

Ekspressioonisöötme optimeerimine inimese prostaglandiin H süntaas-2 tootmiseks pärmis *Pichia pastoris*

Bakalaureusetöö lühikokkuvõte

Mari Västra

Prostaglandiin H süntaas-2 (PGHS-2) on heemi sisaldav membraanvalk, mis vastutab prostanoidide biosünteesi esimese etapi eest, osaleb valu, palaviku ja põletiku protsessides ning on sihtmärgiks mitte-steroidsetele põletikuvastastele ravimitele. Seetõttu on farmakoloogia alaseks uurimistööks vaja endiselt võimalikult soodsalt toota inimese rekombinantset PGHS-2-te.

Pichia pastoris on metülotroofne pärm, mida on kasutatud mitmete rekombinantsete membraanvalkude tootmiseks. Rekombinantse valgu ekspressioonitaseme tõstmiseks pärmis on sageli vajalik iga valgu jaoks eraldi ekspressioonitingimusi optimeerida.

Käesolevas töös uuriti, kuidas sobivad erinevat tüüpi söötmed PGHS-2 ekspresseerimiseks pärmis *P. pastoris*. Samuti uuriti, kuidas mõjutavad PGHS-2 ekspressioonitaset söötme pH muutmine, erinevate lisandite juuresolu, metanooli ja dimetüülsulfoksiidi (DMSO) kontsentratsioon, segamise intensiivsus ning anuma kuju. Selleks teostati 72 h ekspressioon, mille järel mõõdeti kultuuri optiline tihedus 600 nm juures ja määrati valgu suhteline aktiivsus.

Raku lüsaatidega läbi viidud PGHS-2 aktiivsuse määramise tulemuste ja rakutiheduste põhjal sobis PGHS-2 ekspresseerimiseks kõige paremini BMGY/BMMY pH 6 sööde, kuhu oli lisatud 2,5% DMSO-d ning täiendavalt metanooli iga järgneva 24 h kohta lõppkontsentratsioonidega 0,5/1/1,5%. Tegemist oli pärmiekstrakti ja peptooni sisaldava söötmega, mille tõttu saavutati 72 h ekspressiooni lõpuks märgatavalt kõrgem rakutihedus võrreldes minimaalse, BMG/BMM söötmega. BMGY/BMMY pH 6 söötmele DMSO lisamine tõstis oluliselt funktsionaalse valgu ekspressioonitaset, kuid vähendas rakutihedust, mistõttu kompenseeriti seda, lisades söötmele juurde suurem kogus metanooli. Metanooli kontsentratsiooni tõstmine järk-järgult 1,5%-ni tõstis rakutihedust, kuid ei mõjutanud märgatavalt valgu ekspressioonitaset, tehes suurema metanooli kontsentratsiooni ja DMSO-ga söötme tootlikkuse palju kõrgemaks, kui see oli standardsöötme puhul.