

Transkriptsioonifaktor Gli3 ekspresseerub T rakkude pinnal

Bakalaureusetöö

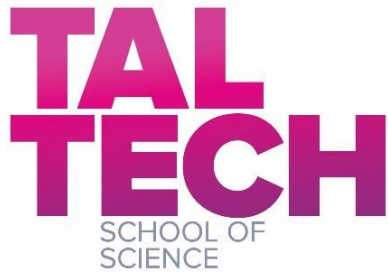
Üliõpilane: Priit Ties

Tudenginumber: 201366LAAB

Õppekava: LAAB17/20 - Rakenduskeemia ja geenitehnoloogia

Juhendaja: Sirje Rüütel Boudinot, PhD

Tallinn, 2025



Transcription factor Gli3 is expressed on the surface of T cells

Bachelor thesis

Student: Priit Ties

Student code: 201366LAAB

Study program: Applied Chemistry and Gene technology

Supervisor: Sirje Rüütel Boudinot, PhD

Tallinn 2025

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Priit Ties

16.01.2025

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.
Juhendaja: Sirje Rüütel Boudinot

16.01.2025

Töö on lubatud kaitsmisele.
Kaitsmiskomisjoni esimees: Indrek Koppel

Sisukord

Lühendite loetelu	5
Sissejuhatus koos töö eesmärgiga	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Signaaliülekanalid	7
1.2 Geeniekspressiooni mõjutavad signaaliülekanalid	8
1.3 Hedgehog signaalirada	8
1.4 Gli transkriptsioonifaktorite perekond	12
1.5 Gli3	13
1.6 mAb 5E1 ja scFv	14
1.7 Th rakkude alarühmad	14
2. Materjalid ja meetodid	15
2.1 Vereproovide võtmine	15
2.2. Inimese venoosse vere rakkude värvimine	15
2.3 Inimvere voolutsütomeetriline analüüs	15
2.4 Gli3 Westernblot kasutades mAb 5E1	15
2.5 Kasutatud statistilised meetodid	17
3. Tulemused	18
3.1 BD laboris ja TTÜ immunoloogia laboris saadud tulemused	18
3.2 Kloon 5E1 näitab positiivset värvingut Westernblotil	19
3.3 Gli3 membraanivärvingu suhtes positiivsed T rakud hiies	21
4. Arutelu	22
4.1 Järeldused	23
Tänuavaldused	25
Kasutatud kirjanduse loetelu	26
Annotatsioon	28
Abstract	29
Lisad	30

Lühendite loetelu

FACS – läbivoolutsütomeetria (ingl *flow cytometry*)

FITC – fluorestseiniisotiotsüanaat (ingl *fluorescein-5-isothiocyanate*)

Gli3- glioomaga seotud onkogeeni perekonna tsingisõrm 3 (ingl *glioma-associated oncogene family zinc finger 3*)

Gli3- FL- täispikk Gli3 valk (ingl *full length Gli3*)

Hh- hedgehog (ingl *hedgehog*)

mAb – monoklonaalne antikeha

NK-T – loomulikud T-tapjarakud (ingl *natural killer T cells*)

PBMC- perifeerse vere mononukleaarsed rakud

PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus (ingl *phosphate-buffered saline*)

PE – fukoerütriin (ingl *phycoerythrin*)

scFv- üheaheelaline muutuva fragmendiga antikeha (ingl *single-chain variable fragment antibody*)

Siglec – sialinhapet siduvad immunoglobuliini tüüpi lektiinid (ingl *sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*)

Tc – tsütotoksiline T-rakk (ingl *cytotoxic T cell*)

Th – T-abistajarakk (ingl *T helper cell*)

Treg – reguloorne T-rakk (ingl *regulatory T cell*)

WB- Western Blot

Sissejuhatus

2005 aastal valmistasid Tallinna Tehnikaülikooli teadlased monoklonaalsed antikehad transkriptsioonifaktori Gli3 repressiivse domeeni vastu ja veidi hiljem ka antikeha klooni 5E1 põhjal intrakeha rakusiseseks kasutuseks. Need tulemused avaldati aastatel 2007. [1] ja 2008. [2]

Aastal 2023 soovis Becton, Dickinson and Company (BD) Gli3 vastase antikeha ära osta. Selleks oli vaja läbi viia antikeha iseloomustamise korduskatsed nii BD laboris kui ka Tallinna Tehnikaülikooli immunoloogialaboris. BD soovis kontrollida antikeha töötamist eelkõige läbivoolutsütomeetria ja Western Bloti meetodite korral. Osa nendest korduskatsetest sai minu käesoleva bakalaureusetöö sisuks. Viisin läbi katseid kontrollimaks Gli3 avaldumist inimese perifeerse vere rakkudel ning hiire kudedes. Uue ja väga huvitava tulemusena selgus, et transkriptsioonifaktor Gli3 avaldus osadel inimese perifeerse vere T rakkudel.

Töö eesmärk

1. Teostada antikeha 5E1 iseloomustamise korduskatsed Tallinna Tehnikaülikooli immunoloogialaboris, et kontrollida selle klooni funktsionaalsust pärast 16-aastast vedelas lämmastikus olemist.
2. Viia läbi katsed kontrollimaks Gli3 avaldumist inimese perifeerse vere rakkudel ning hiire kudedes.

