuure 20°C juures ning neid indutseeriti 0,2 mM IPTG-ga vastavalt 8, 14 ja 16 tundi.

Induktsiooni lõpus koguti kultuurid kokku (Hettich Universal 32R, rootor 1617 swing out) tsentrifuugiga, 10 minutit 4500 rpm. Rakkudelt eemaldati sööde ja pesti läbi 10ml S<sub>100</sub>T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> lahusega. Tsentrifugimist korrati samadel tingimustel, vedelik eemaldati rakkudelt ning rakud külmutati vedelas lämmastikus.

### **2.15.2 Väikeses mahus valgu ekspressiooni kontroll**

Hmi1 valgupuhastusprotokoll on optimeeritud Kuusk, 2002 järgi. Kõik valkude eraldamisega seotud protseduurid viidi läbi jääs või 4°C juures. 100ml kultuurist saadud rakkudele lisati 1ml puhvrit A ja lütsotsüümi (AppliChem GmbH) lõppkontsentratsiooniga 0,18mg/ml ning proovi inkubeeriti 1h jääs. Suspensioon külmutati vedelas lämmastikus ning sulatati koheselt jääs. Sulanud lüsaati sonikeeriti kolm korda 10 sekundit 50% võimsusega (Bandelin sonoplus sonikaator) ja tsentrifuugiti Eppendorf "Minispin" (rootor F45-12-11) lauatsentrifuugiga, 13 400 rpm-iga 15 minutit. Saadud supernatandile lisati Glutathion-Sepharose kuule 20µl, mida oli enne pestud kaks korda ddH<sub>2</sub>O-ga ja tasakaalustatud nelja mahu puhver A-ga. Kuulidel lasti siduda valku 4°C juures tuube segades neli tundi. Segu tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga 1 minut 900 rpm-i 4°C juures ja valk elueeriti Puhver A-ga, mis sisaldas glutatiooni lõppkontsentratsiooniga 3,7mg/ml. Elueeritud valkude segu töödeldi 0,2µg/µl TEV proteaasiga

(Molekulaarbioloogia labori kingitus) üleöö. Proteaasiga lõigatud ja lõikamata proove kontrolliti SDS polüakrüülamiid geelil.

### **2.15.3 Suuremahuline Hmi1 valgu puhastus**

Suures mahus valguekspressiooniks kasutati söödet M9CA+ Amp, Cam juuresolekul ja indutseeriti 2l kultuure optilise tiheduse jõudmisel 0,5-ni 0,2 mM IPTG-ga 20°C kraadi juures 12 tundi.

Induktsiooni lõpus tsentrifugeeriti kultuuri Sorvall RC5B Plus tsentrifuugiga (rootor GS3), 12 min 4°C juures, 5000 rpm. Seejärel suspendeeriti ja pesti rakud 40ml S<sub>100</sub>T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> lahusega. Rakud koguti uuesti Hettich Universal 32R tsentrifuugis (rootor 1617 swing out) 10 minutit 5000 rpm ning külmutati vedelas lämmastikus.

Valgupuhastuseks suspendeeriti sulanud rakud 10 ml puhvri A-s. Lisati lütsotsüümi (AppliChem GmbH) lõppkontsentratsiooniga 1 mg/ml-s ja inkubeeriti jääl üks tund. Suspensioon külmutati vedelas lämmastikus ja sulatati uuesti. Sulanud suspensioonile lisati puhvrit A mahuni 25ml, 5mM MgCl<sub>2</sub> ning 20 ühikut DNAasi (AppliChem GmbH). Rakke hoiti üks tund jääl ning sonikeeriti (Cole Parmer) sonikaatoril, kolmel korral 20sekundit 50% tsükkel ja 0,7 koguvõimsusega. Saadud lüsaat tsentrifugeeriti Sorvall RC5B Plus tsentrifuugiga SS-34 rootoriga 20 minutit 15 000rpm-iga. Vajadusel korrati fuugimist, kui sade ei olnud korralikult kinni jäänud.

Supernatandile lisati 0,4ml Glutathion Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) puhvriga A tasakaalustatud kuule ja lasti neli tundi valku siduda 4°C juures suspensiooni segades. Peale nelja tundi lasti kuulidel sedimeteeruda üks tund. Seejärel tõsteti kuulid koos vähese puhvriga üle plastikkoloni, pesti 5x 750µl puhvriga B, 2x 750µl puhvriga B, millele oli lisatud 0.1% detergent NP-40, 1x 750µl puhvriga B, 2x 750µl puhvriga B+ 1M NaCl ning lõpuks veel 2x 750µl puhvriga B. Valk elueeriti puhvriga B+ 350 mM NaCl ja 10mM glutatioon ja koguti 150µl kaupa kuni 12 fraktsiooni, mida analüüsiti Bradfordi reagenti (Thermo Fisher Scientific) kasutades.

Valku sisaldavad fraktsioonid tõsteti kokku ja neile lisati TEV proteaas lõppkontsentratsiooniga 0,2µg/µl. Lõikus kestis 16 tundi 4°C juures. Lõigatud valk lahjendati 37,5 mM NaCl sisaldusega Puhver Q abil nii, et lõpplahus sisaldaks 100mM NaCl. Valgulahus kanti koheselt Q-sepharose FastFlow kolonnile (GE Healthcare), mida oli eelnevalt tasakaalustatud puhvriga Q+ 100mM NaCl. Q-sepharose kolonnilt koguti läbijooks ja 4 ml 100mM NaCl sisaldusega puhver Q fraktsioon. Seejärel kanti kõik kogutud materjal S-sepharose fast flow kolonnile (GE Healthcare), mida oli eelnevalt tasakaalustatud puhvriga S. Koloni pesti 3x 700µl puhver S

+100mM NaCl, 3x 700µl puhver S +150mM NaCl. Valk kogutakse kolonnilt kasutades Puhver S +400mM NaCl, 100µl fraktsioonide kaupa.

## 2.16 Hmi1 valgu ATP hüdrolüüsi aktiivsuse mõõtmine NADH-ga

Valkude aktiivsuse mõõtmine viidi läbi POLARstar Omega Multi-mode plaadilugejal 30 min. Reaktsioonisegu (15mM NaCl, 30mM Tris-MES (pH 7.5), 7mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 0,1mg/ml BSA, 0,15 mM NADH, 3 ühikut fosfoenoolpüruvaati, 3 ühikut püruvaat kinaasi ja 3 ühikut laktaadi dehüdrogenaasi) ja valku 4,25 nM reaktsiooni kohta. Osadele reaktsioonidele lisati 40 aluspaari (bp) pikkune ssDNA (TAG Copenhagen). Reaktsiooni segu kuumutati 2 min 30°C juures ja reaktsioonile lisati vahetult enne mõõtmist ATP lõppkontsentratsiooniga 5mM.

## 2.17 Hmi1 valgu struktuuri *in silico* analüüs

Hmi1 valgu võimaliku struktuuri analüüsiks, modelleerisin valgustruktuuri homoloogiliste valkude baasil. Selleks kasutati programmi I-tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> 15.04.18) interneti serverit (Zang, 2008; Yang *et al.*, 2015). Programmi sisestati modelleerimiseks Hmi1 valgu aminohappeline järjestus, mille lõpust puudus 14 aminohapet, mis moodustab küpse valgu küljest eemaldatava C-terminaalse mitokondriaalse signaali (Lee *et al.*, 1999).

I-tasseri programm kasutab stuktuuri ennustamiseks nelja põhilist etappi. Esimeses tehakse mittehomoloogne “threading” ehk valgu lõimimine, mille käigus leitakse aminohappelise primaarstruktuuri ja sekundaarstruktuuri elementide ennustusele põhinevad parimad referentsvalgud. Teises etapis pannakse paika referentsvalguga kattuvate alade fragmendid ning ennustatakse Monte Carlo simulatsiooni abil, millised on nende fragmentide vahelised struktuurid. Saadud tulemuse korrastamiseks korratakse ka saadud mudelitega protsessi uuesti. Lõplikku mudelit kasutatakse valgu struktuuride andmebaasi ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) abil erinevate ligandide seondumise ja struktuuri elementide funktsiooni ennustamiseks varem kirjeldatud valkude põhjal (Roy *et al.*, 2010).

Saadud tulemustest valiti ssDNA ligandi sisaldav struktuur Hmi1 kohta, et näitlikustada ennustatud DNA sidumisega antud magistritöös konstrueeritud mutantide paiknemist.

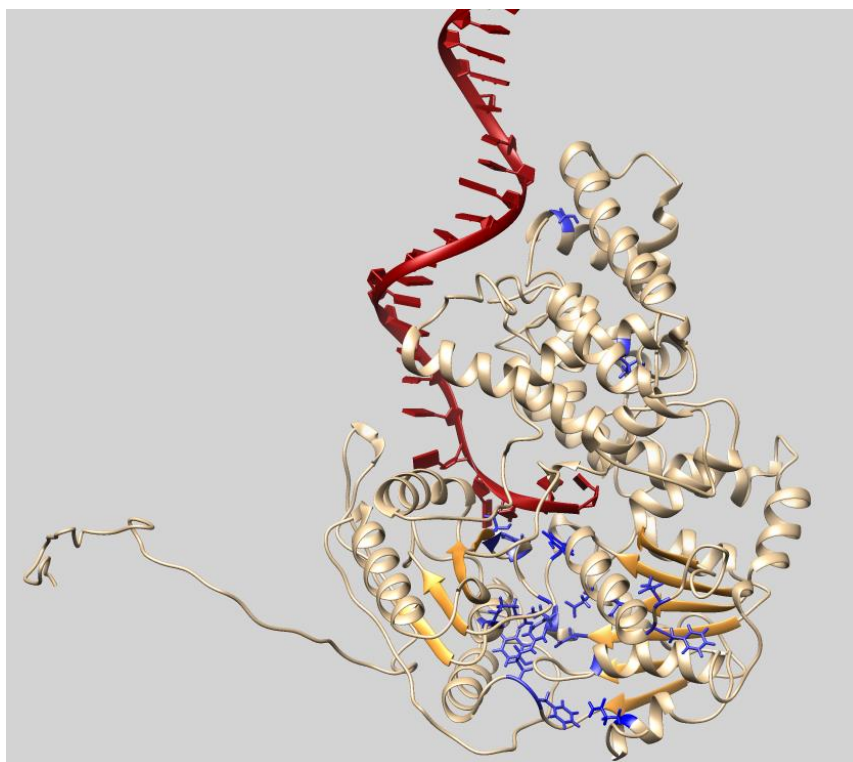
I-tasseri loodud valgukordinaatide põhjal kujutati Hmi1 valgu struktuur kasutades programmi UCSF Chimera 1.12 (Pettersen *et al.*, 2004; [www.cgl.ucsf.edu/chimera](http://www.cgl.ucsf.edu/chimera)).



### 3 TULEMUSED

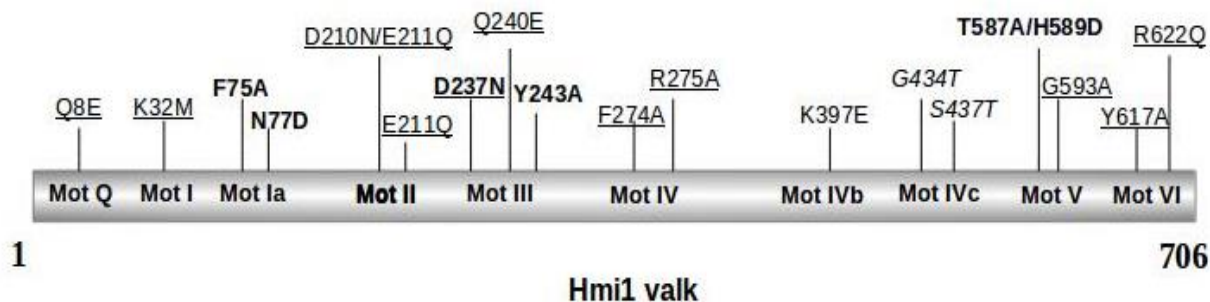
#### 3.1 Hmi1 struktuuri modelleerimine

Tõenäoliselt kõige sarnasema struktuuriga Hmi1 valgule I-tasseri programmi ennustuste põhjal on bakteriaalne *E. coli* helikaas UvrD. Samas tuleb märkida, et kümnest valgu “threading” programmist üks ennustab Hmi1 helikaasi struktuurilt sarnasemaiks AddAB helikaasse nukleasiga. Esimeste programmi poolt ennustatud mudelite põhjal on analoogsed valgud *E. coli* UvrD, Rep, PcrA, RecBCD, mis tähendab, et neil on Hmi1 helikaasiga sarnane ruumiline struktuur. I-tasseri programmi ennustatud Hmi1 ruumiline struktuur koos ssDNA ligandiga on ära toodud joonisel 5.



