

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

Vlad-Julian Piljukov
Irc3 katalüütiliselt aktiivne vorm
Magistritöö
30 EAP

Juhendaja: professor Juhan Sedman

TARTU 2017

Irc3 katalüütiliselt aktiivne vorm

Magistritöö

Vlad-Julian Piljukov

Lühikokkuvõte. Irc3 on SF2 superperekonna pagaripärmi mitokondri helikaas mis võib vastutada replikatsioonikahvli regressiooni eest ja osaleda homoloogilises rekombinatsioonis. Töös puhastasime rekombinantse Irc3 valgu, määrasime Irc3 kineetilised parameetrid ATP suhtes ja meie leitud andmed viitavad sellele, et Irc3 on aktiivne monomeerina.

CERCS teaduseriala: P310 Proteiinid, ensüümid.

Märksõnad: Irc3, ATPaas, monomeer, dimeer

Catalytically active form of Irc3

Master's thesis

Vlad-Julian Piljukov

Abstract. Irc3 is SF2 superfamily helicase that functions in brewer's yeast mitochondria and may be responsive for replication fork regression and take part in homologous recombination. During this study, recombinant Irc3 was purified and kinetic constants of ATP hydrolysis measured. Finally, our data suggest that Irc3 is functionally active as a monomer.

CERCS research specialization: P310 Proteins, enzymes.

Keywords: Irc3, ATPase, monomer, dimer

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Mitokonder	7
1.2 Mitokondriaalne DNA	7
1.3 Helikaasid	7
1.4 Helikaaside süstemaatika	8
1.5 SF2 helikaasid	9
1.6 SF2 helikaaside motiivid	9
1.7 SF2 helikaaside perekonnad	11
1.8 UvsW	12
1.9 SMARCAL1	12
1.10 RecG	13
1.11 Irc3	13
EKSPERIMENTAALNE OSA	15
2. Materjalid ja meetodika	15
2.1 Töö eesmärgid	15
2.2.1 Bakteritüved ja plasmiidid	15
2.2.2 Söötmed ja kasvutingimused	15
2.2.3 Lahused	15
2.2.4 Reaktiivid	16
2.2.5 Oligonukleotiidid	17
2.3 Rekombinantse Irc3 valgu puhastamine	17
2.3.1 E. coli BL21 CodonPlus RIL rakkude transformatsioon	17
2.3.2 Irc3 valgu ekspressioon	17
2.3.3 Rakkude lüüs ja valkude segu eelfraktsioneerimine ammooniumsulfaadiga	18
2.3.5 Rekombinantse valgu lõikamine Tev proteaasiga	19
2.3.6 Sulfopropüül-agaros kationvahetuschromatograafia	19
2.3.7 Heparin-agaros chromatograafia	19
2.3.8 SDS-poliakrüülamiidgeelelektroforees (SDS-PAGE)	20
2.3.9 Irc3 kontsentratsiooni määramine	20
2.4 Irc3 ATPasse aktiivsuse mõõtmine	20
2.4.1 DNA kofaktori valmistamine	20
2.4.2 ATPasse aktiivsuse määramine	21
2.5 Irc3 sedimentatsioonanalüüs	21
2.5.1 Glütserooli gradiendi parameetrite valik	21
2.5.2 Glütserooli gradiendi tulemuste analüüs	22
3. Tulemused	23
3.1 Irc3 puhastamine	23
3.1.1 Irc3 ekspressiooni konstrukt, transformatsioon ja kasvatamine	23
3.1.2 Rakkude lüüs, valkude sadestamine ja Glutatioon-agarosi kolonn	24
3.1.3 GST-Δ28Irc3 liitvalgu lõikamine ja Sulfopropüül-agaros kolonn	24
3.1.4 Heparin-agaros chromatograafia	25
3.1.5 Valgu kontsentratsiooni määramine	26
3.2 K65A mutatsiooniga Irc3 puhastamine	26
3.3 Irc3 ATPaasi aktiivsuse testsüsteem	28
3.3.1 Irc3 ATPaasi reaktsiooni parameetrite valik	28
3.3.1.1 Soolade mõju Irc3 ATPaasi aktiivsusele	28
3.3.1.2 DNA kofaktorite valmistamine	30
3.3.1.3 ATP kontsentratsiooni mõju Irc3 ensümaatilisele aktiivsusele	31

3.3.3 Irc3 oligomerisatsioon kofaktori juuresolekul	33
3.3.3.1 Kooperatiivsus Irc3 ATPaasi reaktsioonis	33
3.3.3.2 K65A Irc3 mõju aktiivsusele	34
3.3.3 Irc3 oligomerisatsioon lahuses	36
Arutelu.....	38
Kokkuvõte	40
Summary	41
Kasutatud allikad.....	43

KASUTATUD LÜHENDID

mtDNA – mitokondriaalne DNA

NTP – nukleosiid trifosfaat

SF2 – superperekond 2

cpma – impulsid minutis, keskmistatud

Amp – ampitsilliin

Cam – klooramfenikool

SDS – naatrium dodetsüülsulfaat

PAGE – polüakrüülamiid geelelektroforees

rpm – pööret minutis

IPTG – isopropüül β -D-1-thiogalaktopüranosiid

DTT – ditiotreitool

ddH₂O – kahekordselt destilleeritud vesi

SISSEJUHATUS

Mitokonder on eukariootse raku üks olulisemaid organelle. Mis teeb teda tõeliselt teistest organellidest erinevaks on oma eraldiseisva genoomi olemasolu, kuigi täielikuks funktsioneerimiseks on vaja palju tuuma geenide pealt kodeeritud produkte. Kuna mitokondril on oma genoom, siis seda on vaja säilitada, parandada, replitseerida – kõik see aga nõuab palju erinevaid valke. Üks oluline valkude grupp nendes protsessides on helikaasid. Minu töös uuritud valk Irc3 on SF2 helikaas, mis on kodeeritud tuumas ja transporditud mitokondrisse. Tema peamiseks funktsioonideks on arvatavasti homoloogilise rekombinatsiooni vaheetapis osalemine ja või seisma jäänud replikatsioonikahvlite taaskäivitamine. Irc3 deletsiooniga tüved omavad ebastabiilset mitokondriaalset DNA-d. Eelnevalt oli teada, et RecG suudab osaliselt komplementeerida Irc3 deletsiooniga kaasnevat fenotüüpi ja *in vitro* katsetest oli teada, et nende valkude nukleiinhape kofaktorispetsiifika on sarnane. Otsustasime Irc3 edasiseks uurimiseks kasutada kohandatud RecG statsionaarse faasi kineetika uurimise meetodit.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Mitokonder

Mitokondri peamine funktsioon organismis on energia tootmine läbi ADP oksüdatiivse fosforüleerimise. Teine oluline hädavajalik mitokondrite funktsioon on raud-väävel klastrite süntees (McBride *et al.*, 2006). Ilma nende funktsioonideta on tavaliselt eukarüootse organismi elu võimatu ning see rõhutab vajadust säilitada rakus funktsionaalne mitokonder.

1.2 Mitokondriaalne DNA

Üks olulisemaid faktoreid funktsionaalse mitokondri säilimiseks on intaktne mtDNA. Mitokondriaalne genoom on pagaripärmis umbes 85,8 kbp pikk, sellele on iseloomulik kõrge adeniini ja tümiini rikkus ja guaniini ja tsütosiini piirkondlik kontsentreerumine ehk nn. GC-saared. Mitokondriaalne genoom kodeerib 21S ja 15S ribosomaalseid rRNA-sid, 24 tRNA-d ja vähemalt kaheksat oksüdatiivse fosforüleerimise ahela valku (Foury *et al.*, 1998). Juhul kui mtDNA on intaktne, siis toimuvad mitokondris replikatsioon, transkriptsioon ja translatsioon, mis on omakorda vajalikud mtDNA säilimiseks (Smits *et al.*, 2010). Mitokondriaalse DNA mutatsioonidega on seotud paljud haigused, mis hõlmavad kesknärvisüsteemi, perifeerset närvisüsteemi, lihaseid, vereloome organeid, endokriinset süsteemi, süda, seedesüsteemi ja kõrva (Dimauro and Davidzon, 2005). Siinjuures on olulise tähtsusega mudelorganism – pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae*, mis on eukarüootne organism, kes on võimeline elama ka ilma funktsionaalse mtDNA-ta, kasutades ainult glükolüüsist saadud energiat (Tzagoloff and Dieckmann, 1990). Tänu sellele saab uurida erinevate valkude mõju mitokondriaalsele DNA-le, jälgides kasvõi kolooniate fenotüüpi. Ilma funktsionaalse mtDNA-ta kolooniad on tavaliselt väiksemad kui funktsionaalse mtDNA-ga rakkude kolooniad ja ei ole võimelised kasvama mittefermenteeritaval söötmel. Eristatakse ρ^- või ρ^0 rakke, mis on vastavalt defektse mtDNA-ga või kus mtDNA täielikult puudub. Intaktse mitokondriaalse DNA-ga rakke nimetatakse ρ^+ (Tzagoloff and Dieckmann, 1990). Hinnatakse, et mitokondri funktsioonide täitmises osaleb umbes 1000 valku, millest suurem enamus on kodeeritud tuumas ja transleeritud tsütosoolis, millejärel transporditud mitokondrisse (Schmidt *et al.*, 2010). Nende hulka kuulub ka minu poolt uuritud valk Irc3, mis on tuumas kodeeritud ja mitokondris töötav helikaas (Alvaro *et al.*, 2007; Gaidutšik *et al.*, 2016).

1.3 Helikaasid

Helikaasideks nimetatakse valke, mis suudavad lõhkuda nukleinhapete vahelisi

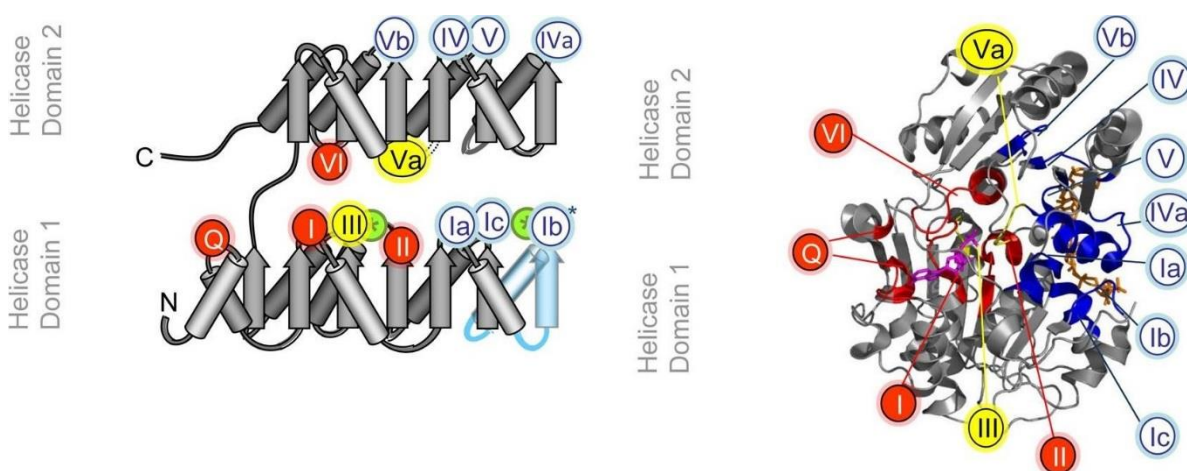
vesiniksidemeid, harutades sellega lahti DNA, RNA või DNA/RNA hübriidi. Enamus nendest tegeleb kaksikahelalise DNA lahtiharutamise, kasutades selleks NTP (tavaliselt ATP) hüdrolyüüsi vabanevat energiat (Singleton *et al.*, 2007). Seda protsessi on vaja paljude molekulaarsete protsesside läbiviimiseks rakus nagu näiteks DNA replikatsioon, transkriptsioon, translatsioon, rekombinatsioon, DNA reparatsioon (Patel and Donmez, 2006). Hinnatakse, et helikaasid võtavad enda alla 1% genoomi kodeerivatest järjestustest ja seda nii prokarüootides, kui ka eukarüootides, mis väga selgelt viidab nende olulisusele (Schmidt *et al.*, 2010). Defektid nende funktsioonis või ekspressiooni regulatsioonis on seotud paljude haigustega, nagu: kasvajakasv, arengudefektid ja neurodegeneratiivsed haigused. Viimased võivad olla seotud ka helikaaside poolt põhjustatud mitokondriaalse genoomi ebastabiilsustest (Abdelhaleem, 2004; Hanada and Hickson, 2007).

1.4 Helikaaside süstemaatika

Süstematiseerimise eesmärgil on võimalik helikaase jaotada järgmiselt: kofaktori spetsiifilisuse alusel DNA, RNA ja DNA/RNA hübriidide helikaasideks; liikumise polaarsuse alusel 5'-3' ja 3'-5' helikaasideks (B ja A helikaasid); oligomerisatsiooni alusel monomeerseteks, dimeerseteks ja heksameerseteks helikaasideks (Tuteja and Tuteja, 2004). Töö mehhanismi alusel saab helikaasid jaotada aktiivseteks ja passiivseteks helikaasideks: esimesed liiguvad DNA või RNA kofaktoril, teised stabiliseerivad kofaktori ahelate juhuslikku termilise liikumise olekuid (Lohman and Bjornson, 2003). Kõik need jaotamise viisid ei võimalda uusi veel tundmatuid helikaase iseloomustada järjestuse alusel ja tekitavad segadust, sest sageli omavad järjestuselt sarnased helikaasid hoopis erinevaid funktsioone rakus ja seega nende kofaktori spetsiifilisus, liikumise suund, mehhanism jne. on erinevad. Selleks et seda vältida oli aastal 1993 välja töödatud aminohapete motiivide alusel põhinev süstemaatika, kus kõik helikaasid on kindlate motiivide olemasolu alusel jaotatud superperekondadesse (superfamilies või SF) (Gorbalenya and Koonin, 1993). Alguses jaotati kõik helikaasid kolme superperekonda ja kahte väiksemasse perekonda, praegu eristatakse superperekondi kokku kuus ja neid jaotatakse omakorda veel alamperekondadeks. Selle süstemaatika alusel kuulub enamus helikaase kas esimesse või teise superperekonda (Gorbalenya and Koonin, 1993; Singleton *et al.*, 2007). Edasi kirjeldan lähemalt just SF2 helikaase, sest minu poolt uuritav valk Irc3 kuulub just sellesse perekonda (Sedman *et al.*, 2014).

1.5 SF2 helikaasid

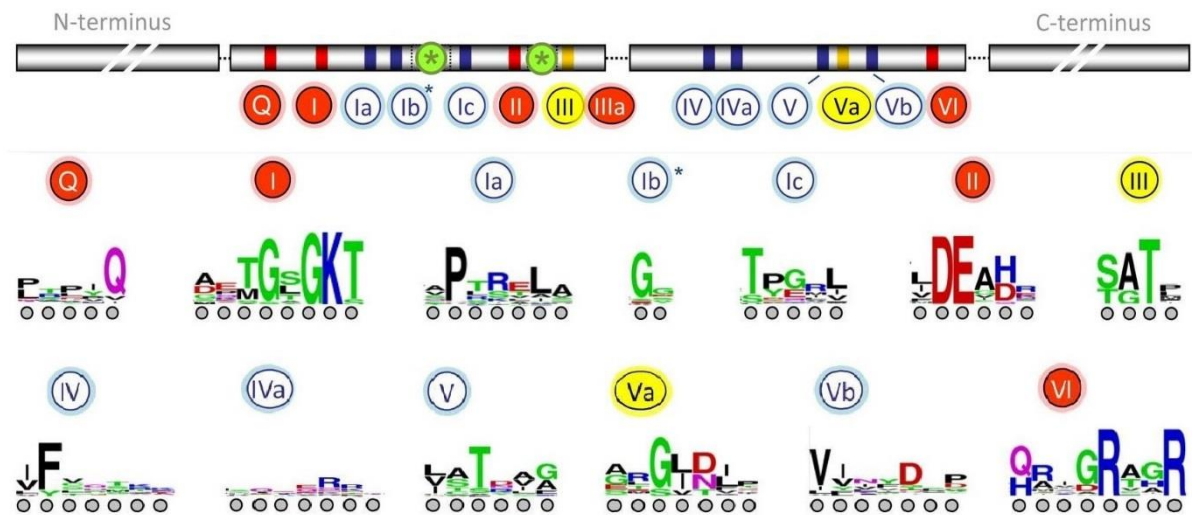
Superperekonna 2 helikaasid moodustavad kõige suurema helikaaside grupi, täites rakus väga erinevaid funktsioone (Singleton *et al.*, 2007). Kristallstruktuuris on nende valkude tuumik moodustatud kahest RecA-sarnasest domeenist mille vahel asuvas vaos paiknevad enamasti helikaasi funktsiooni tagavad motiivid (ATP hüdrolüüs, konformatsioonilised muutused) ja väljaspool – kofaktoriga (DNA, RNA) sidumist tagavad struktuursed motiivid (Joonis 1) (Singleton *et al.*, 2007). SF2 helikaasid funktsioneerivad alati mono- või dimeeridena ja peaaegu kõik antud superperekonna helikaasid liiguvad eelistatult 3`-5` polaarsusega, ehk on A tüüpi (Singleton *et al.*, 2007).



