

RNAas L inhibiitori FeS domeeni klonimine ja ekspresseerimine

Autor: Airiin Roots

Juhendaja: Karin Valmsen

Geenitehnoloogia instituut

Lühikokkuvõte

ABC valkude perekonda kuuluv ribonukleas L inhibiitor (RLI) on evolutsiooniliselt konserveerunud valk, mis on hädavajalik kõigis eukarüootides ja arhedes. RLI on identifitseeritud kui antiviraalse interferoon-aktiveeritud ribonukleas L inhibiitor, kuid tema funktsiooni on täheldatud ka ribosoomide biogeneesis, translatsiooni initsiatsioonis, histoonide biosünteesis ja RNA vaigistamises.

RLI struktuuri iseloomustavad kahe nukleotiidi siduva domeeni ja N-terminaalse tsüsteiini-rikka ferredoksiindomeeni (FeS) olemasolu. FeS domeen koosneb kahest klastrist, mis funktsioneerivad raua ja sulfiidi hoiustajatena, käituvad elektronide ülekandjatena ning katalüütiliste tsentrite sensoritena. Fe-S klastrid on reaktiivsete hapnikuühendite poolt vahendatud oksüdatiivsele stressile väga tundlikud. Inimestes seostatakse oksüdatiivset stressi mitme haigusega, mistõttu on klastrite uurimine biomeditsiinilise tähtsusega.

Praktilises töös kasutati inimese ja müürlooga RLI FeS domeeni järjestusi, mille ekspressiooni uuriti esmalt pET11a vektoris. Ekspressiooniks kasutati *E.coli* erinevaid rakuliine. Paremaks ekspressiooniks lisati rakkudesse arginiini, isoleutsiini ja leutsiini tRNA geenide lisakooptiaid sisaldav RIL+ plasmiid. Lisaks kasutati spetsiaalset disulfiidsillarohkete valkude ekspresseerimiseks disainitud *E.coli* Origami rakutüve. Saavutati rahuldav ekspressioonitase, kuid valku ei suudetud lahustuvaks saada.

RLI FeS domeeni järjestus kloneeriti lahustuvat GST-märgist lisavasse pET42a vektorisse. Saadud konstruktsioon transformeeriti *E.coli* BL21(DE3) RIL+ plasmiidiga rakkudesse, millelt toimus valguekspressioon. Natiivsel lüüsil lahustuvat valku saada ei õnnestunud, kuid 8M GndCl puhvriga õnnestus valk saada lahustuvaks denatureeritud olekus. Denatureeritud valku puhastati His-märgisega seonduvas Ni²⁺-agarosgeelis, mille tulemusel valk seostus kandjale pöördumatult.