**Joonis 5.** Hmi1 valgustruktuur ja sellega seostunud ssDNA. Joonisel on kuldsest värvitud Hmi1 ruumilise struktuuri ennustus. Punakas-pruuniks on värvitud seostunud ssDNA ja tumesiniselt on märgitud aminohapped ja nende külghelad, mida antud magistritöö käigus muteeriti (positsioonid Q8, K32, F75, N77, D210, E211, D237, Q240, Y243, R274, F275, K397, G434, S437, T587, H589, G593, Y617, R622). Enamus muteeritud aminohappeid koondub ATP sidumise vao ümber. Pilt tehtud I-tasseri ennustatud kordinaatide põhjal kasutades programmi Chimera 1.12 (Pettersen *et al.*, 2004; [www.cgl.ucsf.edu/chimera](http://www.cgl.ucsf.edu/chimera)).

Homoloogia baasil modelleerimine võimaldas ennustada rea positsioone Hmi1 struktuuris, mis võiksid olla olulised helikaasi ja nukleiinhappe kontaktide moodustamises. Saadud tulemusi kõrvutati Hmi1 homoloogsete SF1 helikaaside konserveerunud aminohapetega ja konstrueeriti seeria mutante, mis on eeldatavasti seotud ATP, ssDNA, dsDNA või domäänide interaktsioonidega Hmi1 valgus. Valitud positsioonidesse viidi sisse asendused, mis on kirjeldatud joonisel 6.



**Joonis 6.** Hmi1 valku (706 aminohapet) disainitud aminohapete vahetused. Joonisel on ära toodud muteeritud aminohapete paiknemine motiivides. Alla on joonitud ATP sidumisega seotud mutandid, tumedamas kirjas ssDNA sidumisega seotud mutandid, kaldkirjas dsDNA sidumisega seotud mutandid ja tavalises kirjas mutant, mis peaks ennustuste järgi mõjutama 1B-2B domäänide interaktsioone.

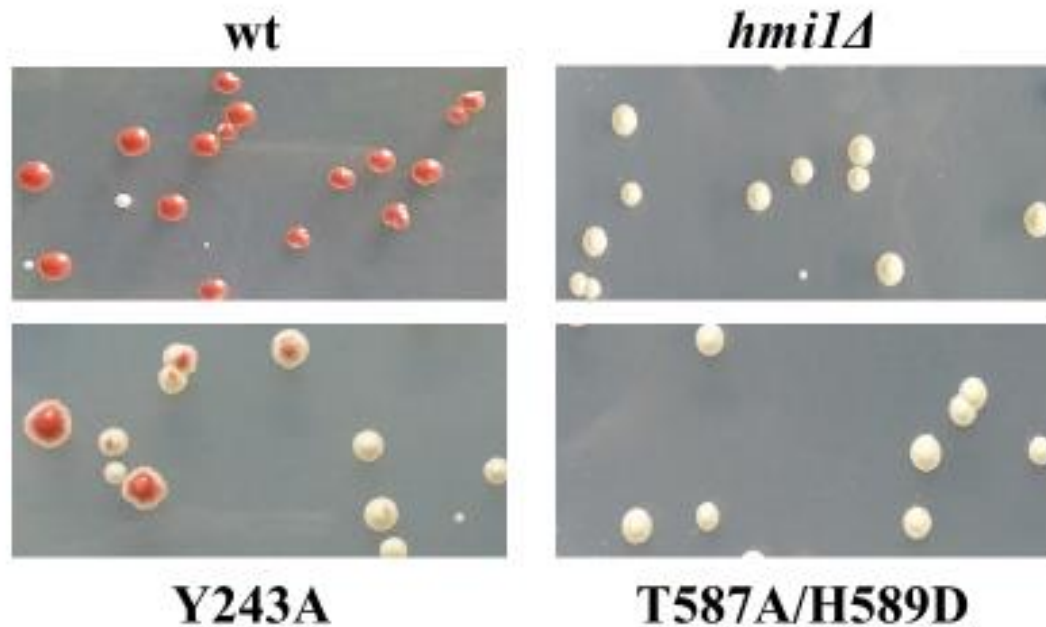
### 3.2 Hmi1 mutantide analüüs 5-fluoro-oroothapet (5-FOA) selektsioonil baseeruv plasmiidivahetuskatses

Selgitamaks välja, kuidas mõjutavad konstrueeritud mutatsioonid *S. cerevisiae* mitokondri funktsionaalsusele, kasutati 5-fluoro-oroothappe tundlikkusel baseeruvat plasmiidivahetuse meetodit. Kuna pärmi genoomi mutatsiooni integreerimine on aega nõudev protsess, siis annab antud katse kiirema ülevaate mutatsioonide põhjustatud efektidest. Katse läbiviimiseks kasutati pRS315 plasmide, millesse oli integreeritud *HMI1* metsiktüüpi geen või *hmi1* geen mutatsiooniga positsioonis Q8E, K32M, F75A, N77D, D210N/E211Q, E211Q, D237N, Q240E, Y243A, F274A, F275A, K397E, G434T, S437T, T587A/H589D, G593A, Y617A, R622A. Plasmiidide täpsem kirjeldus on ära toodud peatükis 2.2.

pRS315-*HMI1* derivaadid transformeeriti tüvesse W303 *hmi1Δ* +pRS316 *HMI1*, kus *HMI1* ORF on inaktiveeritud TRP1 geeni sisseviimisega ning tüvi sisaldab eraldi metsiktüüpi *HMI1* geeni, mida kodeeritakse plasmidi pRS316 derivaadi poolt, mis omab lisaks veel selektsiooni

võimaldavat *URA3* geeni. Katse käigus transformeeriti kirjeldatud tüvesse juurde veel pRS315 plasmiidid, mis kodeerivad uuritava järjestusega mutantseid *hmi1* gene ja *LEU2* geeni selektsiooniks. Peale transformatsiooni, külvati kahte plasmidi sisaldavad tüved välja 5-fluoro-oroothapet sisaldavale söötmele, mis on toksiline *URA3* geeni kodeerivatele rakkudele, kus 5-fluoro-oroothapet muudetakse toksiliseks 5-fluorouratsiiliks, seega jäävad antud söötmel ellu ainult need rakud, mis on kaotanud metsiktüüpi valguga plasmidi ja sisaldavad tänu leutsiini selektsioonile pRS315 derivaati mutantse *hmi1* geeniga. Antud toksilises keskkonnas jääb 1000x vähem rakke ellu, kui tavalisel väljakülvil. Katse täpsema protokolliga on võimalik tutvuda peatükis 2.13.

5-fluoro-oroothappega SC-Leu -Trp tassidel on võimalik kokku lugeda tekkinud kolooniad ja jälgida mutatsiooni tekitatud fenotüüpi, nagu illustreeritud joonisel 7. Negatiivseks kontrolliks transformeeriti pärmitüvesse ka pRS315 plasmiid ilma *HMI1* inserdita. Sellist plasmidi sisaldavad rakud annavad Hmi1 valgu deletsiooni fenotüübi, mille puhul rakud glükoosi sisaldaval söötmel ei hinga. Mitterespireerivad pärmi W303 tüve rakud moodustavad valgeid kolooniaid. Positiivse kontrollina transformeeriti pärmi pRS315 plasmiid, mis sisaldas metsiktüüpi *HMI1* geeni. Vastavad rakud ei oma respiratsiooni defekti ja annavad glükoosiga söötmel punase fenotüübi, kuna W303 tüve derivaadid sisaldavad mutatsiooni *ADE2* geenis, mille puhul akumulereerub respiratoorsetes rakkudes punane pigment. Lisaks punastele ja valgetele kolooniatele, tekivad ka sektoritega kolooniad, kus toimub üleminek respiratoorselt hingamiselt glükolüüsile.

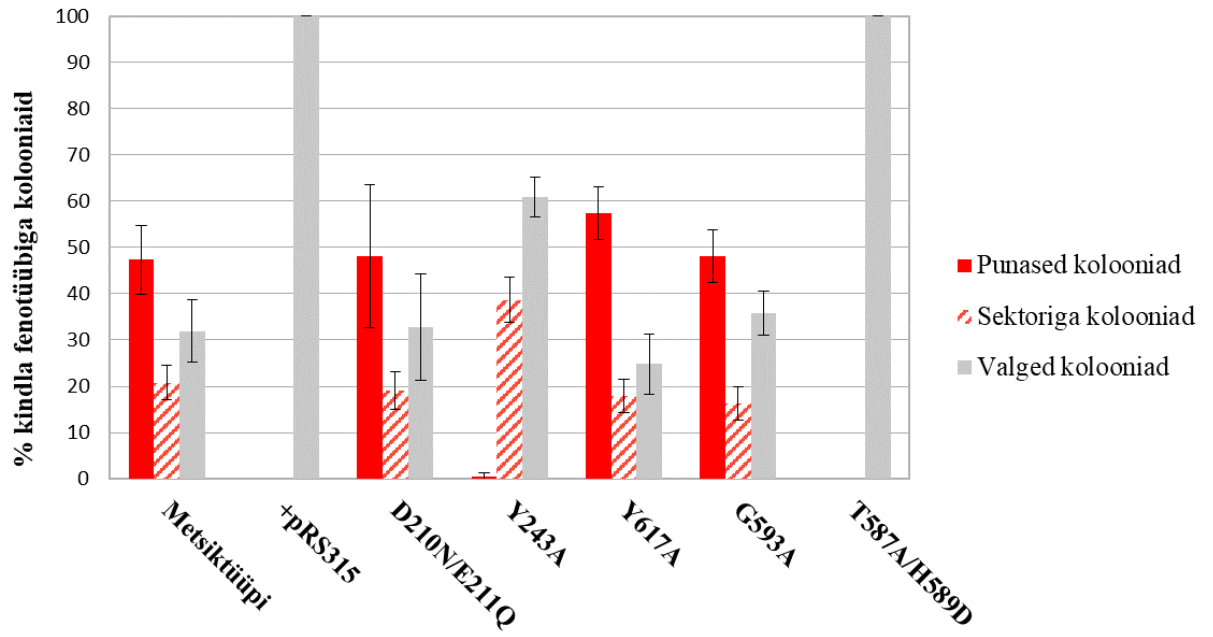


**Joonis 7.** 5-fluoro-oroothapet SC- glükoosiga tassidel üles kasvanud kolooniate fenotüübid. Metsiktüüpi (wt) *HMI1* geeni kodeerivad rakud, fenotüübilt põhiliselt punased. Negatiivne kontroll (*hmi1Δ*), rakud on fenotüübilt valged, kuna neil puudub respiratoorne aktiivsus. Tugeva fenotüübiga pRS315-*hmi1*-Y243A (joonisel Y243A) ja pRS315-*hmi1*-T587A/H589D (joonisel T587A/H589D) moodustavad vastavalt valgeid sektoreid sisaldavaid ja valgeid kolooniaid.

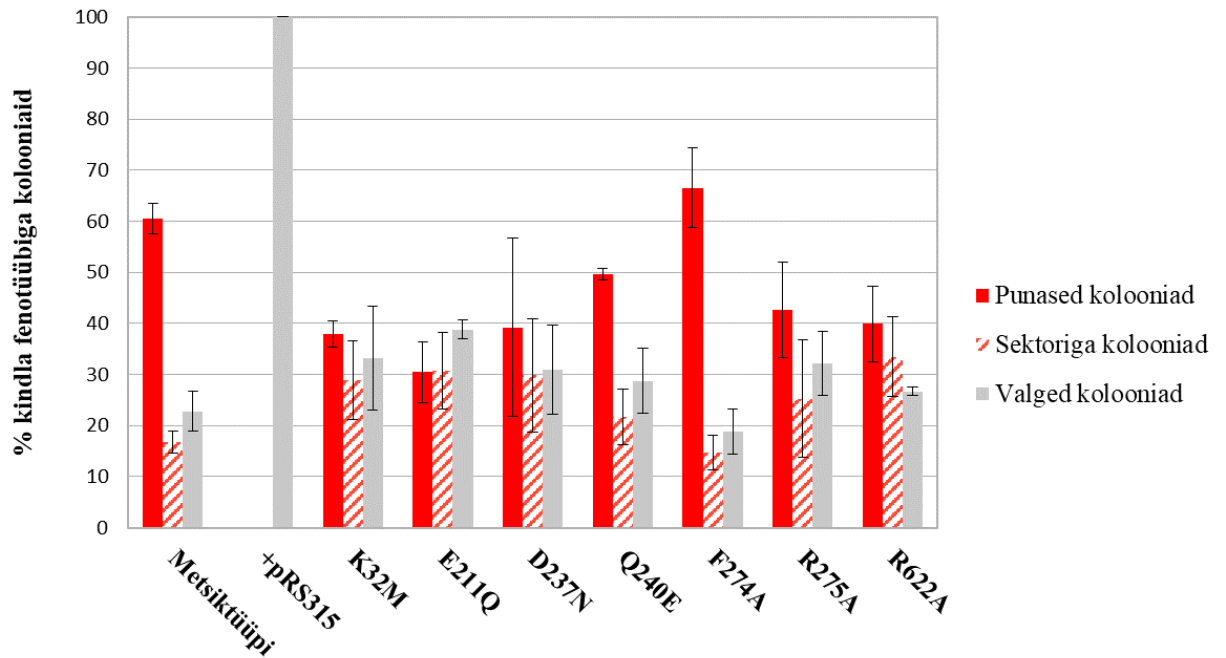
*HMI1* punktmutantide analüüsi tulemused plasmiidivahetuse katses on ära toodud joonisel 8. Tulemuste põhjal võib jagada disainitud mutatsioonid kolme klassi:

1. Mutatsioone sisaldavad tüved, mille kasvuparameetrid on võrreldavad metsiktüüpi tüvega. Nende mutatsioonide mõju on marginaalne (p-väärtused suurem kui 0,05 v.a. E211Q). Siia hulka kuuluvad enamused asendusi: Q8E, K32M, F75A, N77D, D210N/E211Q, E211Q, D237N, Q240E, F274A, R275A, K397E, G434T, S437T, G593A, Y617A, R622A.
2. Mutatsiooni sisaldav tüvi Y243A asendusega, mille fenotüübiks on tugevalt fragmenteerunud sektoritega kolooniad. Punaseid respiratiivseid kolooniaid esineb üksikuid ja seega on rakud enamasti respiratoorse võimekuseta või on seda kaotamas. (p-väärtus väiksem kui 0,05 kõigi kolme fenotüübi puhul).
3. Tüvi asendusega T587A/H589D, mis omab *hmi1Δ* fenotüüpi, kus ei esine ühtegi respiratiivse aktiivsusega rakku ja valge fenotüübiga kolooniaid on 100%.

