

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL
MATEMAATIKA-LOODUSTEADUSKOND
GEENITEHNOLOOGIA INSTITUUT
MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Kinaasi ULK3 ekspressiooni optimeerimine ja inhibitsiooni kineetika

Magistritöö

Mihkel Näks

Juhendaja: Lagle Kasak, Msc
Molekulaarbioloogia õppetool, teadur
Marko Piirsoo, PhD
Molekulaarbioloogia õppetool, dotsent

Geenitehnoloogia
Tallinn 2016

Magistritöö lühikokkuvõte

Seistes silmitsi ülesandega ekspresseerida rekombinantseid valke, mõeldakse praktiliselt alati esimese asjana bakteriaalse ekspressioonisüsteemi peale. Vaatamata kõigile teistele alternatiividele rekombinantsete valkude tootmises on gram-negatiivne bakter *Escherichia coli* (*E. coli*) tänaseni üks kõige enamkasutatavamaid süsteeme. Bakterirakkude kasvatamise lihtsus ning nende kasvukiirus on ühed peamised eelised, miks loodetakse väikesest prokarüootsest *E. coli*'st nõnda palju.

Käesoleva töö eesmärgid lähtusid meie grupi põhiprojektist – saada inimese seriin/treoniin kinaasi ULK3 kristallstruktuur. Kuna tegemist on atüüpilisse kinaaside klassi kuuluva ensüümiga, mille füsioloogiline roll eukarüootses rakus ei ole täielikult selge, siis annaks kristallstruktuur väärtuslikku informatsiooni selle kinaasi kohta. Konkreetsemalt tuli leida võimalus aktiivse seriin/treoniin kinaasi ULK3 ekspresseerimiseks bakteris ning valmistada leitud meetod ette suuremahuliseks feed-batch fermentatsiooniks. Lisaks uuriti kui suur potentsiaalne roll on inhibiitoril SU6668 ULK3 aktiivsuse reguleerimisel.

Ekspressiooniks katsetati kahte erinevat *E. coli* tüve mitmete erinevate ekspressioonitingimuste juures. Muudeti söötmete koostiseid, induktsiooniaega, induktori tasemeid ja kasvutemperatuuri. Kuigi enamik bakteris ekspresseeritud ULK3-st jääb küll lahustumatuks, suutsime saada kogu ULK3-e hulgast umbes 20% lahustuvat kinaasi. Saagis oli võrreldav nii LB kui ka M9 minimaalsöötmel, mis võimaldab kasutada feed-batch fermentatsiooni meetodit.

Lisaks uuriti inhibiitori SU6668 potentsiaalset rolli ULK3 kinaasi aktiivsuse reguleerimisel. Üritati leida vastus küsimusele, millist tüüpi inhibitsiooniga on SU6668 puhul tegemist. Paralleelselt viidi katseid läbi tuntud ATP konkurentse inhibiitoriga staurosporiin. Katsetulemustest selgus üllatuslikult, et staurosporiin käitus ULK3 kinaasi puhul kui ATP mittekonkurentne inhibiitor. Katsed SU6668-ga näitasid ühel korral ATP konkurentset ning teisel korral segatüüpi inhibitsiooni.

Magistritöö tulemused võimaldavad jätkata katseid ULK3 kristallstruktuuri saavutamiseks. Inhibitsioonikineetika katsetest õhku jäänud küsimustele konkreetseid vastuseid suudaks pakkuda vaid kinaasi kristallstruktuur.