

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÜLDISE JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

***Hansenula polymorpha* rekombinatiivse helikaasi Irc3 ekspressioon,
puhastamine ja aktiivsuse võrdlus *Saccharomyces cerevisiae* Irc3-ga**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Kadri Maal

Juhendajad prof. Juhan Sedman

ja PhD Tiina Sedman

TARTU 2018

***Hansenula polymorpha* rekombinatiivse helikaasi Irc3 ekspressioon, puhastamine ja aktiivsuse võrdlus *Saccharomyces cerevisiae* Irc3-ga**

Bakalaureusetöö

Kadri Maal

Lühikokkuvõte. *H. polymorpha* on termotolerantne metülotroofne pärmseen, mille optimaalne kasvutemperatuur on 45 °C (Levine ja Cooney, 1973) ning mis sobib hästi rekombinantsete valkude tootmiseks (Hollenberg ja Gellissen, 1997). Irc3 on mitokondriaalne helikaas, mis on oluline mitokondriaalse DNA säilitamisel (Sedman jt., 2014). Antud töö eesmärgiks oli ekspresseerida ja puhastada *H. polymorpha* Irc3 helikaas ning viia läbi ATPaasse aktiivsuse mõõtmised erinevatel temperatuuridel, et vaadata võimalikku temperatuuri mõju Irc3 valgu aktiivsusele. Samad katsed viidi läbi ka *S. cerevisiae* Irc3-ga. Katsete tulemusena selgus, et *H. polymorpha* Irc3 valgul esines ATPaasset aktiivsust veel ka 42 °C juures, kuid *S. cerevisiae* valgul mitte. See näitas, et *H. polymorpha* Irc3 valk on termostabiilsem võrreldes *S. cerevisiae* Irc3-ga.

CERCS teaduseriala kood: P320 (Nukleiinhappe süntees, proteiini süntees)

Märksõnad: *Hansenula polymorpha*, Irc3 helikaas, valgu puhastus, valgu termostabiilsus

Expression, purification and activity of *Hansenula polymorpha*'s recombinant helicase Irc3 compared to *Saccharomyces cerevisiae*'s Irc3

Bachelor's thesis

Kadri Maal

Abstract. *H. polymorpha* is a thermotolerant methylotrophic yeast with an optimum growth temperature of 45 °C (Levine and Cooney, 1973), which is well suited for the production of recombinant proteins (Hollenberg and Gellissen, 1997). Irc3 is a mitochondrial helicase, which is needed for mitochondrial DNA maintenance (Sedman et al., 2014). The aim of this study was to express and purify the *H. polymorpha*'s Irc3 helicase and to conduct measurements of ATPase activity at various temperatures to see the possible effect temperature has on Irc3's activity. Same experiments were done also with *S. cerevisiae*'s Irc3 protein. The study showed that the *H. polymorpha*'s Irc3 protein exhibited ATPase activity even at 42 °C, whereas the *S. cerevisiae*'s Irc3 protein did not, which suggests that the *H. polymorpha*'s Irc3 protein is more thermostable.

CERCS research specialization: P320 (Nucleic acid synthesis, protein synthesis)

Keywords: *Hansenula polymorpha*, Irc3 helicase, protein purification, protein thermostability

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. <i>Hansenula polymorpha</i> iseloomustus.....	7
1.2. Termostabiilsus.....	8
1.2.1. <i>H. polymorpha</i> termostabiilsus.....	8
1.3. <i>H. polymorpha</i> ja <i>S. cerevisiae</i> võrdlus.....	9
1.4. Helikaasid ja superperekond 2.....	9
1.5. Mitokondriaalne helikaas Irc3 ja selle omadused.....	12
2. EKSPERIMENTAALOSA	13
2.1. Töö eesmärk	13
2.2. Materjalid ja meetodika.....	13
2.2.1. Töös kasutatud genoomne DNA järjestus, plasmiid ja bakteritüved.....	13
2.2.2. Praimerid ja restriктаasid.....	15
2.2.3. Söötmed.....	17
2.2.4. Puhvrid ja lahused	17
2.2.5. PCR amplifikatsiooni meetod, kasutades <i>Phusion High-Fidelity</i> DNA polümeraasi	19
2.2.6. Geelelektroforees ja PCR produkti puhastamine.....	19
2.2.7. DNA ja plasmidi restriksioon.....	20
2.2.8. Lõigatud DNA fragmendi ja plasmidi selekteerimine 0,8 % agarosgeel elektroforeesiga	20
2.2.9. IRC3 geeni sisestamine pGEX-4T-1 plasmidi	21
2.2.10. pGEX-4T-1 IRC3 plasmidi transformatsioon ja amplifikatsioon <i>E. coli</i> DH5 α rakkudes.....	21
2.2.11. pGEX-4T-1 IRC3 plasmidi eraldamine <i>E. coli</i> DH5 α rakkudest ja puhastamine fenooltöötusega.....	21
2.2.12. pGEX-4T-1 IRC3 plasmidi transformatsioon <i>E. coli</i> BL21-RIL rakkudesse	22
2.2.13. pGEX-4T-1 IRC3 plasmidi ekspresioonisüsteem <i>E. coli</i> rakkudes.....	22
2.2.14. <i>E. coli</i> BL21-RIL rakkude kasvatamine ja GST-Irc3 liitvalgu ekspressiooni induktsioon	23

2.2.15.	10% SDS- polüakrüülamiid geelelektroforees valgu ekspressiooni kontrolliks	24
2.2.16.	Rekombinantse Irc3 valgu puhastamine 50 ml-st ja 250 ml-st <i>E. coli</i> BL21-RIL rakkudest.....	25
2.2.16.1.	GST-Irc3 liitvalgu puhastamine ekspressiooni kontrolliks 50 ml-st <i>E. coli</i> BL21-RIL rakkudest	25
2.2.16.2.	GST-Irc3 liitvalgu puhastamine 250 ml-st <i>E. coli</i> BL21-RIL rakkudest kasutades ammonium sulfaadiga sadestamist	26
2.2.17.	Irc3-GST liitvalgu lõikamine trombiiniga.....	27
2.2.18.	Katioonvahetus S-Sepharose kolonnil.....	27
2.2.19.	Valgu kontsentratsiooni mõõtmine NanoDrop spektrofotomeetriga.....	28
2.2.20.	Irc3 valgu ATPaasse aktiivsuse mõõtmine.....	28
2.2.21.	Irc3 valgu helikaasse aktiivsuse mõõtmine	29
2.3.	Tulemused	30
2.3.1.	pGEX-4T-1 IRC3 ekspressiooni plasmidi valmistamine	30
2.3.2.	pGEX-4T-1 plasmidi transformatsioon <i>E. coli</i> BL21-RIL rakkudesse, GST-Irc3 liitvalgu valgu ekspressiooni induktsioon	31
2.3.3.	GST-Irc3 liitvalgu puhastamine <i>E. coli</i> BL21-RIL rakkudest	33
2.3.4.	GST-Irc3 liitvalgu lõikamine trombiiniga ja katioonvahetus S-Sepharose kolonnil .	35
2.3.5.	Irc3 valgu ATPaasse aktiivsuse mõõtmine.....	35
2.3.6.	Irc3 valgu helikaasse aktiivsuse mõõtmine	37
2.4.	Arutelu.....	39
	KOKKUVÕTE.....	43
	SUMMARY.....	44
	TÄNUSÕNAD.....	46
	KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU.....	47
	Kasutatud veebiadressid	51
	LISA 1.....	52
	LIHTLITSENTS.....	53

KASUTATUD LÜHENDID

Amp – ampitsilliin

BSA – veise seerumalbumiin

Cam – klooramfenikool

DMSO – dimetüülsulfoksiid

DNA – desoksüribonukleinhape

dNTP – desoksünukleosiidtrifosfaat

DTT – ditiotreitool

EDTA – etüleendiamiintetraäädikhape

EtBr – etiidiumbromiid

EtOH – etanool

GST – glutatioon-S-transferaas

IPTG – isopropüül-2-tio- β -D-galaktopüranosiid

n/a – andmed puuduvad

NTP – nukleosiidtrifosfaat

mtDNA – mitokondriaalne DNA

ORF – avatud lugemisraam

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon

PMSF – fenüülmetüülsulfonüülfluoriid

rDNA – ribosomaalne DNA

RNA – ribonukleinhape

rRNA – ribosomaalne RNA

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat

SF – superperekond (*superfamily*)

STE – naatriumkloriid-Tris-EDTA

TAE – Tris-atsetaat-EDTA puhver

Tris – tris(hüdroksümetüül)aminoetaan

SISSEJUHATUS

Hansenula polymorpha (*H. polymorpha*) on termotolerantne metülotroofne pärmseen, mis on võimeline kasvama, vajades ainukese süsiniku allikana metanooli ning mille optimaalne kasvutemperatuur on 45 °C (Levine ja Cooney, 1973). *H. polymorpha*-t saab kasutada mudelorganismina, uurimaks peroksüsoomide funktsiooni ja biogeneesi, nitraatide assimilatsiooni (Gellissen ja Veenhuis, 2001; van der Klei ja Veenhuis, 2002; van der Klei jt., 2006; Siverio, 2002; Veenhuis, 1992) ning metanooli metabolismi regulatsiooni (Yurimoto jt., 2002). *H. polymorpha* sobib hästi ka rekombinantsete valkude tootmiseks (Hollenberg ja Gellissen, 1997; Gellissen jt., 2005). Kuna *H. polymorpha* on termotolerantne pärmseen, siis on ta võimeline tootma termostabiilsemaid valke (Gellissen, 2006). Termostabiilsemad valgud on paremad valgu kristallstruktuuride saamiseks, seega ka valgu struktuuri uurimiseks kristallograafiliselt.

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) Irc3 on kaheaahelalisest DNA-st sõltuv mitokondriaalne helikaas (superperekonna 2 alla kuuluvast DExH/D-box perekonnast), mis on oluline mitokondriaalse DNA stabiilsuse hoidmisel (Sedman jt., 2014). Irc3 seondub selektiivselt ja harutab lahti Holliday ühendusi ning replikatsioonikahvli struktuure (Gaidutšik jt., 2016). Samuti on teada, et see valk translokeerib kaheaahelisel DNA-l (Sedman jt., 2017). *H. polymorpha* IRC3 geen on oma DNA järjestuse poolest väga sarnane *S. cerevisiae* IRC3 geenile ning suure tõenäosusega täidavad need valgud rakus sama rolli.

Käesoleva bakalaureuse töö eesmärgiks oli ekspresseerida ja puhastada funktsionaalset *H. polymorpha* mitokondriaalset Irc3 valku ja analüüsida selle valgu ATPaasset aktiivsust erinevatel temperatuuridel (30 °C, 32 °C ja 42 °C), et välja selgitada selle valgu võimalikku termostabiilsust ning võrrelda saadud tulemusi *S. cerevisiae* Irc3 valgu ATPaasse aktiivsusega samadel temperatuuridel.

Töö käigus ekspresseerisin ja puhastasin funktsionaalset *H. polymorpha* Irc3 valku sellises koguses, mis võimaldas läbi viia ATPaasse ja helikaasse aktiivsuse katsed. Puhastatud termostabiilsema *H. polymorpha* Irc3 valgu funktsionaalsuse olemasolu võib anda võimaluse parema kristallstruktuuri saamiseks, kui seda oleks võimalik saada *S. cerevisiae* Irc3 valguga.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. *Hansenula polymorpha* iseloomustus

H. polymorpha (ka *Pichia angusta*, *Ogataea polymorpha*) on termotolerantne metülotroofne pärmseen, mida esimesena leiti piiritustehase reoveega niisutatud mullast (Morais ja Maia, 1959) ning riknenud kontsentreeritud (50% suhkur) apelsinimahlast, mis oli konserveeritud ja pastöriseeritud, kuid mis kääritas (Wickerham, 1951).

Metülotroofsus tähendab, et mikroorganism suudab kasvamiseks vajaliku süsiniku allikana kasutada ühe-süsinikulisi või mitme-süsinikulisi ühendeid, millel puuduvad süsinik-süsinik sidemed, vastavalt näiteks metanool ja metaan või dimetüüleeter ja dimetüülamiin (Methylotrophy, 2016).

Nimetus *polymorpha* (ingl k *poly* – palju, mitu; *morpha* – vormi omav) iseloomustab pärmseene kolooniate varieeruvust. Haploid ja diploid kolooniaid saab teineteisest eristada värvuse, suuruse, rakkude paigutumise ja askuste konjugeerituse järgi (Teunisson jt., 1960; Wickerham, 1970).

Antud töös kasutusel olev *H. polymorpha* tüvi DL-1 (sünonüümne ATCC26012 ja NRRL-Y-7560-ga) oli esmalt eraldatud pinnasest ja identifitseeritud teadlaste Levine ja Cooney poolt aastal 1973. Nende töös on kirjeldatud antud tüve omadusi järgmiselt:

- *H. polymorpha* oli võimeline kasvama, vajades ainukese süsiniku allikana metanooli;
- 37 °C juures oli tüve optimaalne keskkonna pH 4,5 kuni 5,5 ning omakorda pH 4,5 juures oli tüve optimaalne kasvutemperatuur 37 °C kuni 42 °C.
- kemostaadis oli pärmseene kasvu näha ka kuni 50 °C juures, optimaalseim temperatuur, mille juures oli näha tugevat kasvu, oli 45 °C;
- rakkudes sisalduva valgu kontsentratsiooniks saadi 46% ja totaalne nukleiinhappe sisaldus aktiivselt kasvavates rakkudes varieerus 5,0-st kuni 7,0%-ni. (Levine ja Cooney, 1973)

H. polymorpha-t on laialdaselt kasutatud juba aastakümneid nii elementaar- kui ka rakenduslikus teadustöös (Kunze jt., 2009). Seda pärmist saab kasutada mudelorganismina, uurimaks peroksüsoomide funktsiooni ja biogeneesi, nitraatide assimilatsiooni (Gellissen ja Veenhuis, 2001; van der Klei ja Veenhuis, 2002; van der Klei jt., 2006; Siverio, 2002; Veenhuis, 1992), ning metanooli metabolismi regulatsiooni (Yurimoto jt., 2002). *H. polymorpha*-t saab kasutada ka nii öelda tehasena rekombinantsete valkude tootmiseks (Hollenberg ja Gellissen, 1997; Gellissen jt., 2005). *H. polymorpha* on termotolerantne ning seega saab seda kasutada, et toota valke, mis on termostabiilsemad (Gellissen, 2006). Termostabiilsemad valgud on paremad kristallstruktuuri saamiseks ja seega valgu struktuuri uurimiseks kristallograafiliselt.

1.2. Termostabiilsus

Termostabiilsus on resistentsus kõrge temperatuurist tingituna mingis aines toimunud pöördumatu keemilise või füüsilise muutuse vastu. Valkude termostabiilsus on valgu polüpeptiidahelate unikaalse struktuuri ja keemiliste omaduste säilitamine kõrgete temperatuuride juures (Zhou jt., 2008). Termostabiilsus on väga oluliseks omaduseks ensüümidel, näiteks suurendab valgu termostabiilsus tootlikkust tööstuses, kuna kõrgemate temperatuuride juures on rohkem reagente ja ühendeid kasutamiseks saadaval (Lasa ja Berenguer, 1993; Leuschner ja Antranikian, 1995). Samuti on reaktsioonid kõrgematel temperatuuridel, kasutades termostabiilseid ensüüme, suurenenud lahustuvuse tõttu tõhusamad, kuna kaob ära vajadus pidevaks jahutamiseks, mis tavaliselt aeglustab tootmist, mis kehtib näiteks mesofiilsete ja mõnede sünteetiliste ensüümide tootmise puhul (Becker jt., 1997; Haki ja Rakshit, 2003; Lioliou jt., 2004). Termofiilsed organismid on termostabiilsete ensüümide looduslikuks allikaks, mida saab kasutada tööstuslikeks rakendusteks.

1.2.1. *H. polymorpha* termostabiilsus

H. polymorpha rakud on kohandunud kasvamiseks kõrgetel temperatuuridel, isegi kuni 48 °C-ni, kuid seejuures osaliselt sõltudes kasvuks kasutatavast süsinikuallikast (Gellissen, 2002, lk 12). Kuumastressi korral indutseerivad transkriptsioonifaktorid Hsf1/Msn2/4 pärmides valkude ekspressiooni kuumašoki ja trehaloosi biosünteesi geenidelt (Boy-Marcotte jt., 1999; Eastmond ja Nelson, 2006; Martínez-Pastor jt., 1996). *H. polymorpha* puhul on näidatud, et trehaloos-6-fosfaati (Tre6P) sünteesiva geeni TPS1 deleteerimisel ei suuda rakud enam trehaloosi sünteesida, tingimustes, kus tavaliselt metsiktüüpi rakkudes koguneb palju trehaloosi (Reinders jt., 1999). Reinders jt. (1999) leidsid ka, et kõrgetel temperatuuridel kasvamisel ei ilmnenud Tre6P valgu puudumisel rakkudel silmnähtavaid kasvudefekte glükoosi sisaldavas söötmes, küll aga oli rakkude võime omandada termotolerantsust tõsiselt ohustatud. Sellest järeldati, et kõrge trehaloosi tase metsiktüüpi rakkudes pole vajalik kasvamiseks kõrgetel temperatuuridel, vaid pigem võib see toimida kaitsena võimalike karmimate soojustingimuste tekkimisel (Reinders jt., 1999). Kõrge temperatuur kahjustab rakke mitmel viisil, kuid kõige kriitilisemad on kahjustused membraanide vastupidavusele ja valkude struktuurile ning funktsionaalsusele (valkude denaturatsioon ja agregeerumine). Selle vastu aitavad väikesed kuumašoki valgud, koos ATP-sõltuvate kuumašoki valkude ja trehaloosiga, mis vahendavad kokkupakkimata valkude agregatsiooni vältimist, lahustavad tekkinud valkude agregate ning abistavad valkude taasvoltumist (Elbein jt., 2003; Glover ja Lindquist, 1998; Lindquist ja Kim, 1996).

1.3. *H. polymorpha* ja *S. cerevisiae* võrdlus

H. polymorpha kasutamise kasvavat populaarsust saab omistada tema eelistele *S. cerevisiae* ees. Näiteks omab *H. polymorpha* väga tugevaid ning rangelt reguleeritud metanooli metabolismiga seotud promotoreid, samuti omab ta võimet kasvada kõrgete tihedusteni isegi kõige lihtsamatel mineraalsöötmetel (Gellissen jt., 1995).

Gellissen (2002, lk 124) on toonud välja veel ühe erilise *H. polymorpha* omaduse, milleks on sagedase mitte-homoloogilise rekombinatsiooni toimumine, mida näiteks klassikalises mudelorganismis *S. cerevisiae*-s ei toimu. Rakku transformeeritud DNA, isegi autonoomseks paljunemiseks vajalikku järjestust kandev plasmiid, kipub integreeruma peremees organismi genoomi juhuslikesse kohtadesse läbi mitte-homoloogilise rekombinatsiooni. See tekitab erinevaid individuaalseid, mitootiliselt stabiilseid integraale, mis omavad ühte või mitut plasmidi kordusjärjestuse koopiat.

