

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

***Saccharomyces cerevisiae* helikaasi Irc3 ekspresseerimine *E.coli* BL 21 RIL
tüvedes ja puhastatud valgu funktsionaalne analüüs**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Mihkel Kõbin

Juhendaja: prof. Juhan Sedman

TARTU 2017

***Saccharomyces cerevisiae* helikaasi Irc3 ekspresseerimine *E.coli* BL 21 RIL tüvedes ja puhastatud valgu funktsionaalne analüüs**

Bakalaureusetöö

Mihkel Kõbin

Lühikokkuvõte. Irc3 ensüüm on DExH/D-*box* klassi kuuluv pärmi mitokondriaalne DNA helikaas, mis on vajalik *S. cerevisiae* mitokondriaalse DNA terviklikkuse säilitamiseks. Antud töö eesmärk oli leida optimaalsed tingimused, mille juures ekspresseerida Irc3 sünteesi, puhastada välja Irc3 helikaas ning viia läbi ATPaase aktiivsuse mõõtmised puhastatud valgupreparaadiga, et vaadata, kas antud valgul on säilinud aktiivsus *in vitro* tingimustes. Tööst selgus, et optimaalsed tingimused, mille juures Irc3 sünteesi ekspresseerida, oli 20°C, OD 0,4 ja 4h ning antud tingimustel ekspresseeritud ja välja puhastatud Irc3 helikaasi aktiivsus säilib *in vitro* tingimustes.

CERCS teaduseriala: P310 Proteiinid, ensüümid

Märksõnad: Irc3, helikaas, optimaalsed tingimused, valgu puhastus, aktiivsus.

Expression of Irc3 helicase from *Saccharomyces cerevisiae* in *E.coli* BL21

RIL strains and its functional analysis

Bachelor's thesis

Mihkel Kõbin

Abstract. Irc3 enzyme is a DExH/D-*box* helicase that is needed for mitochondrial DNA maintainance in *S. cerevisiae*. The aim of this study was to find the optimal conditions to induce the expression of Irc3 enzyme, purify the Irc3 helicase and to conduct ATPase assay to demonstrate that Irc3 has retained its activity. The study showed that the optimal conditions were at 20°C, OD 0,4 and 4h and demonstrated that expression of Irc3 helicase under these conditions will not inactivate Irc3.

CERCS research specialization: P310 Proteins, enzymes

Keywords: Irc3, helicase, optimal conditions, protein purification, activity.

Sisukord

Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid:	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduslik osa	7
1.1. Helikaasid ja nende ajalugu.....	7
1.2. Helikaasid kui molekulaarsed mootorid.....	8
1.2.1 Üldine molekulaarne mehhanism.....	9
1.3 Helikaaside struktuur ja klassifikatsioon.....	12
1.3.1 SF II helikaasid.....	14
1.3.2 Irc3 helikaas	16
2. Eksperimentaalne osa.....	19
2.1. Töö eesmärk	19
2.2. Materjalid ja meetodid	19
2.2.1. Bakteritüved ja söötmed.....	19
2.2.2 Kasutatud plasmiidid ja praimerid	20
2.2.3 pGEX 4TEV-Irc3 ekspresioonikonstrukti valmistamine.....	20
2.2.4 GST-Irc3 liitvalgu ekspresioonisüsteem.....	20
2.2.5 pGEX 4TEV-Irc3 transformeerimine <i>E. coli</i> BL21 RIL tüve rakkudesse	22
2.2.6. Optimaalsete tingimuste leidmine Irc3 ekspresiooni indutseerimiseks	23
2.2.7. Irc3 valgu ekspresseeriva <i>E. coli</i> kultuuri kasvatamine väikeses ja suures mahus	23
2.2.8. Irc3 valgu puhastamine	24
2.2.9. Valgu analüüsi meetodid.....	26
2.2.10. Valgu kontsentratsiooni mõõtmine ja ATPaasse aktiivsuse mõõtmine.....	27
2.3 Tulemused	29
2.3.1 Irc3 valgu ekspresiooni kontroll ja optimaalsete ekspresiooni tingimuste leidmine.....	29
2.3.2 Irc3 valgu puhastamine	31

2.3.3 Irc3 valgu ATPaasse aktiivsuse testimine	34
2.4. Arutelu.....	36
Kokkuvõte	39
Summary	40
Kirjanduse loetelu	41

Kasutatud lühendid:

Amp - ampitsilliin

BSA - veiseseerumi albumiin (*bovine serum albumine*)

Cam - klooramfenikool

dsDNA - kaheahelaline DNA (*double stranded DNA*)

DTT - ditiotritool

EDTA - etüleendiamiintetraädikhape

GST - glutatioon S-transferaas

LB - Luria sööde

mtDNA - mitokondriaalne DNA

NA - nukleinhape

NTP - nukleosiid 5'- trifosfaat

O/N - üleöö (*over night*)

PAGE - polüakrüülamiid geelelektroforees

rpm - pööret minutis (*revolution per minute*)

SDS - naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfat*)

SF - superperekond (*superfamily*)

ssDNA - üheaahelaline DNA (*single stranded DNA*)

Tris - tris(hüdroksümetüül)aminometaan

Sissejuhatus

Kõik eukarüootsed organismid omavad organelli, mida nimetatakse mitokondriks. See on kaksikmembraanne raku organell, millele on omistatud palju olulisi füsioloogilisi rolle. Üks olulisemaid neist on asjaolu, et mitokondris toimub energia konversioon ATP molekuliks, mis on energiaallikaks suurema osa raku füsioloogilistele protsessidele. Mitokondrite funktsioonid ei piirdu aga ainult ATP sünteesiga, nii toimub seal näiteks Fe-S klastrite süntees, β -oksidatsioon, tsitraadi tsükkel. Hiljuti on tehtud veel huvitav avastus, kus pandi tähele, et pärmi mitokondritesse saadetakse valesti pakitud valke. Seega võib mitokondril kõigele lisaks olla ka valke degradeeriv roll (Ruan et al., 2017).

Oluline aspekt selle organelli juures on tõik, et tal on oma iseseisev genoom. Pärmis *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriaalne genoom (mtDNA) võib erinevates tüvedes olla 75-150 kbp pikkune (Maleszka et al., 1991). *S. cerevisiae* rakkudes kodeeritakse enamus mitokondrites funktsioneeruvad valgud tuuma genoomi poolt. Viimasel kümnendil on tehtud palju avastusi, mis on paljastanud mtDNA metabolismi kompleksuse. On selgunud, et pärmi mtDNA kaitseks ja stabiilsuse tagamiseks on rakul vaja hulk ensüüme, millel on omad kindlad funktsioonid. Üks selliseid valke on Irc3 (*increased recombinant centers*) ensüüm. Irc3 on raku tuuma genoomi poolt kodeeritud ja mitokondrisse lokaliseeruv ensüüm, millel on helikaasidele omane aktiivsus/funktsioon. Meie rühma töö tulemusel on leitud, et Irc3 on absoluutselt vajalik ensüüm pärmi mitokondriaalse DNA stabiilsuse tagamiseks.

Käesoleva töö eesmärgiks oli testida uut pGEX 4TEV-Irc3 ekspressioonivektorit, mida saaks kasutada Irc3 valgu puhastamiseks rekombinantsest allikast *E. coli* bakterist. Töö käigus leiti uuritava valgu ekspressiooniks optimaalsed tingimused, isoleeriti Irc3 valk, hinnati neis tingimustes ekspresseeritud valgu kogust ja mõõdeti puhastatud valgu aktiivsust.

Töö autor tänab Prof. Juhan Sedman ja Dr. Tiina Sedmani sisuka juhendamise eest ja teisi kolleege kasulike nõuannete ja abivalmiduse eest.

1. Kirjanduslik osa

1.1. Helikaasid ja nende ajalugu

Helikaasid on nukleiinhappe-sõltuvad NTPaased ensüümid. Nende valkude üks põhiomadusi on võime lahti harutada DNA, RNA või ka DNA-RNA hübriidseid kaksikahelaid, ehk katkestada vesiniksidemed aluspaaride vahel, kuid on leitud, et nad võivad läbi viia teisi reaktsioone (Shin ja Kelman, 2006). Seetõttu osalevad nad rakkudes pea kõigis nukleiinhapetega seotud protsessides - replikatsioon, transkriptsioon, translatsioon, reparatsioon, splaissimine, nukleiinhapete pakkimine jne (Singleton et al., 2007).

Oma olemuselt võib helikaase nimetada ka nn molekulaarseteks mootoriteks. See tähendab üldistatult, et nad konverteerivad keemilise energia mehaaniliseks energiaks ehk suunatud füüsiliseks liikumiseks (translokatsioon). Enamik helikaase saavad selleks vajaliku keemilise energia ATP või GTP hüdrolyüsi käigus vabanevast vabaenergiast. Taoliste mootorvalkude liikumist antud substraadil iseloomustab tsüklilisus. See tähendab, et vabaenergiast peab piisama nii kaksikahela lahtiharutamiseks kui ka helikaasi uude tsüklisse lähtestamiseks (Colin ja Spies, 2013).

Esimene helikaasi funktsiooniga ensüüm avastati 1976. aastal. Valk isoleeriti *Escherichia coli* organismist ja esmalt kirjeldati seda kui "DNA-d lahtiharutavat ensüümi" (Abdel-Monem et al., 1976). Üsna samal ajal, 1978. aastal, avastati esimene helikaas ka eukarüootses organismis - nimelt liilia meiootilistes rakkudes (Hotta ja Stern, 1978). Pärast seda on uusi helikaase järjepidevalt juurde avastatud ja nende uurimine samamoodi kasvanud (Tuteja ja Tuteja, 2004).

1980.-ndatel avastati esimesed helikaasid viiruste ja bakteriofaagide seas, kus tehti ka esimesed biokeemilised testid nende ensüümidega mõõtes valkude aktiivsust (Venkatesan et al., 1982). Selle kümnendi lõpus avastati helikaasidele omased konserveerunud domeenid ning defineeriti kaks helikaaside superperekonda. Nendeks olid superperekond 1 ja superperekond 2 (Gorbalenya et al., 1989). 1992. aastal isoleeriti veise ajast esimene mitokondriaalne helikaas ja 1996. aastal puhastati hernest esimene kloroplastist pärit helikaas (Tuteja et al., 1996) (Hehman ja Hauswirth, 1992). Helikaaside uurimises on olnud olulised veel ka esimese inimese helikaasi, HDH, avastamine ja RecQ helikaasi isoleerimine *E.coli*

organismist (Umezumi et al., 1990) (Tuteja et al., 1990). RecQ-sarnaseid valke avastati edaspidi veel teisteski organismides, sealhulgas mitu inimesest, ning on loodud tervenisti RecQ valkude perekond. Vähemalt viis selle perekonna helikaasi esineb ka inimese organismis ja on leitud, et osad neist võivad põhjustada ka geneetilisi haigusi (Tuteja ja Tuteja, 2004). Praeguseks on avastatud kokku üle saja erineva helikaasi nii eukarüootsetest kui ka prokarüootsetest organismidest ning on hinnatud, et umbes 1% kõigi organismide genoomist kodeeritakse valke, mis sisaldavad helikaaside motiive (Colin ja Spies, 2013).

1.2. Helikaasid kui molekulaarsed mootorid

Nagu juba mainitud kuuluvad helikaasid molekulide hulka, mida nimetatakse molekulaarseteks mootoriteks. Kõiki selliseid mootorvalke iseloomustab võime viia läbi mingisugust suunatud mehaanilist liikumist. See vajab loomulikult energiat. See tähendab, et nad konverteerivad keemilise energia suunatud liikumiseks. Samas, taolised mootorvalgud on oma struktuuri ja funktsionaalsuse poolest väga mitmekesised. Need võib oma funktsiooni ja tööpõhimõtte alusel jagada üldistavalt nelja gruppi (Phillips et al., 2013):

- Translatsioonilised mootorid, kus ensüüm liigub ühedimensionaalselt ja sirgjooneliselt. Siia gruppi kuulub ka helikaasi ensüüm, aga veel näiteks müosiin ja DNA polümeraas.
- Pöörlevad mootorid, mis tekitavad pöördemomenti, nagu näiteks ATPaasid ja bakterite viburi mootorid.
- Polümeriseerimis-mootorid, nagu näiteks aktiinid ja mikrotuubulid, võivad samuti subühikuid polümeriseerides vabastada energiat, mida on võimalik ära kasutada vajalikke protsesside läbiviimiseks. Näiteks raku liikumine adhesiooni teel (Ananthkrishnan ja Ehrlicher, 2007).
- Translokeerivad mootorid, mis tihtipeale transpordivad valke või nukleiinhappeid kindlatesse raku organelidesse. Need on näiteks tuuma poori kompleks, proteosoomid või mitokondri sise- või välismembraani translokaasid (Phillips et al., 2013).

1.2.1 Üldine molekulaarne mehhanism

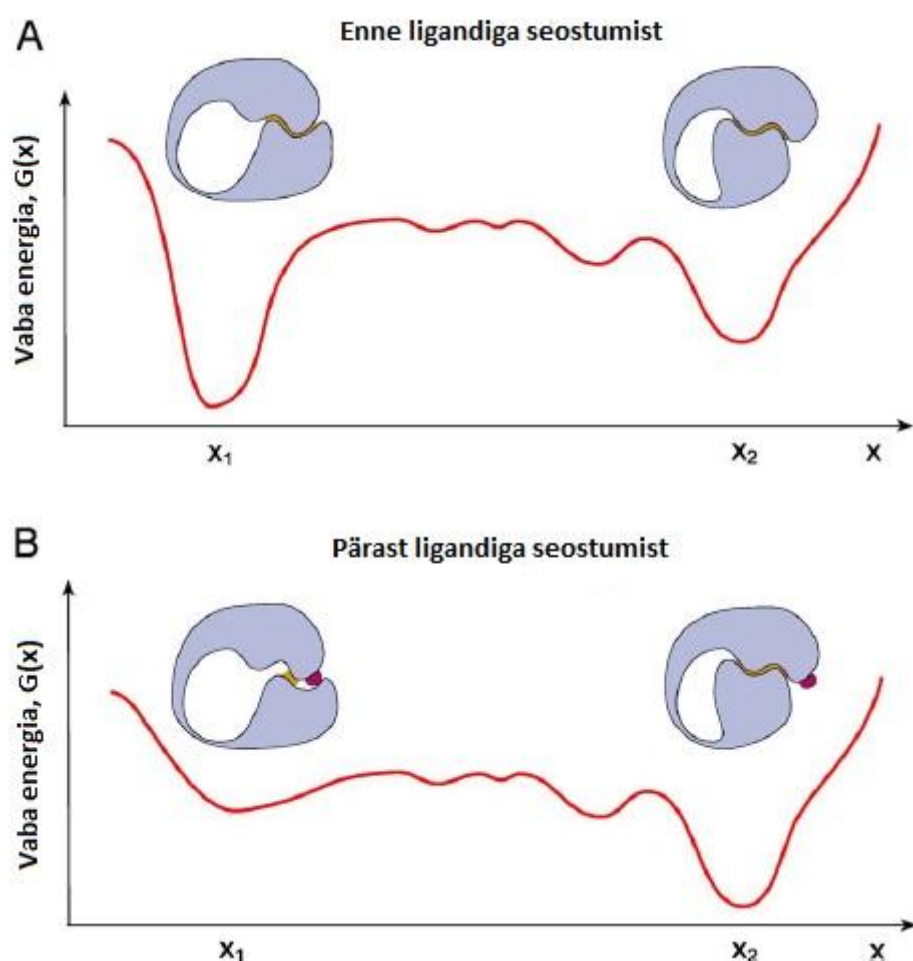
Üks olulisemaid aspekte, mis eristab molekulaarseid mootoreid inimeste loodud makroskoopilistest mootoritest on asjaolu, et molekulaarsetel skaaladel töötades puudub inerts. See tähendab, et teatud molekuli subühik liigub antud suunas seni, kuni talle rakendub mingi jõud. Kui see enam ei mõju, ei toimu enam ka liikumist selles kindlas suunas. Sellise fenomeni põhjuseks on asjaolu, et niisugustes mikroskoopilistes tingimustes hakkab vee (või mingi muu keskkonna) tihedus ja viskoossus rakendama niivõrd palju suuremat vastassuunalist jõudu vaadeldavale objektile. Mikroskoopilisel tasandil on kehadele rakenduvad jõud tihtipeale mõõdetavad mikro-, nano- või isegi pikonjuutonites. Seega, kui see jõud ühtäkki kaob, siis keskkonnast tulenev vastassuunaline jõud seisataks selle pea hetkega. Näiteks vees, kiirusel $30\mu\text{m}/\text{sek}$ liikuval mikroobil võtaks peatumiseks aega $0,3\ \mu\text{sek}$ ja teepikkus, mille ta läbiks selle ajaga oleks ainult $0,01\ \text{nm}$. See on isegi molekulide mõõtmeid arvestades väga väike ja võib seetõttu tervenisti arvestamata jääda (Purcell, 1976).

