

Töö pealkiri: Väikese GTPaasi Rin fosfomutantide klonereimine ja iseloomustamine

Autor: Kristiina Kuningas

Juhendaja: Piret Laht

Instituut: geenitehnoloogia instituut

Ras superperekonna väikesed GTPaasid on raku jagunemist, diferentseerumist ja apoptoosi kontrollivates signaaliradades põhilisteks regulaatoriteks. Need protsessid on vajalikud normaalseks arenguks ning vead GTPaase kodeerivates geenides võivad viia vähi või teiste haiguste tekkeni.

Rin on Ras perekonda kuuluv valk, mis on ekspresseeritud närvikoes. Ta on seotud kaltsiumvahendatud neuriitide kasvuga ja mängib keskset rolli neuronite signaaliülekaneraja regulatsioonis. Lisaks on leitud Rin-i seoseid skisofreenia ja Parkinsoni tõvega.

Valke mõjutavad mitmed post-translatoolsed modifikatsioonid, mille üheks näiteks on fosforüleerimine. Väikestele GTPaasidele on fosforüleerimine äärmiselt oluline protsess, kuna sellega reguleeritakse nende bioloogilisi funktsioone. Fosforüleerimise-defosforüleerimise tsüklil kontrollib paljude Ras superperekonna valkude aktiivsust ja rakulist paiknemist. Membraaniga seondunud GTPaaside fosforüleerimine põhjustab nende eemaldumist plasmamembraanilt ja liikumist teistele raku osadele.

Hoolimata oma tähtsusest teatakse Rin-i fosforüleerimisest ja selle mõjudest vähe. Antud töö eesmärgiks oli Rin fosfomutantide tegemine muteerides valikulised seriini aminohappejäägid Rin valgu järjestuses kasalaniiniks või asparagiinhappeks ning mutatsioonidest tulenevate valgu lokalisatsiooniliste muutuste jälgimine rakus.

Esmalt valmistati Rin fosfomutandid vahetades seriini koodonidalaniini või asparagiinhappe koodoniteks. Seejärel produktid klonereeriti pFLAG-CMV-4 ekspressioonivektorisse. Muteeritud Rin valkude ekspressiooni kontrolliti *Western blot* analüüsiga. hRin/pFLAG mutantsed konstruktid ekspresseerusid üldiselt hästi, kuid mõnedel juhtudel (S106A, S106D, S186D) oli valgu tase tunduvalt madalam. Mutandid ekspresseeriti NIH3T3 rakuliinis, värviti immuunotsütokeemiliselt ning pildistati kasutades konfokaalmikroskoopi. Selle tulemusel võib näha Rin valke olenevalt mutandist kas tuumas, plasmamembraanis ja/või tsütoplasmas.

Võrreldes Asp-mutante Ala-mutantidega, võib täheldada viimaste tunduvalt tugevamat lokaliseerimist membraanis.

Kokkuvõttes võib öelda, et fosforüleerimine mõjutab Rin valggu lokaliseerimist ning sellest tulenevalt ka tema funktsioneerimist rakus.