

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÜLDISE JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

***Ogataea polymorpha* helikaasi Irc3 funktsionaalsuse uurimine N-terminaalse  
domeeni analüüsi kaudu**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Jakob Mäeots

Juhendaja Tiina Sedman, PhD

professor Juhan Sedman

TARTU 2023

# ***Ogataea polymorpha* helikaasi Irc3 funktsionaalsuse uurimine N-terminaalse domeeni analüüsi kaudu**

Bakalaureusetöö

Jakob Mäeots

**Lühikokkuvõte.** Irc3 on üks kuuest *Saccharomyces cerevisiae* kirjeldatud mitokondriaalsest helikaasist. Irc3 *in vitro* analüüsi on takistanud *S. cerevisiae* valgu tagasihoidlik termostabiilsus. Antud töö eesmärk oli valmistada OpIRC3 N- ja C-terminaalsete domeenide ekspressiooni plasmiidid, testida kas neid plasmide on võimalik kasutada nende valkude ekspressiooniks. Töö käigus puhastati OpIrc3 helikaasi N-terminaalne domeen ning võrreldi selle valgu ATP hüdrolüütilist aktiivsust täispika OpIrc3 valgu vastu. Tööst selgus, et OpIrc3 N-terminaalse domeeni ATP hüdrolüüsi aktiivsus on 10 korda madalam kui täispika OpIrc3 valgu oma.

**CERCS teaduseriala:** P310 Proteiinid, ensüümid

Märksõnad: Irc3, helikaas, valgu puhastus, biokeemiline analüüs, mitokonder

## **Investigation of the functionality of the *Ogataea polymorpha* helicase Irc3 via N-terminal domain analysis**

Bachelor's thesis

Jakob Mäeots

**Abstract.** Irc3 is one of six mitochondrial helicases described from *Saccharomyces cerevisiae*. *In vitro* analysis of Irc3 has been hampered by the modest thermostability of the *S. cerevisiae* protein. The aim of this work was to construct plasmids for the expression of the N- and C-terminal domains of OpIRC3, to test whether these plasmids can be used for the expression of these proteins. During the work, the N-terminal domain of the OpIrc3 helicase was purified and the ATP hydrolytic activity of the N-terminal was compared with the full-length OpIrc3 protein. It was found that the N-terminal domain has 10 times lower activity than the full-length OpIrc3 protein.

**CERCS research specialization:** P310 Proteins, enzymes

Keywords: Irc3, helicase, protein purification, biochemical analysis, mitochondrion

# Sisukord

<b>KASUTATUD LÜHENDID .....</b>	<b>5</b>
<b>SISSEJUHATUS .....</b>	<b>6</b>
<b>1. KIRJANDUSLIK OSA .....</b>	<b>8</b>
1.1. HELIKAASID UURIMISE AJALUGU .....	8
1.2. HELIKAASIDE KLASSIFIKATSIOON .....	9
1.3. SF II HELIKAASID .....	9
1.4. IRC3 HELIKAAS.....	11
<b>2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....</b>	<b>14</b>
2.1. TÖÖ EESMÄRK .....	14
2.2. MATERJALID JA METOODIKA .....	14
2.2.1. Töös kasutatud tüved ja söötmed .....	14
2.2.2. Puhvrid .....	15
2.2.3. Plasmiidid, praimerid ja oligonukleotiidid .....	16
2.2.4. PCR reaktsioonid.....	18
2.2.5. Agaroosgeelelektroforees.....	18
2.2.6. N416, N385, C351, C416 OPIRC3 EKSPRESSIOONI PLASMIIDIDE VALMISTAMINE.....	19
2.2.6.1. Restriktsiooni ja ligeerimisreaktsioonid.....	19
2.2.6.2. E. coli DH5α rakkude transformeerimine ligeeritud plasmiididega .....	20
2.2.6.3. OpIRC3 N- ja C-terminaalsete plasmiidsete DNA-de väljapuhastamine ja kontroll .....	21
2.2.7. N- JA C-TERMINAALSETE OPIRC3 VALKUDE EKSPRESSEERIMINE E. COLI BL21 DE3 RIL RAKKUNES ..	21
2.2.7.1. Rakkude kogumine ja lüüsimine .....	22
2.2.7.2. Valkude puhastamine .....	22
2.2.7.3. OpIrc3 valkude ekspressiooni kontrollimine .....	23
2.2.7.4. OpIrc3 N416 puhastamine suures mahus.....	23

2.2.8. VALGUANALÜÜS .....	25
2.2.8.1. Naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforees (SDS-PAGE) .....	25
2.2.8.2. Valgu kontsentratsiooni hindamine Bradfordi meetodil.....	25
2.6.3 Kontsentratsiooni määramine Nanodropiga.....	26
2.6.4 ATP hüdroolüüsi aktiivsuse määramine .....	26
<b>2.3. TULEMUSED .....</b>	<b>26</b>
2.3.1 OPIRC3 N-TERMINAALSETE JA C-TERMINAALSETE EKSPRESSIOONI PLASMIIDIDE VALMISTAMINE .....	26
2.3.2 SUMO-OPIRC3 N416, N385, C415, C351 VALKUDE EKSPRESSIOONI KONTROLLIMINE .....	29
2.3.3. OPIRC3 N416 EKSPRESSIOONI PROTOKOLLI VÄLJA TÖÖTAMINE.....	31
2.3.4. VALGU KONTSENTRATSIOONI MÄÄRAMINE .....	33
2.3.5. OPIRC3 N416 ATP HÜDROLÜÜSIMISE AKTIIVSUS.....	34
<b>2.4 ARUTELU .....</b>	<b>36</b>
<b>KOKKUVÕTE .....</b>	<b>40</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>41</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS .....</b>	<b>43</b>
<b>LISAD.....</b>	<b>48</b>

## Kasutatud lühendid

Cam – klooramfenikool

ddH<sub>2</sub>O – kahekordselt destilleeritud vesi

dsDNA – kaheaheelaline DNA

DTT – ditiotreitool

EtOH- etanool

Kan – kanamütsiin

mtDNA – mitokondriaalne DNA

NAPS - amoonium persulfaat

PAGE – polüakrüülamiid geelelektroforees

rpm - pööret minutis

RT – toatemperatuur

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat

SF – superperekond

ssDNA – üheaheelaline DNA

TEMED - tetrametüületüleendiamiin

WT – metsiktüüpi

## Sissejuhatus

Mitokonder on rakuorganell, mis omab eraldi genoomi ning mille oluliseks funktsiooniks on raku ATP-ga varustamine. Mitokondri metabolismis on oluline roll nii mitokondriaalse DNA enda poolt kui ka raku tuuma genoomi poolt kodeeritud valkudel. Üheks selliseks näiteks on raku tuuma poolt kodeeritud helikaasid, mis on laialdaselt levinud erinevate organismide seas ning on teadaolevalt vajalikud nukleiinhappe ainevahetuse kõikides osades. Seetõttu mängivad helikaasid olulist rolli raku funktsionaalsuse ja genoomi terviklikkuse säilitamise juures. Mitokondriaalseid helikaase kodeerivate geenide katkestamine pärmis *S. cerevisiae* toob tavaliselt kaasa WT mtDNA täieliku või osalise kadumise ja mutantidel ilmneb klassikaline *petite* fenotüüp – väikeste pärmikolooniate moodustumine käärivate suhkrute piiratud koguste juuresolekul, mis on iseloomulik hingamispuudulikkusega pärmimutantidele (Sedman jt., 2000) (De Silva jt., 2013) (Merz ja Westermann, 2009) (Lahaye jt., 1991) (Séraphin jt., 1989) (Stepien jt., 1992).

Punguva pärmii liigis *Saccharomyces cerevisiae* on kirjeldatud 6 mitokondriaalset helikaasi ja enamik neist näib olevat suures osas konserveerunud erinevates pärmiliikides (Szczesny jt., 2013). Järjestuse sarnasuse põhjal on määratletud 2 suurt superperekonda ja mitu väiksemat helikaaside superperekonda (Singleton jt., 2007) (Fairman-Williams jt., 2010).

Irc3 on superperekonna 2 helikaas, mis algselt avastati ülegenoomilise sõeluuringu käigus, kus uuriti pärmimutante, millel oli kõrge rekombinatsiooni keskuste tase tuuma DNA-s (Alvaro jt., 2007). Järgnevad uuringud on näidanud, et Irc3 valk lokaliseerub pärmii mitokondrites ja on hädavajalik mitokondriaalse DNA stabiilsuse säilitamiseks (Sedman jt., 2014).

Puhastatud *S. cerevisiae* Irc3 (ScIrc3) tagasihoidlik termiline stabiilsus on takistanud valgu üksikasjalikke funktsionaalseid ja struktuurilisi uuringuid *in vitro*. Seetõttu on viimastel aastatel hakatud uurima termotolerantse pärmii *O. Polymorpha* Irc3 valku (Oplrc3). *In silico* analüüs Oplrc3 valgust on näidanud sarnast mitokondriaalse maatriksi lokaliseerumise signaali nagu ScIrc3, sellele järgnevad konserveerunud RecA1 ja RecA2 domeenid. Sellest saab järeldada, et Irc3 N-terminaalne domeen on mõlemal puhul sarnane. C-terminaalne domeen on Irc3 homologide seas vähem konserveerunud ja on Oplrc3 puhul tunduvalt väiksem (Piljukov jt., 2023).

Helikaaside struktuuri ja funktsiooni uurimine on oluline meie teadmiste edendamiseks põhiliste bioloogiliste protsesside, DNA replikatsiooni ja reparatsiooni, geneetilise rekombinatsiooni, RNA töötlemise ja haiguse mehhanismide kohta. Selline uurimistöö võib viia uute diagnostikavahendite, terapeutiliste sekkumiste ja sügavama arusaamiseni rakkude ja organismide keerulisest toimimisest.

Käesoleva töö eesmärk on valmistada Oplrc3 valgu N- ja C-terminaalseid ekspressiooni plasmiidid, testida kas nende pealt on võimalik disainitud Oplrc3 valke ekspresseerida. Seejärel puhastada Oplrc3 N-terminaalne valk Oplrc3 N416 ning teostada ATP hüdrolüüsi aktiivsuse katse, et võrrelda selle aktiivsust täispika Oplrc3 valguga.

# 1. Kirjanduslik osa

## 1.1. Helikaasid uurimise ajalugu

Helikaasid on ensüümid, mis mängivad nukleiinhapete metabolismis olulist rolli. Peaaegu kõik DNA-d või RNA-d hõlmavad bioloogilised protsessid kasutavad ühte või mitut helikaasi, sealhulgas DNA replikatsioon, rekombinatsioon, reparatsioon, translatsioon, ribosoomi süntees, RNA transkriptsioon, tuumast välja transportimise protsessid ja splaiising (Matson ja Kaiser-Rogers, 1990) (Lohman ja Bjornson, 1996) (Singelton jt., 2007). Helikaaside põhiülesanne on lahti harutada kaksikahelalised nukleiinhapped, nagu DNA, RNA kui ka DNA-RNA hübriidseid kaksikahelaid. (Caruthers ja McKay, 2002) (Fairman-Williams jt., 2010).

Esimene helikaas avastati 1976. aastal bakterist *Escherichia coli* (Abdel-Monem jt., 1976). Mõiste helikaas võeti kasutusele kaks aastat hiljem Hoffmann-Berlingi poolt (Kuhn jt., 1979). Samal aastal avastati ka esimene eukarüootne helikaas *Lilium* perekonna taime meiotootilistes rakkudes (Hotta ja Stern, 1978). 1980. aastatel avastati esimesed helikaasid viiruste ja bakteriofaagide seas, kus tehti ka esimesed biokeemilised testid nende ensüümidega mõõtes valkude aktiivsust (Venkatesan jt., 1982). 1980. aastate lõpus avastati helikaasidele omased konserveerunud domeenid ning defineeriti kaks helikaaside superperekonda. Nendeks olid superperekonnad SF 1 ja SF 2 (Gorbalenya jt., 1989). Sellele järgnesid veise mitokondriaalse helikaasi ja herne kloroplastide helikaaside puhastamine (Tuteja jt., 1996) (Hehman ja Hauswirth, 1992). Helikaaside uurimises on olnud olulised veel ka esimese inimese helikaasi, HDH, avastamine ja RecQ helikaasi isoleerimine *E. coli* organismist (Umezu jt., 1990) (Tuteja jt., 1990). SF2 kuuluvaid RecQ-sarnaseid valke avastati edaspidi veel teisteski organismides, sealhulgas mitu inimesest, ning on loodud ka eraldi RecQ valkude perekond. Vähemalt viis selle perekonna helikaasi esineb ka inimese organismis: WRN, BLM, RECQ4, RECQ5 ja REQL. (Tuteja ja Tuteja, 2004). Mutatsioonid helikaasides WRN, BLM ja RECQ4 on haigustega Wernerini sündroom, Bloomi sündroom ja Rothmund Thomsoni sündroom. Kõiki kolme haigust iseloomustavad kromosomaalne ebastabiilsus, kasvus mahajäämine, enneaegne vananemine ja eelsoodumus pahaloomuliste kasvujatele (Yu jt., 1996) (Ellis jt., 1995) (Kitao jt., 1999).

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 (Wu & Spies, 2013).

## 1.2. Helikaaside klassifikatsioon

Helikaasid on motoorsed valgud, mis translokeeruvad mööda nukleiinhappeid, kasutades NTP hüdroolüüsi energiat nukleiinhapete kaksikheeliksi lahti harutamiseks (Caruthers ja McKay, 2002) (Fairman-Williams jt., 2010). Selliste mootorvalkude liikumist substraadil iseloomustab tsüklikilisus, ehk NTP hüdroolüüsist vabanevast energiast peab jätkuma kaksikahela lahti harutamiseks kui ka uue tsükli alustamiseks (Wu & Spies, 2013). Helikaasi aktiivsust reguleerib iseseisev kokkupanek ja/või koostoime lisavalkudega (Lohman jt., 2008).

Helikaase on võimalik jaotada erinevate struktuursete ja biokeemiliste tunnuste järgi. Esiteks on võimalik helikaase jaotada selle järgi, millist nukleiinhapet substraadina kasutavad. (Lohman ja Bjornson, 1996). Teiseks liigitatakse järjestuse ning võrdleva struktuuri- ja funktsionaalanalüüsi põhjal kuueks superperekonmaks (Singleton jt., 2007) (Gorbalenya ja Koonin, 1993). Nad võivad moodustada oligomeerseid rõngaid või mitte. Heksameere mitte moodustavate helikaasid kuuluvad SF 1 ja SF 2 hulka, heksameere moodustavad helikaasid kuuluvad SF 3 kuni 6. Helikaase saab kategoriseerida ka translokatsioonilise liikumise alusel. A tüüpi helikaasid liiguvad 3'-5' suunas ning B tüüpi helikaasid 5'-3' suunas. Protsessiivsuse alusel jagatakse helikaasid kas protsessiivseteks või distributiivseteks helikaasideks, olenevalt kui pikki substraate helikaasid lahti harutavad (Singleton jt., 2007).

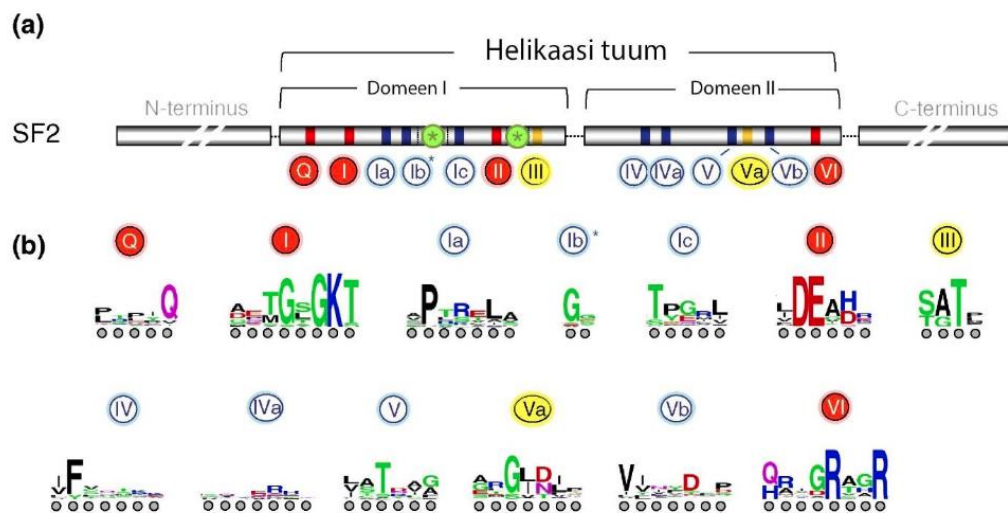
Helikaase on kirjeldatud eukarüootides ja prokarüootides. SF1 ja SF2-te kuuluvaid helikaase on leitud kõikides organismides (Caruthers ja McKay, 2002).

