

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion Faculty		Laitos Institution Department
Matemaattis-luonnontieteellinen		Biotieteiden laitos, biokemian osasto
Tekijä Författare Author		
Bencomo, Eija		
Työn nimi Arbetets titel Title		
<i>E. coli</i> n sinkkiä pumppaava membraaniproteiini ZntA mallina P-tyypin ATPaasien rakenteen ja toiminnan tutkimuksessa		
Oppiaine Läroämne Subject		
Biokemia		
Työn laji Arbetets art Level	Aika Datum Month and year	Sivumäärä Sidoantal Number of pages
Pro Gradu -tutkielma	elokuu 2000	88
Tiivistelmä Referat Abstract		
<p>Tutkielman kirjallisuusosassa esitetään katsaus P-tyypin ATPaasien rakenteeseen ja toimintaan. Kokeellinen tutkimuskohteeni oli <i>E. coli</i>n ZntA-proteiini, joka on n. 80 kDa:n kokoinen Zn²⁺:ä solusta ulos pumppaava P-tyypin ATPaasi. Se on noin 30 %:sti identtinen ihmisen soluista kuparia ulos pumppaavan Wilsonin tautiproteiinin (WND) kanssa. Mutaatiot WND-geenissä aiheuttavat ihmisellä Wilsonin tauti -nimisen kuparinkertymäsairauden, jonka oireita ovat mm. maksakirroosi ja aivovauriot.</p> <p>Tutkimukseni tarkoituksena oli käyttää <i>E. coli</i>n ZntA-entsyymiä malliproteiinina P-tyypin ATPaasien rakenteen ja toiminnan tutkimuksessa selvittämällä ZntA:han tehtyjen Wilsonin tautimutaatioiden vaikutusta entsyymien toimintaan. Tuotetut pistemutaatiot sijaitsivat kohdissa, jotka ovat konservoituneita P-tyypin ATPaasiperheessä.</p> <p><i>E. coli</i> JM 109:n ZntA-geeni oli kloonattu pTrcHisA-vektoriin, jossa sitä voitiin ekspressoida polyhistidiinifuusioituna rekombinanttiproteiinina. Pistemutaatiot P401L, P476L, D628A ja P634L tuotettiin PCR:llä tätä konstruktia templaattina käyttäen. Ylituotin mutanttiproteiineja ja villityypin ZntA-proteiinia polyhistidiinifuusioituna rekombinanttiproteiineina <i>E. coli</i> TOP 10-kannassa ja eristin soluista kalvofraktiot. Mittasin kalvofraktioiden ATPaasiaktiivisuuden, tutkin fosforylaatiota [γ-³³P]ATP:llä ja [³³P]P_i:llä sekä defosforylaationopeutta ADP:n kanssa ja ilman sitä.</p> <p><i>E. coli</i>n ZntA-entsyymi osoittautui sopivaksi malliproteiiniksi tutkittaessa P-tyypin ATPaasien toimintaa ja rakennetta. Entsyymi ekspressoituu hyvin ja lokalisoituu helposti eristettävään kalvofraktioon, jossa sen toimintaa voidaan suhteellisen yksinkertaisin menetelmin tutkia. Mutaatioita D628A ja P634L vastaavat mutaatiot oli tuotettu aiemmin sarkoplasmiseen Ca²⁺-ATPaasiin, ja vaikutukset ATPaasiaktiivisuuteen, fosforylaatioon ATP:llä ja inorgaanisella fosfaatilla sekä defosforylaatioon olivat hyvin samankaltaiset. Tutkimuksessa saatiin myös uutta tietoa konservoituneiden aminohappojen tehtävistä P-tyypin ATPaasien toiminnassa.</p> <p>ZntA-proteiini osoittautui hyväksi malliksi tutkittaessa Wilsonin tautimutaatioita. Koska kaikki kolme Wilsonin tautimutaatioita vastaavaa mutaatiota laskivat huomattavasti ZntA:n aktiivisuutta, voidaan olettaa, että ZntA-mutantit vastaavat ominaisuuksiltaan hyvin Wilsonin tautipotilaiden viallisia WND-proteiineja.</p>		
Avainsanat Nyckelord Keywords		
P-tyypin ATPaasi, ZntA, Wilsonin tauti		
Säilytyspaikka Förvaringsställe Where deposited		
Biokemian osaston kirjasto		
Muita tietoja Övriga uppgifter Additional information		