Seega on *H. polymorpha* sobilik peremeesorganism võõrgeenide kõrgetasemeliseks ekspressiooniks, eriti veel kui tahetakse kahte erinevat valku koos ekspresseerida. Samas põhjustab see sama omadus ka probleeme, kui tahetakse *H. polymorpha* genoomi mingisugusesse kindlasse alasse teha täpset ekspressiooni kasseti sisestust (Gellissen, 2002, lk 125).

Võrreldes *H. polymorpha*-t *S. cerevisiae*-ga on nende liikide omavahelisteks sarnasusteks näiteks nende ribosomaalse DNA (rDNA) korduste (vaata tabel 1) sarnane organiseeritus (Gellissen, 2002, lk 99) ning ka nende mtDNA järjestuses leidub üksteisele sarnaseid kordusjärjestusi ja motiive (Eldarov jt., 2011).

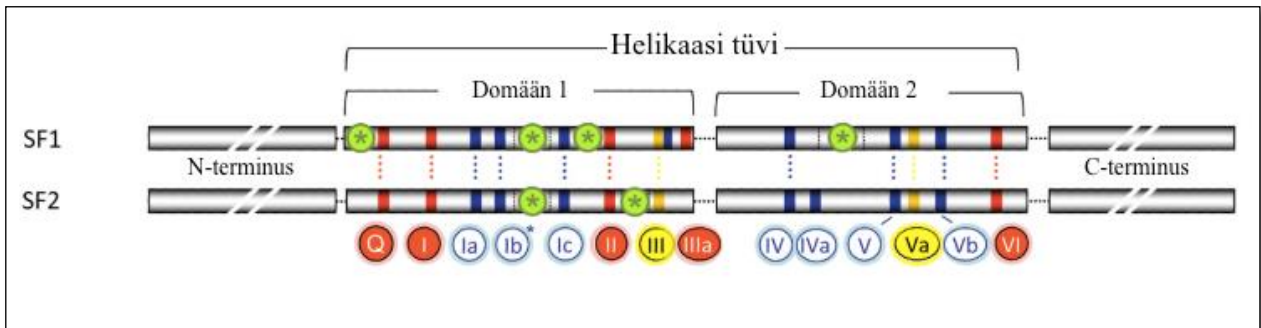
Tabel 1. *H. polymorpha* ribosomaalset RNA-d (rRNA) kodeeriva DNA homoloogia *S. cerevisiae*-ga (Gellissen, 2002, lk 100).

	5S rDNA	18S rDNA	5,8S rDNA	25S rDNA
<i>S. cerevisiae</i> võrreldes	97,5%-line	94,3%-line	94,8%-line	92,3%-line
<i>H. polymorpha</i>-ga	homoloogia	homoloogia	homoloogia	homoloogia

1.4. Helikaasid ja superperekond 2

DNA helikaasid on ensüümid, mis katalüüsivad DNA kaksikheeliksi komplementaarsete ahelate lahtikeerdumist. Nad teevad seda, translokeerides mööda ühte ahelat nukleiinhappe kaksikheeliksil, et mehaaniliselt lahti harutada nende teel olevat heeliksit, kasutades selleks nukleosiidtrifosfaatide (NTP) hüdrolyüüsi vabaenergiat (Voet jt., 2008).

Superperekonna (SF) 2 helikaaside eristavaks tunnuseks on konserveerunud helikaasi tuum (*core*), mis koosneb kahest sarnasest valgudomäänist (vaata joonis 2) (Singelton jt., 2007).



Joonis 2. SF1 ja SF2 helikaaside tüvijärjestuste organiseeritus (Singelton jt., 2007). Iseloomulikud järjestuse motiivid on märgitud värviga vastavalt nende peamisele biokeemilisele funktsioonile: punane – ATP sidumine ja hüdrolüüs; kollane – koordinatsioon nukleiinhappe ja NTP sidumiskohtade vahel; sinine – nukleiinhappe sidumine. Rohelised tärnikesed märgivad lisa-domäänide sisendeid. Plokkide pikkused ja konserveerunud domäänide vaheline kaugus ei ole tegelikkusele vastavad. Motiivid on nummerdatud järjestikuliselt. IVa-motiiv SF2 valkudes on tihti märgitud ka kui QxxR ja Ic-motiiv kui TPGR. Ib-motiivil märgitud tärnike (*) tähendab seda, et mõnede valkude puhul on see motiiv asendatud lisa-domääniga.

SF2 hulka kuuluvad sellised helikaaside perekonnad, nagu RecQ-sarnased, RecG-sarnased, Rad3/XPD, Ski2-sarnased, T1R, Swi/Snf, RIG-I-sarnased, DEAD-box, DEAH/RHA ja NS3/NPH-II (vaata tabel 2) (Fairman-Williams jt., 2010). Käesolevas bakalaureusetöös puhastatud ja analüüsitud Irc3 valk on helikaas superperekonna 2 alla kuuluvast DExH/D-box perekonnast.

Tabel 2. Superperekonna 2 alla kuuluvate perekondade mehaanilised omadused (Fairman-Williams jt., 2010).

	Valkude arv ^a S.c.	Nukleiinhappe eelistus ^b		NTP eelistus ^c				Lahtiharutamise polaarsus ^d		Funktsionaalne klassifikatsioon ^e
		DNA	RNA	A	G	C	U/T	3'→5'	5'→3'	
DEAD-box	26		+	+				+	+	n/a ^f
DEAH/RHA	7	+	+	+	+	+	+	+	+ ^g	SF2A α ^g
NS3/NPH-II	-	+	+	+	+	+	+	+		SF2A α
Ski2-sarnased	5	+	+	+				+		SF2A α
RIG-I-sarnased	1	+	+	+				+		SF2A α / β ^h
RecQ-sarnased	2	+		+				+	* ⁱ	SF2A α
RecG-sarnased	-	+		+				+		SF2A β
Swi/Snf	16	+		+				n/a	n/a	SF2 β
T1R	-	+		+				n/a	n/a	SF2 β
Rad3/XPD	2	+		+					+	SF2B α

^a Andmed on saadud Swissprot ja Genbank andmebaasidest (S.c. – *S. cerevisiae*)

^b Nukleiinhappe eelistus näitab suutlikkust lahti harutada kas DNA-d või RNA-d. Perekondades, kus on nii RNA kui ka DNA helikaase, harutavad individuaalsed valgud enamasti lahti ainult kas RNA-d või DNA-d. On näidatud, et mõned viiruse valgud ja mõned Upf1-sarnased valgud suudavad aga mõlemaid nukleiinhappeid lahti harutada.

^c NTP eelistus näitab kindla perekonna valkude suutlikkust hüdrolüüsida kõiki nukleotiide sama efektiivsusega, või valkude spetsialiseeritust adenosiin trifosfaadile.

^d Lahtiharutamise polaarsus näitab, kas valk kindlast perekonnast vajab kaksikahelalise substraadi puhul üheaheelalist 3'-eendumist (3'→5') või 5'-eendumist (5'→3') kaksikahelalise regiooni ette.

^e Funktsionaalne klassifikatsioon on määratud Wigley jt. poolt väljapakutud süsteemi järgi (Singleton jt., 2007).

^f DEAD-box valgud, mis ei haruta kaksikahelaid kindla polaarsusega (Yang ja Jankowsky, 2006; Yang jt., 2007), pole klassifitseeritud selles süsteemis.

^g Mitmete DEAH valkude puhul on näidatud, et need võivad harutada DNA-d või RNA-d kahese polaarsusega, kuid 3'→5' on üldiselt eelistatud.

^h RIG-I on võimeline nii polaarselt harutama (SF2A α) DNA-d või RNA-d (Takahasi jt., 2008), kui ka kaheaheelisel RNA-l translokeerima (SF2 β) (Myong jt., 2009).

ⁱ Mitmed RecQ-sarnased valgud on spetsialiseerunud kindlatele erilistele DNA struktuuridele, ja pole selge, kas kõigil perekonna liikmetel on unikaalne polaarsus selliste substraatidega.

1.5. Mitokondriaalne helikaas Irc3 ja selle omadused

Irc3 on kaheaheelalisest DNA-st sõltuv helikaas, mis on vajalik funktsionaalse mitokondriaalse genoomi säilitamiseks. Pärsi *S. cerevisiae* Irc3 nullmutandi korral on nähtud kaheaheelaliste katkestuste kuhjumist mtDNA-s (De la Cruz jt., 1999; Sedman jt., 2014). Mitokondriaalse DNA (mtDNA) terviklikkus on oluline, kuna selle mutatsioonid ja deletsioonid võivad põhjustada mitokondri talitlushäireid, mis omakorda võivad inimeste puhul põhjustada näiteks ainevahetusega seotud haigusi, vähi teket või neuroloogilisi häireid (Nunnari ja Suomalainen, 2012; Taylor ja Turnbull, 2005). Samuti on näidatud, et mitokondri talitlushäired soodustavad vananemist (Park ja Larsson, 2011). *S. cerevisiae* on olnud heaks mudelorganismiks, sest valgud, mis vastutavad mitokondriaalse DNA säilitamise eest, on evolutsiooniliselt konserveerunud (Kaliszewska jt., 2015).

Gaidutšik jt. (2016) toovad välja, et *S. cerevisiae* Irc3 mõjutab mtDNA metaboolseid vaheühendeid selektiivselt seondudes ja lahti harutades Holliday ühendusi ning replikatsioonikahvli struktuure. Lisaks näitasid nad, et Irc3 valgu puudumist suudab osaliselt komplementeerida *Escherichia coli* (*E. coli*) valk RecG. RecG valk lokaliseerib taimedes mitokondritesse ja on näidatud, et see valk osaleb seal rekombinatsioonis ja mtDNA stabiilsuse tagamise protsessides (Odahara jt., 2015). Seega nendel valkudel võivad olla sarnased funktsioonid. Artikli autorid pakuvad välja, et Irc3 võime toetada mtDNA stabiilsust võib tuleneda selle potentsiaalsest omadusest stimuleerida replikatsioonikahvli regressiooni ja harude migratsiooni või omadusest pärssida ebaregulaarselt hargnenud molekulide moodustumist (Gaidutšik jt., 2016; Sedman jt., 2017).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

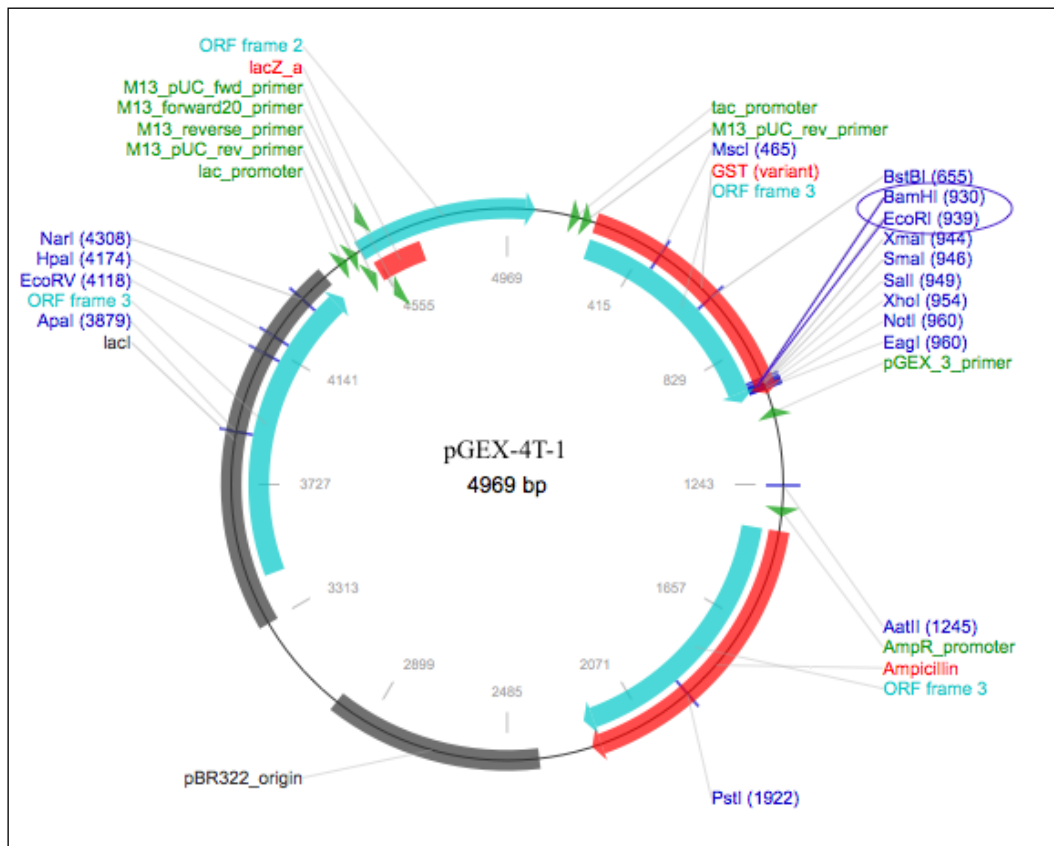
Käesoleva bakalaureuse töö eesmärgiks oli ekspresseerida ja puhastada funktsionaalset *H. polymorpha* mitokondriaalset Irc3 valku, analüüsida selle valgu ATPaasset aktiivsust erinevatel temperatuuridel ning võrrelda saadud tulemusi *S. cerevisiae* mitokondriaalse Irc3 valgu ATPaasse aktiivsusega samadel tingimustel.

2.2. Materjalid ja meetodika

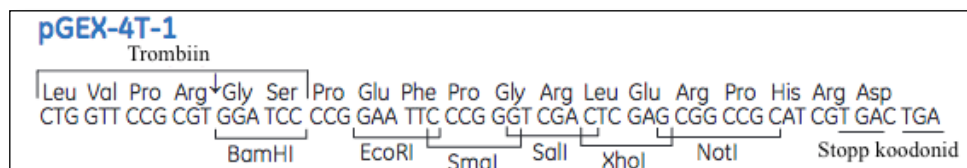
2.2.1. Töös kasutatud genoomne DNA järjestus, plasmid ja bakteritüved

H. polymorpha DL-1 tüve genoomse DNA oli eelnevalt eraldanud ja puhastanud tudeng Paula Salme Sandrak.

H. polymorpha Irc3 valgu ekspresseerimiseks sisestasin vastava IRC3 geeni, mille järjestus on 1900 aluspaari pikkune (vaata lisa 1), pGEX-4T-1 plasmidi (GE Healthcare) vahetult peale glutatioon-S-transferaasi (GST) geeni järjestust (vaata joonis 3). See võimaldab ekspresseerida GST-Irc3 liitvalku. GST märgise eemaldamiseks Irc3 valgu küljest, on vajalik trombiini äratundmiskoht, mis asub pGEX-4T-1 plasmidis GST järjestuse järel ning mis sisaldab BamHI lõikekohta ja millele järgneb EcoRI lõikekoht (vaata joonis 4).



Joonis 3. pGEX-4T-1 plasmidi kaart. Helesinised plokid tähistavad avatud lugemisraame (ORF), punased plokid näitavad selekteerimiseks kasutatavaid gene (*lacZ a*, *GST*, ampitsilliin), hallid plokid tähistavad plasmidi BR322 replikatsiooni alguspunkti (*pBR322 origin*) ja laktoosi geeni repressorit (*lacI*), rohelised nooled tähistavad primereid ja promotereid (*tac* promooter, M13 pUC pöördpraimer, pGEX-3 praimer, AmpR promooter, *lac* promooter, M13 pUC päripidine praimer, M13 pöördpraimer, M13 päripidine praimer), tumesinised kriipsud tähistavad ensüümide lõikekohti (*MscI*, *BstBI*, *BamHI*, *EcoRI*, *XmaI*, *SmaI*, *Sall*, *XhoI*, *NotI*, *EagI*, *AatII*, *PstI*, *ApaI*, *EcoRV*, *HpaI*, *NarI*). Autori poolt modifitseeritud joonis pärineb GE Healthcare-lt. Antud töös kasutatud ensüümide lõikekohad (*BamHI* ja *EcoRI*) on tumesinise ringiga välja toodud. Andmete analüüsiks kasutasin Addgene: Analyze Sequence: pGEX-4T1 veebilehekülge.



Joonis 4. pGEX-4T-1 plasmiidil oleva trombiini nukleotiidne ja aminohappeline järjestus ning trombiini lõikekoht. Trombiini äratundmiskoht asub plasmiidis *GST* järjestuse järel ning sisaldab *BamHI* lõikekohta ning sellele järgneb *EcoRI* lõikekoht. Autori poolt modifitseeritud joonis pärineb GE Healthcare-lt.

Töös vajalike IRC3 geenikonstruktide valmistamiseks kasutasin kompetentset *E. coli* DH5 α tüve rakke [*E. coli* F⁻ Φ 80*dlacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (r κ^- , m κ^+) *phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1*] (edaspidi DH5 α) (Grant jt, 1990). DH5 α kompetentsed rakud olid valmistatud TÜ molekulaar- ja rakubioloogia instituudi vanemlaborandi Maie Looritsa poolt.

Rekombinantse valgu ekspressiooniks kasutasin kompetentset *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL tüve rakke [*E. coli* B F⁻ *ompT hsdS* (r β^- m β^-) *dcm⁺ Tet^r gal endA Hte* (*argU proL Cam^r*)] (edaspidi BL21-RIL). BL21-RIL kompetentsed rakud olid valmistatud doktorandi Ilja Gaidutšiku poolt. BL21-RIL tüve bakterirakud kannavad endas lisa tRNA geene: *argU* (AGA, AGG), *ileY* (AUA), *leuW* (CUA), mis on Cam^r (klooramfenikool) antibiootikumi resistentsusgeeniga selekteeritavad.

2.2.2. Praimerid ja restriктаasid

H. polymorpha IRC3 geeni amplifitseerisin PCR-i abil *H. polymorpha* DNA-lt *Phusion High-Fidelity* (BioLabs) polümeraasiga, kasutades selleks primereid (vaata tabel 3) HPIRC35-BclI (5'-suunaline) ja HPIRC33-EcoRI (3'-suunaline). Praimerid on tellitud Tag Copenhagen A/S firmalt ja need olid disainitud nii, et amplifikatsiooni käigus tekiks IRC3 geeni algusesse BclI lõikekoha ja geeni lõppu EcoRI lõikekoha. Lõikasin pGEX-4T-1 plasmidi restriктаasidega BamHI ja EcoRI (vaata tabel 4) ja IRC3 sisaldavat DNA fragmenti lõikasin restriктаasidega BclI ja EcoRI (vaata tabel 5) ning ligeerisin need kokku, kasutades T4 DNA ligaasi (vaata joonis 5). Restriктаasid ja ligaas olid firmalt Thermo Scientific.

Tabel 3. *H. polymorpha* DNA amplifitseerimiseks kasutatud praimerid.