Samuti jõud, mis rakenduvad mootorvalkudele, toimuvad väga lühikeste vahemaade tagant, sest kõik keemilistest reaktsioonidest tulenevad jõud toimivadki vaid väga lühikeste vahemaade piires - kuni paar nanomeetrit (Vologodskii, 2006).

Oluline põhimõte, mida tuleks seda teemat käsitledes silmas pidada on see, et mootorvalgud ei konverteeri ATP-d või mõnda muud molekuli otse mehaaniliseks energiaks (Vale ja Oosawa, 1990). Sellisel makroskoopilisel skaalal toimub molekulide vahel pidev juhuslik nn Browni liikumine, mis on tingitud molekulide kineetilisest energiast (ing. k *thermal motion*). Samasugune nähtus toimub ka makromolekulides, nagu näiteks valkudes, kus see väljendub muuhulgas ka nn võbelemises (Rienzo et al., 2014). Niisiis, keemilistest reaktsioonidest saadud energia eesmärk on pigem vähendada molekuli mingi subühiku juhuslikku liikumist ja anda sellele mingi kindel suund. Ehk teisisõnu: suurendada molekuli tõenäosust liikuda mingis kindlas suunas (Vologodskii, 2006).

Proteiinide funktsionaalne struktuur on põhiliselt määratud selle primaarse järjestuse järgi (Anfinsen, 1973). Samas, valgu tertsiaarsetes ja kvaternaarsetes struktuurides esineb arvukalt nõrku sidemed: hüdrofoobsed-hüdrofiilsed interaktsioonid, vesiniksidemed, van der Waalsi sidemed, mis tähendab, et nende sidemete lõhkumiseks on samuti vaja vähem energiat. Seetõttu võivad need valkude struktuurid paljuski sõltuda ka soojusliikumisest (Vologodskii, 2006). Me võime valgu loomulikku funktsionaalset 3D struktuuri ette kujutada kui paiknemist valgu kõigi võimalikke konformatsioonide vaba energia miinimumis. Erinevate valgu

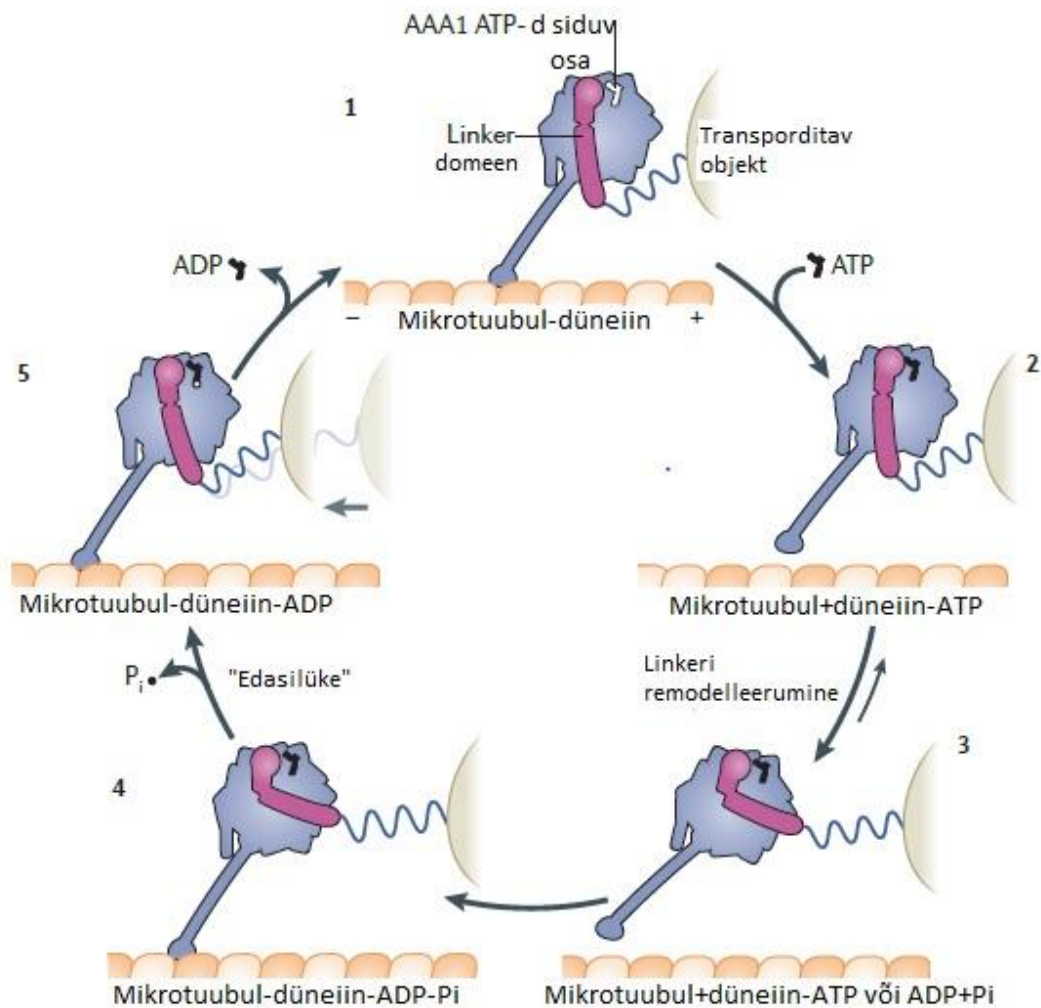
konformatsioonide vahel esinevad barjäärid ja kuna valgu loomulik struktuur peab üldjuhul olema võimalikult stabiilne, siis selle loomulik konformatsioon paikneb vabaenergia nn potentsiaali augus. Seda potentsiaali auku võivad aga muuta interaktsioonid mingite muude molekulidega, milleks võivad olla näiteks ATP või mõne muu valgu mingi osa jne. Uue sideme loomisega muutub valgu konformatsiooni tasakaaluline jaotus, mistõttu toimubki allosteeriline üleminek uude potentsiaali auku, mis on eelkõige ajendatud molekulide soojusliikumise (Yang et al., 2017)(Vologodskii, 2006).



Joonis 1. Idealiseeritud joonis allosteerilisest üleminekust. Konformatsioonilised muutused on tähistatud x -ga. (A) x_1 ja x_2 märgivad kahte vaba energia miinimumi, millest $G(x_1) < G(x_2)$ seega konformatsioon 1 esinemise tõenäosus on kõrgem. Kollaselt värvitud ala stabiliseerib mõlemat konformatsiooni. (B) Ligandi seostumine (punasega) teatud subühikule takistab seniseid valgu interaktsioone positsioonis x_1 , mistõttu muutub $G(x)$ nii, et $G(x_1) > G(x_2)$ ja olek x_2 muutub kõige tõenäolisemaks. (Vologodskii, 2006 järgi)

Viimasena, mida sai juba põgusalt mainitud, iseloomustab mootorvalke tsüklilisus. Tavaliselt läbib ensüüm ühe tsükli jooksul mitu erinevat lühiajalist olekut, mille tulemusel toimub mingisugune mehaaniline liikumine, kuid samas jõuab ta selle lõpuks oma algolekusse

tagasi. Selle heaks näiteks on hästi ja põhjalikult uuritud düneiini valgu liikumine raku mikrotuubulitel. Düneiinid on translatsioonilised ATPaased mootorvalgud, mis liiguvad mööda raku tsütoskeleti (mikrotuubulit), ja kannavad endaga kaasas erinevaid organelle või makromolekule, transportides nii vajalikke aineid raku erinevatesse osadesse (Vale et al., 1985). Esmalt, kui düneiini ATPd siduv osa, AAA1 (ehk ingl.k *ATPase activity associated*), ei ole sidemes nukleotiidiga, on düneiin tugevalt assotseerunud mikrotuubuliga. Kui ATP seostub, indutseerib see düneiini kiire lahknemise mikrotuubulilt, millele järgneb aeglasem mikrotuubulit siduva düneiini domeeni - ehk linkeri - remodelleerumine. Selles etapis saab linker domeeni sisemiste konformatsiooniliste muutuste tulemusel võimalikuks valgu nn edasilikumine. Arvatakse, et ATP hüdrolyüsi abil ADPks ja inorgaaniliseks fosfaadiks (P_i) toimub linkeri nõrk seostumine uuesti mikrotuubuliga. Fosfaadi vabastamine AAA osast aga muudab antud sideme tugevamaks ja arvatakse, et see etapp esindab mootorvalgu nn edasilükke etappi (ingl k. *powerstroke*). Lõpuks vabaneb ka ADP ja tsükel kordub jälle (Roberts et al., 2013). Kusjuures valgu liikumise suuna määrab eelkõige energia barjääride kõrgus. Kui näiteks mikrotuubuli miinus-otsa poole liikudes oleks valgu termodünaamilise energia barjäär madalam toimuks mikrotuubuliga seostumine just selles suunas (Astumian et al., 2016).



Joonis 2. Illustreeriv skeem düneiin mootorvalgu tsükli erinevatest etappidest (Roberts et al., 2013 järgi).

1.3 Helikaaside struktuur ja klassifikatsioon

Præguseks on helikaasid primaarjärjestuse alusel jaotatud 6 erinevasse superperekonda: SF1, SF2, SF3, SF4, SF5, SF6. On selgunud, et esinevad ka helikaasid või üldisemalt translokaasid, millel on mitmeid erinevaid aktiivsusi ja seega ka funktsioone. Neid nimetatakse AAA⁺ valkudeks (ingl k. *ATPase associated with various activities*) ja nad kuuluvad perekonda SF6 (Singleton et al., 2007).

Algselt identifitseeriti helikaasides 7 konserveerunud järjestust ehk motiivi (I, Ia, II, III, IV, V ja VI) ning helikaasid jagati sarnaste motiivide alusel 2 superperekonda (SF). Need olid järjestused, mis olid leitavad mõlemas SFs. Hiljem lisandus neile kahele kõige suuremale

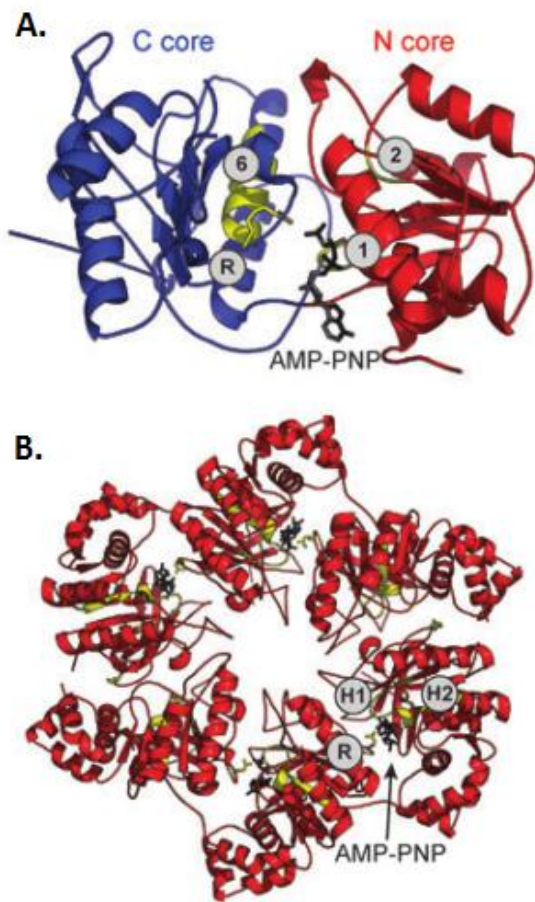
superperekonnale veel 4 SFd (Caruthers ja McKay, 2002). Samuti on neile seitsmele motiivile lisandunud hiljem juurde teisi järjestusi nagu näiteks Q, Ib, IVa ja Va motiiv, mis on iseloomulikud teatud SF-le või mõnele superperekonnas olevale väiksemale alamgrupile (Beyer et al., 2013).



Joonis 3. 7 algset motiivi, mis tuvastati SF1 ja SF2 superperekonnas. Motiiv I ja II tuntud ka kui Walker A ja Walker B järjestused. Need on kaks motiivi, mis on ühed kõige konserveerunud järjestused üle terve helikaaside superperekondade (Caruthers ja McKay, 2002 järgi).

Kõigil helikaasidel esineb teatud polaarsus, mis näitab antud ensüümi liikumissuunda ning on defineeritud sellega kummale DNA ahelale helikaas algselt seondunud on. SF1, SF2 ja SF6 perekonnas olevatel helikaasidel esineb nii 3'-5' kui 5'-3' polaarsusega aktiivsus. SF3 helikaaside puhul aga ainult 3'-5' suunaline ja SF4 ja SF5 valkudel on leitud ainult 5'-3' suunaline translokeeriv funktsioon. Helikaaside juures on samuti oluline asjaolu, kas helikaas seostub üheaahelalise või kaheaahelalise nukleiinhappega (NA). Siiamaani on leitud kõigis, peale SF1, perekondades mõlemat tüüpi ensüüme. Ainult SF1 leidub üht tüüpi - üheaahelalisel NA põhinevad helikaasid (Singleton et al., 2007).

