

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL

Matemaatika-loodusteaduskond

Geenitehnoloogia instituut

Molekulaardiagnostika õppetool

Annika Kupper

**Potentsiaalse DYRK1A fosforüleerimispiirkonna
deleteerimine GLI1-s ja selle funktsionaalne analüüs.**

Lühikokkuvõte

Juhendaja: MSc Piret Michelson

Tallinn 2014

KOKKUVÕTE

Hedgehog (Hh) perekonna valkudest lähtuv signaalirada osaleb väga tähtsates arengulistest protsessides nagu näiteks rakkude surma määramises, prolifererumises, ellujäämises ja diferentseerumises. GLI perekonna valgud vahendavad Hh signaaliraja transkriptsioonilist vastust. DYRK1A suurendab GLI1-e aktiivsust läbi fosforüleerimise ja GLI1 valgu tase tuumas suureneb, põhjustades transkriptsioonilise aktiivsuse tõusu. Kuna GLI sihtmärgid on seotud erinevate oluliste rakuliste protsessidega, siis igasugune transkriptsiooniline ja/või posttranslatsiooniline muutus, mis viib pidevale GLI aktiivsusele soodustab tuumorigeneesi.

Antud töö raames deleteeriti täispikas GLI1-s võimalik DYRK1A spetsiifiline konsensusjärjestus ja analüüsiti kinaasi mõju tema aktiivsusele, ekspressioonile ja rakusisesele lokalisatsioonile. Lisaks uuriti varasemalt kloneeritud punktmutantide transkriptsioonilist aktiivsust ja DYRK1A mõju sellele.

Western blot analüüsil leiti, et deletsioonimutandi ekspressioon ei erinenud metsiktüübi omast ja DYRK1A oli võimaline nende ekspressioonitaset vähesel määral tõstma. Kinaasi juuresolekul tekkis GLI1-l fosforüleerimise tulemusena kaksikbänd.

Uurides EGLI1 wt ja E Δ 406 rakusisest lokalisatsiooni ning DYRK1A mõju sellele, selgus, et deletsiooniga mutant lokaliseerub suuremal hulgal tuumas kui metsiktüüpi GLI1, seda nii 24 h kui ka 48 h möödudes. Samas DYRK1A juuresolekul liigub enamuse metsiktüüpi kui ka deletsiooniga GLI1-st tsütoplastmast tuuma, mis on põhjustatud GLI1-e fosforüleerimisest DYRK1A poolt. Tulemused on statistiliselt olulised.

Kasutades luminomeetrilisi mõõtmisi vaadeldi, kuidas DYRK1A muudab metsiktüüpi GLI1-e ja tema mutantide transkriptsioonilist aktiivsust. DYRK1A juuresolekul tõusis nii metsiktüübi kui ka tema mutantide transkriptsiooniline aktiivsus. Võrreldes metsiktüübiga oli punktmutantidel aktivatsioonivõime oluliselt madalam aga deletsioonimutandil suurem.

Prooviti ka detekteerida GLI1-e *in vitro* fosforüleerimist DYRK1A poolt, kasutades DYRK1A katalüütilist domääni ja immuunosadestatud GLI1-te, kuid kahjuks antud katse ebaõnnestus.