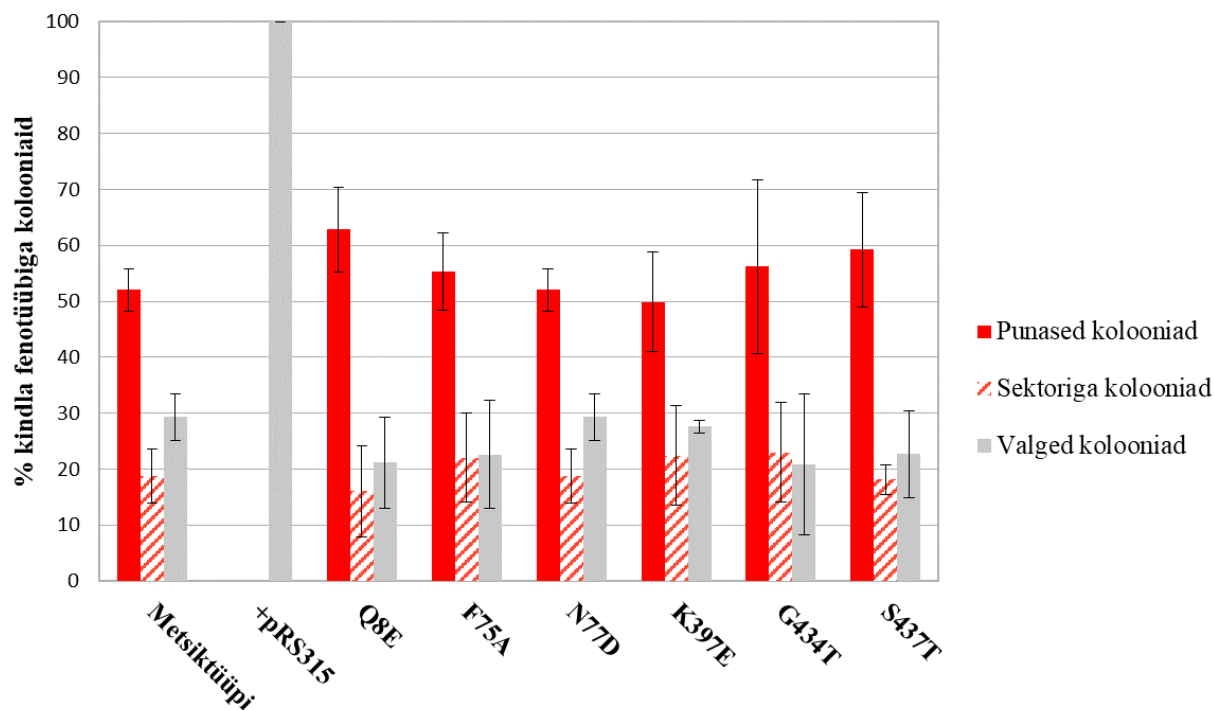
A.



B.



C.



**Joonis 8. A. B. C.** Joonisel on ära toodud kolm erinevat tulpdiagrammi, kõigi mutantide kohta. Y-teljel ära toodud kõigi kolme fenotüübiga rakkude proportsionaalne suhe võrrelduna kõigi kolooniate summaga. Igal graafikul on näidatud vastava katse negatiivne (pRS315) ja positiivne võrdlustulemus (metsiktüüpi). Punasena on tähistatud punased ehk respiratoorsed kolooniad, punaste kriipsudega sektoritega ehk respiratsiooni aktiivsust kaotava kolooniad ja halliga valged ehk respiratoorse võimekuse kaotanud rakud). Kõigi mutantide nimed on lühendatud ja nimetatud ainult toimunud aminohappe vahetuse järgi. A, B, C tähistavad kolme erinevat katset. Veapiirid on peale märgitud standardhälbena.

### 3.3 Tetraadanalüüs tugeva fenotüübiga mutantidele Y243A ja T587A/H589D

Kontrollimaks mutatsioonide mõju mitokondriaalse DNA säilimisele, kromosoomi integreerituna, otsustasin viia vastavad mutatsioonid *HMII* geeni lookusesse homoloogilise rekombinatsiooni abiga. *S. cerevisiae* W303a/ $\alpha$  metsiktüüpi tüvesse viidi LiOAc meetodil sisse lineariseeritud konstruktsioon, mis sisaldas mutatsiooniga *HMII* geeni ning sellest ülesvoolu kloneeritud KanMx4 fragmenti, millega selekteeriti mutatsioonide insertiooni antibiootikumi

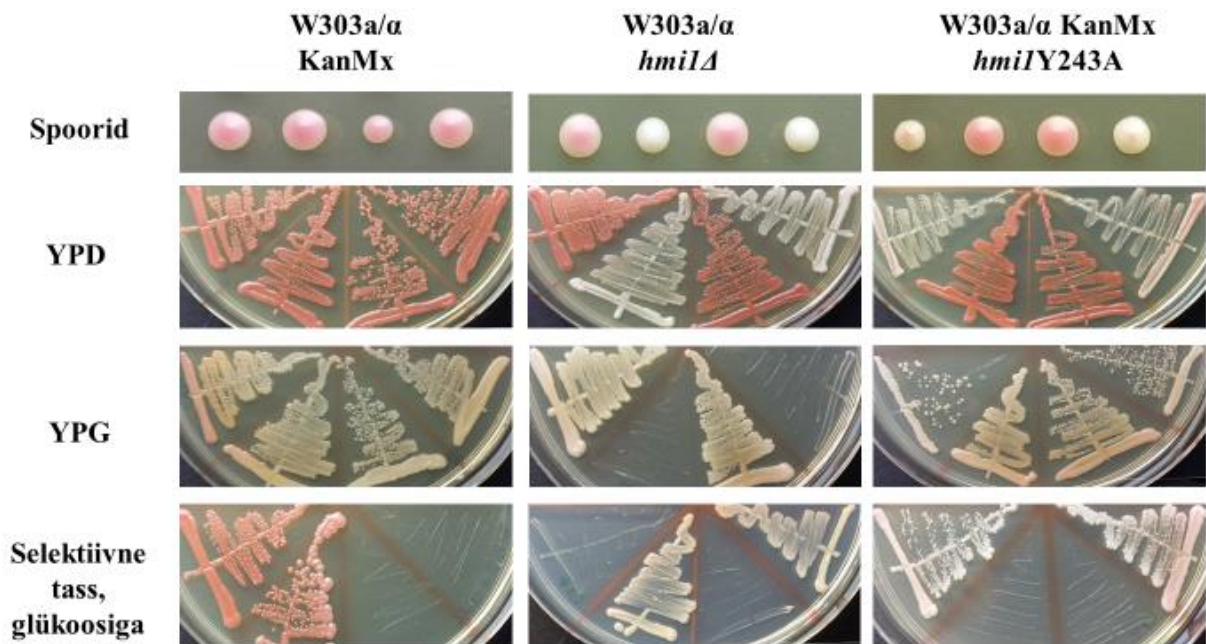
G418 resistentsuse abil. KanMx4 järjestus sisestati *RFC4* geeni ja *HMI1* geeni vahele (täpsem kirjeldus peatükis 2.10).

Antud katseseeriasse valiti tugeva fenotüübiga Y243A ja T587A/H589D ja lisaks kontrolliks mutant E211Q, mida on ka varasemalt uuritud meie uurimisgrupi poolt ja Q240E mis asub sarnaselt Y243A-le III helikaasi motiivis, kuid mis teistel sarnastel helikaasidel osaleb ATP sidumises. Positiivsete kontrollidena kasutati nii tavalist metsiktüüpi W303a/ $\alpha$  tüve kui ka W303a/ $\alpha$  KanMx tüve, kuhu sisestati ainult KanMx4 fragment *HMI1* geenist ülesvoolu. Edasises analüüsis rakendati negatiivse kontrollina W303a/ $\alpha$  *hmi1 $\Delta$*  heterosügooti, kus diploidi ühes alleelis on *HMI1* geen deleteeritud.

Transformatsiooni tulemusel saadud mutatsiooniga diploidsed pärmitüved selekteeriti G-418 sisaldusega söötmel ja sporuleeriti toiteainetevaesemal söötmel, kus kehvades elutingimustes hakkab pärm spoore moodustama, mis omavad haploidset genoomi. Peale 3-4 päeva sporulatsiooni eraldati tetraadid mikroskoobi all mikromanipulatsiooni abil. YPG ja YPD tassidel üles kasvanud haploidsetest kolooniatest kontrolliti ainult neid, kus ühest diploidset rakust oli moodustunud 4 elujõulist spoori. Antud magistr töö raames läbiviidud spooride laialiajamised ei õnnestunud kõige paremini, kuna paljudel juhtudel neljaseid tetraade üles ei kasvanud. Mutatsiooni T587A/H589D ei õnnestunud antud katsete käigus kromosoomi integreerida. Tetraadanalüüsi viidi antud mutandi puhul läbi neljast erinevast transformatsioonist ja igakord analüüsiti 2-4 erinevat sporulatsiooni produkti, kuid mutantset tüve ei õnnestunud saada.

Kõigist ülejäänud tüvedest W303a/ $\alpha$  KanMx, W303a/ $\alpha$  KanMx *hmi1E211Q*, W303a/ $\alpha$  KanMx *hmi1Y243A*, W303a/ $\alpha$  KanMx *hmi1Q240E* saadi spooride eraldamise tulemusel kaks mutantset ja kaks metsiktüüpi haploidset spoori. W303a/ $\alpha$  KanMx *hmi1E211Q* ja W303a/ $\alpha$  KanMx *hmi1Q240E* haploididel ei esinenud erinevusi kasvus mutantidel ja metsiktüüpi spooridel. Vananevatel kolooniatel võis antud tassidel märgata samuti osaliselt valgete mitterespiratiivsete rakkude kolooniate tekkeid. W303a/ $\alpha$  KanMx *hmi1Y243A* omab aga tugevat fenotüüpi ja edasi külvatud tassidel tekib valgete ja punaste kolooniate segu. Joonisel 9 on ära toodud W303a/ $\alpha$  KanMx *hmi1Y243A* fenotüübi võrdlus positiivse kontrolltüvega W303a/ $\alpha$  KanMx ja negatiivse kontroll tüvega W303a/ $\alpha$  *hmi1 $\Delta$* . Seega reprodutseerub plasmidi vahetuse katses saadud fenotüüp tüve W303a/ $\alpha$  *hmi1 $\Delta$*  korral tetraadanalüüsis.





**Joonis 9.** Tüvede W303a/ $\alpha$  KanMx, W303a/ $\alpha$  *hmi1* $\Delta$  ja W303a/ $\alpha$  KanMx *hmi1Y243A* fenotüüpide võrdlus, kus ära on toodud üks neljane tetraad ja sellest edasi striigitud haploidsete tüvede fenotüübi efektid YPD, YPG ja glükoosisisaldusega selektiivsel tassil (W303a/ $\alpha$  KanMx ja W303a/ $\alpha$  KanMx *hmi1Y243A* puhul YPD+G418 tardsöötmetassil ja W303a/ $\alpha$  *hmi1* $\Delta$  puhul SC- Trp tardsöötmetassil).