Oluliseks diskussiooniteemaks on olnud nende valkude loomulik struktuur. Praeguste andmete põhjal paistab, et SF1 ja SF2 ensüümid esinevad valdavalt dimeersete või monomeersetenä, kus üks monomeer sisaldab kahte RecA-sarnast domeeni. Kõik teised grupid on oma struktuurilt üldiselt heksameersed (Singleton et al., 2007) (Zhang et al., 2006).



Joonis 4. Helikaaside funktsionaalse tuumiku 3D struktuurid (*core structures*). Need osad, kus toimub NTP sidumine ja hüdroolüüs ning konformatsioonilised muutused, on näidatud kollasena. (A) Näidatud on SF1 ja SF2 ensüümide monomeerset tuumik struktuuri (*core structure*). Koosneb C- ja N-terminaalsest RecA-sarnasest domeenist. Motiivid 1 ja 2 on vastavalt Walker A ja B järjestused ja motiivis 6 asub samuti väga konserveerunud argiini jääk. Kasutatud on PcrA helikaasi 3D struktuuri, mis pärit SF1. (B) SF3-6 helikaaside tuumik struktuur sisaldab tavaliselt 6 RecA- või AAA^+ -sarnasest domeenist, mis moodustavad ringikujulise struktuuri. Iga domeeni kohta on üks NTP'd siduv "tasku" (kollasena). Samuti on ära toodud Walker A ja B motiivid (H1 ja H2) ja argiini jääk (R). Tegemist on SF4 kuuluva T7 bakteriofaagi geen 4 valguga (Singleton et al., 2007 järgi).

Edasi, kuna autori uuritud ensüüm, Irc3, kuulub superperekonda SF2, analüüsisime lähemalt just sellesse superperekonda kuuluvate ensüümide omapära.

1.3.1 SF II helikaasid

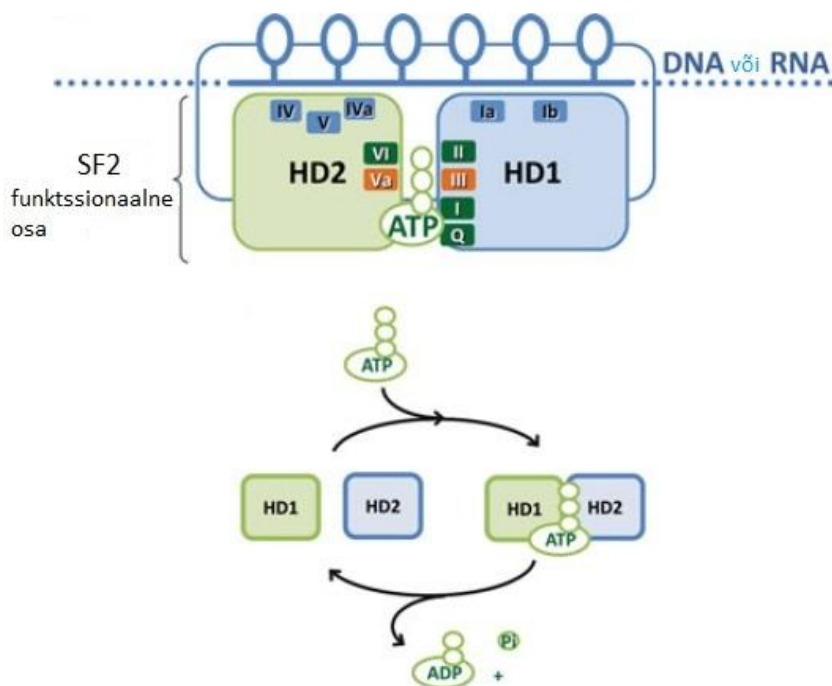
SF2 on kõige suurem ja mitmekesisem helikaaside superperekond. Sinna kuuluvad ensüümid osalevad rakkudes näiteks RNA metabolismis, transkriptsioonis, DNA

parandamises, kromatiini ümberkorraldamisel jne. Samas sisaldab see SF ka ensüüme, mis ei ole oma olemuselt helikaasid, nagu näiteks tüüp III restriiktaasid (Byrd ja Raney, 2013). Substraadi spetsiifilisuse põhjal on siin kõige arvukamalt esindatud RNA spetsiifilised helikaasid, mis moodustavad peaaegu et poole kogu superperekonnast. Teise poole moodustavad erinevad ssDNA ja dsDNA spetsiifilised helikaasid ja ülejäänud väikese osa katavad muud, erineva funktsiooniga ensüümid (Beyer et al., 2013). Antud superperekond on ise omakorda jaotatud 10 erinevaks alamperekonnaks, kus enamik neist on nimetatud selle grupi nn arhetüüp valgu järgi: *RecG-like*, *RecQ-like*, *RIG-I-like*, *Rad3/XPD*, *Ski2-like*, *Swi/Snf*, *T1R*, *DEAD-box*, *DEAH/RHA* ja *NS3/NPH-II* (Fairman-Williams et al., 2010). Samas mõnikord on kirjanduses *DEAH* ja *DEAD-box* alamgrupid ühendatud üheks *DExH/D* grupiks, sest nendesse gruppidesse kuuluvad helikaasid omavad tihti sarnaseid motiive ja on enamasti ka RNA-sõltuvad helikaasid (Jankowsky ja Jankowsky, 2000).

Siia SFsse kuuluvaid helikaase uurides on näha, et kõige enam esinevad konserveerunud järjestused ehk motiivid just NTP'd ja nukleiinhapet siduvates osades. Sama trend on nähtav ka teistes SFdes. Motiividel I, II, ja VI on leitud oluline roll NTPga seostumisel ja selle hüdrolüüsibilisatsioonil SF2 helikaaside seas. Sarnane omadus on avastatud ka Q motiivil, kuid too ei ole eelmistega võrreldes niivõrd konserveerunud ja esineb ainult osadel selle superperekonna ensüümidel. Need järjestused asuvad kahe *RecA*-sarnase domeeni vahel, mis moodustavad omavahel nõ tasku (Sengoku et al., 2006). Selles lõhes asuvad ka motiivid Ia ja III, mida seostatakse helikaaside translokatsiooni polaarsuse määramisega (Saikrishnan et al., 2009). Nukleiinhapet seonduvad omadused on leitud motiividel Ia, Ib, Ic, IV, IVa, V ja Vb. Need paiknevad domeenide küljel, mis on piltlikult NTP aktiivtsentrite vastaspoolel. Need motiivid on oma sekundaarstruktuurilt mõlemas *RecA*-sarnases domeenis väga sarnased. Kuigi need aminohappelised järjestused on vägagi konserveerunud SF2s, siis SF1ga võrreldes sarnast motiivide konserveeruvust ei ole märgata. Ainult kaks treoniini (T) aminohappe jääki motiivist Ic ja V on avastatud, mis on konserveerunud ulatuslikult üle mõlema superperekonna (SF2 ja SF1). Kuna neile motiividele on omastatud nukleiinhapet siduvad omadused, siis on tembeldatud neile kahele T jäägile kriitiline tähtsus lõhkumaks vesiniksidemeid kahe ahela vahel (Fairman-Williams et al., 2010).

Praegused andmed annavad alust arvata, et SF2 helikaaside edasi liikumine toimub nn vaksiku (*inchworm*) mudeli järgi. ATP hüdrolüüs ADPks ja inorgaaniliseks fosfaadiks võimaldab helikaasi mõlemal domeenil (HD1 ja HD2) üksteisest eemalduda. Selle tulemusel liigub üks domeen edasi sõltuvalt translokatsiooni polaarsusest. Uue ATP molekuliga

seondumine toob jälle domeeni üksteisele lähemale ja protsess kordub (Lohman & Bjornson, 1996).



Joonis 5. SF2 helikaasi seondumine nukleinhappega (NA) ning ATP seondumine ja hüdrolüüs. HD1 ja HD2 (helikaasi domeen) kujutavad ensüümi kahte RecA-sarnast domeeni. Rooma numbrid märgivad erinevaid motiive. Ülemisel pildil on kujutatud helikaasi orientatsiooni NA'1 ja motiivide asukohta, kui ensüüm on seondunud ATP'ga. Alumisel pildil on näha helikaasi domeenide asendit üksteise suhtes ATP' seondumisel ja selle puudumisel. Kui SF2 helikaasiga pole ATP parajasti seondunud asuvad domeenid üksteisest kaugemal (Beyer et al., 2013 järgi).

1.3.2 Irc3 helikaas

Irc3 (*increased recombination centers*) valk on pärmi mitokondriaalse DNA kaksikahela sõltuv ATPaasne helikaas. Senine *in silico* analüüs annab alust arvata, et ensüüm kuulub SF2 helikaaside hulka. Alamperekondadest kuulub Irc3 DExH/D-*box* helikaaside hulka ja selle järjestuse analüüsi põhjal on teada, et tal esinevad helikaaside motiivid I-VI (Sedman et al., 2014). *S. cerevisiae*s tuuma genoomis kodeeritakse veel kolme mitokondriaalset DExH/D-*box* klassi kuuluvat helikaasi, milleks on Mss116, Suv3 ja Mrh4. Irc3 erineb neist sellega, et on ainus, mis on DNA sõltuv, ülejäänud 3 helikaasil on täheldatud RNA sõltuvust (Szczyzny et al., 2013).

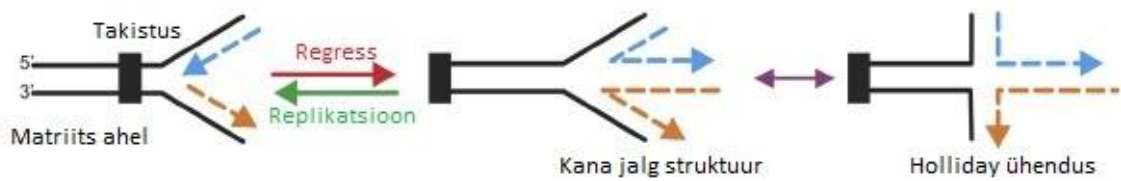
Irc3 on kodeeritud pärmi tuuma genoomi poolt. Sellest tulenevalt peab antud kodeeritud valgu enne transportima sihtpunkti, kus see saaks hakata läbi viima oma funktsiooni. See tähendab, et selle valgu aminohappelises järjestuses peab olema mingi kood, mis annaks pärmi raku mehhanismidele märku, et selle valgu peaks toimetama just mitokondrisse. See oletatav kood on Irc3 valgus N-terminaalne 28 nukleotiidi pikkune osa - MTS (*mitochondrial targeting signal*) (Sedman et al., 2014).



Joonis 6. Skeem, mis näitab Irc3 motiivide asukohta valgus järjestuses. Motiivid väljatoodud rooma numbritena. MTS - *mitochondrial targeting signal*, CTD - *C-terminal domain* (Sedman et al., 2014 järgi).

Esialgsed katsed IRC3 defektsete pärmi rakkudega (Δ Irc3), ehk tüved, kus Irc3 valku ei ekspresseeru, näitasid, et mitokondriaalne DNA on fragmenteerunud. Need tulemused viitasid, et antud valk võib olla seotud mtDNA parandamisel. Ehk Irc3 olemasolu pärmi rakkude mitokondrites surub maha DNA kaheaahelaliste katkete tekke (Sedman et al., 2014). Järgnevad katsed, kus kasutati hargnenud ahelatega DNA kofaktoreid (Y- ja X-struktuurid ehk nn kahvel struktuurid), näitasid, et Irc3 valk seostub eelistatult just nimelt taoliste kahvel struktuuridega. Muuhulgas tõestati, et üheaahelalised DNA ahelad ei indutseeri selles valgus ATPaasset aktiivsust, samal ajal kui kahvel-struktuuridega katsed näitasid, et nendega seotult ATPaasne aktiivsus on suurem võrreldes lineaarse DNA kofaktoriga. Lisaks näitas nende analüüs, et Irc3 puudusel tõuseb märgatavalt irregulaarse X- ja Y-struktuurse mtDNA tase (Gaidutšik et al., 2016).

Kokkuvõtvalt tõestati, et Irc3 helikaas on võimeline Holliday ühendustes läbiviima DNA lahtiharutamist. Lisaks näidati, et Irc3 on võimeline ümbermodelleerima replikatsiooni (*branch migration*) kahvleid või Holliday ühendusi. Seega võib Irc3 aidata pärmi rakkudel üle saada DNA ahelal olevatest vigadest või takistustest, mis muidu peataks pärmi mtDNA replikatsiooni. Nende andmete põhjal on oletatud, et Irc3 võib osa võtta mehhanismist, mis aitab ära tunda mingi takistava agendi replikatsioonikompleksi ees ja katalüüsib kogu replikatsioonikompleksi eemaldumist sellest kohast, kus asub vigane DNA ahel. Seejärel on võimalik ohutult ära parandada antud viga lineaarsel ahelal, et replikatsioon saaks jätkuda (Gaidutšik et al., 2016).



Joonis 7. Skeem, kus on välja toodud olulised etapid, mis võivad toimuda, kui replikatsiooni kahvli ette satub mingi takistus. Sinine ahel on juhtiv ja oranž mahajääv ahel. Kahvli struktuuri regressioonil toimub mahajääva ja juhtiva ahela sidumine, mille tulemusel replikatsioonikompleks liigub takistuse asukohast eemale. Selle tulemusel tekib nn "kana jalg" struktuur, mis on oma olemuselt sarnane Holliday struktuuriga (Bianco, 2015 järgi).

Senini on *S. cerevisiae*s kindlaks tehtud 3 mtDNA helikaasi: Irc3, Hmi1 ja Pif1. Irc3 tundub seega olevat vajalik säilitamiseks mtDNA stabiilsus ja terviklikus, sest Δ irc3 pärmi tüved kaotavad tervikliku mtDNA mõne generatsiooni möödudes. Hmi1 olulisus võib peamiselt seisneda mtDNA struktuuri säilitamisel, sest on leitud, et pärmitüvedel, kus antud valgu aktiivsus puudub, kuid valk ise on olemas, on ikkagi stabiilne mtDNA. Pif1 helikaas on mitokondrile vajalik eelkõige kõrgendatud temperatuuridel (Gaidutšik et al., 2016).

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Töö eesmärk

Töö eesmärgid olid jaotatud kolmeks erinevaks etapiks:

- Esiteks, kontrollida helikaasi Irc3 ekspressiooni toimumist konstrueeritud vektorilt pGEX 4TEV-Irc3 *Escherichia coli* bakteritüves BL21-CodonPlus-RIL tüves, mis on koodonoptimeeritud tüvi eukarüootsete rekombinantsete valkude saamiseks, ja leida optimaalsed tingimused indutseerimaks selle ensüümi ekspresseerimist.
- Teiseks, isoleerida võimalikult puhas Irc3 valk rakulüsaadist.
- Kolmandaks analüüsida Irc3 ATPaasset aktiivsust *in vitro* tingimustes, et kontrollida, kas peale isoleerimist on säilinud valgu aktiivsus.