## 1.3. SF II helikaasid

Superperekonna II helikaasid viitavad helikaaside rühmale, millel on säilinud järjestuse motiivid kõikides perekondades. Helikaaside superperekonadest on see üks suurimaid ja mitmekesisemaid (Alicia K Byrd, 2012). SF2 helikaaside hulka kuuluvad RecQ-sarnased, RecG-

sarnased, Rad3/XPD, Ski2-sarnased, tüüp I restriktsooniensüüm, RIG-I-sarnased, NS3/NPH-II, DEAH/RHA, DEAD-box ja Swi/Snf perekonnad. (Alicia K Byrd, 2012). 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). Siiski ei teosta mõned perekonnad SF2-st, nagu tüüp I restriktsooniensüümid ja RIG-I, klassikalist helikaasi reaktsiooni, DNA kaksikhelikaasi lahti harutamist, vaid tüüp I restriktsooniensüümid viivad läbi restriktsooni reaktsioone ja RIG-I töötab immunsüsteemis ssRNA viiruste äratundjana (Loenen jt., 2014) (Deimling jt., 2014). SF2 helikaase kasutatakse transkriptsioonis, DNA reparatsioonis ja kromatiini ümberkorraldamises ning kõigis RNA ainevahetuse aspektides. SF2 iseloomustab 200-700 aminohappe pikkune helikaasi tuum, mis koosneb kahest RecA sarnasest konserveerunud helikaasi domeenist (Gorbalenya ja Koonin, 1993) (Singleton jt., 2007).

SF2 helikaaside tuumale on omased vähemalt 13 motiivi: algselt kindlaks tehtud motiividele I, Ia, II-VI on lisandunud ka Q, Ib, Ic, IVa, Va ja Vb (Joonis 1). Kõik need motiivid ei ole SF2 helikaaside perekondades konserveerunud (Gorbalenya ja Koonin, 1993). Iga perekonnale on omane kõrgelt konserveerunud motiivide muster (Fairman-Williams jt., 2010). Siiski on SF2 helikaase uurides näha, et kõige enam esinevad motiivid, mis on seotud nukleiinhappe või NTP-ga seondumisel. Sama trend on nähtav ka teistes SF-des. Motiividel I, II, ja VI on leitud oluline roll NTP-ga seostumisel ja selle hüdrolüüsimeel. (Sengoku jt., 2006). Nukleiinhappet seonduvad omadused on leitud motiividel Ia, Ib, Ic, IV, IVa, V ja Vb. Need motiivid on oma sekundaarstruktuurilt mõlemas RecA-sarnases domeenis väga sarnased (Fairman-Williams jt., 2010).



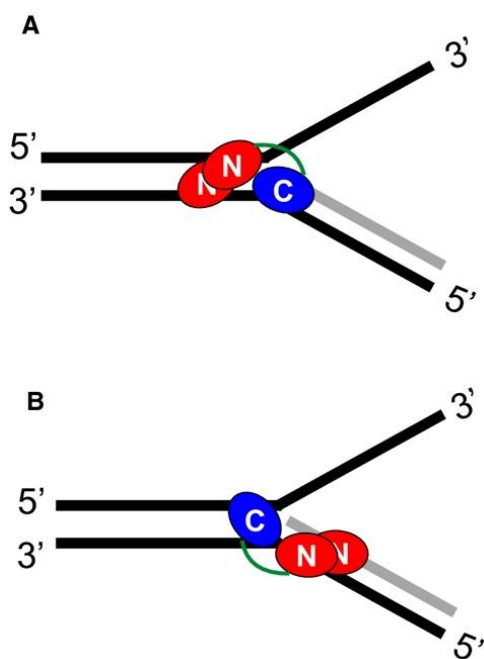
**Joonis 1. SF2-s olevad konserveerunud helikaasi motiivid. (a)** SF2 helikaaside tuumas paiknevate motiivide paigutus. Motiivid on märgitud kindlate värvidega ning tähistavad neile omast üldist biokeemilist funktsiooni. Punaselt märgitud motiivid osalevad ATP sidumises ja hüdrolüüsis, kollaselt märgitud nukleinhappe ja NTP sidumiskohti koordineerivad motiivid ning siniselt märgitud motiivid on seotud nukleinhappe sidumisega. Rohelised tärnid tähistavad lisadomeenide insertioonikohti. **(b)** Helikaasi motiivide konserveerumine. Tähe kõrgus motiivi järjestuses näitab aminohappejäägi konserveerumise taset – mida kõrgem täht, seda konserveerunum on aminohape. Tähtede värv tähistab aminohappe keemilisi omadusi: roheline ja lilla – polaarne, sinine – aluseline, punane – happeline ja must tähistab hüdrofoobset aminohapet (Fairman-Williams jt., 2010 järgi).

## 1.4. Irc3 helikaas

Pärmis *Saccharomyces cerevisiae* on kirjeldatud 6 mitokondriaalset helikaasi, mis on erinevates pärmi liikides suuresti konserveerunud (Szczytny jt., 2013). Nendeks helikaasideks on SF 1 DNA helikaasid Pif1 ja Hmi1 ning SF 2 helikaasid Irc3, Mss116, Suv3 ja Mrh4. Kõigi nimetatud helikaaside puhul on tõestatud nende olulisus mtDNA stabiilsuse säilitamiseks (Lahaye jt., 1991) (Schmidt jt., 2002) (Sedman jt., 2000) (Sedman jt., 2014) (Seraphin jt., 1989) (Stepien jt., 1992). Irc3 (*Increased recombination centers protein 3*) leiti koos 21 tundmatu valguga ülegenoomses *S. cerevisiae* genoomi skriiningu käigus (Alvaro jt., 2007). Järgnevate uuringute käigus tehti kindlaks, et Irc3 on lokaliseeritud mitokondrisse ning selle kadumine viib rakulise hingamise kadumiseni rakus ja mtDNA fragmenteerumiseni. Samuti leiti, et *S. cerevisiae* Irc3 ATP hüdrolüütiline aktiivsus sõltub dsDNAst ning Irc3 võib translokeeruda mööda dsDNA molekule. Irc3 peamine roll *S. cerevisiae* mtDNA metabolismis on tõenäoliselt

mtDNA kaheaahelised katkete mahasurumine. Hilisemad biokeemilised analüüsid näitasid, et Irc3 kasutab ATP-d, et remodelleerida replikatsioonikahvleid ja Holliday ühendusi ning seondub eelistatult X- ja Y-struktuuridega DNA molekulidele (Gaidutšik jt., 2016).

Järgnevalt viidi läbi uuringud *S. cerevisiae* Irc3 N-terminaalse ja C-terminaalse domeeni uurimiseks (valguga ruumiline struktuur leitav lisa 1). Irc3 N-terminaalse domeenil on näidatud sarnast dsDNA poolt stimuleeritud ATP hüdrolüütilist aktiivsust nagu täispikal Irc3 valgul, kuid Irc3 kaotab dsDNA peal translokeerumise võime kui C-terminaalne domeen deleteerida. See tuleneb sellest, et Irc3 C-terminaalne osa võib moodustada domeeni, mis tunneb ära hargnenud DNA ahelad (Sedman jt., 2017). Aastal 2020 avaldatud artiklis näidati, et Irc3 käitub monomeerse valguna ning eelistab lahti harutada hargnenud DNA mahajäävat ahelat. Töös pakuti välja ka kaks erinevat mudelit Irc3 seondumise kohta, selle skeem on näidatud joonisel 2 (Piljukov jt., 2020).

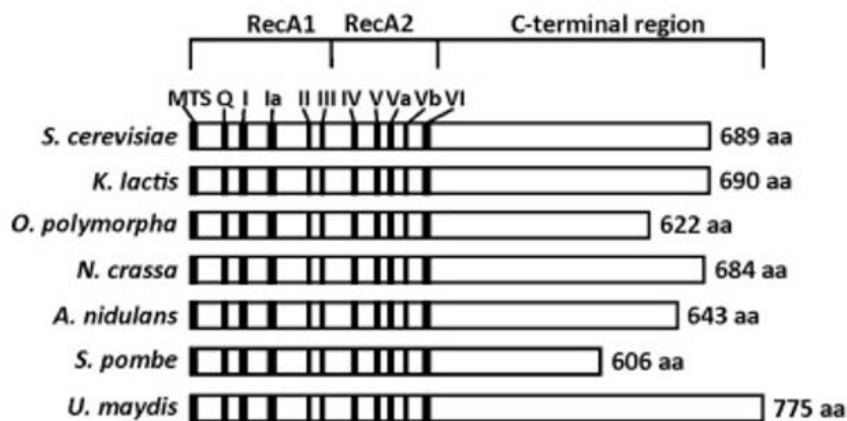


**Joonis 2. Irc3 valgu seondumine DNA kahvlile. (a)** N-terminaalse RecA-ga sarnased domeenid seonduvad kaheaahelisele DNA-le. **(b)** näitab kuidas RecA domeenid võivad seonduda kaksikahelalise DNA mahajäävale ahelale. Mõlemas mudelis käitub Irc3 C-terminaalne domeen kahvli äratundjana (Piljukov jt., 2020).

Viimastel aastatel on Tartu Ülikooli üldise ja mikroobibiokeemia laboris hakatud uurima termotolerantse pärmi *Ogataea polymorpha* Irc3 valgu (Oplrc3), sest selle ensümaatilise aktiivsuse ning struktuuri säilivad kuni 45 °C. *O. Polymorpha* Irc3 on üks *S. cerevisiae* Irc3 homologidest (82% sarnasus, 41% identsus) koos *K. lactise*, *N. crassa*, *A. nidulans*, *S. pombe* ja *U. maydis* Irc3 valkudega, mis on näidatud joonisel 3, paneelidel A ja B. Oplrc3-l on

tuvastatud ka nõrgemat ATP hüdrolüüsi aktiivsust ssDNA ning RNA substraadi olemasolul. See tähendab, et Oplrc3 võib omada nii DNA kui ka DNA-RNA spetsiifilisust *in vivo*. Katsed näitasid ka seda, et Oplrc3 ATP hüdrolüüsi aktiivsus on kõrgem dsDNA substraadi juuresolekul, aga DNA sidumine on efektiivsem ssDNA substraadi juuresolekul (Piljukov jt., 2023).

**A**



**B**

	Motif Q	Motif I	Motif Ia	Motif II	Motif III	Motif IV
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LRDYQQ	VSLATGGGKT	LILVHRRELA	DEAH	SAT	LLFGVD
<i>Kiyuveromyces lactis</i>	LRDYQQ	VSLATGGGKT	LILVHRRELA	DEAH	SAT	LLFAVD
<i>Ogataea polymorpha</i>	LRPYQQ	VSLATGGGKT	LILVHRKELA	DECH	SAT	LLFCVN
<i>Neurospora crassa</i>	LRDYQE	VSLATGAGKT	LIIAHRRELV	DEAH	SAT	LVFCVD
<i>Aspergillus nidulans</i>	LRDYQE	ISLATGAGKT	LIVVHRRELV	DEAH	SAT	LVFCVD
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	LRPYQE	VSLATGSGKT	LILVHRKELA	DEVH	TAT	LVFCIN
<i>Ustilago maydis</i>	LRPYQE	VSSPTGSGKT	AIIVNSIELA	DEAH	SAT	LIFAVN
	** **	:* **	*:.. **	** *	:**	*.* ::
	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	33	38	57	66	93	100
				158	161	190
						192
						284
						289
	Motif V	Motif Va	Motif Vb	Motif VI		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	VLMNC	TEGTD	ILL	QMIGRGLR		
<i>Kiyuveromyces lactis</i>	VLMNC	TEGTD	VLL	QMIGRGLR		
<i>Ogataea polymorpha</i>	VLMNC	TEGTD	IFI	QMVGRGLR		
<i>Neurospora crassa</i>	VLVNC	TEGTD	ILM	QMIGRGMR		
<i>Aspergillus nidulans</i>	VLLNC	TEGTD	ILM	QMIGRGMR		
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	VLVNC	TEGTD	LMI	QMIGRGLR		
<i>Ustilago maydis</i>	VLVNC	TEGAD	VLL	QMIGRGLR		
	**:*	***:*	:::	**:*		
	↑	↑	↑	↑		
	331	335	339	343		
					350	352
					364	371

**Joonis 3. Termotolerantse pärimi *O. Polymorpha* kodeerib *S. cerevisiae* helikaasi Irc3 homoloogi. (a) Skemaatilisel on näidatud 7 erineva pärmiliigi Irc3 helikaasid. (b): Irc3 konserveerunud helikaasi motiivid 7 erinevas pärimi liigis, „\*“ tähistab aminohapet, mis ei varieeru, „:“ tähistab aminohapet, mis on füüsikaliste ja keemiliste omaduste poolest üsna sarnased, „:“ tähistab aminohapet, mis on oma füüsikaliste ja keemiliste omaduste poolest sarnased (Piljukov, jt., 2023).**

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1. Töö eesmärk

Töö eesmärgid olid jaotatud kolmeks erinevaks etapiks:

- Esimene samm oli kloneerida Oplrc3 domeenid (N416, N385, C415, C351) ekspressioonivektorisse pET24d+ 10XHis-SUMO (joonis 4) ning kontrollida nende õigsust.
- Teiseks, kontrollida kas OpIRC3 on võimalik ekspresseerida BL21-CodonPlus(DE3)-RIL tüves.
- Kolmandaks puhastada Oplrc3 N416 valk suures mahus ning kontrollida saadud valgu ATP hüdrolüütilist aktiivsust.

### 2.2. Materjalid ja meetodika

#### 2.2.1. Töös kasutatud tüved ja söötmed

Tabel 1. Töös kasutatud söötmed

Söötme nimetus	Koostis	Allikas
LB ( <i>Luria Broth</i> ) sööde	(1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl. Tardsöötme puhul lisati 1,7% agarit)	Bertani, 1951
LB sööde, 50 µg/mL Kan	LB sööde + 50 µg/mL Kan	

LB sööde, 50 µg/mL Kan, 25 µg/mL Cam	LB sööde + 50 µg/mL Kan, 25 µg/mL Cam	
---	--	--

**Tabel 2. Töös kasutatud bakteritüved**

Bakteritüvi	Genotüüp	Allikas
<i>E. coli</i> DH5α	F- <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA- argF)U169, hsdR17(rKmK+), λ-</i>	Bethesda Research Laboratories, 1986
<i>E. coli</i> BL21 -CodonPlus(DE3)- RIL	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]</i>	Agilent

### 2.2.2. Puhvrid

**Tabel 3. Töös kasutatud puhvrid**

Puhvri nimetus	Koostis
T <sub>10</sub> E <sub>1</sub>	10 mM Tris -HCl pH 8, 1 mM EDTA
LB (lüüsipuhver)puhver	50mM Tris -HCl pH 8, 500 mM NaCl, 0,1% tween 20, 2 mM β- <i>mercaptoetanol</i> ja 10% glütserool
LB puhver, 15 mM imidasool (pH8)	50mM Tris -HCl pH 8, 500 mM NaCl, 0,1% tween 20, 2 mM β- <i>mercaptoetanol</i> ja 10% glütserool, 15 mM imidasool pH 8

LB puhver, 50 mM imidasool (pH8)	50mM Tris -HCl pH 8, 500 mM NaCl, 0,1% tween 20, 2 mM $\beta$ -mercaptoetanol ja 10% glütserool, 50 mM imidasool pH 8
LB puhver, 400 mM imidasool (pH8)	50mM Tris -HCl pH 8, 500 mM NaCl, 0,1% tween 20, 2 mM $\beta$ -mercaptoetanol ja 10% glütserool, 400 mM imidasool pH 8
FB puhver	50 mM Tris pH 8, 10% glütserool, 1% tween
FB puhver, 500 mM K-glutamaat	50 mM Tris pH 8, 10% glütserool, 1% tween, 500 mM K-glutamaat pH 8, 2 $\mu$ M DTT

