

Inimese endoteeli lipaasi ekspressioon pärmis *Pichia pastoris*

Robert Risti

Endoteeli lipaas (EL) on triglütseriidi lipaaside perekonda kuuluv ensüüm, mis katalüüsib vere lipoproteiinide koosseisu kuuluvate triglütseriidide ja fosfolipiidide hüdrolyüsi. In vitro läbiviidud eksperimendid näitavad, et EL-i eelistatud substraadiks on suure tihedusega lipoproteiinid (HDL), täpsemalt nende fosfolipiidide fraktsioon. Suurenenud EL-i aktiivsus korreleerub HDL-i ehk hea kolesterooli vähenemisega vereplasmas. Lisaks mõjutab EL põletikueelsete protsesside kulgu. Üldlevinud on seisukoht, et EL-i aktiivuse inhibeerimine teatud piirini alandab ateroskleroosi riski. Selle ensüümi uurimise üheks suurimaks takistuseks on siiani olnud sobiva ekspressioonisüsteemi puudumine, mis võimaldaks aktiivset valku saada piisavas koguses.

Kasutades ekspressiooniks pärmi *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) on saadud mitmeid rekombinantseid valke suurtes kogustes ning söötmesse sekreteerituna, mis lihtsustab valgu puhastamist. Kuna pärmil *P. pastoris* on olemas kõik eukarüootse valgusünteesi eelised, siis on võimalik saada ka õigesti modifitseeritud ja pakitud aktiivseid imetaja valke. Seetõttu valitigi käesolevas töös inimese endoteeli lipaasi ekspresseerimiseks pärm *P. pastoris*.

Antud töös konstrueeriti pPIC9 EL plasmiid ning transformeeriti see *P. pastoris* GS115 rakkudesse. Kasutades immunodetekeerimist analüüsiti söötmeid ning rakulüsaadist Ni-afiinsuskromatograafia meetodil puhastatud valke. Söötmes His₆-epitoobiga valku ei detekteeritud, kuid Ni-afiinsusmaatriksilt elueeritud valguproovis tuvastati His₆-epitoobiga 57 kDa EL-i vorm. See näitas, et EL-i ekspressioon toimus, kuid valku ei sekreteeritud ega glükosüleeritud. Samas oli valgult ära lõigatud α -MF signaalpeptiid, mis lubab oletada, et signaaljärjestus tunti küll ära, kuid järgnevat sekretsiooni ei toimunud.

Rakusisest 57 kDa vormis EL-i saadi 0,669 mg/l söötme kohta, kuid kuna arvatakse, et EL-i aktiivsuseks on vajalik ensüümi glükosüleerimine, siis tõenäoliselt ei ole ekspresseeritud valk aktiivne. Saadud tulemuste põhjal võib väita, et pärmi *P. pastoris* pPIC9 vektor ei ole sobiv aktiivse sekreteeritud EL-i ekspresseerimiseks ning natiivse 67 kDa glükosüleeritud EL-i saamiseks oleks tarvis uurida teisi sekreteerimise signaaljärjestusi sisaldavaid *P. pastoris* vektoreid või kasutada EL-i enda natiivset signaali.