Joonis 1: Valkude tuum on moodustatud kahest RecA-sarnasest domeenist, mis on omavahel seotud linguga. Domeenide vahel asuvas vaos paiknevad enamasti helikaasi funktsiooni tagavad motiivid (ATP hüdrolüüs, konformatsioonilised muutused) joonisel tähistatud I, II, II, Va, VI, Q. Vaost väljaspoole paiknevad kofaktoriga (DNA, RNA) sidumist tagavad struktuursed motiivid Ia, Ib, Ic, IV, IVa, V, Vb (Fairman-Williams *et al.*, 2010).

1.6 SF2 helikaaside motiivid

Algselt leiti seitse superperekonna II iseloomulikku motiivi, hiljem laiendati nende arv kaheteistkümmeni. Igas SF2 alamperekonnas on motiivide muster unikaalne (Fairman-Williams *et al.*, 2010; Gorbalenya and Koonin, 1993) (Joonis 2).



Joonis 2: Järjestuse organisatsioon SF2 helikaasidel. Motiivid on värvitud oma biokeemilise funktsiooni järgi: punased – ATP sidumine ja hüdrolüüs, kollased – koordinatsioon nukleinhappe kofaktori sidumistsentri ja ATP sidumistsentrite vahel, sinine – nukleinhape sidumine. Rohelised ringid tärniga tähistavad võimalikke lisadomeenide insertioonikohti. Motiivide järjestused on värvitud aminohapete keemiliste omaduste järgi: roheline – polaarne, sinine – aluseline, punane – happeline, must – hüdrofoobne. Tähe suurus tähistab positsiooni konservatsiooni tugevust (Fairman-Williams *et al.*, 2010).

Peamised motiivid, mille funktsioonid on teada:

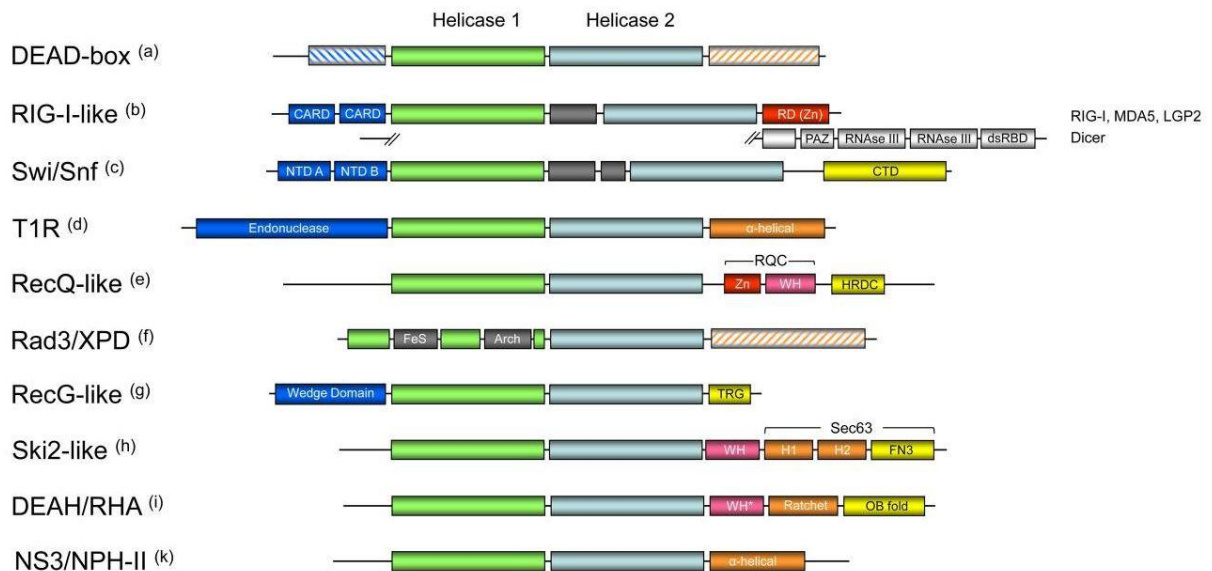
- Q-motiiv, kontakteerub adenini lämmastikalusega ATP koosseisus, tagades sellega helikaasile ATP-spetsiifilisuse. Helikaasides, kus seda motiivi pole olemas, võib oodata ATP-st erinevate NTP-de kasutamist. Näiteks viiruselised DExH valgud, mis on võimelised kasutama kõiki NTP-sid (Tanner *et al.*, 2003).
- III ja Va, vastutavad nukleinhape ja NTP sidumiskiirkondade koordineerimise eest. Mutatsioonid antud motiivides põhjustavad seoste kadumist NTP hüdrolüüsi ja nukleinhape sidumise või nukleinhape peal liikumise vahel (Dillingham *et al.*, 1999; Banroques *et al.*, 2010).
- Motiivid I ja II olid avastatud juba aastal 1982 (Walker *et al.*, 1982). Avastaja nime järgi nimetatakse neid ka Walker A ja B motiivideks. Mutatsioonanalüüsist selgus, et motiiv I on vajalik ATP sidumiseks ja motiiv II – ATP hüdrolüüsiks. Motiiv II on oluline Mg^{2+} sidumiseks, millel on omakorda oluline roll ATP hüdrolüüsil (Pause and Sonenberg, 1992).
- Ia, IV ja V on olulised interaktsioonides nukleinhape fosfaatselgrooga. Kuna need motiivid asuvad RecA-sarnaste domeenide erinevates õlgades, on pakutud välja, et

nad võivad olla olulised helikaaside veereva ratta mudeli järgi liikumisel nukleiinhappel. Selle mudeli kohaselt on üks õlg liikuv ja lükkab valku nukleiinhappe molekulil edasi; teine õlg fikseerib järgmise positsiooni (Kim *et al.*, 1998).

- VI motiiv on oluline valgu konformatsioonilises üleminekus "avatud" ja "suletud" vormide vahel ja seostab konformatsiooni muutused NTP hüdroolüüsiga. Motiivi koosseisus on oluline "arginiini sõrm" struktuur, mis liigub motiivi I seotud NTP juurde produtseerides valgu kinnise konformatsiooni, peale NTP hüdroolüüsi "arginiini sõrm" liigub tagasi, vabastades NDP ja valk läheb üle "avatud" vormi. Sellise liikumise käigus liigub helikaas nukleiinhappe peal edasi (Sengoku *et al.*, 2006).

1.7 SF2 helikaaside perekonnad

Superperekond 2 helikaasidel on olemas minimaalne funktsionaalne struktuur, mida nimetatakse helikaasi tuumaks. See koosneb kahest RecA valgu sarnasest domeenist, helikaasi domeenid I ja II. Ruumiliselt asuvad vastavad domeenid üksteise vastas ja on ühendatud peptiidse linguga (Joonis 1). Domeenide vahele jääv vagu on oluline helikaasi funktsioneerimiseks (Gorbalenya and Koonin, 1993; Singleton *et al.*, 2007). Peale helikaasi tuuma esinevad SF2 helikaasidel ka lisadomeenid, need võivad paikneda tuuma struktuuri suhtes N- või C-terminaalselt või isegi olla inserteerunud struktuuri sisse. Nende domeenide olemasolu ja paiknemine on samaaegselt helikaasi biokeemiliste omadustega olulised SF2 helikaaside liigitamisel alamperekondadesse (Fairman-Williams *et al.*, 2010) (Joonis 3). Järgnevalt annan lühiülevaate kolmest helikaasist, mis omavad minu töös uuritud Irc3 helikaasiga sarnast biokeemilist funktsiooni.



Joonis 3: SF2 helikaasi perekondade skeem, millel on tähistatud helikaasi domeenid I ja II (helikaasi tuum), ja nende sees või juures asuvad lisadomeenid (Fairman-Williams *et al.*, 2010).

1.8 UvsW

UvsW kuulub SF2 helikaaside hulka ja on üks kolmest helikaasist mis olid leitud T4 bakteriofaagis (Nelson and Benkovic, 2007). UvsW on ATP-st sõltuv DNA helikaas mis on 587 aminohapet pikk ja massiga umbes 67,5 kDa (Nelson and Benkovic, 2007). UvsW omab rolli DNA replikatsioonis ja parandamises, koordineerib juhtiva ja mahajääva ahelate replikatsiooni (Schrock and Alberts, 1996). UvsW ekspressiooni aktivatsioon suudab taaskäivitada seismajäänud replikatsioonikahvleid (Derr and Kreuzer, 1990). *In vivo* katsetest on teada, et UvsW deletsiooniga T4 tüved on tundlikumad ultraviolettkiirgusele ja hüdroksüurea töötlusele (Derr and Drake, 1990).

1.9 SMARCAL1

SMARCAL1 on RecG, Irc3 ja UvsW sarnase funktsiooniga valk inimeses. SMARCAL1 on lühend valgu täisnimetusest: SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1. SMARCAL1 on 953 aminohapet pikk SF2 superperekonna Swi/Snf alam perekonna helikaas, mis sisaldab DESH-box helikaasset motiivi (Postow *et al.*, 2009). Mutatsioon *SMARCAL1* geenis põhjustab defektse valgu, mis on aga ühe haruldase haiguse schimke immuno-osseous düsplaasia põhjuseks. Haigus põhjustab luude väärarengut, madalat kasvu, silmanägemuse kadumist, T-rakkude hävimist (Lou *et al.*, 2002). On leitud et SMARCAL1 osaleb kaksikahelaste DNA katkete parandamisel,

seismajäänud replikatsioonikahvlite täiskäivitamisel ja lahtikeerdunud DNA ahelate kokkusulatamisel (Postow *et al.*, 2009; Bansbach *et al.*, 2009). *SMARCAL1* mutatsiooniga rakkudes on raskendatud telomeersete regioonide replikatsioon, mis võib viidata antud valgu olulisusele ka vananemise protsessides (Poole and Cortez, 2016). Oma funktsiooni poolest on *SMARCAL1* sarnane *RecG*-ga ja meie töös uuritud *Irc3*-ga, mis näitab meie uurimise olulisust ka inimese haiguste mõistmises.

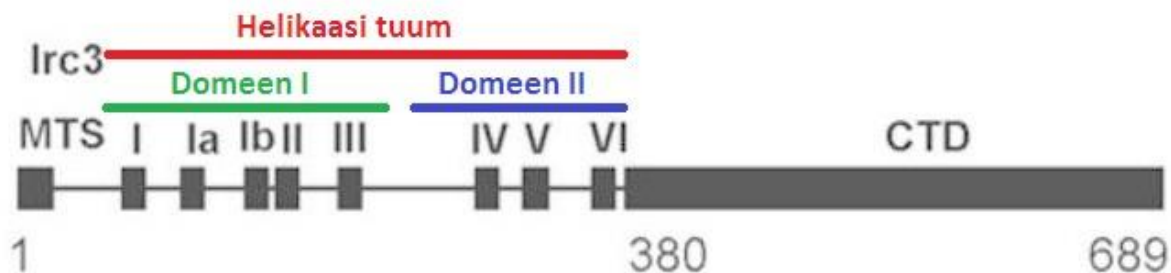
1.10 *RecG*

RecG kuulub SF2 helikaaside hulka ja on enda alamperekonna näidisesindaja. *RecG* on ATP-st sõltuv DNA helikaas ja omab DEQH tetrapeptiidi motiiv II-s. *RecG* on *E. coli* valk, mis on 693 aminohapet pikk ja massiga umbes 76 kDa (Whitby *et al.*, 1994). Erinevalt *Irc3*-st omab *RecG* N-terminaalset Wedge domeeni ja C-terminaalset TRG motiivi (Joonis 3) (Fairman Williams *et al.*, 2010). *RecG* deletsiooniga mutandid on märgatavalt tundlikumad ultravioletti valgusele ja mitomütsiin C töötlusele, mis viitab DNA reparatsiooni masinavärgi puudulikkusele (Lloyd and Buckman, 1991). Selle valgu peamiseks bioloogilisteks funktsioonideks on homoloogilise rekombinatsiooni ajal Holiday struktuuri liikumine, seisma jäänud replikatsioonikahvli tagasiliikumine, R- ja D-loopide lahtiharutamine (Whitby *et al.*, 1994; Wardrope *et al.*, 2009; Lloyd and Rudolph, 2016). Samblal *Physcomitrella patens* on leitud otsene bakteriaalse *RecG* homoloog RECG, mis lokaliseerub mitokondritesse ja on oluline mitokondri genoomi stabiliseerimises (Odahara *et al.*, 2015). Pärmis otsene *RecG* homoloog puudub, aga üks võimalikke kandidaate, mis täidaks *RecG* rolli pärmi mitokondris on *Irc3*.

1.11 *Irc3*

Antud töös uuritud valgu *Irc3* geen avastati aastal 2007 koos veel 20 teise geeniga, mis kõik said endale nimeks IRC (Increased Recombination Centers) ja numbrid 1-21 (Alvaro *et al.*, 2007). Vastavas skriinis otsiti valke, mille deleteerimine mis põhjustab Rad52p rekombinatsioonikompleksi arvu kasvu tuumas (Alvaro *et al.*, 2007). Hiljem leiti, et *Irc3* on hoopis mitokondri valk (Sedman *et al.*, 2014). *Irc3* on 689 aminohapet pikk ja massiga umbes 78,5 kDa. N-terminaalsest otsast alustades esimesed 28 aminohapet moodustavad mitokondri transpordisignaali. Sellele järgneb 380-ne aminohappe pikkune helikaasi tuum, mis koosneb kahest domeenist. Domeen I sisaldab motiive I, Ia, Ib, II ja III, mille peamine funktsioon on ATP hüdrolyüs ja ATP ja nukleiinhappe sidumispiirkondade koordineerimine. Sellele järgneb helikaasne domeen II, mille koosseisu kuuluvad motiivid IV, V ja VI, mille peamine funktsioon on interaktsioon nukleiinhappega ja valgu konformatsiooniline üleminek „avatud“

ja „suletud“ vormide vahel. Domeen II-le järgneb valgu lõpus teadmata funktsiooniga C-terminaalne domeen, mille moodustavad 309 aminohapet (Sedman *et al.*, 2014) (Joonis 4).



Joonis 4: Irc3 on 689 aminohapet pikk ja massiga umbes 78,5kDa. N-terminaalsest otsast alustades esimesed 28 aminohapet moodustavad mitokondri transpordisignaali, siis 380-ni aminohapteni on helikaasi tuum, mis koosneb kahest helikaasi domeenist, millele järgneb tundmatu funktsiooniga C-terminaalne domeen (Sedman *et al.*, 2014).

