

# Proteolüütiliselt eemaldatava His<sub>6</sub>-epitoobiga 11R-lipoksügenaasi ekspressioon ning puhastamine

Autor: Helian Vunk

Juhendaja: Priit Eek, bioorgaanilise keemia õppetooli doktorant

Matemaatika-loodusteaduskond, keemiainstituut

Lipoksügenaasid (LOX) on paljudes organismides leiduvad dioksügenaasid, mis katalüüsivad polüküllastamata rasvhapete peroksüdatsiooni hüdroperoksürasvhapeteks, mis võivad olla signaalmolekulide eelühendid või osaleda struktuursete muutuste esile kutsumises rakus. Inimeses on näiteks 5-LOX, millel on oluline roll astma, psoriaasi ja teiste krooniliste haiguste patogeneesis. Seetõttu on lipoksügenaasid olulised ravimi sihtmärgid. Arktilise mere koralli *Gersemia fruticosa* 11R-lipoksügenaas on järjestuselt sarnane just inimese 5-LOXiga. Tänu stabiilsusele on 11R-LOX hea mudel teiste LOXide regulatsiooni ning katalüüsi mehhanismide uurimiseks.

Senistes uuringutes on kasutatud N-terminaalse epitoobiga 11R-LOXi. Lipoksügenaasidel seondub aga just N-terminaalne PLAT-domeen membraaniga ning on regulatoorse funktsiooniga. Täpsemateks membraanile seondumise uuringuteks oleks oluline kasutada natiivset valku, sest epitoop võib mõjutada PLAT-domeeni funktsiooni ning epitoobita valk võib anda paremaid tulemusi valgu kristallimisel.

Paremateks struktuur-funktsiooni uuringuteks töötati käesoleva töö käigus välja protokoll 11R-lipoksügenaasi tootmiseks proteolüütiliselt eemaldatava His<sub>6</sub>-epitoobiga. Lõplik protokoll koosnes 11R-LOXi ekspressioonist autoinduktsiooni meetodil, kahest järjestikusest afiinsuskromatograafia etapist vahepealse proteolüüsiga epitoobi eemaldamiseks ning geelfiltratsioonist. Antud protokoll järgi on võimalik toota ligi 10 mg elektroforeetiliselt puhast natiivset 11R-LOXi 1 l ekspressioonikultuuri kohta.