

METALLOTIONEIIN 2E VASEVORMI

KRISTALLISEERIMINE

Bakalaureusetöö

Autor: Doris Pooga

Juhendajad:

Professor Peep Palumaa, Ph.D.

Genoomika ja proteoomika õppetool

Geenitehnoloogia instituut

Tallinna Tehnikaülikool

Priit Eek M.Sc.

Bioorgaanilise keemia õppetool

Keemiainstituut

Tallinna Tehnikaülikool

Küüliku metallotioneiin (MT) 2E kuulub valkude perekonda, mille põhilisteks funktsioonideks organismis arvatakse olevat d^{10} metallioonide sidumine, metallide detoksifikatsioon, metallide füsioloogilise homöostaasi säilitamine ning oksüdatiivse stressi vastu võitlemine. Valgu kristalliseerimine on väga komplitseeritud meetod, mille puhul mängivad olulist rolli keskkonna pH, temperatuur, valgu ja sadestajate kontsentratsioonid ning erinevad füüsikalised parameetrid. Cu-MT2E on sobiv valk, mille kristalliseerimisel saab koguda olulist informatsiooni metallotioneiinide struktuuri, funktsioneerimise ning vaseioonide sidumise kohta. Cu-MT2E on sarnane teistele Cu-MT vormidele, mille vale funktsioneerimine võib põhjustada erinevaid neurodegeneratiivseid haigusi.

Käesolevas uurimuses analüüsiti valgulahuse koostisi metallioonide ja taandava reagenti (DTT) sisalduse suhtes, mis oleksid sobilikud homogeense Cu-MT2E metallo vormi saamiseks ning leiti optimaalsed tingimused vajaliku korrapäraga kristallide saamiseks.

Sobivad tingimused optimaalseks vaseioonide sidumiseks selgitati välja ESI MS massispektromeetria rakendamisel. Kõige sobilikumad tingimused homogeense Cu-MT2E

metallovormi saamiseks olid järgmised: 15 mM DTT; 12 ekv Cu(I). Kõige enam oli neil tingimustel 10 vaseiooniga assotsieerinud Cu-MT2E vormi, aga vähesel määral esines ka vähem vasega küllastatud vorme. Saavutatud suhteliselt homogeenne vaseioonide sidumine on väga oluline valkude kristalliseerumisel ja vajaliku kvaliteediga kristallide saamisel (kui valgulahuses ei prevaleeri üks valgu vasevorm ja lahus ei ole piisavalt homogeenne, siis väheneb ka kindla struktuuriga valgu kontsentratsioon ning valk ei kristalliseeru).

Valkude kristalliseerumise käigus saadi 5 mg/ml kontsentratsiooniga Cu-MT2E valgust sferoliite, nõelkristalle, kristallisarnaseid moodustisi ning monokristalle. Nõelkristallide saamiseni viinud tingimuste optimeerimisel kordus ka nõelkristallide teke ning teatud tingimuste optimeerimisel, mis algselt viisid sferoliitide tekkele (0,2 M KBr; 0,2 M KSCN; 3% polü- γ -Glu LM; 5% PEG 8000; 0,1 M Na-kakodülaad, pH 6,5) ning Na-kakodülaadi puhvri asendamisel Bis-Trisiga saadi samuti nõelkristallid. Mikroskoopilise vaatluse tulemusena õnnestus optimeerimisega tõsta esialgse skriinimise käigus saadud kristallide kvaliteeti. Kristallimiseks sobisid lahused, mis sisaldasid erinevates kontsentratsioonide kombinatsioonides 0,1-0,4 M NaI ja 5-29,55% PEG 3350.

Käesolevas töös alustati ka saadud kristallide röntgenkristallograafilisi uuringuid. Seni saadud difraktsiooniandmed näitavad, et suure tõenäosusega on tegemist valgukristalliga ning struktuurianalüüsiga ka jätkatakse.