

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL  
Matemaatika-loodusteaduskond  
Geenitehnoloogia instituut

**EKSPERIMENTAALSE SÜSTEEMI LOOMINE PRO-APOPTOOTILISE  
VALGU BAX UURIMISEKS TEMA NATIIVSES KONFORMATSIOONIS  
MITTEAPOPTOOTILISTES RAKKUES**

Magistritöö

Agnes Siiber

Juhendajad: Urmas Arumäe, Molekulaarbioloogia õppetool,  
vanemteadur  
Jaan Palgi,  
nooremteadur

Geenitehnoloogia  
2014

## LÜHIKOKKUVÕTE

Kõige levinumaks rakkude programmeeritud surma vormiks on apoptoos. See on hoolikalt reguleeritud energiast sõltuv protsess, mis omab kindlaid morfoloogilisi ning biokeemilisi tunnuseid. Apoptoosi eesmärgiks on soovimatute rakkude elimineerimine, nii rakkude arvu korrigeerimiseks kui ka näiteks oma otstarbe kaotanud struktuuride eemaldamiseks. Apoptoos on tähtis eelkõige arengus ja kudede rakulise homöostaasi säilitamises, aga ka kahjustunud või mittefunktsionaalsete rakkude kõrvaldamises.

Apoptoosi aktiveerumine peab olema hoolikalt reguleeritud, et rakud sureksid ainult siis, kui see on vajalik. Apoptoosi regulatsiooni teostavad põhiliselt kaks signaalirada: mitokondriaalne- ja surma retseptori signaalirada. Mitokondriaalses signaalirajas on üheks oluliseks apoptoosi teostajavalguks Bax. Bax on Bcl-2 perekonda kuuluv 21 kDa suurune pro-apoptootiline valk, mis aktiveerudes vahendab rakkude surma. Palju on uuritud Bax-i aktiveerumist, kuid vähem on uuritud, mis hoiab Bax-i tervetes rakkudes inaktiivses konformatsioonis. Antud töö põhieesmärgiks oli uurida Bax-i tervetes rakkudes võimalikult natiivsetes tingimustes, et selgitada välja, kuidas on Bax-i inaktivatsioon reguleeritud.

Käesolevas töös teostati katsed HEK 293 rakuliiniga, kontrollidena kasutati Bax+/- Bak+/- MEF ja Bax-/- Bak-/- MEF rakuliine. Meetoditest kasutati geelfiltratsiooni kromatograafiat, et tuvastada Bax-i elueerumisprofiil ja selle põhjal teha järeldusi inaktiivse Bax-i suuruse kohta. Töös kasutati ka natiivset geelelektroforeesi (BN-PAGE), mis on küllaltki uus meetod natiivsete valkude elektroforeetiliseks lahutamiseks. Lisaks teostati kahe-dimensionaalne geelelektroforeetiline analüüs (2D

BN/SDS-PAGE), SDS-PAGE ja Western blot. Huvipakkuvaid tundmatuid valke saadeti Tartu Ülikooli Tehnoloogia instituuti mass-spektromeetriliseks analüüsimiseks ja võimaliku Bax-i interaktsioonipartneri tuvastamiseks teostati ka immuunsadestamine.

Geelfiltratsioon kromatograafiaga saadud tulemused ei kinnitanud varem avaldatud artikli tulemusi, kus näidati, et endogeenne Bax elueerub geelfiltratsioonis 20-30 kDa võrra suurema molekulmassiga kui rekombinantne Bax, mis elueerub oma teoreetilise molekulmassi juures (21 kDa) (Vogel *et al.*, 2012). Saadud elueerumisprofiilid endogeennele Bax-ile HEK 293 rakkudest ja rekombinantsele Bax  $\Delta$ 23-le on sarnased ja märgatav molekulmassi erinevus puudub. 2D elektroforeesi tulemused näitavad, et Bax esineb HEK 293 ja Bax+/- Bak+/- MEF rakkudes kahes erinevas suures valgukompleksis. Lisaks tuvastati antud töös kolm valku, mida Bax-i antikeha N-20 ära tunneb – anneksiin A5, vimentiin ja  $\alpha$ -aktiniin. Varasemalt pole Bax-i antikeha ristreaktiivsust nende valkudega näidatud. Töö käigus tekkis hüpotees Bax-i ja anneksiin A5 interakteerumise kohta. Selle kontrollimiseks teostati immuunsadestamine, kuid saadud tulemused lükkasid hüpoteesi ümber. Kokkuvõtlikult, tulemuste põhjal võib järeldada, et Bax-i inaktiivse konformatsiooni stabiliseerimiseks võib olla vajalik teiste valkudega kompleksi moodustamine.

Saadud tulemused vastasid töö algul püstitud põhieesmärgile uurida inaktiivse Bax-i regulatsiooni. Küll aga on senini teadmata, kas inaktiivse Bax-i stabiliseerimiseks on vajalik interaktsioon mõne teise valguga või mitte. Seetõttu võiks tulevikus uurida Bax-i elueerumisprofiili veel ka teistes rakkudes. Kui Bax elueerub erinevates rakkudes suure valgukompleksina, siis võiks Bax-i interaktsioonipartnerite otsimiseks analüüsida otse rakulüsaadist Bax-i immuunsadestamisel kaasa sadenevaid valke mass-spektromeetriliselt.