

EEMALDATAVA C-TERMINAALSE HIS₆-EPITOOBIGA PROSTAGLANDIIN H SÜNТАAS-2 EKSPRESSIOON PÄRMIS NING PUHASTAMINE

Töö autor: Luise Tiks

Juhendaja: Kaia Kukk

Matemaatika-loodusteaduskond, Keemiasstituut, Bioorgaanilise keemia õppetool

Prostaglandiin H süntaasid-1 ja -2 (PGHS-1 ja PGHS-2, EC 1.14.99.1) on membraanile seonduvad hemoproteiinid, mis katalüüsivad prostaglandiinide sünteesi kiirust limiteerivat etappi. PGHS-2 seostatakse põletiku, valu, palaviku ning kasvajate tekkega. PGHS-1 ja PGHS-2 on mittesteroidsete põletikuvastaste ravimite põhiliseks sihtmärgiks. Seetõttu on oluline välja töötada efektiivne meetod PGHS-2 tootmiseks ning puhastamiseks. Käesolevas töös ekspresseeriti C-terminaalse 6 histidiinijäägist koosneva afiinsusepitoobiga (His₆-epitoobiga) inimese PGHS-2 *Pichia pastoris* ekspressioonisüsteemis ning puhastati kasutades Ni-afiinsuskromatograafiat. Valgu elueerimiseks Ni-afiinsusmaatriksilt eemaldati His₆-epitoope veise karboksüpeptidaas A-ga (boCPA), vältides nii kõrge imidasooli kontsentratsiooniga lahuste kasutamist. Seejärel määrati puhastatud PGHS-2 aktiivsus, kusjuures tulemused näitasid, et eraldatud PGHS-2 on funktsionaalne. Puhastatud ning kontsentreeritud valgulahuse eriaktiivsus oli võrreldes rakulüsaadi eriaktiivsusega 450 korda kõrgem. Ka leiti, et suur osa valgust elueerus enne boCPA-ga töötlemist, mistõttu eraldatud valgu summaarne kogus oli väike. Saagist oleks võimalik parandada, kui lisada valgu natiivse järjestuse ja His₆-epitoope vahele glütsiini jääk või pikendada afiinsusepitoopi paari histidiinijäägi võrra. Puhastamise eeskirja täiustamisel võiks töös kirjeldatud meetod leida rakendust rekombinantse afiinsusepitoobita PGHS-2 tootmisel.