2.2. Materjalid ja meetodid

2.2.1. Bakteritüved ja söötmed

Antud töös kasutati kahte *E. coli* bakteri tüve. Vektori pGEX-4TEV konstrueerimisel kasutati *E. coli* DH5 α tüve rakke [*E. coli* F⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA -argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1] (Grant et al., 1990). Rekombinantse valgu ekspresseerimiseks kasutati *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL tüve rakke [*E. coli* B F⁻ *ompT* *hsdS*(rB⁻ mB⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* *endA* Hte (*argU* *ileY* *leuW* Cam^r)] (edaspidi BL21 RIL tüvi), mida oli võimalik selekteerida klooramfenikool (Cam) antibiootikumiga (Agilent Technologies Inc., 2010).

Bakteri kultuure kasvatati kas vedelas või 1,7% agarit sisaldavas LB (Luria *broth*) söötmel [0,5% pärmiekstrakti, 1% trüpton, 1%NaCl]. Bakterite selekteerimiseks kasutati söötmes antibiootikume ampitsilliini (Amp) (kontsentratsioonil 100 μ g/ml) ja klooramfenikooli (Cam) (25 μ g/ml).

2.2.2 Kasutatud plasmiidid ja praimerid

Töös kasutati pGEX 4T1 (GE Healthcare), pGEX 4TEV-Irc3 (Juhan Sedman), pGEX 4T1-Irc3 (Ilja Gaidutšik), pGEX 4TEV-Gcf1 (Juhan Sedman) ja pRS316 (Sikorski ja Hieter, 1989) vektoreid.

2.2.3 pGEX 4TEV-Irc3 ekspressioonikonstrukti valmistamine

pGEX 4TEV-Irc3 plasmidi tegemiseks transformeerisin pGEX 4T1-Irc3 ja pGEX 4TEV-Gcf1 plasmiidid *E. coli* DH5 α kompetentsetesse rakkudesse. Kasvasin saadud rakke üleöö 20 ml vedelas LB söötmes ja puhastasin mõlemad plasmiidid DNA'd välja kasutades leelise lüüsi meetodid miniprepis (Sambrook et al., 1989). Edasi viisin läbi restriksiooni, kus GCF1 geeni sisaldavat plasmidi töötlesin BamHI ja XhoI restriktasiga ja IRC3 geeni sisaldavat plasmidi BamHI ja SalI restriktasiga. Selle tulemusel tekkis lahtiste otstega pGEX 4TEV plasmid, kust oli GCF1 geen eemaldatud, ja lineaarne IRC3 geeni sisaldav lõik. Järgmiseks tehti agaros geelelektroforees [0,8%/(100ml kohta) agaros, 0,5 μ g/ml etiidumbromiid, 1xTAE puhver (40 mM Tris, 20 mM etaanhape, 1 mM EDTA)], et visualiseerida DNA fragmendid. Geelist lõigati välja pGEX 4TEV plasmid ja IRC3 geen ja DNA fragmendid puhastati geelist välja (Favorgen Biotech Corp).

Edasi viidi läbi antud fragmentide ligeerimine (teostas Juhan Sedman) ning saadi pGEX 4TEV-Irc3 ekspressiooni konstrukti. Seda kloonimist tehti selleks, et vahetada välja pGEX 4T1-Irc3 vektoris olev trombiini proteaasi lõikekoht TEV proteaasi lõikekohaga.

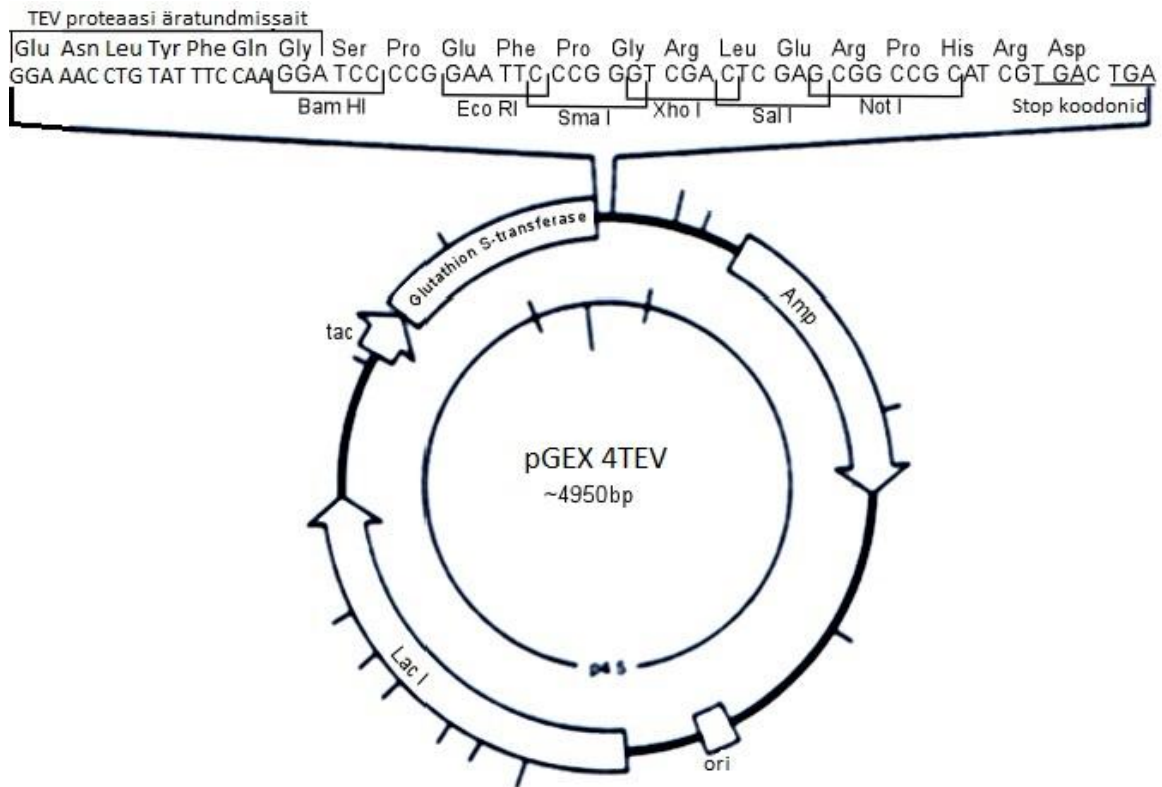
2.2.4 GST-Irc3 liitvalgu ekspressioonisüsteem

*E. coli*s võib heteroloogiliste valkude transleerimine olla pidurdatud teatud aminohapete tRNA'de vähesuse tõttu. Et sellest probleemist üle saada on *E. coli* BL21 RIL tüvedes tehtud modifikatsioonid, mille tulemusel sisaldab see tüvi lisa koopiaarvu arginiini (R), isoleutsiini (I) ja leutsiini (L) tRNA gene. (Agilent Technologies Inc, 2010). Irc3 ekspressioonikonstrukti on Irc3 geenist eemaldatud selle N-terminaalne 28 aminohappeline osa. Tegemist on valgu signaaljärjestusega, mis pärmi rakkudes aitab valku transportida mitokondrisse. Antud tingimustes oli N-terminaalne osa eemaldatud, sest see puudub ka

loomulikus funktsionaalses vormis ja lisaks võinuks see järjestus takistada ensüümi puhastamist ja põhjustada valesti pakkimist (Gaidutšik, 2009).

Irc3-GST liitvalgu ekspressiooniks kasutati pGEX 4TEV-Irc3 vektorit, mis on vektori pGEX 4T1 derivaat. Vektorit on võimalik selekteerida ampitsilliini abil. Uuritava valgu süntees on reguleeritud läbi *tac* promootori, mis on *lac* (laktoos) ja *trp* (trüptofaan) operoni hübriid. Plasmiid sisaldab ka *lacI* geeni, millelt kodeeritud repressorvalk seostub *tac* promootoriga ja takistab sellelt transkriptsiooni alustamist. Liitvalgu ekspressiooni *tac* promootorilt indutseeritakse IPTG (isopropüül-2-tio- β -D-galaktopüranosiid) lisamisega kultuuri, mis seostub ise repressorvalguga ja võimaldab nii promootorilt alustada transkriptsiooni. IPTG'ga induktsioon toimus alati kontsentratsioonil 0,2 mM.

Tac promootorilt algab esmalt glutatioon-S-transferaasi (GST) valgu transkriptsioon, mis võimaldab kodeeritud liitvalku isoleerida afiinsuskromatograafia alusel. GST järjestusele järgneb TEV proteaasi lõikesait, mille kõige tavalisem aminohappeline järjestus on E-N-L-Y-F-Q/-S, kus "/" tähistab proteaasi lõikekohta (Waugh, 2010). Sealt edasi asub MCS (*multiple cloning site*) järjestus, kus asub paljude erinevate restriктаaside lõikekohad ja kuhu on ligeeritud ka uuritava helikaasi Irc3 geen ilma N-terminaalse signaaljärjestuseta. Seega sisaldab kodeeritud rekombinantne valk kolme olulist osa: GST valk, proteaasi äratundev järjestus ja uuritav Irc3 helikaas.



Joonis 8. Ekspressioonivektor pGEX 4TEV skeem. Eraldi, nukleotiidses ja aminohappelises järjestuses, on välja toodud TEV proteaasi äratundmiskoht ja MCS järjestus erinevate restriктаaside lõikekohtadega, kuhu on ligeeritud ka IRC3 geen kasutades BamHI ja SalI restriктаase. Plasmidi suurus on 4950 bp (base pairs). "Ori" tähistab plasmidi replikatsiooni alguspunkti (<http://huayueyang.com.cn/product/277323825>; 17.05.17 järgi).

2.2.5 pGEX 4TEV-Irc3 transformeerimine *E. coli* BL21 RIL tüve rakkudes

Ekspressioonivektori transformeerimiseks kasutati kompetentseid *E. coli* BL21 RIL baktereid, mida hoiti -70°C . Kompetentsete rakkude saamiseks kasvatati esialgu 20 ml rakke LB söötmes, mis sisaldas 20 mM MgSO_4 , ja kasvatati üleöö 20°C loksutil. Saadud kultuur lahjendati 200 ml LB söötmesse (20 mM MgSO_4) nii, et selle optiline tihedus $\text{OD}=0,1$. Seejärel lasti kultuuril kasvada toatemperatuuril kuni $\text{OD}=0,5-0,6$. Kasvatamise lõppedes pandi kasvatuskolvid 10 min jääle. Rakususpensioon viidi üle steriilsetesse tsentrifuugitopsidesse ja tsentrifuugiti tingimustel 10 min, 4°C ja 3000 rpm (Universal 32R, Hettich Zentrifugen). Supernatant eemaldati ja põhja sadenenud rakukultuur resuspendeeriti 20 ml TB puhvrts (10 mM Hepes, 15 mM CaCl_2 , 55mM MnCl_2 , 250 mM KCl) ning hoiti 10

min jääl. Tsentrifuugiti uuesti samadel tingimustel, eemaldati supernatant ja rakud resuspendeeriti uuesti 14 ml TB puhvril. Sellele lisati nüüd aeglaselt ja tilkhaaval 1 ml 7% DMSO (dimetüül sulfoksiid) ja suspensioon jäeti 10 min jääle. 1,5 ml viaalid, kuhu sooviti kompetentsete rakkude kultuur jaotada, pandi jääle jahenema. Suspensioon jagati külmadesse viaalidesse ja 200-300 µl ühe viaali kohta. Peale pipeteerimist külmutati tuubid koheselt vedelas lämmastikus ja säilitati -70°C külmkapis. Transformatsiooniks kasutati korraga 30 µl kompetentsete bakterirakkude suspensiooni. Sellele lisati 1 µl plasmidi (ca. 50 ng), tehti lühike vortex ja inkubeeriti 30 minutit jääl. Sellele järgnes 2 minutiline kuumašokk 37°C termoblokis ning uuesti jääle viimine. Rakkudele lisati 0,5 ml vedelat LB söödet ja 20 mM MgSO₄ ning inkubeeriti seejärel 30 min 37°C juures. Kultuur külvati kahele Amp ja Cam sisaldavale LB tassile: esimesele inokuleeriti 200 µl kultuuri. Teisele tassile ülejäänud materjal, kus sisalduvad bakterid kontsentreeriti eelnevalt tsentrifuugimisega (tingimustel 1000 rpm ja 1 min tsentrifuugil MiniSpin, Eppendorf) ning lisati seejärel esimesega samas mahus Amp ja Cam tassile. Seda tehti selleks, et saada võimalikult palju baktereid külvatud tassile. Tassid pandi üleöö 37°C kasvama.

2.2.6. Optimaalsete tingimuste leidmine Irc3 ekspressiooni indutseerimiseks

Selleks, et selgitada välja, millised on optimaalsed tingimused indutseerimaks rekombinantse valgu ekspressiooni, varieeriti erinevates katsetes 3 erinevat parameetrit. Nendeks oli temperatuur, kultuuri optiline tihedus ja indutseerimise aeg. Optimaalsete tingimuste leidmisel kasvatati raku kultuuri ainult väikseses mahus (250 ml).

2.2.7. Irc3 valgu ekspresseeriva *E. coli* kultuuri kasvatamine väikeses ja suures mahus

Väikeses mahus Irc3 ekspresseeriva *E. coli* kultuuri kasvatati 250 ml LB söötmes. Selleks võeti esialgu LB agari plaadilt 1-3 kolooniat, millesse oli eelnevalt transformeeritud pGEX 4TEV-Irc3 plasmid, ja inokuleeriti 20 ml eelkultuur. Seejärel pandi kolv(id), milles oli inokuleeritud kultuur, inkubaatoritesse (Innova 44) ja lasti kasvada soovitud tiheduseni,

arvestusega et bakterid oleksid eksponentsiaalses kasvufaasis. Eelkultuuri suuremasse mahtu (250 ml või enam) lahjendades arvestati alati, et enne IPTG'ga indutseerimist, oleks ka suuremas mahus möödunud vähemalt üks bakteri generatsiooni aeg (antud juhul vähemalt 2h).

Kõikidesse söötmetesse lisati selektsiooniks Amp (100 µg/ml) ja Cam (25 µg/ml) antibiootikume. Selleks, et uurida, milline on kultuuri kasvu tihedus mingil ajahetkel, võeti kolvist 1 ml proovi ja mõõdeti Ultraspec 2000 spektrofotomeetril 600 nm lainepikkusel selle optilist tihedust steriilse LB söötme suhtes.

