

Magistritöö **Aluselise heeliks-ling-heeliks transkriptsioonifaktori Daughterless iseloomustamine täiskasvanud äädikakärbse närvisüsteemis** kokkuvõte

Töö autor: Mariliis Jaago

Töö juhendajad: Mari Maria Palgi, PhD, Tõnis Timmusk, PhD

Äädikakärbse valk Daughterless (Da) kuulub klass I aluseliste heeliks-ling-heeliks transkriptsioonifaktorite hulka, koos inimese ortoloogiga Transkriptsioonifaktor 4 (TCF4). Mutatsioonid ühes inimese *TCF4* geenikoopias vähendavad funktsionaalse TCF4 valgu hulka rakus ning sellega põhjustavad Pitt-Hopksinsi sündroomi, mille patsiente iseloomustavad vaimne alaareng, hingamisraskused ja peenmootorika häired. TCF4 olulisust närvisüsteemi arengus ja toimimises rõhutavad järjest lisanduvad andmed selle aktiivsuse, regulatsiooni ja funktsiooni kohta. Äädikakärbes on võimalik PTHS mudeldada, kasutades selleks Da valku, ning seega uued teadmised Da molekulaarsetest omadustest võivad anda ka olulist informatsiooni inimese TCF4 valgu kohta. Käesoleva töö esimene eesmärk oli luua transgeenne kärbseliin, milles ekspresseeritaks N-terminaalselt märgistatud Da^{3xFLAG} valku. Kuna saadavalolevad Da-vastased antikehad ei ole piisavalt spetsiifilised, annaks selline kärbseliin võimaluse kasutada Da tuvastamiseks parema spetsiifika ja vähema taustsignaaliga FLAG-vastaseid antikehi. Esmalt kasutati CRISPR-Cas9 genoomimuutmise tehnoloogiat, et tekitada äädikakärbse *da* lookusesse kaheahelaline DNA katke. Selle parandamisel homoloogilise rekombinatsiooni mehhanismi teel sisestati äädikakärbse genoomi 3xFLAG märgise kodeeriv ala. Sellisel meetodil loodi viis identset da^{3xFLAG} kärbseliini, kus kärbsed on pealtnäha terved ning viljakad. Järgmisena värvisime me immuunohistokeemiliselt täiskasvanud da^{3xFLAG} kärbeaste aju, kuna varasemalt on Da uuritud pigem embrüonaalse või vaglastaadiumi arengu kontekstis. Me tuvastasime Da^{3xFLAG} ekspresseerivaid rakke muuhulgas äädikakärbse seenkehades, külgmistes sarvedes ja keskkompleksis - ajustruktuurides, mis vastutavad visuaalse ja olfaktoorse informatsiooni töötlemise, õppimisprotsesside ja käitumise reguleerimise eest. Viimasena analüüsisime me, kas Da transaktivatsioonilist aktiivsust on võimalik reguleerida kahe konserveerunud seriinjäägi (positsioonides 535 ja 536) fosforüleerimise teel. Tuginedes HEK293 rakukultuuris läbiviidud lutsiferaasi reportergeeni katsete tulemustele, järeldasime me, et seriinjäägi 535 fosforüleerimine vähendab Da transkriptsioonilist aktiivsust, kuid mõlema seriinjäägi samaaegne defosforüleerimine suurendab Da transaktivatsioonivõimet. Kuigi aktiivsuse reguleerimist posttranslatoorselt fosforüleerimise/defosforüleerimise tasemel on näidatud ka inimese TCF4 ja äädikakärbse aluselise heeliks-ling-heeliks valgu Atonal puhul, jääb välja selgitamata, kas kirjeldatud Da aktiivsuse reguleerimise mehhanism ka füsioloogilistes tingimustes kasutusel on.