

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL

Matemaatika-loodusteaduskond

Geenitehnoloogia Instituut

Cu⁺-ATPaasi KRISTALLISATSIIONI UURINGUD

Magistritöö

Tõnis Tiirik

Juhendaja: Poul Nissen,

Aarhusi Ülikool,

Molekulaarbioloogia ja Geneetika õppetool,

professor

Kaasjuhendaja: Indrek Koppel,

Tallinna Tehnikaülikool,

Molekulaarbioloogia õppetool,

insener

Geenitehnoloogia

2015

LÜHIKOKKUVÕTE

Vask on oluline bioelement, kuuludes paljude ensüümide koosseisu. Samas on vaba vask ka toksiline element, mistõttu tema rakku transpordi, rakus viibimise ja ekspordi eest vastutab hulk valke. Ühed sellised valgud on Cu^+ -ATPaasid, membraanides paiknevad ionipumbad, mis kulutavad ATP hüdroolüüsil saadavat energiat, et liigutada Cu^+ -ioone üle membraani, eemaldades neid niimoodi rakust või viies vastavatesse organellidesse.

Cu^+ -ATPaas kuulub P-tüüpi ATPaaside perekonda. Selle perekonna liikmeid iseloomustab neljast põhiolekust – E1, E1P, E2P ja E2 – koosneva tsükli läbimine ionide pumpamise käigus. Selleks, et mõista pumba töösükli, peaksid kõik olekud olema kirjeldatud. Vastavate röntgen-kristallstruktuuride määramine pakuks selleks atomaarse resolutsiooniga võimalust. Kuigi Cu^+ -ATPaasi leidub organismides arhedest inimesteni, on praegusteks ainukesteks terviklikeks röntgen-kristallstruktuurideks *Legionella pneumophila*s leiduva LpCopA valgu struktuurid metallivabades E2-P_i ja E2P olekutes.

Antud töös püüti LpCopA-d kristallida ühes E1 olekutest, mis tähendab struktuuri koos pumbatava metalliooniga. Sellise struktuuri määramine aitaks paremini mõista pumba töösükli, näidates ära ionide seondumissaidid ja viisi, kuidas ioonid transmembraansesse ossa suletakse. Struktuursete iseärasuste kirjeldused võiksid anda ka vihjeid ravimidisainiks, et mõjutada inimese Menkesi ja Wilsoni tõve tekkes osalevaid või parasiitide Cu^+ -ATPaase.

Käesolevas töös viidi läbi kristallisatsiooni uuringuid *Legionella pneumophila* Cu^+ -ATPaasi LpCopA-ga. Selleks klooreriti, ekspresseeriti ja puhastati vastava valgu D426N ja D426N- Δ HMBD mutandid nikkel-afiinsus kromatograafia ja geelfiltratsiooni abil. Leiti, et D426N mutanti saab geelfiltratsioonil puhastada ka ilma sooladeta puhvril, mis annab võimaluse hiljem kergelt testida erinevate soolalisandite mõju kristallimiskatsetes. LpCopA-d püüti kristallida koos metalliga, milleks valiti hõbe (Ag^+). Hõbe meenutab oma omadustelt vaske, ta on Cu^+ -ATPaaside poolt pumbatav ning ta ei oksüdeeru nii kergelt kui Cu^+ . Kristallimiskatsetes varieeriti erinevaid nukleotiidi analooge, lisaaineid, pH väärtusi, valgu kontsentratsioone ja hõbeda hulka. Enamjaolt kasutati HiLiDe meetodit, kus kõrged lipiidi ja detergendi kontsentratsioonid loovad membraanivalgu kristallumiseks sobivat keskkonda. Kasutati ka lipiidse kuubikfaasi meetodit.

HiLiDe meetodit rakendati 64 kristallisatsioonikatsetes ning lipiidse kuubikfaasi meetodit 4-s. Hoolimata sadadest tingimustest, mida testiti, andsid eksperimendid vaid agregate,

detergendi ja soola kristalle. Valgukristalle ei omandatud. Tulevastes uuringutes võib olla kasulik siduda LpCopA-ga stöhhiomeetriline kogus metalli ning testida selle seonduvust mass-spektromeetria vms meetodi abil. Ka võib kasu olla teiste Cu^+ -ATPaasi mutantide või homoloogide testimisest ning termostabiilsusanalüüside teostamisest, selgitamaks välja puhvreid, milles valk oleks stabiilsem.