

## Kokkuvõte

Raud-väävel klastrid on ühed vanimad ja levinumad valkude kofaktorid. Need osalevad nii elektronide ülekandes, ensüümkatalüüsis, geeniekspressioonis kui ka valkude struktuuri säilitamises ja neid leidub kõikides elusorganismides. Nende valkude väärtalitus, mille põhjuseks on tihti klatri dissotsiatsioon, võib viia oksüdatiivse stressi ja mitmete haigusteni. Seetõttu on raud-väävel klatriite stabiilsuse uuringud väga olulised. Üheks Fe-S klatriite koostise ja stabiilsuse uurimise meetodikaks on mass-spektromeetria.

Yah1 on pärmi ferredoksiin, mis sisaldab [2Fe-2S] klatriit ja on funktsionaalseks ortoloogiks bakteriaalsele ferredoksiinile ja inimese FDX2 valgule. Yah1 valk osaleb heem-a biosünteesis ja raud-väävel valkude biogeneesis. Lisaks on Yah1 valgu väärtalitlust seotud ühe levinuma mitokondriaalse haiguse Friedreichi ataksiaga, vase toksilisuse avaldumisega ning mitokondriaalse müopaatiaga.

Antud lõputöö raames kloneeriti *Saccharomyces cerevisiae* YAH1 HisUbi-märgist sisaldavasse vektorisse HisUbipET24d ning ekspresseeriti *E. coli* BL21 Star (DE3) rakkudes. Valk puhastati kasutades erinevaid kromatograafia meetodeid ning märgis eemaldati hiire ubikvitiini hüdrolaas 2 (Usp2) abil. Töös näidati, et HisUbi-märgise abil puhastamine ei ole kõige efektiivsem, sest piisava puhtusega valgu saamiseks tuli kasutada mitmeid lisaetappe ning lisaks oli puhastamise saagis väike.

Puhastatud holo-valku uuriti MALDI mass-spektromeetriga, kuid proovimaatriksite happelisuse tõttu osutus MALDI-MS ebasobivaks detekteerimaks Yah1 [2Fe-2S] klatriit. Klatri lagunemist happelistes tingimustes näidati ka UV-Vis spektroskoopiaga. Nimelt on [2Fe-2S] klatriitel omapärane UV-Vis spekter neeldumismaksimumidega lainepikkustel 320 nm, 410 nm ja 458 nm, mis võimaldab UV-Vis spektroskoopia abil detekteerida klatriit esinemist.

Natiivset ja rekonstrueeritud valku iseloomustati ka ESI mass-spektromeetriga, katsetades seejuures erinevaid holo-valgu rekonstrueerimise protokolle, kuid Fe-S klatriiga valku ei detekteeritud. Kõik rekonstrueerimise katsed viisid, kas erinevate aduktide tekkeni või spektrini, milles domineeriv piik vastas ScYah1 valgule 2 rauaiooniga.

Kuna sulfiidi olemasolu tõestati sulfiidi määramise protokolliga kohaselt ja UV-Vis spektris esinesid samuti klatriile iseloomulikud jooned, siis järeldati, et [2Fe-2S] klatriiga valgule vastava piigi puudumine ESI-MS spektris tuleneb sulfiidiioonide dissotsiatsioonist ESI-MS analüüsi käigus, mitte ebaõnnestunud rekonstrueerimisest. Seega varieeriti ka erinevaid ESI-MS tingimusi nagu kuivatusgaasi temperatuur, kapillaari pinget, lahuse pH, detektsiooni režiim. Ainult detektsiooni režiimi muutmine positiivsest negatiivseks võimaldas detekteerida väikse osa valku koos [2Fe-2S] klatriiga, kuid põhipiigiks jäi siiski valk kahe rauaiooniga. Teised tingimused ei muutnud klatriiga valgule vastava piigi osakaalu spektris, kuid muutsid signaali intensiivsust. Seega määrati tingimused maksimaalse signaali intensiivsuse saavutamiseks milleks olid: kuivatusgaasi temperatuur 100°C, kapillaari pinget 3500 V, lahuse pH 7.5.

Siiski tõestati, et ESI-MS sobib klatriit stabiilsuse uuringuteks, kasutades Yah1 valgu piiki kahe rauaiooniga, sest klatriit stabiilsus sõltub just nende sidumisafiinsusest. Töös näidati klatriit stabiilsust DTT suhtes, mis võimaldab leida klatriit dissotsiatsioonikonstandi järgnevate uuringute jaoks.

Käesolevalt töötati ka välja ka optimaalne Yah1 valgu Fe-S klastriga rekonstrueerimise protokoll, milleks oli esiteks anaeroobses keskkonnas valgu apo-vormiks tegemine, seejärel pH tõstmine tagasi väärtuseni 7.5, valgu taandamine ja inkubeerimine DTT-ga, raua ja sulfiidioonide lisamine ning seejärel puhvrivahetuskolonniga liigsete soolade eemaldamine.

Antud töö tulemusi saab kasutada edaspidi teiste valkude puhastamisel, järgnevate Yah1 valgu raud-väävel klastrite stabiilsust mõjutavate ainete uurimisel ning erinevate raud-väävel valkude mass-spektromeetrilisel iseloomustamisel.