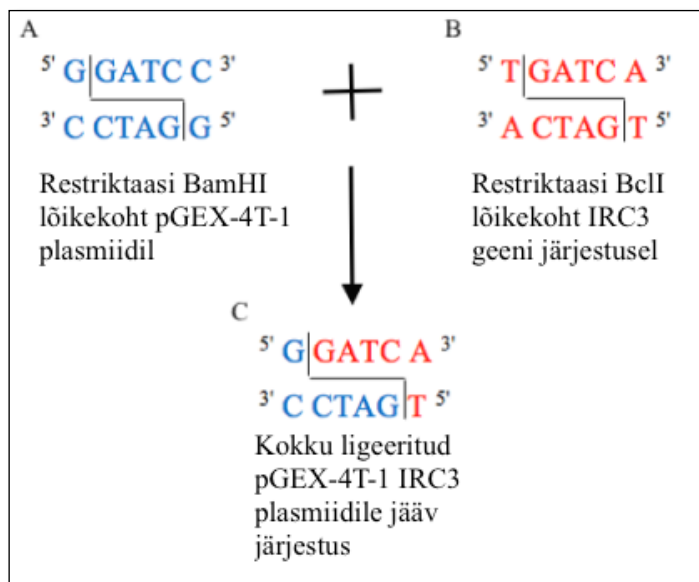
Nimi	Järjestus (5' → 3')	Positsioon IRC3 geenil
HPIRC35-BclI	ATC TGA TCA TCT ACC CTT TCC CTT CGC CCT	58 – 78
HPIRC33-EcoRI	ATC GAA TTC TCA TCT CGA GAC TAC GTA TTT TTG	1849 – 1872

Tabel 4. pGEX-4T-1 plasmidi lõikamiseks kasutatud restriктаasid.

Nimi	Järjestus (5' → 3')	Positsioon plasmiidil pGEX-4T-1
BamHI	G↓GATCC	930 – 935
EcoRI	G↓AATTC	939 – 944

Tabel 5. IRC3 geeni fragmendi lõikamiseks kasutatud restriктаasid.

Nimi	Järjestus (5' → 3')
BclI	T↓GA TCA
EcoRI	G↓AA TTC



Joonis 5. Plasmidi pGEX-4T-1 ja IRC3 geeni fragmendi lõikekohtade skeem. **A.** Restriктаasi BamHI lõikekoht pGEX-4T-1 plasmiidil. **B.** Restriктаasi BclI lõikekoht IRC3 geenil. **C.** Kokku ligeeritud pGEX-4T-1 IRC3 plasmiidil tekkinud järjestus, mille tulemusena on GST märgistus kokku liidetud IRC3 geeniga.

DH5 α rakkudest välja puhastatud pGEX-4T-1 IRC3 plasmidi kontrollisin, lõigates seda restriктаasidega EcoRI ja Bsp119I (vaata tabel 6).

Tabel 6. Plasmidi õigsuse kontrolliks kasutatud restriктаasid.

Nimi	Järjestus (5' → 3')	Lõike positsioonid plasmiidil pGEX-4T-1 IRC3
EcoRI	G↓AA TTC	2751
Bsp119I	TT↓C GAA	2131; 2227; 2688

2.2.3. Söötmed

DH5 α ja BL21-RIL bakterirakkude kasvatamiseks kasutasin LB vedel- ja tardsöödet. Plasmidi transformeerimisel bakterirakkudesse lisasin LB vedelsöötlele soola MgSO₄ (20 mM), kuna on leitud, et gram-negatiivsete bakterite puhul vähendab see valk-lipopolüsahhariidide vaheliste sidemete tekkimist, suurendades ionsete sidemete suhet kovalentsete sidemete üle, mis omakorda suurendab membraani voolavust, soodustades transformatsiooni (Srivastava, 2013).

Irc3 valgu ekspressiooniks kasvasin BL21-RIL rakke M9 minimaalsöötmes, millesse lisasin ka antibiootikume ampitsilliin (Amp) 100 μ g/ml ja klooramfenikooli (Cam) 25 μ g/ml. Kõik nimetatud söötmed on kirjeldatud tabelis 7.

Tabel 7. Bakterirakkude kasvatamiseks kasutatud söötmete kirjeldused.

Kasutatud sööde	Koostis	Allikas
Luria-Bertani (LB) vedelsööde	1% trüptoon; 0,5% pärmiekstrakt; 0,5% NaCl; 20 mM MgSO ₄	Bertani, 1951
LB tardsööde	1% trüptoon; 0,5% pärmiekstrakt; 0,5% NaCl; 1,7% agar	Bertani, 1951
M9 minimaalsööde kasaminohapetega	1,28% Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O; 0,3% KH ₂ PO ₄ ; 0,05% NaCl; 0,1% NH ₄ Cl; 0,4% glükoos; 0,1 mM CaCl ₂ ; 1 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 0,01% tiamiin; 0,5% kasaminohapped	Elbing ja Brent, 2002

BL21-RIL rakud sisaldavad plasmiididel lisa koopiaid argU, ileY ja leuW tRNA geenidest ja neid saab selekteerida klooramfenikooli lisamisega söötmesse. Ampitsilliin on söötmes vajalik pGEX-4T-1 IRC3 plasmidi selekteerimiseks.

2.2.4. Puhvrid ja lahused

Käesolevas töös kasutatud puhvrid, lahused, nende koostised ja milleks neid kasutati on välja toodud tabelis 8.

Tabel 8. Puhvrid, lahused ja nende koostised.

Nimetus	Koostis	Milleks kasutati
T ₁₀ E _{0,1}	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 0,1 mM EDTA (pH 8,0)	DNA puhastamine
Tango puhver (Thermo Scientific)	33 mM Tris-atsetaat (pH 7,9); 10 mM magneesiumatsetaat; 66 mM kaaliumatsetaat; 0,1 mg/ml veise seerumalbumiin (BSA)	DNA ja plasmiidi restriksioon
T ₄ ligaasi puhver (Thermo Scientific)	50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM DTT; 1 mM ATP (pH 7,5)	IRC3 geeni ligeerimine pGEX-4T-1 plasmiidi
Leelise lüüsi lahus I	50 mM glükoos; 25 mM Tris-Cl (pH 8,0); 10 mM EDTA (pH 8,0)	Plasmiidse DNA eraldamine
Leelise lüüsi lahus II	0,2 N NaOH; 1% SDS	Plasmiidse DNA eraldamine
Leelise lüüsi lahus III	5 M kaaliumatsetaat (KOAc); äädikhape (tulemusena on lahus kaaliumi suhtes 3 M ja atsetaadi suhtes 5 M)	Plasmiidse DNA eraldamine
T ₁₀ E ₁	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)	Plasmiidi puhastamine
Natriumkloriid- Tris-EDTA (STE) puhver	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA (pH 8,0)	Irc3 valgu puhastamine
Lüüsipuhver	50 mM Tris-2-D-morfolinoenatosulfoon hape (MES) (pH 7,5); 300 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM fenüülmetüülsulfonüülfluoriid (PMSF); 1 mM DTT (DTT lisada vahetult enne kasutamist)	Rakkude lüüsimine
Elueerimispuhver (EB)	50 mM Tris-MES (pH 7,5); 300 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 10% glütserool; 1 mM DTT (DTT lisada vahetult enne kasutamist)	Irc3 valgu puhastamine
Tris-atsetaat-EDTA (TAE) puhver	40 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA	Agaroos-TAE geelelektroforees
S-sepharose-i kolonni puhver (S)	[50 mM Tris-MES (pH 7,5); NaCl (kontsentratsioon varieerub); 1 mM EDTA; 10% glütserool; 1 mM DTT]	Irc3 valgu puhastamine

2.2.5. PCR amplifikatsiooni meetod, kasutades *Phusion High-Fidelity* DNA polümeraasi

Phusion High-Fidelity (BioLabs) DNA polümeraasil on väga madal veamäär, mis on umbes 50 korda madalam, kui Taq polümeraasil ja umbes kuuekordne vahe Pfu DNA polümeraasiga.

H. polymorpha IRC3 geeni fragmentide amplifitseerimiseks kasutasin PCR-i meetodit. PCR-i 50 µl reaktsioonisegu sisaldas: 1x *Phusion*® GC puhver (Biolabs), MgCl₂ lõppkontsentratsiooniga 1,5 mM, 0,2 mM desoksünukleosiidtrifosfaadi (dNTP) segu, 0,5 µM praimerid HPIRC35-BclI ja HPIRC33-EcoRI, 3% dimetüülsulfoksiid (DMSO), H₂O, 0,02 U/µl *Phusion* DNA polümeraas. Matriitsina kasutasin 10 ng *H. polymorpha* genoomset DNA-d. PCR-i teostas Mastercycler Personal masinaga. Reaktsioonisegu segasin kokku jääs (0 °C juures). Jäält tõstsin reaktsioonisegu PCR masinasse, mis oli saavutanud 98 °C. PCR programm sai loodud Biolabs-i protokollide juhiste alusel ning oli järgnevalt:

- 1) Esialgne denaturatsioon: 98 °C, 1 minut;
- 2) Renaturatsioon: 98 °C, 10 sekundit;
- 3) Praimerite seondumine: 60 °C, 10 sekundit;
- 4) DNA süntees: 72 °C, 1 minut;
- 5) Mine tagasi sammu juurde 2, 34 korda;
- 6) Lõplik DNA süntees: 72 °C, 5 minutit;
- 7) Hoia temperatuuri 10 °C.

PCR produkti olemasolu kontrollisin 0,8%-lises agaros-TAE geelis [0,8% agaros; 40 mM Tris-tsetaat; 2 mM EDTA (pH 8,5); etiidiumbromiidi (EtBr) 1 µg/ml].

2.2.6. Geelelektroforees ja PCR produkti puhastamine

PCR produkti kontrollisin kasutades 0,8% agaros-TAE geeli. EtBr-i (300 ng/ml) lisasin DNA hilisemaks tuvastamiseks ultraviolet (UV) valguses. Enne geelile kandmist, lisasin DNA-le 6x TAE värvi [10 mM Tris-HCl (pH 7,6); 0,3% bromofenool *blue*; 60% glütserool; 60 mM EDTA] ja DNA suurusmarkerina kasutasin Mix5-te (valmistatud TÜ üldise ja mikroobibiokeemia laboris) [fragmentide suurus: 10 tuhat aluspaari (kb); 4,9 kb; 3,5 kb; 2,2 kb; 1,8 kb; 1,5 kb; 1,1 kb; 0,8 kb; 0,5 kb; 0,3 kb].

Pärast PCR reaktsiooni lõppemist, puhastasin sellest välja edasisteks katseteks vajaliku DNA, lisades kõigepealt 20 µl-le PCR produktile 1 µl EDTA-d (lõppkontsentratsioon 5–10 mM), mis seob endaga lahuses olevad vabad Mg²⁺ ioonid. Tõstsin mahtu H₂O lisamisega 200 µl-ni. Seejärel lisasin 20 µg dekstraani, mis aitab DNA sademel nähtavaks muutuda, ja 100 µl

fenool/kloroformi (pH 8), mis sadestab valgud ja lipiidid. Segasin lahust keeristil, lasin seista toatemperatuuril 5–10 minutit. Tsentrifugisin Eppendorf Centrifuge 5415 C masinaga (kõik edasised tsentrifugimised tegin sama masinaga juhul, kui ei ole teisiti märgitud) ühe minuti 13400 p/min. Seejärel kogusin lahuse ülemise faasi uude tuubikusse tõmbekapi all ja lisasin naatriumatsetaati (NaOAc, pH 7,0) lõppkontsentratsiooniga 0,3 M. NaOAc lisamisega tekib DNA ja soola kompleks. DNA sadestamiseks lisasin 3 mahtu 96%-list etanooli (EtOH), et keskkonnast vesi ära siduda ning segasin lahust keeristil, misjärel hoidsin segu 20 minutit -20 °C juures. Tsentrifugisin 5 minutit, 13400 p/min ning eemaldasın supernatandi ja lisasin tuubi põhjas olevale sademele 80%-list etanooli 200 µl. Seejärel loksutasın tuubikut kergelt, käes edasi-tagasi liigutades ning lasın lahusel seista toatemperatuuril 10 minutit. Järgnevalt tsentrifugisin lahust 5 minutit, 13400 p/min ja eemaldasın supernatandi. Resuspendeerisin sademe 20 µl-s T₁₀E_{0,1} lahuses.

2.2.7. DNA ja plasmidi restriksioon

Töös kasutasın firma Thermo Scientific restriктаase ja puhvreid. Restriksiooniks võtsın DNA-d (eelnevalt puhastatud PCR produkt), mis oli lahustatud 20 µl-s T₁₀E_{0,1} lahuses, lisasin sellele 5 µl 2x Tango puhvrit, 5 ühikut (U) BclI restriктаasi ja segasin kergelt keeristil. Restriksioon toimus 55 °C juures 1 tund. Pärast ühe tunni möödumist jahutasın reaktsioonituubi ning lisasin 5 U EcoRI-te ja panın reaktsioonisegu 37 °C juurde restriктеerima üheks tunniks. Seejärel valmistasin ette plasmidi pGEX-4T-1. Selleks võtsın 5 µl 2x Tango puhvrit, lisasin 2 µl puhastatud plasmidi (kontsentratsiooniga 0,5 µg/µl) ja viisin ruumala 25 µl-ni, lisades T₁₀E_{0,1} lahust, segasin keeristil. Mõlemat restriктаasi, BamHI ja EcoRI, lisasin 5 U ja inkubeerisin lahust 37 °C juures 2 tundi. Reaktsiooni peatasın EDTA (lõppkontsentratsioon 40 mM) lisamisega.

2.2.8. Lõigatud DNA fragmendi ja plasmidi selekteerimine 0,8% agarosgeel elektrofooresiga

Restrikteeritud DNA ja plasmidi fragmente ja markerit Mix5 voolutasın 0,8%-lises agarosgeelis. Lõikasin DNA fragmendi ja plasmidi geelist välja UV-valguse all. Kaalusın esmalt tühjad tuubikud ära, seejärel panın välja lõigatud geelitükid tuubikute sisse ning kaalusın tuubikuid uuesti, et saada geelitüki kaal ja arvutada selle järgi ruumala (0,1 g = 0,3 ml). DNA eraldamiseks geelist kasutasın MO BIO Laboratories firma *Ultra Clean Kit*-i ning nende poolt välja töötatud vastavat puhastusprotokollı.

2.2.9. IRC3 geeni sisestamine pGEX-4T-1 plasmidi

Ligeerimise reaktsioonisegu koosnes järgnevatest komponentidest: 250 ng plasmid pGEX-4T-1 või 125 ng IRC3 DNA (50 ng/ μ l) ; T₄ ligaasi puhver; BSA 1 mg/ml; H₂O kuni mahuni 10 μ l; 0,3 Weiss U T₄ ligaas (Thermo Scientific). Lasin reaktsioonil toimuda 1 tund ja 15 minutit toatemperatuuril.

2.2.10. pGEX-4T-1 IRC3 plasmidi transformatsioon ja amplifikatsioon *E. coli* DH5 α rakkudes

Transformeerimiseks lisasin 20 μ l-le kompetentsetele *E. coli* DH5 α rakkudele 1 μ l eelnevalt ligeeritud pGEX-4T-1 IRC3 plasmidi segu ning hoidsin seda 30 minutit jääl. Pärast seda sooritasin rakkudele kuumašoki, hoides neid 2 minutit 37 °C juures. Pipeteerisin 400 μ l LB vedelsöödet, millele olin eelnevalt lisanud MgSO₄ (lõppkontsentratsioon 20 mM), rakulahusesse. Hoidsin rakke 30 minutit 37 °C juures, misjärel külvasin rakud (50 μ l vedelsöötmet) LB Amp (100 μ g/ μ l) tardsöötmega Petri tassile ja inkubeerisin 37 °C juures üleöö.

Inokuleerisin LB Amp tardsöötmetelt 3 kolooniat 2,5 ml-sse LB Amp (100 μ g/ μ l) vedelsöötmesse ning jätsin rakud 37 °C juurde loksutile kasvama üleöö.

2.2.11. pGEX-4T-1 IRC3 plasmidi eraldamine *E. coli* DH5 α rakkudest ja puhastamine fenooltöötluusega

Plasmidse DNA eraldamiseks *E. coli* rakkudest kasutasin leelise lüüsi meetodit (Sambrook jt., 1989). Selleks valasin üleöö loksutil olnud bakterikultuurid tuubikutesse ja tsentrifugeerisin 5 minutit 4000 p/min. Eemaldasın supernatandi veejoapumbaga ja tõstsin tuubikud jääle. Lisasin 200 μ l leelise lüüsi lahust I [50 mM glükoos; 25 mM Tris-Cl (pH 8,0); 10 mM EDTA (pH 8,0)] ja segasin tugevasti keeristil, kuni sadet polnud enam näha. Lisasin leelise lüüsi lahust II (0,2 N NaOH; 1% SDS) 400 μ l ja segasin lahust õrnalt, tuubikut käes edasi-tagasi liigutades. Asetasin tuubikud jääle. Inkubeerisin 5 minutit.

Lõpuks lisasin 300 μ l leelise lüüsi lahust III [5 M kaaliumatsetaat (KOAc); äädikhape (lisasin vastava koguse, mille puhul oli lahus kaaliumi suhtes 3 M ja atsetaadi suhtes 5 M)] ja segasin lahust, tuubikut käes raputades. Hoidsin 10–15 minutit jääl. Seejärel tsentrifugeerisin 5 minutit 13400 p/min. Tõstsin 800 μ l lahust uude tuubikusse ja lisasin 480 μ l isopropanooli, segasin keeristil. Tsentrifugeerisin 5 minutit 13400 p/min ja eemaldasın supernatandi veejoapumbaga. Lisasin 400 μ l 80%-list EtOH-d ja segasin paar korda käes, tuubikut üles-alla liigutades. Tsentrifugeerisin 5 minutit 13400 p/min ja eemaldasın supernatandi pipeteerides. Lisasin 100 μ l

T₁₀E₁ lahust ja RNAasi 20 µg/ml. Inkubeerisin 65 °C juures 30 minutit. Võtsin lahusest välja 4 µl proovi, millele lisasin 4 µl 2x TAE puhvrit ning kontrollisin esialgset plasmidi olemasolu 0,8%-lises agaros-TAE geelis.