Üldise aminohappelise järjestuse järgi määrati Irc3 SF2 DEAD helikaaside alam perekonda, kui aga vaadata helikaasi tuuma järjestust ja punktmutatsiooni analüüsi tulemusi, siis kulub ta pigem SF2 DEAH helikaaside hulka. Lisaks omab Irc3 DEAH tetrapeptiidi motiiv II-s, mis viitab sellele, et ATP hüdrolüüs toimub sarnaselt teistele DEAH helikaasidele (de la Cruz *et al.*, 1999; Sedman *et al.*, 2014). *In vivo* katsetest on teada, et Irc3 deletsiooniga tüvede kasvatamine fermenteeritaval söötmel viib ρ^- või ρ^0 , ehk defektse mitokondriaalse DNA-ga või puuduva mitokondriaalse DNA-ga rakkude tekkimiseni. Mittefermenteeritaval söötmel aga mitokondriaalne DNA säilib Irc3 deletsiooniga tüvedes. Samaaegselt tõuseb Irc3 deletsiooni tagajärjena spetsiifiliste kaksikahelaste katkete arv mitokondriaalses genoomis (Sedman *et al.*, 2014). *In vitro* katsetest on teada, et Irc3 on kaksikahelase DNA poolt stimuleeritud helikaas, mis vajab tööks ATP hüdrolüüsi energiat. Irc3 on oluliselt paremini stimuleeritud *Holliday* ja replikatsioonikahvli meenutavate struktuuride poolt, mis võib viidata tema olulisele rollile seisma jäänud replikatsioonikahvlite regressioonis ja homoloogilises rekombinatsioonis *Holliday* struktuuri migratsioonis. Samuti võib Irc3-1 olla oluline irregulaarsete hargnenud DNA molekulide tekkimist takistav funktsioon (Gaidutšik *et al.*, 2016). Bakteriaalne valk RecG, kuhu on lisatud mitokondrisse transpordi signaal suudab osaliselt komplementeerida Irc3 deletsiooni fenotüüpi, seega on võimalik, et Irc3 täidab sarnast bioloogilist funktsiooni (Gaidutšik *et al.*, 2016).

EKSPERIMENTAALNE OSA

2. Materjalid ja meetodika

2.1 Töö eesmärgid

Töö eesmärgid olid:

1. Puhastada rekombinantne Irc3 helikaas kasutades *E. coli* BL21 CodonPlus RIL rakke ja pGEX4(TEV)-Irc3(Δ 28) plasmidi.
2. Välja töötada Irc3 ATPaasi mõõtmise meetodika.
3. Analüüsida Irc3 oligomerisatsiooni lahuses ja DNA kofaktoril.

2.2.1 Bakteritüved ja plasmiidid

Nimetus	Päritolu
<i>E. coli</i> BL21 CodonPlus RIL	Agilent Technologies (<i>E. coli</i> B F ⁻ ompT hsdS(rB – mB –) dcm ⁺ Tetr gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr])
pGEX4(TEV)-Irc3(Δ 28)	Valmistatud J. Sedmani poolt
pGEX4(TEV)-K65A-Irc3(Δ 28)	Valmistatud I. Gaidutšiku poolt

2.2.2 Söötmed ja kasvutingimused

Söötme nimetus	Koostis
LB	1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1,5% agar
M9Ca	0,5% kasaminohaped; 0,4% glükoos; 2 μ M MgSO ₄ ; 0,1 μ M CaCl ₂ ; 1,28% Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O; 0,3% KH ₂ PO ₄ ; 0,05% NaCl; 0,01% NH ₄ Cl

2.2.3 Lahused

Lahuse nimetus	Koostis
STE	10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M NaCl, 1mM EDTA pH 7.5
LB	50 mM Tris-MES pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Tween 20, 10% glütserool
SB	50 mM Tris-MES pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 0.1% Tween 20, 10% glütserool, 1mM DTT, lisatud <i>ex tempore</i>

H	50 mM Tris-MES pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% glütserool, 1mM DTT lisatud <i>ex tempore</i>
5x AB	50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM kaaliumglutamaat, 5 mM MgCl ₂
Irc3 DB	50 mM Tris-MES pH 7.5, 500 mM kaaliumglutamaat, 0.1 mM EDTA, 0.1% Tween 20, 10% glütserool, 1 mM DTT
5x G	150 mM Tris-MES pH 7.5, 750 mM naatriumglutamaat, 35 mM MgCl ₂
STOP-lahus	2 mM KH ₂ PO ₄ , 0.036% (v/v) Hcl, 0.8% (w/v) Norit A 100 mesh aktiivsüsi
5x SDS	125 mM Tris-HCl pH 6.8, 250 mM DTT, 10% SDS, 0.5% broomfenoolsinine, 25% glütserool
EB	50 mM Tris-MES pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Tween 20, 10% glütserool

2.2.4 Reaktiivid

Reaktiivi nimetus	Päritolu
Lüsotsüüm	AppliChem
Glutatioon-agarooos	Glutathione Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare)
Glutatioon	AppliChem
Sulfopropüül-agarooos	Pharmacia S Sepharose Fast Flow
Hepariin-agarooos	HiTrap Heparin HP 5ml
Norit A 100 mesh aktiivsüsi	Aldrich Chemical Company Inc
[³² P]-ATP	Hartmann Analytic
OPTIHASE HISAFE 3	Perkin Elmer

2.2.5 Oligonukleotiidid

Oligonukleotiidi nimetus	Järjestus 5'-3'
1058	AGCTACCATGCCTGCCTCAAGAATTCG TAATATGCCTACACTGGAGTACCGGAG CATCGTCGTGACTGGGAAAAC
1118	GTTTTCCCAGTCACGACGATGCTCCGG TACTCCAGTGTAGGCATATTACGAATTC TTGAGGCAGGCATGGTAGCT
RFSO1	GTCGGATCCTCTAGACAGCTCCATGAT CACTGGCACTGGTAGAATTCGGC
RFSO2	CAACGTCATAGACGATTACATTGCTACA TGGAGCTGTCTAGAGGATCCGA

2.3 Rekombinantse Irc3 valgu puhastamine

2.3.1 *E. coli* BL21 CodonPlus RIL rakkude transformatsioon

E. coli BL21 CodonPlus RIL kompetentsed rakud valmistati CaCl₂ protokolliga I. Gaidutšiku poolt. Selleks eelkasvatatud *E. coli* BL21 CodonPlus RIL rakkud hoiti 20 min 100 mM CaCl₂ lahuses jääl, tsentrifuugiti 3 min 6000 rpm (2400 x g) (Eppendorf Minispin, Sigma Aldrich), resuspendeeriti 100 mM CaCl₂, 20% glütserool lahuses, külmutati vedelas lämmastikus ja hoiti -80 °C juures. Kompetentseid *E. coli* BL21 CodonPlus RIL rakud transformeeriti pGEX4(TEV)-Irc3(Δ28) plasmiidiga. Selleks segati kokku jääl 30 µl kompetentsete rakkude suspensiooni ja 0,5 µl pGEX4(TEV)-Irc3(Δ28) plasmidi lahust kontsentratsiooniga 100 ng/µl, segati õrnalt ja jäeti 30-ks minutiks seisma 0 °C juures. Seejärel tehti rakkudele kuumašokk – 2 min 37 °C juures. Pärast kuumašokki jahutati rakkude suspensioon jääl, lisati 500 µl LB söödet, mis sisaldas täiendavalt 20 mM MgSO₄ ja 0,8% Glükoos ning inkubeeriti 30 min 37 °C juures. Seejärel külvati 100 µl rakkude suspensiooni selektiivsele tardsöötmele LB + 100µg/ml Amp, 25µg/ml Cam ning kasvatati üleöö 37 °C juures.

2.3.2 Irc3 valgu ekspressioon

Tardsöötmele kasvatatud *E. coli* BL21 CodonPlus RIL pGEX4(TEV)-Irc3(Δ28) kolooniade hulgast valiti üks ja sellega inokuleeriti 3 ml LB (Amp 100 µg/ml, Cam 50 µg/ml) vedelkultuur, mida kasvatati loksutil 180 rpm 37 °C juures. Seejärel lahjendati kultuur 5 liitrise M9Ca söötmesse (Amp 100µg/ml, Cam 25µg/ml), nii et peale üleöö 30 °C loksutil kasvatamist oleks kultuuri tihedus OD₆₀₀ = 0,75. Pooldumise ajaks arvestati 60 min. Soovitud kultuuritiheduse saavutamiseks indutseeriti Irc3 ekspressioon IPTG lisamisega 0,2 mM lõppkontsentratsioonini. Peale induktsiooni kasvatati rakke veel 6 h. Rakud koguti

tsentrifuugimisega 10 min 5000 rpm (3000 x g) Sorvall RC5B Plus tsentrifuugis (rootor GS3) 4 °C juures. Rakud resuspendeeriti 10 ml STE puhvril (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M NaCl, 1mM EDTA pH 7.5), jagati nelja 50ml tuubi ja tsentrifuugiti uuesti kasutades Hettich Universal 32R tsentrifuugi (rootor 1617 swing-out) 4 °C 3500 rpm (1780 x g) 15 min. Supernatant eemaldati, rakud külmutati vedelas lämmastikus ja hoiti -80 °C juures puhastamiseni.

2.3.3 Rakkude lüüs ja valkude segu eelfraktsioneerimine ammoniumsulfaadiga

Kui pole märgitud teisiti viidi kõik valgupuhastuse etapid läbi 4 °C juures ja igast puhastamise etapist võeti 20 µl proov, mis analüüsiti hiljem, SDS-PAGE analüüsiga (peatükk 2.3.8). Rakumass sulatati jääl ja suspendeeriti 20 ml lüüsipuhvril (LB), mis sisaldas 50 mM Tris-MES pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Tween 20, 10% glütserooli ja kuhu lisati 1 mM PMSF *ex tempore*. Seejärel lisati lüütsüüm lõppkontsentratsioonini 2 mg/ml ja hoiti rakkude suspensiooni jääl 30 min. Pärast lüütsüümitöötlust lisati lõppkontsentratsioonideni 25 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 1 mM DTT ja 0,00125 µg/ml DnaasI. Rakkude suspensiooni hoiti veel 20 min ja seejärel sonikeeriti 3 x 20 s 50% võimsusega Bandelin Sonopuls HD2070 sonikaatoriga (60W). Sonikeeritud rakulüsaat tsentrifuugiti Sorvall RC5B Plus (rootor SS34) 20 min 12000 rpm (17000 x g) 4 °C. Supernatant eraldati sademest ja lisati järk-järgult magnetsegajal segades 30% küllastumiskontsentratsioonini ammoniumsulfaati. Seejärel tsentrifuugiti Sorvall RC5B Plus (rootor SS34) 12000 rpm (17000 x g) 4 °C 20 min. Saadud supernatandile lisati ammoniumsulfaati nagu eelmises punktis, aga seekord kuni 60% küllastumiskontsentratsioonini ja tsentrifuugiti Sorvall RC5B Plus (rootor SS34) 12000 rpm (17000 x g) 4 °C 20 min, supernatant eemaldati ja sadelahustati 5 ml LB-s.

2.3.4 Glutatioon-agaros kromatograafia Puhastamiseks võeti 0,4 ml 50% glutatioon agarooši suspensiooni 1 liitri algse kultuuri kohta (Glutathione Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare). Maatriksit pesti kaks korda kahekordse suspensiooni ruumalaga ddH₂O-ga ja kaks korda kahe ruumala LB-ga, iga pesu järel tsentrifuugiti suspensiooni 1 min 1000 rpm (150 x g) 4 °C juures Hettich Universal 32R (rootor 1617 swing-out) ning supernatant eemaldati. Seejärel lisati ettevalmistatud glutatioon agarooši suspensioon eelmises peatükis sadestatud ja LB-s lahustatud valkude proovi. Järgnevalt segati suspensiooni end over-end segajal (Bio RS-24, Biosan) 2 h 4 °C juures. Seejärel valati suspensioon plastikkoloni kesta sisse (Bio Rad Poly-Prep ® 10 ml) ja lasti puhvril koos maatriksile mitteseotud valkudega läbi voolata. Maatriksit pesti kahekümne maatriksi ruumala elueerimispuhvriga (EB) (50 mM Tris-MES pH 7.5, 300

mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Tween 20, 10% glütserool), kuhu oli lisatud 1mM DTT *ex tempore*. Seejärel elueeriti kolonnile seondunud valgud kolme ruumalaga EB-ga, mis sisaldas 10mM glutatiooni (AppliChem). Maatriksit pesti korduvaks kasutamiseks kümnekordse ruumalaga ddH₂O ja kümnekordse ruumalaga 20% etanool ja säilitati 20%-ses etanooli lahuses. Fraktsioonide valgusisaldust hinnati SDS-PAGE analüüsi kasutades.

2.3.5 Rekombinantse valgu lõikamine Tev proteaasiga

GST- Δ 28 Irc3 rekombinantse valgu GST osa eemaldamiseks lisati kokkusegatud valgufraktsioonidele Tev proteaasi (A.Liiv) lõppkontsentratsioonini 0,033 μ g/ml ja DTT lõppkontsentratsioonini 1 mM ning inkubeeriti üleöö jääl.

2.3.6 Sulfopropüül-agaros kationvahetuskromatograafia

1-1,5 ml Sulfopropüül-agaros maatriksit (Pharmacia S Sepharose Fast Flow) pakiti tühja kolonni kesta (Bio Rad Poly-Prep® 10 ml) ning pesti kümne kolonni ruumalaga ddH₂O, nelja kolonni ruumalaga SB₁₀₀₀ (SB + 1 M NaCl), kümne kolonni ruumalaga SB₁₀₀ (SB + 100 mM NaCl). Valgu preparaati lahjendati puhvriga SB NaCl lõppkontsentratsioonini 100 mM ja kanti kolonnile. Kolonni pesti nelja kolonni ruumalaga puhvriga SB₁₀₀ (SB + 100 mM NaCl) ja nelja kolonni ruumalaga puhvriga SB₂₀₀ (SB + 200 mM NaCl) ning seejärel elueeriti Irc3 maatriksilt 1 ml puhvriga SB₃₅₀ (SB + 350 mM NaCl), kogudes 200 μ l fraktsioonid ja 1,4 ml puhvriga SB₄₅₀ (SB + 450 mM NaCl). Peale elueerimist pesti kolonni ühe kolonni ruumalaga puhvriga SB₁₀₀₀ (SB + 1 M NaCl) et eemaldada kõik kolonnile kinni jäänud valgud. Edasiseks puhastamiseks võeti enim Δ 28 Irc3 valku sisaldavad fraktsioonid, mis tehti kindlaks SDS PAGE meetodiga.

2.3.7 Heparin-agaros kromatograafia

Kõik antud etapis kasutatud puhvrid filtreeriti vahetult enne tööd läbi 0,22 μ m membraanfiltrit (Millipore Durapore 0.22 μ m GV) ja degaseeriti vaakumpumbaga (Buchi). Heparin-agarosi kolonn (HiTrap Heparin HP 5ml) paigutatati ÄKTA süsteemi (GE ÄKTAprime plus) ja pesti kümne kolonni ruumalaga ddH₂O või seni kui juhtivuse sensoril saavutatakse null signaali. Seejärel tasakaalustati kolonn puhvriga H₃₀₀ (H + 300 mM NaCl), kuni juhtivus stabiliseerus täielikult. Järgnevalt segati kokku suure kontsentratsiooniga Δ 28 Irc3 valku sisaldavad fraktsioonid, mis olid kogutud eelmises etapis ja lahjendati puhvriga H NaCl lõppkontsentratsioonini 300 mM. Lahjendatud preparaati filtreeriti läbi 0,22 μ m membraanfiltrit (Minisart SRP4) ja kanti kolonnile (HiTrap Heparin HP 5ml). Seejärel pesti kolonni puhvriga H₃₀₀ (H + 300 mM NaCl) kuni juhtivuse stabiliseerimiseni ja rakendati

kolonnile 50 ml mahuga gradient H_{300} -st kuni H_{2000} ($H + 300 \text{ mM} - 2 \text{ M NaCl}$). $\Delta 28$ Irc3 sisaldavad fraktsioonid tulid välja piigina 800-850 mM NaCl juures. Fraktsioonid korjati ja analüüsiti SDS PAGE meetodiga (2.3.8). Kõrgema kontsentratsiooniga ja lisanditest puhtamad fraktsioonid segati kokku, alikvooditi 5 μl kaupa, külmutati vedelas lämmastikus ja hoiti $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ juures. Töö lõpus pesti kolonn (HiTrap Heparin HP 5ml) kümne kolonni ruumala ddH₂O ja viie kolonni ruumala 20% etanooliga, eemaldati ÄKTA masinast ja hoiti suletuna ruumi temperatuuri juures.

