

## Inimese NFU1 valgu ekspresseerimine ja puhastamine

NFU1 on tellingvalk, mis vastutab mitokondriaalse Fe-S klastrite transpordi eest. Selle valgu puudulik ekspressioon või mutatsioonid avaldavad negatiivset mõju lipohappe süntaasile, hingamisahela kompleksile II ning viivad tõsiste metaboolsete häirete tekkeni.

Kuna NFU1 funktsionaalsus on tingitud peamiselt selle Fe-S klatri sidumis omadustest, siis uuringud selles valdkonnas on eriti olulised mõistmaks Fe-S klastrite ülekande mehhanisme erinevate mitokondriaalsete valkude vahel.

Valmistati ekspressiooni konstruktid ekspresseerimaks N-terminaalse His10Ubi- ja GST-märgisega NFU1 valku. His10Ubi-NFU1 ekspresseeriti 18°C juures üleöö ning 37°C juures 4 tundi ning puhastati IMAC meetodil. Saadud valgult eemaldati märgis USP2 proteaasiga. Analüüsid märgise eemaldamise-järgseid proove täheldati, et mõlema temperatuuri juures ekspresseeritud NFU1 omab kalduvust väljasadenemiseks peale märgise eemaldamist. Selgituseks võiks olla NFU1 võimetus saavutada korrektset struktuuri His10Ubi-NFU1 liitvalgu osana. Selle tõttu peeti His10Ubi süsteemi mitesobilikuks NFU1 valgu ekspresseerimiseks.

GST-NFU1 ekspresseeriti 18°C juures üleöö ning 37°C juures 4 tundi sarnaselt His10Ubi-NFU1-ga. Ekspressioon 37°C juures võimaldas saavutada suhteliselt kõrge saagisega liitvalku, kuid märgise-vaba NFU1 omas kalduvust väljasadenemiseks. 18°C juures ekspresseeritud valk säilitas oma natiivse struktuuri jäädes peale märgise eemaldamist lahustuvaks. Samas oli valgu saagis antud juhul oli suhteliselt väike. Saagise suurendamiseks ning märgise-vaba valgu lahustuvuse säilitamiseks kasutati madala aeratsiooniga kultiveerimist 30°C juures üleöö, 4% glütserooli sisaldavas söötmes. Kõikide mainitud tingimuste eesmärgiks oli bakteriaalse metabolismi aeglustamine, mis võimaldaks saada maksimaalses koguses lahustuvat NFU1 valku. Saadud valku peeti suhteliselt puhtaks (hinnanguliselt kui 80%) ning valgu liigikaudne saagis oli 325 µg liitri kultuuri kohta. Saadud NFU1 valku analüüsiti MALDI-MS ja ESI-MS abil.

ESI-MS analüüs viidi läbi nii oksüdeerivates, kui ka taandavates tingimustes ning täheldati redoks keskkonnast-sõltuvat muutust NFU1 oligomeerses olekus. Oksüdeeritud NFU1 eksisteerib nii monomeerses, kui ka dimeerses olekus, taandatud valk aga ainult monomeerses olekus. Võttes arvesse detekteeritud vormide molekulmasse järeldati, et dimeerne olek on tingitud monomeeride-vaheliste disulfiidsildade moodustamisest kõikide tsüsteiinijääkide vahel. Antud töös saadud NFU1 on sobilik Fe-S klatriga rekonstitueerimiseks ning edaspidisteks metalli sidumise omaduste uuringuteks MS abil.