Ülejäänud lahuse tõstsin pärast inkubeerimisperioodi jääle ning lisasin sellele 100 µl T₁₀E₁ lahust. Fenooltötluse sooritasin tõmbekapi all, lisades 50 µl fenool/kloroformi (pH 8,0). Segasin aeg-ajalt keeristil 5 minuti kestel. Tsentrifuugisin segu 1 minuti 13400 p/min. Pipeteerisin tõmbekapi all lahuse ülemisest vedelfaasist 200 µl uude tuubikusse. Lisasin sellele 20 µl NaOAc (3 M, pH 7,0) ja 130 µl isopropanooli, segasin ning hoidsin toatemperatuuril 10 minutit. Tsentrifuugisin 5 minutit 13400 p/min. Eemaldasın supernatandi, lisasin sademele 200 µl 80%-list etanooli, hoidsin 5 minutit. Tsentrifuugisin 5 minutit 13400 p/min, eemaldasın supernatandi ja lisasin 50 µl T₁₀E_{0,1} lahust. Säilitasin -20 °C juures. Välja puhastatud plasmidi õigsuse kontrolliks, lõikasin seda restriктаasidega EcoRI ja Bsp119I. Reaktsiooni läbiviimiseks võtsin 4 µl 10x Tango puhvrit, lisasin sellele 11 µl H₂O-d, 5 µl puhastatud plasmidi DNA-d ja 3 ühikut (U) mõlemat restriктаasi (EcoRI ja Bsp119I). Reaktsioon mahus 20 µl toimus 37 °C juures 1 tund. Restriksiooni fragmente jooksutasin 0,8%-lises agaros-TAE geelis.

2.2.12. pGEX-4T-1 IRC3 plasmidi transformatsioon *E. coli* BL21-RIL rakkudesse

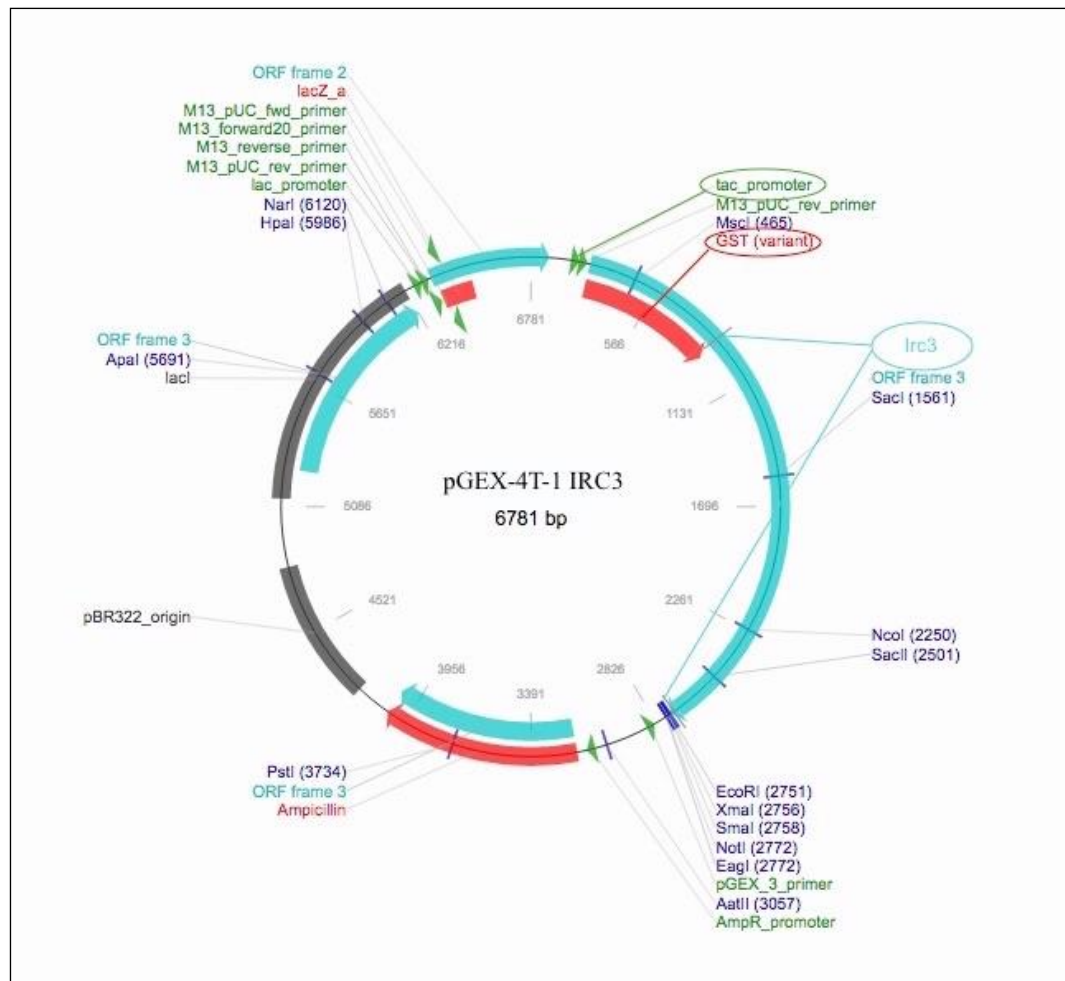
Transformatsiooniks võtsin 20 µl *E. coli* BL21-RIL rakke ja lisasin neile 1 µl eelnevalt puhastatud pGEX-4T-1 IRC3 plasmidi. Hoidsin rakke 30 minutit jääl, mille möödudes sooritasin kuumašoki, hoides rakke 2 minutit 37 °C juures. Pärast seda panin rakud uuesti jääle, lisasin neile 400 µl LB vedelsöödet, kuhu olin vahetult enne lisanud 50 µl MgSO₄ (lõppkontsentratsioon 20 mM). Hoidsin rakke 30 minutit 37 °C juures. Külvasin 50 µl rakke LB Amp (100 µg/µl), Cam (25 µg/µl) tardsöötmege Petri tassile. Rakke kasvasin üleöö 37 °C juures.

2.2.13. pGEX-4T-1 IRC3 plasmidi ekspresioonisüsteem *E. coli* rakkudes

H. polymorpha Irc3 valgu rekombinantseks ekspresiooniks *E. coli* BL21-RIL rakkudes kasutasin glutatioon-S-transferaasil (GST) põhinevat GST *Gene Fusion* süsteemi (GE Healthcare) protokollist aastast 2010. GST *Gene Fusion* on mitmekülgne süsteem *E. coli* poolt toodetud *fusion* valkude ekspresiooniks, puhastamiseks ja detekteerimiseks.

Plasmid pGEX-4T-1 sisaldab glutatioon-S-transferaasi (GST) geeni, mille järele liidetakse uuritava valgu järjestus (vaata joonis 6), antud töös IRC3 geen, mis võimaldab plasmiidilt sünteesida Irc3 ja GST liitvalku. GST-Irc3 liitvalk on tac promooteri (trp ja lac promooterite hübriid) kontrolli all. Tac promooteri operaatorile seonduv LACI geeni valguline produkt

represeerib ekspressiooni, seetõttu on vaja GST-Irc3 liitvalgu ekspressiooni indutseerida. Indutseerimiseks kasutasin isopropüül-2-tio- β -D-galaktopüranosiidi (IPTG).



Joonis 6. Plasmidi pGEX-4T-1 ja IRC3 geeni järjestused kokku ligeeritud kujul rõngasmolekulina. Rohelise ringiga on välja toodud tac promooteri geen, punase ringiga on märgitud GST, helesinise ringiga on välja toodud IRC3 asukoht. Helesiniste joontega on viidatud IRC3 geeni algusele ja lõpule geneetilisel kaardil. Geneetilise kaardi loomiseks plasmidi järjestuse järgi kasutasin Addgene veebilehe *Analyze Sequence* funktsiooni. Joonis on autori poolt modifitseeritud.

2.2.14. *E. coli* BL21-RIL rakkude kasvatamine ja GST-Irc3 liitvalgu ekspressiooni induktioon

Plasmiidiga pGEX-4T-1 IRC3 transformeeritud *E. coli* BL21-RIL kolooniat inokuleerisin 2 ml-s LB Amp (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), Cam (25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) vedelsöötmes ja jätsin üleöö 20 °C juurde loksutile kasvama tiheduseni $\text{OD}_{600} = 0,7$.

Väikeses mahus kasvatamisel, lahjendasin rakukultuurid 50 ml-s M9 Amp (100 µg/µl) minimaalsöötmes niivõrd, et rakukultuuri tihedus oleks lõpuks $OD_{600} = 0,05$. Kasvatasin rakke 30 °C juures loksutis tiheduseni $OD_{600} = 0,7$. Irc3 valgu ekspressiooniks oli vaja lisada IPTG-d, kuid enne IPTG-ga indutseerimist võtsin rakukultuurist välja 100 µl rakke (hilisemaks indutseeritud kultuuriga võrdluseks geelis). Seejärel indutseerisin kultuuri IPTG-ga (lõppkontsentratsioon 0,1 mM). Induktsioon kestis 6 tundi temperatuuril 30 °C. Peale induktsiooni toimumist võtsin uuesti 100 µl rakke, tsentrifuugisin 1 minuti 13400 p/min, eemaldasid vedeliku ja panin rakusademe jääle. Samamoodi tegin ka induktsiooni eelselt rakukultuurist välja võetud 100 µl rakkudega. Lisasin välja võetud rakkudele 25 µl H₂O-d ja 25 µl 2x SDS proovipuhvrit [100 mM Tris-HCl (pH 6,8); 20% glütserool; 4% SDS; 0,2% broomfenoolsinine; 200 mM DTT] ning segasin keeristil. Seejärel keetsin 5 minutit 95 °C juures. Valgu ekspressiooni kontrolliks kandsin 10%-lisele SDS-PAAG geelile 10 µl rakulüsaati ning 4,5 µl markerit. Kasutasin *Unstained Protein Mw #SMO431* markerit (Thermo Scientific), mille fragmentide suurused olid järgnevad: 116 kDa; 66,2 kDa; 45 kDa; 35 kDa; 25 kDa; 18 kDa ja 14,4 kDa.

Suuremas mahus kasvatamisel lahjendasin üleöö LB Amp (100 µg/µl), Cam (25 µg/µl) vedelsöötmes kasvanud rakud (algne tihedus $OD_{600} = 0,7$) 250 ml-s M9 Amp (100 µg/µl) minimaalsöötmes tiheduseni $OD_{600} = 0,05$. Kasvatasin rakke 30 °C juures loksutis kuni rakukultuuri tiheduseni $OD_{600} = 0,75$, misjärel indutseerisin rakukultuuri IPTG-ga (lõppkontsentratsioon 0,1 mM).

2.2.15. 10% SDS-poliakrüülamiid geelelektroforees valgu ekspressiooni kontrolliks

Irc3 valgu ekspressiooni kontrollisin 10%-lises SDS-poliakrüülamiid geelis (SDS-PAAG), mille valmistamiseks vajalikud puhvrid, lahused ja nende koostised on välja toodud tabelis 9.

Tabel 9. SDS-PAAG geelelektroforeesi puhvrid, lahused ja nende koostised

Nimetus	Koostis
2x SDS proovipuhver	100 mM Tris-HCl (pH 6,8); 20% glütserool; 4% SDS; 0,2% broomfenoolsinine; 200 mM DTT
Tris-glütsiin elektroforeesi puhver	960 mM glütsiin; 125 mM Tris; 0,5% SDS
Geeli värvimislahus	2,5 mg/ml Coomassie brilliant blue R-250; 7% äädikhape; 25% etanool
Värvi eemaldamislahus	7% äädikhape; 25% etanool

Valmistasin 10%-lise SDS-PAAG geeli vastavalt Sambrooki ja Russelli protokollile (Sambrook ja Russell, 2006). Asetasin valmistatud geelikasseti Bio-Rad-i valgugeeli foreesiaparaati. Foreesiaparaadi elektroodi ruumi täitsin Tris-glütsiin elektroforeesi puhvriga (960 mM glütsiin; 125 mM Tris; 0,5% SDS). Kandsin geeli kambrisse 10 µl eelnevalt denatureeritud proovi ja 4,5 µl valgumarkerit *Unstained Protein Mw #SMO431*. Voolutasin proove geelis pingega 100 – 130 volti umbes 2,5 tundi. Geelelektroforeesi lõppedes värvisin geeli värvimislahusega (0,25% Coomassie R 250; 7,5% äädikhape; 50% etanool) ning hiljem eemaldasın värvi geelilt, kasutades selleks värvi eemaldamislahust (7% äädikhape; 5% etanool). Kui üleliigne värv oli geelist eemaldatud, sai näha valkude liikumiskaugust geelis.

2.2.16. Rekombinantse Irc3 valgu puhastamine 50 ml-st ja 250 ml-st *E. coli* BL21-RIL rakkudest

Indutseerimise lõppedes jahutasin rakke jääl, misjärel tsentrifugisin rakke 10 minutit 4000 p/min 4 °C juures masinaga Hettich ® Universal 32R (1617 rootor). Pärast supernatandi eemaldamist, pesin 50 ml-ses mahus kasvatatud rakke 10 ml naatriumkloriid-Tris-EDTA (STE) puhvriga [10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA (pH 8,0)], tsentrifugisin uuesti 10 minutit 4000 p/min 4 °C juures ja eemaldasın supernatandi. 250 ml-ses mahus kasvatatud rakke pesin 20 ml STE puhvriga. Külmutasin rakud vedelas lämmastikus ning säilitasin -80 °C juures. Edasiseks lüüsimiseks sulatasın rakud üles, hoides neid 30 minutit jääl.

2.2.16.1. GST-Irc3 lüütsõõmiga puhastamine ekspressiooni kontrolliks 50 ml-st *E. coli* BL21-RIL rakkudest

50 ml-s M9 söötmes kasvatatud *E. coli* BL21-RIL GST-Irc3 rakkudele lisasin 0,8 ml jääkülma lüüsi puhvrit [50 mM Tris-2-D-morfolinoenatosulfoon hape (MES) (pH 7,5); 300 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM fenüülmetüülsulfonüülfluoriid (PMSF); 1 mM DTT (DTT lisasin vahetult enne kasutamist)] koos lüütsõõmiga (AppliChem, lõppkontsentratsioon 2 mg/ml). Lüüsisin rakke jääl 30 minutit. Seejärel lisasin DTT (lõppkontsentratsioon 1 mM), MgCl₂ (lõppkontsentratsioon 25 mM), CaCl₂ (lõppkontsentratsioon 5 mM), 5 U DNaasi (Sigma) ja inkubeerisin rakke jääl veel 20 minutit. Edasi sonikeerisin rakulüüsaati 3 korda 10 sekundit Bandelin Sonopuls sonikaatoriga võimsusel 35 W. Sonikeerimiste vahepeal inkubeerisin rakke jääl 1 minuti. Sonikeeritud rakulüüsaati tsentrifugisin 20 minutit 14000 p/min 4 °C juures masinaga Hettich® Mikro R200 (2424 rootor). Pipeteerisin supernatandi uude tuubikusse ja

võtsin sealt 20 µl eraldi välja, lisasin sellele 20 µl 2x SDS proovipuhvrit ja kuumutasin 5 minutit 95 °C juures, et hiljem kontrolliks kasutada SDS-PAAG geelelektroforeesil. Ülejäänud supernatandile lisasin 50 µl 90%-list glutatioon-agarooos suspensiooni (Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow, GE Healthcare) ja panin *end-over-end* segajale (Bio RS-24, Biosan) kaheks tunniks 4 °C juurde.

Pärast seda, tsentrifuugisin lüsaati 1 minuti 900 p/min 4 °C juures. Eemaldas supernatandi ning resuspendeerisin sademe 500 µl-s elueerimispuhvris (EB) [50 mM Tris-MES (pH 7,5); 300 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 10% glütserool; 1 mM DTT (DTT lisasin vahetult enne kasutamist)], tsentrifuugisin 1 minuti 900 p/min 4 °C juures ning eemaldas supernatandi. Kordasin seda sammu (pesu) 3 korda. Pärast viimast korda supernatandi eemaldamist, lisasin 25 µl EB-d, millele olin eelnevalt lisanud 10 mM glutatiooni (Sigma-Aldrich), suspendeerisin ja tsentrifuugisin 1 minuti 900 p/min 4 °C juures. Seejärel tõstsin supernatandi uude tuubikusse. Kordasin seda sammu (elueerimist) 3 korda. Võtsin kõigest kolmest eluaadist (maht 25 µl) välja 10 µl, millele lisasin 10 µl 2x SDS proovipuhvrit, et hiljem analüüsida SDS-PAAG geelelektroforeesil. Ülejäänud valgulahuse külmutasin vedelas lämmastikus ning säilitasin -80 °C juures.

2.2.16.2. GST-Irc3 liitvalgu puhastamine 250 ml-st *E. coli* BL21-RIL rakkudest kasutades ammoonium sulfaadiga sadestamist

250 ml-s M9 söötmes kasvatatud *E. coli* BL21-RIL GST-Irc3 rakkudele lisasin 10 ml jääkülma lüüsipuhvrit koos lüüsisüümiga (lõppkontsentratsioon 2 mg/ml). Lüüsisin rakke jää 15 minutit. Seejärel lisasin DTT (lõppkontsentratsioon 1 mM), MgCl₂ (lõppkontsentratsioon 25 mM), CaCl₂ (lõppkontsentratsioon 5 mM), 5 U DNAasi (Sigma) ja inkubeerisin jää 15 minutit. Järgnev töö toimus kõik 4 °C juures. Sonikeerisin rakulüsaati 4 korda 30 sekundit võimsusel 35 W. Sonikeerimiste vahepeal inkubeerisin rakke jää 1 minut. Sonikeeritud rakulüsaati tsentrifuugisin 20 minutit 12000 p/min 4 °C juures masinaga Sorvall® RC-5 Refrigerated Superspeed Centrifuge (Sorvall® SS34 rootor). Täpse ruumala saamiseks pipeteerisin supernatanti 12 ml keeduklaasi, millesse lisasin terahaaval ammoonium sulfaati [(NH₄)₂SO₄] 2,112 g (lõppkontsentratsioon 176 g/l) ning panin lahuse magnetsegajale kuni ammoonium sulfaadi sademe täieliku lahustumiseni. Seejärel valasin lahuse tsentrifuugi topsidesse ja tsentrifuugisin 20 minutit 12000 p/min. Irc3 valk jäi supernatanti, millest pipeteerisin 11 ml uuesti keeduklaasi, lisasin teist korda terahaaval ammoonium sulfaati [(NH₄)₂SO₄] 2,178 g (lõppkontsentratsioon 198 g/l) ning panin lahuse magnetsegajale segama, kuni ammoonium sulfaadi sademe täieliku

lahustumiseni. Valasin lahuse tsentrifuugi topsidesse ja tsentrifuugisin 20 minutit 12000 p/min 4 °C juures, misjärel jäi Irc3 valk ammoonium sulfaadi sademesse. Valasin supernatandi pealt ära, resuspendeerisin sademe 15 ml-s lüüsipuhvris, kuhu olin lisanud DTT (lõppkontsentratsioon 1 mM) ning lisasin lahusele 500 µl 90%-list glutatioon-agaroos (Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow, GE Healthcare) suspensiooni.

