

LÜHIKOKKUVÕTE

INIMESE PROSTAGLANDIIN H SÜNТАASIDE JA VALGU DISULFIIDI ISOMERAASI KO-EKSPRESSIOON PÄRMIS *P. PASTORIS*

Stina Sistok

Prostaglandiin H süntaasid (PGHS; E.C. 1.14.99.1) on oksüdüreduktaaside klassi kuuluvad membraanseotud ensüümid. PGHS-1 on kaks aktiivtsentrit ning ta katalüüsib prostaglandiinide sünteesi kahte esimest reaktsiooni. Tsüklooksügenaases aktiivtsenteris liidetakse polüküllastamata rasvhappele – enamasti arahhidoonhappele (AA) – kaks hapniku molekuli, moodustades esmase prostanoidi, milleks AA kasutamisel on prostaglandiin G₂ (PGG₂). Peroksüdaases aktiivtsentris taandatakse PGG₂ vastavaks alkoholiks – prostaglandiin H₂-ks (PGH₂). Selgroogsetest on leitud kaks isovormi – PGHS-1 ja PGHS-2. PGHS-1-e poolt sünteesitud prostaglandiinid on vajalikud organismi füsioloogilise tasakaalu tagamiseks. Samal ajal on PGHS-2 ekspresseerimine aktiveeritud pigem läbi väliste stiimulite ning produktid on põletiku ja valu mediaatoriteks. PGHS-d on mittesteroidsete põletikuvastaste ravimite sihtmärgiks ning seetõttu on tegemist farmakoloogiliselt väga oluliste valkudega.

Valgu disulfiidi isomeraas (protein disulfide isomerase, PDI) on tioredoksiinide superperekonda kuuluv ensüüm. Sellesse perekonda kuuluvad valgud mängivad ensüümide kokkupakkimisel ja kvaliteedikontrollil olulist rolli, kuid nad erinevad üksteisest muuhulgas kasutatavate substraatide ja ekspressioonitasemete poolest. PDI katalüüsib disulfiidsidemete teket, isomerisatsiooni ja taandamist endoplasmaatilises retiikulumis. Lisaks käitub PDI tšaperonina pakkudes kokku pakkimata või valesti pakitud valkudele keskkonda natiivse vormi saavutamiseks.

Senised katsed Bioorgaanilise keemia õppetoolis on näidanud, et pärmis *Pichia pastoris* ekspresseeritud aktiivse rekombinantse inimese PGHS-1-e (hPGHS-1) hulk

rakus on madal. Selle põhjuseks võivad olla ebakorrektsed disulfiidsidemed ning sellest tulenev vale tertsiaarstruktuur. Eksperimendid teiste valkudega on näidanud, et ko-ekspressioon PDI-ga võib tõsta aktiivse valgu ekspressioonitaset. Seetõttu otsustati antud magistritöö raames uurida, kas hPGHS-1 ko-ekspressioonil pärmi PDI-ga (yPDI) aktiivse ensüümi ekspressioonitase tõuseb. Kuigi hPGHS-2 aktiivsena ekspresseerimisel pärmis näiliselt probleeme ei ole, viidi ko-ekspressioon paralleelselt läbi ka hPGHS-2-ga.

Antud magistritöö raames valmistati ette pärmi PDI (yPDI) kodeerivad järjestused, millega transformeeriti pärmi *Pichia pastoris* tüvesid, mille geeni oli juba eelnevalt viidud metanooliga indutseeritava promootorjärjestuse järele hPGHS-1 või hPGHS-2 kodeerivad järjestused. Pärimi genoomi viidud täiendavad yPDI järjestused kodeerisid ühel juhul naiivset yPDI-d, teisel juhul oli järjestusele lisatud C-terminaalne mycHis₆ afiinsusmärgis. Seejärel viidi läbi yPDI mycHis₆ ekspressioon, erinevate transformantide valgu ekspressioonitaset hinnati Western analüüsi abil ning valk puhastati Ni-afiinsuskromatograafia meetodil. Western analüüs kinnitas, et pärmis yPDI mycHis₆ ekspressioon toimub ning 200 ml ekspressioonikultuuris õnnestus puhastada umbes 0,4 mg valku. Puhastatud valgu preparaadiga viidi läbi ensüümi aktiivsuse määramine insuliini sadestamise testi abil, mis näitas, et puhastatud yPDI mycHis₆ on aktiivne.

Järgnevalt viidi läbi yPDI ja hPGHS isovormide üheaegne ekspresseerimine. Paraku selgus, et ko-ekspressioon kummagi isovormi puhul aktiivse valgu ekspressioonitaset ei tõsta. Saadud tulemus võib viidata sellele, et hPGHS-1 inaktiivsena ekspresseerumise põhjuseks ei ole puuduvad või ebakorrektsed disulfiidsidemed. Samuti ei pruugi inimese membraanvalgud olla heaks substraadiks sellele pärmi tšaperonile.