### 2.2.3. Plasmiidid, praimerid ja oligonukleotiidid

**Tabel 4. Töös kasutatud plasmiidid**

Plasmiid			
pET24d+ 10XHis-SUMO	Kan resistentsusgeeni, SUMO-tag'i, T7 promootori, SUMO lõikesaidi ja LacI promootoriga rekombinantsete valkude ekspressioonivektor		Kingitud biokeemia laborile V. Hauryljuk poolt ning modifitseeritud V. Piljukovi poolt
pET24d+ 10XHis-SUMO N416	OpIRC3	pET24d+ 10XHis-SUMO + OpIRC3 N416 plasmiid	Valmistatud töö autori poolt
pET24d+ 10XHis-SUMO N385	OpIRC3	pET24d+ 10XHis-SUMO + OpIRC3 N385 plasmiid	Valmistatud töö autori poolt

pET24d+ SUMO C415	10XHis- OpIRC3	pET24d+ 10XHis-SUMO + OpIRC3 C415 plasmiid	Valmistatud töö autori poolt
pET24d+ SUMO C351	10XHis- OpIRC3	pET24d+ 10XHis-SUMO + OpIRC3 C351 plasmiid	Valmistatud töö autori poolt

**Tabel 5. Töös kasutatud oligonukleotiidid**

Oligo- nukleotiidid nimi	Järjestus	Milleks kasutati
Esp3I NEW SUMO-OpIRC3 delt.19 5'	TACCGTCTCTGGTGGGTCGAGTCTTTCTCTTCGCCCT	Kloneerimine
EcoRI NEW SUMO-OpIRC3 3'	ATCGAATTCTCATCTCGAGACTACGTATTTCTGGA	Kloneerimine
OpIRC3 C351 Esp3I 5'	TACCGTCTCTGGTGGGAGATGCTACGTGATTGACTTTG	Kloneerimine
OpIRC3 N416 EcoRI 3'	ATCGAATTCTTCGAAGATCTTTTGATAGCCATCAAG	Kloneerimine
OpIRC3 N385 EcoRI 3'	ATCGAATTCGCTTTCAAACAGAGAAACTCCG	Kloneerimine
OpIRC3 C415 Esp3I 5'	TACCGTCTCTGGTGGGTTGAAAAGTTTAAGGAGCAAG	Kloneerimine

45s DNA	GGGCAATTGTAATACGACTCACTATAGTAGACCTGCGG  TTGGATC	Oplrc3 ATP hüdrolüütilise aktiivsuse määramine
---------	---	---

#### 2.2.4. PCR reaktsioonid

Töö raames tehtud PCR reaktsioonid viidi läbi Biometra PCR'i masinas T1 Thermocycler. Ettevalmistavades PCR'i reaktsioonides kasutati Thermofischeri Scientific phusion polümeraasi. Reaktsioone korrati 25 tsükli. PCR programm, mida kasutati, koosnes ühekordsest 98 °C juures 2 min pikkusest eelkuumutusest, mille järel toimus 25 korduses 98°C 10 sek DNA denaturatsioon, 60 °C 20 sek praimerite seondumine, 72 °C 1 min DNA süntees. Irc3 mutantide konstrueerimiseks ja amplifitseerimiseks tehtud 50 µl PCR reaktsioonisegu sisaldas: 10 µl 5X Phusion GC puhvrit, 5 µl 2mM dNTP, 0,5 µM praimerit A, 0,5 µM praimerit B, 100 ng matriitsina kasutatavat plasmidi ning 0,5 U Phusion polümeraasi. Amplifitseeritud sisend DNA fragmente kontrolliti 0,8% agarosgeelil ning neid kasutati järgnevas töö etappides.

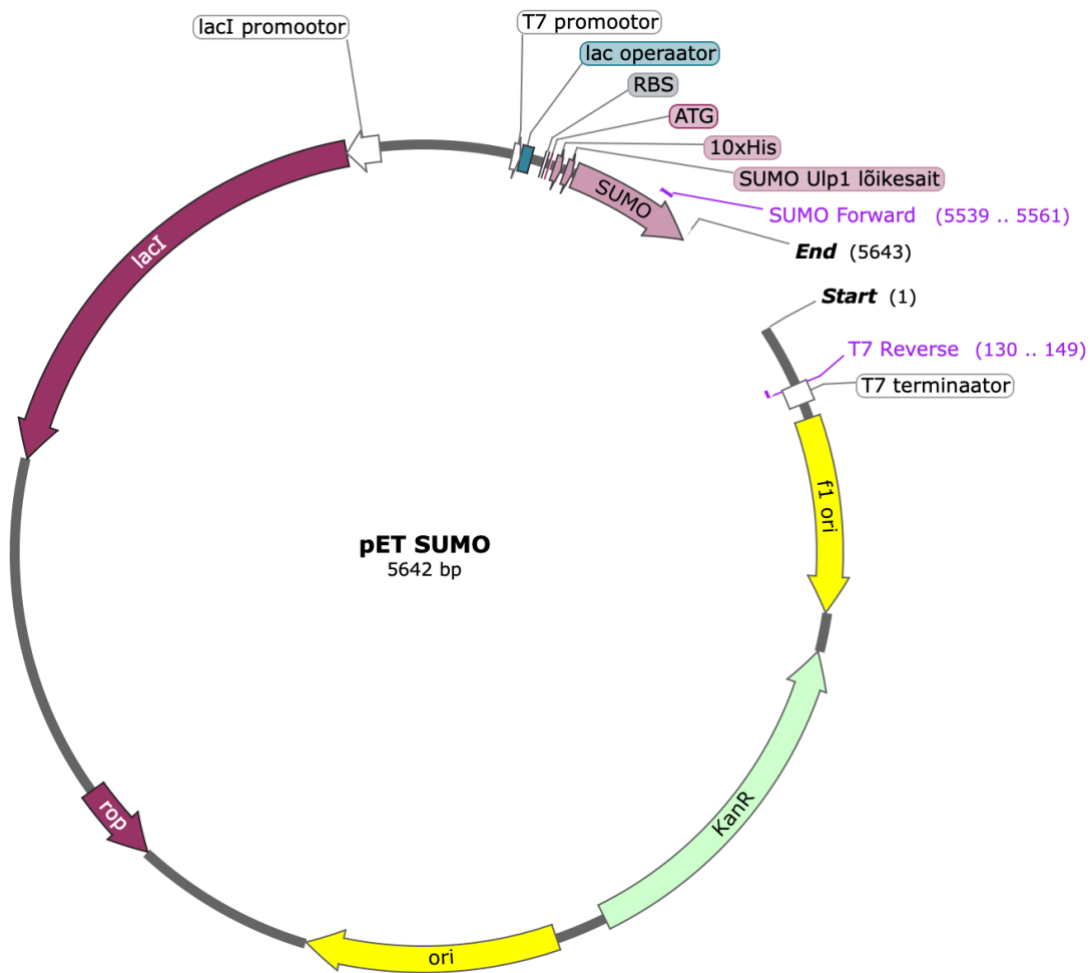
#### 2.2.5. Agarosgeelelektroforees

DNA eraldamis- ja klonerimistöode raames analüüsiti nukleiinhappeid agarosgeelelektroforeesil, mille käigus voolutati 1,5h 2-4 V/cm kohta 0,8% agarosgeel (0,8% agaros, 40mM Tris-atsetaat, 2mM EDTA [pH 8,5], EtBr 0,5 µg/ml) TAE puhvris (40mM Tris-atsetaat, 2mM EDTA [pH 8,5]). DNA geelile kandmiseks kasutati 6x TAE laadimispuhvrit (10 mM Tris-HCl [pH 7,6], 60mM EDTA, 60% glütserool, 0,25% broomfenoolsinine). Suurusmarkerina kasutati Thermofischer Scientific *GeneRuler 1 kb DNA ladder* markerit. Elektroforees toimus toatemperatuuril.

## 2.2.6. N416, N385, C351, C416 OpIRC3 ekspressiooni plasmiidide valmistamine

### 2.2.6.1. Restriktsiooni ja ligeerimisreaktsioonid

Ekspressiooniks kasutavate plasmiidide pET24d+ 10XHis-SUMO OpIRC3 (N416, N385, C415, C351) loomiseks teostati restriktsiooni- ja ligeerimisreaktsioonid, milles kasutati Thermofischer Scientific restriktase, T4 DNA ligaasi ja puhvreid. *FavorPrep GEL/PCR Purification Kit*’iga puhastatud sisend DNA lõigati Esp3I ja EcoRI restriktasidega ja plasmiid pET24d+ 10XHis-SUMO restrikteeriti EcoRI ja Eco31I restriktasidega. Ekspressioonivektori restriktsioonisegu sisaldas 3µL 10xGreen puhvrit, 1,5µL plasmidi pET24d+ 10XHis-SUMO (1,95µg) ning 8 U Eco31I. PCR produkti restriktsioonisegu sisaldas 3µL 10X Yellow Tango puhvrit, 0.6µL 50mM DTT, 8 U Esp3I ning 25,6µL PCR produkti. Reaktsioonisegu ruumala viidi mõlemal juhul 30 µL-ni ddH<sub>2</sub>O-ga. Restriktsiooni reaktsioon toimus 37 °C 3 h. Mõlemale produktile tehti fenoolkloroformi töötlus. Selleks lisati 170 µL T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>, 60 µg dekstraani, 20 µL 3M NaOAc (pH 8), millele lisati lisaks 80 µL fenool kloroformi (pH 8). Sellele segule tehti 30 sek *vortex*-it, 1min pausi ning uuesti 30 sek *vortex*. Lõpus tehti 2min 13 800 rpm peal tsentrifuugimist 2min Eppendorf Mini Spin tsentrifuugiga (rootor F45 12-11) ning pealmine kiht kanti uude tuubi, millele lisati 2,5 mahtu 96% EtOH, mis pandi -20 °C külmkappi sadenema. Seejärel tsentrifuugiti 5 min 13 800 rpm, eelmaldati supernatant, sadet pesti 70% etanooliga ning lahustati 25 µL T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>. Seejärel tehti mõlemale produktile veel teine lõikus EcoRI restriktasiga, kus lisati 25 µL restriktsiooni produktile 2,5 µL EcoRI 10X puhvrit 8 U EcoRI ja ruumala viidi 50 µL-ni. Restrikteeritud sisend DNA fragmendid ja pET24d+ 10XHis-SUMO plasmiid, mille skeem on näidatud joonisel 8, selekteeriti 0,8% agarosgeelil ning puhastati vastavalt *FavorPrep GEL/PCR Purification Kit* protokollile. Ligeerimisel kasutati DNA T4 ligaasi. Ligeerimiseks kasutatav ligeerimissegu maht oli 10 µL ning koosnes 1 µL T4 ligaasi 10x puhvrist, 1 U T4 Ligaasist, 3 µL-st restrikteeritud pET24d+ 10XHis-SUMO plasmidist ja 3 µL-st sisend DNA-st (N416, N385, C415, C351). Ligeerimisreaktsioon toimus toatemperatuuril 2 h.



**Joonis 4. pET24d+ SUMO vektorplasmidi skemaatiline joonis.** Ekspressiooni plasmiidide valmistamiseks kasutatud pET24d+ 10XHis-SUMO ekspressioonivektori skemaatiline joonis. Kommertsiaalse pET24d+ SUMO trombiini lõikamiskoht on asendatud SUMO Ulp1 lõikamiskohaga (SnapGene andmebaasi järgi).

#### 2.2.6.2. *E. coli* DH5 $\alpha$ rakkude transformeerimine ligeeritud plasmiididega

*E. coli* DH5 $\alpha$  rakke transformeeriti eelnevas etapis (2.2.6.1.) saadud ligeerimisseguga. Iga transformatsiooni jaoks võeti 50  $\mu$ L kompetentseid *E. coli* DH5 $\alpha$  rakke, millele lisati 3  $\mu$ L ligeerimissegu ja suspendeeriti õrnalt, protsess toimus 0  $^{\circ}$ C juures jääl. Rakke koos ligeerimisseguga hoiti 30 min jääl, pärast mida tehti rakkudele kuumašokk - 2 min 37  $^{\circ}$ C juures. Pärast kuumašokki rakud jahutati jää peal ning lisati rakkudele 500  $\mu$ L LB söödet (+ 20 mM MgSO<sub>4</sub> ja 0,8% Glükoos) ning hoiti 30 min 37  $^{\circ}$ C juures. Seejärel plaaditi 100  $\mu$ L-t rakke selektiivsele LB Kan 50  $\mu$ g/mL tardsöötmele ning kasvatati üleöö 16h 37  $^{\circ}$ C juures.

### 2.2.6.3. OpIRC3 N- ja C-terminaalsete plasmiidsete DNA-de väljapuhastamine ja kontroll

LB Kan 50µg/mL tardsöötmele kasvavate ekspressioonivektorit sisaldavate DH5α rakkude hulgast valiti iga ekspressioonivektori kohta kaks kolooniat ja kasvatati loksutil 16h 37 °C juures 3 mL-s LB vedelsöötmes, millele oli lisatud Kan 50 µg/mL lõppkontsentratsioonini. Pärast kasvamist tsentrifugeeriti baktiereid 4000 rpm 5 minutit Eppendorf Mini Spin tsentrifuugiga (rootor F45 12-11), mida kasutati kõigis antud etapi tsentrifugeerimistes. Pärast tsentrifugeerimist eemaldati supernatant ning töötati edasi 0 °C juures jääl. Rakkudele lisati 200 µL SOL I (25mM Tris HCl [pH 8], 50mM glükoos, 10mM EDTA) ja tehti *vortex*. Seejärel lisati 400 µL SOL II (0,2 M NaOH; 1% SDS) ning hoiti 5 min jääl. Edasi lisati 300 µL SOL III (3 M kaaliumatsetaat; 5 M äädikhape), segati ning hoiti jääl 10 min. Lahust tsentrifugeeriti 13400 rpm juures 5 min ja pärast seda eemaldati supernatant. Supernatandile lisati 0.6 mahtu isopropanooli, (0,54 mL). Lahusele tehti *vortex* ning hoiti 5 min RT, mille järel tsentrifugeeriti lahust 13400 rpm 10 min. Eemaldati supernatant ja lisati 100 µL 80% EtOH-d ja hoiti lahust 5 min RT. Seejärel tsentrifugeeriti lahust 13400 rpm 5 min ja eemaldati supernatant. DNA sade lahustati 30 µL-s T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> puhvril, millele oli lisatud RNAas A 20 µg/ml ning inkubeeriti 30 min 65 °C juures. Puhastatud plasmide kontrolliti 0,8% agarosgeelil. Lisaks teostati restriksioonanalüüs. N-terminaalset IRC3 geeni sisaldav ekspressiooni plasmid lõigati EcoRI ja PstI restriksiooniga. Mõlemad ensüümid on Thermofischer Scientific-u poolt. Restriksioonireaktsioon toimus 37 °C 3 h. Reaktsiooni lõppedes analüüsiti restrikteeritud plasmide 0,8% agarosgeelil.

### 2.2.7. N- ja C-terminaalsete OpIrc3 valkude ekspresseerimine

#### *E. coli* BL21 DE3 RIL rakkudes

SUMO OpIrc3 (N416, N385, C415, C351) rekombinantsete valkude ekspresseerimiseks kasutati BL21-DE3-RIL tüve. 30 µL BL21 -CodonPlus(DE3)- RIL kompetentseid rakke transformeeriti 1 µL puhastatud plasmiididega sarnaselt peatükis 2.2.6.2. kirjeldatule ning

plaaditi LB Kan 50µg/mL Cam 25µg/ml tardsöötmele. Rakke kasvatati 37 °C juures 16h. LB tardsöötmele kasvatatud *E. coli* BL21 -CodonPlus(DE3)- RIL pET24d+ 10XHis-SUMO OpIRC3 (N416, N385, C415, C351) kolooniate hulgast valiti välja igalt tardsöötme tassilt 2 üksikut kolooniat, mis pandi kasvama ekspressiooni analüüsiks väiksemas mahus (50 mL). Samas mahus pandi kasvama ka negatiivse kontrolli rakud mida ei indutseeritud IPTG lisamisega. Valkude eraldamiseks suures mahus kasvatati rakud 600 ml LB Kan 50 µg/mL, Cam 25 µg/mL söötmes). Ekspressioonirakkude kasvatamine tehti nii et rakke kasvatati loksutil 180 rpm 20 ml-s LB (Kan 50 µg/mL, Cam 25 µg/mL) vedelsöötmes 37 °C juures nii kaua kuni söötme OD 600 nm oli 0,3 . Seejärel lisati 30 mL LB Kan 50 µg/mL, Cam 25 µg/mL söödete juurde (suures mahus kasvatamise puhul lisati 580 mL LB Kan 50 µg/mL, Cam 25 µg/mL söödete). Kultuuri kasvatati kuni OD 600 nm oli 0,4. Kultuurid jahutati jää peal maha ning valguekspressioon indutseeriti IPTG lisamisega 0,5 mM lõppkontsentratsioonini, pärast mida kasvatati rakke 16h 20 °C. Peale kasvatust mõõdeti OD 600 nm veelkord.