Seejärel panin lüsaadi *end-over-end* segajale kaheks tunniks 4 °C juurde seonduma. Tsentrifuugisin lüsaati 1 minut 900 p/min 4 °C juures Hettich® Universal 32R (1617 rootor) masinaga, eemaldas supernatandi, mis sisaldas seondumata valku, resuspendeerisin sademe 10 ml-s elueerimispuhvris (EB) ning tsentrifuugisin uuesti 1 minut 900 p/min 4°C juures, misjärel eemaldas supernatandi. Lisasin sademele 500 µl EB-d ning kandsin maatriksi kolonnile. Pesin maatriksit veel 3 korda 500 µl EB-ga. Seejärel elueerisin valku elueerimispuhvriga, millele olin eelnevalt lisanud 10 mM glutatiooni (Sigma-Aldrich). Kolonnist välja tulnud fraktsioone korjasin järgmistes mahtudes: E1) 250 µl; E2) 500 µl; E3) 250 µl; E4) 250 µl; E5) 250 µl. Fraktsioonide ja puhastamise vaheetappide tulemusi analüüsisin SDS-PAAG geelelektroforeesiga.

2.2.17. Irc3-GST liitvalgu lõikamine trombiiniga

Kolonnist välja tulnud fraktsioonid, mis sisaldasid GST-Irc3 liitvalku, tõstsin kokku ühte tuubikusse. Kokku kogutud valgu fraktsioonidele lisasin 7,5 U inimese vereplasma trombiini (Calbiochem). Seda oli vaja teha selleks, et eemaldada GST märgis IRC3 valgu küljest. Reaktsiooni toimumiseks, inkubeerisin puhastatud valgufraktsioone jääl üleöö koos trombiiniga. Reaktsiooni peatasin, lisades 1 mM PMSF-i.

2.2.18. Katioonvahetus S-Sepharose kolonnil

Kogu järgnev protsess toimus 4 °C juures. Irc3 edasiseks puhastamiseks kasutasin 0,5 ml-st S-Sepharose (GE Healthcare) kolonni, mida pesin 5 ml MQ veega, 2 ml S-sepharose-i kolonni puhvriga S_{1M} (1 M NaCl suhtes) [50 mM Tris-MES (pH 7,5); 1 M NaCl; 1 mM EDTA; 10% glütserool; 1 mM DTT], uuesti 5 ml MQ veega ning seejärel 5 ml puhvriga S_{100mM} (100 mM NaCl suhtes). Kandsin kolonnile trombiiniga lõigatud Irc3 fraktsiooni, mis oli lahjendatud 100 mM NaCl kontsentratsioonini. Seejärel pesin kolonni 1 ml puhvriga S_{100mM} ning elueerisin järgnevate fraktsioonidena:

- 1) 4x 1 ml puhvriga S_{100mM} (100 mM NaCl suhtes);
- 2) 4x 0,5 ml puhvriga S_{200mM} (200 mM NaCl suhtes);
- 3) 5x 100 µl puhvriga S_{350mM} (350 mM NaCl suhtes);

4) 8x 250 µl puhvriga S_{450mM} (450 mM NaCl suhtes).

Pesin kolonni 500 µl puhvriga S_{600mM} (600 mM NaCl suhtes) ja 500 µl puhvriga S_{1M} (1 M NaCl suhtes). Fraktsioone analüüsisin hiljem 10%-lises SDS-PAAG geelis.

2.2.19. Valgu kontsentratsiooni mõõtmine NanoDrop spektrofotomeetriga

Fraktsioonide valgusisaldust mõõtsin spektrofotomeetriga NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific), lainepikkuse juures 280 nm. Seadme pjedestaalile pipeteerisin 2 µl puhastatud valgufraktsiooni. Mõõtsin neelduvust sama lahuse suhtes, milles oli Irc3 valk kolonnist välja tulnud (ilma Irc3 valguta S puhver). Mõõtmistulemusena saadud kontsentratsiooni abil hindasin valgu kogust fraktsioonides, teades Irc3 molekulmassi $mW = 59,447$ kDa ja Irc3 molaarset neeldumiskoefitsenti $\epsilon = 51270 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ExPASy ProtParam tool, 2017). Valgu kontsentratsiooni leidsin valemist $A_{280} = \epsilon \times C$ (ng/µl) tuleneva valemiga $C = A/\epsilon$.

250 ml-st rakkudest puhastatud Irc3 valgu kontsentratsioon oli keskmiselt $C = 66,7$ ng/µl. *S. cerevisiae* Irc3 valgukontsentratsioon oli eelnevalt määratud doktorandi Ilja Gaidutšiku poolt ning selleks oli $C = 281$ ng/µl.

2.2.20. Irc3 valgu ATPaasse aktiivsuse mõõtmine

ATPaasse aktiivsuse katse reaktsioonisegu sisaldas järgnevaid komponente: 0,1 mg/ml BSA; 0,1 mM dATP; 7 mM MgCl₂; 30 mM Tris (pH 7,5); 1 mM DTT; 50 ng Irc3 valk; 50 ng substraat DNA, milleks oli pärmi süstikvektor pRS303. Ühe reaktsiooni koguruumala oli 18 µl. Eelsoojendasin reaktsioonisegu 30 °C juures 2 minutit. Tegin katseid kolmel erineval korral ja kolmel erineval temperatuuril: 30 °C, 37 °C ja 42 °C. Reaktsiooni alustamiseks, lisasin 50000 CPM (*counts per minute*) [γ ³²P]-dATP-d (PerkinElmer). Peatasin reaktsiooni erinevatel ajahetkedel (0 minuti, 2 minuti, 5 minuti, 10 minuti ja 15 minuti möödudes) lisades 150 µl stopplahust, mis sisaldas järgnevaid komponente: aktiivsüsi Norit A 100 mesh (Aldrich Chemical Company); 2 mM KH₂PO₄; 0,036% (v/v) HCl. Pärast reaktsiooni peatamist, segasin proove 10 minutit Eppendorf Mixer 5432 masinaga, tsentrifuugisin neid 2 minutit 14000 p/min (Eppendorf 5415C Centrifuge), pipeteerisin 100 µl vedelat faasi uude tuubikusse ja lisasin uuesti 150 µl stopplahust. Segasin uuesti 10 minutit ning tsentrifuugisin uuesti 2 minutit 14000 p/min. Seejärel pipeteerisin 160 µl vedelat faasi uude tuubikusse, tsentrifuugisin 2 minutit 14000 p/min, misjärel pipeteerisin 150 µl vedelat faasi viaali, kuhu olin lisanud eelnevalt 5 ml Optiphase HiSafe 3 (PerkinElmer) stsintsillatsiooni vedelikku. Ühte viaalidest pipeteerisin 18 µl reaktsioonisegu,

millele ma ei olnud lisanud stopplahust, et mõõta totaalset kiirgust ($\gamma^{32}\text{ATP} + \gamma^{32}\text{P}$), mitte ainult reaktsiooni tulemusena vabaneva γ^{32} fosfaadi kiirgust.

Analüüsi teostas Liquid Scintillation Analyzer (PerkinElmer) masinaga. Saadud CPM (*counts per minute*) arvutasin ümber pmol ATP-d/1pmol valgu kohta.

Võrdluskatses kasutatud *S. cerevisiae* Irc3 valgu oli eelnevalt puhastanud doktorant Ilja Gaidutšik.

2.2.21. Irc3 valgu helikaasse aktiivsuse mõõtmine

Teostas helikaasse aktiivsuse katsed, et välja selgitada, kas Irc3 valk suudab lahti harutada DNA kahvleid, millel on kas 3' üleulatuv ots (juhtahela DNA kahvel) või 5' üleulatuv ots (mahajääva ahela DNA kahvel). Selleks tööks kasutatud helikaasi katse substraadid sain doktorandi Ilja Gaidutšiku käest.

Helikaasse aktiivsuse katse reaktsioonisegu (15 μl) sisaldas järgnevaid komponente: reaktsiooni puhver [20 mM Tris (pH 7,0); 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 1 mM ATP; 0,1 mg/ml BSA; 1 mM DTT; 10% glütserool]; 0,25 mM 3' üleulatava otsaga või 0,25 mM 5' üleulatava otsaga substraat; 30 ng Irc3 valk. Reaktsiooni käivitasin valgu lisamisega. *H. polymorpha* Irc3 valguga läbi viidud reaktsioon kulges 30 °C juures ja peatasin selle erinevatel ajahetkedel (5 minuti, 10 minuti ja 15 minuti möödudes), lisades TBE stop lahust 5 μl [0,5% SDS; 15 mM EDTA; 10% glütserool; 20 mM Tris (pH 8,0); 0,05% (w/v) broomfenoolsinine]. *S. cerevisiae* Irc3 valguga läbi viidud reaktsioon kulges 30 °C juures 10 minutit.

Tulemuste visualiseerimiseks kandsin proovid (15 μl) 10%-lisele TBE akrüülamiid/bis-akrüülamiid geelile ning voolutasin proove pingel 90 volti 4 °C juures 1,5 tundi. Kontrolliks kandsin geelile ka 15 μl reaktsioonisegu ilma Irc3 valguta ning substraati mida olin eelnevalt keetnud 3 minutit 95 °C juures. Need näitavad vastavalt struktuuriga DNA kahvlite ja lahtiharutunud DNA kahvlite paiknemist geelis. Võrdluseks kandsin geelile 15 μl reaktsioonisegu koos *S. cerevisiae* Irc3 valguga. Elektroforeesi lõppedes asetasin geeli Whatman paberile ja kuivatasin seda 30 minutit 80 °C juures. Tulemused visualiseerisin autoradiograafiliselt, kasutades selleks Fuji Medical X-Ray filmi.

2.3. Tulemused

2.3.1. pGEX-4T-1 IRC3 ekspressiooni plasmiiidi valmistamine

H. polymorpha on teadaolevalt termotolerantne pärmseene liik. *H. polymorpha* mitokondriaalse valgu Irc3-e võimaliku termostabiilsuse välja selgitamiseks pidin esmalt viima IRC3 geeni pGEX-4T-1 plasmiiidi. Selleks amplifitseerisin *H. polymorpha* IRC3 geeni PCR-i meetodiga, kasutades selleks *Phusion High-Fidelity* (BioLabs) DNA polümeraasi ning praimereid HPIRC35-BclII ja HPIRC33-EcoRI. PCR-i praimerid olid disainitud nii, et amplifikatsioon jätkaks IRC3 geeni algusest 19 aminohappelise järjestuse PCR produktist välja. See oli vajalik selleks, et eemaldada oletatav mitokondrisse transportimiseks vajalik signaaljärjestus, mis puudub mitokondris oleval funktsionaalsel valgul *in vivo* tingimustes. Soovitud DNA fragmendi olemasolu kontrollisin 0,8%-lises agaros-TAE geelis.

PCR-i produkti (50 µl) lõikasin restriktasidtega BclII ja EcoRI. Plasmiiidi pGEX-4T-1 lõikasin restriktasidtega BamHI ja EcoRI. IRC3 geeni ligeerisin kokku pGEX-4T-1 plasmiidiga, kasutades selleks T4 DNA ligaasi. Pärast ligeerimist asub IRC3 geeni järjestus plasmiidis vahetult pärast GST geeni järjestust, et oleks võimalik ekspresseerida GST-Irc3 liitvalku. GST märgistus Irc3 valgu küljes oli vajalik selleks, et liitvalk seonduks glutatioon-agarosiga, mis võimaldas hilisemat Irc3 valgu väljapuhastamist rakulüsaadist.

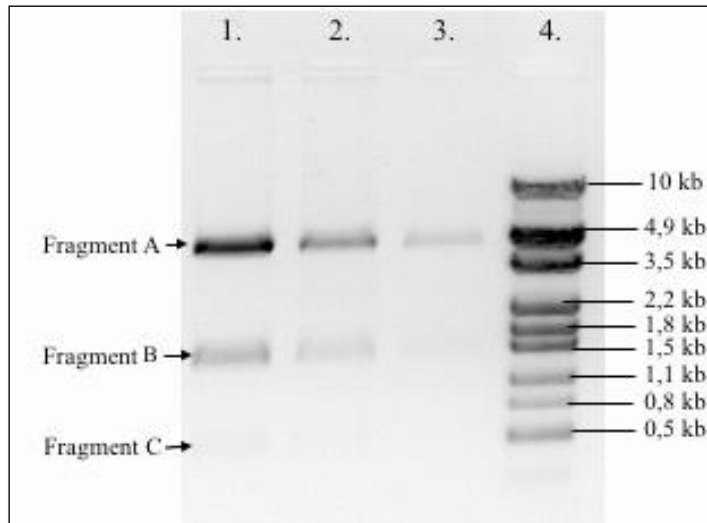
Saadud rekombinantset DNA-d amplifitseerisin *E. coli* DH5α rakkudes. Kasvatasin rakke LB söötmes 37 °C juures ja plasmiiidi sisaldavate rakkude selektsiooniks kasutasin antibiootikumi ampitsilliin, kuna pGEX-4T-1 IRC3 plasmiid sisaldas Amp resistentsusgeeni Amp^r.

Plasmiiidi pGEX-4T-1 IRC3 eraldamiseks *E. coli* DH5α rakkudest, kasutasin leelise lüüsi meetodit ning edasiseks plasmiiidi puhastamiseks kasutasin fenooltöötlust.

Puhastatud pGEX-4T-1 IRC3 plasmiiidi õigsuse kontrollimiseks, lõikasin seda restriktasidtega EcoRI ja Bsp119I ning jooksutasin saadud fragmente 0,8%-lises agaros-TAE geelis. Bsp119I restriktasil on 4 lõikekohta IRC3 geenis ning EcoRI-l on üks lõikekoht IRC3 geeni ja pGEX-4T-1 plasmiiidi ühenduskohas.

Plasmiiidi restriktatsiooni tulemusena sain järgnevad 5 fragmenti (vaata joonis 7):

- 1) Fragment A: EcoRI lõikekohast kuni Bsp119I lõikekohani, 4685 nt pikkune lõik;
- 2) Fragment B: Bsp119I lõikekohast kuni Bsp119I lõikekohani, 1428 nt pikkune lõik;
- 3) Fragment C: Bsp119I lõikekohast kuni Bsp119I lõikekohani, 461 nt pikkune lõik;
- 4) Fragment D: Bsp119I lõikekohast kuni EcoRI lõikekohani, 111 nt pikkune lõik;
- 5) Fragment E: Bsp119I lõikekohast kuni Bsp119I lõikekohani, 96 nt pikkune lõik.



Joonis 7. Plasmidi pGEX-4T-1 IRC3 lõikamisel restriктаasidega EcoRI ja Bsp119I saadud fragmendid. Radadel 1 – 3 on erinevatest kolooniatest eraldatud plasmiidide lõikused. Proove kandsin geelile 10 µl 20 µl-st reaktsioonisegust ning *Unstained Protein Mw #SMO431* markerit 4,5 µl (rada 4). Geelipildil nähtav ülemine fragment on Fragment A: EcoRI lõikekohast kuni Bsp119I lõikekohani, 4685 nt pikkune lõik. Geelipildil nähtav keskmine fragment on Fragment B: Bsp119I lõikekohast kuni Bsp119I lõikekohani, 1428 nt pikkune lõik. Alumine, nõrgalt nähtav fragment, on Fragment C: Bsp119I lõikekohast kuni Bsp119I lõikekohani, 461 nt pikkune lõik. Teised lühemad fragmendid pole joonisel nähtavad.

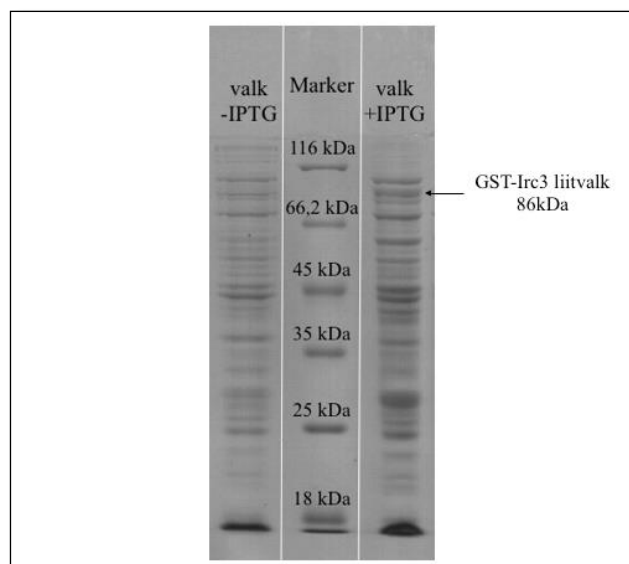
Joonisel 7 on erinevatest kolooniatest eraldatud plasmidi hulk erinev, kuna pGEX-4T-1 on madala koopiaarvuga plasmiid ning bakterid olid DNA eraldamise ajaks kasvanud erinevate tihedusteni. Seetõttu polnud geelil kõiki fragmente võrdselt hästi näha.

2.3.2. pGEX-4T-1 plasmidi transformatsioon *E. coli* BL21-RIL rakkudesse, GST-Irc3 liitvalgu valguekspressiooni induktsioon

Pärast pGEX-4T-1 IRC3 plasmidi olemasolu kontrollimist, transformeerisin selle *E. coli* BL21-RIL rakkudesse kuumašoki meetodil. Bakterirakke, mis sisaldasid sisseviidud plasmidi pGEX-4T-1 IRC3, sain selekteerida, kasutades antibiootikumi ampitsilliin. BL21-RIL tüve bakterirakke sain selekteerida, kasutades selleks antibiootikumi klooramfenikool, kuna BL21-RIL rakud sisaldavad plasmiididel lisa koopiaid *argU*, *ileY* ja *leuW* tRNA geenidest. Plasmiidiga transformeeritud BL21-RIL kolooniaid kasvasin edasi M9 vedelsöötmes esmalt 50 ml-ses mahus, et kontrollida Irc3 valgu ekspresseerumist rakkudes. Kasutasin M9 söödet, kuna see on sobilik just rekombinantsete *E. coli* tüvede kasvatamiseks. Irc3 rekombinantseks ekspressiooniks kasutasin GST Gene Fusion süsteemi, mis võimaldas plasmiidilt sünteesida GST ja Irc3 liitvalku.

GST-Irc3 liitvalgu valguekspressiooni BL21-RIL rakkudes indutseerisin 1 mM IPTG lisamisega, kui 50 ml-s M9 söötmes kasvanud rakukultuur oli saavutanud tiheduse $OD_{600} = 0,7$. Induktsioon kestis 6 tundi 30 °C juures. Kasvatatud rakkudes toimunud valguekspressiooni kontrolliks võrdlesin enne indutseerimist (vaata joonis 8, rada 1) ning pärast indutseerimist (vaata joonis 8, rada 3) võetud proovide valgusisaldust 10%-lises SDS-PAAG geelis. 50 ml-st rakukultuurist võtsin välja 100 μ l rakke, millele lisasin 25 μ l 2x SDS geelipuhvrit ja 25 μ l vett, millest võtsin omakorda 10 μ l proovi välja geelile kandmiseks.

Irc3 ja GST liitvalgu suurus on 86 kDa, seejuures Irc3 molekulaarmass on $mW = 60$ kD ja GST molekulaarmass on $mW = 26$ kDa. Geelil võrrelduna suurusmarkeriga oli näha sellise suurusjärgu juures valgu olemasolu, mis kinnitas, et tahetud GST-Irc3 liitvalku oli tõepoolest rakkudes ekspresseeritud.