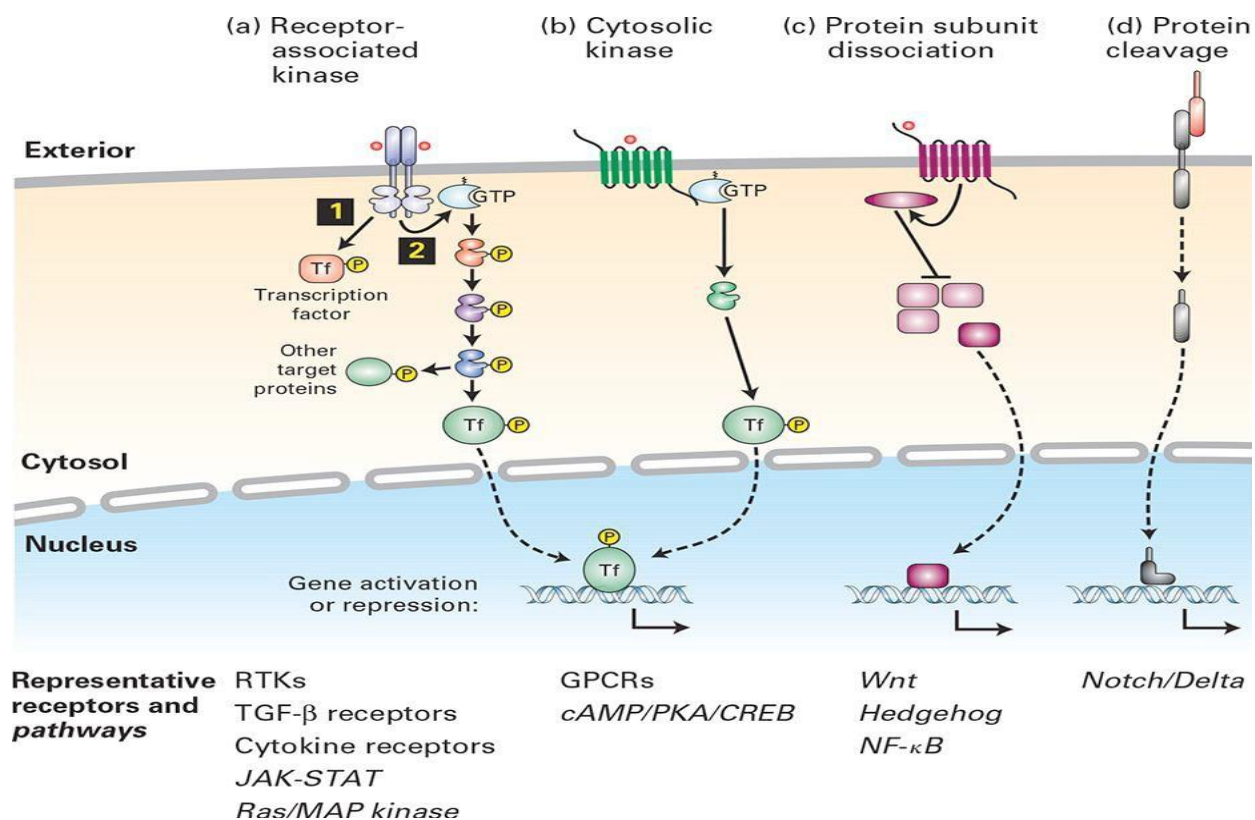
1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Signaaliülekanerajad

Rakkude võime võtta vastu membraani väliselt poolt tulevaid signaale ja nendele reageerida on tüüpiline ja tarvilik mehhanism organismide toimimiseks ja arenguks. Ka kõige lihtsamad rakud peavad vastu võtma ja vahetama bioloogilist informatsiooni. [3]

Bakterirakud saavad pidevalt uusi signaale membraanivalkudelt, mis toimivad info vastuvõtjate ehk retseptoritena. Need valgud saavad aru olulistest muutustest väliskeskkonnas nagu pH, rõhk jms. Samuti reageerimine toidu, valguse ja hapniku olemasolule või puudumisele. Lisaks konkurentide, vaenlaste ja mürkainete märkamise. Sellised rakuvälised signaalid tingivad prokarüootides asjakohaseid vastuseid nagu liikumine toidu poole või eemaldumine toksilistest ainetest. [3]

Kõrgematel organismidel on välja kujunenud spetsiaalsed süsteemid, mis tegelevad signaaliülekanedega. Rakust väljaspool liikuvate virgatsainete poolt tekitatud signaalid võib laias laastus jagada kolmeks lähtudes sellest, milliselt vahemaalt signaal toimib: kaugemale ulatuv endokriinne, rakkude vahetus lähedusel toimuv parakriinne või samale rakule toimiv autokriinne. Mõned rakkude membraanivalgud võivad toimida rakkudevaheliste kontaktide korral bioloogiliste signaalidena. [3]



Joonis 1. Signaaliülekanerajad, mis mõjutavad geeniekspressiooni- neli põhitüüpi.

Nagu jooniselt näha, kuulub Hedgehog rada nende hulka, kus transkriptsioonifaktor on rakusiseselt seotud suuremasse valkude kompleksi ja vabaneb sealt ligandi vabanemisel. [4]

1.2. Geeniekspressiooni mõjutavad signaaliülekanerajad

Neil signaaliülekaneradadel on neli põhitüüpi, mis annavad pikemaajalise tulemuse (Joonis 1). Nad on evolutsiooniliselt väga konserveerunud ning toimivad sarnaselt kärbsesest inimeseni. Ka nende uurimiseks kasutatakse erinevaid mudelorganisme (äädikakärbes, hiir, pärm, *C. elegans* eesti keeles: varbuss/sireuss). Geeniekspressiooni mõjutavate signaaliülekaneradade peamised funktsioonid on:

- muutused rakkude diferentsieerumises (rakkude jagunemine ja areng),
- muutused keskkonnas, mis tingivad rakkude kuju, metabolismi ja liikumise muutumise,
- immuunvastus – muutused immuunvastuses osalevate geenide ekspressioonis.