### **2.2.7.1. Rakkude kogumine ja lüüsimine**

Peale OD 600 nm mõõtmist tsentrifugeeriti kultuur Universal 320/320R, Hettich tsentrifuugis 4 °C 4500 rpm 20min. Sööde eemaldati ning bakterid suspendeeriti 10 mL-s (30 mL suure puhastuse puhul) ST puhvril (100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7,5). Segu tsentrifugeeriti samadel tingimustel 10 min, puhver eemaldati ning alles jäänud bakterid külmutati vedelas N<sub>2</sub> ning pandi -80 °C külmkappi.

### **2.2.7.2. Valkude puhastamine**

Kogu valkude puhastamise protsess toimus 4 °C või jää peal.

Ekspressiooni analüüsiks võeti -80 °C peal külmutatud rakud ning suspendeeriti 5 mL (20 mL LB, 1 mM PMSF (fenüülmetüülsulfonüül fluoriid) suure mahu puhul) LB puhvril. Peale suspendeerimist lisati 5mg lütsotsüümi või suure puhastuse puhul 60 mg lütsotsüümi ning lahus pandi 1h 4 °C *end-over-end* masina peale pöörlema. Seejärel supernatanti sonikeeriti

ultraheliga 3 x 20 sekundit 50% võimsusega Bandelin Sonopuls HD2070 sonikaatoriga. Sonikeeritud rakulüsaati tsentrifugeeriti Sorvall RC5B Plus SS34 rootoriga 20 min 12000 rpm 4 °C juures ja supernatant viidi üle uude puhtasse topsi ning hoiti edasi jääl edasiseks lahuses oleva valgu hulga analüüsiks. Topsi põhjas olev sade hoiti alles, et oleks võimalik hinnata lahustumata valgu hulka ning mõlemad fraktsioonid analüüsiti SDS-PAGE kasutades.

### **2.2.7.3. Oplrc3 valkude ekspressiooni kontrollimine**

Oplrc3 N416, N385, C415, C351 ekspressiooni kontrollimine 50 mL-ist kultuurist tehti Ni-afiinsuskromatograafia meetodil. Kõigepealt valmistati ette Ni-NTA *agarose beads*'id, selleks suspendeeriti 200 µL/proovi kohta *beads*'id 3x 1 mL ddH<sub>2</sub>O ja 1x LB puhvriga (tabel 3), peale igat suspendeerimist tuub tsentrifugeeriti 800 rpm Eppendorf Mini Spin tsentrifugeeriga (rootor F45 12-11) ning vedelik eemaldati. Punktis 2.2.7.2. saadud supernatant tõsteti uude tuubi ning sellele lisati 100 µL eelnevalt töödeldud *Ni-NTA agarose beads*'e ja imidasool (pH 8) lõppkontsentratsiooniga 20 mM. Lahust inkubeeriti 2h end-over-end masinal. Lahus tsentrifugeeriti 500 rpm 4 °C Hettich Universal 32R tsentrifugeeris. Supernatant eemaldati ning hoiti alles edasiseks SDS-PAGE analüüsiks. Edasine pesu toimus 1,5 mL tuubis ja tsentrifugeerimine toimus 800 rpm Eppendorf Mini Spin tsentrifugeeriga (rootor F45 12-11). Esimesed 2x 1 mL pesu tehti LB puhvriga nii et 10 min *end-over-end* masinaga segamist 4 °C juures ning pesu eemaldati. Seejärel valgud elueeriti 100 µL LB + 400 mM imidasooli lisamisega ja 10 min *end-over-end* masinal segamisega 4 °C. Tehti viimast korda 800 rpm tsentrifugeerimine ning supernatanti jäänud Oplrc3 N- ja C-terminaalsed valgud analüüsiti SDS-PAGE-il koos eelnevalt alles jäetud proovidega.

### **2.2.7.4. Oplrc3 N416 puhastamine suures mahus**

Oplrc3 N416 valk puhastati suures mahus (600 mL bakterikultuurist) samuti Ni-afiinsuskromatograafia meetodil. 2.2.7.2. punktis kirjeldatud protokoll järgi saadud

supernatant inkubeeriti 2 mL ettevalmistatud *Ni-NTA agarose beads*'idega, lisati imidasool (pH 8), et oleks lõppkontsentratsioon 20 mM ning segu pandi 2h 4 °C *end-over-end* masinaga pöörlema. Seejärel tsentrifugeeriti tuube 500 rpm 4 °C Hettich Universal 32R tsentrifuugis. Supernatant, millesse peaksid jääma *Ni-NTA agarose*'ile mitte sidunud valgud, jäeti alles edasiseks analüüsiks. *Ni-NTA agarose beads*-ile tehti pesu 5 mL LB puhvriga, sellele järgnes pesu 5 mL 15 mM imidasool LB puhvriga. *Ni-NTA agarose beads* kallati tühja kolonni ning läbijooksust koguti 20µL proov SDS-PAGE jaoks, kolonn pesti veelkord 5 mL LB puhvriga, siis 5 mL 15 mM imidasool LB puhvriga ning lõpuks 2 mL 50 mM imidasool LB puhvriga, kõik fraktsioonid koguti kokku ning kasutati edasises analüüsis. Peale kolonni pesusid elueeriti kolonnile kinnitunud valk 6x 500 µL 400 mM imidasool LB puhvriga (tabel 3). Saadud fraktsioonidele tehti Bradfordini kolorimeetriline analüüs, et leida kõige suurema valgukontsentratsiooniga fraktsioonid, igast proovist jäeti alles 20 µL SDS-PAGE analüüsi jaoks. Suure valgukontsentratsiooniga fraktsioonid segati kokku ning paigutati 12 000 – 14 000 Da (SPECTRA/POR)membraani tuubi, lisati 50 U Ulp1 proteaasi (puhastatud biokeemia laboris) ja tuubi otsad suleti klambritega ning paigutati 200 ml FB puhvrisesse ( tabel 3) 4 °C 8h, selle aja jooksul Ulp1 tunneb ära ning lõikab ära SUMO-*tag*'id. Samal ajal toimub puhvri vahetus membraansüsteemi abil, väiksemad kui 12 000- 14 000 Da molekulid liiguvad läbi membraani FB puhvrisesse, nagu näiteks imidasool (pH 8) ning membraani sees olev LB puhver asendub FB puhvriga. Peale 8 h vahetati FB puhver uue vastu, et puhvri vahetus oleks veelgi efektiivsem. Proteolüütiliselt lõigatud proov kanti uuele 400 µL ettevalmistatud *Ni-NTA agarose beads*'i kolonnile, et vabaneda 10XHis-SUMO-*tag*'ist, Ulp1 proteaasist ja lõikamata SUMO-Oplrc3 N416 valgust. FB K glutamaat puhvrises olev Oplrc3 N416 valk elueerus kolonni läbijooksus ja koguti kokku ning seejärel pesti kolonni 4x 400 µL FB 500 mM K glutamaat puhvriga ning 2x 400 µL FB 500 mM K glutamaat 50 mM imidasool (pH 8) puhvriga. Saadud valgulahusele tehti Bradfordini kolorimeetriline analüüs ning külmutati vedelas N<sub>2</sub> 50µL allikvootides.

## 2.2.8. Valguanalüüs

### 2.2.8.1. Naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforees (SDS-PAGE)

Valguanalüüsiks tehti 10 x 10 cm SDS-PAGE geel (10% akrüülamiid, 375 mM Tris pH8, 0,004% SDS, 0,01% NAPS, 7 µL TEMED). Geelil jooksutatud proovid denatureeriti SDS puhvril (25 mM Tris-HCl [pH 6,8], 50mM DTT, 2% SDS, 0,1% broomfenoolsinine, 5% glütserool) 95 °C juures 5 min. Suurusmarkerina kasutati ThermoScientific *Unstained protein molecular weight marker*'it. Elektroforees toimus RT 80V kuni värv jõudis valke lahutava osani, seejärel 130V 1,5h Hoefer *Mighty Small II* SE250/SE260 aparaadis Elektroforeesipuhvrina kasutati SDS puhvrit (0,4 M glütsiin, 50mM Tris, 0,1% SDS). Geelides jooksutatud proovide visualiseerimiseks värviti geele Coomassie briljantsinist sisaldavat värvilahusega (25% EtOH, 7% äädikhape, 2,5mg/ml Coomassie Brilliant Blue R- 250) RT 8h ning pesti 2 h RT värveemaldus lahusega (25% EtOH, 7% äädikhape).

### 2.2.8.2. Valgu kontsentratsiooni hindamine Bradfordin meetodil

Puhastatud valgufraktsioonides valgukoguse hindamiseks kasutati Bradfordin meetodit (Bradford, 1976). Mikrotiiterplaadile kanti 5 µL kogutud valgufraktsiooni ning 100 µl Bradfordin reagenti (0,01% Coomassie brilliant blue G-250, 5% EtOH, 4,25% fosforhape). Proove suspendeeriti ja inkubeeriti 5 min RT ning hinnati seejärel visuaalselt reaktsioonide värvumist. Sobilike fraktsioonide säilitamiseks ja kokku kogumiseks hinnati Bradfordin meetodil valgufraktsioonide värvumist.

### 2.6.3 Kontsentratsiooni määramine Nanodropiga

Valkude täpse kontsentratsiooni teada saamiseks mõõdeti valkude neelduvust  $\lambda 280$  juures NanoDrop2000c UV-Vis spektrofotomeeriga.

### 2.6.4 ATP hüdrolüüsi aktiivsuse määramine

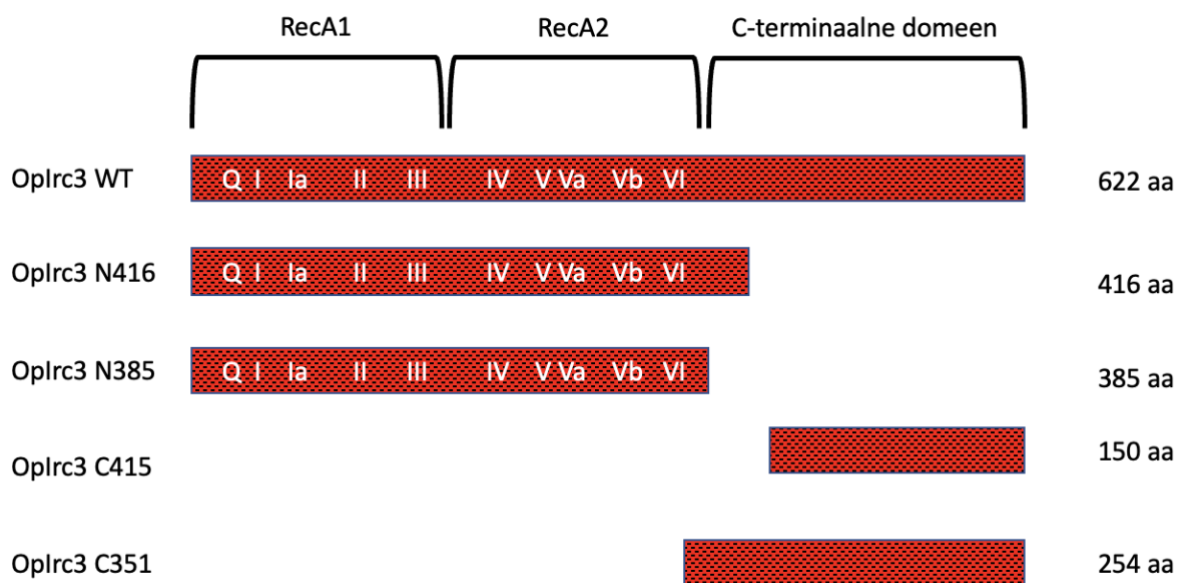
Oplrc3 N416 ATP hüdrolüütilist aktiivsust mõõdeti NADH oksüdatsiooni kaudu kombineeritud spektrofotomeetrilise meetodiga 150  $\mu\text{L}$ -s 37 °C juures. Reaktsioonipuhvriks oli 50 mM Tris - HCl pH 8 150 mM K-glutamaat, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT. Reaktsioonisegu sisaldas 5 mM ATP, 100 nM DNA kofaktor (45bp ssDNA) ning Oplrc3 N416 kontsentratsioonil 1,1  $\mu\text{M}$  või Oplrc3 täispikka helikaasi kontsentratsioonil 10 nM. ATP hüdrolüüsi kiirust jälgiti 30 minuti jooksul, mõõtes NADH-i ekvimolaarset muundumist  $\text{NAD}^+$ -iks 340 nm juures  $\epsilon = 6200 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  järgi kasutades POLARstar Omega plate reader masinat.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1 Oplrc3 N-terminaalsete ja C-terminaalsete ekspressiooni plasmiidide valmistamine

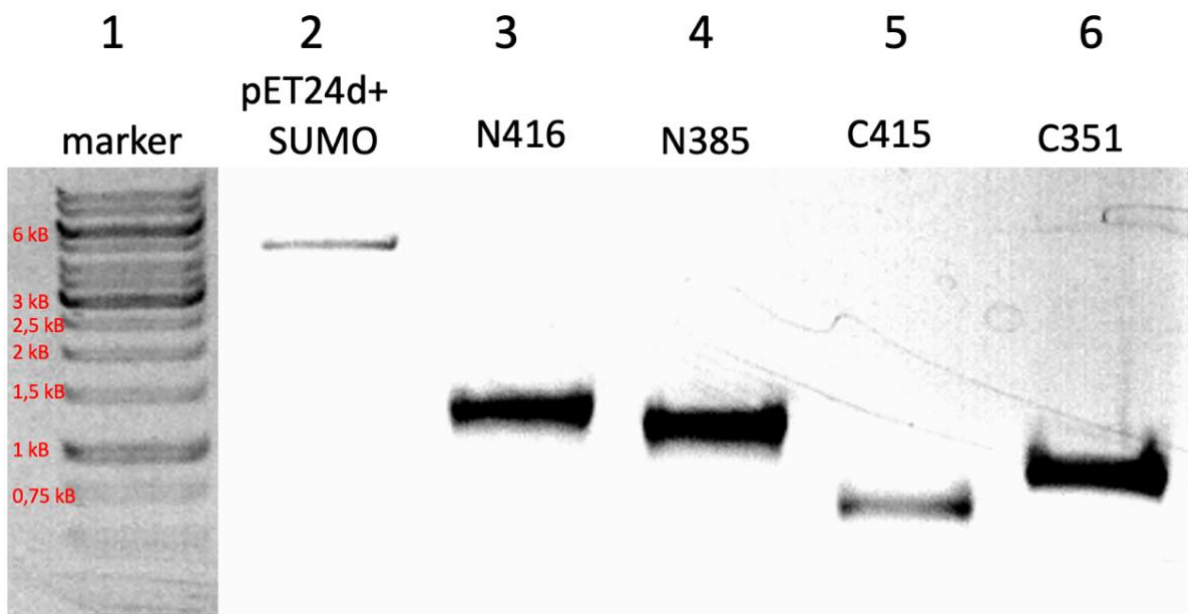
Eelnevates töödes on iseloomustatud *S. cerevisiae* Irc3 valku ning selle aktiivsust, aga selle põhjalik *in vitro* analüüs on raskendatud kehva termostabiilsuse tõttu. Selle pärast valiti välja termotolerantne pärm *Ogataea polymorpha*, sest selle pärmi Irc3 valgu struktuur ning katalüütiline aktiivsus säilib temperatuuridel, mis ületavad 40 °C. Selle töö eesmärk on valmistada *O. polymorpha* Irc3 N- ja C-terminaalseid ekspressiooni plasmiidid ning testida, kas neid on võimalik kasutada valkude ekspresseerimiseks ja puhastamiseks ning uurida Oplrc3

valgu N-terminaalse domeeni ATP hüdrolüütilist aktiivsust. Oplrc3 valgu ennustatud struktuuri põhjal ei olnud võimalik päris täpselt ennustada millised valgu fragmendid osalevad oletatavas DNA sidumise ja millised ATP hüdrolüüsi eest. Seetõttu disainiti 4 erinevat valku, mida näidatud joonisel 5. Oplrc3 N416 ja Oplrc3 385 on mõlemad N-terminaalsed domeenid, millesse on jäänud kõik konserveerunud motiivid, aga Oplrc3 N416 on ka mõned lisa aminohapped C-terminaalsest domeenist. Oplrc3 C415 ja C351 on erineva pikkusega C-terminaalsed domeenid. Disainitud valkude aminohappelised järjestused on leitavad lisa 2-st.