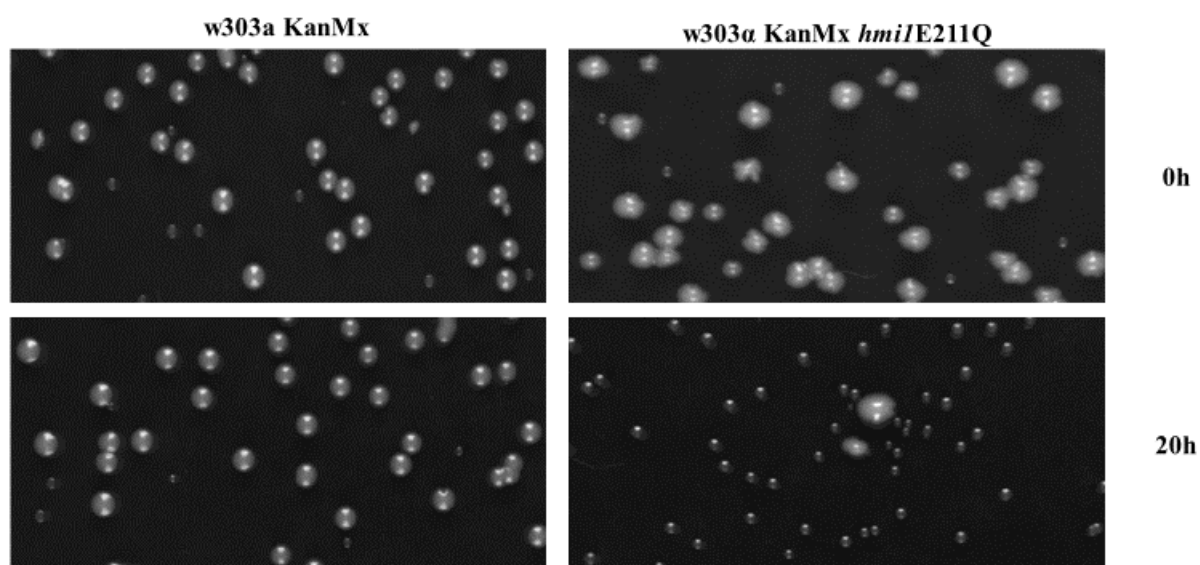
### 3.4 Hmi1 valgu mutatsioonid E211Q, Q240E ja Y243A mõjutavad *petite*'de tekkimist

Kolmandaks *in vivo* testsüsteemiks, valmistatud mutantide iseloomustamiseks, kasutati respiratoorsetelt inaktiivsete rakkude tekkesageduse analüüsi. Katses analüüsiti W303a KanMx, W303a KanMx *hmi1E211Q*, W303a KanMx *hmi1Y243A*, W303a KanMx *hmi1Q240E* tüvesid ja respiratsioonivõimeliste rakkude osakaalu analüüsiti madala glükoosisisaldusega YPDG söötmel. Positiivse kontrolltüvena kasutati analüüsis W303a. Sellise kontrolli kasutamine võimaldas vastata küsimusele kas KanMx fragmendi sisestamine *HMI1* geenist ülesvoolu omab täiendavat efekti. Kuivõrd katseskeem eeldas eelkultuuri kasvatamist glütserooli süsiniku allikana sisaldavas YPG söötmes, ei olnud võimalik kasutada negatiivse kontrollina tüve, kus *HMI1* geen oleks deleteeritud, kuna vastav mutant ei ole võimeline YPG eelkultuuris kasvama.

Eelkultuurina kasvatati rakke YPG söötmel, kus rakud saavad kasvada ainult juhul, kui neil on säilinud respiratoorne võimekus. Seejärel lahjendati kultuur YPD söötmesse, kus rakud võivad kasvada ka respiratoorset aktiivsust omamata. Kuna YPD söötmes ei ole mitokondriaalse DNA

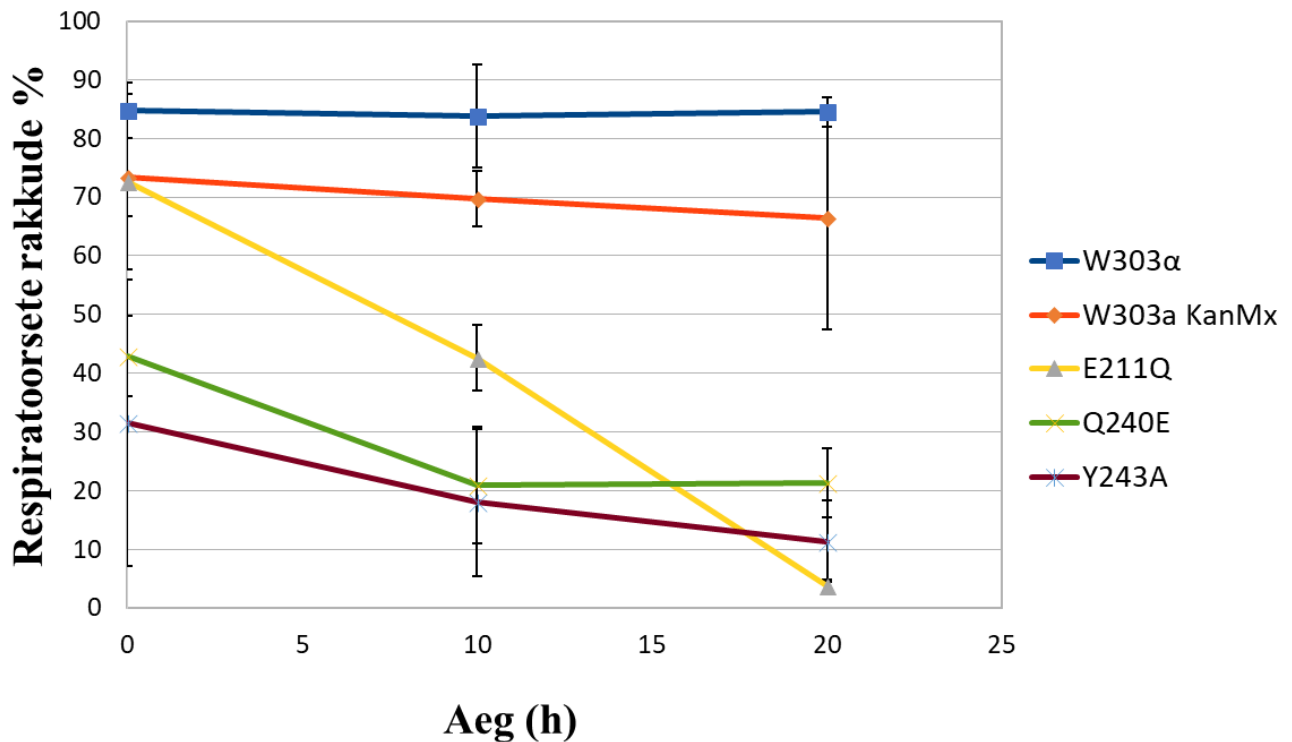


omamine eluks hädavajalik võivad rakud kaotada mitokondriaalse DNA, kui see ei ole stabiilne. Kultuuridest tehti väljakülvid katse alguses ehk enne YPD-sse lahjendamist ning seejärel peale 10 ja 20 tundi kasvu YPDG tassidele. Madala glükoosisisaldusega YPDG tassidele külvatud kolooniad erineva suuruselt vastavalt respiratsiooni võimekusele. Stabiilse ja täieliku mtDNA olemasolul suudavad rakud glütserooli kasutada süsiniku allikana ja kasvada normaalse suurusega kolooniaks. Rakud, millel mtDNA puudub või on see olemas ainult osaliselt, suudavad alguses kasvada kasutades glükoosi fermentatsiooniks, kuid glükoosi madala protsendi tõttu ammenduvad selle varud ning suutmata glütserooli kasutada elutegevuseks jäävad kasvult väikeseks (näide joonisel 10.).



**Joonis 10.** Tüvede W303a KanMx ja W303a KanMx *hmi1E211Q* väljakülvid YPDG tassil katse alguses (0h) ja 20 tundi peale glükoosiga söötmes kasvamist.

Väljakülvatud kolooniaid on võimalik lugeda 3 päeva peale 30°C juures kasvamist. Joonisel 11 on kujutatud graafik, kus on ära toodud kolme paralleelkatse keskmine respiratoorsete rakkude protsent.



**Joonis 11.** Madala glükoosisisaldusega tardsöötmetassidel kasvanud respiratoorsete rakkude protsent kõigist rakkudest, väljakülvid erinevatest ajapunktidest. Joonisel on sinisega tähistatud W303α, oranžiga W303a KanMx, kollasega W303α KanMx *hmi1E211Q* (lühendatud E211Q), roheliselt W303a KanMx *hmi1Q240E* (lühendatud Q240E) ja punakalt W303a KanMx *hmi1Y243A* (lühendatud Y243A). Joonisel on ära toodud kõigi ajapunktide standardhälbed. P-väärtused on kõigil juhtudel alla 0,05 (v.a. E211Q 0h)

W303a KanMx respiratsiooni aktiivsusega rakkude võrdlusel W303α rakkudega, tuleb tõdeda, et tüvesse sisestatud antibiootikumi G-418 resistentsust kodeeriv KanMx geen omab nõrka mõju respiratoorsele aktiivsusele. Seega tuleb arvestada alati, et *HMI1* lookuses KanMX kasseti sisaldavad konstruktid omavad *HMI1* mutatsioonidest sõltumatut lisa defekti, mis võib olla seotud näiteks geeniekspressiooni muutustega. Metsiktüüpi *S. cerevisiae* haploidiga võrreldes on resistentsust omaval tüvel W303a KanMx 10% vähem respiratoorseid rakke ning 20 tunni jooksul mitteselektiivsetes tingimustes kaotab W303a KanMx tüvi veel lisaks 5-10% respiratoorsetest rakkudest.

Tähelepanu väärivalt käitusid antud katses analüüsitud *Hmi1* mutante sisaldavad tüved erinevalt. Vahetult selektiivselt söötmelt (YPG) külvatuna, oli respiratoorselt kompetentsete rakkude arv W303α KanMx *hmi1E211Q* mutatsiooniga tüve korral sarnane W303a KanMx tüvega. Glükoosil kasvades langeb respiratiivse aktiivsusega W303α KanMx *hmi1E211Q* rakkude arv 20 tunniga 72% pealt 4% peale. Erinevalt W303α KanMx *hmi1E211Q* tüvest, oli tugev defekt W303a KanMx *hmi1Y243A* ja W303a KanMx *hmi1Q240E* tüvedel detekteeritav

juba esimeses ajapunktis. Respiratoorseid rakke oli mõlemal tüvel juba katse alguses vastavalt 31,5% ja 43% ning nende osakaal langes 20 tunni jooksul veelgi vastavalt 11% ja 21%-ni. Mõlemad tüved omasid kasvukiiruse defekte ka eelkultuuris kasvades ning YPD söötmes kasvatades olid mõlema tüve poolestusajad pikemad võrreldes W303a KanMx tüvega.

### **3.5 Hmi1 valgu ekspressiooni optimeerimine ja valgu puhastamine**

Varasemalt on meie uurimisgrupi poolt avaldatud Hmi1 valgu puhastuseprotokoll, millega on õnnestunud välja puhastada väikses koguses metsiktüüpi valk ja E211Q positsioonis mutatsiooni omav valk. Samuti on näidatud, et muteeritud järjestusega valgud K32M ja R275A ei puhastu antud protokoll järgi (Kuusk *et al.*, 2005). Seetõttu otsustasin optimeerida Hmi1 valgu ekspressiooni protokoll ning kasutada seda hiljem metsiktüüpi valgu ja mutantsete valkude puhastamisel.

