

Aluselise heeliks-ling-heeliks transkriptsioonifaktori TCF4 potentsiaalsed märklaudgeenid roti primaarsetes neuronites

Autor: Mari Urb

Juhendajad: Kaja Kannike, MSc; prof. Tõnis Timmusk, PhD; Mari Sepp, PhD

Geenitehnoloogia Instituut

Resümee

Aluseline heeliks-ling-heeliks transkriptsioonifaktor 4 (TCF4) seondub DNA *E-box* järjestusele (CANNTG) homo- või heterodimeerina. TCF4 on laialdase ekspressiooniga ning omab olulist rolli mitmete rakkude arengus ja funktsioneerimisel. Hiljutised uuringud viitavad TCF4 olulisusele närvisüsteemis. Teadmata põhjustel ei ole *TCF4* geenipuudulikkusega hiired elujõulised. TCF4 olulisust närvisüsteemis näitab häirunud ajusilla tuumade diferentseerumine proneuraalse heeliks-ling-heeliks valguga Math1-TCF4 dimeeri puudumisel. Inimeses põhjustab TCF4 haplopuudulikkus harvaesinevat ja rasket häiret, Pitt-Hopkinsi sündroomi (PTHS), millele tunnusteks on vaimse arengu peetus, iseloomulikud näojooned and hingamisanomaaliad. Lisaks on TCF4 seostatud skisofreeniaga.

Vaatamata märkimisväärsele rollile imetajate närvisüsteemis, on geenidest, mida TCF4 reguleerib neuronites üllatavalt vähe teada. Põhjalikult on TCF4 sihtmärkgeene uuritud plasmatsütoidsetes dentriitrakkudes ning inimese neuroblastoomis SH-SY5Y on analüüsitud geeniekspressiooni mustri muutust *TCF4* vaigistamise korral. Kirjanduse andmete põhjal valisime välja viis võimalikku TCF4 märklaudgeeni: *GADD45G*, *ID2*, *CDKN1A*, *NRXN1* ja *CNTNAP2*. TCF4 aktivatsioon arvatakse olevat seotud neuronaaalse aktiivsusega ja *GADD45G* ekspressiooni tõusu on näidatud depolariseeritud neuronites. *ID2* ja *CDKN1A* on tõestatud TCF4 märklaudgeenid mitmetes kudedes. Mutatsioonid *NRXN1* ja *CNTNAP2* geenides põhjustavad PTHS-sarnaseid sündroomide ning lisaks on

deletsioone *NRXN1* geenis seostatud harvaesinevate skisofreenia juhtumitega ning mutatsioonid *CNTNAP2* geenis võivad olla seotud autismiga.

Sellest tulenevalt oli käesoleva töö eesmärgiks uurida PC12 rakuliinis ja primaarsetes roti neuronites TCF4 potentsiaalsete sihtmärkgeenide *Gadd45g*, *Id2*, *Cdkn1a*, *Nrxn1* ja *Cntnap2* ekspressiooni muutusi TCF4 vaigistamisel siRNAdega. Uurimaks TCF4 võimet aktiveerida transkriptsiooni inimese *GADD45G* ja *ID2* promootoril, transfekteeriti primaarsetesse korteksi ja hipokampuse neuronitesse inimese *GADD45G* ja *ID2* promootorkonstrukte ning TCF4 ja ASCL1 efektorvalke kodeerivaid konstrukte. Endogeense TCF4 seondumist nimetatud promootoraladele uuriti kromatiini immuunosadestamise meetodiga roti primaarsetes neuronites.

Käesoleva magistritöö peamised tulemused on:

1. TCF4 reguleerib *Gadd45g* ekspressiooni langust roti primaarsetes kortikaalsetes ja hipokampaalsetes neuronites ja PC12 rakkudes;
2. TCF4 vaigistamine primaarsetes roti kortikaalsetes ja hipokampaalsetes neuronites põhjustab *Id2* transkriptide tasemete allaregulatsiooni;
3. TCF4 ja ASCL1 dimeer on võimeline aktiveerima transkriptsiooni inimese *GADD45G* ja *ID2* promootorilt nii basaalingimustel kui ka depolariseeritud roti primaarsetes neuronites;
4. TCF4 seondub *Gadd45g* ja *Id2* promootorile roti primaarsetes neuronites.

Kinnitamaks, et TCF4 reguleerib otseselt *GADD45G*, on edaspidi vajalik tuvastada konkreetsed *E-box*'id, mis vahendavad *GADD45G* transkriptsiooni tõusu. Teisalt, meie tulemused TCF4 vaigistamisel primaarsetes neuronites ja PC12 rakkudes ei näidanud seoseid TCF4 ja *NRXN1*, *CNTNAP2* ning *CDKN1A* vahel, seetõttu võiks uute märklaudgeenide tuvastamiseks kasutada näiteks kombineeritud meetodit kromatiini immuunosadestamisest ja sekveneerimisest.