2.3.8 SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforees (SDS-PAGE)

Valgualanüüsideks kasutati 10% polüakrüülamiid (akrüülamiid/bisakrüülamiidgeeli) geeli (standartse protokoll järgi (Schägger, 2006)). Proovid denatureeriti SDS puhvis (25 mM Tris-Cl pH 6.8, 50 mM DTT, 2% SDS, 0.1% broomfenoolsinine, 5% glütserool) $95 \text{ }^\circ\text{C}$ juures 5 min. Elektroforees toimus toatemperatuuril 10-13 V/cm umbes 3 tundi. Foreesipuhvrina kasutati SDS puhvrit (0.4 M glütsiin, 50mM Tris-Cl, 0.1% SDS). Proovide visualiseerimiseks värviti geele Coomassie värvilahusega (25% etanool, 7% äädikhape, 2,5mg/ml Coomassie Brilliant Blue R-250) 5 min $95 \text{ }^\circ\text{C}$ ning pesti 2 korda 10 min $95 \text{ }^\circ\text{C}$ värviemalduslahusega (25% etanool, 7% äädikhape). Suurusmarkerina kasutati 14.4-116 kDa Fermentas Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas #SM0431).

2.3.9 Irc3 kontsentratsiooni määramine

Valgu kontsentratsiooni määramiseks mõõdeti preparaadi neelduvust λ_{280} juures NanoDrop2000c UV-Vis spektrofotomeetriga. Kasutades Nanodrop2000 tarkvara ja ExPASy ProtParam programmiga $\Delta 28$ Irc3 aminohappelise järjestuse järgi arvutatud ekstinktsioonikoeffitsenti, määrati $\Delta 28$ Irc3 kontsentratsioon.

2.4 Irc3 ATPasse aktiivsuse mõõtmine

2.4.1 DNA kofaktori valmistamine

Irc3 ATPasse aktiivsuse määramiseks valmistati erineva pikkusega ja struktuuriga DNA kofaktorid. Selleks segati kokku vastavad (1058 ja 1118, RFSO1 ja RFSO2) (tabel 2.2.5) sünteetilised üheaahelalised DNA ahelad. Reaktsioonisegu (50 μl) koosneb: 5 μl 100 mM vastavaid oligonukleotiidide, 10 μl 5x AB (annealing buffer) koostisega 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM kaaliumglutamaat, 5 mM MgCl₂) ning 30 μl ddH₂O. Valmis reaktsioonisegu inkubeeriti 5 min $95 \text{ }^\circ\text{C}$ juures ja jahutati seejärel termoblokkide vahel toatemperatuurini. Valmis substraati säilitati $4 \text{ }^\circ\text{C}$ juures ja kasutati maksimaalselt ühe nädala jooksul.

2.4.2 ATPaasse aktiivsuse määramine

Kõikide lahuste kokkusegamine toimub jää peal. Irc3 lahjendati 340 nM kontsentratsioonini lahjenduspuhvris (Irc3 DB), koostisega: 50 mM Tris-MES pH 7.5, 500 mM kaaliumglutamaat, 0.1 mM EDTA, 0.1% Tween 20, 10% glütserool, 1 mM DTT. Reaktsioon viidi läbi 20 µl ruumalaga segus järgmise koostisega: 150 mM kaaliumglutamaat, 7 mM MgCl₂, 30 mM Tris-MES pH 7.5, 2 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 15-1000 nM DNA kofaktorit, 8.5-68 nM Δ28 Irc3 valku, 5 mM ATP segu ja 40000-60000 cpm [γ32P]-ATP-d (Hartmann Analytic 50µCi/µl). Kõik komponendid peale ATP segati kokku, arvestades 18 µl ruumala reaktsiooni kohta ja eelsoojendati 37 °C juures 5 min. Eelinkubatsiooni ajal võeti välja null proovid, 18 µl üldisest reaktsioonisegust ja 2 µl 50 mM ATP/[γ32P]-ATP segust ning lisati 150 µl stopp-lahusesse (2 mM KH₂PO₄, 0.036% (v/v) HCl, 0.8% (w/v) Norit A 100 mesh aktiivsüsi (Aldrich Chemical Company Inc). Kui eelinkubatsioon oli lõppenud, lisati 2 µl 50 mM ATP/[γ32P]-ATP segu üldsegusse iga arvestatud mõõtepunkti kohta, et saavutada lõppkontsentratsiooniks 5 mM ATP. Reaktsioone inkubeeriti 37 °C juures 0 s, 80 s, 160 s, 240 s ja igal ajamomendil võeti üldreaktsioonisegust 20 µl proov ja lisati see 150 µl stopp lahusesse. Peatatud proove segati 20 min väristajas Eppendorf Mixer 5432. Seejärel tsentrifugeeriti 2 min 14000 rpm (16000 x g) (Eppendorf Centrifuge 5415c). 100 µl supernatanti eemaldati ning lisati uuesti 150 µl stopp-lahusesse ja korrati eelpool kirjeldatud väristamise ja tsentrifugeerimise etappe. Peale teist tsentrifugeerimist võeti proovist 160 µl supernatanti ja tsentrifugeeriti eelpool kasutatud tsentrifugeeriga veel 2 min samadel tingimustel. Seejärel võeti 150 µl supernatanti ning lisati 5 ml-sse stsintillatsiooni vedelikku (OPTIHASE HISAFE 3, Perkin Elmer) ning analüüsiti stsintillatsiooni loendajas (Liquid scintillation analyzer TriCarb 2800 TR, Perkin Elmer). Sarnaselt oli mõõdetud summaarne isotoobi hulk proovi kohta. Sõega adsorbeerimisel seotakse sinna külge lahuses olevad nukleotiidid ja lahusesse jääb vaid ATP hüdroolüüsil vabanev radioaktiivse monofosfaat. Teades et alguses oli reaktsioonisegust 5 mM ATP ja sellele vastas näiteks 60000 impulssi (mõõdetakse täpsemalt võttes 20 µl proovi üldreaktsioonisegust otse stsintillatsiooni vedelikku, kui kõik teised proovid on juba võetud) [γ32P]-ATP, võime leida kui suur osa ATP-st oli ära kasutatud valgust poolt ajahihikus, ehk ATP hüdroolüüsi kiiruse. Kõiki ATPaasse aktiivsuse määramise katseid korrati vähemalt kolm korda.

2.5 Irc3 sedimentatsioonanalüüs

2.5.1 Glütserooli gradiendi parameetrite valik

Puhastatud Irc3 proovid lahjendati 5x G lahjenduspuhvris (150 mM Tris-MES pH 7.5, 750

mM naatriumglutamaat, 35 mM MgCl₂) nii et lõppkontsentratsioonid oleks 30 mM Tris-MES pH 7.5, 150 mM naatriumglutamaat, 7 mM MgCl₂, 100 nM Irc3 ja lõppmaht oleks 100 µl (kokku umbes 735 ng valku). Lahjendatud proovid kanti 5 ml lineaarsele 15-30% glütserooligradiendile, mis peale glütserooli sisaldas 30 mM Tris-MES pH 7.5, 150 mM naatriumglutamaat, 7 mM MgCl₂. Samadele gradientidele kanti markeritena ka 500 µg karboonanhüdraasi (Bovine Erythrocyte, Sigma) ja 500 µg BSA-d (Sigma, Fraction V). Proove tsentrifugeeriti ultratsentrifuugis Optima L-90K (rootor SW-55) 45000 rpm (245000 x g) 20 h, 4 °C. Gradiendid fraktsioneeriti 150 µl suurusteks proovideks ja analüüsiti hõbedaga värvimise (2.5.2) või Coomassie Brilliant Blue R-250 värvilahusega (peatükk 2.3.8). Lisaks koguti ka tsentrifugeerimistopside põhja kogunenud võimalik sade, loputades tsentrifugeerimistuubi 40 µl puhvriga (30 mM Tris-MES pH 7.5, 150 mM naatriumglutamaat, 7 mM MgCl₂, 0.1% SDS).

2.5.2 Glütserooli gradiendi tulemuste analüüs

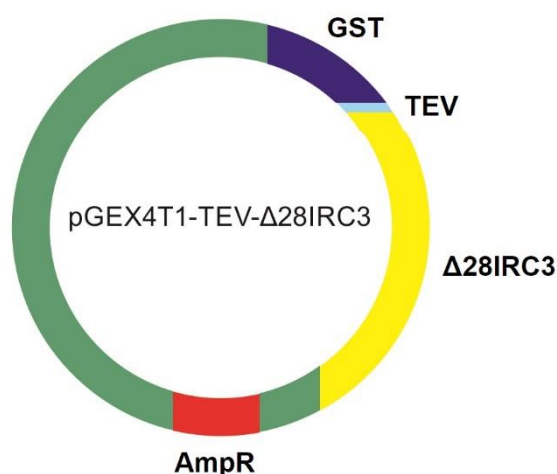
Eelmises etapis kogutud fraktsioonidest võeti 20 µl proovid ja lisati 5 µl 5x SDS puhvrit (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 250 mM DTT, 10% SDS, 0.5% broomfenoolsinine, 25% glütserool). Proove kuumutati 95 °C juures 5 min. Elektroforees toimus toatemperatuuril 10-13 V/cm umbes 3 tundi. Foresipuhvrina kasutati SDS puhvrit (0.4 M glütsiin, 50mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS). Edaspidi toimus markervalkude analüüs nagu peatükis 2.3.8, Irc3 aga analüüsiti hõbedaga värvimise meetodiga, sest tema kontsentratsioon fraktsioonides on madal. Selleks leotati proove sisaldavaid geele üleöö fikseerivas puhvril (50% etanool, 10% äädikhape, 0.05% formaldehüüd). Hommikul pesti geele kolm korda 20 min 50% etanooliga. Seejärel hoiti täpselt 2 min 0,2 mg/ml Na₂S₂O₃ lahuses ja pesti 3x 20 s ddH₂O-ga. Järgnevalt inkubeeriti geele 30 min 2 mg/ml AgNO₃ lahuses ja pesti veelkord 3x 20 s ddH₂O-ga. Seejärel hoiti geele ilmutavas lahuses (0.06 g/ml Na₂CO₃, 4 µg/ml Na₂S₂O₃, 0.05% formaldehüüd) 30 min või seni kui tekkis selgelt eristatav signaal. Seejärel geelid neutraliseeriti 5% äädikhapega ja säilitati lahuses, mis sisaldas 50% etanooli, 10% äädikhapet.

3. Tulemused

3.1 Irc3 puhastamine

3.1.1 Irc3 ekspressiooni konstruktsioon, transformatsioon ja kasvatamine

Irc3 biokeemiliste omaduste analüüsiks on vaja saada piisava kontsentratsiooniga ja puhtusega valgu preparaati, mida endogeenselt allikast lähtudes on väga raske saavutada. Hinnanguliselt on Irc3 valku vaid 26 molekuli igas rakus (Kulak *et al.*, 2014). Seetõttu puhastasime Irc3 helikaasi *E. coli* BL21 CodonPlus RIL pGEX4(TEV)-Irc3(Δ 28) rakkudest. Puhastamiseks valmistati Tev lõikesaidiga konstruktsioon, mis erineb meie laboris algselt kasutatud trombiini lõikesaidiga konstruktsioonist. (Joonis 5). Vastav plasmiid oli konstrueeritud J. Sedmani poolt. Antud töö käigus töötati välja uus Irc3 puhastamise protokoll, mis erineb algselt kasutatud protokollist ja millega saavutatakse rekombinantse Irc3 helikaasi kõrge puhtusaste ja stabiilselt kõrge saagis.

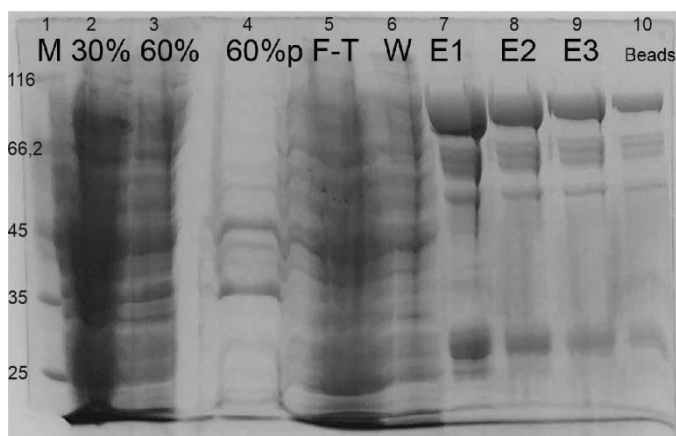


Joonis 5: Joonisel on kujutatud Irc3 ekspressiooniks kasutatud plasmiid, selle olulisemad osad on GST (Glutatiooni S-transferaas), TEV – Tev proteaasi lõikesait ENLYFQ/S ja Δ 28 IRC3 geen (deleteeritud mitokondri transpordisignaal).

pGEX4(TEV)-Irc3(Δ 28) konstruktsioon transformeeriti *E. coli* BL21 CodonPlus RIL tüvesse, selekteeriti ja kasvatati 30 °C juures 5 l vedelas M9Ca (Amp 100 μ g/ml, Cam 25 μ g/ml) söötmes kuni OD₆₀₀ = 0,75. Seejärel indutseeriti Irc3 ekspressioon 0,2 mM IPTG lisamisega ja kasvatati 6h 30 °C juures. Rakud koguti tsentrifuugimisega, külmutati vedelas lämmastikus ja hoiti -80 °C juures vastavalt osas 2.3.2 kirjeldatule. Tüüpiliselt saadi kasvatamise tulemusel 2-3 grammi rakke 5 liitrist kultuurist (peatükid 2.3.1-2.3.2).

3.1.2 Rakkude lüüs, valkude sadestamine ja Glutatioon-agarooosi kolonn

E. coli BL21 CodonPlus RIL rakud sulatati jääl ja töödeldi lütsotsüümiga 300 mM NaCl sisaldavas LB puhvril, membraanid lõhuti sonikeerimisega. Mittelahustuv materjal eemaldati tsentrifuugimisega. Puhastamise erinevate etappide proovid analüüsiti SDS-PAGE abil (peatükk 2.3.7) ja tulemused on esitatud joonisel 6. Esmalt sadestati valgud lisades ammooniumsulfaati kuni 30% küllastumiskontsentratsioonist. Sadenenud valkudest võeti proov ja eemaldati (Joonis 6, rada 2), varasematest katsetest oli teada, et selles fraktsioonis GST- Δ 28Irc3 liitvalku ei sisaldu (publitseerimata andmed). Järgnevalt tõsteti ammooniumsulfaadi kontsentratsiooni 60% küllastumiskontsentratsioonist, millega Irc3 sadenes (Joonis 6, rada 3) (publitseerimata andmed). Joonise 6 rajal 4 on 60% ammooniumsulfaadi küllastumiskontsentratsioonist mittesadenenud valgud (Joonis 6, rada 4). Valkude sade lahustati 300 mM NaCl sisaldavas LB puhvril ja kanti GST agarooosi kolonnile. Kõik kolonnile mittekinnitunud valgud eemaldati pesemisega LB puhvril abil (Joonis 6, rada 6) ja GST- Δ 28Irc3 liitvalk elueeriti 10 mM glutatiooniga (EB + 10 mM glutatioon) (Joonis 6, rajad 7-9), mis konkurentselt seostub liitvalgu GST osaga. Joonise 6 rajal 10 on peale elueerimist kolonni maatriksi külge jäänud valgud (Joonis 6, rada 10). Vastav protokoll on kirjeldatud peatükis 2.3.3-2.3.4.

