

Kokkuvõte

Hedgehog signaalirada on üks tähtsamatest signaaliülekanne kaskaadidest bilateraalsetel loomadel. HH rada on oluline embrüogeneesis ja mõnedes postnataalsetes protsessides. HH signaaliraja misregulatsioonid põhjustavad erinevate vähitüüpide teket. Kõige rohkem ja paremini on uuritud Hh valkude selgroogsete homoloog Shh.

Fused (fu) on huvipakkuv seriin/treoniin kinaas HH signaalirajas, aga selle funktsioonid ei ole konserveerunud imetajates. Imetajates on ULK3 üks parimatest kandidaatidest fu rolli täitmiseks. ULK3 reguleerib positiivselt SHH signaaliraja aktiivsust. Meie töörühma eelnevad uurimused on näidanud, et ULK3 on aktiivne kinaas, mis on võimeline fosforüülima nii ennast, kui ka GLI valke.

Meie töörühma põhiliseks eesmärgiks on ULK3 kristallstruktuuri saamine. ULK3 autofosforüülimise võime ja paljude fosfosaitide olemasolu raskendab tema puhastamist ja kristallisatsiooni protsessi. Suuremad mittefosforüülitud valgu kogused on selle protsessi jaoks vajalikud. Antud töös tehti ULK3 inaktiivsed mutandid, mis on kaotanud kinaasse aktiivsuse.

Selle töö põhilisteks eesmärkideks on mutantsete ULK3(S134D) ja ULK3(K139R) valkude bakteriaalne ekspresseerimine, puhastamine, kinaasse aktiivsuse ja fosforüülimise tase hindamine.

Töö käigus subkloneeriti mutantsete valgud eelnevalt tehtud eukarüootsest vektorist ULK3pFlagCMV4 bacteriaalsesse ULK3-UBI-pET47 vektorisse. Mutantide ekspresseerimiseks oli valitud *E. coli* RP-koodon(+) tüvi ja ekspressioon indutseeriti IPTG-ga. Kõik indutseeritud proovid sisaldasid 63 kD ULK3 valku. Prooviti ka ekspresseerida ULK3 mutante madalate temperatuuride juures (10°C ja 15°C), kuna rekombinantsete valkude konformatsiooniline kvaliteet, funktsionaalsus ja lahustuvus peaks tõusma temperatuuri alandades. Valke puhastati nikkel afiinsus kromatograafia abil, aga edasised puhastusetappid on ka vajalikud, kuna valgu eluaadid sisaldasid palju lisandeid.

Aktiivsuse kontroll näitas, et ULK3-wt fosforüülib iseennast ja mittebioloogilist substraati MBP, aga ULK3(K139R)-l on jääk aktiivsus ning ULK3(S134D) on täiesti inaktiivne. Fosforüülimise kontroll demonstreeris, et ULK-wt-l esineb autofosforüülimine iga temperatuuri juures, aga mutantidel on väga madal fosforüülimise tase.

Afiinsus puhastuse käigus selgus, et ULK3-UBI elueerub koos GroEL shaperoniga. Kuna ULK3-UBI ja GroEL molekulmassid on sarnased, siis on SDS-PAGE geeli peal võimatu neid lahutada. Reaalse ULK3 sisalduse hindamiseks proovides on vaja tag'i ära lõigata. Mutantsete valkude osakaal oli väga vähene võrreldes ULK3-wt kasvatatud samastel tingimustel. Seega on mutantide kasutamine valgu suuremate koguste kättesaamiseks ebaotstarbekas.