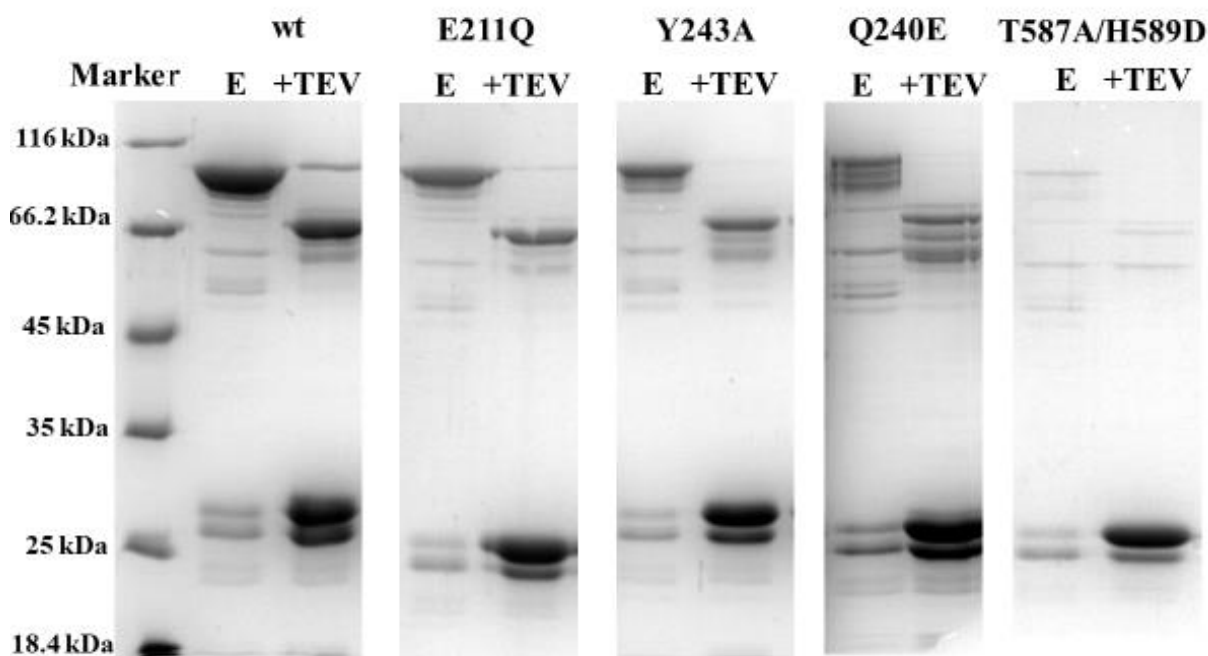
Valgu ekspressiooni optimeerimiseks konstrueeriti pGex4T-TEV-Hmi1 ja pGex4T-TEV-hmi1-Y617A plasmiidid, et kontrollida ekspressiooni laboris kasutusel olevas TEV proteaasi kasutatavas ekspressiooni süsteemis. Selleks viidi *HMI1* geen sisse modifitseeritud pGex4-T-1 valguvektorisse, mis sisaldas TEV proteaasi lõikamissaiti klassikalise trombiini lõikesaidi asemel. *HMI1* geen, millelt oli eemaldatud 14 aminohappeline C-terminaalne signaal, sisestati BamHI ja SalI restriksioonisaitide vahele.

Varasemad optimeerimise katsed meie uurimisrühmas on näidanud, et Hmi1 valk ekspresseerub paremini *E. coli* Rosetta bakteritüves. Seetõttu transformeeriti ekspressioonivektorid vastavasse tüvesse. Kuna valgu pakkumine on efektiivsem madalatel temperatuuridel ja algse protokoll järgi ekspresseeriti Hmi1 valku 23°C juures, kontrolliti ekspressiooni efektiivsust veel lisaks 20°C, 18°C ja 16°C juures ning eraldi katses uuriti induktsiooni pikkuse mõju, indutseerides kultuuri kas 8h, 14h või 16h. Ekspressiooni kontrolliti totaalsest valgu preparaadist, kandes SDS polüakrüülamiid geelile võrdse koguses lüüsitud rakke ja seda tehti vastavalt optilisele tihedusele. Väikesest mahust valgu ekspressiooni kontrolli protokoll on täpsemalt kirjeldatud punktis 2.15.2. Saadud tulemuste põhjal valisin valgu ekspressiooni temperatuuriks 20°C ja induktsiooni ajaks 12-14 tundi.

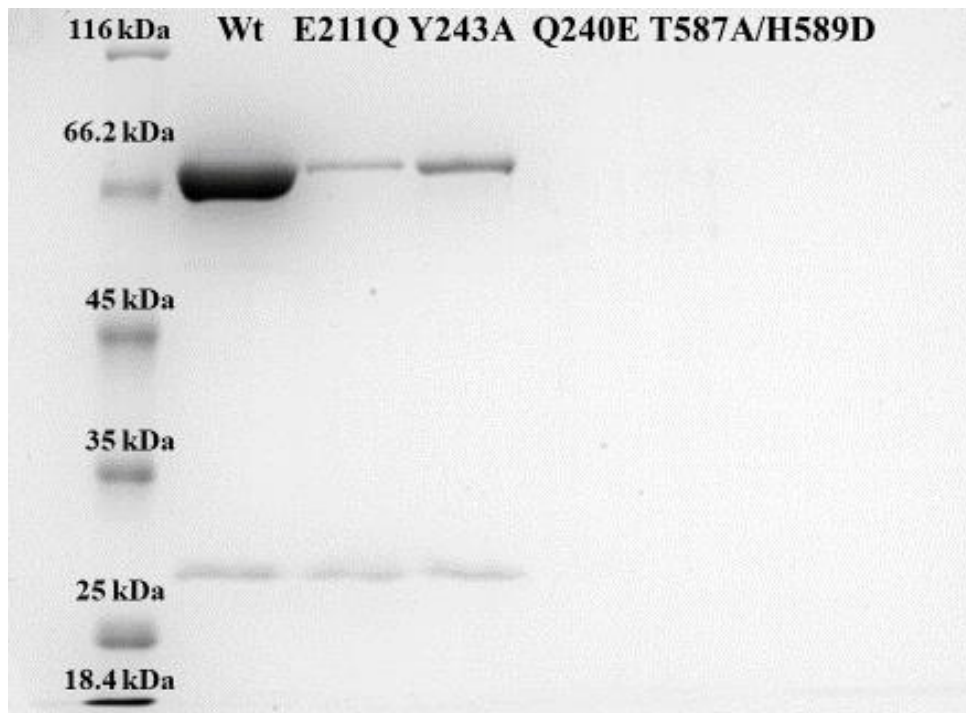
Preparatiivseks Hmi1 puhastamiseks indutseeriti optimaalsetes tingimustes 2l mahuga kultuurid. Lisaks metsikut tüüpi Hmi1 helikaasile, valisin puhastamiseks järgmised mutandid: Hmi1E211Q, Hmi1Q240E, Hmi1Y243A ja Hmi1T587A/H589D. Vastavad mutatsioonid viidi eelnevalt pGex4T-1- Hmi1 vektorisse ja kontrolliti sekveneerimisega.

Kõik valgud ekspresseerisid *E. coli* rakkudes ja GST liitvalke, mis sisaldasid mutantseid Hmi1 valke oli võimalik afiinsuskromatograafiliselt isoleerida ning TEV proteaasiga töödeldes oli

GST liitvalgu osa eemaldatav (joonis 12). Metsiktüüpi Hmi1 valgu ekspressioonitase oli kõige kõrgem ja Hmi1T587A/H589D mutantse valgu tase kõige madalam. Vaatamata sellele, et Hmi1T587A/H589D valgu ekspressioonitase, hinnatuna totaalse valgu hulgast, oli võrreldav teiste Hmi1 mutantidega, oli seda mutanti lahustavas lüsaadis vähe. Peale glutatioon-agarosile (Glutathion Sepharose 4 Fast Flow) sidumist, muutus valgu kontsentratsioon peaaegu mittedetekeeritavaks, nagu näidatud joonisel 12. Teised mutantsed valgud puhastusid võrdlemisi rahuldavalt ka glutatioon-agarosil ja olid spetsiifiliselt TEV proteaasiga hüdrolüüsitavad. Samas ei puhastunud need mutantsed valgud efektiivselt järgneval ionvahetuskromatograafia kolonnil ning võrreldes metsiktüüpi Hmi1 valguga saadi lõpuks väheses koguses kahte mutantset valku Hmi1E211Q ja Hmi1Y243A. Saadud valgupuhastuse produktid on ära toodud joonisel 13.



**Joonis 12.** Hmi1 valgu ja tema punktmutantide eluatsioon glutatioon-agarosil ja hüdrolüüs TEV proteaasiga. Joonisel on toodud metsiktüüpi Hmi1 valk (wt) ning seejärel mutantsed Hmi1E211Q, Hmi1Y243A, Hmi1Q240A, Hmi1T587A/H589D GST liitvalgud ja TEV proteaasiga töötlemise produktid. Mutandid on nimetatud nende aminohappelise asenduse järgi. Iga valgu kohta on näidatud proov peale puhver B ja glutatiooniga eluatsiooni (joonisel lühendatud E) ja proovid peale TEV proteaasiga lõikust (joonisel +TEV). Esimesel rajal on Unstained protein marker (Thermo Fischer Scientific).



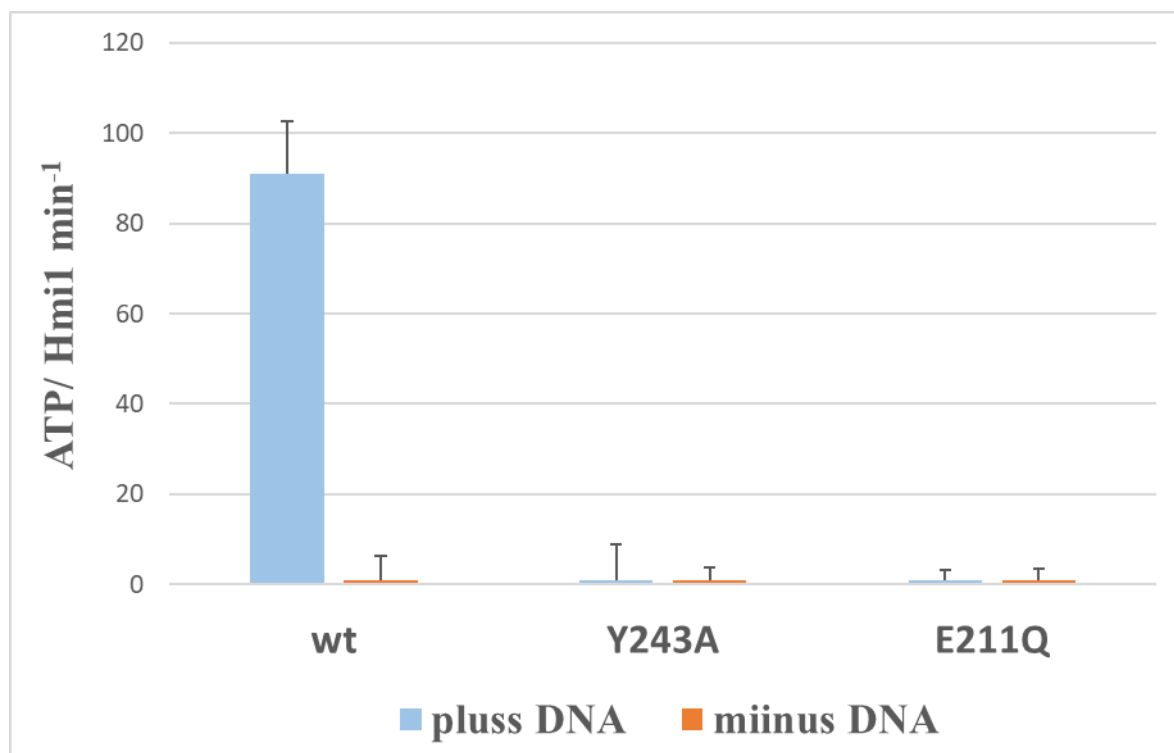
**Joonis 13.** Ioonvahetuskromatograafia kolonnidega puhastatud valgupreparaadid SDS geelil. Esimesel rajal on Unstained protein marker (Thermo Fischer Scientific). Teisel rajal metsiktüüpi Hmi1 valk (wt) umbes 80kDa ning seejärel järjest mutandid Hmi1E211Q, Hmi1Y243A, Hmi1Q240A, Hmi1T578A/H589D. Kõiki valke on viimases puhastusetapis saadud fraktsioonidest geelile kantud 10 $\mu$ l. hmi1Q240A, hmi1T578A/H589D valku ei õnnestunud detekteerida.

### 3.6 Hmi1E211Q ja Hmi1Y243A ei oma ssDNA stimuleeritavat ATP hüdrolüüsi aktiivsust

Valgupuhastuse käigus õnnestus isoleerida ainult metsiktüüpi Hmi1 valku ja mõningal hulgal mutante Hmi1E211Q ning Hmi1Y243A. Selleks, et kontrollida vastavate valkude ATP hüdrolüüsi aktiivsust, kontrollisime nende võimet hüdrolüüsida ssDNA-st sõltuvas reaktsioonis ATP-d. Selleks kasutati NADH-oksüdatsiooni seoselist skeemi, mis võimaldab ATP hüdrolüüsi jälgida reaajas kolorimeetriliselt. NADH oksüdatsioon toimub reaktsioonis ekvimolaarselt vastavalt sellele kui kiiresti on valgu poolt ATP-d reaktsioonis ära kasutatud ehk kui aktiivne on valk. Hüdrolüüsitud ATP muudab reaktsiooni lisatud fosfoenoolpüruvaadi püruvaadiks, mis omakorda nõuab laktaadidehüdrogenaasi olemasolul NADH oksüdatsiooni, et produtseerida laktaati. Kuna varasemalt on näidatud, et Hmi1 valk, seob eelistatult kofaktorina ssDNA-d (Kuusk *et al.*, 2005), kontrolliti aktiivsust ssDNA lisamisega analüüsitava segusse.

Esmalt mõõdeti kõigi kolme valgu aktiivsust kolmes korduses ilma ssDNA kofaktorita ja 200nM ssDNA juuresolekul. ssDNA segati ülejäänud reaktsiooniseguga (kirjeldatud punktis 2.16), proove inkubeeriti 30°C juures ja seejärel lisati reaktsiooni algatamiseks ATP, lõppkontsentratsiooniga 5 mM. Täpsem reaktsiooni segu ja katse käik on selgitatud materjalide ja meetodite osas peatükk 2.16.

