

## Inimese 12R-lipoksügenaasi ekspresseerimine pärmis *Pichia pastoris*

Autor: Merilin Grossthal

Juhendaja: Kaia Kukk

Lipoksügenaasid (LOX-id) on mitte-heemset rauda sisaldavad dioksügenaasid, mis katalüüsivad (1Z, 4Z)-pentadieeni motiivi sisaldavate rasvhapete oksüdatsiooni. 12R-lipoksügenaas (12R-LOX) osaleb naha vee läbilaskvusbarjääri moodustumises. Mutatsioonid selle LOX-i aminohappelises järjestuses põhjustavad mitmeid nahahaigusi, millest kõige laialdasemalt on kirjanduses käsitletud ihtüoosi. Seega on tegemist farmakoloogiliselt huvipakkuva ensüümiga.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kas pärm *Pichia pastoris* sobib inimese 12R-LOX-i ekspresseerimiseks. Ekspressioonisüsteemiks valiti *P. pastoris*, kuna see pärm kasvab kõrgete tihedusteni ja on teoreetiliselt võimeline ekspresseerima suures koguses uuritavat valku tänu tugevalt reguleeritud promootorile. Lisaks on pärmid võimelised rekombinantseid valke ka posttranslatoorselt modifitseerima.

Töö eesmärgi saavutamiseks jagati see järgnevateks suuremateks etappideks: 12R-LOX-i järjestust viimine pärmis ekspressioonivektoritesse, plasmidi paljundamine bakteri kultuuri abil ja 12R-LOX-i ekspresseerimine pärmis. Rekombinantset valku püüti ekspresseerida nii intra- kui ka ekstratsellulaarselt. Valgu ekspresseerimiseks kasutati nii metanooliga indutseeritavat *AOX1* promootorit kui ka konstitutiivset *GAP* promootorit. Ekspresseeritud valgu N-terminus kodeerib ka kuute histidiinjääki, mis võimaldas valgu puhastamist kasutades Ni- aafiinsuskromatograafiat.

Paraku selgus, et pärmis 12R-LOX-i funktsionaalse ja aktiivse valguna ei ekspresseerunud. Nimelt, ei õnnestunud 12R-LOX-i produkte detekteerida. Puhastamise järgselt tehtud *Western blot* analüüs näitas, et elueerimisfraktsioonides leidub u 60 kDa valk (12R-LOX on 80 kDa suurune), mis viitab sellele, et ekspresseerunud 12R-LOX suunatakse degradeerimisele. Seega pärm ei sobi 12R-LOX-i ekspresseerimiseks.