Mutatsioonid sellistes signaaliülekaneradades põhjustavad tõsiseid haiguseid – vähkkasvajaid, diabeeti, immuunsüsteemi haiguseid. Sama ligand (hormoon) võib aktiveerida/inhibeerida eri rakutüüpides erineva vastuse, kuna seal aktiveeritakse/inhibeeritakse erinevad geenid. [4]

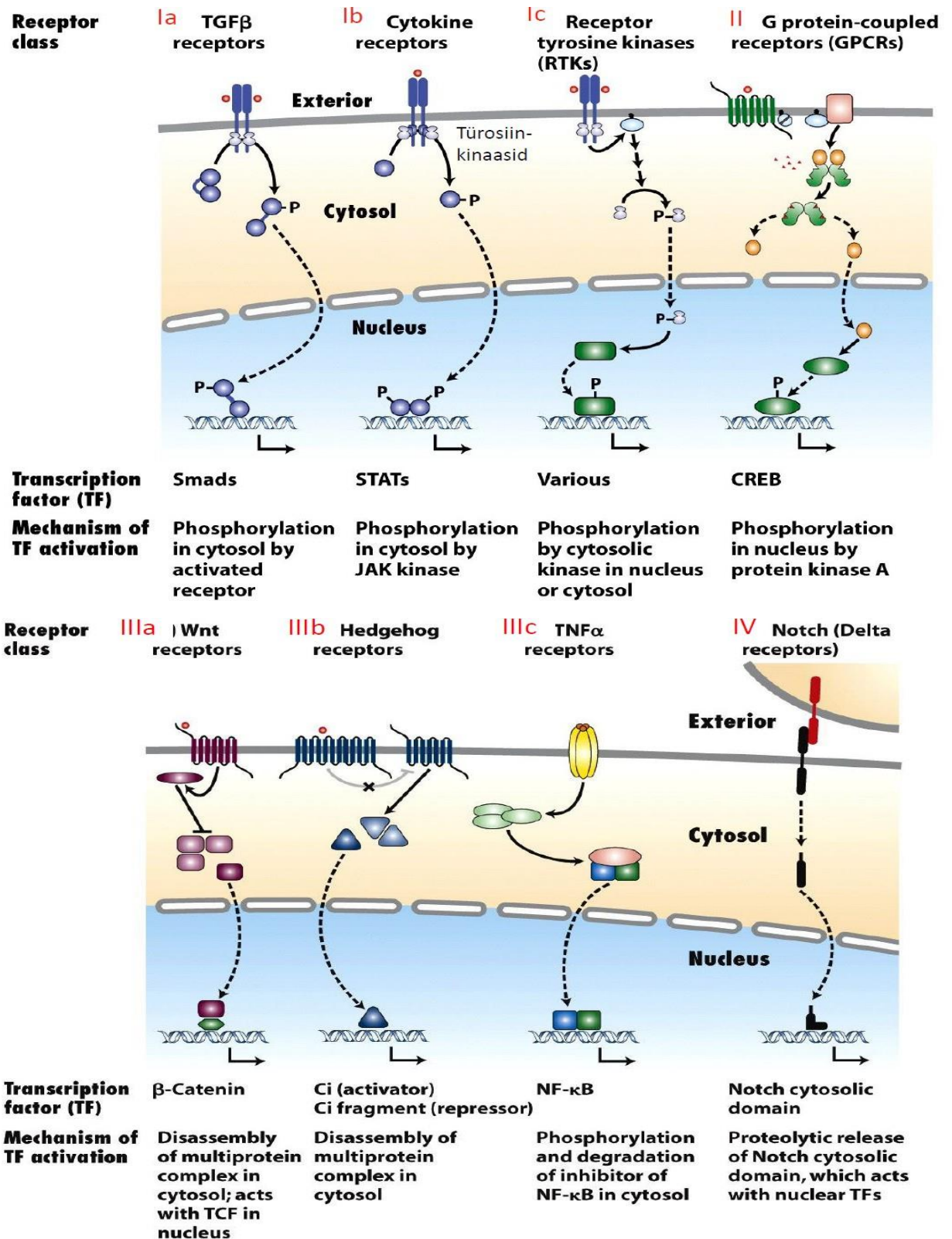
1.3. Hedgehog signaalirada

Hedgehog (Hh) signaali edastamisel osaleb kaks retseptorit: 7 korda membraani läbiva domeeniga Patched (Ptc) ja 4 korda transmembraanse domeeniga Smoothened (Smo) (Joonis 2). Hh signaaliraja aktiivsus on oluline selgroogsete peaaegu iga organsüsteemi normaalseks arenguks, sealhulgas närvisüsteemi arenguks, kopsude morfogeneesi, jäsemealgete moodustumiseks, parem-vasak asümmeetria tekkeks jne. Geenimutatsioonid Hh signaalirajas, kaasa arvatud mutatsioonid Hh ligandis ja Ptc valgus, võivad päädida erinevate vääringutega, sealhulgas holoprosentsefaalia (vääring sagedusega 1:250 rasestumisest, mille puhul embrüo eesaju ei arene kaheks poolkeraks, põhjustades kolju ja aju deformatsioonide tõttu loote emakasisest surma).