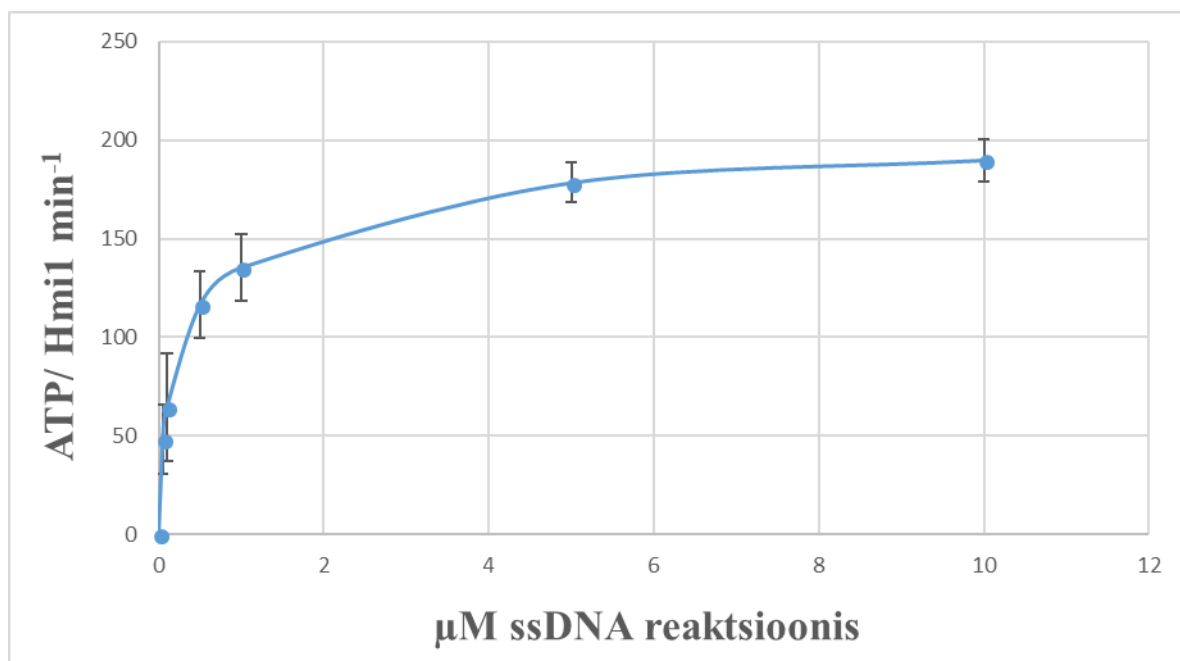
ATP hüdrolüüsi aktiivsuse mõõtmine 200nM ssDNA juuresolekul näitab, et aktiivsust omab ainult metsiktüüpi valk. Vastavad aktiivsused on ära toodud joonisel 14, mis näitab mitu pikomooli ATP-d kasutatakse pmol Hmi1 valgu poolt minuti jooksul. Metsiktüüpi valgu aktiivsus on 91,1 pmol ATP/pmol Hmi1 min<sup>-1</sup>. Mutatsioonidega valgud Hmi1E211Q ja Hmi1Y243A aktiivsust ei oma, samuti on aktiivsusetu kõik reaktsioonid, kus ssDNA-d ei ole lisatud.



**Joonis 14.** Valgupreparaatide aktiivsused 200mM ssDNA juuresolekul (sinine) ja ssDNA reaktsioonist puudumisel (oranž). Veapiirid on arvutatud standardhälvena.

Selleks et kontrollida, kas ssDNA hulk mõjutab valkude ATP hüdrolüüsi aktiivsust, viidi samade valkudega läbi ka ssDNA tiitrimise eksperiment, kus ssDNA kontsentratsioon varieerus 50nM-10000nM vahel. Metsiktüüpi valguga korrati katset kolm korda ja mutantidega kaks korda, kuna mutantsed valgud ei näidanud mitte mingisugust aktiivsust kummalgi korral. Joonisel 15 on näha metsiktüüpi valgu ssDNA tiitrimise katse tulemused, mis näitavad, et ssDNA kontsentratsiooni tõusu korral tõuseb ka valgu aktiivsus kuni platoole jõudmiseni.

Mutantsete valkude tiitrimisi ei ole eraldi välja toodud, kuna antud valgud olid inaktiivsed kõigi ssDNA kontsentratsioonide korral ja võrreldavad ssDNA-d mitte sisaldava negatiivse kontrolliga.



**Joonis 15.** Metsiktüüpi Hmi1 valgu ssDNA tiitrimise katse. Konstantsete reaktsiooni tingimuste juures on varieeritud ssDNA kontsentratsiooni (0,05μM; 0,1μM; 0,5μM; 1μM; 5μM; 10μM). Joonisel on ära toodud kolme katse keskmine ATP hüdrolüüsi aktiivsus pikomoolides. Veapiirid representeerivad graafikul standardhälvet.

## 4 ARUTELU

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli konstrueerida helikaas Hmi1 mutandid konserveerunud helikaasi motiividesse ja analüüsida nende funktsionaalsed tähtsust. Selleks konstrueeriti 18 erinevat mutanti aminohapete vahetusega positsioonides Q8E, K32M, F75A, N77D, D210N/E211Q, E211Q, D237N, Q240E, Y243A, F274A, R275A, K397E, G434T, S437T, T587A/H589D, G593A, Y617A, R622A.

Antud töös toodud tulemused näitavad, et plasmidi vahetusmeetodil loodud mutantsetes Hmi1 tüvedes on kaks mutanti silmnähtavalt respiratoorse defektiga, mis suure tõenäosusega tuleneb sellest, et nende mitokondriaalse DNA stabiilsus on tugevalt häiritud. Mutandid Y243A, kus asendatud on III motiivi konserveerunud türosiin ja T587A/H589D, kus asendatud on V motiivi konserveerunud treoniin ja histidiin, on eeldatavalt seotud asendustega, mis puudutavad ssDNA sidumist. Varasemalt on Hmi1 homologide peal näidatud III motiivis konserveerunud türosiini ja V motiivis konserveerunud treoniini ja histidiini struktuurilist paiknemist ssDNA kanalis ja nende otsest interakteerumist ssDNA-ga (Korolev *et al.*, 1997; Lee ja Yang, 2006). Ka antud töös esitatud struktuuri ennustuse põhjal on võimalik väita, et suure tõenäosusega paiknevad need aminohapped vähemalt ruumiliselt ssDNA lähedal ja osalevad tõenäoliselt ssDNA sidumises, positsioneerudes iseloomulikku kanalisse, mida ssDNA ahelate lahti harutamisel läbib. Sellegipoolest ei ole võimalik teha lõplikke järeldusi enne, kui on olemas Hmi1 kristallstruktuur, kuna antud töös kasutatud modelleerimine põhineb siiski paljuski homologile vastava struktuuri loomises.

Järgnevalt kinnitasin osaliselt saadud tulemusi ka kromosoomi integreeritud punktmutatsioonidega. Y243A mutatsioon näitab ka *S. cerevisiae* Hmi1 lookusesse integreeritult võrdlemisi sarnast respiratoorse aktiivsuse osalist või täielikku puudumist kolooniatena kasvavatel rakkudel. Glükoosi sisaldusega söötmel langeb nende respiratoorne aktiivsus kiiresti ning enamik moodustuvaid kolooniaid koosnevad *petite* rakkudest, kus ei ole mtDNA täielikult säilinud. See tähendab, et antud mutatsiooni mõju Hmi1 valgu funktsioonile või struktuurile peab olema piisavalt tugev, et häirida mtDNA säilimist sarnaselt Hmi1 valgu puudumisele mitokondris. Ehkki homologiliste helikaaside varasemates analüüsides ei ole kolmandas motiivis asuvat türosiini muteeritud, spekulatsioonide põhjal, et tänu sellele, et ta asub ssDNast vesiniksideme tekkimise kaugusel, interakteerub see aminohape nt. Rep helikaasil otseselt kanalis asuva üksikahelalise DNA koosseisu kuuluva nukleotiidiga (Korolev *et al.*, 1997). UvrD puhul on näidatud, et ssDNA kanalis paiknev türosiin interakteerub Id motiivi fenüülalaniiniga, mis vastutab selle eest, et ssDNA ei pääseks



kanalist välja. ATP sidumisega kaasnevad konformatsioonilised muutused, lõhuvad selle sideme ja ssDNA saab mööda kanalit ühe nukleotiidi võrra edasi libiseda (Lee ja Yang, 2006). Seetõttu on võimalik spekuloida, et Hmi1 valgu funktsioneerimiseks on oluline korrektne ssDNA peal translokeerumine ning ssDNA kontrollimatu libisemine läbi valgu struktuuri segab selle funktsiooni läbi viimist.

See selgitaks ka dopelmutandi, asendustega T587A/H589D, veelgi drastilisemat mõju Hmi1 valgu funktsioonile, kuna V motiivi lähestikku asetsevad histidiin ja treoniin paiknevad Hmi1 struktuuris homoloogiliste valkude kristallstruktuuri põhjal mõlemad ssDNA sidumise kanalis ja on piisavalt lähedal, et interakteeruda otse ssDNA ahelaga. Nii UvrD kui PcrA helikaasi puhul on näidatud antud motiivi histidiini interaktsiooni kanali alguses asuvate nukleotiididega, mis tõenäoliselt tähendab, et nad on olulised regulatsioonis, mis ei lase valgul ssDNA ahelal tagasi libiseda.

Kahjuks ei õnnestunud antud töö käigus positsioonides T587A/H589D muteeritud *HMI1* geeni pärmi kromosoomi haploidseesse tüvesse integreerida. Eeldatavasti olid probleemid tehnilise iseloomuga, ehkki täpset vastust sellele miks muteerimine ei õnnestunud, me ei tea. Esiteks võib spekuloida, et mutatsioon ei inserteeru piisava efektiivsusega transformatsiooni käigus, kuna fragment omab täispikkuses *hmi1* geeni kus mutatsiooni asukoht on antibiootikumi resistentsust tagavast osast niivõrd kaugel, et transformatsiooni käigus inserteerub ainult osa *HMI1* geeni järjestusest. Teiseks, ehkki töö käigus on loodud diploidne tüvi, mille puhul on kinnitatud, et üks alleel sisaldas mutatsiooni, ei õnnestunud vastava diploidse tüve sporulatsioon. Arvatavasti oli jällegi tegemist tehnilise probleemiga sporulatsioonil, ehkki antud hetkel pole võimalik välistada, et tüvel ilmnis mutatsioonist tingitud sporulatsiooni fenotüüp.

Ülejäänud kaks põhjalikumalt käsitletud haploidset tüve mutatsioonidega positsioonides E211Q ja Q240E, on *S. cerevisiae* kromosoomi integreerununa respiratoorselt aktiivsed ja mtDNA stabiilsus hakkab kaduma alles kolooniate vananedes. Siiski viitavad antud töös tehtud katsed, et mtDNA stabiilsus väljendub nende tüvede puhul fermenteeritaval süsiniku allikal kasvades.

Eksponentsiaalselt kasvades glükoosi sisaldavas vedelkultuuris langeb kirjeldatud tüvedes respiratoorsete rakkude arv suhteliselt kiirelt. Tüve W303a KanMx *hmi1Q240E* puhul on juba katse alguses väljakülvatud rakkudest vähem kui pooled ehk 43% respiratoorselt aktiivsed. See tõenäoliselt viitab mutatsiooni tugevale mõjule, kus esimesel võimalusel rakud pigem loobuvad mitokondriaalse DNA alalhoidmisest. Võimalik, et osaliselt on see tingitud ka pikast

eelkultuuris kasvatamisest, kuna YPG-s eelkultuuride saamiseks tuleb kasvama panna suurem kogus rakke ja eelkultuuride jõudmine vajamineva optilise tiheduseni võtab märkimisväärse aja. Tõenäolisemalt rikub antud aminohappe vahetus polaarsest laenguta aminohappest negatiivselt laetud glutamiinhappeks interaktsiooni negatiivselt laetud  $\gamma$ - fosfaadiga. *In vitro* katsed PcrA helikaasiga on tõestanud antud aminohappe mõju helikaasi aktiivsuse kaotamisel, kui asendus on sisse viidud negatiivse või neutraalse külghelaga aminohappe vastu (Dillingham *et al.*, 1999).

