

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL  
MATEMAATIKA-LOODUSTEADUSKOND  
GEENITEHNOLOOGIA INSTITUUT  
MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

## ***Neur1* mRNA splaissvariantide ja dendriitse transpordi**

### **analüüs**

Magistritöö

Madis Jaagura

Juhendaja: Richard Tamme, PhD

*Molekulaarbioloogia õppetool,*

*teadur*

Tõnis Timmusk, PhD

*Molekulaarbioloogia õppetool,*

*uurija-professor*

Geenitehnoloogia õppekava

Tallinn 2015

## KOKKUVÕTE

Notch kaskaad on üldine rakkude saatust mõjutav signaalirada, reguleerides erinevaid arengulisi, füsioloogilisi ja patoloogilisi protsesse. Notch kaskaad on vajalik ka sünaptilises plastilisuses, õppimises ja mälus. Notch rada saab reguleerida mitmeti - nii Notch retseptori kui ka selle DSL ligandi endotsüteerimise abil.

Neuralized on E3 ubikvitiinligaas, mis osaleb Notch raja ligandide ubikvitineerimises, mis viib nende endotsütoosi ja järgneva lagundamiseni. *Neur1* mRNA lokaliseerub dendriitidesse, kuid selle protsessi mehhanism pole teada.

Transkriptide spetsiifiline lokaliseerumine dendriitidesse ja sellele järgnev lokaalne translatsioon võimaldab sünaptilise plastilisuse moduleerimist sisendspetsiifiliselt. Transpordi selektiivsus tagatakse mRNA üldjuhul 3' mittetransleeritavas regioonis (UTR), aga ka mujal paiknevate *cis*-toimivate elementide ja neid ära tundvate väliste valguliste faktorite poolt, mis seejärel suunatakse RNA- Valk kompleksis mööda tsütoskeletti molekulaarsete mootorite abil sihtkohta. Nüüdseks on kirjeldatud kümneid erinevaid *cis*-elemente ning nendele seonduvaid valke.

Käesoleva töö peamiseks eesmärgiks oli selgitada välja *Neur1* mRNA *cis*-element/elementid, mis tagaksid selle dendriitse transpordi. Esmalt selgitati bioinformaatilise analüüsi käigus välja kaks G-kvartett järjestust ning A2RE-sarnane element, mis võiksid osaleda *Neur1* mRNA dendriitse transpordi tagamisel. Antud elementid on olulised mitmete teiste dendriitsete mRNA-de transpordi jaoks. *Neur1* 3'UTR klonereerimisel selgus, et selle 3'UTR's asub putatiivne intron. *Neur1* splaissvariantide analüüsimisel selgus, et välja splaissitud introniga lühem mRNA on ekspresseeritud tunduvalt madalamal tasemel võrreldes pika, intronit sisaldava transkriptiga, seda nii arengus kui ka täiskasvanud roti aju eri piirkondades. Samas selgus ka hipokampuse neuronkultuuris mõlema *Neur1* transkripti rikastatus neuriitides. See lubab järeldada, et antud töös edaspidi kasutatud rakukultuurides esineb endogeenne dendriitselt lokaliseeruv *Neur1*. Üldjuhul viib introni olemasolu 3'UTR's selle lagundamiseni. Seetõttu uuriti, kas see kehtib ka *Neur1* puhul. Selgus, et ainult lühema transkripti ekspressioonitase tõusis. See viitab lühema splaiss-variandi lagundamisele NMD

mehanismi abil. *Neur1* mRNA üleekspressioonikatsetes viidi primaarsetesse hipokampuse neuronitesse kimäärsed konstruktid, mille abil uuriti *Neur1* *cis*-elemendi olemasolu ja asukohta. Selle analüüsi käigus selgitati välja *Neur1* 3'UTR piirkond, mis endiselt tagas kodeeritud transkriptide dendriitse lokalisatsiooni. Eelpool mainitud bioinformaatiliselt ennustatud dendriitse transpordi elementide vajalikkuse määramisel selgus, et ka neid elemente mitte-sisaldava kimäärses konstrukti poolt kodeeritud transkript transporditakse endiselt dendriitidesse. See lubab järeldada, et antud elemendid (G-kvartetid ja A2RE-sarnane element) pole dendriitse transpordi jaoks vajalikud. Deletsioonanalüüs näitas, et *Neur1* 3' UTR minimaalne dendriitset lokalisatsiooni tagav *cis*-element asub selle esimeses pooles: 1-148 ja/või 416-914 nt regioonis.