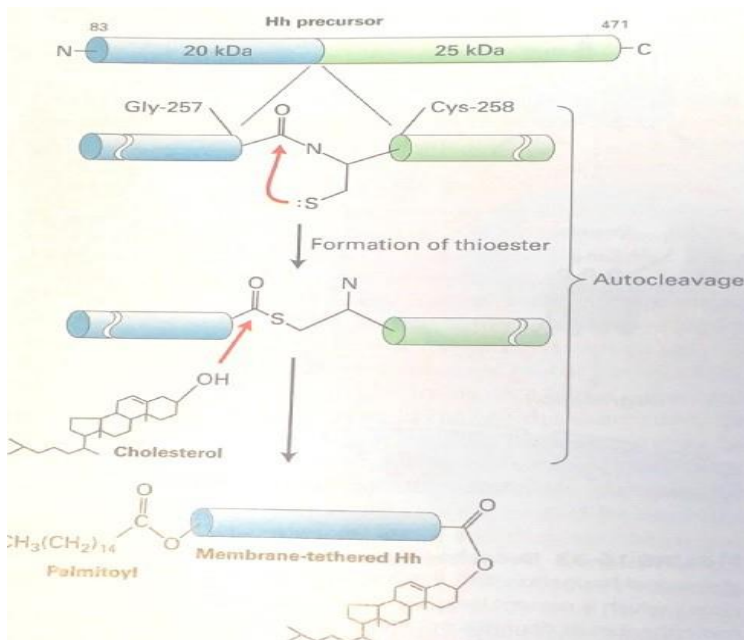
Hh valgud, sarnaselt transformeeriva kasvufaktori TGF β valkudega, sünteesitakse eellasvalguna, millel on autoproteolüütiline aktiivsus ning mille tulemusena lõigatakse eellasvalk endoplasmaatilises retiikulumis poole lühemaks (Joonis 3). C-terminaalne osa läheb lagundamisele. N-terminaalset fragmenti modifitseeritakse lisades selle C-otsa kolesterooli jääk ja N-otsa palmitaatrühm. Sääraselt lipiidiselt modifitseeritud Hh sekreteeritakse ning ta käitub rada aktiveeriva ligandina.

Selgroogsete Hh perekonnas on 3 liiget:

- *Desert hedgehog* (Dhh),
- *Indian hedgehog* (Ihh),
- *Sonic hedgehog* (Shh).

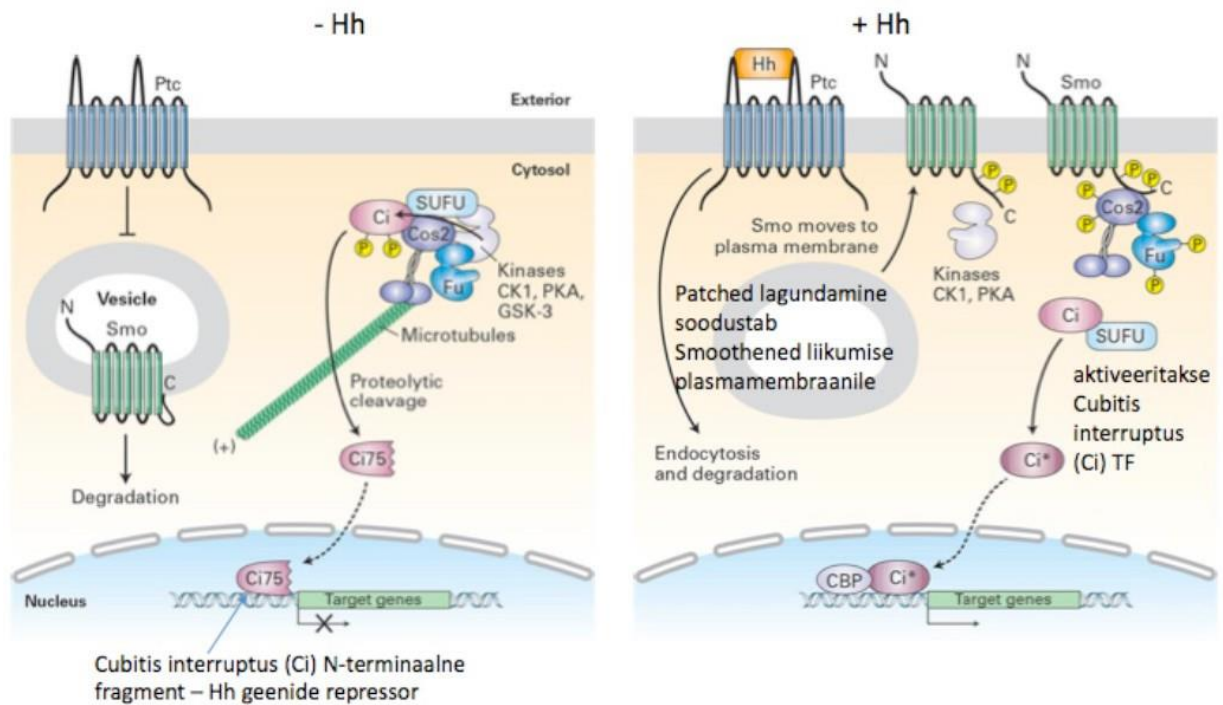


Joonis 2. Signaaliülekanderadu, mis mõjutavad geeniekspressiooni, on kaheksa alamtüüpi. [4]