Bakteri kultuuri kokku tsentrifuugimiseks ja induktsiooni lõpetamiseks valati kultuur esialgu 50 ml tuubidesse ning asetati jääle. Tsentrifuugiti 10 min 4°C pööretel 4000 rpm (revolution per minute) tsentrifuugis Universal 32R (Hettich Zentrifugen). Seejärel sööde eemaldati ning kui oli vajadus koguda ühte tuubi rohkem kui 50 ml kultuuri valati kultuuri juurde ja korrati protsessi. Kokku tsentrifuugitud kultuurile lisati 15 ml jääkülma S₁₀₀T₁₀E₁ [100mM NaCl, 10mM Tris(tris(hüdroksümetüül)aminometaan)-HCl pH 7,5 puhver, 1mM etüleendiamiintetraäädikhape (EDTA)] puhvrit, rakud resuspendeeriti ja tsentrifuugiti uuesti samadel tingimustel. Peale tsentrifuugimist eemaldati supernatant, kaaluti rakkude massi, külmutati vedelas lämmastikus ning pandi -85°C külmikusse.

Suure mahu kultuuri puhul kasvatati ühes 2 L Erlenmeyeri kolvis korraga 500 ml kultuuri (LB söödet). Eelkultuuri maht oli 100 ml ja sinna inokuleeriti 3 kolooniat. Kultuur kasvatati üles Innova 44 inkubaatoris tingimustel 30°C 180 rpm. Suures mahus kasvatati kultuuri ainult 20°C, indutseeriti OD₆₀₀ 0,4 ning induktsiooniajaks oli 4 tundi. Kultuur tsentrifuugiti kokku samadel tingimustel kui väikese mahuga kultuur. Välja arvatud, et esimene tsentrifuugimine viidi läbi tsentrifuugil Rotina 420R (Hettich Zentrifugen), mis võimaldas korraga suuremas hulgas kultuuri tsentrifuugida. Pärast seda lahustati rakumass 20 ml jääkülmas STE puhvris ja viidi üle 50 ml tuubidesse.

2.2.8. Irc3 valgu puhastamine

2.2.8.1 Puhastamine väikesest kultuuri mahust

Kogu Irc3 ensüümi puhastamise protsess nii väikeses mahus kui ka suures mahus viidi läbi 4°C tingimustel või jää peal. Rakumassil (250 ml), mis oli eelnevalt kokku tsentrifuugitud ja -85°C kappi hoiule pandud, lasti esialgu jääl mõnda aega sulada. Peale sulamist suspendeeriti raku mass 1,8 ml LB puhvris [50mM Tris-MES (2-(N-morfolino)etaan sulfoon hape) pH 7,5, 1mM EDTA, 300mM NaCl, 10% glütserool], 1 mM DTT's (ditiotreitol), 1 mM PMSF's

(fenüülmetüülsulfonüül fluoriid) ja 1mg/ml lüsotsüümis, mis oli eelnevalt lahustatud LB puhvril. Suspensioonil lasti seista jääl umbes 15 minutit ning järgmiseks lisati segule 5 mM CaCl₂, 25 mM MgCl₂, 0,005 U/μl DNAasi ja lasti veelkord umbes 15 minutit jääl seista, et rakud lüüsuks lahuses. Edasi sonikeeriti rakulüsaati minutiliste intervallidega 3x10 sek võimsusel 50 W (Bandelin Sonoplus). Saadud rakulüsaat viidi 50 ml tuubidest üle 2 ml tuubidesse ja tsentrifuugiti 20 min, 14000 rpm (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen). Supernatant viidi üle uude 2 ml topsi ja sellele lisati 100 μl LB puhvril olevat 50% glutatioon agarooi suspensiooni (Glutathione SepharoseTM 4 Fast Flow, GE Healthcare). Lahust inkubeeriti 2h *end-over-end* segajal. Inkubatsiooni lõppedes tsentrifuugiti lahust 2 min ja 1000 rpm (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen). Eemaldati supernatant ning põhja kogunenud agarooi kuulikesi pesti 1 ml EB puhvriga [50mM Tris-MES pH 7,5, 0,1mM ETDA, 300mM NaCl, 10% glütserool ja 1 mM DTT]. Seda segati 5 min *end-over-end*il, tsentrifuugiti 2 min ja pööretel 1000 rpm ning eemaldati supernatant. Seda pesu korrati veel 2 korda, et saada lahti kõrvalistest ainetest, mis võisid veel suspensioonis olla. Peale pesu lisati agarooi kuulikestele 50 μl EB puhvrit, milles oli lahustatud glutatioon (GSH) kontsentratsioonis 10 mM. Suspensiooni segati jälle 5 min *end-over-end*il, fuugiti 2 min 1000 rpm (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen) ja seejärel võeti lahusest välja 50 μl valgu fraktsiooni. Sama protsessi korrati jälle veel 2 korda, et puhastada välja võimalikult suur kogus GST-Irc3 liitvalku.

2.2.8.2 Puhastamine suurest kultuuri mahust

Suures mahus Irc3 puhastamisel tsentrifuugiti 1 L kultuuri kokku 50 ml tuubidesse. Külmutatud bakteri massil lasti esialgu sulada jääl ning resuspendeeriti seejärel 20 ml LB puhvril, 1 mM PMSF ja 0,1% Tweeni (polüsorbaat). Edasi lisati lüsaadile 2 mg/ml lüsotsüümi ja lasti seista umbes 30 min. Seejärel lisati 25 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 0,025 U/μl DNAasi ja lasti uuesti lüsaadil seista umbes 20 min Järgmiseks sonikeeriti rakulüsaati minutiliste intervallidega 4x20 sek võimsusel 50W (Bandelin Sonoplus) ning tsentrifuugiti 20 min 12000 rpm (Sorvall RC-5 B plus Centrifuge). Sealt saadud supernatant tsentrifuugiti veelkord samadel tingimustel ja sealt saadud vedelik valati eraldi nõusse. Järgmise etapina sadestati uuritavat valku soola [(NH₄)₂SO₄] lisamisega. Seda lisati väikeste koguste kaupa kuni see saavutas antud lahuses 30% kontsentratsiooni. Siis tsentrifuugiti jälle samadel tingimustel, supernatant valati uuesti nõusse ja sadestati uuesti. Nüüd kuni 60% (NH₄)₂SO₄ kontsentratsioonini. tsentrifuugiti uuesti ja nüüd lahustati sade 10 ml LB puhvril. Saadud lahusele lisati 2 ml 50% glutatiooni agarooi suspensiooni ja see segu pandi 2h segama *end-*

over-endile. Inkubatsiooni lõppedes tsentrifuugiti tingimustel 1000 rpm 1 min (Mikro 200R, Hettisch Zentrifugen) ja põhja kogunenud agarosilt eemaldati vedelik. Agarooši maatriks paigutati 10 ml kolonni, mida hoiti 4°C toas. Agarosiga kolonni pesti kaks korda EB puhvri hulgaga (lisaks 1 mM DTT), mis oli võrdne kümnekordse agarooši maatriksi ruumalaga (antud juhul 10 ml). Seejärel elueeriti Irc3-GST liitvalk fraktsioonide kaupa maatriksist välja. Selleks lisati kolonnile 3x 2 ml EB puhvrit, mis sisaldas veel 10 mM glutatiooni, ja kolonnist väljunud vedelik koguti eraldi tuubidesse.

Kui SDS-PAGE'lt (naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiidgeelelektroforees) saadud tulemused olid rahuldavad, proteolüüsi puhastatud liitvalk TEV (*tobacco etch virus*) proteaasiga (TEV proteaas oli puhastatud Aivar Liivi poolt). Selleks lisati 6 ml kogutud valgu fraktsioonile 10 µl TEV proteaasi ja 1mM DTT. Tehtud lahust inkubeeriti 10-12 tundi.

Järgmise valgu puhastusetapina kasutati ioonvahetuskromatograafia põhimõttel S-Sepharose kolonni (GE Healthcare), kus agarooši kuulidega on seotud negatiivselt laetud metüülsulfaat rühmad. Puhastamisel kasutati 0,6 ml S-Sepharose'i maatriksit ja enne maatriksile kandmist tuli valgulahus lahjendada 100 mM NaCl kontsentratsioonini ja sama pidi tegema ka kolonni maatriksiga. Seejärel kanti lahus kolonnile ja maatriksit hakati pesema S puhvriga [50mM Tris-MES pH7,5, 0,1mM EDTA, 10% glütserool, kuhu oli vahetult enne kasutust lisatud 1mM DTT]. Valgu elueerimiseks maatriksilt kasutati S puhvrit, milles hakati tõstma NaCl kontsentratsiooni vastavalt 100 mM, 200 mM, 350 mM, 450 mM ja 600 mM. Valgu fraktsioone hakati koguma 100 µl kaupa. Irc3 elueerus 350 mM NaCl kontsentratsiooni juures.

2.2.9. Valgu analüüsi meetodid

Peamine valgu analüüsi meetod Irc3 väljapuhastamisel oli SDS-PAGE ehk naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforees. Geeli valmistamiseks kasutati 10% akrüülamiid/bisakrüülamiid lahust, Tris/SDS lahust, 10% NAPS (amoonium persulfaat) ja TEMED (tetrametüületüleendiamiin). Valgu proovid denatureeriti 5x SDS puhvris [300mM Tris-HCl pH6,8, 500mM DTT, 10% SDS, 0,5% broomfenoolsinine ja 20% glütserool]. Geelid asetati seejärel puhvrissse [6,8mM SDS, 58mM Tris, 380mM Gly] ja voolutati pingel 100-130V umbes 2,5 tundi. Elektroforeesi lõppedes kuumutati (mikrolaineahjus) geeliproove värvilahuses (2,5 mg/ml Coomassie brilliant blue R-250, 25% etanool ja 7% äädikhapet). Seejärel inkubeeriti veel umbes 10 min toatemperatuuril, pärast mida valati värv ära. Siis lisati

värvi mahavõtmislahust (20% etanool, 7% äädikhape), mida kuumutati samuti mikrolaineahjus, ja inkubeeriti uuesti 10 minutit.

Teine analüüsi meetod oli Bradfordin meetod, et kontrollida valgu olemasolu ja umbkaudset kogust eri puhastusetappides. Selleks pipeteeriti 50 µl Bradfordin reagenti (0,01% Comassie brilliant blue G-250, 5% etanool, 4,25% fosforhape) mikrotiiter plaadi aukudesse ja sinna lisati 5 µl oma valgu proovi. Standardiks kasutati veise seerumi albumiini ehk BSA'd (2 mg/ml), millest tehti lahjendusrida vastavalt 0,25 µl, 0,5 µl, 0,75 µl, 1 µl, 2 µl, 3 µl ja 4 µl.

2.2.10. Valgu kontsentratsiooni mõõtmine ja ATPasse aktiivsuse mõõtmine

Puhastatud Irc3 valgu kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriliselt (NanoDrop 2000C spektrofotomeetril, Thermo Scientific). Valgulahust pipeteeriti seadme pjedestaalile 2 µl ja mõõdeti lainepikkusel 280 nm. Neelduvust mõõdeti sama lahuse suhtes, milles oli lahustunud Irc3, kuid antud valku seal ei olnud. Sealt saadud kontsentratsiooni abil hinnati valgu kogust lahuses, kasutades Irc3 molaarset neeldumiskoeffitsienti $\epsilon=0,0648$ (Walker, 2009). Valgu kontsentratsioon leiti valemiga $A = \epsilon cl$, kus c on aine kontsentratsioon, l on küveti läbimõõt ja A aine neelduvus.

Ensüümi aktiivsuse mõõtmise jaoks kasutati kofaktorina 35 bp lineaarset dsDNA. Selle valmistamiseks kasutati kahte lineaarset 35 bp ssDNA ahelat. Kumbagi oli kontsentratsioonis 100 µM ja koguses 5 µl (mahajääv ahel 3Rev EYFP järjestusega 5'TCGGCATGGTGTAGGTGTACAAGTAACTCAAGAGCTC3' ja juhtiv ahel 3Rev EYFP XhoI järjestusega 5'GAGCTCGAGTTACTTGTACACCTCGTCCATGCCGA3'). Neile lisati 10 µl 5xAB puhvrit (10 mM Tris-HCl pH7,5, 1 mM MgCl₂, 100 mM K-Glu.) ja 30 µl mQ vett. Lahusele tehti kerge vortex, lühike tsentrifuugimine (10 sek tsentrifuugil MiniSpin, Eppendorf) ja inkubeeriti 5 min 95°C. Seejärel lasti 2 h lahusel toatemperatuuril aeglaselt maha jahtuda ning pandi 4°C külmkappi hoiule.

Irc3 ATPasse aktiivsuse katse reaktsioonisegu koosnes: 0,1 mg/ml BSA (veiseseerumi albumiin), 0,1 mM ATP ja 60000 cpm [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP, 1 mM DTT, 150 mM K-glutamaat pH 7,5, 30 mM Tris pH7,5, 2,5 ng/µl Irc3 lahust ja 0,5 µM 35 bp lineaarset dsDNA kofaktorit. Reaktsioonisegu mahuga 20 µl inkubeeriti 30°C 10 minutit ja käivitati 2 µl ATP [koos ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP'ga] lisamisega. Reaktsioon viidi läbi samuti 30°C. Aktiivsuse mõõtmisel võeti reaktsioonisegust proovid 1,5., 3., 4,5. ja 6. minutil. Reaktsioonid peatati 150 µl aktiivsöe lisamisega (0,8% Norit A 100 mesh aktiivsüsi, 2mM KH₂PO₄, 10mM (v/v) HCl), seejärel

segati 10 min (Disruptor Genie, Scientific Industries Inc.) ja tsentrifuugiti 2 min pöõretel 13000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415C). Sealt saadud 100 µl puhast vedelikku pipeteeriti uuesti aktiivsõega lahusesse, korrati eelmist etappi ja nüüd võeti 155 µl puhast vedelikku ning viidi puhtasse 1,5 ml viaali. Seda tsentrifuugiti jälle samadel tingimustel ning sealt pipeteeriti välja 150 µl võimalikult puhast vedelikku ja kanti spetsiaalsetesse viaalidesse (Perkin Elmer), millesse oli eelnevalt lisatud 5 ml stsintsillatsiooni vedeliku lahust (di-isopropüleennaftaleen OptiPhase HiSafe 3, Perkin Elmer). Saadud proovid analüüsiti stsintsillatsiooni loenduris Liquid Scintillator Analyzer'is (Perkin Elmer).

