

KOKKUVÕTE

Käesolevas uurimises jätkati bakalaureusetöös alustatud projekti metallotioneiini vasevormi struktuuri määramiseks. Eksperimentide disainil lähtuti bakalaureusetöös välja selgitatud lahuse tingimustest, mis võimaldaks Cu-MT2E metalloormi korrapäraste kristallide saamist. Leitud optimaalsetel tingimustel ESI MS massispektromeetria analüüsi alusel oli DTT kontsentratsioon lahuses 15 mM ning Cu(I)-ioone 12 ekvivalenti 1 valgumolekuli kohta.

Metallotioneiini vasevormi kristalliseerimiseks rakendati sõeltestide lahust segatuna 10 mg/ml kontsentratsiooniga Cu-MT2E-lahusega ning kirjeldati sferoliitide, nõelkristallide, kristallisarnaste moodustiste ning monokristallide tekkimiseks sobivad lahuse tingimused. Paraku ei leitud sõeltestide kordamise käigus uusi Cu-MT2E monokristallide tekkimiseks sobivaid lahuste koostisi, mida järgnevalt täiustada.

Cu-MT2E metalloormi kristalliseerimiseks sobilikke lahuste koostisi ja seda soodustavaid reagente prooviti analüüsida ka diferentsiaalse skaneeriva fluorimeetria meetodil, kuid antud valgu uurimiseks see meetod rakendatav ei olnud.

Üheks oluliseks väljakutseks magistritöö eksperimentides osutus saadud kristallide koostise kindlakstegemine. Kristallide koostise analüüsimiseks rakendati kombineerituna MALDI-TOF MS-i, metüleensinisega värvimist, geelelektroforeesi, kromatograafiat ning tühja tilga meetodit. Tekkinud monokristallide puhul osutus informatiivseks geelelektroforees. Lisaks olid tulemuslikud geelfiltratsioonkromatograafia katsed ning röntgendifraktsioonanalüüs.

Esmalt analüüsiti erinevates kontsentratsioonide kombinatsioonides 0,1-0,4 M NaI ja 5-29,55% PEG 3350 sisaldanud Cu-MT2E metalloormi lahustes tekkinud monokristallide koostist elektroforeesi ning röntgenkristallograafia abil. Mõlema

analüüsi tulemused näitasid, et tegemist ei ole valgukristallidega. Röntgen-difraktsioonianalüüs näitas kristalli ühikraku suuruseks: 31,97 Å; 31,97 Å; 32,45 Å ja kristall oli rombohedraalne. Saadud kristallide asümmeetrilise ühiku mõõtmed ei olnud piisavalt suured, et tegemist võiks olla valgukristalliga.

Nõelkristallide koostist, mis reprodutseeruvalt tekkisid lahuses koostisega: 0,1-0,4 M KSCN; 0,1-0,3 M KBr; 1-6,64% polü- γ -Glu; 0,1 M Bis-Tris, pH 6,5; 15 mM DTT ning 3-19% PEG 4000/7-20% mPEG 2000/3-20% PEG 8000 analüüsiti geelelektroforeesi, metüleensinisega värvimise, tühja tilga meetodi, geelfiltratsioonkromatograafia ning röntgendifraktsiooni abil. Tühja tilga katses kristalle ei tekkinud ning valgulahuses saadud kristallid värvusid metüleensinisega, mis viitasid, et tegemist võiks olla valgukristallidega. Nõelkristallide lahustamisel saadud proovi analüüs geelfiltratsioonkromatograafias ning sobivate kontrolllahuste kasutamine aga ei kinnitanud Cu-MT2E valgu olemasolu kristallides. Geelelektroforees ei osutunud sobivaks meetodiks saadud nõelkristallide uurimisel. Nõelkristallide koostise analüüsiks kasutati usaldusväärsemat meetodit – röntgendifraktsioonanalüüsi, mille abil leiti trikliinse kristalli ühikraku mõõtmeteks olevat 10,123 Å; 13,603 Å; 13,771 Å. Ka Cu-MT2E lahuses tekkinud nõelkristallide ühikrakk osutus liiga väikseks, kinnitades veelkord kristallide mittevalgulist päritolu.

Kõige perspektiivikamad lahuse tingimused Cu-MT2E metallo vormi kristalliseerimiseks on hetkel: 0,1-0,4 M Na-tsitraat, pH 5,6; 0,1 M Na-fosfaat, pH 5,8-8,5 ning 0,1-0,3 M K-fosfaat, pH 5,8-7,6 puhverlahused, milles tekkisid sferoliidid. Sferoliitide lahustamisel saadud proovide kromatograafiline analüüs näitas, et lahus sisaldas Cu-MT2E valku, luues eelduse nendest lähtudes kristallide saamiseks. Meie katsed lahuse tingimuste optimeerimisel, erinevate lisandite rakendamisel ning tekkinud sferoliitide ümberkõlvamisel hästi difrageeriva kristalli saamiseks, ei ole seni piisava kvaliteediga kristalle andnud. Seetõttu oleks antud uurimisprojekti edukaks lõpetamiseks kindlasti vajalik sferoliitide materjalist kristallide kasvatamise katsete jätkamine.