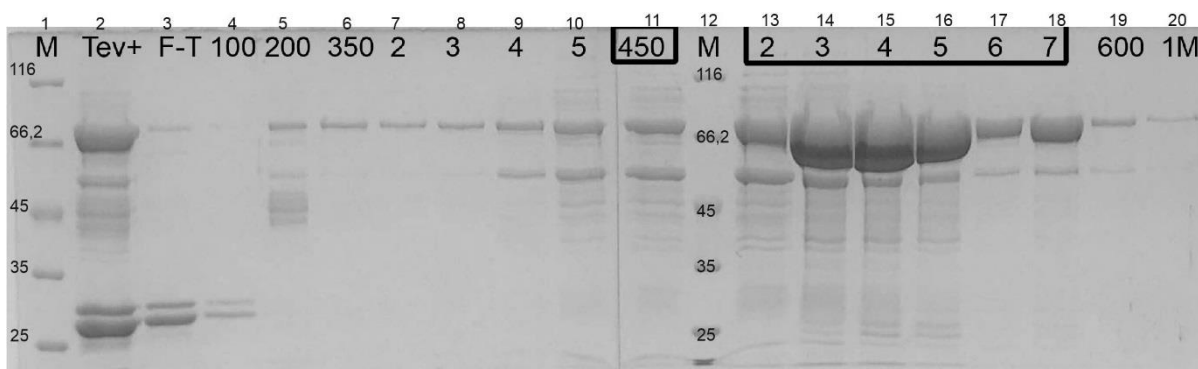


Joonis 6: Irc3 puhastamine glutatioon-agarooosil. Rada 1, marker (#SM0431); rada 2, 30% ammooniumsulfaadi sade; rada 3, 60% ammooniumsulfaadi sade; rada 4 60% ammooniumsulfaadi supernatant; rada 5, Glutatioon-agarooosi kolonni läbivool; rada 6, Glutatioon-agarooosi kolonni pesu; rajad 7-9, kolm järjestikust GST- Δ 28Irc3 elueerimise fraktsiooni; rada 10, maatriksi külge jäänud valgud.

3.1.3 GST- Δ 28Irc3 liitvalgu lõikamine ja Sulfopropüül-agarooosi kolonn

GST- Δ 28Irc3 liitvalku sisaldavad fraktsioonid (Joonis 6, rajad 7-9) segati kokku ja lõigati üleöö Tev proteaasiga jää peal (0,033 μ g/ml Tev, 1 mM DTT) (Joonis 7, rada 2). Seejärel

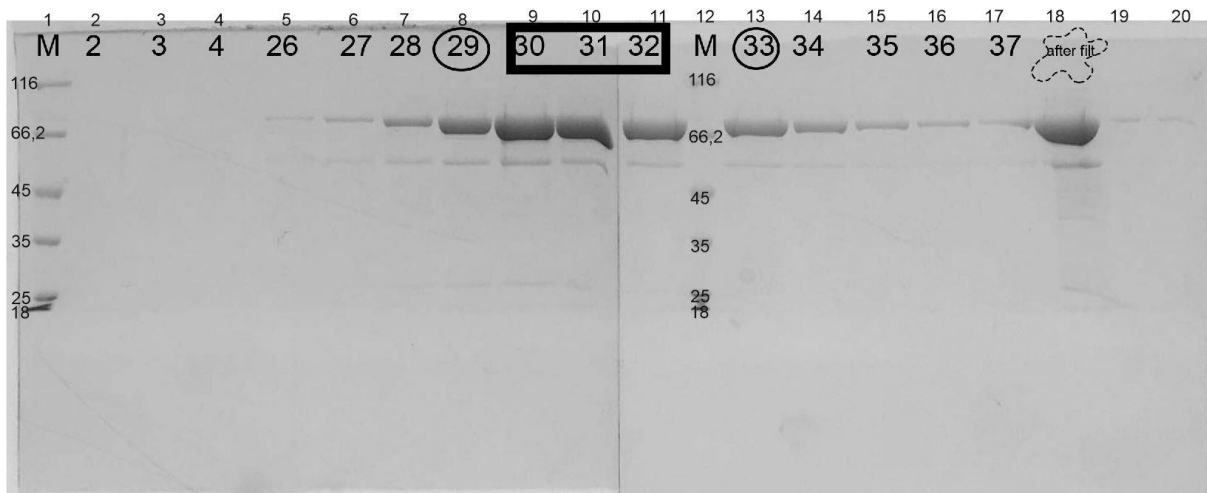
lahjendati SB₀ puhvriga 100 mM NaCl kontsentratsioonini ja kanti eelnevalt 4 °C juures ettevalmistatud Sulfopropüül-agaroos kolonnile (Joonis 7, rada 3). Sulfopropüül-agaroosi kolonni maatriksit pesti 4 kolonniruumalaga 100 mM NaCl sisaldava SB puhvriga (Joonis 7, rada 4), siis veel 4 kolonniruumalaga 200 mM NaCl sisaldava SB puhvriga (Joonis 7, rada 5) ja seejärel elueeriti 5x 200 µl 350 mM NaCl (Joonis 7, rajad 6-10) ja 7x 200 µl 450 mM NaCl (Joonis 7, rajad 11 ja 13-18) sisaldavate SB puhvritega. Ülejäänud valgud eemaldati 600 mM (Joonis 7, rada 19) ja 1 M NaCl (Joonis 7, rada 20) sisaldavate SB puhvritega pesemisega. Joonise 7 radadel 1 ja 12 on marker (#SM0431). Katse protokoll on kirjeldatud peatükis 2.3.5-2.3.6.



Joonis 7: Irc3 puhastamine Sulfopropüül-agaroosil. Rada 1, marker (#SM0431); rada 2, Tev proteaasiga lõigatud GST- Δ 28Irc3; rada 3, kolonni läbivool; rada 4, 100 mM NaCl sisaldava SB puhvri kolonni pesu; rada 5, 200 mM NaCl sisaldava SB puhvriga kolonni pesu; rajad 6-10, 350 mM NaCl sisaldava SB puhvriga elueerimise fraktsioonid; rajad 11 ja 13-18, seitse 450 mM NaCl sisaldava SB puhvri elutsiooni; rada 12, marker (#SM0431); rada 19, 600 mM NaCl sisaldava SB kolonni pesu; rada 20, 1 M NaCl sisaldava SB puhvri pesu. Musta raamiga on tähistatud järgmises etapis kasutatud fraktsioonid.

3.1.4 Hepariin-agaroos kromatograafia

Eelmises etapis väljavalitud Δ 28Irc3 fraktsioonid segati kokku ja lahjendati H₀ puhvriga kuni 300 mM NaCl kontsentratsioonini. Saadud preparaat filtreeriti läbi 0,22 µm filtri ja kanti ettevalmistatud HiTrap Heparin HP 5ml kolonnile, mis oli paigutatud ÄKTAprime plus masinasse. Pesti 300 mM NaCl sisaldava H puhvriga ja siis elueeriti 300 mM – 2000 mM NaCl sisaldavas gradiendis H puhvriga. Δ 28Irc3 elueerus H puhvril umbes 800-850 mM NaCl juures (peatükk 2.3.7). Piiki ja sellele külgnevaid fraktsioone analüüsiti täiendavalt SDS-PAGE abil (peatükk 2.3.8) ja tulemused on esitatud joonisel 8.



Joonis 8: Irc3 fraktsioneerimine Hepariin-agarosil. Rada 1, marker (#SM0431); rajad 2-4, tühjad fraktsioonid; rajad 5-11, 13-17 ja 19-20, $\Delta 28$ Irc3 piik koos kõrvalfraktsioonidega; rada 12, marker (#SM0431); rada 18, kontrollproov peale valgupreparaadi filtreerimist. Ruuduga ja ringiga on tähistatud kaks kokkusegatud fraktsioonide preparaati, mis on kokkusegatud ja alikvooditud eraldi.

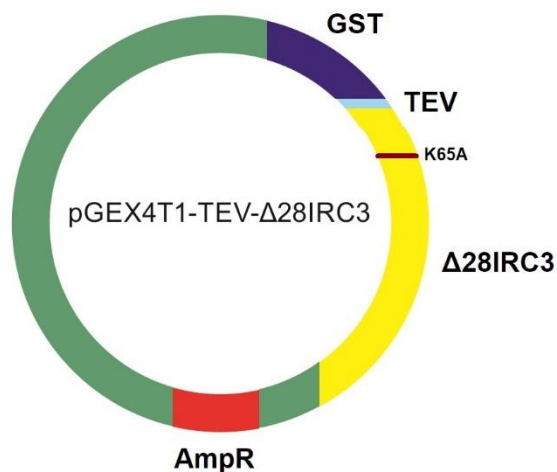
Kui valku sisaldavad fraktsioonid olid leitud ja analüüsitud, segati neid kokku vastavalt puhtusele ja kontsentratsioonile. Irc3 puhastatud alikvoodid külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures.

3.1.5 Valgu kontsentratsiooni määramine

Valgu kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati proovi λ_{280} neelduvuse mõõtmist. Neelduvus arvutati ümber kontsentratsiooniks kasutades Nanodrop2000 tarkvara ja ExpASy ProtParam arvutatud Irc3 valgu ekstinktsioonikoefitsienti 64800 ja teades et $\Delta 28$ Irc3 mass on 75434 Da. Taustaks kasutati puhastamisel kasutatud H puhvreid, segades neid kokku 850 mM NaCl saavutamiseks. Puhastamisel saadud kaks $\Delta 28$ Irc3 preparaati sisaldasid valku 524 ng/ μl (6,96 μM) ja lahjemat 320 ng/ μl (4,25 μM). Kokku saadi umbes 1 mg valku viiest liitrist kultuurist.

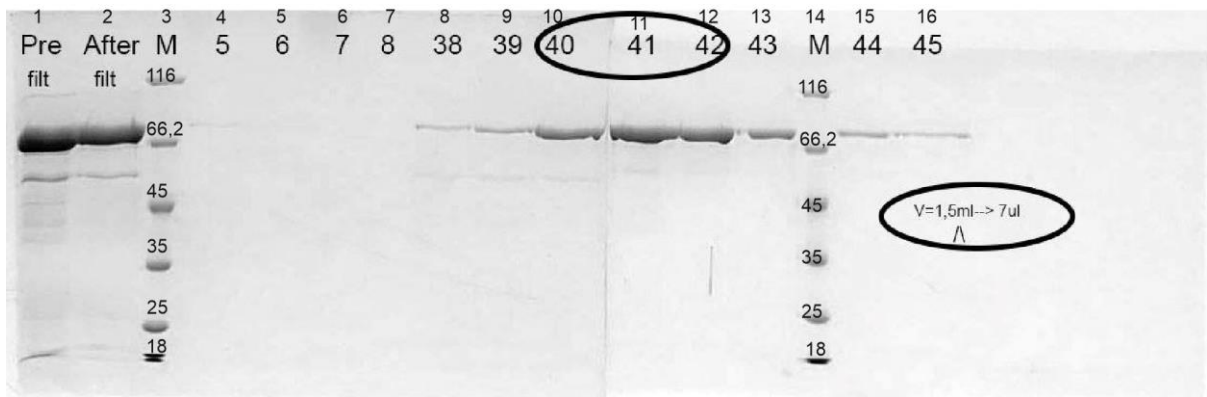
3.2 K65A mutatsiooniga Irc3 puhastamine

Motiiv I mutatsiooniga valgu ekspressioonikonstrukti oli konstrueeritud I. Gaidutšiku poolt, 65 positsioonis asuv funktsionaalne lüsiin on asendatudalaniiniga (Joonis 9). Niisuguse mutatsiooniga Irc3 ei ole võimeline hüdrolyüsima ATP-d. (Sedman *et al.*, 2014).



Joonis 9: Joonisel on kujutatud Irc3 ekspressiooniks kasutatud plasmiid, selle olulisemad osad on GST (Glutatiooni S-transferaas), TEV – Tev proteaasi lõikesait ENLYFQ\S ja Δ28 IRC3 geen (deleteeritud mitokondri transpordisignaal). Δ28 IRC3 geeni peal on märgitud K65A mutatsioon, kus lüsiini koodon AAG on asendatudalaniiniga GCT.

K65A-Δ28Irc3 puhastamine toimus sama moodi nagu kirjeldatud Δ28Irc3 puhastamine peatükkides 2.3 ja 3.1. Tulemusena näitan SDS-PAGE geeli pildi peale Heparin-agaros kromatograafiat (Joonis 10). Esimesel rajal on K65A-Δ28Irc3 valgu proov enne filtreerimist läbi 22 μm filtri; teisel rajal, K65A-Δ28Irc3 valgu proov peale filtreerimist läbi 22 μm filtri; kolmandal rajal, marker (#SM0431); radadel 4 kuni 7 on kontrollfraktsioonid; radadel 8 kuni 13 ja 15 kuni 16 on K65A-Δ28Irc3 piik koos kõrvalfraktsioonidega; rajal 14 on marker (#SM0431).



Joonis 10: K65A-Irc3 fraktsioneerimine Hepariin-agarosil. Rada 1, K65A- Δ 28Irc3 proov enne filtreerimist; rada 2, K65A- Δ 28Irc3 valgu proov peale filtreerimist; rada 3, marker (#SM0431); rajad 4-7, kontrollfraktsioonid; rajad 8-13 ja 15-16, K65A- Δ 28Irc3 piik koos kõrvalfraktsioonidega; rada 14, marker (#SM0431). Ringiga on märgitud alikvooditud fraktsioonid.

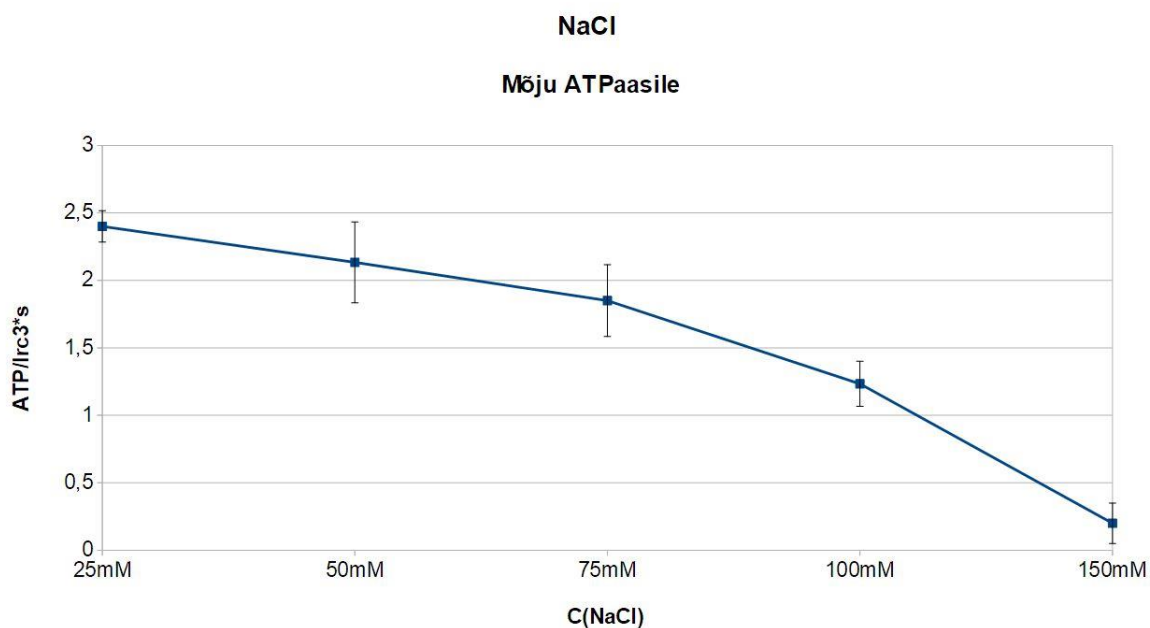
K65A- Δ 28Irc3 valgu kontsentratsiooni mõõdeti nagu peatükkis 3.1.5. Puhastatud K65A- Δ 28Irc3 preparaadi kontsentratsiooniks saadi 225 ng/ μ l (3 μ M). Kokku saadi umbes 330 μ g valku lähtudes viiest liitrist kultuurist.