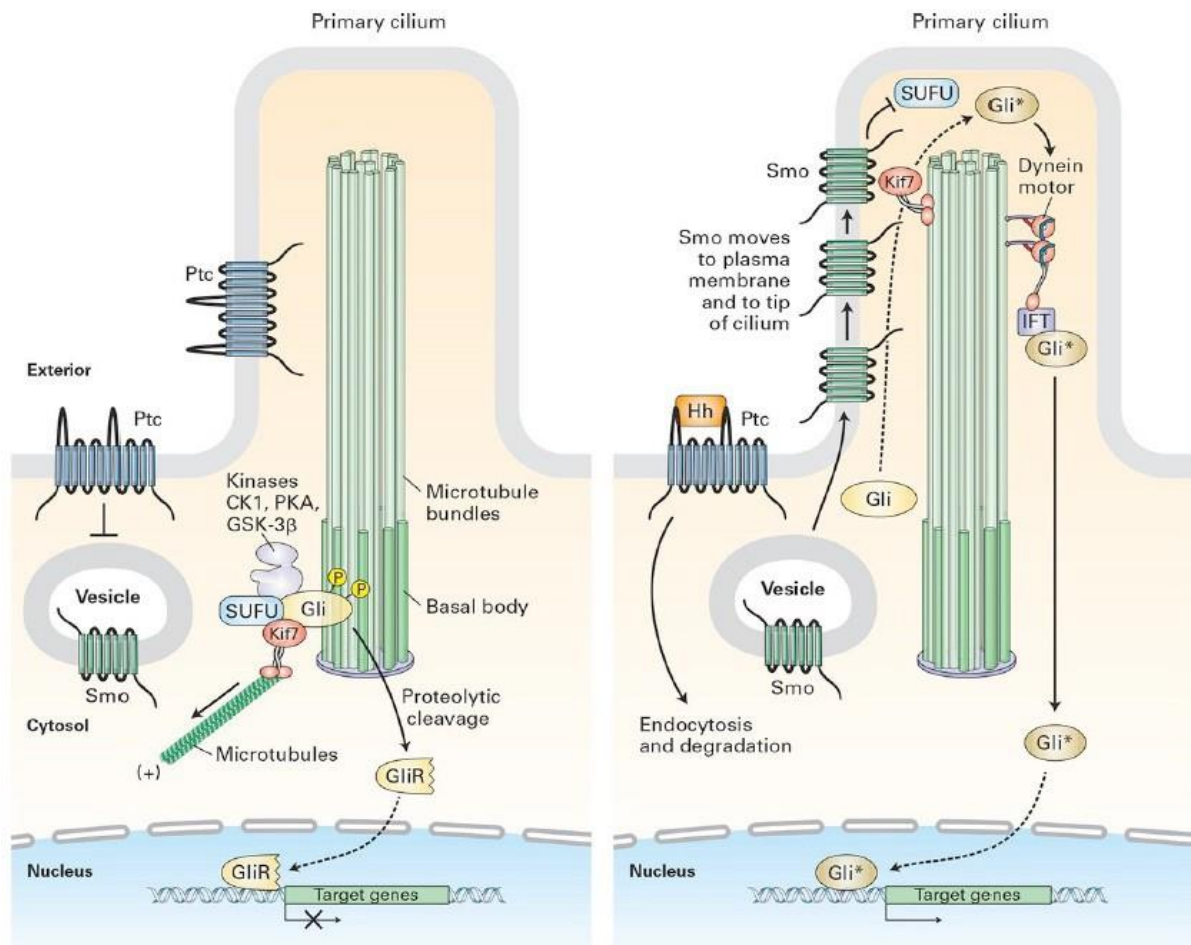
Joonis 3. Hh signaalvalgu süntees lähterakus. [4]

Prototüüp -Shh tuvastati Drosophilas, ja selle nimi "Hedgehog" (inglise keeles 'siil') tuleneb lühikesest ja ogalisest Hh mutantset geeni kandvate Drosophila vastsete kutiikula fenotüübist, mis sarnaneb siili ogadega. Ihh signaalirada on vajalik luukoe väljakujunemiseks. Dhh defektse ligandi puhul on isased hiired viljatud, sest nende sugurakud ei küpse korrektselt. Shh funktsioneerib nii lähisfääriliselt, kontaktsõltuvalt kui kaugsfääriliselt, olles difundeeruv morfogeen. Shh geenid on eri liikides, sealhulgas inimene, hiir, konn, kala ja kana, kõrgelt konserveerunud. Hiire ja inimese Shh valgud on aminohapete (aa) järjestuselt 92% ulatuselt identsed. Hh signaaliraja aktivatsioonil seob Shh ligand Ptc retseptorit, samas kui Smo funktsioneerib kui signaali edastaja. Ligandi puudumisel Ptc inhibeerib Smo'd takistades viimase translokatsiooni vesiikulitest raku pinnale, mistõttu Smo lagundatakse proteolüütiliselt (Joonis 4). See inhibitsioon omakorda viib transkriptsiooni repressori, näit. *Cubitus interruptus* (Ci) Drosophilas ja Gli valgud selgroogsetes, proteolüütilise protsessimiseni, mille tulemusel tekib N-terminaalne fragment, mis käitub tuumas kui märklaudgeenide transkriptsiooni repressor vastava ligandi olemasolul. [4]



Joonis 4. Gli toimimine äädikakärbses rakus. [4]

Ptc ja Smo omavaheline interaktsioon muutub, Smo ei ole enam inhibeeritud, liikudes raku pinnale. Täispikka Ci/Gli valku enam ei protsessita, see liigub nüüd tuuma ja funktsioneerib kui transkriptsiooni aktivaator. Hh ja Smo aktiivsuse märklaud-geenide seas on ka *Ptc* ja *wingless* (tagasisidestusmehhanism) (Joonis 4). Selgroogsetes teostatakse kontrolli Hh raja aktiivsuse üle primaarsete ripsmete ehk tsiilide (*primary cilia*) kaudu. Ripsmed on enamasti liikuvad väljasopistised (elundid), mis täidavad peamiselt liikumis- või toitumisülesannet. Nimelt, imetajate genoomis on 3 *Hh* geeni ja 2 *Ptc* geeni, mille ekspressioon erinevates kudedes on erinev. Samuti on imetajatel 3 *Gli* geeni. Hh signaali puudumisel paikneb Ptc primaarsetel ripsmetel ja Smo asub rakupinna lähedastes vesiikulites. Hh seondumisel Ptc retseptorile liigub Smo vesiikulist membraanile primaarse ripsme tipus, mille tulemusena kogu Hh/Ptc internaliseeritakse ja lagundatakse (6). Samaaegselt laguneb Gli protsessimise kompleks, ta aktiveeritakse (fosforüülides ja atsetüleerides) ning täispikka aktiveeritud Gli valguna liigub nüüd edasi tuuma, kus aktiveerib transkriptsiooni. [4]