Silmapaistev on ka W303 $\alpha$  KanMx *hmi1E211Q* tüve kasv. Algselt glütseroolis kasvades on mtDNA stabiilsus võrreldav W303a KanMx tüvega, kuid aja jooksul fermentatiivsel söötmel väheneb mtDNA stabiilsus väga kiiresti. Antud katsetest järeldub, et ehkki mutantsed tüved on vajadusel suutelised ka respiratsiooni nõudvates tingimustes ellu jääma, tekitavad mutatsioonid erinevates helikaasi motiivides valgu funktsioonis või struktuuris muudatuse, mille tõttu võimalusel loobuvad tüved täieliku mtDNA alalhoidmisest. UvrD valgu *in vivo* analüüsi tulemused on näidanud, et mutatsioon positsioonis E211 ei suuda säilitada helikaasset aktiivsust ja seetõttu on häiritud ka UvrD võime parandada suuremaid vigastusi DNA ahelates (Brosh ja Matson, 1995). mtDNA terviklikkuse säilitamiseks on samuti oluline, et mtDNA tekkivad kahjustused ja spetsiifilised struktuurid saaksid parandatud, vastasel juhul muutub mtDNA ebastabiilseks. Meie laboris on seda efekti varasemalt näidatud mitokondriaalse helikaasi Irc3 puhul, mis tegeleb spetsiifiliste DNA hargnenud ahelatega struktuuride lahendamise. Irc3 puudumisel hakkavad antud struktuurid kuhjuma ja rakud kaotavad mtDNA (Gaidutšik *et al.*, 2016). Võimalik, et ka Hmi1 omab sellist ATP aktiivsust vajavat funktsiooni, mille puhul asendus E211Q viib antud funktsiooni häirimiseni.

Seda, kas antud muutused mtDNA stabiilsuses on pigem seotud sellega, et Hmi1 valk ei saa enda funktsiooni täita kuna muteeritud aminohapped on otseselt seotud Hmi1 funktsiooniga või sellest, et sisse viidud mutatsioonid põhjustavad ebastabiilsusi valgu struktuuris ja selle pakkumises, mistõttu valk ei oma üldiselt funktsionaalset struktuuri on raske ennustada.

Valgu struktuuri ja aktiivsuse täpsemaks uurimiseks puhastati antud katsete käigus Hmi1 metsiktüüpi valku ja mutante Hmi1E211Q, Hmi1Y243A, Hmi1Q240E ja Hmi1T578A/H589D. Vastuoluliselt õnnestus puhastada üks ATP sidumisega tegelev mutantne valk Hmi1E211Q ja ssDNA sidumisega seotud Hmi1Y243A ja needki mutandid puhastusid ebaefektiivselt võrreldes metsiktüüpi Hmi1 valguga. Võiks eeldada, et struktuuri juures sarnast funktsiooni omavad aminohapped puhastuvad sarnaselt, kuid antud valgupuhastus tõestas vastupidist. Kuna metsiktüüpi valku puhastub arvestatavas koguses, võib spekuloida, et mutantide vähene või

olematu puhastumine on seotud sisse viidud mutatsioonidega. Samuti kinnitab antud töös mõõdetud valgus ATP hüdrolüüsi aktiivsus, et puhastatud metsiktüüpi valk on aktiivne.

Üllataval kombel olid aga mõlemad puhastatud mutandid inaktiivsed. Hmi1E211Q puhul ei ole see imeks pandav, kuna ta omab rolli ATP sidumises ning varasemalt on näidatud, et UvrD valgus puudub II motiivi sisse viidud glutamiinhappe asendusel glutamiiniga valgul igasugune helikaasne aktiivsus ja ATP hüdrolüüsi ei toimu (Brosh ja Matson, 1995). Hmi1Y243A analoogiliste mutantide kohta kohta kohta ei ole suutnud ma andmeid leida. Teades antud mutandi oletatavat rolli ssDNA sidumisel on loomulik spekulatsioon, et kuna antud mutandis pole muteeritud struktuure, mis osalevad vahetult ATP hüdrolüüsis, peaks ta omama teatud tasemel aktiivsust. Isegi kui ssDNA sidumise võime on vähenenud, peaks valk olema aktiivne tingimustes, kus ssDNA hulk on viidud piisava ülehulgani. Antud magistr töö raames läbi viidud ssDNA tiitrimise katsed aga näitasid vastupidist.

Ehkki antud magistr töö tulemused tekitavad rohkem küsimusi kui vastuseid, on võimalik spekulatsioonide mitmete võimaluste üle. Välistatud ei ole võimalus, et me vaatleme valgus puhastusel puhtalt struktuurilist efekti, kus aminohapped vastavalt enda paiknemisele struktuuris lõhuvad valgustruktuuri täielikult või osaliselt ja valk puhastub seetõttu halvemini. Kahjuks ei ole puhastatud mutantide kogused piisavad selleks, et läbi viia näiteks võrdlevat CD spektrite analüüsi mutantsetel ja metsiktüüpi Hmi1 valgus preparaatidel. Oletades, et Hmi1 struktuuri mudel vastab tegelikkusele, asuksid ssDNA sidumisega seotud aminohapped sarnaselt UvrD valguga domäänide 2A ja 1A kokkupuute punktis (Lee ja Yang 2006). Kõige lihtsam spekulatsioon oleks, et ssDNA kanali aminohapped hoiavad koos ka kahte domääni ning ühe aminohappe kõrvalahela muutmine näiteks positsioonis 243 mõjutab tugevasti kahe domääni interaktsioone, aga mitte nii tugevasti kui kaks muteeritud aminohapet positsioonides 578 ja 589, mille tõttu struktuur kukub täielikult kokku. Samamoodi võiks seletada ka ATP sidumisega seotud aminohapete muteerimise efekte. Kuna ATP seondumise vagu asub sarnaselt UvrD valgule kahe domääni 2A ja 1A piiril võib argumenteerida, et mutatsioon positsioonis 211 mõjutab struktuuri vähem, kuna see aminohape ei oma otsest kontakti ATP molekuliga ja ei asu valgus struktuuris nii ligiläbil kahe domääni interakteerumise alale nagu seda teeb positsioonis 240 asuv glutamiin.

Välistatud ei ole ka võimalused, et mutandid Hmi1Q240E ja Hmi1T578A/H589D oleksid võimelised oma struktuuri kergemini hoidma, kui nende puhastusreaktsioon sisaldaks vastavalt ATP või ssDNA molekule, millega seondumine tagaks stabiilsuse. Samas on tähelepanuväärne, et mitmel Hmi1 mutandil, mida ei õnnestu puhastada biokeemiliselt, on säilinud olulisel määral aktiivsus *in vivo*. Kuidas see mitokondri keskkonnas saavutatakse, on praeguste teadmiste

kohaselt arusaamatu, aga üks võimalustest on Hmi1 struktuuri stabiliseerimine spetsiifilise valkkompleksi poolt.

## KOKKUVÕTE

Mitokondriaalse DNA säilimise juures omavad olulist rolli spetsiifilised mitokondriaalse DNA helikaasid. Üheks selliseks helikaasiks on Hmi1, mis kuulub superperekond 1 helikaaside hulka. Käesolevas magistritöös antakse kirjandusele baseeruv ülevaade superperekond 1 helikaasidest, mitokondriaalsetest helikaasidest ja põhjalikumalt käsitletakse helikaaside aminohappelise primaarstruktuuri konserveerunud motiive ja ruumilist struktuuri. Kirjanduse ülevaates käsitletakse ka töö keskmeks oleva valgu Hmi1 teadaolevaid biokeemilisi omadusi ja talle homoloogiliselt lähedasi helikaase.

Antud magistritöö käigus konstrueeriti Hmi1 valku mutatsioonid positsioonidesse Q8, K32, F75, N77, D210, E211, D237, Q240, Y243, R274, F275, K397, G434, S437, T587, H589, G593, Y617, R622 ning uuriti nende mõju mtDNA säilimisele. Tugevat fenotüüpi näitasid mutatsioonid aminohapete vahetusega Y243A ja T587A/H589D. Töökäigus modelleeritud Hmi1 ennustatud struktuuri põhjal on tegemist ssDNA seondumisel osalevate aminohapetega, mille muteerimisel kaotavad rakud kas osaliselt või täielikult respiratoorse võimekuse.

Edasises töös fokuseeriti katsed kahe tugeva fenotüübiga Y243A ja T587A/H589D asendusega mutatsioonide uurimisele ning lisaks võeti kõrvale kontrolliks ka mutandid, mis sisaldasid asendusi E211Q ja Q240E. Katsete käigus integreeriti mutatsioonid pärmikromosoomi ja ekspresseeriti mutatsioone sisaldavaid valke. Pärmikromosoomi integreerituna ja fermentatiivsel söötmel kasvades väheneb kõigil mutantidel respiratoorselt aktiivsete rakkude hulk (v.a. T587A/H589D asendusega mutant, mille tüve ei suudetud haploidina eraldada), mis viitab mitokondriaalse DNA ebastabiilsusele.

Valgupuhastuse käigus õnnestus puhastada metsiktüüpi valk ja kaks mutatsiooniga valku, asendustega positsioonides E211Q ja Y243A ning ülejäänud kaks mutanti kahjuks ei puhastunud. Puhastatud valkude ATP hüdrolyüüsi aktiivsuse mõõtmisel tehti kindlaks, et ainult metsiktüüpi valk on aktiivne ja aktiivsus on sõltuv ssDNA hulgast. Mutandid on aga täielikult inaktiivsed ja ATP hüdrolyüüsi aktiivsust ei oma.

# Functional significance of conserved residues in Hmi1 helicase

Sirelin Sillamaa

## SUMMARY

Helicases are proteins which possess a wide range of biological functions. As a common feature they all contain conserved helicase motifs, which are important for their DNA and RNA metabolism related functions. Mitochondrial DNA also needs specific mitochondrial DNA helicases for its DNA integrity maintenance. One of them is the helicase with a remarkable C-terminal mitochondrial locating signal, Hmi1.

Hmi1 has showed to play an important part in the mitochondrial DNA maintenance and most likely is needed for preserving longer concatemeric DNA fragments. However, not much is known about Hmi1 specific role in mitochondria and its structural determinants. The following master thesis focuses on amino acid substitution mutations in conserved helicase motifs. Mutated amino acids were chosen based on the Hmi1 protein structure prediction and from comparison with other homologous proteins. The following substitutions were designed and introduced in *HMI1* gene: Q8E, K32M, F75A, N77D, D210N/E211Q, E211Q, D237N, Q240E, Y243A, F274A, R275A, K397E, G434T, S437T, T587A/H589D, G593A, Y617A, R622A.

The impact of mutated aminoacid residues on mitochondrial DNA maintenance was first analyzed with 5-fluoroorotic acid based plasmid shuffling method. Two mutants with Hmi1 amino acid substitutions Y243A and T587A/H589D had the most severe phenotype, so the following experiments were focused on these mutants. Next these mutants were introduced in to yeast chromosome and the E211Q and Q240E were constructed as well. Unfortunately, we were unable to successfully integrate the T587A/H589D double mutant. Only the strain with Y243A substitution showed the remarkable respiratory defect in yeast tetrad dissection analysis.

Next the haploid mutant strains were analyzed for the loss of respiratory activity following growth in glucose-containing media on the low glucose plates, which allow to observe the relative numbers of respiratory competent compared to nonrespiratory cells. All tested mutants had a defect in the maintenance of respiratory activity compared to wild type cells.

Finally, the mutants were introduced into protein expression vectors and the wild type protein and mutant proteins with the same substitutions as used for yeast chromosome integration were expressed. The mutants Hmi1Q240E and Hmi1T587A/H589D did not purify using the scheme

of wild type Hmi1 purification. The other two mutants expressed in a lower level compared to wild type. However, the amount of these purified mutants was sufficient for determination of their ATP dependent activity. Wild type Hmi1 protein showed ssDNA dependent ATPase activity, the mutants on the other hand had no ATP hydrolysis activity what so ever under identical conditions. This may indicate, that the mutations alter the protein structure and even distort it. Further experiments are needed to determine whether the inactivation of the mutated protein is caused by the loss of structural integrity of the protein or are the mutations affecting some specific critical function, needed for the maintenance of mitochondrial DNA.

## TÄNUAVALDUSED

Tahaksin siin kohal tänada enda juhendajat Juhan Sedmani, kes on andnud mulle võimaluse töötada selle tohutu ja põneva projekti kallal ning üle elanud kõik minu emotsionaalsed hetked magistritöö kirjutamisel. Aitäh Tiinale, kes aitas teksti viimistlemisel ja katsete planeerimisel. Aitäh Maiele, kes aitas alati nõuga kõigi labori tegevuste juures. Aitäh lauanaabrile Nataljale, kes õpetas, et magistrant oskab juba epse laduda küll ja aitas seda mul kiiretel aegadel teha. Lisaks tahan tänada kõiki mikroobiokeemia õppetooli ja molekulaarbioloogia õppetooli ülejäänud liikmeid, kes veetsid minuga aega laboris hiliste tundideni või tirisid mind segadust tekitavatesse aruteludesse. Aitäh Annele, kes tekitas minus alati süümepiinu, et ma hakkaks kirjutama. Aitäh minu perele, kes ei pahandanud, et ma neid korra unustusse jätsin. Ja aitäh Karlile kes sa vaatasid, et ma sellel raskel ajal nii füüsiliselt kui emotsionaalselt ellu jääks ja toidetud saaks.



