

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL
Matemaatika-loodusteaduskond
Geenitehnoloogia instituut

**FILAMIIN A ROLL PKB/AKT, ERK1/2 JA
FOKAALADHESIOONIDE REGULATSIOONIS M2
INIMESE MELANOOMI RAKKODES**

Magistritöö

Kristi Krebs

Juhendaja: Teet Velling, PhD
Molekulaarbioloogia Õppetool,
Vanemteadur

Geenitehnoloogia õppekava
2014

LÜHIKOKKUVÕTE

Proteiin kinaas B (PKB) ehk Akt on oluline seriin/treoniin kinaas mitmetes bioloogilistes protsessides nagu elulemus, kasv, migratsioon ja proliferatsioon. Akt on kasvufaktoritest ja teistest rakuvälistest stiimulitest lähtuvas signaaliülekanandes üheks kesksel kohal olevaks signaalvalgus. Akt-il on mitmeid elulisi rolle vahendavaid tsütosoolseid ja tuumseid substraate ning ebakorrapärane signaliseerimine on mitmete haiguste, sealhulgas ka vähkkasvajate, põhjuseks. Seetõttu on oluline mõista Akt-i signaliseerimise mehhanisme.

Peamiste väliskeskkonna signaalide edastamise eest rakku vastutavad rakuväline maatriks (ECM) ja kasvufaktorid, mis edastavad signaale vastavate rakupinnareseptorite, integriinide ja retseptortürosiinkinaaside (RTK) kaudu, ning toimivad nii üksteisest sõltumatult või teineteist mõjutades. Mitmed rakusisesed adaptorvalgud seonduvad integriinidega, tagades dünaamilise ühenduse aktiini tsütoskeleti ja ECM-i vahel ning signaaliülekanandes oluliste fokaaladhesioonide (FA) moodustumise. Integriinidega seonduv aktiini tsütoskelett ühtseks võrgustikuks ühendav valkude perekond filamiinid, mille laialdasemalt levinud isovormiks on Filamiin A (FLNa). Filamiinid toimivad signaaliülekande platvormvalkudena interakteerudes olenevalt edastatavast stiimulist erinevate transmembraansete retseptoritega ja tsütoplasmaatiliste struktuur- ning signaalmolekulidega. Oluline signaliseerimise kaskaad, mis aktiveeritakse nii retseptor-türosiinkinaaside kui ka integriinide stimulatsiooni tulemusena, on mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaasi (MAPK) signaalirada, mille tähtsaks, mitmeid funktsioone vahendavaks liikmeks on ekstratsellulaarse signaal-reguleeritud kinaas (ERK1/2).

Akt-i paiknemine tuuma on aastaid olnud teadlaste huviorbiidis. Vaatamata sellele pole Akt-i täpne tuuma translokatsiooni molekulaarne mehhanism teada, mistõttu oli üheks käesoleva töö peamiseks eesmärgiks selgitada välja FLNa kui olulise signaaliülekande platvormvalgu roll Akt-i aktiveerimises ja lokaliseerimises. Samuti oli eesmärgiks selgitada välja FLNa roll EGFR-i ja integriinide- vahendatud ERK1/2 ja fokaaladhesioonide regulatsioonis. FLNa rolli hindamiseks võrreldakse töös M2 inimese melanoomi rakke, kus puudub endogeenne FLNa, EGFP-ga konjugeeritud täispikka FLNa-d või selle erinevaid piirkondi ekspresseerivate M2 rakkudega.

Antud töös näidati immunofluorestsents- ning tuuma- ja tsütoplasmafraktsioonide analüüsi abil FLNa ekspressiooni vajalikkust Akt-i paiknemiseks tuuma ning intensiivsemat Akt-i seriini 473 fosforüleerimist EGF-iga stimuleeritud rakkudes. Samuti näidati, et tuuma paiknenud Akt on FLNa-d ekspresseerivates rakkudes seriinil 473 fosforüleeritud ja tuuma paiknemiseks on oluline EGFR-i ja PI3K aktiivsus. Kinnitamaks Akt-i fosforüleerimise olulisust selle tuumalokalisatsiooniks on vajalikud edasised katsed. Kinaasi *assay*'s näidati, et EGF-iga stimuleeritud FLNa-d ekspresseerivates rakkudes on Akt-i katalüütiline aktiivsus kõrgem. Valgukomplekside immunosadestamisest selgus, et mehhanism, mis tagab Akt-i paiknemise tuuma FLNa-d ekspresseerivates rakkudes, ei sõltu interaktsioonist FLNa ja Akt-i vahel ning tuuma translokatsiooni määravad teised FLNa-st sõltuvad mehhanismid. Kinnitamaks, milline FLNa osa on vajalik Akt-i tuumalokalisatsiooni vahendamises on vaja teha korduskatsed 1-8+24, 8-15+24 ja 16-24 ekspresseerivate M2 rakkudega.

Töös leiti, et EGFR-i poolt aktiveeritud ERK1/2 ko-lokaliseerub FLNa-ga M2F rakkude membraanis ning et selleks on vajalik EGFR-i ja PI3K aktiivsus. Kollageenil moodustuvad FLNa-d ekspresseerivates rakkudes FA-d, mis EGFR-i stimulatsiooni järel katkevad EGFR-i ja PI3K katalüütilisest aktiivsusest sõltuvalt, ning rakkude morfoloogia ja aktiini organiseeritus rakkudes erineb olenevalt adhesioonisubstraadist ning FLNa ekspressioonist. Tuvastati ka võimalik integriini tüüpi kollageeni retseptorite vahendatud FLNa-st sõltuv EGFR-i transaktivatsioon.