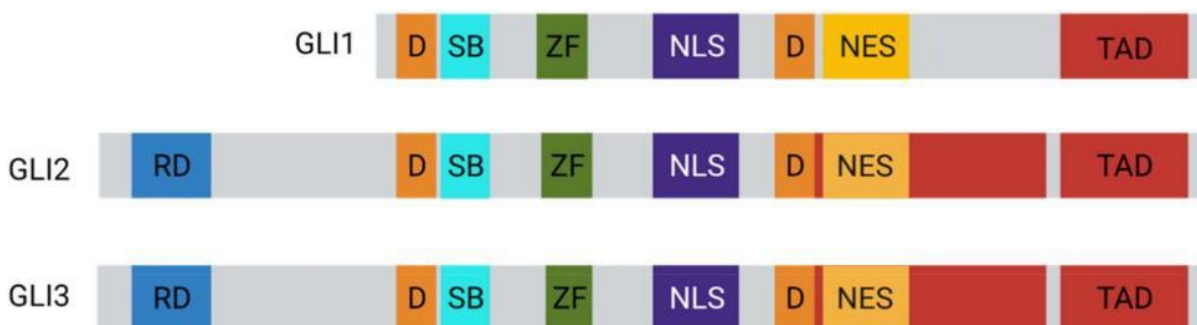


Joonis 5. Gli toimimine imetaja rakus [4]

1.4. Gli transkriptsioonifaktorite perekond

Hh/Gli signaaliraja käivitamine põhjustab transkriptsioonifaktorite Gli perekonna aktiveerimise, et muuta rakuvälise ligandi seondumine geeniekspressiooni vastuseks. Gli transkriptsioonifaktorite perekond võib suhelda üksteisega ja ka teiste kaasregulaatoritega, et reguleerida nende interaktsioonidega geneetiliste sihtmärkide spetsiifilisi alamhulki. Gli transkriptsioonifaktorite perekond on Krüppeli transkriptsioonifaktorite perekonna alamosa, millel on DNA sidumiseks väga konserveerunud tsink-sõrme domeen. Gli1–3 valgud omavad domeeni, mis sisaldab viit sellist sõrme suunaga valgu keskpunkti poole. Sõrmed 2–5 tunnevad ära ja seonduvad GACCACCA motiivi, puutudes kokku suure vaoga ja seonduvad DNA-ga. Esimene sõrm ei puutu DNA-ga kokku. Arvatakse, et tsinksõrmed võivad vahendada ka valkudevahelisi koostoimeid. Lisaks on igal Gli valgul tuuma lokaliseerimise signaal (NLS), tuumaekspordi signaal (NES) ja SUFU siduvad domeenid. Gli1 sisaldab C-otsas ühte aktiveerimisdomeeni ja Gli2/3 sisaldab C-otsas 2 aktiveerimisdomeeni, mis interakteeruvad transkriptsiooni aktivaatoritega, et levitada Gli transkriptsioonifaktorite perekonna transkriptsiooni aktivatsiooni efekte (Joonis 6). Kui kõik Gli1–3 sisaldavad C-terminaalset transaktivatsioonidomeeni, siis ainult Gli2 ja 3 sisaldavad N-terminaalset repressioonidomeeni, mis aitab kaasa nende aktiivsusele transkriptsiooni repressoritena. Gli valkudel on valdavalt tuumalokalisatsioon ja nad kasutavad nii NLS-st sõltuvaid kui ka sõltumatuid mehhanisme. Gli2 ja Gli3 sisaldavad kumbki kahte NLS-i, millest üks sõltub tuuma

impordi masinatest \ddot{y}/\ddot{y} -s, samas kui teine NLS on sellest masinast sõltumatu ja suhtleb selle asemel $\ddot{y}2$ impordiga. SUFU siduv domeen SYGH on Gli1–3 hulgas levinud ja on vajalik SUFU negatiivseks reguleerimiseks. SUFU seondumine selle motiiviga takistab NLS-i äratundmist Gli-s, toetades Gli tsütoplasmaatilist jaotumust. [5]



Joonis 6. Gli1–3 regulatoorsed ja valkudega interakteeruvad domeenid. Joonisel on näidatud translatsioonijärgsed modifikatsioonikohad ja interaktsioonid kaasregulaatoritega: Gli1–3 valgud ja nende asjakohased regulatoorsed järjestused ja valkudega interakteeruvad domeenid. RD (sinine) tähistab repressori domeeni, D (oranž) tähistab degroni järjestust, SB (helesinine) tähistab SUFU sidumissaiti, ZF (roheline) tähistab tsinksõrme domeeni, NLS (lilla) tähistab tuuma lokaliseerimise signaali, NES (kollane)) tähistab tuumaekspordi signaali ja TAD (punane) tähistab transkriptsiooni aktivaatori domeeni. [5]

GLI1 toimib eranditult transkriptsiooni aktivaatorina, samas kui GLI2 ja GLI3 sisaldavad nii aktivaatori kui ka repressori domeene. [6] Mitmes koes toimib GLI2 peamiselt transkriptsiooni aktivaatorina [7], samas kui GLI3 toimib transkriptsiooni repressorina. [8; 9]

1.5. Gli3

Transkriptsioonifaktor Gli3 on Hh signaaliraja liige, mis võib eksisteerida täispika (Gli3- FL) või repressorvormina (Gli3-R). Vastuseks Hh aktiveerimisele reguleerib Gli3-FL Hh geene, kasutades Gli1 promootorit. Hh signaali puudumisel fosforüleeritakse Gli3, mis viib selle osalise lagunemiseni ja Gli3-R tekkeni, mis represserib Hh funktsioone. Gli3 osaleb ka kudede arengus, immuunrakkude arengus ja vähi tekkes. Gli3 puudumine hiirtel kahjustab aju ja kopsude arengut ning Gli3 mutatsioonid inimestel on Greig tsefalopoolüsündaktüülia (GCPS) ja Pallister Halli sündroomide (PHS) põhjuseks. Immuunsüsteemis reguleerib Gli3 B-, T- ja NK-rakke ning võib olla seotud LPS-TLR4 signaaliülekanedega. Lisaks on leitud, et Gli3 on mitme vähi korral ülesreguleeritud ja et see soodustab vähktõve arengut läbi selliste protsesside nagu näiteks ankurdusest sõltumatu kasv, angiogenees, proliferatsioon ja migratsioon, välja arvatud ägeda müeloidse leukeemia (AML) ja medulloblastoomi korral, kus Gli3 omab vähivastast toimet. Lisaks on Gli3 mikroRNA sihtmärk. [6]