3.3 Irc3 ATPaasi aktiivsuse testsüsteem

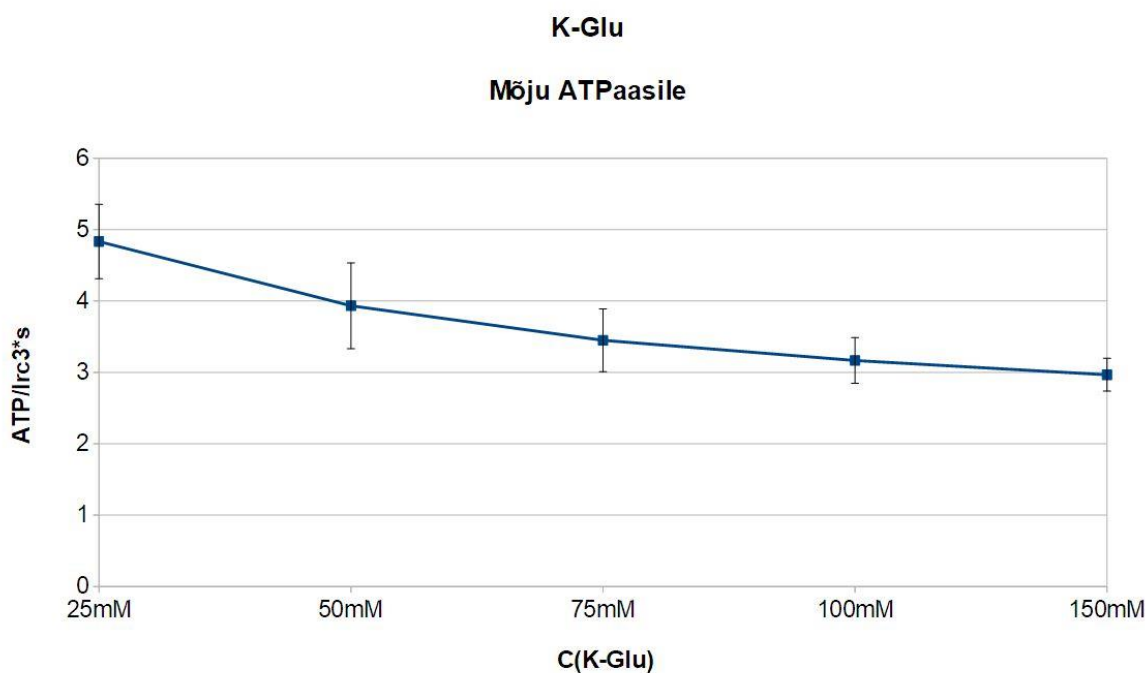
3.3.1 Irc3 ATPaasi reaktsiooni parameetrite valik

3.3.1.1 Soolade mõju Irc3 ATPaasi aktiivsusele

Selleks, et analüüsida soolade mõju Irc3 ATPaasi aktiivsusele viisime läbi reaktsioonid kasutades kofaktorina lineariseeritud pRS416 plasmidi (saadud J.Sedmani käest). Reaktsioonisegu sisaldas: 7 mM MgCl₂, 30 mM Tris-MES pH 7.5, 2 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 2.5 ng/ μ l pRS416(lin.), 34 nM Δ 28 Irc3. Reaktsioonides testiti kahte erinevat soola, NaCl, kaaliumglutamaat ja varieeriti nende kontsentratsiooni 25 mM - 150 mM. Reaktsioonisegu eelinkubeeriti 37 °C juures 5 min ja starditi ATP lisamisega. Kasutati ATP-d lõppkontsentratsiooniga 0.1 mM, ja 40000-60000 cpm [γ 32P]-ATP reaktsiooni kohta. Proovid võeti järgnevatel ajahetketel: 0 s, 150 s, 300 s, 600 s. Väljavõetud reaktsioonid peatati aktiivsöe stopplahusega (2.4.2). Mitteseotud radioaktiivse fosfaadi hulk määrati stsintsillatsiooniloendajat kasutades (Liquid scintillation analyzer TriCarb 2800 TR, Perkin Elmer). Tulemused arvutati ümber EXEL-i kasutades ja esitati graafikuna, kus Y-teljel on ühe Irc3 molekuli kohta hüdrolüüsitud ATP molekulide arv sekundis ja X-teljel soola kontsentratsioon reaktsioonis (Joonis 11-12).



Joonis 11: Joonisel on kujutatud Irc3 ATPaasse aktiivsuse sõltuvus NaCl kontsentratsioonist. Y-teljel on ühe Irc3 molekuli kohta hüdrolüüsitud ATP molekulide arv sekundis ja X-teljel soola kontsentratsioon reaktsioonis.



Joonis 12: Joonisel on kujutatud Irc3 ATPaasse aktiivsuse sõltuvus kaaliumglutamaadi kontsentratsioonist. Y-teljel on ühe Irc3 molekuli kohta hüdrolüüsitud ATP molekulide arv sekundis ja X-teljel soola kontsentratsioon reaktsioonis.

Minimaalsete soola kontsentratsioonide juures 25 mM NaCl ja 25 mM kaaliumglutamaat, suudab Irc3 kaaliumglutamaadi sisaldavas puhvril hüdrolüüsida peaaegu 5 ATP molekuli sekundis, NaCl sisaldavas puhvril suudab aga Irc3 hüdrolüüsida vaid umbes 2,5 ATP

molekuli sekundis. Soola kontsentratsioonide tõstes Irc3 ATP hüdrolyütiline aktiivsus langeb ja aktiivsuse langus on palju järsem NaCl sisaldavas puhvril, langedes peaaegu nulli 150 mM NaCl juures. Kaaliumglutamaadis on aga aktiivsuse langus soola kontsentratsiooni tõstmisega palju aeglasem ja 150 mM kaaliumglutamaadi juures suudab veel üks molekul Irc3-e hüdrolyüsida umbes 3 ATP molekuli sekundis. Seega kaaliumglutamaadi sisaldavas puhvril on Irc3 aktiivsus oluliselt kõrgem kui NaCl puhvril. *In vivo* mitokondris olevate tingimustele kõige lähedasemaks võib lugeda 135-140 mM ühevalentse soola kontsentratsiooni (Baron *et al.*, 2005), kõrgemat soola kontsentratsiooni on vaja ka valgu stabiliseerimiseks lahuses. Arvestades neid seisukohti ja ka seda, et 150 mM kaaliumglutamaadi juures aktiivsus oli stabiilselt hästi mõõdetav, valisime just 150 mM kaaliumglutamaadi edaspidiste katsete läbiviimiseks.

3.3.1.2 DNA kofaktorite valmistamine

Antud töös kasutati 1058 ja 1118, RFSO1 ja RFSO2 oligonukleotiide (tabel 2.2.5). Spetsiifiliselt disainitud sünteetilised oligod lahjendati puhvril (100 mM kaaliumglutamaat, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM MgCl₂), kuumutati 5 min 95 °C juures ja jahutati aeglaselt toatemperatuurini (Gaidutšik *et al.*, 2016). Oligotest 1058 ja 1118 saadi 65 bp pikkusega lineaarne kaksikahelaline DNA molekul ja RFSO1 ja RFSO2 oligotest 50 bp pikkusega Y kujuga DNA molekul (Joonis 13). Saadud kofaktoreid säilitati 4 °C juures ja kasutati ühe nädala jooksul.

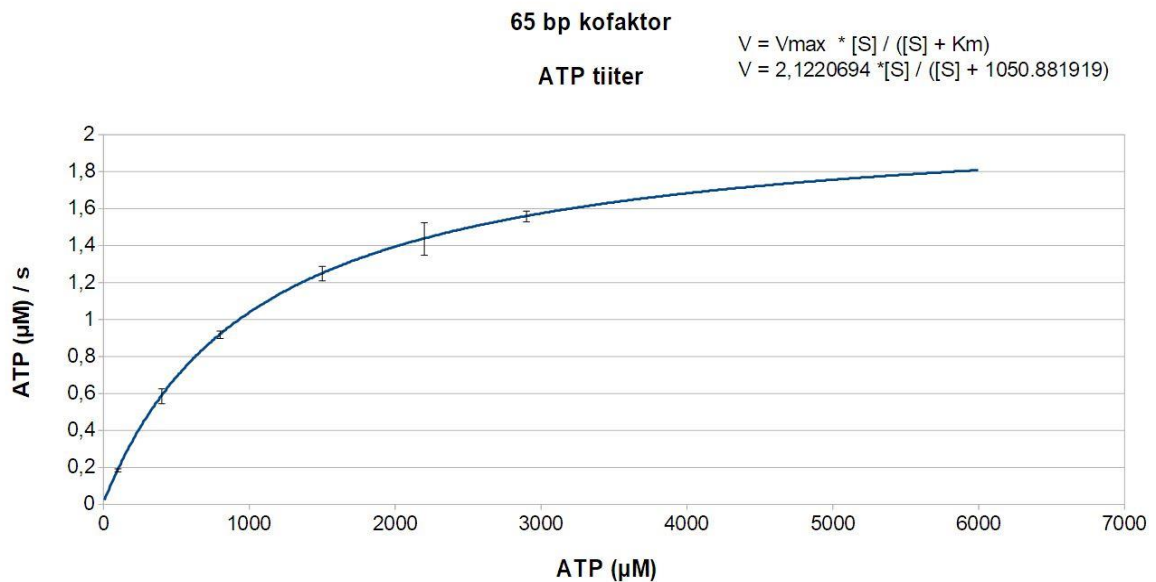


Joonis 13: Joonisel on kujutatud 1058 ja 1118 oligonukleotiidide kokkusulatamisel 65 bp pikkune lineaarne produkt ja oligonukleotiidide RFSO1 ja RFSO2 kokkusulatamisel saadud Y-kujuline produkt.

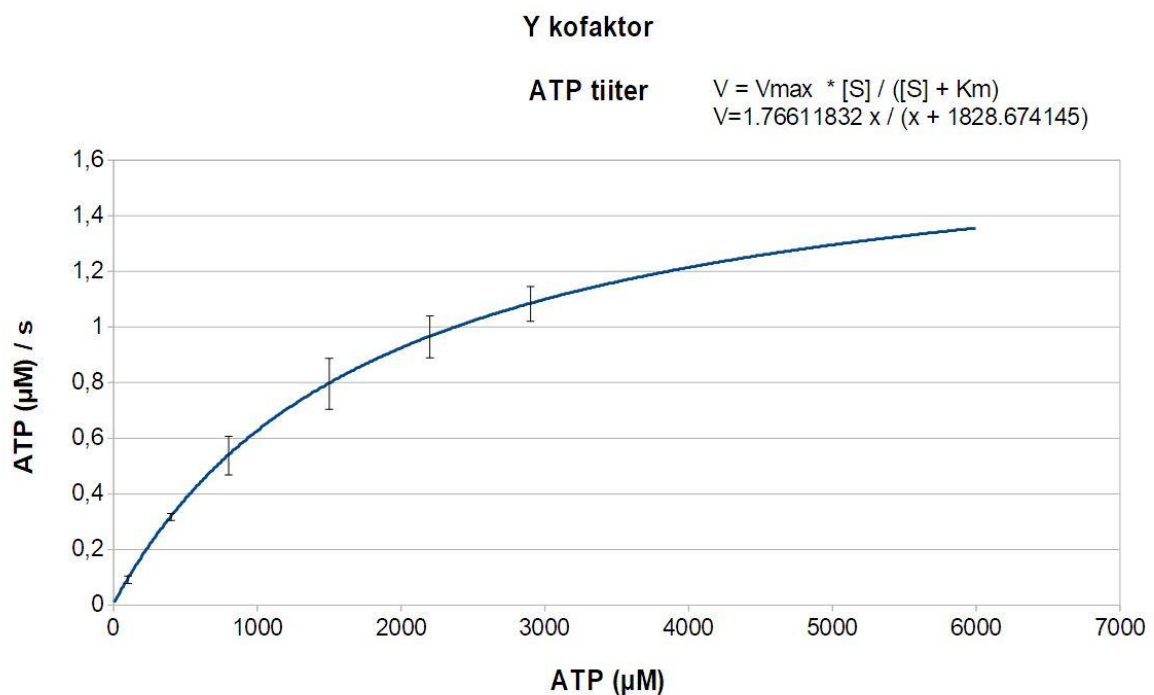
3.3.1.3 ATP kontsentratsiooni mõju Irc3 ensümaatilisele aktiivsusele

Reaktsioonid segati kokku nagu kirjeldatud peatükis 2.4.2. Kofaktorina kasutati 65 bp pikkusega lineaarset DNA molekuli ja 50 bp pikkusega Y kujuga DNA molekuli, neid valmistati peatükis 3.3.1 kirjeldatud protokoll järgi, sulatades kokku sünteetilisi oligonukleotiide 1058 ja 1118, RFSO1 ja RFSO2 (Joonis 13). Reaktsioonisegu sisaldas: 7 mM MgCl₂, 30 mM Tris-MES pH 7.5, 2 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 200 nM vastavat DNA kofaktorit, 34 nM Δ28 Irc3. Reaktsioonid starditi erineva ATP hulgaga: 100 μM, 400 μM, 800 μM, 1500 μM, 2200 μM, 2900 μM ja töödeldi nagu peatükis 2.4.2.

Tulemusi sobitati mittelineaarse regressioonivõrrandiga ja joonistati graafik, kus Y-teljel on ühe Irc3 molekuli kohta hüdrolüüsitud ATP molekulide arv sekundis ja X-teljel ATP kontsentratsioon reaktsioonis (Joonis 14-15)



Joonis 14: Joonisel on kujutatud Irc3 ATPasse aktiivsuse sõltuvus ATP kontsentratsioonist 65 bp pikkuse kofaktori juuresolekul. Y-teljel on hüdrolüüsitud ATP molekulide arv sekundis ja X-teljel ATP kontsentratsioon reaktsioonis. On antud regressiooni kõvera valem ja sellele vastav Michaelis-Menteni võrrand.



Joonis 15: Joonisel on kujutatud Irc3 ATPasse aktiivsuse sõltuvus ATP kontsentratsioonist Y kujulisel kofaktoril. Y-teljel on hüdrolüüsitud ATP molekulide arv sekundis ja X-teljel ATP kontsentratsioon reaktsioonis. On antud regressiooni kõvera valem ja sellele vastav Michaelis-Menteni võrrand.

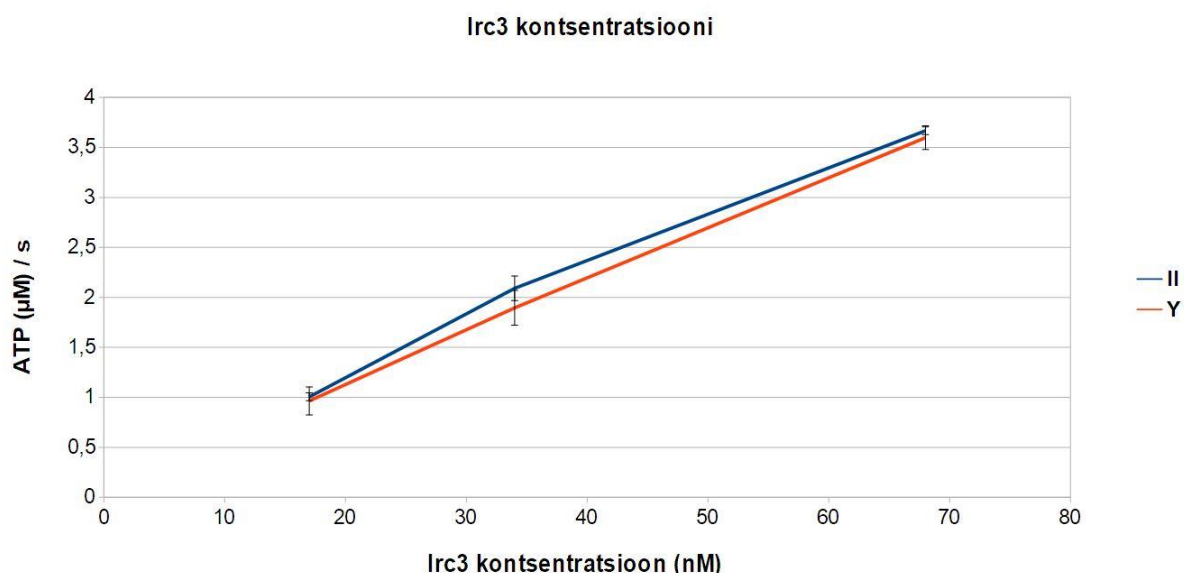
Selgus et lineaarsel kofaktoril on Irc3-me Km 1051 μM ja Vmax 2,12 $\mu\text{M/s}$, Y-kujulisel aga Km 1829 μM ja Vmax 1,77 $\mu\text{M/s}$. Edaspidisteks katseteks valiti 5000 μM ATP kontsentratsioon.