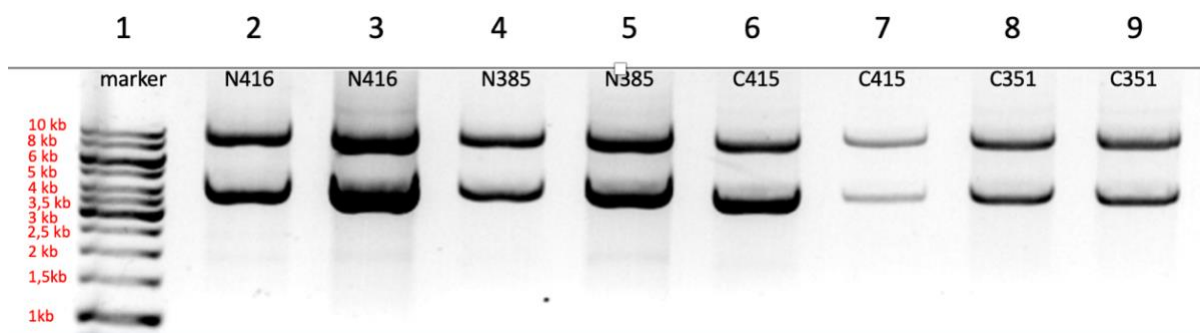
**Joonis 5. Töös kasutatud termotolerantse pärmi *O. Polymorpha* Irc3 valgud.** Pildil näha iga disainitud valgu suurus ning konserveerunud motiivid Q, I, Ia, II, III, IV, V, Va, Vb, VI ning iga valgu aminohappeline (aa) pikkus.

Töö eesmärkide saavutamiseks alustati Oplrc3 valgudomeenide ekspressioonivektorisse sisestamisega. Selleks pidi amplifitseerima sisend DNA lõigud, mis kodeerivad OpIRC3 N416, N385, C415 ja C351 fragmente. Praimerite paaridega sünteesitud sisend DNA lõigud koos nende pikkustega on 1,1 kB OpIRC3 N385, 1,2 kB OpIRC3 N416, 0,57 kB OpIRC3 C415, 0,77 kB OpIRC3 C351 on näidatud joonisel 6.



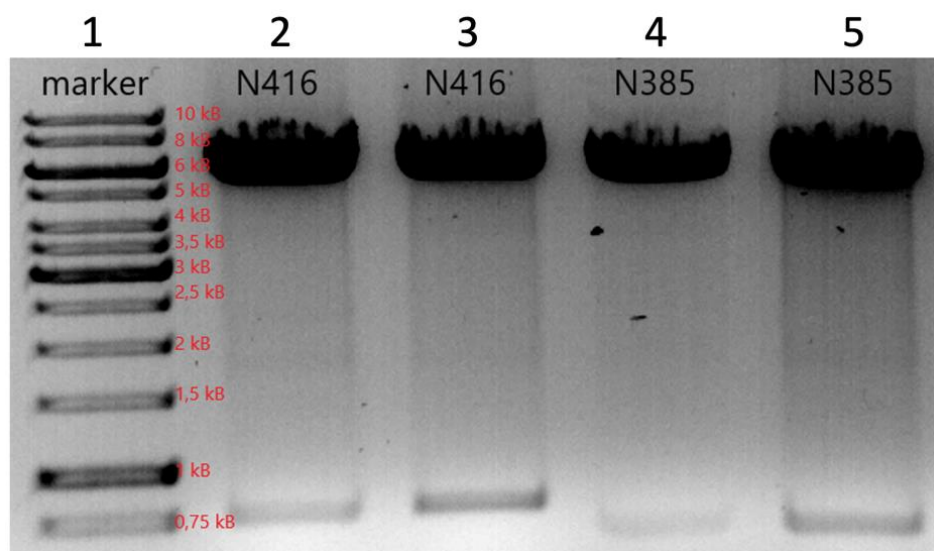
**Joonis 6. Praimerite ja ekspressioonivektori kontroll.** Joonisel on näidatud 0,8% agarosgeel, millel lasti joosta 1h/50V. Rada 1 Thermofischer Scientific *Generuler 1 kB*, Rada 2 pET24d+ SUMO ekspressioonivektor pikkusega 5,6 kB, rada 3 OpIRC3 N416 1,2 kB, rada 4 OpIRC3 N385 1,1 kB, rada 5 OpIRC3 S415 0,57 kB, rada 6 OpIRC3 S351 0,77 kB. Marker ja proovid on samal geelil, samadel tingimustel joostud, aga markeri nägemiseks on esimese raja kontrasti ja heledust muudetud ImageJ programmis.

Järgmisena kloneeriti sisend DNA lõigud pET24d+ 10XHis-SUMO ekspressioonivektorisse. Loodud plasmiidide eraldamiseks transformeeriti *E. coli* bakteritüve DH5 $\alpha$  rakke. Sellele järgnes rakkudest plasmiidse DNA eraldamine, protsess kirjeldatud peatükis 2.2.6.3. Kõigi 4 ekspressiooni plasmiidiga transformeeritud kolooniatest eraldati 2 plasmidi. Saadud pET24d+ 10XHis-SUMO OpIRC3 (N416, N385, C415, C351) plasmide kontrolliti 0,8% agarosgeelil (Joonis 7).



**Joonis 7. Plasmidi puhastuse kontroll.** 1. rada Thermofischer Scientific *Generuler 1 kB*, 2.-3. rada pET24d+ 10XHis-SUMO OpIRC3 N416 plasmiidid, 4.-5. rada pET24d+ 10XHis-SUMO OpIRC3 N385 plasmiidid, 6.-7. rada pET24d+ 10XHis-SUMO OpIRC3 C415 plasmiidid, 8.-9. rada pET24d+ 10XHis-SUMO OpIRC3 C351 plasmiidid.

Restriktsioonanalüüsiga kontrolliti pET24d+ 10XHis-SUMO OpIRC3 N-terminaalsete plasmiidide korrektsust. pET24d+ 10XHis-SUMO OpIRC3 416 peale EcoRI ja PstI lõigatust on 812 aluspaari ja pET24d+ 10XHis-SUMO OpIRC3 N385 pikkus 714 aluspaari (joonis 8). C-terminaalsete pET24d+ 10XHis-SUMO OpIRC3 valkude ekspressiooni plasmide ei õnnestunud restriktsiooni analüüsiga kontrollida, kuna ei leitud sobivaid restriктаase.

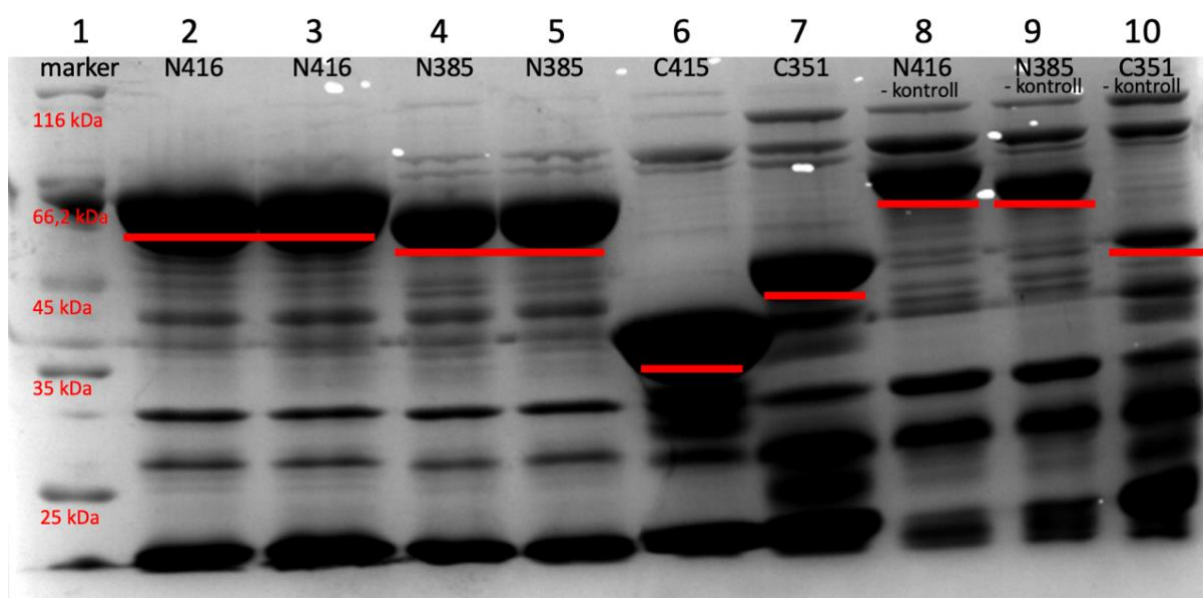


**Joonis 8. Restrikteeritud ekspressioonivektorid.** N-terminaalseid IRC3 geene sisaldavad ekspressiooni plasmiidid restrikteeriti EcoRI ja PstI restriktsiooni ensüümidega. Rada 1 Thermofischer Scientific *Generuler 1 kB*. Rada 2-3 pET24d+ 10XHis-SUMO OpIRC3 N416. Rada 4-5 pET24d+ 10XHis-SUMO OpIRC3 N385.

### 2.3.2 SUMO-OpIrc3 N416, N385, C415, C351 valkude ekspressiooni kontrollimine

OpIrc3 valkude ekspresseerimiseks kasutati pET24d+ 10XHis-SUMO OpIRC3 (N416, N385, C415, C351) plasmide. Nendega transformeeriti *E. coli* bakteri BL21 -CodonPlus(DE3)- RIL tüve. See tüvi valiti sellepärast, et need rakud kannavad DE3 lüsogeeni ja T7 RNA polümeraasi geeni, mis tunneb ära pET24d+ 10xHis-SUMOs oleva T7 promootorjärjestuse, samuti saab selles tüves valguekspressiooni indutseerida IPTG abil. Lisaks on selles tüves plasmid, mis kodeerib eukarüootsetele organismidele vajalikke, kuid bakteris harvem esinevaid koodoneid, mis võimaldab OpIrc3 efektiivsemalt ekspresseerida, nendeks on argU (AGA, AGG), ileY (AUA), leuW (CUA).

Kõigepealt kontrolliti kas tehtud plasmiidid võimaldavad valke ekspresseerida. Selleks tehti Oplrc3 valkude ekspressiooni testimine, mis toimus nii nagu peatükis 2.2.7.3. on kirjeldatud. Kasutades valkude aminohappelisi järjestusi, arvatati eeldatavad valkude molekulmassid, millele liideti SUMO-*tag* molekulmass 11 kDa ning saadi, et SUMO-Oplrc3 N416  $M_w = 57,5$  kDa, SUMO-Oplrc3 N385  $M_w = 53,8$  kDa, SUMO-Oplrc3 C415  $M_w = 33,3$  kDa, SUMO-Oplrc3 C351  $M_w = 40,6$  kDa.

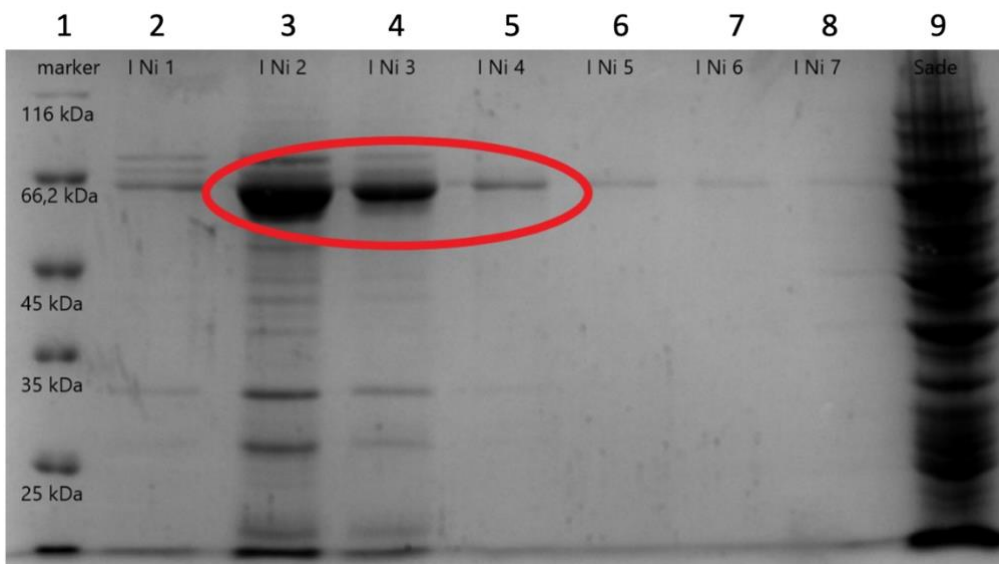


**Joonis 9. Ekspressiooni testimise analüüs SDS-PAGE'il.** Punase joonega on alla joonitud ekspresseerunud SUMO-Oplrc3 rekombinantset valgud. Negatiivse kontrollina on võetud samad transformeeritud rakud, aga pole ekspressiooni indutseerimiseks lisatud 0,5 mM IPTG-d. Rada 1 ThermoScientific *Unstained Protein Molecular Weight Marker*, rada 2-3 SUMO-Oplrc3 N416, rada 4-5 SUMO-Oplrc3 N385, rada 6 SUMO-Oplrc3 C415, rada 7 SUMO-Oplrc3 C351, rada 8 SUMO-Oplrc3 N416 negatiivne kontroll, rada 9 SUMO-Oplrc3 N385 negatiivne kontroll, rada 10 SUMO-Oplrc3 C351 negatiivne kontroll.

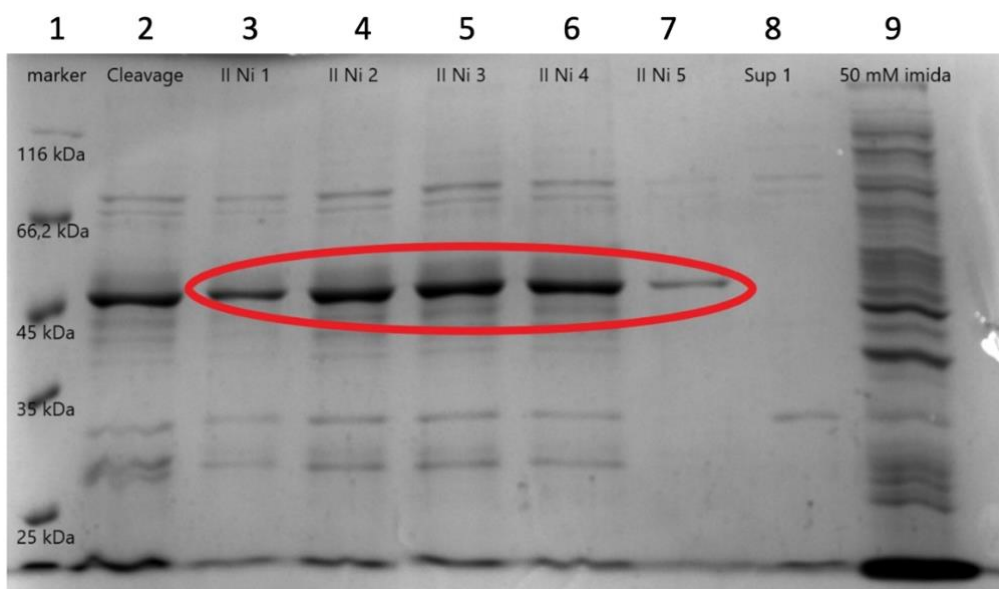
Joonisel 9 on näha, et SUMO-Oplrc3 liitvalgud on ekspresseerunud ning IPTG lisamine on ekspressiooni suurendanud. Negatiivses kontrollis on SUMO-Oplrc3 N- ja C-terminaalsed domeenid ekspresseerunud madalamal tasemel. C451 negatiivne kontroll ei mahtunud geelile ja jäi sellest analüüsist välja. Tuleb ka mainida, et pildil olevad suurused ja arvutatud suurused erinevad teineteisest umbes 10 kDa võrra. See tuleneb sellest, et SUMO-*tag* migreerub SDS-PAGE-il 20 kDa juures (Bylebyl jt., 2003). See võib tuleneda suurenenud lüsiini sisaldusest, mis põhjustab positiivset laengut ja aeglasemat liikumist geelis (Samuel jt., 2018).