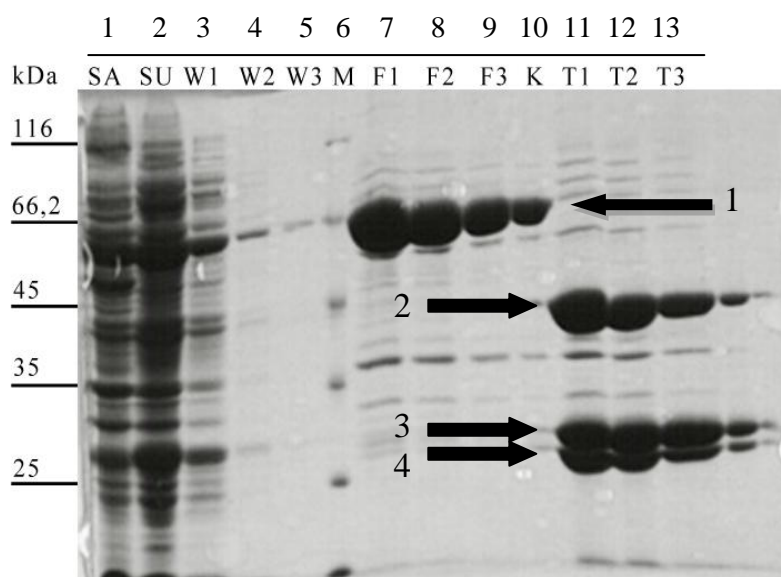
2.3 Tulemused

2.3.1 Irc3 valgu ekspressiooni kontroll ja optimaalsete ekspressiooni tingimuste leidmine

Irc3 ensüümi ekspressiooniks kasutati pGEX 4TEV-Irc3 ekspressioonivektorit, mis oli transformeeritud *E. coli* bakteri BL21 RIL tüvesse. Irc3 valk kodeeriti plasmiidilt liitvalguna, kus helikaas oli seotud GST valguga ja nende kahe valgu vahel asus järjestus, millega seostub TEV proteaas. GST valku kasutati Irc3 väljapuhastamisel rakulüsaadist ning hiljem lõigati see osa ära kasutades TEV proteaasi.

Enne optimaalsete ekspressioonitingimuste leidmist vaadati, kas konstrueeritud (pGEX 4TEV-Irc3) uuritava ekspressiooni kontrolliks välja 100 ml puhastatud Irc3, töödeldi edasi

optimaalsete ekspressioonitingimuste leidmist vaadati, kas konstrueeritud (pGEX 4TEV-Irc3) uuritava ekspressiooni kontrolliks välja 100 ml puhastatud liitvalku, GST-Irc3, töödeldi edasi TEV proteaasiga (Joonis 9).



Joonis 9. SDS-PAGE'i geelipilt. Erinevad puhastusetapid Irc3 helikaasi isoleerimisel rakulüsaadist ja puhastatud Irc3-GST liitvalgu proteolüüs TEV proteaasiga. Rajal SA on näha proov, mis on pärit rakulüsaadist peale sonikeerimist ja tsentrifuugimist. 1 - GST-Irc3 liitvalk; 2 - Irc3 helikaas; 3 - GST valk; 4 - TEV proteaas. SU rajal on näha proovi, mis võetud peale tsentrifuugimist tekkinud sademest. Rajal W1-W3 on proovid glutatiooni agaroozi pesust elueerimispuhvriga. M rajal molekulmassi marker. Rajal F1-F3 GST-Irc3 liitvalgu fraktsioonid. T1-T3. on näha liitvalk lõigatud TEV proteaasiga, mille tulemusel liiguvad Irc3 (2) ja GST (3) valk eri kiirustega geelil.

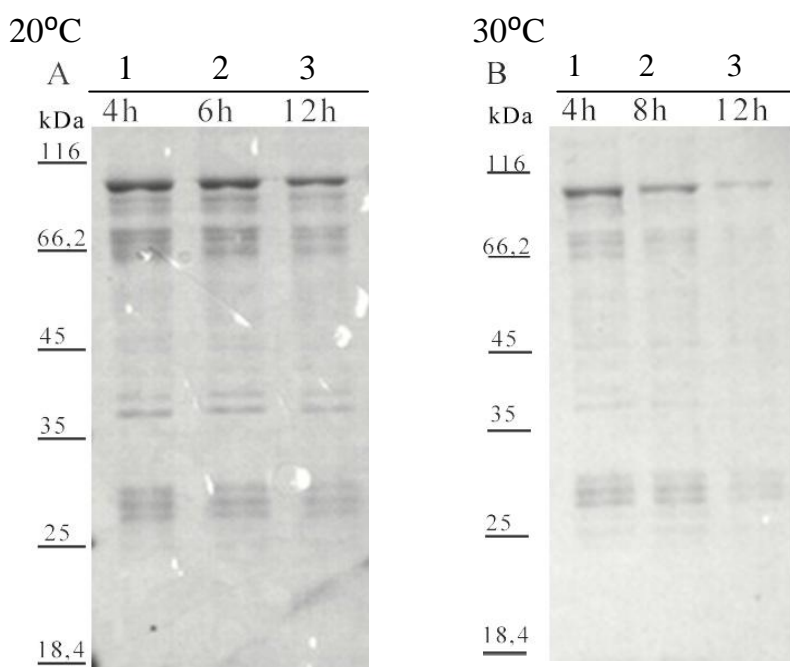
Antud geelipildilt on näha, et rekombinantse valgu hulk (Joonis 9, rajad 7-9) geelil on väga kõrge ning peale TEV proteaasiga lõikamist (Joonis 9, rajad 11-13) on Irc3 (Joonis 9, nr 2) ja

GST valk (Joonis 9, nr 3) geelil erinevale kaugusele liikunud. Lisaks on sel samal rajal näha ka TEV (nr 4 joonisel 9) proteaasi ennast. Sellest järeldati, et Irc3 ekspressiooni tase on heal tasemel. Seega konstrueeritud plasmiid, pGEX 4TEV-Irc3, on sobilik ja efektiivne vektor tootmaks Irc3 valku *E. coli* BL21 RIL tüve rakkudes edasiste katsete tarvis.

Järgnevalt taheti leida optimaalsed tingimused, mille juures Irc3 valgu ekspressioon oleks kõige kõrgem. Selleks varieeriti 3 erinevat parameetrit.

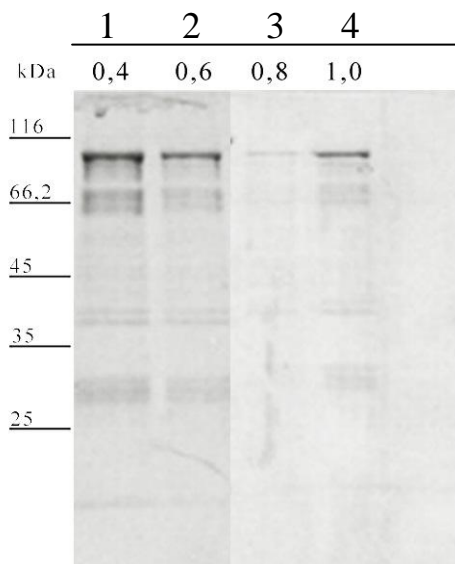
- Temperatuur. Bakteri kultuure indutseeriti IPTG'ga kahel erineval temperatuuril - 20°C ja 30°C.
- Optiline tihedus. Kultuuril lasti kasvada mingi aja ja möödeti seejärel selle optilist tihedust (OD) spektrofotomeetril (Ultraspec 2000C; Pharmacia Biotech). Kultuure indutseeriti OD₆₀₀ 1,0, 0,4; 0,6; 0,8 ja 1,0.
- Aeg. Peale indutseerimist lasti kultuuril kasvada vastavalt 4h, 8h ja 12h ja seejärel tsentrifuugit rakud kokku ning külmutati. Sellega lõppeb ka uuritava valgu ekspressioon.

Kasvutemperatuuri ja induktsiooniaja optimeerimised olid omavahel kombineeritud, sest samu induktsiooniaegu tuli katsetada erinevatel temperatuuridel. Seega võib nende parameetrite optimeerimist vaadata koos. Indutseeritud kultuure (250 ml) kasvatati ja töödeldi väikeses mahus (vt 2.2.8) ja kultuurist välja puhastatud rekombinantset valku analüüsiti SDS-PAGE'il (joonis10). Katsetest selgus, et kõige kõrgem liitvalgu ekspressioon esines temperatuuril 20°C ja optimaalseimaks induktsiooni ajaks osutus 4 tundi (Joonis 10 A, rada 1).



Joonis 10. GST-Irc3 hulk indutseeritud proovides sõltuvalt temperatuurist ja induksiooniajast. Vasakul on molekulmassi marker. (A) 20°C indutseeritud ja vastavalt 4h, 6h ja 8h tunnil võetud proovid võrrelduna (B) 30°C indutseeritud ja vastavalt 4h, 8h ja 12h võetud proovidega. Iga proovi, mis võeti puhastatud Irc3 valgu fraktsioonidest, kanti geelile 10 µl.

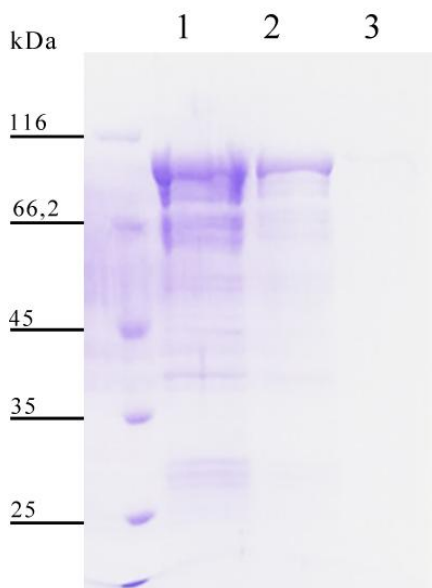
GST-Irc3 liitvalgu ekspressiooniks optimaalse OD₆₀₀ leidmisel varieeriti antud parameetrit vastavalt 0,4, 0,6, 0,8 ja 1,0. Kultuuri kasvatati 100 ml mahus ja proove analüüsiti SDS-PAGE'il (joonis 11). Analüüs näitas, et liitvalgu hulk on kõige suurem OD 0,4 juures (Joonis 11, rada 1). Seega otsustati edasistes katsetes indutseerida GST-Irc3 liitvalgu ekspressiooni tingimustel OD₆₀₀=0,4, 20°C ja 4 tundi.



Joonis 11. GST-Irc3 valgu ekspressiooni induksioon erinevatel optilistel tihedustel. Vasakul on molekulmassi marker. Numbrid erinevate radade kohal näitavad optilist tihedust mille juures, antud kultuuri indutseeriti. Igat proovi, mis võeti puhastatud valgu fraktsioonist, kanti geelile 10 µl.

2.3.2 Irc3 valgu puhastamine

Valgu isoleerimisel kasutati rakkude lüüsimiseks lüotsüümi, DNAasi ja sonikeerimist ning valgu puhastamiseks rakulüsaadist tsentrifugimist, valgu sadestamist soolaga, glutatiooniga (GSH) afiinsuskromatograafiat jaioonvahetuskromatograafiat (vt pt 2.2.8.2.). Irc3 ensüümi ekspresseeriti 4L kultuurist ja tingimustel 20°C, OD 0,4 ja 4 h. Rakud tsentrifugiti kultuurist kokku, lüüsi ja isoleeriti afiinsuskromatograafia alusel. Selle abil puhastati GST-Irc3 liitvalk rakulüsaadist. Liitvalgu elueerimine GSH agarosiga kolonnilt toimus EB puhvriga, kus oli

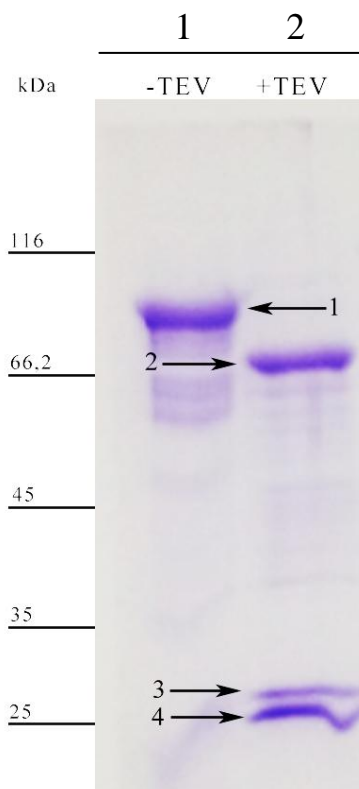


lahustatud 10 mM glutatioon. GST-Irc3 valk koguti kolme 2 ml mahuga fraktsioonina (Joonis 12, rajad 1-3).

Joonis 12. GST-Irc3 liitvalgu puhastamine suurest mahust. Vasakul rajal molekulumassi marker. Pildil on äratoodud kolme fraktsiooni proovid peale GSH agarosiga kolonnil puhastamist. Kolm fraktsiooni on vastavalt 1, 2 ja 3. Esimesel rajal on näha markeri proovi. Igale rajale kanti 10 µl proovi, mis võeti vastavast valgu fraktsioonist. Irc3 puhastati välja 4 l kultuurist.

Analüüs näitas, et valk elueerus eelkõige esimeses 2 ml fraktsioonis (Joonis 12, rada 1), ent märkimisväärne kogus liitvalku oli ka fraktsioonis 2 (Joonis 12, rada 2) ning mõningane hulk ka fraktsioonis 3 (Joonis 12, rada 3). Seetõttu kasutasime edasises puhastuses kõiki fraktsioone.

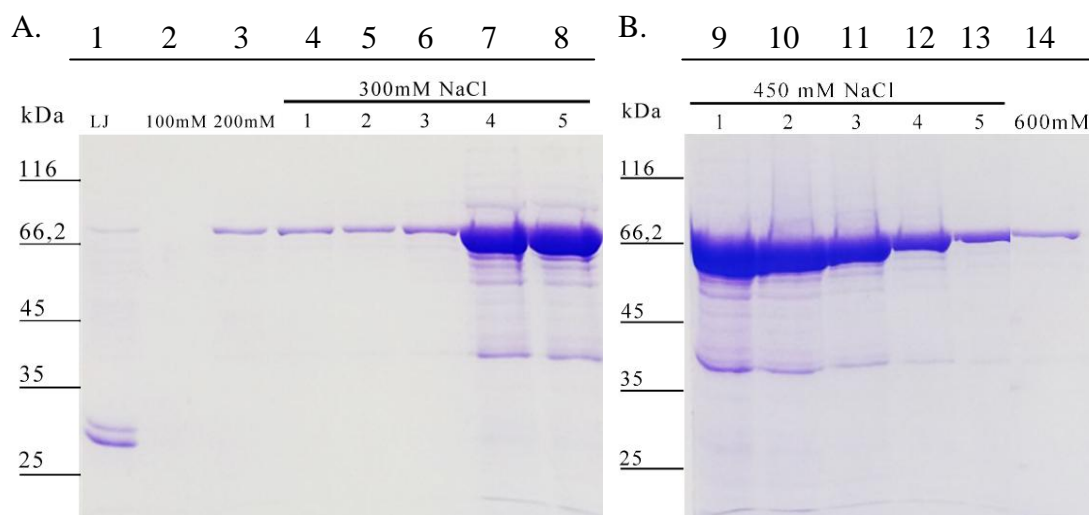
Järgmise etapina viidi läbi GST-Irc3 rekombinantse valgu proteolüütiline lõikamine TEV proteaasiga. Selleks lisati kolmele kokku segatud valgu fraktsioonile 10 µl TEV ensüümi lahust (20 mg/ml) ja tehtud segu hoiti üleöö jääl. Peale lõikamist tehti proovidega SDS-PAGE ja kontrolliti, kas proteolüüs oli õnnestunud. Joonisel 13 rajal 1 on näha TEV proteaasiga töötlemata liitvalku (tähistatud noolega nr 1). Teisel rajal (Joonis 14, rada 2) on liitvalk proteaasiga töödeldud, mistõttu et näha kolme erinevat valgu riba. Kõige aeglasemini on liikunud Irc3 (Joonis 14, nool nr 2) GST ja TEV proteaas on liikunud enam-vähem sama kauguse geeli (Joonis 14, TEV nr 3 ja GST nr 4).