1.6. mAb 5E1 ja scFv

Sissejuhtuses mainiti hiire monoklonaalse antikeha (mAb) tootmist Gli3-e repressiivse motiivi (Gli3pRM) vastu. BALB/c hiired immuniseeriti puhastatud rekombinantse inimese GLI3pRM valguga ja nende hiirte põrnarakud liideti müeloomi rakkudega (SP2/0) kasutades standardseid hübriidoomi tootmiseks kasutatavaid tehnikaid. Saadud hübriidoomid, mis tootsid anti-Gli3pRM antikehi, skriiniti kasutades ensüümiga seotud immunosorbent analüüsi (ELISA) ja isotüpiseeriti. Saadud MAb 5E1 spetsiifilisus määrati selle aktiivsuse põhjal inimese NT2/D1 rakuliini Western blot (WB) analüüsiga ja ka immunofluorestsents analüüsiga. Selle põhjal võib öelda, et 5E1 on immunoglobuliin IgM/k ja see tuvastab spetsiifiliselt inimese rekombinantse Gli3pRM. Peale selle, et MAb 5E1 seondub nii täispika (Gli3-FL) kui ka lühikese valguga (Gli3-R), ei tekita ta ka ristreaktsiooni Gli2 sarnase RM piirkonnaga. 5E1 sobib ka Gli3 ekspressiooni tuvastamiseks hiire rakuliinides ja embrüonaalsetes kudedes. [1]

5E1 mAb basil valmistatud üheaahelaline muutuva fragmendiga antikeha (scFv) säilitab oma algse anti-Gli3 monoklonaalse antikeha seondumisvõime. Imetajarakkudes ekspresseerituna anti-Gli3 scFv kaaslokaliseerub intratsellulaarse Gli3-ga. Intrakeha immunotsütokeemilisel värvimisel Gli3-s positiivsel TM4 rakul on selge perinukleaarne tsütoplasmaatiline lokalisatsioon. Selline scFv kujutab endast kasulikku tööriista Hedgehog raja transkriptsioonilise regulatsiooni uurimiseks imetajates ja pakub lähtepunkti uudsete Gli-ga seotud terapeutiliste intrakehade väljatöötamiseks. [2]

1.7. Th rakkude alarühmad

CD4+ T rakud (Th/T abistajarakud) on kriitilise tähtsusega erinevate patogeenide ja vähivastase immuunvastuse juhtimisel, kuid võivad olla ka autoimmuunhaiguste, allergia ja kasvajate tekke põhjustajad. Naiivsed CD4+ T rakud polariseeruvad spetsialiseerunud Th raku alamrühmadeks, mis toodavad spetsiifilisi efektorsütokiine, et moduleerida immuunvastuseid:

Th1 rakud toodavad IFN γ , IL-2 ja TNF α ning koos kaasasündinud lümfoidsete rakkudega (ILC1) ja $\gamma\delta$ 1 T rakkudega juhivad I tüüpi immuunvastust, mis on oluline viirusevastase, antibakteriaalse ja kasvajavastase immuunsuse jaoks.

Th2 rakud koos ILC2-ga sekreteerivad IL-4, IL-5 ja IL-13, mis iseloomustab II tüüpi immuunvastust ja mis kaitseb rakuväliste patogeenide, näiteks parasiitsete helmintide eest.

Th17 rakud koos ILC3-ga ja $\gamma\delta$ 17 T rakkudega toodavad IL-17 ja IL-22, mis iseloomustab III tüüpi immuunvastust ja mis peamiselt kaitseb limaskestade pinnal toimuvate bakteriaalsete ja seen-infektsioonide eest. [10]

Treg (regulatoorsed T rakud) toimivad immuunvastuse pärssijate ja homöostaasi säilitajatena. [11]

Viimastel aastatel on tuvastatud uusi Th-alarühki, nagu Tfh, Th9 ja Th22 [12; 13], kuid neid ei ole veel uuritud seoses Hedgehogi signaaliraja ja Gli3 avaldumisega.

2. Materjalid ja meetodid

2.1. Vereproovi võtmine

Inimese veenivere proov võeti Põhja-Eesti Regionaalhaigla verekeskuse Ülemiste doonorikeskuses korralise vereproovi käigus loovutatud vere (25 ml) analüütilisest osast (8ml) TTÜ immunoloogia laboris tehtavate uuringute tarbeks (eetikaluba nr. 2855, väljastatud TTÜ Sirje Rüütel Boudinot'le 07.05.2019). Verevõtmine toimus käe veenipunktsiooni teel vastavasse verekotti ja sealt edasi steriilsesse BD Vacutainer EDTA verevõtukatsutisse (BD#367844). Vereproovi hoiti kuni rakkude isoleerimise ja värvimiseni +4 ° C juures.

2.2. Inimese venoosse vere rakkude värvimine.

Rakud värviti täisveres, sellisel värvimisel ei ole vajalik teha eraldi Fc retseptorite blokeerimist, kuna täisveres on palju immunoglobuliine. Veri jaotati 50 mikrolitri kaupa tuubidesse ja lisati iga värvimise kombinatsiooni jaoks vajalikud antikehad ja inkubeeriti 45 minutit toatemperatuuril pimedas. Fluorokroomidena kasutati kas FITC (fluorestsüanid) või PE (fükoerütriin), mis olid konjugeeritud kas mono- või polüklooraalsetele antikehadele. Kasutati järgmised antikehi: anti-h(inimese) CD4-FITC, anti-hCD8-PE, anti-hCD3-FITC, anti mouse Ig light chain kappa-FITC (Biolegend).