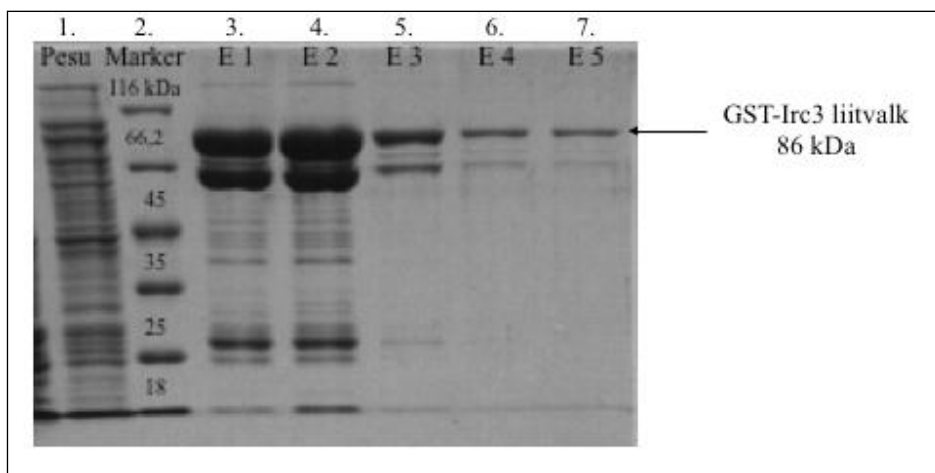
Joonis 8. Valguekspressiooni kontroll 10%-lises SDS polüakrüülamiid geelis. Rada 1 (valk –IPTG) näitab IPTG-ga indutseerimata rakulüsaati ja rada 3 (valk +IPTG) näitab IPTG-ga indutseeritud rakulüsaati. Geelile kandsin 10 μ l proovi 50 ml-st rakukultuurist ja 4,5 μ l markerit. Keskel (rada 2, Marker) on molekulmassi marker *Unstained Protein Mw #SMO431*. Irc3 valgu suurus koos GST-ga on 86 kDa.

2.3.3. GST-Irc3 liitvalgu puhastamine *E. coli* BL21-RIL rakkudest

Selleks, et saaks töötada välja protokoll *H. polymorpha* Irc3 valgu puhastamiseks, kasvasin BL21-RIL pGEX-4T-1 IRC3 rakud üles 250 ml-ses mahus. Valguekspressiooni indutseerisin siis, kui rakukultuur oli saavutanud tiheduse $OD_{600} = 0,75$.

GST-Irc3 liitvalgu puhastamiseks lüüsisin rakke rakukestade lõhkumiseks ultraheliga sonikeerides. Irc3 valku sisaldavat rakulüsaati küllastasin 30%-lise ammooniumsulfaadi lõppkontsentratsioonini. Seda tegin selleks, et mittevajalikud valgud välja soolata. Järgmises etapis küllastasin rakulüsaati 60%-lise ammooniumsulfaadi lõppkontsentratsioonini selleks, et puhastatav Irc3 valk sadestuks. Valku sisaldava sadestatud fraktsiooni lahustasin 12 ml-s lüüsipuhvri lahuses, millele lisasin 0,5 ml glutatioon-agaroosi maatriksit ning segasin 4 tundi *end-over-end* il. Seejärel kandsin glutatioon-agaroosi maatriksi kolonnile ning pesin elueerimispuhvriga, misjärel elueerisin seda 10 mM glutatiooni sisaldava elueerimispuhvriga. Kolonnist välja tulnud fraktsioone korjasin järgmistes mahtudes: E1) 250 µl; E2) 500 µl; E3) 250 µl; E4) 250 µl; E5) 250 µl.

250 ml-st puhastatud GST-Irc3 liitvalgu elueerimist, fraktsioonide ja puhastamise vaheetappide tulemusi analüüsisin SDS-PAAG geelelektroforeesiga. 10%-lises SDS-PAAG geelis kontrollisin kolonni maatriksist eelnevalt läbi jooksnud elueerimispuhvrit (Pesu) ning valgu elueerimise fraktsioone (E1 – E5) koos suurusmarkeriga *Unstained Protein Mw #SMO431* (vaata joonis 9).



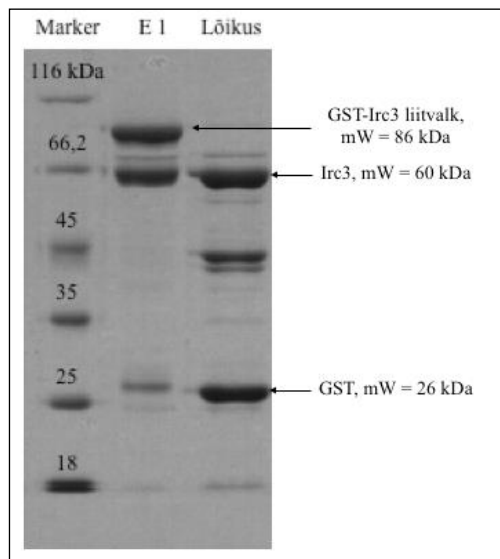
Joonis 9. 250 ml-st *E. coli* BL21-RIL rakkudest välja puhastatud GST-Irc3 liitvalgu elueerimise kontroll 10%-lises SDS-PAAG geelis. Esimeses rajas (Pesu) on näha elueerimise eelset kolonni läbivoolu 10 µl-st proovist. Teises rajas on suurusmarker (4,5 µl) *Unstained Protein Mw #SMO431*. Kolmandas kuni seitsmendas rajas on 10 µl proovi vastavast elueerimise fraktsioonist selles järjekorras, kuidas nad kolonnist läbi jooksid, vastavalt E1 – E5.

2.3.4. GST-Irc3 liitvalgu lõikamine trombiiniga ja kationvahetus S-Sepharose kolonnil

Eelnevalt puhastatud elueerimise fraktsioonid sisaldasid GST-Irc3 liitvalku. Irc3 valgu edasiseks puhastamiseks ning hiljem analüüsimiseks tuli esmalt Irc3 valk GST küljest lahti lõigata. Selleks

kasutasin inimese vereplasma trombiini. Lõikamiseks vajalik trombiini äratundmiskoht asus pGEX-4T-1 plasmiidis GST järjestuse järel, et oleks võimalik GST ja Irc3 valke üksteisest eraldada.

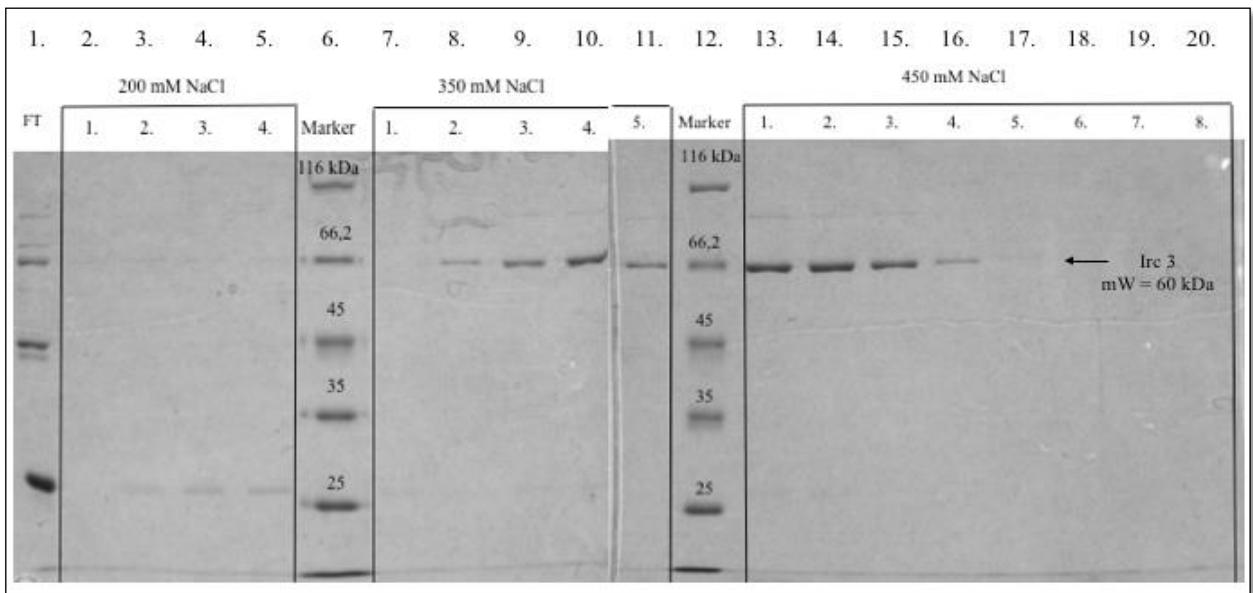
Trombiiniga lõikamise reaktsiooni teostasid üleöö jääl ning reaktsiooni peatamiseks kasutasid 1 mM PMSF-i. Trombiiniga lõikuse toimumist kontrollisid 10%-lises SDS-PAAG geelis (vaata joonis 10), võrrelduna trombiini lõikusele eelneva elueerimise fraktsiooniga E1, mille maht oli 250 µl.



Joonis 10. Trombiiniga GST-Irc3 liitvalgu lõikamise kontroll 10%-lises SDS-PAAG geelis. Esimeses rajas on 4,5 µl markerit *Unstained Protein Mw #SMO431*. Teises rajas (E1) on võrdluseks 10 µl proovi trombiini lõikusele eelnevast elueerimise fraktsioonist E1, mis sisaldab GST-Irc3 liitvalku (mW = 86 kDa). Kolmandas rajas (Lõikus) on trombiini lõikusele järgnevalt lahusest võetud 10 µl proovi kontrolliks, milles on näha, et Irc3 valk (mW = 60 kDa) ja GST (mW = 26 kDa) on üksteisest eraldunud.

Edasist Irc3 puhastamist viisin läbi S-Sepharose kolonnil. Trombiiniga lõigatud Irc3 fraktsioonid, mis oli lahjendatud 100 mM NaCl kontsentratsioonini, kandsin S-Sepharose maatriksiga täidetud kolonnile. Kolonni pesin 100 – 200 mM NaCl sisaldusega S-sepharose-i kolonni puhvriga (S) ning Irc3 valk elueerus 350 – 450 mM NaCl kontsentratsiooniga S puhvril.

S-Sepharose kolonnil puhastatud Irc3 valgu fraktsioone kontrollisid 10%-lises SDS-PAAG geelis (vaata joonis 11). Geelis kontrollisid S-Sepharose kolonni pesu ehk läbivoolu (FT), 4x 500 µl elueerimisfraktsioone 200 mM-se NaCl sisaldusega (1. – 4.), 5x 100 µl 350 mM-se NaCl sisaldusega (1. – 5.) ja 8x 250 µl 450 mM-se NaCl sisaldusega (1. – 8.).



Joonis 11. S-Sepharose kolonnil puhastatud Irc3 valgu olemasolu kontroll 10%-lises SDS-PAAG geelis. Igal rajal on 10 µl proovi vastavast fraktsioonist. Esimeses rajas (FT) on kolonni pesu läbijooks. Radade üles märgitud NaCl kontsentratsioon (200 mM, 350 mM ja 450 mM) tähistab fraktsiooni puhvris S olnud NaCl sisaldust. Teises kuni viiendas rajas on valgu puhastusfraktsioonid (1. – 4.) 200 mM-se NaCl-i sisaldusega, kuuendas ja kaheistkümnendas rajas on 4,5 µl markerit *Unstained Protein Mw #SMO43*, seitsmendas kuni üheteistkümnendas rajas on valgu puhastusfraktsioonid (1. – 5.) 350 mM-se NaCl-i sisaldusega ning kolmeteistkümnendas kuni kahekümnendas rajas on valgu puhastusfraktsioonid (1. – 8.) 450 mM-se NaCl-i sisaldusega. Noolega on märgitud Irc3 valgu (mW = 60 kDa) asukoht geelis.

Saadud tulemused näitasid, et *H. polymorpha* Irc3 valku saab puhastada sama protokoll järgi kui *S. cerevisiae* Irc3 valku.

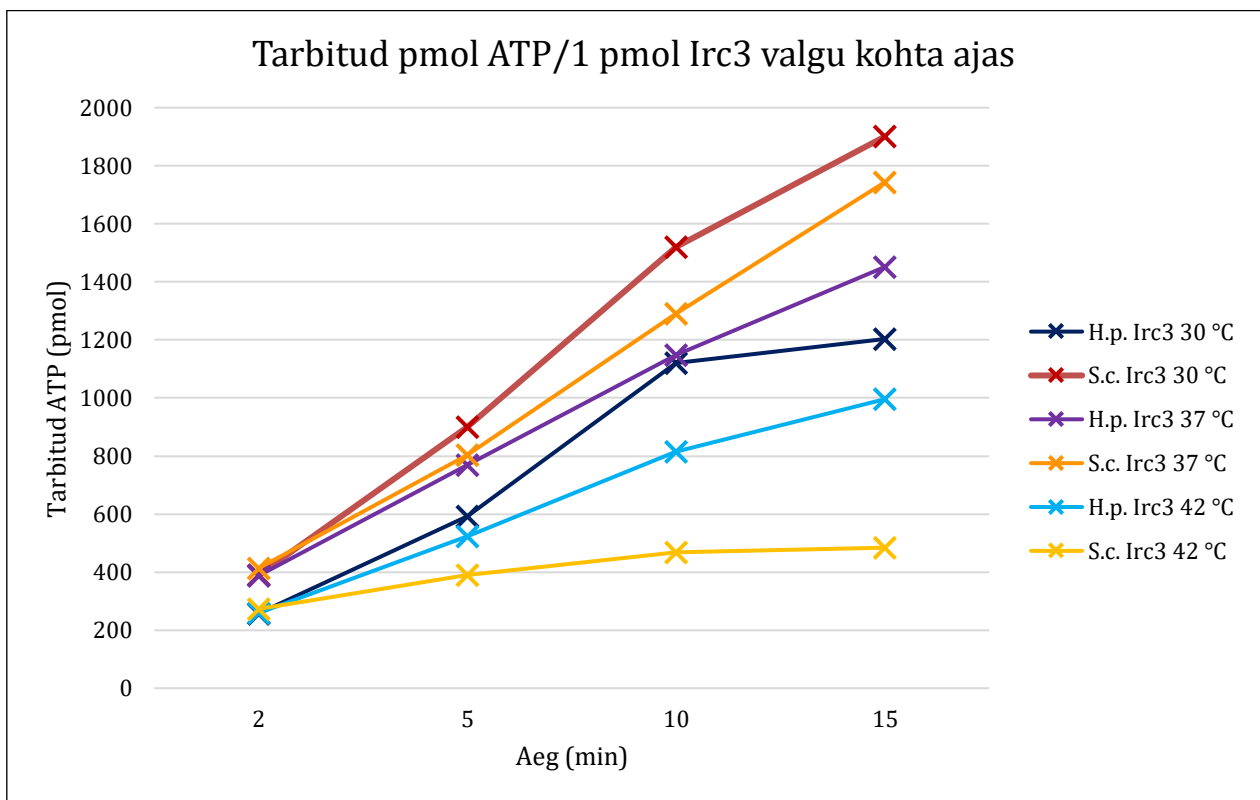
Elektroforeesi tulemusena sain järeldada, et 350 mM-se NaCl sisaldusega 2. – 5. fraktsioonis ning 450 mM-se NaCl sisaldusega 1. – 4. fraktsioonis oli väljapuhastunud Irc3 valku kõige enam. Neid valgu fraktsioone säilitasin -80 °C juures ning edasiste katsete jaoks kasutasin kindla puhastusfraktsiooni valku, vastavalt kas 350 mM-se NaCl sisaldusega fraktsioone (2. – 5.) või 450 mM-se NaCl sisaldusega fraktsioone (1. – 4.).

2.3.5. Irc3 valgu ATPaasse aktiivsuse mõõtmine

Irc3 ATPaasse aktiivsuse reaktsioone viisin läbi erinevatel temperatuuridel (30 °C, 37 °C ja 42 °C). Need katsed viisin läbi selleks, et näha võimalikku temperatuuri mõju valgu aktiivsusele. Võrdluskatsed tegin *S. cerevisiae* Irc3 valguga samadel tingimustel. Antud katse põhimõte seisneb selles, et kui valgul on ATPaasne aktiivsus olemas, siis ta tarbib ATP-d ja sealhulgas ka

radioaktiivselt märgistatud [$\gamma^{32}\text{P}$]-dATP-d. Nii tavalist kui ka γ^{32} ATP-d lagundavad valgud ADP-ks ja anorgaaniliseks fosfaadiks ning seega, mida kauem on valk aktiivsena inkubeeritud reaktsioonisegus, seda rohkem saab tekkida anorgaanilist fosfaati. Stopplahuse lisamisega sai reguleerida reaktsiooni toimumise kestust. Stopplahuses olev aktiivsüsi on võimeline siduma ADP-d ja ATP-d, kuid mitte anorgaanilist fosfaati. Lahusesse jääva radioaktiivselt märgistatud vaba fosfaadi kiirgust mõõtsin Liquid Scintillation Analyzer (Perkin Elmer) masinaga. Antud töös lasin reaktsioonidel kesta 2 minutit, 5 minutit, 10 minutit ja 15 minutit. ATPasse aktiivsuse katse tulemusena saadud CPM (*counts per minute*) arvutasin ümber tarbitud pmol ATP-d/1 pmol Irc3 valgu kohta (vaata joonis 12), kasutades selleks järgnevat valemit:

$$\frac{\text{ATP pmol} \times \frac{\text{CPM} \times \text{lahjenduskoefitsent}}{\text{totaalne kiirgus}}}{\text{Irc3 pmol/reaktsiooni kohta}}$$

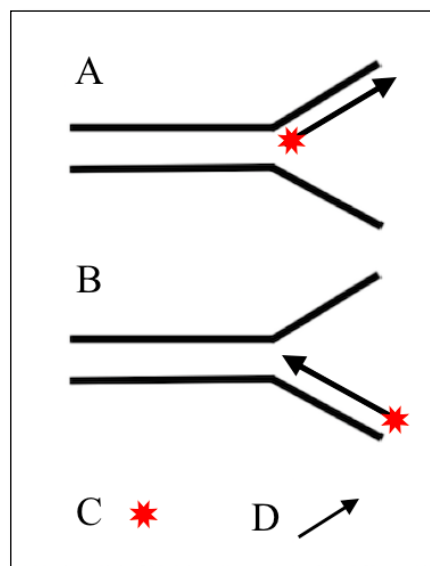


Joonis 12. ATPasse aktiivsuse katse tulemused arvatuna ümber tarbitud pmol ATP-ks/1 pmol Irc3 valgu kohta ajas. Y-teljel on tarbitud ATP hulk (pmol) ja x-teljel on ajaskaala minutites (ajapunktid 2 minutit, 5 minutit, 10 minutit ja 15 minutit on tähistatud ristiga). Graafikul olevad sirged kajastavad igas proovis hüdrolüüsitava ATP koguse muutust ajas. *H. polymorpha* (H.p.) Irc3 valgu aktiivsus 30 °C juures on tähistatud tumesinisega, 37 °C lillaga, 42 °C helesinisega. *S. cerevisiae* (S.c.) Irc3 valgu aktiivsus 30 °C juures on tähistatud punasega, 37 °C oranžiga ja 42 °C kollasega.