### 2.3.3. Oplrc3 N416 ekspressiooni protokoll välja töötamine

Kuigi selgus, et kõik kloneeritud plasmiidid võimaldavad nii N- kui ka C-terminaalseid Oplrc3 valke ekspresseerida, siis otsustati aja puudusel puhastada ainult üks N-terminaalne Oplrc3 valk. Selleks valiti Oplrc3 N416, põhjusel, et see oli kahest N-terminaalsest valgust suurem ning ATP hüdrolüüsi aktiivsus on suurema tõenäosusega säilinud. Oplrc3 N416 kasvatati suures mahus nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.7.4. Puhastus põhines Oplrc3 N416 domeenile liidetud SUMO-*tag*'i ja nikliiooni vahelisel seondumisel. Kolonnile olevate *beads*'ide pinnal on nikliioonid, millel on tugev afiinsus SUMO-*tag*'is oleva histidiini vastu. Kui supernatant kanda Ni-NTA *agarose beads* kolonnile, siis SUMO-Oplrc3 N416 valgud kinnituvad sellele, samal ajal kui ülejäänud valgud voolavad kolonnist läbi. Valkude kolonnist vabastamise jaoks elueeriti valgud 400 mM imidasooli lahusega, mis konkureerib SUMO-*tag*'iga ning SUMO-Oplrc3 N416 valk liigub läbijooksu, see tulemus on näidatud joonisel 11. Samal meetodil põhines ka väikesest mahust valkude eraldamine (joonis 10). Seejärel kasutati SUMO proteaasi Ulp1, et SUMO-*tag* eemaldada, see tehti puhvri vahetusega dialüüsi süsteemis, mille käigus toimub lõikus ning väikesed molekulid liiguvad dialüüsi kotist välja puhvrissi. Samal ajal toimub puhvri vahetus, mis valmistaks ette valgulahuse järgmiseks puhastus etapiks, milleks oli lõigatud valguproovi uuesti Ni-NTA *agarose beads* kolonnile kandmine. Puhvri vahetust oli vaja selleks, et Oplrc3 416 valk ei kinnituks enam Ni-NTA kolonnile vaid liiguks läbi selle kolonni, mis võimaldab seda valku koguda läbijooksu fraktsioonist. Samal ajal seonduvad sellele kolonnile lõigatud SUMO-*tag*'id, lõikamata SUMO-Oplrc3 N416 valk ja mõned alles jäänud muud valgud. Oplrc3 N416 kogutakse kolonni läbijooksu fraktsioonis. Teise Ni-NTA kolonni Oplrc3 N416 puhastus etapid on näidatud joonisel 12. Oplrc3 N416 arvutatud suurus peale lõikust on 46,5 kDa.



**Joonis 10. Oplrc3 N416 puhastamine I Ni- NTA kolonnil.** SUMO-Oplrc3 N416 valgu Ni-NTA agarose beads'i kolonni puhastamisel kogutud fraktsioonidest tehtud SDS-PAGE analüüs. Rada 1 ThermoScientific *Unstained Protein Molecular Weight Marker*, rajad 1-8 Ni-NTA agarose beads'i kolonni kinni jäänud ja siis 400 mM imidasooliga elueeritud fraktsioonid, rada 9 peale rakkude lüüsimist, tsentrifugimist ning peale supernatandi eemaldamist alles jäänud sademe (lahuses mitteolevad valgud) analüüs .



**Joonis 11. Oplrc3 N416 puhastuse II NI-NTA kolonni analüüsi.** Valgu puhastamisel kogutud fraktsioonidest tehtud SDS-PAGE analüüs. Ringiga märgitud lõigatud Oplrc3 N416, mis külmutati ATP hüdrolüüsi katse jaoks Rada 1 ThermoScientific *Unstained Protein Molecular Weight Marker*, rada 2 SUMO-tag lõikus, mis ei kandud II Ni NTA kolonnile, rada 3-5 on peale lõikust läbi Ni-NTA kolonni läbijooksu fraktsioonid, rada 6-7 kolonni pesu 50 mM imidasooliga FB puhvriga fraktsioonid, rada 8 on supernatant, mis jooksis esimesest Ni-NTA kolonnist kohe välja kui valgulahus peale kanti, rada 9 supernatant 50 mM imidasooliga proov on viimane pesu enne I Ni-NTA kolonni fraktsioonide kogumist.

Jooniseid 10 ja 11 võrreldes on näha, et Ulp1 proteaasi poolt SUMO-tag lõikus on toimunud. Kõige tumedam valguriba on enne lõikust ~65 kDa suurune (joonis 10, rada 3-5), aga pärast

SUMO-tag-i lõikuse toimumist on tumedaim valguriba suurusega ~46,5 kDa, mis läheb kokku arvatud Oplrc3 N416 suurusega (joonis 11, rada 2-7). Samuti ei ole joonisel 11 näha SUMO-Oplrc3 N416 valku, ehk lõikus oli täielik. Joonis 12 rada 3-7 valguproovid allikvooditi 50 µL kaupa ning külmutati vedelas N<sub>2</sub> ning säilitati -80 °C. Suur osa valgust jäi ka sademesse, mida on näha joonis 10 rada 9 ja osa valku kaotati ka fraktsioonidesse, mida edasi ei kasutatud. See tõttu loetakse puhastuse efektiivsust ligikaudu 40%. Tuleb tunnistada, et II Ni-NTA kolonnilt kogutud fraktsioone ei saa veel nimetada puhtaks Oplrc3 N416 valguks ning tulevikus tuleks proovida ka järgnevate puhastusetappide kasutamist, nagu näiteks ekslusioonkromatograafiat, anioonvahetuskromatograafiat või hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafiat.

### 2.3.4. Valgu kontsentratsiooni määramine

Peale Oplrc3 N416 puhastamist mõõdeti valgupreparaadi spektrofotomeetrist neelduvust 280 nm lainepikkusel *NanoDrop2000c* abil. Neelduvust mõõdet kolmes korduses ning keskmiseks tulemuseks oli  $A_{280} = 1,04$ , mille järgi hinnatud valgukontsentratsioon oli 1,0 mg/mL. Tulemuse kontrollimiseks kasutati ka Bradfordi meetodit. Selleks tehti Oplrc3 N416 kõrvale ka võrdluseks 1 mg/mL *ThermoScientific Albumin Standard* (BSA) proov, millest tehti samasugused lahjendused nagu Oplrc3 N416.



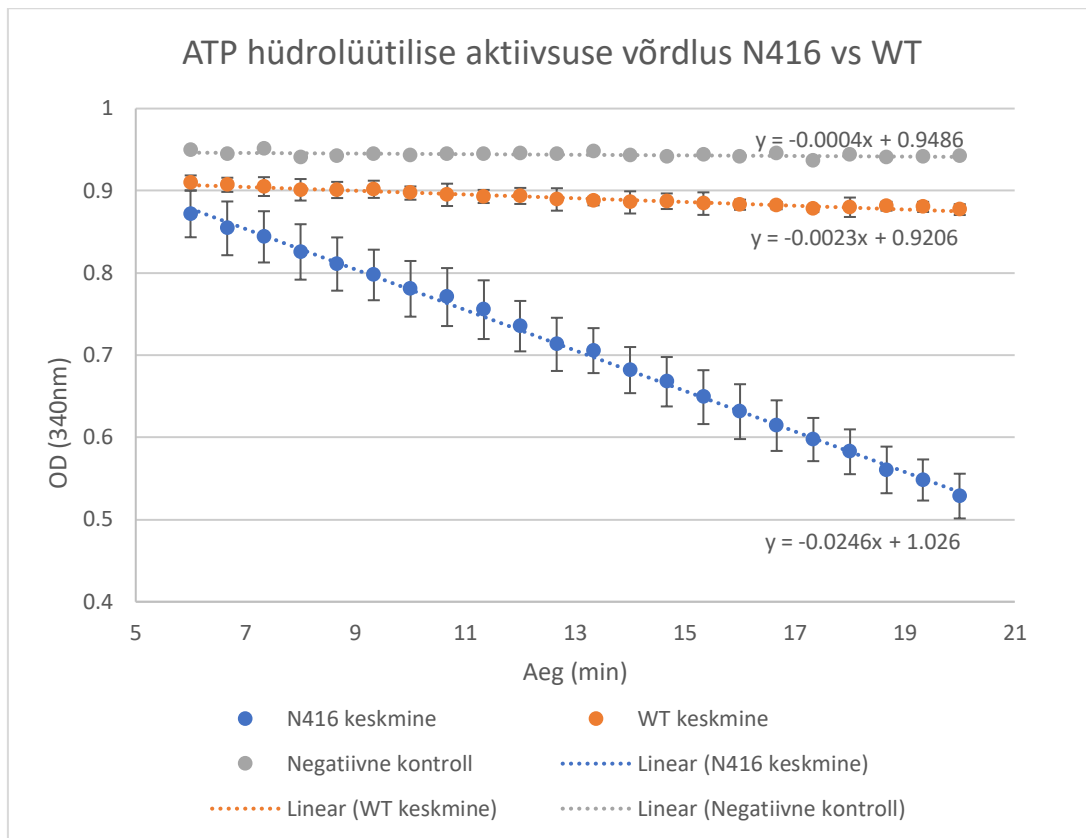
**Joonis 12. Bradfordi meetodil Oplrc3 N416 kontsentratsiooni määramine.** Mikroitiiter plaadile lisati 100 µL Bradfordi reagenti ning 0-6 µL valgufraktsiooni. Rida A BSA 1 mg/mL proov: auk 1 – 0 µg, auk 2 – 1 µg, auk 3 – 2 µg, auk 4 – 3 µg, auk 5. – 4 µg, auk 6 – 5 µg, auk 7. – 6 µg. Rida B Oplrc3 N416: auk 1 – 0 µL, auk 2 – 1 µL, auk 3 – 2 µL, auk 4 – 3 µL, auk 5. – 4 µL, auk 6 – 5 µL, auk 7. – 6 µL.

Jooniselt 12 on näha, et tehtud read on identsed, kui lisada 1mg/mL BSA proovi samas koguses kui puhastatud Oplrc3 N416 proovi, siis Bradfordi reagent värvus sama palju. See katse kinnitas, et Oplrc3 N416 proovide on valgukontsentratsiooniga on ligikaudu 1 mg/mL. Kokku

oli puhastatud Oplrc3 N416 proovi 2 mL, millest saab arvutada välja, et 600 mL-ist kultuurist oli võimalik puhastada 2 mg valku, millest ligikaudu 40% oli uuritav Oplrc3 N416.

### 2.3.5. Oplrc3 N416 ATP hüdrolüüsamise aktiivsus

Oplrc3 N416 ATP hüdrolüüsamise aktiivsust võrreldi täispika Oplrc3 (WT) valguga, mis oli varasemalt biokeemia laboris puhastatud. Katses kasutati Oplrc3 N416 valku kontsentratsioonil 1100 nM ja WT valku kontsentratsioonil 10 nM. Selle abil leiti mitu pikomooli ATP-d suudab 1 pikomool Oplrc3 N416 hüdrolüüsida 1-s minutis. Kõigepealt koostati tulemustest graafik ning sealt võeti sirgevõrrandid Oplrc3 N416, WT valgu ja negatiivse kontrolli jaoks. See jagati läbi NADH ekstinktsiooni koefitsendiga, milleks on  $6220 \text{ l/M(molaarsus)*cm}$ , et saada M/min. Seejärel teisendati M/min pmolNADH/min, selleks korrutati M/min  $1,0 \cdot 10^{12}$  ja 0,00015-ga. Lõpuks jagati NADH hüdrolüüsamise kiirus minutis Oplrc3 kontsentratsiooniga ning lahutati taust, et saada pmol ATP / pmol Irc3 min<sup>1</sup>. Lõpuks jagati see 60, et saada ATP hüdrolüüsi kiirus sekundis. Oplrc3 N416 hüdrolüüsis 0,0601 pmol ATP / pmol Irc3 sek<sup>-1</sup> ning WT Oplrc3 hüdrolüüsis 0,6183 pmol ATP / pmol Irc3 sek<sup>-1</sup>, negatiivse kontrolli ATP hüdrolüüsi kiirus tuli negatiivne. Mõõtmistulemused koos arvutustega on näidatud lisa 3-s.



**Joonis 13. ATP hüdrolüüsi graafik.** Y-telg tähistab proovi optilist tihedust 340 nm juures, X-telg aega minutites. ATP hüdrolüüsi käigus NADH oksüdeeritakse ning OD langeb. Oplrc3 N416 on 110x kõrgema kontsentratsiooniga kui WT, hüdrolüüsi kiirus on tegelikult WT Oplrc3-l 10x kõrgem kui Oplrc3 N416 valgul.

Joonisel 13 on näha, et nii Oplrc3 WT kui ka Oplrc3 N416 omavad ATP hüdrolüütilist aktiivsust, sest NADH neelduvus väheneb ajas. Kui graafikult saadud sirgevõrrandi abil ning arvesse võttes valguproovide kontsentratsioone, arvutati mõlema valgu ATP hüdrolüüsi kiirus, siis selgus, et Oplrc3 N416 aktiivsus on ~10x madalam kui WT Oplrc3. Sellest saame järeldada, et kuigi Oplrc3 tuumikpiirkond, mis on vastutab ATP sidumise ja hüdrolüüsi eest, asuvad N-terminaalses domeenis, on C-terminus ikka oluline ATP hüdrolüütilise aktiivsuse jaoks.

## 2.4 Arutelu

Selle bakalaureuse töö eesmärgiks oli valmistada pärmi *Ogataea polymorpha* Irc3 N- ja C-terminaalseid osasid sisaldavad plasmiidid, uurida kas neid plasmide on võimalik kasutada valkude ekspressiooniks. Seejärel puhastada Oplrc3 N-terminaalne valk ja võrrelda selle ATP hüdrolüütilist aktiivsust täispika Oplrc3 valgu vastu. Käesoleva töö katsed on osa suuremast projektist ning valmistatud ekspressiooni plasmide kasutatakse järgnevatel töödel.

Esimese sammuna tehti *In silico* järjestuse analüüs Oplrc3 valgule, selle analüüsi järgi disainiti N-terminaalsed valku Oplrc3 N416 ja Oplrc3 N385 ning C-terminaalsed valgud Oplrc3 C415 ja Oplrc3 C385. Põhjus miks mõlemast 2 ja erineva pikkusega valgu domeeni disainiti oli see, et AlphaFold-i mudeli järgi ei saadud ennustada kas 2 RecA ja C-terminaalse domeeni vahel olev lisajärjestus osaleb ka DNA-ga seondumise ja/või ATP hüdrolüüsi toimumiseks. Mõlemale N-terminaalsele valgule jäid kõik konserveerunud motiivid, aga Oplrc3 N416 jäi pikem osa RecA ja C-terminaalse valgu järjestusest, võrreldes Oplrc3 N385-ga. C-terminaalsed valgud sisaldavad C-terminaalset lisadomeeni, kus Oplrc3 C351 algab peale konserveerunud motiivi VI ning Oplrc3 C415 ei sisaldanud RecA ja C-terminaalse domeeni vahelist *linker*-järjestust. Samuti on oluline mainida, et Oplrc3 N-terminaalselt valgult on eemaldatud esimesed 28 aminohapet, sest see on signaaljärjestus, mis aitab valgul mitokondrisse lokaliseeruda. See järjestus eemaldatakse põhjusel, et jäljendada *In vivo* tingimusi, kus see samuti eemaldatakse ning, et vältida võimalike probleeme nagu valgu vale pakkimine ja agregeerumine.

Peale valkude disaini valmistati ekspressiooni plasmiidid. Selle jaoks sisestati uuritavad Oplrc3 N- ja C-terminaalseid valke kodeerivad DNA lõigud pET24d+ 10XHis-SUMO vektorplasmidi. Sellest ekspressiooni plasmidist on võimalik indutseerida SUMO-Oplrc3 liitvalgu ekspressiooni, mida on võimalik Ni-afiinsuskromatograafia meetodil välja puhastada. SUMO-Oplrc3 N- ja C-terminaalsete valkude ekspressiooniks valiti *E.coli* bakteritüvi BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, millel on tRNA geenide lisakopiooide, mille koodoniteks on argU, ileY, leuW, mis võimaldavad sellel tüvel eukarüootset valku efektiivsemalt toota. Samuti sobib RIL tüvi just AT rikaste geenide ekspressiooniks nagu Oplrc3 on.

