

CD44 hüaluroonhapet siduva domääni punktmutantide klonimine ja puhastamine

Töö autor: Kristine Roos

Juhendajad: Anne Pink, VTAK; Taavi Päll, VTAK

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös kloneriti ja puhastati CD44 hüaluroonhapet siduva domääni punktmutante. Lisaks uuriti rekombinantsete valkude ja vimentiini omavahelist seondumist GST-afiinsussadestamise meetodiga.

CD44-HABD-i C-terminuse üheksa aminohapet muudeti punktmutatsioonigaalaniiniks ning rekloneeriti pTZ57R vektorist GST-järjestust sisaldavasse ekspressioonivektorisse pGEX-6P-3. Paljud eukarüootsed valgud pakitakse bakteriaalses süsteemis ekspresseerides lahustumatute inkluusioonkehadena. Selle protsessi minimeerimiseks optimeeriti nii valgu ekspressiooni bakteritüve kui indutseerimistemperatuuri. Saadud katsetulemuste põhjal kasutati GST-liiteliste CD44-HABD valkude ekspresseerimiseks *E.coli* BL21(DE3)pLysS tüve rakke, bakterikultuure kasvatati 22 °C juures ning indutseeriti 0.5 mM IPTG-ga 2.5 tundi. Rekombinantseid GST-liitvalke puhastati üheastmelise GST-afiinsuskromatograafia meetodil. Lõpp-produktiks saadi natiivselt voltunud lahustavas vormis GST-liitelised CD44-HABD valgud molekulmassiga ~38 kDa, mis vastab nende teoreetilisele molekulmassile ~38.9 kDa. Rekombinantsete CD44-HABD punktmutantide ja vimentiini seondumist kontrolliti GST-afiinsussadestamise meetodit kasutades. Katsete tulemused näitavad, et CD44-HABD valgu C-terminuse aminohapete punktmutatsioonidalaniiniks ei mõjuta oluliselt vimentiinile sidumist. Rekombinantsete valkude vimentiini sidumine jäi samaks või pigem suurenes võrreldes metsik-tüüpi CD44-HABD-iga. Järgnevalt võiks kinnitada saadud katsetulemusi mõne teise kahe valgu vahelist otsest interaktsiooni mõõtvametodiga (eralduva soojuse kalorimeetriline mõõtmine, raku pinna plasmon resonants) ning uurida rekombinantsete valkude funktsionaalsust ka endotsütoosi katses.