Jooniselt 12 on näha, et *S. cerevisiae* Irc3 valgu ATPaasne aktiivsus on *H. polymorpha* Irc3 aktiivsusest suurem temperatuuridel 30 °C ja 37 °C. Temperatuuril 42 °C on aga *S. cerevisiae* Irc3 kaotanud enamuse enda ATPaasest aktiivsusest, kuid *H. polymorpha* Irc3 pole, mis näitab *H. polymorpha* Irc3 valgu võimalikku termostabiilsust. Teine tähelepanek, mida saadud tulemustest saab teha, on see, et kui *S. cerevisiae* Irc3 oli kõige aktiivsem 30 °C juures, siis *H. polymorpha* Irc3 oli seda 37 °C juures, mis samuti viitab *H. polymorpha* Irc3 valgu võimalikule termofiilsusele.

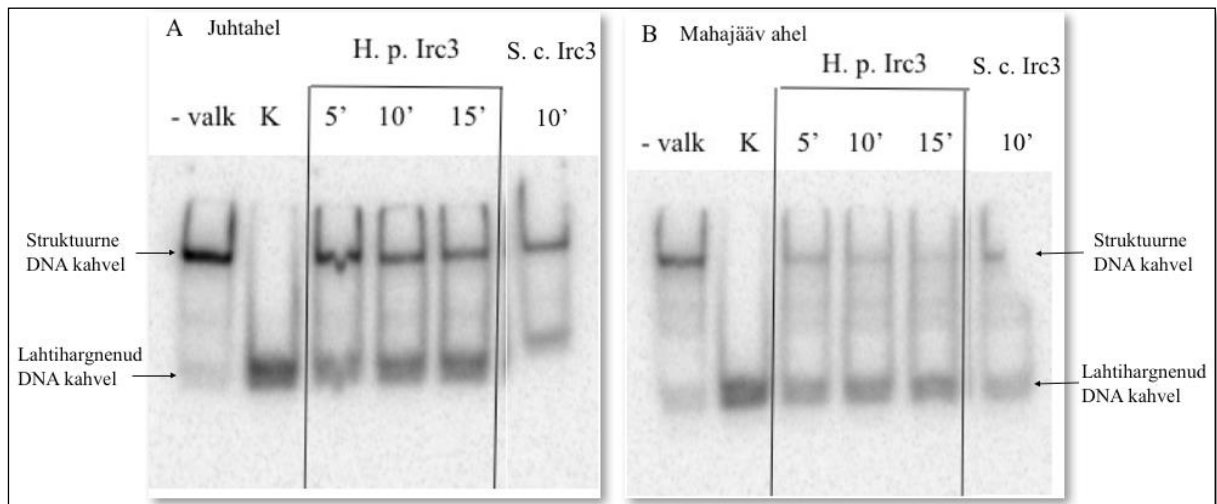
2.3.6. Irc3 valgu helikaasse aktiivsuse mõõtmine

Järgmisena tegin Irc3 valgu helikaasse aktiivsuse katse, et välja selgitada Irc3 võimet lahti harutada DNA kahvli struktuure. Reaktsioonides kasutasin kahte erinevat DNA substraati: 3' üleulatava otsaga DNA kahvlit ja 5' üleulatava otsaga DNA kahvlit (vaata joonis 13).



Joonis 13. DNA kahvlite skeemid. A. Mahajääva ahela DNA kahvel (5' üleulatav ots). B. Juhtiva ahela DNA kahvel (3' üleulatav ots). C. Radioaktiivne märg. D. DNA sünteesi suund (→).

Reaktsioon kulges 30 °C juures ning kestis vastavalt 5, 10 või 15 minutit. Proove (15 µl) jooksutasin 10%-lisel akrüülamiid geelil. Võrdluseks oli *S. cerevisiae* Irc3 valk ja kontrolliks oli ilma valguta reaktsioonisegu ning läbi keedetud substraat. Ilma valguta reaktsioonisegu näitab geelis struktuursete DNA kahvlite paiknemist. 95 °C juures 3 minutit läbi keedetud substraat näitab geelis lahtihargnenud DNA kahvlite asukohta. Helikaasse aktiivsuse katse tulemused on kujutatud joonisel 14.



Joonis 14. Helikaase aktiivsuse katse tulemused. *H. polymorpha* Irc3 valguga läbi viidud reaktsioonid kulgesid 5, 10 ja 15 minutit (rajad 3 – 5, vastavalt *H. p.* Irc3: 5', 10' ja 15'). *S. cerevisiae* Irc3 valguga läbi viidud reaktsioonid kulgesid 10 minutit (rada 6, *S. c.* Irc3: 10'). Mõlemal geelipildid (A. ja B.) on kontrolliks esimeses rajas reaktsioonisegu ilma Irc3 valguta (–valk) ning teises rajas on eelnevalt keedetud substraat (K). **A.** DNA substraadina kasutasin 3' üleulatava otsaga DNA kahvlit, et näha Irc3 võimet lahti harutada DNA kahvleid mööda juhtahelat liikudes. **B.** DNA substraadina kasutasin 5' üleulatava otsaga DNA kahvlit, et näha Irc3 võimet lahti harutada DNA kahvleid mööda mahajäävat ahelat liikudes.

Jooniselt võib näha, et *H. polymorpha* Irc3 ja *S. cerevisiae* Irc3 kumbki ei harutanud kogu substraati lahti, kui võrrelda vastavate valkude radasid keedetud substraadi prooviga. Siiski saab öelda, et *H. polymorpha* Irc3-el on helikaasne aktiivsus olemas mõlemat pidi DNA-l liikudes, mis kinnitab *H. polymorpha* Irc3 valgu funktsionaalset sarnasust *S. cerevisiae* Irc3 valguga.

2.4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli ekspresseerida ja puhastada *H. polymorpha* Irc3 valku ning analüüsida selle valgu ATPaasset aktiivsust erinevatel temperatuuridel ning saadud tulemusi võrrelda *S. cerevisiae* Irc3 valgu ATPaasse aktiivsusega samadel tingimustel.

H. polymorpha IRC3 geeni amplifitseerisin PCR meetodiga. Kasutasin selleks praimereid, mis olid disainitud nii, et amplifikatsiooni käigus tekiks IRC3 geeni algusesse BclI lõikekoht ja geeni lõppu EcoRI lõikekoht. Valisin just nende restriктаaside lõikekohtade sisseviimise, kuna nendel restriктаasidel puudusid lõikekohad IRC3 geenis. Samuti ei saanud ma IRC3 geeni lõikamiseks kasutada BamHI restriктаasi, kuna sellel oli kaks lõikekohta geeni järjestuses olemas, mis paiknesid ebasobivates kohtades. Plasmidi pGEX-4T-1 ja geeni IRC3 kokku ligeerimiseks lõikasin plasmidi BamHI restriктаasiga, kuna plasmiidil puudus BclI lõikekoht. Kuna BamHI ja BclI restriктаaside lõikekohad on järjestuses enamuses kattuvad (vaata joonis 5), oli võimalik plasmidi ja geeni hiljem kokku ligeerida, kaotades seeläbi mõlemad nii BamHI kui ka BclI lõikekohad.

Plasmidi pGEX-4T-1 IRC3 välja puhastamisel DH5 α rakkudest ning *H. polymorpha* Irc3 valgu puhastamisel BL21-RIL rakkudest, kasutasin puhastusprotokolle, mis olid juba eelnevalt üldise ja mikroobibiokeemia laboris välja töötatud ja optimeeritud *S. cerevisiae* Irc3 valgu puhastamiseks. Rekombinantse Irc3 valgu ekspressiooniks kasutasin *E. coli* BL21-RIL tüve rakke, mis kannavad endas lisa tRNA gene: *argU*, *ileY* ja *leuW*. Nende kolme aminohappe lisa sünteesi oli vaja, kuna nimetatud aminohapped on eukarüootsetes valkudes enam kasutusel kui prokarüootses *E. coli*-s, mida kasutati rekombinantseks valguekspressiooniks.

Ekspresseerisin *H. polymorpha* Irc3 helikaasi M9 minimaalsöötme kasvatatud BL21-RIL rakkudest, temperatuuril 30 °C. Kasutasin M9 söödet, kuna see aeglustas *E. coli* rakkude kasvu, mis võimaldas ekspresseerida plasmiidilt rohkem valku. Samuti oli töös kasutatud *S. cerevisiae* Irc3 valk puhastatud samas söötmes kasvatatud rakkudest. Ning kuna eesmärk oli saada nii suures koguses *H. polymorpha* Irc3 valku, et seda oleks võimalik kasutada aktiivsuse kontrolli katseteks, oli M9 söötme kasutamine optimaalseim valik.

Ekspressioonivektorina kasutasin plasmidi pGEX-4T-1 (vaata joonis 3). See plasmiid sisaldab glutatioon-S-transferaasi (GST) geeni, mille järele liitsin *H. polymorpha* IRC3 geeni järjestuse. See võimaldas pGEX-4T-1 IRC3 plasmiidilt kodeerida rekombinantset GST-Irc3 liitvalku, millest GST valgu osa oli vajalik hilisemaks glutatioon-agaroosiga seondumiseks valgupuhastuse eesmärgil. GST-Irc3 liitvalk on pGEX-4T-1 IRC3 plasmiidil *tac* promooteri, mis on *trp* ja *lac*

promooterite hübriid, kontrolli all. Tac promooterile seonduv LACI geeni valguline produkt represserib GST-Irc3 ekspressiooni. Seetõttu oli vaja liitvalgu ekspressiooni indutseerida. Selleks kasutasin isopropüül-a-tio-β-D-galaktopüranosiidi (IPTG), mis seondub lacI repressoriga, mistõttu katkeb ühendus repressori ja lac operaatori vahel, mis omakorda lubab valgu ekspresseerimist tac promooterilt.

Isoleerisin GST-Irc3 liitvalku esmalt kontrolli eesmärgil 50 ml-st kultuurist, ning hiljem 250 ml-st kultuurist, et saada piisavas koguses puhast Irc3 valku edasiseks analüüsimiseks.

Ekspressiooni kontroll kinnitas, et pGEX-4T-1 IRC3 plasmidi on võimalik kasutada *H. polymorpha* Irc3 valgu produtseerimiseks. Joonis 9 näitab, et olin GST-Irc3 liitvalku ekspresseerinud ning joonis 11 näitab, et trombiin oli GST ja Irc3 valgud üksteisest eraldanud.

GST märgise eraldamiseks Irc3-st kasutasin proteaasi trombiin. Lõikamiseks vajalik trombiini äratundmiskoht asub pGEX-4T-1 plasmidis GST järjestuse järel ning see järjestus sisaldab ka BamHI lõikekohta ning sellele järgneb EcoRI lõikekoht. Seega lõigates pGEX-4T-1 plasmidi BamHI ja EcoRI-ga sain viia oma IRC3 geeni järjestuse vahetult trombiini lõikekoha järele (vaata joonis 6). Kindlasti tuleks enne edasise katseid pGEX-4T-1 ekspressiooni plasmidis trombiini lõikekoht välja vahetada teo proteaasi (Tobacco Etch Virus, 2017) lõikekohaga. Sellel on praktiline põhjendus, sest seda proteaasi saame laboris ise puhastada, aga trombiini peame ostma.

Irc3 valgu edasiseks puhastamiseks kasutasin S-Sepharose kolonni, mis põhineb ionvahetuskromatograafial. Selle tulemusena vabanesin GST-st, trombiinist ja vähenes ka teiste mittetahetud polüpeptiidide sisaldus lõpplahuses. Saadud Irc3 valku sain sellises koguses, et oli võimalik sellega ATPaasseid ja helikaasi aktiivsuskatseid teostada. Tehtud töö tulemusena võib väita, et kasutatud valgu puhastamisprotokoll sobib *H. polymorpha* Irc3 puhastamiseks.

Valgu kontsentratsiooni mõõtsin NanoDrop spektrofotomeetriga 250 ml-st rakkudest puhastatud Irc3 valgul ning sain tulemuseks 66,7 ng/μl. Seega oli 250 ml-st hinnanguliselt võimalik eraldada 93 μg Irc3 valku.

ATPaasse aktiivsuse reaktsioone viisin läbi *H. polymorpha* ja *S. cerevisiae* Irc3 valkudega temperatuuridel 30 °C, 37 °C ja 42 °C. See võimaldas näha võimalikku temperatuuri mõju valgu aktiivsusele. Reaktsioonid kestsid 2, 5, 10 ja 15 minutit. ATPaasse aktiivsuse katse põhimõte seisneb selles, et kui valgul esineb ATPaasne aktiivsus, siis ta ka tarbib ATP-d, muuhulgas radioaktiivselt märgistatud [$\gamma^{32}\text{P}$]-dATP-d. ATP-d lagundavad valgud ADP-ks ja anorgaaniliseks fosfaadiks ning mida kauem reaktsioon kestab, seda rohkem saab tekkida anorgaanilist fosfaati.

Reaktsiooni kestust sai kontrollida stopplahuse lisamisega kindlal ajahetkel. Kasutatud stopplahuses olev aktiivsüsi oli võimeline siduma ADP-d ja ATP-d, kuid mitte anorgaanilist fosfaati. Aktiivsüsi põhja tseentrifuugimisega jäi lahusesse vaid anorgaaniline fosfaat, mida saab mõõta. ATPaasse aktiivsuse katse tulemused on kujutatud joonisel 12 ning selle põhjal saab öelda järgmist:

- 1) *S. cerevisiae* Irc3 valgu ATPaasne aktiivsus on *H. polymorpha* Irc3 aktiivsusest suurem temperatuuridel 30 °C ja 37 °C;
- 2) *S. cerevisiae* Irc3 oli kõige aktiivsem 30 °C juures;
- 3) *H. polymorpha* Irc3 oli kõige aktiivsem 37 °C juures;
- 4) 42 °C juures on *S. cerevisiae* Irc3 kaotanud enamuse enda ATPaasest aktiivsusest, kui *H. polymorpha* Irc3 puhul seda näha pole.

Saadud tulemuste põhjal võib öelda, et puhastatud *H. polymorpha* Irc3 on termostabiilne valk ning et see on termostabiilsem võrreldes *S. cerevisiae* Irc3 valguga.

Praeguseks ei ole teada, milline on Irc3 valgu struktuur. Minu töö kaugemale ulatuv eesmärk oli saada Irc3 valku stabiilses vormis, mis võimaldaks paremini teostada kristallstruktuuri tegemist.

Valgu kristallisatsiooni peetakse üldiselt keeruliseks protsessiks veekeskkonnast tingitud piirangute, kõrgekvaliteediliste valguproovide saamise probleemide, valguproovide tundlikkuse temperatuuri, pH ja ioontugevuse suhtes ning muude tegurite tõttu. Valgud varieeruvad suuresti oma füüsikalise-keemiliste omaduste poolest ja seetõttu on konkreetse valgu kristalliseerumine harva ettearvatu. Kindla valgu sobivate kristallisatsiooni tingimuste määramine nõuab sageli paljude tingimuste empiirilist testimist enne õnnestunud kristalliseerumise tingimuste leidmist. Võiks arvata, et *H. polymorpha* Irc3 valguga on suurem tõenäosus saada kristallstruktuure, kuna see valk on termostabiilsem kui *S. cerevisiae* Irc3.

Lisaks teostasin *H. polymorpha* Irc3 helikaasest aktiivsust uuriva katse. Helikaasne aktiivsus näitab valgu võimet lahti harutada erinevaid DNA kahvli struktuure. Antud töös kasutasin DNA substraatidena 3' üleulatava otsaga DNA kahvli ja 5' üleulatava otsaga DNA kahvli, et näha Irc3 võimet lahti harutada DNA kahvleid mõlemat ahelat pidi liikudes. Katse tulemused on välja toodud joonisel 14 ning need tõendavad *H. polymorpha* Irc3 helikaasse aktiivsuse olemasolu. Samuti näitavad katse tulemused, et *H. polymorpha* Irc3 ja *S. cerevisiae* Irc3 valgud on sarnase helikaasse aktiivsusega.

Edaspidi on kindlasti vaja korrata tehtud katseid, kuna ajapuuduse tõttu viisin katseid läbi ainult ühel korral. Võiks varieerida *E. coli* BL21-RIL rakkude kasvutingimusi, et parandada plasmiidilt

valgu ekspresseerimist. Näiteks proovida kasvatada rakke erinevatel temperatuuridel, et näha, kas GST-Irc3 liitvalku toodetakse seejuures rohkem või ei. Lisaks tuleks kasvatada rakke suuremas mahus kui olin töös kasvanud (250 ml).

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli ekspresseerida ja puhastada funktsionaalset *H. polymorpha* Irc3 helikaasi, analüüsida selle valgu ATPaasset aktiivsust erinevatel temperatuuridel (30 °C, 37 °C ja 42 °C) ning võrrelda saadud tulemusi *S. cerevisiae* Irc3 valgu aktiivsusega samadel tingimustel.

Irc3 ekspressiooniks kasutasin pGEX-4T-1 IRC3 plasmidi. Plasmidi ligeeritud IRC3 geenist oli eemaldatud N-terminaalne mitokondrisse suunav signaaljärjestus, kuna antud järjestus puudub ka funktsionaalsel Irc3 valgul *in vivo* tingimustes. Irc3 valk ekspresseerus plasmiidilt GST-Irc3 liitvalguna. GST-Irc3 liitvalku puhastasin, kasutades ammoonium sulfaadiga valgu sadestamist ja afiinsuskromatograafiat. GST eemaldas Irc3 küljest, kasutades selleks trombiini. Irc3 valku puhastasin kationvahetus S-Sepharose kolonnil ning Irc3 elueerus puhvris, mille NaCl kontsentratsioon jäi vahemikku 350 – 450 mM. Välja puhastatud Irc3 valgu kontsentratsioon oli keskmiselt 66 ng/μl. 250 ml-st kultuurist puhastus umbes 93 μg *H. polymorpha* Irc3 valku.

Puhastatud valguga sooritasin ATPaasse ja helikaasse aktiivsuse katsed. ATPaasse aktiivsuse reaktsioone viisin läbi *H. polymorpha* ja *S. cerevisiae* Irc3 valkudega temperatuuridel 30 °C, 37 °C ja 42 °C. Reaktsiooni läbi viimine erinevatel temperatuuridel oli eesmärgiga tuvastada Irc3 valgu võimalikku temperatuurisõltuvust. Katsete tulemustest selgus, et *S. cerevisiae* Irc3 valgu ATPaasne aktiivsus oli *H. polymorpha* Irc3 aktiivsusest suurem temperatuuridel 30 °C ja 37 °C. Samas 42 °C juures oli *S. cerevisiae* Irc3 kaotanud enamuse ATPaasest aktiivsusest, kui *H. polymorpha* Irc3 ei olnud. Saadud tulemustest sain järeldada, et *H. polymorpha* Irc3 on termostabiilsem kui *S. cerevisiae* Irc3. Samuti selgus neist katsetest, et *S. cerevisiae* Irc3 valgu ATPaasne aktiivsus oli kõige suurem 30 °C juures, kui *H. polymorpha* Irc3 aktiivsus oli kõige suurem 37 °C juures, mis tõendab *H. polymorpha* Irc3 valgu termofiilsust.