Kõigepealt uuriti kas kõikide ekspressiooni plasmiidide pealt on võimalik Oplrc3 N- ja C-terminaalseid domeene ekspresseerida. Selleks transformeeriti saadud plasmiidid *E.coli* bakteri BL21-CodonPlus(DE3)-RIL tüvesse ning indutseeriti IPTG-ga SUMO-Oplrc3 valkude

ekspressioon. SUMO-Oplrc3 N- ja C-terminaalsete domeenide ekspressiooni uuriti Ni-afiinsuskromatograafia meetodil, kus Oplrc3 valkudele liidetud SUMO-tag seondub Ni-NTA agarose beads'idega tänu 10x histidiini kordusele. SUMO-Oplrc3 valkude kätte saamiseks pesti Ni-NTA agarose beads-id läbi imidasooli (pH 8) sisaldava puhvriga, mis konkureeris histidiini Ni-NTA agarose beads'ilt välja. Katsed näitasid, et kõik 4 valmistatud ekspressiooni plasmidi on võimelised Oplrc3 ekspresseerima valitud bakteri tüves. Vähesemal määral suutsid transformeeritud bakterid valku ekspresseerida ka negatiivses kontrollis, millele polnud lisatud induktorit IPTG. See võis toimuda sellepärast, et selles bakteritüve genoomis on DE3 lüsoseen ja T7 RNA polümeraasi geen, mis tunnevad ära pET24d+ 10xHis-SUMO-s oleva T7 promootorjärjestuse ja võimaldab valguekspressiooni.

Kui oli selgunud, et kõikidelt ekspressiooni plasmiididelt on võimalik SUMO-Oplrc3 N- ja C-terminaalset valke ekspresseerida, siis valiti välja Oplrc3 N416, et välja töötada puhastusprotokoll selle valgu puhastamiseks. Oplrc3 N416 valk omab kõiki Irc3 konserveerunud motiive ning seetõttu oletati, et omab ATP hüdrolüütilist aktiivsust. See põhines teadmisel, et *S. cerevisiae* N-terminaalne domeen omab ATP hüdrolüütilist aktiivsust (Sedman jt., 2017). Oplrc3 N416 puhastus põhines samuti Ni-afiinsuskromatograafia meetodil. Rakulüsaat kanti Ni-NTA agarose beads'idega kolonnile, et eristada uuritavad SUMO-Oplrc3 N416 liitvalk ülejäänud valkudest. Seejärel jälle elueeriti SUMO-Oplrc3 Ni-NTA agarose beads'idelt maha 400 mM imidasooli (pH 8) abil. Saadud valgulahus kanti dialüüsi kotti, kuhu lisati proteaasi Ulp1, SUMO-tag'i eemaldamiseks. Dialüüsi käigus toimus ka puhvrivahetus, mis valmistab valguproovi ette edasiseks puhastamiseks ja seda oli vaja selleks, et Oplrc3 416 valk ei kinnituks enam Ni-NTA kolonnile, vaid liiguks läbi selle kolonni. See võimaldaks Oplrc3 N416 valku koguda läbijooksu fraktsioonist, samal ajal kui lõikamata SUMO-Oplrc3 N416 ja lõigatud SUMO-tag'id jäävad kolonni kinni. Oplrc3 N416 oli võimalik puhastada teatud puhtuse astmeni, aga saadud valguproov oli siiski liiga heterogeenne, et nimetada seda puhtaks valguprooviks. Puhtama valgu saamiseks oleks tulevikus vajalik lisada Ni-afiinsuskromatograafia meetodile ka mõni täiendav puhastusmeetod, näiteks ekslusioonkromatograafia, anioonvahetuskromatograafia või hüdfoobse interaktsiooni kromatograafia. Siiski saadi katsete jaoks piisav kogus Oplrc3 N416 valku kätte. 600 mL-ist kultuurist õnnestus puhastada valgufraktsioonid, mille kontsentratsioonid olid 1mg/mL, millest suur osa on uuritav Oplrc3 N416, kogu saagis oli 2 mg valguproovi. See on võrreldav biokeemia laboris eelnevalt puhastatud valgusaagistega, nagu näiteks *S. cerevisiae* Irc3 N- ja

C-terminaalse domeeni puhastus Joosep Paatsi poolt, kus saadud valguproovide kontsentratsioonid jäid vahemikku 0,7252-1,277 mg/mL.

Viimase etapina võrreldi puhastatud Oplrc3 N416 valgu ja täispika Oplrc3 valgu ATP hüdrolüüsi aktiivsust. Eelnevates *S. cerevisiae* katsetes on näidatud, et N-terminaalne domeen suudab seonduda DNA-ga ning ATP-d hüdrolüüsida ka ilma C-terminaalse domeenita (Sedman jt., 2017). See läheb kokku ka *In silico* N-terminaalse domeeni analüüsiga, mis näitab kõikide aminohappeliste konserveerunud motiivide olemasolu, mida on seostatud ATP hüdrolüüsi ja DNA-ga seandumise funktsiooniga (de la Cruz jt., 1999) (Szczesny jt., 2013). Selles töös jõuti sama järelduseni. ATP hüdrolüüsi katses kasutati substraadina 45 aluspaari pikkust ssDNA-d. Oplrc3 N416 hüdrolüütiline aktiivsus oli 0,06 ATP/s, samal ajal kui täispikk Oplrc3 hüdrolüüsis 0,6 ATP/s, ehk täispika valgu ATP hüdrolüütiline aktiivsus oli 10 korda kõrgem Oplrc3 N416 omast. Eelnevalt läbiviidud ATP hüdrolüüsi efektiivsuse katsed *S. cerevisiae* N-terminaalse domeeni puhul on näidanud aktiivsust 0,6 ATP/s (Paats, 2016). See on tunduvalt kõrgem kui Oplrc3 N416 aktiivsus, aga eelnevas katses oli substraadiks dsDNA, mille vastu on Oplrc3 tugevam afiinsus kui ssDNA suhtes (Piljukov jt., 2023). Samuti Piljukovi poolt avaldatud artiklis saadi Oplrc3 täispika valgu hüdrolüüsi efektiivsuseks ssDNA puhul 11,5 ATP/s, mis on 20 korda kõrgem kui selles töös saadud tulemus täispika valgu puhul (Piljukov jt., 2023). Üheks võimaluseks miks ATP hüdrolüütilise aktiivsuse mõõtmised olid selles töös niivõrd erinevad varem tehtud katsetest oli see, et kasutatud reaktsiooni puhvrid, mida kasutati eelnevalt täispika Oplrc3 ATP hüdrolüüsis, võisid olla vananenud ja ei olnud aega, et seda katset korrata uute enda tehtud puhvritega ja erinevate substraatidega. Siiski on selles töös tehtud katsetest võimalik järeldada, et Oplrc3 N-terminaalne domeen on üsna sarnane *S. cerevisiae* Irc3 valgu N-terminaalsele domeenile, kuna mõlema Irc3 valgu puhul oli N-terminaalse valgu hüdrolüütiline aktiivsus 10 korda madalam kui täispika Irc3 valgu oma.

Järgnevates katsetes oleks vajalik teha põhjalikum analüüs Oplrc3 WT ning N-terminaalsele N416 valgule, et testida nende ATP hüdrolüüsi aktiivsust erinevatel ATP kontsentratsioonidel. Lisaks oleks vaja katsetada kas N-terminaalne domeen seondub sama efektiivselt ssDNA, dsDNA ja RNA substraatidele kui ka Y-kujulise juhtiva ja mahajääva dsDNA ahela kahvlitele ning Holliday ühendustele kui täispikk Oplrc3 valk. Samuti oleks vaja välja töötada puhastusprotokoll Oplrc3 C-terminaalsetele valkudele ning uurida nende valkude DNA sidumisvõimet samade substraatidega. Eelnevad katsed on näidanud, et *S. cerevisiae* C-terminaalne valk ei oma ATP hüdrolüütilist aktiivsust (Sedman jt., 2017). Oplrc3 funktsiooni

paremaks mõistmiseks oleks vaja välja selgitada ka Oplrc3 valgu täpne ruumiline struktuur x-ray kristallograafia abil.

## Kokkuvõte

Töö eesmärk oli valmistada ekspressiooni plasmiidid, mis võimaldaks ekspresseerida ja puhastada Oplrc3 N ja C-terminaalsete osade valke ning teostada nende ATP hüdrofüütilise aktiivsuse analüüs. *In silico* analüüsi põhjal disainiti töös kasutatavad valgud, N-terminaalsed valgud sisaldasid kõiki Irc3 helikaasile omaseid konserveerunud motiive ning C-terminaalsed valgud sisaldavad C-terminaalset lisadomeeni. Töö käigus loodi 4 ekspressiooni plasmidi: 2 ekspressiooni plasmidi N-terminaalsete valkude Oplrc3 N416 ja Oplrc3 N385 ekspressiooniks ning 2 C-terminaalsete valkude Oplrc3 C415 ja Oplrc385 ekspressiooniks. Ekspressiooni plasmiidide valmistamiseks kasutati pET24d+ 10XHis-SUMO ekspressioonivektorit ning need transformeeriti *E. coli* BL21 -CodonPlus(DE3)- RIL rakkudesse.

Esiteks testiti valmistatud ekspressiooni plasmiidide võimet disainitud valke ekspresseerida. Selle jaoks kasvatati transformeeritud *E. coli* BL21 -CodonPlus(DE3)- RIL bakterikultuuri 50 mL-s ning testiti kas uuritavad Oplrc3 N- ja C-terminaalsed valgud ekspresseeruvad ning on võimalik Ni-afiinsuskromatograafia meetodil teistest valkudest puhastada, segades kokku rakulüsaadi Ni-NTA *agarose beads*'iga. Selle testiga leiti, et kõigi 4 ekspressiooni plasmiidiga on võimalik Oplrc3 N- ja C-terminaalseid valke ekspresseerida.

Järgmise sammuna valiti välja Oplrc3 N416 valk ning see puhastati välja 600 mL-s *E. coli* BL21 -CodonPlus(DE3)- RIL kultuuris. Valkude puhastamise meetod põhines samuti Ni-afiinsuskromatograafia meetodil ning kasutati biokeemia laboris väljatöötatud meetodit, kus peale ühekordset Ni-NTA *agarose beads*'i kolonni lõigatakse SUMO-*tag* Ulp1 proteaasi abil puhvri vahetusega dialüüsi käigus. Dialüüsi järgne supernatant lasti läbi Ni-NTA kolonni teist korda, et Oplrc3 N416 valk kolonnist elueerida ilma SUMO-*tag*'ita. Seda meetodit kasutades õnnestus 600 mL-ist kultuurist puhastada välja 2 mg valku, millest suur osa oli uuritav Oplrc3 N416.

Oplrc3 N416 valguga testiti ATP hüdrofüütilist aktiivsust ning võrreldi seda WT Oplrc3 aktiivsusega. Katses selgus, et N-terminaalne domeen säilitab ATP hüdrofüütilise aktiivsuse ka C-terminaalse osa deleteerimisel, mis läheb kokku *in silico* tehtud analüüsil, mis näitab kõikide konserveerunud motiivide säilimist Oplrc3 N416 valgus. Selle töö käigus leiti, et N-terminaalse valgu Oplrc3 N416 ATP hüdrofüütiline aktiivsus on 10x madalam kui WT Oplrc3 oma.

# Investigation of the functionality of the *Ogataea polymorpha* helicase Irc3 via N-terminal domain analysis

Jakob Mäeots

## Summary

The mitochondrion is a cellular organelle that has a separate genome and has the essential function of supplying the cell with ATP. Helicases are essential for mitochondrial functionality and therefore cell functionality and the maintenance of genome integrity. Disruption of genes encoding mitochondrial helicases in *S. cerevisiae* usually results in complete or partial loss of WT mtDNA, and mutants exhibit the classic *petite* phenotype - the formation of small yeast colonies in the presence of limited amounts of fermentable sugars, which is characteristic of respiratory failure yeast mutants (Sedman et al., 2000) (De Silva et al., 2013) (Merz and Westermann, 2009) (Lahaye et al., 1991) (S raphin et al., 1989) (Stepien et al., 1992).

Six mitochondrial helicases have been described in the budding yeast species *Saccharomyces cerevisiae* and most of them appear to be largely conserved in different yeast species (Szczytny et al., 2013). Based on sequence similarity, 2 major superfamilies and several minor helicase families have been defined (Singleton et al., 2007) (Fairman-Williams et al., 2010).

Irc3 is a superfamily 2 helicase originally discovered in a screen for yeast mutants with high levels of recombination centres in nuclear DNA (Alvaro et al., 2007). Subsequent studies, however, have shown that Irc3 protein localizes to yeast mitochondria and Irc3 disruption results in loss of respiratory activity and fragmentation of the WT mitochondrial genome, suggesting that the nuclear DNA phenotype of the deleted Irc3 mutant may be indirectly due to a defect in mitochondrial metabolism (Sedman et al., 2014).

Purified *S. cerevisiae* Irc3 inactivates rapidly at temperatures above 30  C, which has limited detailed functional and structural studies of the protein *in vitro*. Therefore, in recent years, studies have begun to investigate thermotolerant yeast *O. Polymorpha* Irc3 protein (OpIrc3).

The aim of this work was to prepare expression plasmid that would allow the expression and purification of the N- and C-terminal parts of OpIrc3 proteins and to perform an ATP hydrolytic activity analysis of these proteins. Based on *in silico* analysis, 4 OpIrc3 proteins were designed. 2 N-terminal proteins containing all conserved motifs specific to the Irc3 helicase and 2 C-

terminal constructs containing a C-terminal additional domain. Expression plasmids were prepared using the pET24d+SUMO expression vector and transformed into *E. coli* BL21 -CodonPlus(DE3)- RIL cells.

Firstly, the ability of the engineered expression constructs to express the designed proteins was tested. For this purpose, the transformed *E. coli* BL21 -CodonPlus(DE3)- RIL bacterial culture was grown in 50 mL and the Oplrc3 N- and C-terminal proteins under study are expressed and can be separated from the rest of the proteins by Ni-affinity chromatography by mixing the cell lysate with Ni-NTA agarose beads. All 4 expression plasmids were successful in expressing Oplrc3 proteins.

As a next step, the Oplrc3 N416 protein was selected and purified in 600 mL *E. coli* BL21 -CodonPlus(DE3)- RIL culture. The protein purification method was also based on Ni-affinity chromatography and used a method developed in the biochemistry laboratory, where after a single column of Ni-NTA agarose beads, the SUMO-tag is cut by Ulp1 protease during buffer-exchange dialysis. The post-dialysis supernatant was run through the Ni-NTA column a second time to retain the Oplrc3 N416 protein without the SUMO-tag. Using this method, 2 mg of semi-purified Oplrc3 protein was successfully extracted from 600 mL of culture.

The ATP hydrolytic activity of the Oplrc3 N416 protein was tested and compared with the activity of the WT Oplrc3. The experiment showed that the N-terminal domain retains ATP hydrolytic activity even upon deletion of the C-terminal part, which conforms with the *in-silico* analysis showing the conservation of all conserved motifs in the Oplrc3 N416 domain. In this work, the ATP hydrolytic activity of the N-terminal domain was found to be 10x lower than that of full-length Oplrc3.

## Kasutatud kirjandus

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.

Andersen, C. B., Ballut, L., Johansen, J. S., Chamieh, H., Nielsen, K. H., Oliveira, C. L., ... & Andersen, G. R. (2006). Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA. *Science*, 313(5795), 1968-1972.

Alicia K Byrd, K. D. R. (2012). Superfamily 2 helicases. *FBL*, 17(6), 2070–2088. <https://doi.org/10.2741/4038>

Alvaro, D., Lisby, M., & Rothstein, R. (2007). Genome-wide analysis of Rad52 foci reveals diverse mechanisms impacting recombination. *PLoS genetics*, 3(12), e228.

BERTANI G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1951 Sep;62(3):293-300. doi: 10.1128/jb.62.3.293-300.1951. PMID: 14888646; PMCID: PMC386127.

Borowski, L. S., Dziembowski, A., Hejnowicz, M. S., Stepień, P. P., & Szczesny, R. J. (2013). Human mitochondrial RNA decay mediated by PNPase–hSuv3 complex takes place in distinct foci. *Nucleic acids research*, 41(2), 1223-1240.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.

Bylebyl, G. R., Belichenko, I., & Johnson, E. S. (2003). The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44113-44120.