3.3.3 Irc3 oligomerisatsioon kofaktori juuresolekul

- Uurisime Irc3 aktiivse vormi oligomerisatsiooni astet. Selleks proovisime leida lineaarsest erinevat seost Irc3 kontsentratsiooni tõstmisel. Kui toimub oligomeriseerumine ja aktiivne on monomeerist erinev Irc3 vorm, siis valgu kontsentratsiooni tõstmisel peab ATPaasne aktiivsus kasvama mittelineaarselt (3.3.3.1).
- Proovisime segada kokku aktiivset ja mutatsiooniga inaktiveeritud Irc3 valke. Kui toimub oligomeriseerumine siis võib oodata Irc3 aktiivsuse langust mutantse Irc3 sissetiitrimisel (3.3.3.2).

3.3.3.1 Kooperatiivsus Irc3 ATPaasi reaktsioonis

Irc3 ATPaasi mõõtmise reaktsioonid segati kokku nagu kirjeldatud peatükis 2.4.2. Kofaktorina kasutati 65 bp pikkusega lineaarset molekuli ja 50 bp pikkusega Y kujuga molekuli, neid valmistati peatükis 3.3.1 kirjeldatud protokoll järgi, sulatates kokku sünteetilisi oligonukleotiide 1058 ja 1118, RFSO1 ja RFSO2 (Joonis 13). Reaktsioonisegu sisaldas: 7 mM MgCl_2 , 30 mM Tris-MES pH 7.5, 2 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 200 nM vastavat DNA kofaktorit, 5 mM ATP ja $[\gamma^{32}\text{P}]$ -ATP 60000 impulssi reaktsiooni kohta. Reaktsioonis varieeriti Irc3 kontsentratsiooni: 17 nM, 34 nM ja 68 nM. Aktiivsust mõõdeti nagu kirjeldatud peatükis 2.4.2. Tulemused arvatati ümber EXEL-is ning on esitatud graafikuna kus X-teljel on Irc3 kontsentratsioon ja Y-teljel hüdrolüüsitud ATP molekulide arv sekundis (Joonis 16).



Joonis 16: Joonisel on kujutatud Irc3 ATPaasse aktiivsuse sõltuvus Irc3 kontsentratsioonist Y kujulisel kofaktoril (punane) ja 65 bp lineaarsel kofaktoril (sinine). Y-teljel on hüdrolüüsitud ATP molekulide arv sekundis ja X-teljel Irc3 kontsentratsioon reaktsioonis.

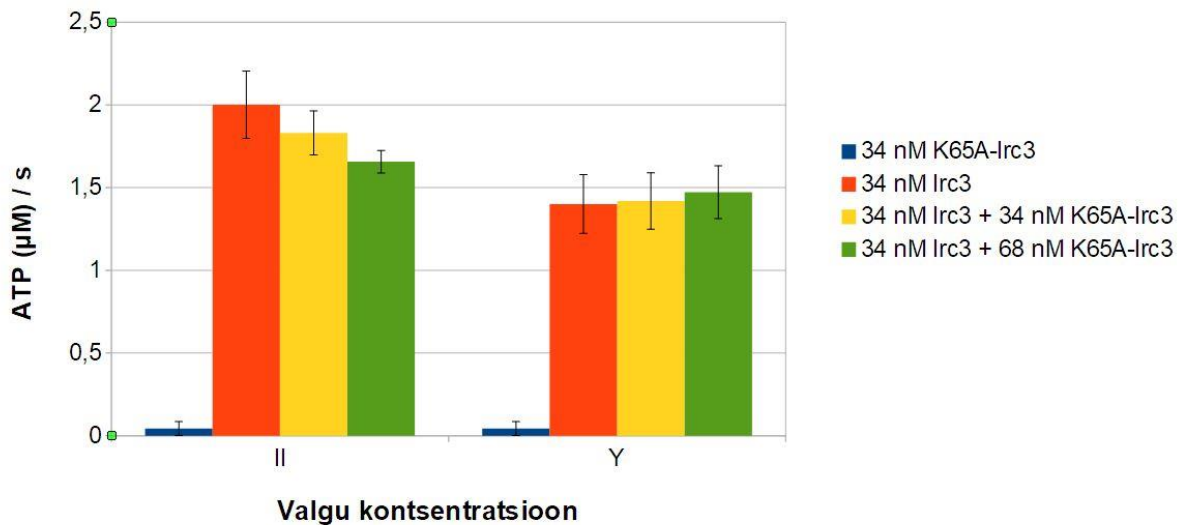
Nagu analüüs näitab, tõuseb reaktsioonis ATPaasne aktiivsus 17 nM Irc3 kontsentratsioonil olevast umbes 1 µM ATP sekundis kuni 2 µM ATP sekundis 34 nM Irc3 kontsentratsioonil. Edasi kasvab ATPaasne aktiivsus kuni umbes 3,5 µM ATP sekundis 68 nM Irc3 kontsentratsioonil. Seega, Irc3 kontsentratsiooni tõstes tõuseb ATPaasi kiirus algul lineaarselt. 68 nM Irc3 juures kiirus oli oodatavast natuke väiksem, aga see on arvatavasti tingitud kofaktori või substraadi puudusest. Järelikult, Irc3 käitub monomeersele valgule omase mudeli järgi.

3.3.3.2 K65A Irc3 mõju aktiivsusele

Irc3 ATPaasi mõõtmise reaktsioonid segati kokku ja analüüsiti nagu kirjeldatud eelmises peatükis. Kofaktoritena kasutati 65 bp pikkusega lineaarset DNA molekuli ja 50 bp pikkusega Y kujuga DNA molekuli. Reaktsioonis varieeriti Irc3 ja Irc3 K65A mutandi kontsentratsiooni. Mõõdeti ATPaasne aktiivsus: 34 nM Irc3, 34 nM K65A-Irc3, 34 nM Irc3 + 34 nM K65A-Irc3, 34 nM Irc3 + 68 nM K65A-Irc3. Tulemused on esitatud tulpdiagrammina, kus X-teljel on valgu või valkude segu kontsentratsioon ja Y-teljel hüdrolüüsitud ATP molekulide arv sekundis (Joonis 17).

K65A mutandi mõju

ATPaasile



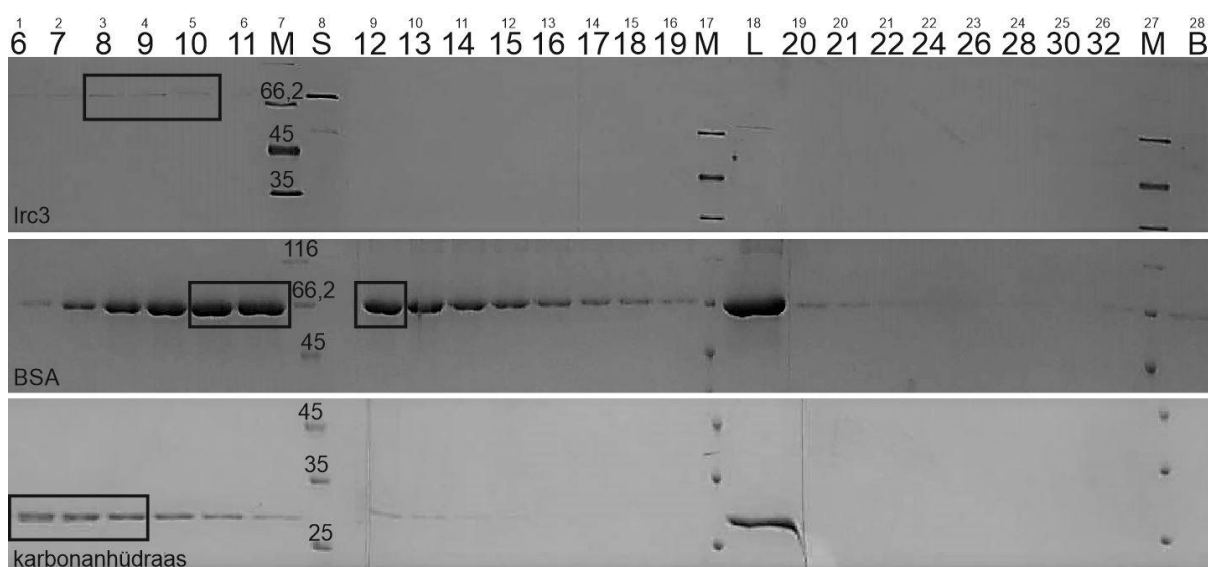
Joonis 17: Joonisel on kujutatud Irc3 ATPaasse aktiivsuse sõltuvus funktsionaalse Irc3-le lisatud K65A-Irc3 kontsentratsioonist. Esimene tulpade rühm tähistab 65 bp lineaarsel kofaktoril mõõdetud tulemusi. Teine tulpade rühm tähistab Y kujulisel kofaktoril mõõdetud tulemusi. Sinise värviga on tähistatud 34 nM K65A-Irc3, punasega 34 nM Irc3, kollasega 34 nM Irc3 + 34 nM K65A-Irc3, rohelisega 34 nM Irc3 + 68 nM K65A-Irc3. Y-teljel on hüdrolüüsitud ATP molekulide arv sekundis.

Analüüsitulemustest võib näha, et K65A-Irc3-l ATPaasne aktiivsus puudub. Lineaarsel kofaktoril hüdrolüüsis 34 nM Irc3 umbes 2 µM ATP-d, see arv langes umbes 1,8 µM ATP sekundis kui oli 34 nM Irc3-le lisatud 34 nM K65A-Irc3 ja kui lisati 68 nM K65A-Irc3 aktiivsus langes 1,6 µM ATP sekundis. Y-kujulisel kofaktoril 34 nM Irc3 hüdrolüüsis umbes 1,4 µM ATP-d ja see arv suurenes 1,5 µM ATP sekundis kui oli 34 nM Irc3-le lisatud 34 nM K65A-Irc3, kui aga 34 nM Irc3-le lisati 68 nM K65A-Irc3 ATPaasne aktiivsus jäi samuti 1,5 µM ATP sekundis juures. Katsest järeldati, et ATPaasi inaktiveeriva K65A mutatsiooniga Irc3 on tõepoolest inaktiivne. Mutandi lisamine funktsionaalse Irc3 segusse mõjutab ATPaasi vähe või ei mõjuta üldse ja mõju suurus ei ole piisav, selleks et arvata aktiivse ja inaktiivse Irc3 oligomeriseerumist kofaktoril. Nähtud efekt on ilmselt tingitud kofaktori kättesaadavuse halvenemisega, sest K65A mutandil esineb kofaktori sidumise aktiivsus.

Kahest kofaktoril Irc3 oligomerisatsiooni uurivast katsest võib järeldada, et oligomeriseerumist ei toimu ja Irc3 on aktiivne monomeerina. Aga need katsed ei ole võimelised eristama juhtu, kui Irc3 esineb lahuses algusest peale stabiilse dimeerina. Selleks teostati järgnev gradiendi katse.

3.3.3 Irc3 oligomerisatsioon lahuses

Selleks et uurida, kas Irc3 on monomeer mitte ainult ATP hüdrolüüsamise ajal kofaktoril vaid ka lahuses, analüüsiti puhastatud Irc3 preparaati 15-30% glütserooli gradiendil (2.5.1). Selleks lahjendati Irc3 ja markervalgud (BSA, karbonanhüdraas) puhvril 150 mM naatriumglutamaat, 7 mM MgCl₂, 30 mM Tris-MES pH 7.5 ja kanti ettevalmistatud gradiendile. Selleks et uurida oligomerisatsiooni just meie ATPaasi reaktsioonile võimalikult lähedastes tingimustes, kasutati Irc3 kontsentratsiooni 100 nM ja gradiendile kanti kokku umbes 735 ng valku. Markervalke võeti niipalju, et neid oleks mugav detekteerida, ehk umbes 500 µg gradiendi kohta. Tsentrifugimine toimus 45000 rpm (245000 x g) Optima L-90K (rootor SW-55) 20 h 4 °C juures. Gradiendid fraktsioneeriti 150 µl proovideks ja analüüsiti SDS-PAGE kasutades (2.3.8). Visualiseerimiseks kasutati hõbedaga värvimise meetodit Irc3 puhul ja Coomassie Brilliant Blue R-250 värvilahust markervalkude puhul (Joonis 18).



Joonis 18: Joonisel on kujutatud gradiendi analüüsi pildid, ülemine on Irc3 (78.5 kDa), keskmine BSA (66.2 kDa) ja alumine karbonanhüdraas (29 kDa). Numbritega on tähistatud fraktsioonid alustades pinnapealsest. Radadel 1-6 on fraktsioonid numbritega 6-11; radadel 9-16 on fraktsioonid 12-19; radadel 19-26 on fraktsioonid 20-32; radadel 7, 17 ja 27 on M tähega tähistatud marker (#SM0431); rajal 8 on S tähega tähistatud lahjendamata valgu proov Irc3 puhul ja markervalkudel seda pole; rajal 18 on L tähega tähistatud lahjendatud valgu proov; rajal 28 on B tähega tähistatud tsentrifugimisanuma põhja pesufraktsioon. Ruuduga on tähistatud piik koos kahe külgneva fraktsiooniga.

Esimene markervalk, BSA, sedimenteerus 15-30% glütserooli gradiendis laia piigiga fraktsioonides 6-11, 12-19 ja 20-22 (Joonis 18, rajad 1-6, 9-16, 19-21). Kõige enam BSA-d

sisaldavad fraktsioonid on 10, 11 ja 12 (Joonis 18, rajad 5, 6, 9). Teine markervalk, karbonanhüdraas, sedimenteerus fraktsioonides 6-11, 12-14 (Joonis 18, rajad 1-6, 9-11) ja kõige enam karbonanhüdraasi sisaldavad fraktsioonid on 6, 7 ja 8 (Joonis 18, rajad 1-3). Irc3 sedimenteerus 15-30% glütserooli gradiendi fraktsioonides 6-11 (Joonis 18, rajad 1-6) ja kõige enam Irc3 sisaldavad fraktsioonid on 8, 9 ja 10 (Joonis 18, rajad 3-5). Oluline on ka tsentrifuugimisanuma põhja pesufraktsioonis B signaali puudumine (Joonis 18, rada 28).

Selgus et Irc3 liigub gradiendis sarnaselt BSA-ga, mis on sarnase massiga ja kindlalt monomeerne valk. Tsentrifuugimisanuma põhja pesufraktsioonis puudub Irc3, seega 150 mM ühevalentse soola kontsentratsiooni juures on 100 nM Irc3 täielikult lahustunud kujul.

Tulemuseks järeldan, et Irc3 on monomeerne nii lahuses kui ka DNA kofaktori peal ATP hüdrolüüsamise ajal.

Arutelu

Töö eesmärgiks oli välja töötada Irc3 puhastusprotokoll, mis võimaldaks oluliselt vabaneda lisanditest, analüüsida Irc3 ATPaasse reaktsiooni statsionaarse faasi kineetikat ja vastata küsimusele, mis on ensümaatilisel aktiivne Irc3 vorm.