Helikaasse aktiivsuse katse tulemused näitasid *H. polymorpha* Irc3 võimet lahti harutada DNA kahvli struktuure mõlemat DNA ahelat pidi liikudes. Sarnaseid tulemusi on saadud *S. cerevisiae* Irc3 valguga, mis tõendab nende valkude omavahelist sarnasust nende funktsionaalsuses.

SUMMARY

Expression, purification and activity of *Hansenula polymorpha*'s recombinant helicase Irc3 compared to *Saccharomyces cerevisiae*'s Irc3

H. polymorpha is a thermotolerant methylotrophic yeast with an optimum growth temperature of 45 °C (Levine and Cooney, 1973), which is well suited for the production of recombinant proteins (Hollenberg and Gellissen, 1997). Irc3 is a mitochondrial helicase, which is needed for mitochondrial maintenance and inheritance (Sedman et al., 2014). Irc3 protein affects the metabolic intermediates of the mtDNA by selectively binding and disrupting Holliday junctions and replication forks (Gaidutšik et al., 2016). The structure of this protein is still unknown. *H. polymorpha* is a thermotolerant yeast, thus it can produce more thermostable proteins, which are better suited for crystallographic studies.

The aim of this study was to express and purify the *H. polymorpha* Irc3 helicase and to conduct measurements of ATPase activity at various temperatures (30 °C, 37 °C and 42 °C) to see the possible effect of temperature on Irc3 enzyme activity. There has been more research done with *S. cerevisiae*'s Irc3 and because it has a very similar sequence to *H. polymorpha*'s Irc3, these two proteins were compared with each other.

For the expression of Irc3 I used the pGEX-4T-1 IRC3 expression vector. Before ligating the IRC3 gene into the pGEX-4T-1 vector, I removed the N-terminal mitochondrial signal sequence from the IRC3 gene during PCR, since the sequence also does not exist in the functional Irc3 protein *in vivo*. The Irc3 protein is expressed from the plasmid as a GST-Irc3 fusion protein. GST was used for the isolation of the fusion protein by affinity chromatography, after which I removed the GST tag from the Irc3 protein using the protease thrombin.

For purification, I used the S-Sepharose (GE Healthcare) column to isolate the Irc3 protein and the protein eluted in a buffer in which the NaCl salt concentration ranged from 350 mM to 450 mM. The concentration of the purified Irc3 was measured with the NanoDrop spectrophotometer and the result was 66 ng/μl. In total I purified about 93 μg of *H. polymorpha*'s Irc3 protein from 250 ml of culture.

I also performed ATPase and helicase activity assays using purified Irc3 protein. ATPase assays were carried out with *H. polymorpha*'s and *S. cerevisiae*'s Irc3 protein at temperatures 30 °C, 37 °C and 42 °C. The reactions were performed at different temperatures to determine the potential temperature dependence of Irc3 proteins.

The results of the ATPase activity assay showed that *S. cerevisiae*'s Irc3 protein had higher ATPase activity than *H. polymorpha*'s Irc3 on temperatures 30 °C and 37 °C. However, *H. polymorpha*'s Irc3 protein exhibited ATPase activity even at 42 °C, whereas the *S. cerevisiae*'s Irc3 protein did not, which suggests that *H. polymorpha*'s Irc3 protein is more thermostable than *S. cerevisiae*'s Irc3 protein. Furthermore, *S. cerevisiae*'s Irc3 had the highest ATPase activity at 30 °C, when *H. polymorpha*'s Irc3 was most active at 37 °C, which indicates that *H. polymorpha*'s Irc3 is a thermophilic protein.

Helicase activity assay's results showed that *H. polymorpha*'s Irc3 has the ability to unwind DNA fork structures when moving along either the leading or lagging DNA strand. Previous tests with *S. cerevisiae*'s Irc3 have had similar results, which indicates that the two proteins are similar in their function.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada üldise ja mikroobibiokeemia labori kõiki abistavaid õppejõude, töötajaid ja tudengeid. Eriline tänu kuulub juhendajatele Tiina Sedman ja Juhan Sedman, kes vaatamata kõigele, minu osas alla ei andnud.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- 1) Becker, P., Abu-Reesh, I., Markossian, S., Antranikian, G. ja Márkl, H. (1997). Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus sp.* IHI-91 on olive oil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48: 184 – 190.
- 2) Bertani, G. (1951). Studies on Lysogenesis. I. The mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62 (3): 293 – 300.
- 3) Boy-Marcotte, E., Lagniel, G., Perrot, M., Bussereau, F., Boudsocq, A., Jacquet, M. ja Labarre, J. (1999). The heat shock response in yeast: Differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Molecular Microbiology*, 33 (2): 274 – 283.
- 4) De la Cruz, J., Kressler, D. ja Linder, P. (1999). Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends in Biochemical Sciences*, 24 (5): 192 – 198.
- 5) Eastmond, D. L., Nelson, H. C. (2006). Genome-wide analysis reveals new roles for the activation domains of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor (Hsf1) during the transient heat shock response. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (43): 32909 – 32921.
- 6) Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I. ja Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: A multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13 (4): 17R – 27R.
- 7) Elbing, K. ja Brent, R. (2002). *Current Protocols in Molecular Biology*. Avaldatud elektrooniliselt: John Wiley and Sons, Inc. doi: 10.1002/0471142727.mb0101s59 Kasutatud 20.05.2017 http://www.geguchadze.com/SZlab/PDF/cpmb_1.1.pdf
- 8) Eldarov, M. A., Mardanov, A. V., Beletsky, A. V., Ravin, N. V. ja Skryabin, K. G. (2011). Complete sequence and analysis of the mitochondrial genome of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. *FEMS Yeast Research*, 11: 464 – 472.
- 9) Fairman-Williams, M. E., Guenther, U. ja Jankowsky, E. (2010). SF1 and SF2 helicases: family matters. *Current Opinion in Structural Biology*, 20: 313 – 324.
- 10) Gaidutšik, I., Sedman, T., Sillamaa, S. ja Sedman, J. (2016). Irc3 is a mitochondrial DNA branch migration enzyme. *Scientific Reports*, 6: 26414.
- 11) Gellissen, G. (2002). *Hansenula polymorpha*: Biology and Applications. Weinheim: Wiley-VCH.

- 12) Gellissen, G. (2006). Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems, lk 112. Wülfrath: Wiley-VCH.
- 13) Gellissen, G., Hollenberg, C. P. ja Janowicz, Z. A. (1995). Gene expression in methylotrophic yeasts. A. Smith (toim). Gene Expression in Recombinant Microorganisms (lk 195 – 239). New York: Marcel Dekker.
- 14) Gellissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., Cregg, J. M., Berardi, E., Veenhuis, M. ja Van der Klei, I. (2005). New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – a comparison. FEMS Yeast Research, 5: 1079 – 1096.
- 15) Glover, J. R. ja Lindquist, S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. Cell, 94 (1): 73 – 82.
- 16) Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. ja 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.
- 17) Haki, G. D. ja Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrial important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology, 89: 17 – 34.
- 18) Hollenberg, C. P. ja Gellissen, G. (1997). Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. Current Opinion in Biotechnology, 8: 554 – 560.
- 19) Kaliszewska, M., Kruszewski, J., Kierdaszuk, B., ... Tonska, K. (2015). Yeast model analysis of novel polymerase gamma variants found in patients with autosomal recessive mitochondrial disease. Human Genetics, 134 (9): 951 – 966.
- 20) Kunze, G., Kang, H. A. ja Gellissen, G. (2009). *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*): biology and applications. T. Satyanarayana ja G. Kunze (toim). Yeast Biotechnology: Diversity and Applications (lk 47 – 64). Berliin: Springer.
- 21) Lasa, I. ja Berenguer, J. (1993). Thermophilic enzymes and their biotechnology potential. Microbiologia, 9: 77 – 89.
- 22) Leuschner, C. ja Antranikian, G. (1995). Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11: 91 – 114.
- 23) Levine, D. W., Cooney, C. L. (1973). Isolation and Characterization of a Thermotolerant Methanol-Utilizing Yeast. Applied Microbiology, 26: 982 – 990.
- 24) Lindquist, S. ja Kim, G. (1996). Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. PNAS, 93 (11): 5301 – 5306.

- 25) Lioliou, E. E., Pantazaki, A. A. ja Kyriakidis, D. A. (2004). *Thermus thermophilus* genome analysis: benefits and implications. *Microbial Cell Factories*, 3 (5): 1723 – 1727.
- 26) Martínez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO Journal*, 15 (9): 2227 – 2235.
- 27) Morais, J. O. F. ja Maia, M. H. D. (1959). Estudos de microorganismos encontrados em leitos de despejos de caldas de destilarias de Pernambuco II. Una nova especie de *Hansenula: H. polymorpha*. *Anais de Escola Superior de Quimica de Universidade do Recife*, 1: 15 – 20.
- 28) Myong, S., Cui, S., Cornish, P. V., Kirchhofer, A., Gaku, M. U., Jung, J. U., Hopfner, K. P. ja Ha, T. (2009). Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA. *Science*, 34: 4160 – 4167.
- 29) Nunnari, J. ja Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148: 1145 – 1159.
- 30) Odahara, M., Masuda, Y., Sato, M., Wakazaki, M., Harada, C., Toyooka, K. ja Sekine, Y. (2015). RECG maintains plastid and mitochondrial genome stability by suppressing extensive recombination between short dispersed repeats. *PLOS Genetics*, 11 (3): e1005080.
- 31) Park, C. B. ja Larsson, N. (2011). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *The Journal of Cell Biology*, 193: 809 – 818.
- 32) Reinders, A., Romano, I., Wiemken, A. ja De Virgilio, C. (1999). The Thermophilic Yeast *Hansenula polymorpha* Does Not Require Trehalose Synthesis for Growth at High Temperatures but Does for Normal Acquisition of Thermotolerance. *Journal of Bacteriology*, 181 (15): 4665 – 4668.
- 33) Sambrook, J., Fritsch, E. F. ja Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 34) Sambrook, J. ja Russell, D. W. (2006). *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006 (23).
- 35) Sedman, T., Gaidutšik, I., Villemson, K., Hou, Y. ja Sedman, J. (2014). Double-stranded DNA-dependent ATPase Irc3p is directly involved in mitochondrial genome maintenance. *Nucleic Acids Research*, 42 (21): 13214 – 13227.
- 36) Sedman, T., Garber, N., Gaidutšik, I., Sillamaa, S., Paats, J., Piljukov, V. J. ja Sedman, J. (2017). Mitochondrial helicase Irc3 translocates along double-stranded DNA. *FEBS Letters*, 591 (23): 3831 – 3841.

- 37) Singleton, M. R., Dillingham, M. S. ja Wigley, D. B. (2007) Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annual Review of Biochemistry*, 76: 23 – 50.
- 38) Siverio, J. M. (2002). Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 26 (3): 277 – 284.
- 39) Srivastava, S. (2013). *Genetics of Bacteria*. New Delhi, India: Springer. doi: 10.1007/978-81-322-1090-0
- 40) Takahasi, K., Yoneyama, M., Nishihori, T., Hirai, R., Kumeta, H., Narita, R., Gale, M., Inagaki, F. ja Fujita, T. (2008). Nonspecific RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Molecular Cell*, 29: 428 – 440.
- 41) Taylor, R. W. ja Turnbull, D. M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews: Genetics*, 6: 389 – 402.
- 42) Teunissen, D. J., Hall, H. H. ja Wickerham, L. J. 1960. *Hansenula angusta*, an excellent species for demonstration of the coexistence of haploid and diploid cells in a homothallic yeast. *Mycologia*, 52: 184 – 188.
- 43) Van der Klei, I. ja Veenhuis, M. (2002). *Hansenula polymorpha* – a versatile model in peroxisome research. G. Gellissen (toim). *Hansenula polymorpha: Biology and Applications* (lk 76 – 94). Weinheim: Wiley-VCH.
- 44) Van der Klei, I., Yurimoto, H., Sakai, Y. ja Veenhuis, M. (2006). The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763: 1453 – 1462.
- 45) Veenhuis, M. (1992). Peroxisome biogenesis and function in *Hansenula polymorpha*. *Cell Biochemistry and Function*, 10: 175 – 184.
- 46) Voet, D., Voet, J. G. ja Pratt, C. W. (2008). *Principles of Biochemistry* (3. tr). Euroopa: John Wiley and Sons, Inc.
- 47) Wickerham, L. J. (1970). *Hansenula*. H. ja P. Sydow, J. Lodder (toim). *The Yeasts, a Taxonomic Study* 2nd Edition (lk 226 – 315). Amsterdam, Holland: Elsevier.
- 48) Wickerham, L. J. (1951). Taxonomy of yeasts. *Technical Bulletin of the U. S. Department of Agriculture*, 1029: 1 – 55.
- 49) Yang, Q., Del Campo, M., Lambowitz, A. M. ja Jankowsky, E. (2007). DEAD-box proteins unwind duplexes by local strand separation. *Molecular Cell*, 28: 253 – 263.
- 50) Yang, Q. ja Jankowsky, E. (2006). The DEAD-box protein Ded1 unwinds RNA duplexes by a mode distinct from translocating helicases. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13: 981 – 986.

- 51) Yurimoto, H., Sakai, Y. ja Kato, N. (2002). Methanol metabolism. G. Gellissen (toim). *Hansenula polymorpha* – Biology and Applications (lk 61 – 75). Weinheim: Wiley VCH.
- 52) Zhou, X. X., Wang, Y. B., Pan, Y. J. ja Li, W. F. (2008). Differences in amino acid composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins. *Amino Acids*, 34: 25 – 33.

Kasutatud veebiadressid

- 1) *Addgene: Analyze Sequence* (2017). Kasutatud 20.05.2017
<https://www.addgene.org/tools/analyze/c7887848cb2a00bd21d7c3c419b0ae557f3c0877/default/>
- 2) *Addgene: Analyze Sequence: pGEX-4T1* (2017). Kasutatud 20.05.2017
https://www.addgene.org/browse/sequence_vdb/2876/
- 3) *H. p. IRC3* (2017). Kasutatud: 20.05.2017 <http://bio.biomedicine.gu.se/cgi-bin/cutter2/cutter>
- 4) *ExPASy ProtParam tool* (2017). Kasutatud 20.05.2017 <http://web.expasy.org/protparam/>
- 5) *Methylotrophy and Methanotrophy* (2016). Kasutatud 05.05.2017
<https://www.boundless.com/microbiology/textbooks/boundless-microbiology-textbook/microbial-metabolism-5/alternatives-to-glycolysis-47/methylotrophy-and-methanotrophy-308-10937/>
- 6) *Tobacco Etch Virusi* (2017). Kasutatud 01.02.2018
https://en.wikipedia.org/wiki/Tobacco_etch_virus

LISA 1

H. polymorpha IRC3 geeni 1900 aluspaari pikkune järjestus (*H. p. IRC3*, 2017) :

atgatgcgtatcttgatacgcgatttagcatttcgctgcatgtgcgaaaccagatctctaacct
ttcccttcgcccattatcaacaggaatgCGTTGATACGtGTCTAAAATCGCTTGAGACTACCCGTC
gaatagcagtttagccttgctaccggaggaggcaaaactgtcatattcagtcatttgatcgaccag
attccaccaaattccaaaaacgggacgatcgaaaacactcatattggtgcatcgcaaagaactggc
ggaccaggccattgcatctttgCGAAAAGTGTACCCTCAATACAAGATAGAACTGGATATGGCAA
atcgcaaaccttcacatgcaccagacattgatgtcgtagttgcctcagttccaactttgaacagg
agcgtcagcggtttagagtcccatgatcccggTGAATACAAGGCTATAGTGGTCGACGAATGCCA
tcacggcgtcgcgactcgtataactaagatactgaagcattttggctgcgactctgCGATTGTG
atatagcgtgctcgggttttagcgcgacattgtcaaggtacgatgagttgccacttggtcttgtt
tttgacgaaattgtctatgacaaaagtttggtggacctcattcgagaaggctatttatctgattt
ctcgtggatccaggtttctgCCGGTCTCGAGCTCTCCAGGTTTCCATCGGTAAGATGGAGACT
acaagatggacgagctggcgaatcagtcacaacaagatgaaatcaacGCCCTTGTGTTCAAAGT
taccagcattttgctgaaaagtatcagctgaaatcatccttgTTTTTTTgCGTTAATGTTGCCA
tttgaaagtttgctcgtgcttttccgctctaacgggtgtgaatgcacaatacgtgacaggtaata
cttctaaatttgagcgcgaaagactggtagcggaaattttcaaatgggcagctgcctgTTTTAATG
aattgtggtgtgttcacagaaggaacggacattcctaataattgactccaatattcatggtacgtcc
gacacaatcaaaaacccttcttactcaaatggtcgggCGTGGGCTACGGCTTCATGAGAGCAAAC
atagatgctacgtgattgactttgtggatgcacacagagttggcgttaattccaatcccactctg
gaaggaaagatgaaaactaacggagtctctttgttcgaaagcgatactggctcgtggaagacagga
gggtccagagatagaagatatcaagtacatggagtatgacactcttgatggctaccaaaaaatct
tcgaaaagtttaaggagcaagaagtggtccagaccgaaaatatattggcaagttcaagacaagc
cagtttccatggatccagatgaggcgcgatgtctggggactcaacataggggaaggaagaatttta
tcagatcaaaatataccccaccggagctaagactttgtcacttgtcaaaaccgttcgtcgaggca
agatcagatacccagagtctcaaaaaattgctgagaaggtgaccctcgaggaactttttgtggaa
tttgaaaaacaactcgagaaatatcctgaaaagtatcgaagctttcgccagacattaatccgCGG
cgcgatcactcaaaaacagcagatcttattagaagcgttactataaatctggtcgataaaaaatc
caaaaatagataaagcgaattcgttggattgctggacaaaagcttaatggtttgagcaaattt
gctgcttcgaacttgattttcgtttacacagtttcgagaacaaaacgctctcaagctgttcgtcaa
gcaacaggttctcccctcaaaagcgcctcaaaaatacgtagtctcgagatgattcaagcgcgcca
atactgagcgcgagact

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Kadri Maal (15.06.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose "*H. polymorpha* rekombinatiivse helikaasi Irc3 ekspressioon, puhastamine ja aktiivsuse võrdlus *Saccharomyces cerevisiae* Irc3",

mille juhendajad on prof. Juhan Sedman ja PhD Tiina 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 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
 3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018