Joonis 13. GST-Irc3 valk lõigatud TEV proteaasiga. Vasakul on äratoodud molekulumassi markerid. -TEV rajal on proov lõikamata GST-Irc3 liitvalgust. Paremalt rajal on TEV proteaasiga töödeldud proov. Igat proovi kanti 10 µl geelile. 1 - GST-Irc3 valk; 2 - Irc3 helikaas; 3 - TEV proteaas; 4 - GST valk.

Peale elueerimist ja TEV'ga lõikamist viid läbi veel täiendav puhastamine *S-Sepharose*'ga ionvahetuskromatograafiaga. Selle abil sai Irc3 lõpplahusest eemaldatud ka TEV ja GST valk. Enne kolonnile kandmist lahjendati valgulahus kolonni maatriksiga samale 100 mM NaCl kontsentratsioonini. Seejärel kanti valgu lahust 0,6 ml *S-Sepharose*'i kolonnile. Kolonni

läbijooksus leiduvad valud on analüüsitud joonisel 14 rajal 1, kus näha GST ja TEV valke. See tehtud, hakati maatriisit pesema S puhvriga, milles hakati tõstma NaCl kontsentratsiooni vastavalt 100 mM, 200 mM (Joonis 14, rajad 2 ja 3) ja 350 mM, 450 mM, 600 mM (vt 2.2.8.2). Irc3 hakkas elueeruma 350 mM soola kontsentratsiooni juures (Joonis 14, rada 4). 350 mM NaCl juures koguti viis 100 µl valgu fraktsiooni ja sama palju ka 450 mM kontsentratsiooni juures.



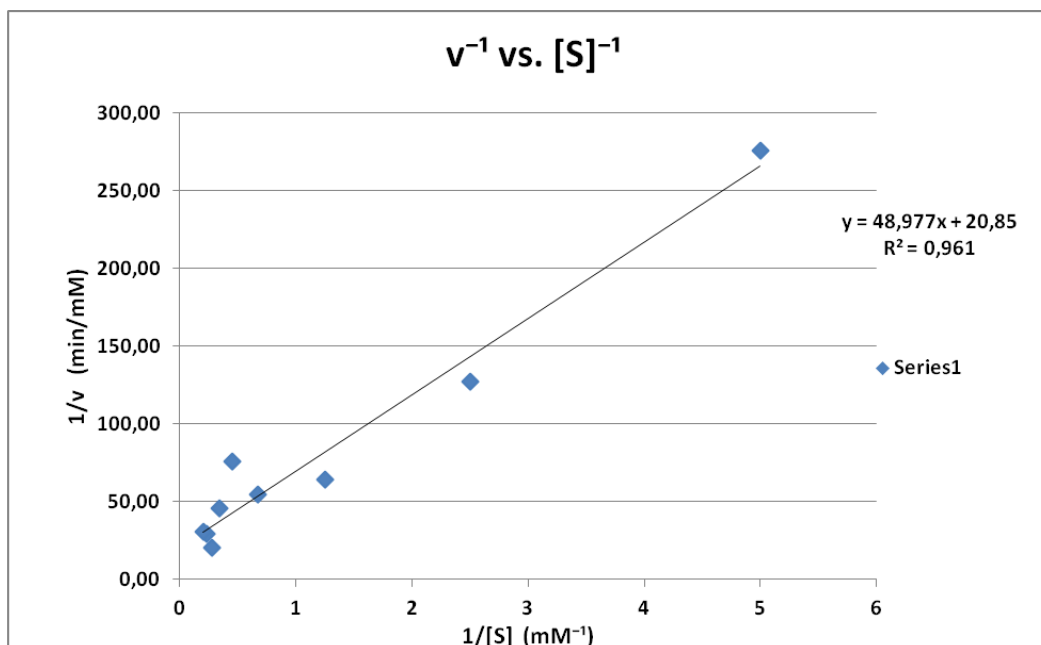
Joonis 14. *S-Sepharose*'i kolonnilt puhastatud Irc3 valk. Vasakul on molekulmassi marker. LJ tähistab kolonnile kantud valgulahust, mis jooksis läbi kolonni kohe välja, kui see sinna peale kanti. Numbrid näitavad antud proovi NaCl kontsentratsiooni. Igale rajale kanti 10 µl proovi.

Jooniselt 14 on LJ rajal näha, et GST ja TEV on kohe kolonnile peale kandes sealt läbi jooksnud (asub 35-25 kDa vahel). Samuti on näha, et valk hakkas kolonnilt välja elueeruma neljanda 350 mM NaCl fraktsiooni juures ja Irc3 hulk saavutas kõrgeima taseme 450 mM kontsentratsiooni juures 1. ja 2. fraktsioonis. Kõige rohkem Irc3 valku oli näha radadel 7, 8 (300 mM NaCl) ja 9-11 (450 mM NaCl) seega otsustati neid fraktsioonide kasutada ensüümi ATPaasi aktiivsuse testides. Jooniselt on veel näha, et kuigi Irc3 kogus on geelil suur on siiski veel kaasa tulnud muid lisavalke, sealhulgas oli kõige domineerivam ligikaudu 40 kDa suurune polüpeptiid. Fraktsioonid, mida otsustati kasutada helikaasi ATPaasi katsetes, jaotati 5 µl alikvootide kaupa PCR tuubidesse ja külmutati koheselt vedelas lämmastikus. Alikvootide hoiti -80°C külmkapis.

2.3.3 Irc3 valgu ATPaasse aktiivsuse testimine

Peale Irc3 isoleerimist mõõdeti saadud valgupreparaadi spektrofotomeetrilist neelduvust, millelt sai hinnata Irc3 ligikaudset kontsentratsiooni ja kogust antud lahuses. Mõõtmine viidi läbi 280 nm lainepikkusel. Neelduvust mõõdeti kolmes korduses ja nende keskmiseks tulemuseks oli $A_{280} = 1,41$. Sealt hinnatud kontsentratsioon oli $c \approx 1,65$ mg/ml. Kuna oli teada ka kogutud valgulahuse ruumala (0,45 ml), siis võis leida ka Irc3 ligikaudse koguse antud lahuses, mis oli $m = 740$ μg .

Aktiivsuse mõõtmisega sooviti teada saada, kas Irc3, mis on kodeeritud uuest vektorist, on peale puhastustappe ka funktsionaalne ning kui on, siis milline on selle valgu aktiivsus. Selleks, et määrata Irc3 ATPaasi reaktsiooni V_{\max} ja hinnata katalüütilist konstanti k_{cat} , varieeriti erinevates katsetes ATP kontsentratsiooni vastavalt 0,2, 0,4, 0,8, 1,5, 2,2, 2,9, 3,6, 4,3 ja 5 mM. Esialgsed andmed saadi CPM (*counts per minute*) kujul, kuid need konverteeriti edasi produktide kontsentratsiooniks (mM). Saadud andmetega tehti Lineweaver-Burki graafik, mis on Michaeli-Menteni (M-M) võrrandi modifikatsioon. Selle modifikatsiooni abil on võimalik M-M võrrand teisendada lineaarvõrrandiks, mis võimaldab hõlpsamini leida otsitavad ensüümi kineetilised parameetrid (K_M , V_{\max} ja k_{cat}).



Regressioonanalüüsist saadud lineaarvõrrandiga, mis ongi Lineweaver-Burki võrrand, leiti otsitavad ensüümi kineetilised parameetrid. Arvutused näitasid, et substraadi (ATP) kontsentratsioon, mille juures reaktsiooni kiirus on täpselt pool reaktsiooni maksimaalsest

kiirusest, V_{\max} , on $K_M = 2,35$ mM. Reaktsiooni maksimaalne kiiruse $V_{\max} = 0,048$ mM/min ja reaktsiooni katalüütiline konstant $k_{\text{cat}} = 24,2$ s⁻¹, mis näitab, et Irc3 ensüüm on võimeline ühe sekundi jooksul läbi viima 24 substraadi molekuli konversiooni. Nendest tulemustest järeldati, et Irc3 helikaasi aktiivsus on säilinud ja ensüüm on funktsionaalne.

2.4. Arutelu

Antud töö eesmärk oli esiteks kontrollida pärimi Irc3 helikaasi ekspresseerumist uuel ekspressioonikonstruktilt ning leida optimaalsed tingimused, mille juures toota seda ensüümi. Teiseks isoleerida võimalikult puhas Irc3 valgulahus ning kolmandaks viia läbi valgu funktsionaalsed katsed, millega mõõta valgu kineetilisi parameetreid.

Irc3 ekspresseeriti *E. coli* bakteri BL21 RIL tüve rakkudes. Antud tüve genoom sisaldab lisa koopiarvu *argU*, *ileY* ja *leuW* tRNA geene, mis võimaldavad efektiivsemalt toota rekombinantseid valke. Ekspressioonivektoriks kasutati pGEX 4TEV-Irc3 plasmidi, mis on pGEX 4T1 (GE Healthcare) plasmidi derivaat (vt joonis 8). pGEX 4TEV-Irc3 vektorilt kodeeritakse rekombinantne liitvalk GST-Irc3. GST valgu osa kasutati glutatiooniga agarosiga seondumiseks, mis võimaldas valku rakulüsaadist välja puhastada. Lisaks oli IRC3 geenist eemaldatud järjestus, mis kodeeris valgu N-terminuse 28 aminohappe jääki (vt joonis 6). Antud valgu osa on signaaljärjestus, mis aitab valgul lokaliseeruda mitokondrisse. See järjestus puudub funktsionaalsel Irc3 valgul ning selleks, et jäljendada *in vivo* tingimusi, oli see eemaldatud ka siin töös kasutatud Irc3 valgust.

Sellelt konstrueeritud plasmiidilt Irc3 valgu ekspressiooni kontrollides kasutati valgu puhastus protokolle, mis olid juba eelnevalt biokeemia laboris välja töötatud ja optimeeritud. Samamoodi kasutati ka valgu suuremas mahus väljapuhastamisel juba eelnevalt optimeeritud protokolle. Ekspressiooni kontroll kinnitas, et antud plasmidi on võimalik kasutada suuremas mahus Irc3 valgu produtseerimiseks. Geelipilt näitas (vt joonis 9), et Irc3-GST liitvalku oli lahuses palju ja TEV proteaas hüdrolyüüsis tõhusalt kahe valgu lõikamist.

Antud töös on kasutatud Irc3 ekspressiooniks tingimusi, mida eelnevalt testitud ei olnud. Seni on antud helikaasi ekspresseeritud eelkõige kultuurides, mis kasvatati M9 minimaal söötmel, kuhu oli lisatud kasaminohappeid (1L kohta 2 ml 5xM9 soolad, 1 M MgSO₄, 40% glükoos, 0,1 M CaCl₂, 10% kasaminohapped). Selles söötmes on Irc3 ekspresseerivaid kultuure kasvatatud 30°C juures. Antud töös on ekspresseeriti Irc3 helikaasi LB söötmel kasvavates bakterites temperatuuril 20°C.

Valgu ekspressiooni optimeerimisel varieeriti temperatuuri, OD´d ja aega. Esialgu plaaniti ekspresseerida valku kolmel temperatuuril: 20°C, 25°C ja 30 °C. Kuid 25°C kasvatades ei kasvanud kultuur soovitud tiheduseni ning andmeid sel temperatuuril ei saadud. Kõige optimaalsemaks temperatuuriks osutus 20°C, mis võib esmapilgul tunduda veidi vastuoluline, sest *E. coli* bakteri enda optimaalne kasvutemperatuur on hoopis 36-37°C. Seega võiks

mõelda, et pigem 30°C on GST-Irc3 valgu ekspressioon kõrgem. Sellise tulemuse põhjuseks võib olla, et madalamal temperatuuril ei toimu bakterite nii kiiret pooldumist, mis võib tähendada, et bakter suunab keskkonnast saadud energia muude mehhanismide edasipüsimiseks ning tänu sellele toimub ka pikaajalisem liitvalgu ekspressioon bakteri rakkudes.

Samuti varieeriti aega, mille jooksul lasti rekombinantset valku raku kultuuril ekspresseerida. Kõige rohkem esines uuritavat valku 4h tundi peale indutseerimist. Sealt edasi oli märgatav, et mida kaugemale induktsiooni lõpp 4h jäi, seda vähemaks jäi ka valgu kogus. Siit võib järeldada, et *E. coli* rakkudes võidakse hakata degradeerima seda valku, kui see on saavutanud mingi kriitilise hulga või siis sõltub see ajast. See tähendab, et *E. coli* võtab lihtsalt teatud aja aega, et reageerida Irc3 olemasolule. Samuti oleks huvitav näha, milline oleks valgu ekspressioon enne 4h, et teada saada, kas just 4h on valgu kogus kõige kõrgem või on juba sellel hetkel hakanud liitvalgu kogus vähenema.

Viimase parameetrina varieeriti optilist tihedust, mille juures raku kultuuri indutseeriti. Need olid vastavalt 0,4, 0,6, 0,8 ja 1,0. Kõige kõrgem oli valgu tase OD 0,4 juures. See tulemus on ka loogiline, sest kõige madalama tiheduse juures on kultuuris iga raku kohta kõige rohkem toitaineid ja see võimaldab ka kõige kauem efektiivselt liivalku toota, sest kuna teistel kultuuridel alustati induktsiooni kõrgema OD juures jõuavad ka need kultuurid kiiremini toitainete puudusesse.

Kui optimaalsed ekspressiooni tingimused olid leitud, isoleeriti GST-Irc3 liitvalk 4L kultuurist, et saada puhast Irc3 valku piisavalt suures koguses ning viia hiljem läbi valgu funktsionaalseid katseid. Oluline puhastusetapp oli glutatioonil põhinev agarooosi maatriksil puhastamine, kus GST valk seostub glutatiooniga. See aitas uuritavat valku välja puhastada rakulüsaadist. Peale seda lõigati liitvalk proteolüütiliselt Irc3 ja GST valguks. Selleks kasutati TEV proteaasi, mis seondub kahe valgu vahel olevale E-N-L-Y-F-Q/-S animohappelisele järjestusele ja lõikab ahela "/" märgitud kohast katki. Lahuses olev Irc3 valku puhastati edasi *S-Sepharose*'i maatriksil, mis põhineb ionvahetuskromatograafial. Sellel kolonnil puhastati valgulahusest välja GST ja TEV ning vähendati teiste polüpeptiidide sisaldust lõpplahuses. Sealt saadud Irc3 valgu lahus oli piisavalt puhas, et sellega teostada funktsionaalseid katseid. Selle töö raames prooviti puhastada valku veel ka hepariini kolonnil, kuid sealt saadud fraktsioonides oli Irc3 kontsentratsioon palju madalama (tulemustes mitte näidatud). Seepärast otsustati, et *S-Sepharose*'lt saadud lahust edasi ei puhastata. Samas kui edaspidistes funktsionaalsetes katsetes on soovi kasutada lahust, mis on täiesti puhas muudest

kontaminantidest peaks kindlasti Irc3 puhastama veel ka hepariini kolonnil, sest sealt saadud fraktsioonides on Irc3 preparaat kõige puhtam.