Caruthers, J. M., & McKay, D. B. (2002). Helicase structure and mechanism. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(1), 123–133. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00298-1](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00298-1)

- De Silva, D., Fontanesi, F., & Barrientos, A. (2013). The DEAD box protein Mrh4 functions in the assembly of the mitochondrial large ribosomal subunit. *Cell metabolism*, *18*(5), 712–725.
- Deimling, T., Cui, S., Lammens, K., Hopfner, K.-P., & Witte, G. (2014). Crystal and solution structure of the human RIG-I SF2 domain. *Acta Crystallographica Section F*, *70*(8), 1027–1031. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14012230>
- Ellis, N. A., Groden, J., Ye, T. Z., Straughen, J., Lennon, D. J., Ciocci, S., Proytcheva, M., & German, J. (1995). The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell*, *83*(4), 655–666. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90105-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90105-1)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.03.011>
- Gaidutšik, I., Sedman, T., Sillamaa, S., & Sedman, J. (2016). Irc3 is a mitochondrial DNA branch migration enzyme. *Scientific Reports*, *6*(1), 26414. <https://doi.org/10.1038/srep26414>
- Gorbalenya, A. E., & Koonin, E. V. (1993). Helicases: Amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current Opinion in Structural Biology*, *3*(3), 419–429. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(05\)80116-2](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(05)80116-2)
- 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
- Hehman, G. L., & Hauswirth, W. W. (1992). DNA helicase from mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(18), 8562–8566.
- 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.
- Jankowsky, E., Gross, C. H., Shuman, S., & Pyle, A. M. (2000). The DExH protein NPH-II is a processive and directional motor for unwinding RNA. *Nature*, *403*(6768), 447–451.
- Kitao, S., Shimamoto, A., Goto, M., Miller, R. W., Smithson, W. A., Lindor, N. M., & Furuichi, Y. (1999). Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nature Genetics*, *22*(1), 82–84. <https://doi.org/10.1038/8788>

- Kuhn, B., Abdel-Monem, M., & Hoffmann-Berling, H. (1979). DNA helicases. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 43 Pt 1, 63–67. <https://doi.org/10.1101/sqb.1979.043.01.011>
- Lahaye, A., Stahl, H., Thines-Sempoux, D., & Foury, F. (1991). PIF1: a DNA helicase in yeast mitochondria. *The EMBO Journal*, 10(4), 997-1007.
- Loenen, W. A. M., Dryden, D. T. F., Raleigh, E. A., & Wilson, G. G. (2014). Type I restriction enzymes and their relatives. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 20–44. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt847>
- Lohman, T.M. ja Bjornson, K.P. (1996). Mechanisms of helicase-catalysed DNA unwinding. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 169-214
- Lohman, T. M., Tomko, E. J., & Wu, C. G. (2008). Non-hexameric DNA helicases and translocases: Mechanisms and regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(5), 391–401. <https://doi.org/10.1038/nrm2394>
- Matson, S.W. ja Kaiser-Rogers, K.A. (1990). DNA Helicases. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 289-329.
- Merz, S. ja Westermann, B. (2009). Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol.* 10(9): R95.
- Piljukov, V. J., Garber, N., Sedman, T., & Sedman, J. (2020). Irc3 is a monomeric DNA branch point-binding helicase in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 594(19), 3142-3155.
- Piljukov, V. J., Sillamaa, S., Sedman, T., Garber, N., Rätsep, M., Freiberg, A., & Sedman, J. (2023). Mitochondrial Irc3 helicase of the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha* displays dual DNA-and RNA-stimulated ATPase activity. *Mitochondrion*, 69, 130-139.
- Samuel, R. V. M., Farrukh, S. Y., Rehmat, S., Hanif, M. U., Ahmed, S. S., Musharraf, S. G., Durrani, F. G., Saleem, M., & Gul, R. (2018). Soluble Production of Human Recombinant VEGF-A121 by Using SUMO Fusion Technology in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*, 60(8), 585–594. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0094-3>

- Schmid S.R., Linder P. (1992). D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Mol Microbiol.* 6(3):283-91.
- Schmidt, U., Lehmann, K., & Stahl, U. (2002). A novel mitochondrial DEAD box protein (Mrh4) required for maintenance of mtDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 2(3), 267-276.
- Sedman, T., Kuusk, S., Kivi, S., & Sedman, J. (2000). A DNA helicase required for maintenance of the functional mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 20(5), 1816-1824.
- 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.
- Sedman, T., Garber, N., Gaidutšik, I., Sillamaa, S., Paats, J., Piljukov, V. J., & Sedman, J. (2017). Mitochondrial helicase Irc3 translocates along double-stranded DNA. *FEBS letters*, 591(23), 3831-3841.
- 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.
- S raphin, B., Simon, M., Boulet, A., & Faye, G. (1989). Mitochondrial splicing requires a protein from a novel helicase family. *Nature*, 337(6202), 84–87. <https://doi.org/10.1038/337084a0>
- Singelton, M.R., Dillingham, M.S., Wigley, D.B. (2007). Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 23-50.
- Stepien, P. P., Margossian, S. P., Landsman, D., & Butow, R. A. (1992). The yeast nuclear gene *suv3* affecting mitochondrial post-transcriptional processes encodes a putative ATP-dependent RNA helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(15), 6813-6817.
- 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 (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(8), 842-853.
- 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.

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). Unraveling DNA helicases: motif, structure, mechanism and function. *European Journal of Biochemistry*, 271(10), 1849-1863.

Umez, K., Nakayama, K., & Nakayama, H. (1990). Escherichia coli RecQ protein is a DNA helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(14), 5363-5367.

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.

Wu, C. G., & Spies, M. (2013). Overview: what are helicases?. *Advances in experimental medicine and biology*, 767, 1–16. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5037-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5037-5_1)

Yu, C. E., Oshima, J., Fu, Y. H., Wijsman, E. M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., Martin, G. M., Mulligan, J., & Schellenberg, G. D. (1996). Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5259), 258–262. <https://doi.org/10.1126/science.272.5259.258>

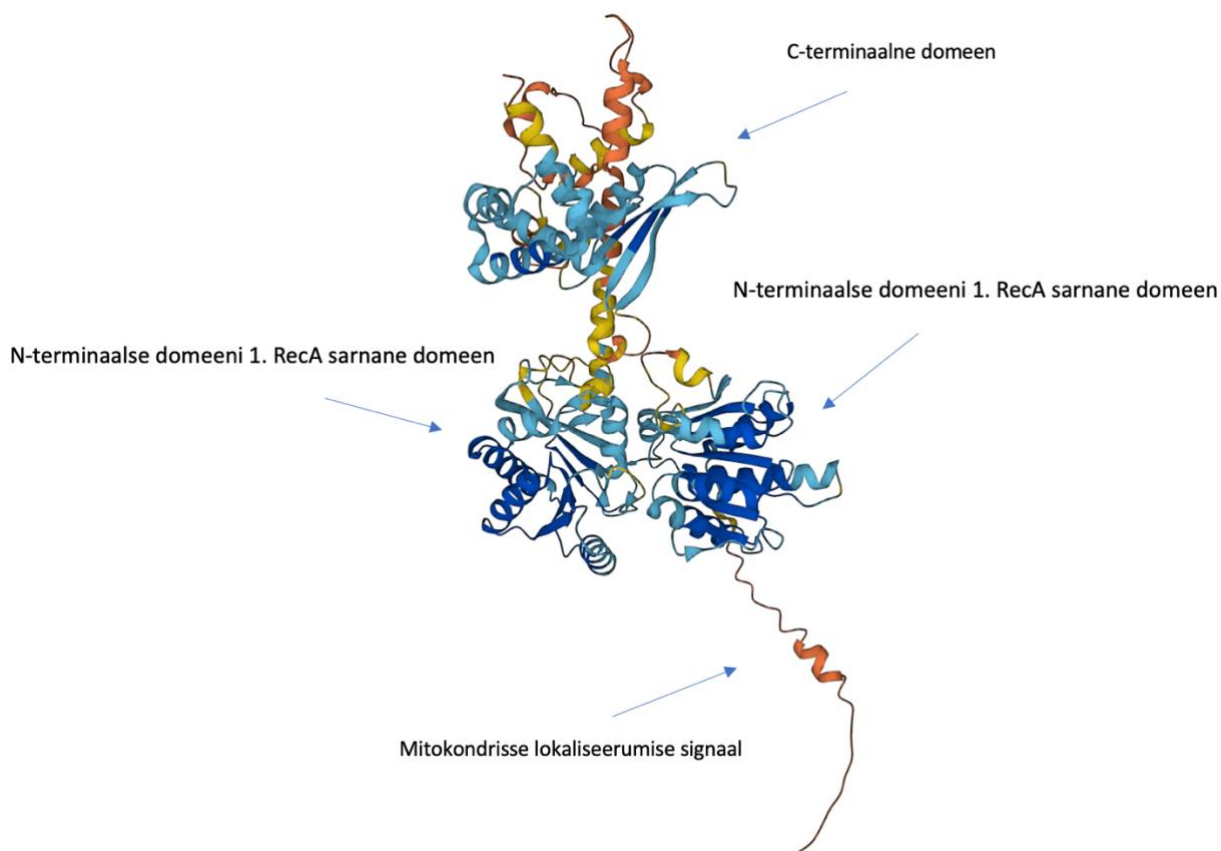
Kasutatud veebiaadressid:

AlphaFold, valgustruktuuride andmebaas: <https://alphafold.ebi.ac.uk/> , viimati kasutatud 28.05.2023

SnapGene, plasmidi failide andmebaas ja tarkvara nende disainimiseks: <https://www.snapgene.com/> , viimati kasutatud 28.05.2023

Nebcutter V2.0, restriksiooni kohtade leidmise tööriist: <https://www.labtools.us/nebcutter-v2-0/> , viimati kasutatud 28.05.2023

## Lisad



**Lisa 1. *S. cerevisiae* ennustatud ruumiline struktuur.** Joonisel on näidatud *S. cerevisiae* Irc3 ennustatud ruumiline struktuur ning välja on toodud C-terminaalne lisadomeen, 2 N-terminaalset RecA sarnast mootordomeeni ning 28 aminohapet pikk mitokondrisse lokaliseerumise signaal. Värvid tähistavad ennustuse kindlust: tumesinine on väga kõrge ehk üle 90% kindlus, helesinine tähistab 70% - 90% kindlust, kollane tähistab 50% - 70% kindlust ja oranž tähistab alla 50% kindlust (AlphaFold protein structure database järgi).

**Lisa 2. Töös kasutatud valkude aminohappelised järjestused, konserveerunud motiivid on esile tõstetud kollase märgisega**

Valk	Valgu aminohappeline järjestus
WT	SSLSLRPYQQECVDTCLKSLETRRIA <b>VSLATGGGKT</b> VIFSHLIDQIPPNPKTGRSKT <b>LILVHRK</b>
Oplrc3	<b>ELA</b> DQAIASLRKVYPQYKIELDMANRKPSHAPDIDVVVASVPTLNRSQRLEAHPGEYKA IVV <b>DECH</b> HGVADSYTKILKHFGCDSADCDIALLG <b>SAT</b> LSRYDELPLGLAFDEIVFDKNLVDLI REGYLSDFSWIQVSAGLELSQVSIKGDGYKMEELANHVNKDEINALVFQSYQHFAQKYQ LKSSL <b>FFCVN</b> VAHLESLSLVFRSNGVNAQYVTGNTSKFERERLVAEFSNGQLP <b>VLMNC</b> GVF <b>TEGTD</b> IPSIDS <b>IFI</b> VRPTQSKLLT <b>QMVGRGLR</b> LHESKHRCYVIDFVDAHRVGVHSNPTLEG

	KIKTNGVSLFESDTGRGRKEPPEIEDIKYMEYDTLDGYQKIFEKFEQEVIQTENIFGKFKTSQ FPWIQLRRDVWGLNIGNEEFYQIQIHPTGAKTSLVKIIRRGKIRYPESQKITEKATLEELFVE FEKQLEKHS DKYRSFRQTLIRGAIQKQRDFIRSVTINLVDKNPKIDKAKFVGFLDKKLNLSLK FAASNLI FAYTVSRTNALKL FVKQQVLPSKALQKYVVSR
Oplrc3 N416	SSLSLRPYQQECVDTCLKSLETTRIAVSLATGGGKT VIFSHLIDQIPPNPKTGRSKT LILVHRK ELADQAIASLRKVYPQYKIELDMANRKPSHAPDIDVVVASVPTLNRS AQRLEAHPGEYKA IVVDECHHG VADS YTKILKHFGCDSADCDIALLGFSATLSRYDELPLGLAFDEIVFDKNLVDLI REGYLSDFSWIQVSAGLELSQVSIGKGDYKMEELANHVNKDEINALVFQSYQHFAQKYQ LKSSLFFCVNVAHLESLSLVFRSNGVNAQYVTGNTSKFERERLVAEFSNGQLP VLMNCGVF TEGTDIPSIDSIFIVRPTQSKLLT QMVGRGLRLHESKHRCYVIDFVDAHRVGVHSNPTLEG KIKTNGVSLFESDTGRGRKEPPEIEDIKYMEYDTLDGYQKIFE
Oplrc3 N385	SSLSLRPYQQECVDTCLKSLETTRIAVSLATGGGKT VIFSHLIDQIPPNPKTGRSKT LILVHRK ELADQAIASLRKVYPQYKIELDMANRKPSHAPDIDVVVASVPTLNRS AQRLEAHPGEYKA IVVDECHHG VADS YTKILKHFGCDSADCDIALLGFSATLSRYDELPLGLAFDEIVFDKNLVDLI REGYLSDFSWIQVSAGLELSQVSIGKGDYKMEELANHVNKDEINALVFQSYQHFAQKYQ LKSSLFFCVNVAHLESLSLVFRSNGVNAQYVTGNTSKFERERLVAEFSNGQLP VLMNCGVF TEGTDIPSIDSIFIVRPTQSKLLT QMVGRGLRLHESKHRCYVIDFVDAHRVGVHSNPTLEG KIKTNGVSLFES
Oplrc3 C415	FEKFEQEVIQTENIFGKFKTSQFPWIQLRRDVWGLNIGNEEFYQIQIHPTGAKTSLVKIIR RGKIRYPESQKITEKATLEELFVEFEKQLEKHS DKYRSFRQTLIRGAIQKQRDFIRSVTINLVD KNPKIDKAKFVGFLDKKLNLSLKFAASNLI FAYTVSRTNALKL FVKQQVLPSKALQKYVVSR
Oplrc3 C385	RCYVIDFVDAHRVGVHSNPTLEGKIKTNGVSLFESDTGRGRKEPPEIEDIKYMEYDTLDGYQ KIFEKFEQEVIQTENIFGKFKTSQFPWIQLRRDVWGLNIGNEEFYQIQIHPTGAKTSLVKII RRGKIRYPESQKITEKATLEELFVEFEKQLEKHS DKYRSFRQTLIRGAIQKQRDFIRSVTINLV DKNPKIDKAKFVGFLDKKLNLSLKFAASNLI FAYTVSRTNALKL FVKQQVLPSKALQKYVVSR

Lisa 3. ATP hüdrolüüsi aktiivsuse arvutamise lahenduskäigu tabel.

	N-term			WT			Neg
	I	II	III	I	II	III	I
<b>OD/min*H</b>	<b>0,0234</b>	<b>0,0248</b>	<b>0,0257</b>	<b>0,0033</b>	<b>0,0028</b>	<b>0,0011</b>	<b>0,0004</b>
<b>M/min</b>	3,77E-06	0,00000 4	4,15E-06	5,32E-07	4,52E-07	1,77E-07	6,45E- 08
<b>pmol NADH/min</b>	566,129	600	621,774	79,8387	67,7419	26,6086	9,67742
<b>pmol ATP/pmol Irc3 min-1</b>	3,37248 1	3,57776	3,70972 5	46,7793 9	38,7148 8	29,0317 3	- 3,22061
<b>pmol ATP/pmol Irc3 sek-1</b>	0,05620 8	0,05962 9	0,06182 9	0,77965 7	0,64524 8	0,48386 2	- 0,05368
<b>Extinct (1/M*cm)</b>	6200	6200	6200	6200	6200	6201	6200
<b>Irc3 c(pmol)</b>	165	165	165	1,5	1,5	0,75	3
<b>Irc3 c(pM)</b>	1100000	1100000	1100000	10000	10000	5000	20000
<b>background</b>	0,05860	0,05860	0,05860	6,44641	6,44641	6,44641	6,44641

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Jakob Mäeots

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose  
„*Ogataea polymorpha* helikaasi Irc3 funktsionaalsuse uurimine N-terminaalse domeeni  
analüüsi kaudu“

mille juhendajad on Tiina Sedman, PhD, prof. Juhan Sedman

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks  
Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative  
Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost  
reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja  
kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega  
isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Jakob Mäeots

29.05.2023