Eesmärgi täitmiseks puhastasin Irc3 ja ATPaasi inaktiveeriva mutatsiooniga Irc3 mutandi kasutades kolme kolonni: glutatioon-agaroosi, sulfopropüül-agaroosi ja hepariin-agaroosi. Tulemusena saadi piisava puhtusega Irc3 preparaadid. Lisandite eemaldamiseks osutus edukaks hepariinil põhinev kromatograafia. Ehkki testisime lisaks veel erinevaid geelfiltratsiooni ja ionvahetuskromatograafiaid, osutus hepariin ainukeseks, millel saavutasime olulise Irc3 puhastamise efekti võrreldes eelnevalt rakendatud kaheetapilise puhastamisprotokolliga (Sedman *et al.*, 2014).

Järgnevalt analüüsisin Irc3 ATP hüdrolüütilist aktiivsust kasutades statsionaarse faasi kineetika mõõtmist. Selle töö tulemusel määrasin reaktsiooni kineetilised parameetrid V_{max} ja K_m ATP suhtes. Nende parameetrite teadmine on vajalik katsete läbiviimisel, kus ATP kontsentratsioon ei tohi kiirust limiteerida. Irc3 ATPaasi reaktsiooni K_m väärtus on suhteliselt kõrge (1 mM suurusjärgus), See võib tähendada, et mitokondrites füsioloogiliste ATP kontsentratsioonide juures sõltub Irc3 aktiivsus ATP produktsioonist. Ühtlasi tähendab ka selline K_m väärtus, et Irc3-e substraadiga küllastamiseks on vaja vähemalt 5 mM ATP kontsentratsiooni. Teiseks olulise tulemusena selgus, et kaaliumglutamaat mõjutab Irc3 aktiivsust palju vähem kui NaCl, mida senini olime katsesegudes kasutanud. Vastavalt sellele oleme ümber disaininud oma ATPaasi mõõtmisel baseeruvad testsüsteemid.

Antud töös rakendasime väljatöötatud katsetingimusi selleks, et analüüsida Irc3 võimalikku oligomerisatsiooni. Selleks analüüsiti esiteks, kuidas sõltub Irc3 kontsentratsioonist ATPaasi reaktsiooni kiirusest. Monomeerina aktiivse ATPaasi korral peaks Irc3 kontsentratsiooni tõstmisel kaks korda tõusma ka ATPaasi kiirus kaks korda. Kui esineb oodatust suurema poole kallutusi, võib see tähendada, et Irc3 on aktiivne dimeerina. Dimerisatsioon peaks olema kõrgemal valgu kontsentratsioonil soodustatud ja seega peaks aktiivsete dimeeride kontsentratsioon tõusma rohkem kui kaks korda valgu kontsentratsiooni kahekordsel tõstmisel. Irc3 aktiivsust mõõtsime kahe erineva DNA kofaktoriga. Meie katsetes täheldasime ATPaasi eriaktiivsuse mõningast kahanemist lineaarse kofaktori kontsentratsiooni tõustes. Y-kujulise kofaktoriga tõusis ATPaasne aktiivsus võrdeliselt kofaktori hulgaga, mis

on kooskõlas sellega, et Irc3 on aktiivne monomeerse valguna. Niisugune efekt lineaarsel kofaktoril võib olla põhjustatud substraadi puudusest kõrgetel Irc3 kontsentratsioonidel, sest katse ei olnud optimeeritud nii kõrgele Irc3 kontsentratsioonile. Y-kujulisel kofaktoril seda efekti ei näe, sest ATPaasne aktiivsus Y-kujulisel kofaktoril on madalam kui lineaarsel ja substraati piisab.

Teiseks analüüsisime, kuidas mõjutab Irc3 aktiivsust katalüütiliselt inaktiivse mutandi lisamine. Aktiivse Irc3 kontsentratsioon hoiti katseskeemis konstantsena ja sinna tiitriti juurde mutantset Irc3 valku. Kui Irc3 on aktiivne dimeerina ja dimeriseerumine toimub kofaktoril või vahetult enne kofaktorile seondumist, peaksime me nägema Irc3 aktiivsuse langust mutantse Irc3 juurde tiitrimisel, mis oleks põhjustatud inaktiivsete dimeeride moodustumisest. Meie katsetes ei olnud detekteeritav mutantse Irc3 mõju Y-kujulise kofaktori korral, ent lineaarse DNA kofaktoriga reaktsioonis toimus väike ATPaasse aktiivsuse langus. Niisugune efekt võib olla tingitud sellest, et mutantsel Irc3-l säilib kofaktori sidumise võime ja seeläbi ta blokeerib osaliselt aktiivse Irc3-e seondumise kofaktorile.

Seega, mõlemad ATPaasse aktiivsuse mõõtmise seeriad toetasid mudelit, mille kohaselt Irc3-e dimeriseerumist kofaktoril või vahetult enne kofaktorile kinnitumist ei toimu. Need katsed ei välista aga võimalust, et Irc3 on algusest peale lahuses stabiilse dimeerina. Seda võimalust kontrollisime glütserooli gradiendil, kus saadud andmed toetavad mudelit, mille kohaselt on Irc3 lahuses monomeerina. Seega, Irc3 on eeldatavasti monomeerina töötav Superperekonna II ensüüm.

Kokkuvõte

Irc3 on SF2 superperekonda kuuluv helikaas, mis eeldatavasti osaleb seisma jäänud replikatsioonikahvlite regressioonis ja homoloogilises rekombinatsioonis. Irc3 aitab meil mõista DNA parandamise mehhanisme ja laiendada teadmisi mitokondri füsioloogia valdkonnas.

Antud töös leiti, et Irc3 omab füsioloogilistele sarnanevates tingimustes väga, kõrget Km-i ATP suhtes, mis tähendab, et tema aktiivsus sõltub tugevalt ATP kontsentratsioonist mitokondri maatriksis ja sellega ka ATP sünteesi kiirusest. Täiendavalt näitas kineetika analüüs, et Irc3 aktiivsust mõjutavad kriitiliselt lahuses olevad soolad – kaaliumglutamaat toetab palju paremini Irc3 aktiivsust kui kloriidid ja tulevikus tuleks seda kontrollida ka teiste mitokondri DNA metabolismis osalevate valkude analüüsis.

Teine oluline tulemus on seotud Irc3 aktiivse vormi oligomerisatsiooni aste uurimisega ja Irc3 oligomerisatsiooni uurimisega lahuses. Selgus, et kõigis aktiivsuskatsetes käitub Irc3 vastavalt monomeersele mudelile. Valgu kontsentratsiooni tõstmisel ei tuvastatud kontsentratsiooni kooperatiivse mõju nähtusi ja ka inaktiveeritud ATPaasse aktiivsusega mutandi lisamisega ei olnud võimalik inhibeerida funktsionaalset Irc3 süsteemi. Irc3 sedimentatsioonanalüüs näitas, et ka lahuses esineb Irc3 monomeersel kujul.

Catalytically active form of Irc3

Vlad-Julian Piljukov

Summary

Helicases are important players in virtually every aspect of DNA metabolism. Helicases are also important in mitochondrial DNA maintenance. Accumulating evidence suggests that mitochondria and helicases are important in human disease and longevity, so it is critical to understand the biochemistry of helicases in mitochondria.

Here we studied biochemical properties of Irc3 protein, that is a mitochondrial helicase with putative roles in replication fork regression and branch migration of mitochondrial DNA. We found that Irc3 ATPase has a high K_m value which might be important in coupling Irc3 activity to the active synthesis of ATP in mitochondria. Our experiments also revealed, that Irc3 activity is critically dependent on concentration and the type of monovalent salt present in the reaction buffers. While NaCl effectively inhibits Irc3 at concentrations above 150 mM, Irc3 remains active in glutamate containing buffers.

In the second part of our study we examined Irc3 oligomerization. Our findings suggest that Irc3 is active as a monomeric protein, because it showed no positive cooperativity of ATPase activity and protein concentration. In an additional experiment where we tested the effects of adding mutated inactive Irc3 protein on fully functional Irc3 ATPase system, little or no effect on ATPase activity was found, that further supports the notion that Irc3 functions as a monomeric protein during ATPase reaction.

Finally, we tested Irc3 sedimentation in a glycerol gradient and the results indicated that Irc3 is also monomeric in solution.

Therefore, our results suggested that Irc3 is catalytically active as a monomer, which is important for our future studies of Irc3 kinetics.

Tänuavaldused

Soovin tänada kõiki töö valmistamisele kaasa aidanud inimesi: Tiina Sedmani, Ilja Gaidutšiku ja Natalja Garberi. Eriti tahaks tänada minu juhendajat professor Juhan Sedmani, väärtuslikke nõuannete ja suure abi eest!

Kasutatud allikad

- Abdelhaleem, M. (2004). Do human RNA helicases have a role in cancer? *Biochim. Biophys. Acta* 1704, 37–46.
- Abdel-Monem, M., and Hoffmann-Berling, H. (1976). Enzymic unwinding of DNA. 1. Purification and characterization of a DNA-dependent ATPase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 65, 431–440.
- Abdel-Monem, M., Dürwald, H., and Hoffmann-Berling, H. (1976). Enzymic unwinding of DNA. 2. Chain separation by an ATP-dependent DNA unwinding enzyme. *Eur. J. Biochem.* 65, 441–449.
- Alvaro, D., Lisby, M., and Rothstein, R. (2007). Genome-Wide Analysis of Rad52 Foci Reveals Diverse Mechanisms Impacting Recombination. *PLOS Genet.* 3, e228.
- Banroques, J., Doère, M., Dreyfus, M., Linder, P., and Tanner, N.K. (2010). Motif III in superfamily 2 “helicases” helps convert the binding energy of ATP into a high-affinity RNA binding site in the yeast DEAD-box protein Ded1. *J. Mol. Biol.* 396, 949–966.
- Bansbach, C.E., Bétous, R., Lovejoy, C.A., Glick, G.G., and Cortez, D. (2009). The annealing helicase SMARCAL1 maintains genome integrity at stalled replication forks. *Genes Dev.* 23, 2405–2414.
- de la Cruz, J., Kressler, D., and Linder, P. (1999). Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* 24, 192–198.
- Briggs, G.S., Mahdi, A.A., Wen, Q., and Lloyd, R.G. (2005). DNA binding by the substrate specificity (wedge) domain of RecG helicase suggests a role in processivity. *J. Biol. Chem.* 280, 13921–13927.
- Derr, L.K., and Drake, J.W. (1990). Isolation and genetic characterization of new *uvrW* alleles of bacteriophage T4. *Mol. Gen. Genet.* MGG 222, 257–264.
- Derr, L.K., and Kreuzer, K.N. (1990). Expression and function of the *uvrW* gene of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 214, 643–656.
- Dillingham, M.S., Soutanas, P., and 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 Res.* 27, 3310–3317.
- Dimauro, S., and Davidzon, G. (2005). Mitochondrial DNA and disease. *Ann. Med.* 37, 222–232.
- Fairman-Williams, M.E., Guenther, U.-P., and Jankowsky, E. (2010). SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 313–324.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., and Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 440, 325–331.
- Gaidutšik, I., Sedman, T., Sillamaa, S., and Sedman, J. (2016). Irc3 is a mitochondrial DNA branch migration enzyme. *Sci. Rep.* 6, 26414.

- Gorbalenya, A.E., and Koonin, E.V. (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 419–429.
- Hanada, K., and Hickson, I.D. (2007). Molecular genetics of RecQ helicase disorders. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 64, 2306–2322.
- Huh, W.-K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686–691.
- Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Griffith, J.P., Dwyer, M.D., Thomson, J.A., Murcko, M.A., Lin, C., and Caron, P.R. (1998). Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* 6, 89–100.
- Lloyd, R.G., and Buckman, C. (1991). Genetic analysis of the recG locus of *Escherichia coli* K-12 and of its role in recombination and DNA repair. *J. Bacteriol.* 173, 1004–1011.
- Lloyd, R.G., and Rudolph, C.J. (2016). 25 years on and no end in sight: a perspective on the role of RecG protein. *Curr. Genet.* 62, 827–840.
- Lohman, T.M., and Bjornson, K.P. (2003). Mechanisms of Helicase-Catalyzed DNA Unwinding.
- Lou, S., Lamfers, P., McGuire, N., and Boerkoel, C.F. (2002). Longevity in Schimke immuno-osseous dysplasia. *J. Med. Genet.* 39, 922–925.
- Manosas, M., Perumal, S.K., Bianco, P., Ritort, F., Benkovic, S.J., and Croquette, V. (2013). RecG and UvsW catalyse robust DNA rewinding critical for stalled DNA replication fork rescue. *Nat. Commun.* 4.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Curr. Biol.* 16, R551–R560.
- McGlynn, P., Mahdi, A.A., and Lloyd, R.G. (2000). Characterisation of the catalytically active form of RecG helicase. *Nucleic Acids Res.* 28, 2324–2332.
- Nelson, S.W., and Benkovic, S.J. (2007). The T4 Phage UvsW Protein Contains Both DNA Unwinding and Strand Annealing Activities. *J. Biol. Chem.* 282, 407–416.
- Odahara, M., Masuda, Y., Sato, M., Wakazaki, M., Harada, C., Toyooka, K., and Sekine, Y. (2015). RECG maintains plastid and mitochondrial genome stability by suppressing extensive recombination between short dispersed repeats. *PLoS Genet.* 11, e1005080.
- Pause, A., and Sonenberg, N. (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J.* 11, 2643–2654.
- Poole, L.A., and Cortez, D. (2016). SMARCAL1 and telomeres: Replicating the troublesome ends. *Nucl. Austin Tex* 7, 270–274.
- Postow, L., Woo, E.M., Chait, B.T., and Funabiki, H. (2009). Identification of SMARCAL1 as a component of the DNA damage response. *J. Biol. Chem.* 284, 35951–35961.
- Schmidt, O., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: from

- proteomics to functional mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 655–667.
- Schrock, R.D., and Alberts, B. (1996). Processivity of the Gene 41 DNA Helicase at the Bacteriophage T4 DNA Replication Fork. *J. Biol. Chem.* *271*, 16678–16682.
- Sedman, T., Gaidutšik, I., Villemson, K., Hou, Y., and Sedman, J. (2014). Double-stranded DNA-dependent ATPase Irc3p is directly involved in mitochondrial genome maintenance. *Nucleic Acids Res.* *42*, 13214–13227.
- Sengoku, T., Nureki, O., Nakamura, A., Kobayashi, S., and Yokoyama, S. (2006). Structural Basis for RNA Unwinding by the DEAD-Box Protein *Drosophila* Vasa. *Cell* *125*, 287–300.
- Singleton, M.R., Dillingham, M.S., and Wigley, D.B. (2007). Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 23–50.
- Smits, P., Smeitink, J., and van den Heuvel, L. (2010). Mitochondrial Translation and Beyond: Processes Implicated in Combined Oxidative Phosphorylation Deficiencies. *BioMed Res. Int.* *2010*, e737385.
- Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques, J., Doère, M., and Linder, P. (2003). The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol. Cell* *11*, 127–138.
- Tuteja, N., and Tuteja, R. (2004). Prokaryotic and eukaryotic DNA helicases. *Eur. J. Biochem.* *271*, 1835–1848.
- Tzagoloff, A., and Dieckmann, C.L. (1990). PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* *54*, 211–225.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and 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. *EMBO J.* *1*, 945–951.
- Wardrope, L., Okely, E., and Leach, D. (2009). Resolution of joint molecules by RuvABC and RecG following cleavage of the *Escherichia coli* chromosome by EcoKI. *PloS One* *4*, e6542.
- Whitby, M.C., Vincent, S.D., and Lloyd, R.G. (1994). Branch migration of Holliday junctions: identification of RecG protein as a junction specific DNA helicase. *EMBO J.* *13*, 5220–5228.

Lihlitsents

Lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Vlad-Julian Piljukov (sünnikuupäev: 31. märts 1993),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose
"Irc3 katalüütiliselt aktiivne vorm",
mille juhendaja on prof. 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 **31.12.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni.

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

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

Tartus, 31.05.2017