4 L kultuurist puhastatud Irc3 lahuse kogus, mida otsustati kasutada aktiivsuse testimiseks, oli 0,45 ml. Selles ruumalas oli hinnanguliselt 740 μg Irc3 ensüümi. Samas suurusjärgus on Irc3 valgu saagis ka kasvatamisel M9 söötmel (Natalja Garber ja Vlad Piljukov, publitseerimata andmed).

Viimase etapina viidi läbi Irc3 ATPaassed aktiivsuse mõõtmised, et kontrollida saadud Irc3 preparaadi funktsionaalset aktiivsust. Aktiivsuse katsetes kasutati kofaktorina 35 bp lineaarset dsDNA molekuli. Varasemad tööd on näidanud, et Irc3 on DNA-sõltuv helikaas, mis kuulub DExH/D-*box* helikaaside gruppi (Sedman et al., 2014). Pärimi mitokondritest on leitud peale Irc3 veel 3 teist samasse gruppi kuuluvat helikaasi. Irc3 erineb neist kõigist sellega, et on ainus, mis on DNA-sõltuv helikaas (Szczyrny et al., 2013). Käesolevas töös Irc3 tehtud funktsionaalsed katsed näitasid, et ensüümil oli peale selle puhastamist aktiivsus säilinud. Lineweaver-Burki graafiku abil leiti, et antud reaktsiooni maksimaalne kiirus $V_{\max} = 0,048$ mM/min ja ensüümi katalüütiline konstant $k_{\text{cat}} = 24,2 \text{ s}^{-1}$. See näitab, et Irc3 konverteerib sekundis ligikaudu 24 ATP molekuli ADP'ks ja fosfaadiks. Nendest tulemustest saab seega järeldada, et antud tingimustel ekspresseeritud ja isoleeritud Irc3 helikaas on aktiivne.

Antud katsed viidi läbi 30°C. Edasipidi oleks huvitav näha kuidas varieerub ensüümi kineetika erinevatel temperatuuridel. Samuti oleks huvitav uurida Irc3 ensüümi DNA'ga seondumise termodünaamikat näiteks mikrokalorimeetriliselt ja uurida, kuidas toimub selle helikaasi seondumine DNA ahelale.

Kokkuvõte

Selle töö peamised eesmärgid oli esiteks leida optimaalsed tingimused ekspresseerimaks Irc3 helikaasi *E. coli* BL21 RIL tüvedes. Teiseks isoleerida suures koguses ja puhas Irc3 valk ning kolmandaks viia läbi ensüümi aktiivsuse katsed, et näha, kas helikaasil on säilinud oma funktsionaalsus *in vitro* tingimustes. Irc3 ekspressiooniks kasutati pGEX 4TEV-Irc3 plasmidi. Antud vektorisse ligeeritud IRC3 geenilt oli selle N-terminaalne signaaljärjestus eemaldatud, sest see osa puudub ka funktsionaalsel Irc3 valgul *in vivo* tingimustes. Uuritav helikaas ekspresseeriti plasmiidilt liitvalguna, GST-Irc3 valk, kus GST valgu osa kasutati selle isoleerimisel afiinsuskromatograafiliselt. Hiljem GST valk eemaldati kasutades TEV proteaasi.

Antud töö peamine erinevus eelnevatest meie õppetoolis läbiviidud Irc3 helikaasiga seotud töödest seisneb erinevates ekspressiooni tingimustes. Varasemalt ei ole antud valgu ekspressiooni läbi viidud LB söötmel ja kasvutemperatuuril 20°C.

Töö esimeses osas varieeriti kolme erinevat parameetrit: temperatuur, aeg ja optiline tihedus. Katsetes varieeritud temperatuuridest osutus kõige optimaalsemaks 20°C. Andmed näitasid, et optimaalseim OD, mille juures kultuuri indutseerida, on 0,4. Ajalisest aspektist esines kõige rohkem valku kultuurides, mille induksioon oli lõpetatud 4h peale selle algust. Seega ekspresseeriti Irc3 edasi just nendes tingimustes.

Teises osa puhastati uuritavat valku suurest mahust kuluurist. 4 l kultuurist õnnestus isoleerida 740 µg Irc3 ensüümi, mille ligikaudne kontsentratsioon oli 1,65 mg/ml. Puhastatud valgu fraktsioonid jaotati 5 µl alikvootidesse ja hoiustati -80°C külmikus.

Töö kolmandas osas tehti puhastatud Irc3 valgulahuse alikvootidega radioisotoopsed aktiivsuse katsed, kus varieeriti antud helikaasi substraadi, ATP, kontsentratsiooni. Saadud tulemustest tehtud Lineweaver-Burki graafikust leiti, et antud reaktsiooni maksimaalne kiirus $V_{\max}=0,048$ mM/min ja ensüümi katalüütiline konstant $k_{\text{cat}}=24,2$ s⁻¹. Need tulemused näitasid, et valgu aktiivsus oli *in vitro* tingimustes säilinud. Seega järeldati katsete tulemustest, et antud tingimustel Irc3 valgu ekspresseerimine ja puhastamine ei riku uuritava valgu aktiivsust ja funktsiooni.

Summary

Expression of Irc3 helicase from *Saccharomyces cerevisiae* in *E.coli* BL21 RIL strains and its functional analysis

Irc3 (increased recombination centres) enzyme is a mitochondrial DNA helicase found in *Saccharomyces cerevisiae*. Previous studies in our department have revealed that Irc3 is a DNA-dependant ATPase. Irc3 is a Superfamily II enzyme that has a direct role in mitochondrial DNA maintenance. It has been shown that Irc3 helicase binds preferentially to Holliday junctions and replication forks. Irc3 is a mtDNA branch migration enzyme that catalyzes fork regression or inhibits the formation of irregular branched mtDNA intermediates (Gaidutšik et al., 2016).

The aim of this study was to express Irc3 helicase in *E. coli* bacteria as recombinant protein, purify the protein and test the protein in a functional ATPase assay. For Irc3 expression I used a novel pGEX 4TEV-Irc3 expression vector that is a derivation of vector pGEX 4T1. The truncated IRC3 gene with deleted N-terminal mitochondrial localization signal sequence was cloned into the plasmid which was expressed in *E. coli* BL21 RIL strain and in LB culture medium.

The first goal was to find the optimal conditions to induce the expression of Irc3 enzyme. Three different parameter were varied: temperature, optical density (OD) of the culture and inducing time. The results indicated that the most optimal conditions were in 20°C, OD 0,4 and the inducing time 4 h. In the second part of this study author used these optimal conditions to purify Irc3 in large-scale cultures. The protein was purified using GST-tag protein on glutathione agarose beads, followed by digestion with TEV protease and additional purification on S-Sepharose column. Approximately 740 µg of Irc3 protein per 4 l of cell culture was obtained with the concentration of 1,65 mg/ml.

Finally the author conducted an ATPase with the purified protein and demonstrated that Irc3 helicase has retained its activity. Therefore the author concluded that purification and expression of Irc3 protein under these conditions will not inactivate Irc3 helicase.

Kirjanduse loetelu

- Abdel-Monem, M., Dürwald, H., & Hoffmann-Berling, H. (1976). Enzymic Unwinding of DNA: 2. Chain Separation by an ATP-Dependent DNA Unwinding Enzyme. *European Journal of Biochemistry*. 65(2): 441–449.
- Ananthakrishnan, R., & Ehrlicher, A. (2007). The forces behind cell movement. *International Journal of Biological Sciences*. 3(5): 303–317.
- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science*. 181(4096): 223–230.
- Astumian, R. D., Mukherjee, S., & Warshel, A. (2016). The Physics and Physical Chemistry of Molecular Machines. *ChemPhysChem*. 1719–1741.
- Beyer, D. C., Spies, M., & Ghoneim, M. K. (2013). DNA Helicases and DNA Motor Proteins (Google eBook). *DNA Helicases and DNA Motor Proteins*. 17–46.
- Bianco, P. R. (2015). I came to a fork in the DNA and there was RecG. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 117(2–3): 1–8.
- Byrd, A. K., & Raney, K. D. (2013). Superfamily 2 helicases. *Frontiers in Bioscience*. 17: 2070–88.
- Caruthers, J. M., & McKay, D. B. (2002). Helicase structure and mechanism. *Current Opinion in Structural Biology*. 12(1): 123–133.
- Fairman-Williams, M. E., Guenther, U. P., & Jankowsky, E. (2010). SF1 and SF2 helicases: Family matters. *Current Opinion in Structural Biology*. 20(3): 313–324.
- Gaidutšik, I., Sedman, T., Sillamaa, S., & Sedman, J. (2016). Irc3 is a mitochondrial DNA branch migration enzyme. *Scientific Reports*. 6(January): 26414. <https://doi.org/10.1038/srep26414>
- 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 Research*. 17(12): 4713–4730.

- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R., & Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87(12): 4645–4649.
- Hehman, G. L., & Hauswirth, W. W. (1992). DNA helicase from mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89(18): 8562–6.
- Hotta, Y., & Stern, H. (1978). DNA unwinding protein from meiotic cells of *Lilium*. *Biochemistry*. 17(10): 1872–1880.
- Jankowsky, E., & Jankowsky, a. (2000). The DExH/D protein family database. *Nucleic Acids Research*. 28(1): 333–334.
- Lohman, T. M., & Bjornson, K. P. (1996). Mechanisms of Helicase-Catalyzed DNA Unwinding. *Annual Review of Biochemistry*. 65(1): 169–214.
- Maleszka, R., Skelly, P. J., & Clark-Walker, G. D. (1991). Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *The EMBO Journal*. 10(12): 3923–3929.
- Phillips, R., Kondev, J., Theriot, J., Garcia., G. H. 2013. Physical Biology of the Cell, p. 623-681. In Gelbart, B., Joanny, F. J., Kolomeisky T., ..., Xing J. Dynamics of Molecular Motors, 2nd ed., Garland Science, New York.
- Purcell, E. M. (1976). Life at low Reynolds number. *American Journal of Physics*. 45: 1–36.
- Rienzo, C. Di, Piazza, V., Gratton, E., Beltram, F., & Cardarelli, F. (2014). Probing short-range protein Brownian motion in the cytoplasm of living cells. *Nature Communications*. 5: 1–8.
- Roberts, A. J., Kon, T., Knight, P. J., Sutoh, K., & Burgess, S. a. (2013). Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 14(11): 713–26.
- Ruan, L., Zhou, C., Jin, E., Kucharavy, A., Zhang, Y., Wen, Z., ... Li, R. (2017). Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria. *Nature*. 543: 443-446.
- 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.
- Sedman, T., Gaidutšik, I., Villemson, K., Hou, Y., & Sedman, J. (2014). Double-stranded DNA-dependent ATPase Irc3p is directly involved in mitochondrial genome maintenance. *Nucleic Acids Research*. 42(21): 13214–13227.
- Sengoku, T., Nureki, O., Nakamura, A., Kobayashi, S., & Yokoyama, S. (2006). Structural Basis for RNA Unwinding by the DEAD-Box Protein *Drosophila* Vasa. *Cell*. 125(2): 287–300.
- Shin, J. H., & Kelman, Z. (2006). The replicative helicases of bacteria, archaea, and eukarya can unwind RNA-DNA hybrid substrates. *Journal of Biological Chemistry*. 281(37): 26914–26921.
- 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.
- Singleton, M. R., Dillingham, M. S., & Wigley, D. B. (2007). Structure and Mechanism of Helicases and Nucleic Acid Translocases. *Annual Review of Biochemistry*. 76: 23-50.
- Szczesny, R. J., Wojcik, M. A., Borowski, L. S., Szewczyk, M. J., Skrok, M. M., Golik, P., & Stepien, P. P. (2013). Yeast and human mitochondrial helicases. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 1829(8): 842–853.
- Zhang, X. D., Dou, S. X., Xie, P., Hu, J. S., Wang, P. Y., & Xu, G. X. (2006). *Escherichia coli* RecQ is a rapid, efficient, and monomeric helicase. *Journal of Biological Chemistry*. 281(18): 12655–12663.
- Technologies. Agilent. (2010). BL21-CodonPlus Competent Cells Instruction Manual.
- Tuteja, N., Phan, T.-N., & Tewari, K. (1996). Purification and characterization of a DNA helicase from pea chloroplast that translocates in the 3'-5' direction. *European Journal of Biochemistry*. 238(1): 54–63.
- Tuteja, N., & Tuteja, R. (2004). Prokaryotic and eukaryotic DNA helicases. *European Journal of Biochemistry*. 1848: 1835–1848.
- Tuteja, N., Tuteja, R., Rahman, K., Kang, L. Y., & Falaschi, A. (1990). A DNA helicase from

- human cells. *Nucleic Acids Research*, 18(23), 6785–6792.
- Umezū, K., Nakayama, K., & Nakayama, H. (1990). *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87(14): 5363–7.
- Vale, R. D., & Oosawa, F. (1990). Protein motors and Maxwell's demons: does mechanochemical transduction involve a thermal ratchet? *Advances in Biophysics*. 26: 97–134.
- Vale, R., Reese, T., & Sheetz, M. (1985). Identification of a Novel Force-Generating Protein, Kinesin, Involved in Microtubule-Based Motility. *Cell*. 42(1): 39–50.
- Walker, M. J. 2009. The Protein Protocols Handbook, p. 3-7. In Aitken, A., Learmonth, P., M., *Protein Determination by UV Absorption*, 3rd ed., Humana Press, New York.
- Waugh, D. S. (2010). TEV Protease FAQ, (September).
- Venkatesan, M., Silver, L. L., & Nossal, N. G. (1982). Bacteriophage T4 gene 41 protein, required for the synthesis of RNA primers, is also a DNA helicase. *Journal of Biological Chemistry*. 257(20): 12426–12434.
- Vologodskii, A. (2006). Energy transformation in biological molecular motors. *Physics of Life Reviews*. 3: 119–132.
- Yang, L., Ji, X., & Liu, S. (2017). The free energy landscape of protein folding and dynamics : a global view. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 1102: 982-992.
- <http://huayueyang.com.cn/product/277323825> (17.05.17)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Mihkel Kõbin (15.02.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose *Saccharomyces cerevisiae* helikaasi Irc3 ekspresseerimine *E.coli* BL 21 RIL tüvedes ja puhastatud valgu funktsionaalne analüüs

mille juhendaja on Juhan Sedman

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 29.05.17