## KASUTATUD KIRJANDUS

1. Boule, J. B., Vega, L. R., Zakian, V.A. (2005). The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. *Nature*. 438(7064): 57-61.
2. Brosh, R. M., 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.
3. Brosh, R. M., 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.
4. Budd, M. E., Reis, C. C., Smith, S., Myung, K., Campbell, J. L. (2006). Evidence suggesting that Pif1 helicase functions in DNA replication with the Dna2 helicase/nuclease and DNA polymerase  $\delta$ . *Molecular and cellular biology*. 26(7): 2490-2500.
5. Burgess, R. C., Lisby, M., Altmannova, V., Krejci, L., Sung, P., Rothstein, R. (2009). Localization of recombination proteins and Srs2 reveals anti-recombinase function in vivo. *The Journal of cell biology*. 185(6): 969-981.
6. Cheng, W., Brendza, K. M., Gauss, G. H., Korolev, S., Waksman, G., Lohman, T. M. (2002). The 2B domain of the Escherichia coli Rep protein is not required for DNA helicase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99(25): 16006-16011.
7. De Silva, D., Fontanesi, F., Barrientos, A. (2013). The DEAD box protein Mrh4 functions in the assembly of the mitochondrial large ribosomal subunit. *Cell metabolism*. 18(5): 712-725.
8. De Silva, D., Poliquin, S., Zeng, R., Zamudio-Ochoa, A., Marrero, N., Perez-Martinez, X., Fontanesi, A., Barrientos, A. (2017). The DEAD-box helicase Mss116 plays distinct

roles in mitochondrial ribogenesis and mRNA-specific translation. *Nucleic acids research*, 45(11): 6628-6643.

9. Dillingham, M. S., Soultanas, P., 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.
10. Eisenberg, S., Scott, J. F., Kornberg, A. (1976). An enzyme system for replication of duplex circular DNA: the replicative form of phage phi X174. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 73(5): 1594-1597.
11. Fairman-Williams M.E., Guenther, U.P., Jankowsky, E. (2010). SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20(3): 313-324.
12. Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*. 440(3): 325-331.
13. Freel, K. C., Friedrich, A., Schacherer, J. (2015). Mitochondrial genome evolution in yeasts: an all-encompassing view. *FEMS yeast research*. 15(4): fov023.
14. Gaidutšik I., Sedman, T., Sillamaa, S., Sedman, J. (2016). Irc3 is a mitochondrial DNA branch migration enzyme. *Sci. Rep.* 6: 26414.
15. Gilhooly, N. S., Gwynn, E. J., Dillingham, M. S. (2013). Superfamily 1 helicases. *Front. Biosci.* S5(1): 206-216.
16. Gorbalenya, A. E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., Blinov, V.M. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 17(12): 4713-4730.
17. Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V. (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 419-429.

18. Graves-Woodward, K. L., Weller, S. K. (1996). Replacement of gly815 in helicase motif V alters the single-stranded DNA-dependent ATPase activity of the herpes simplex virus type 1 helicase-primase. *Journal of Biological Chemistry*. 271(23): 13629-13635.
19. Graves-Woodward, K. L., Gottlieb, J., Challberg, M. D., 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.
20. Guo, X. E., Chen, C. F., Wang, D. D. H., Modrek, A. S., Phan, V. H., Lee, W. H., Chen, P. L. (2011). Uncoupling the roles of the SUV3 helicase in maintenance of mitochondrial genome stability and RNA degradation. *Journal of Biological Chemistry*. 286(44): 38783-38794.
21. Hall, M. C., Matson, S. W. (1997). Mutation of a Highly Conserved Arginine in Motif IV of *Escherichia coli* DNA Helicase II Results in an ATP-binding Defect. *Journal of Biological Chemistry*. 272(30): 18614-18620.
22. Kornberg, A., Scott, J. F., Bertsch, L. L. (1978). ATP utilization by rep protein in the catalytic separation of DNA strands at a replicating fork. *Journal of Biological Chemistry*. 253(9): 3298-3304.
23. Krajewski, W. W., Fu, X., Wilkinson, M., Cronin, N. B., Dillingham, M. S., Wigley, D. B. (2014). Structural basis for translocation by AddAB helicase–nuclease and its arrest at  $\chi$  sites. *Nature*. 508(7496): 416.
24. Kuusk, S., Sedman, T., Jöers, P., Sedman, J. (2005). Hmi1p from *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria Is a Structure-specific DNA Helicase. *J. Biol. Chem.* 280(26): 24322-24329.
25. Korolev, S., Hsieh, J., Gauss, G. H., Lohman, T. M., 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.

26. Lahaye, A., Stahl, H., Thines-Sempoux, D., Foury, F. (1991). Pif1: a DNA helicase in yeast mitochondria. *EMBO J.* 10(4): 997–1007.
27. Lee, C. M., Sedman, J., Neupert, W., Stuart, R. A. (1999). The DNA Helicase, Hmi1p, Is Transported into Mitochondria by a C-terminal Cleavable Targeting Signal. *J. Biol. Chem.* 274(30): 20937-20942.
28. Lee, J. Y., Yang, W. (2006). UvrD Helicase Unwinds DNA One Base Pair at a Time by a Two-Part Power Stroke. *Cell.* 127(7): 1349-1360.
29. Lohman, T. M., Bjornson, K.P. (1996). Mechanisms of helicase-catalysed DNA unwinding. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 169-214.
30. Lohman, T. M., Tomko, E. J., Wu, C. G. (2008). Non-hexameric DNA helicases and translocases: mechanisms and regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 9(5): 391.
31. Lu, K. Y., Chen, W. F., Rety, S., Liu, N. N., Wu, W. Q., Dai, Y. X., Li, D., Ma, H. Y., Dou, S., X., Xi, X. G. (2017). Insights into the structural and mechanistic basis of multifunctional *S. cerevisiae* Pif1p helicase. *Nucleic acids research.* 46(3): 1486-1500.
32. Lõoke, M., Kristjuhan, K., Kristjuhan, A. (2011). EXTRACTION OF GENOMIC DNA FROM YEASTS FOR PCR-BASED APPLICATIONS. *Biotechniques.* 50(5): 325–328.
33. Mishra, P., Chan, D. C. (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology.* 15(10): 634-644.
34. Niu, H., Klein, H. L. (2017). Multifunctional roles of *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 protein in Replication, Recombination and Repair. *FEMS yeast research.* 17(2): 1-28.
35. Niu, H., Potenski, C. J., Epshtein, A., Sung, P., 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.

36. Ortiz, A. M. L., Reid, R. J., Dittmar, J. C., Rothstein, R., Nicolas, A. (2011). Srs2 overexpression reveals a helicase-independent role at replication forks that requires diverse cell functions. *DNA repair*. 10(5): 506-517.
37. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25(13):1605-12.
38. Potenski, C. J., Niu, H., Sung, P., Klein, H. L. (2014). Avoidance of ribonucleotide-induced mutations by RNase H2 and Srs2-Exo1 mechanisms. *Nature*. 511(7508): 251.
39. Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5: 725-738.
40. Saikrishnan, K., Powell, B., Cook, N. J., Webb, M. R., Wigley, D. B. (2009). Mechanistic basis of 5'-3' translocation in SF1B helicases. *Cell*. 137(5): 849-859.
41. Sedman T., Jöers, P., Kuusk, S., Sedman, J. (2005). Helicase Hmi1 stimulates the synthesis of concatemeric mitochondrial DNA molecules in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 47(4):213-22.
42. Sedman, T., Kuusk, S., Kivi, S., Sedman, J. (2000). A DNA Helicase Required for Maintenance of the Functional Mitochondrial Genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 20(5): 1816-1824.
43. Sedman, T., Gaidutšik, I., Villemson, K., Hou, YJ., Sedman, J. (2014). Double-stranded DNA-dependent ATPase Irc3p is directly involved in mitochondrial genome maintenance. *Nucleic Acids Res.* 42(21): 13214–13227.
44. Sedman, T., Garber, N., Gaidutšik, I., Sillamaa, S., Paats, J., Piljukov, V. J., Sedman, J. (2017). Mitochondrial helicase Irc3 translocates along double-stranded DNA. *FEBS letters*. 591(23): 3831-3841.

45. Sikorski R.S., Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 122(1): 19-27.
46. Singleton, M. R., Dillingham, M. S., Gaudier, M., Kowalczykowski, S.C., Wigley, D. B. (2004). Crystal structure of RecBCD enzyme reveals a machine for processing DNA breaks. *Nature*. 432(7014):187-93.
47. Singleton, M. R., Dillingham, M. S., Wigley, D. B. (2007). Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 23-50.
48. Soultanas, P., Dillingham, M. S., Velankar, S. S., Wigley, D. B. (1999). DNA binding mediates conformational changes and metal ion coordination in the active site of PcrA helicase1. *Journal of Molecular Biology*. 290(1): 137-148.
49. Soultanas, P., Dillingham, M. S., Wiley, P., Webb, M. R., Wigley, D. B. (2000). Uncoupling DNA translocation and helicase activity in PcrA: direct evidence for an active mechanism. *The EMBO journal*. 19(14): 3799-3810.
50. Subramanya, H.S., Bird, L.E., Brannigan, J.A., Wigley, D.B. (1996). Crystal structure of a DExx box DNA helicase. *Nature* 384(6607): 379-83.
51. Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9: 40.
52. Zhou, R., Zhang, J., Bochman, M. L., Zakian, V. A., Ha, T. (2014). Periodic DNA patrolling underlies diverse functions of Pif1 on R-loops and G-rich DNA. *Elife*. 3: e02190.
53. Zhu, L. A., Weller, S. K. (1992). The six conserved helicase motifs of the UL5 gene product, a component of the herpes simplex virus type 1 helicase-primase, are essential for its function. *Journal of virology*. 66(1): 469-479.

54. Tanner, N. K., Cordin, O., Banroques, J., Doere, M., Linder, P. (2003). The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Molecular cell*. 11(1): 127-138.
55. Tzagoloff, A., Dieckmann, C. L. (1990). PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews*. 54(3): 211-225.
56. Velankar, S. S., Soultanas, P., Dillingham, M. S., Subramanya, H. S., 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.
57. Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal*. 1(8): 945-51.
58. Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M., Rothstein, R. (1989). A hyperrecombination in *S. cerevisiae* identifies a novel eucaryotic topoisomerase. *Cell* 58: 409-419.
59. Westermann, B. (2013). Mitochondrial inheritance in yeast. *Biochim. Biohys. Acta*. 1837(7): 1039-46.
60. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12: 7-8.
61. Yarranton, G. T., Gefter, M. L. (1979). Enzyme-catalyzed DNA unwinding: studies on *Escherichia coli* rep protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76(4): 1658-1662.

#### Raamatud:

- a. Kuusk, S., Sedman, T., Sedman, J. (2002). Recombinant yeast mtDNA helicases, p. 303-316. Purification and functional assays. In Copeland, W.C: (ed)

Methods in Molecular Biology: Mitochondrial DNA. Methods and Protocols, vol 197. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

- b. Raney, K. D., Byrd, A. K., Aarattuthodiyil, S. (2013). Structure and mechanisms of SF1 DNA helicases, p. 17-46. In DNA Helicases and DNA Motor Proteins. Springer New York.
- c. Rose, M. D., Winston, F., Hieter, P., (1990). Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- d. Sambrook, J., Russel, D. (2001). Molecular Cloning a laboratory manual (3th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- e. Sherman, F. (1991). Getting started with yeast, p.15, 17. C., Fink, R. G. (ed.) Methods in Enzymology: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Euthrie, vol. 194. Academic Press, San Diego, California.
- f. White, B.A., (1993). Site-Directed Mutagenesis by Double Polymerase Chain Reaction, p. 277-287. Barik., S. (ed) Methods in Molecular Biology: PCR Protocols, vol 15. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- g. Wu, C. G., Spies, M. (2013). Overview: What are helicases?, p. 1-16. In DNA Helicases and DNA Motor Proteins. Springer, New York, NY.

#### Kasutatud veebiaadressid ja programmid:

I-tasser, valgu modelleerimise interneti server: <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> 15.04.18

Valkude andmebaas, valgu kristallstruktuuridele (PDB) : [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) 27.05.18

Valgu struktuuri kordinaatide visualiseerimiseks, kasutati UCSF Chimera 1.12 programmi. Chimera on arendatud bioarvutuste, visualisatsiooni ja informaatika ressursside abil California ülikoolis, San Franciscos (toetatud NIGMS P41-GM103311-ga) [www.cgl.ucsf.edu/chimera/](http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/) alla laetud 01.05.18.



# **LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA LÕPUTÖÖ ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS**

Mina, Sirelin Sillamaa (sünnikuupäev: 05.12.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
Hmi1 helikaasi järjestuses konserveerunud aminohapete roll valgu funktsionaalsuses  
mille juhendaja on professor Juhan Sedman,
  - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 28.05.2020 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jääval alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018.