Th rakkude tuvastamiseks kasutati markeritena CD4-FITC (Biolegend, USA) ja CD3-PE (BD Biosciences, USA). Tc rakud tuvastati CD8-PE (Biolegend, USA) ja CD3-FITC (BD Biosciences, USA) abil. NK ja NK-T tuvastamiseks kasutati CD56-PE (BD Biosciences, USA) ja CD3-FITC värvimist. Eosinofiilid tuvastati Siglec-8-PE (Biolegend, USA) värvinguga.

Rakke värviti nagu Lisa 3 Tabelis 2 näidatud.

Peale inkubeerimist lisati samasse tuubi (kus olid veri ja antikehad) 1ml erütrotsüütide lüüsilahust (Becton Dickinson), mis lüüsib erütrotsüüte õrnalt hüpotoonilistes tingimustes, säilitades samal ajal leukotsüüdid ja inkubeeriti veerand tundi pimedas. Peale tsentrifuugimist (10 minutit 4000 p/min) ja supernatandi eemaldamist pesti sadet 1ml PBS abil ja tsentrifuugiti samadel tingimustel, mis eelmisel korral. Sademetele lisati igale 0,4 ml PBS ja seejärel analüüsiti rakke voolutsütomeetria abil.

2.3 Inimvere voolutsütomeetriline analüüs

Voolutsütomeetria viidi läbi BD FACS Caliburiga (FACSCalibur™) ja FACS-i andmeid analüüsiti tarkvara BD CellQuest Pro abil. Igast värvitud proovist analüüsiti 30 000 rakku. Kõik saadud tulemused salvestati edasiseks analüüsiks. Lisaks värvingule hinnati ka leukotsüütide suurust ja granulaarsust koos leukotsüütide liinispetsiifiliste markeritega, et tuvastada ja hinnata võimalikke rakulisi muutusi.

2.4. Gli3 Western Blot kasutades mAb 5E1

Inimese verest eraldati erütrotsüütide lüüsi abil leukotsüüdid kasutades 3.2 osas kasutatud meetodit. Eraldatud leukotsüüdid kasutati WB-l kohe või vajadusel külmutati kasutades külmutussegu, mis koosnes vasikaseerumist (FCS), mis sisaldas 7% dimetüülsulfoksiidi (DMSO).

Emane heterosügootne (AGAT+/-) hiir surmati servikaalse dislokatsiooni abil ja eraldati tüümus, põrn, emakas ja luuüdi mõlemast reieluust. Pehmetest kudetest nagu tüümus, põrn ja luuüdi eraldati rakud Perti tassil süstla kolvi abil, purustades kudet läbi rakufiltri. Emaka puhul lõhuti koe tükk (2mmx2mmx2mm) esmalt skalpelliga Petri tassil peeneks ja seejärel aeti samuti läbi rakufiltri. Saadud rakud koguti Petri tassilt kokku ja tsentrifuugiti 10 minutit kiirusel 1100 p/min. Seejärel lüüsi rakkude sade kasutades 100 mikrolitrit Fermentase lüüsipuhvrit (ProteoJET Mammalian Cell lysis Reagent "K0301). Lüüsitud rakke hoiti -20° C juures 1 kuu (kuni WB materjalid saabusid).

- 1 Inimese PBMC lüsaat (ctr1) 20 µl
- 2 Inimese PBMC lüsaat (ctr1) 20 µl
- 3 Inimese PBMC lüsaat (ctr1) 15 µl
- 4 Inimese PBMC lüsaat (ctr1) 15 µl
- 5 Hiire emakas 20 µl (Mammalian lüüs)
- 6 Hiire emakas 15 µl
- 7 Hiire põrn 15 µl
- 8 Hiire tüümus 15 µl
- 9 Hiire Luuüdi 15 µl
- M-prestained protein ladder

Rakulüsaadi kogus oli 15 või 20 mikrolitrit ja sellele lisati 4 mikrolitrit 5x Laemmli proovipuhvrit. Kasutati eelsoojendatud 5x Laemmli proovipuhvrit ja rakulüsaate kuumutati (koos 1 mikrolitri β -merkaptotoetanooliga) 10 minutit 100 °C juures enne geelile laadimist. Valgud lahutati kasutades laboris valmistatud 12%-list denatureerivat polüakrüülamiidgeeli.

12% separating gel	4% stacking gel
H ₂ O 4,4 ml	H ₂ O 3 ml
4* separating buffer 2,6 ml	4* stability buffer 1,25 ml
40% acrylamid 2,6 ml	40% acrylamid 2,6 ml
APC(1mg/ml) 100 µl	APC(1mg/ml) 100 µl
TEMED 5 µl	TEMED 10 µl

WB jaoks kasutati geeli jooksuks pinget 150 V. Edasi liigutati valgud geelilt nitrotselluloosi membraanile kasutades seadet Trans- Blot Turbo (Transfer System) püsival pingel ja voolul (1,3A 25V) 12 minutit. Siis membraan blokeeriti (Blok: 20 ml H₂O, 2ml 10xPBS, 1g lõssipulbrit) ja inkubeeriti 1 h toatemperatuuril, pesti 3 korda PBS-is ja pandi inkubeerima põhiantikehaga 5E1 üle öö külmikusse +4° C juurde. Teisel päeval tehti pesu 4x PBS Tween 0,2% a' 5min. Sekundaarne antikeha oli polüklooraalne kitse hiirevastane HRP (DAKO P0447) 1:1000 PBS-Tween 0,2% ja 5% kaseiinis 1h temperatuuril +4°. Seejärel oli taas pesu 4x PBS – Tween 0,2% a'10 min. Kemoluminestsentsi esilekutsumiseks kasutati ECL süsteemi SuperSignal West Femto vahekorras 500 mikrolitrit + 500 mikrolitrit.

Membraani värvimiseks kasutati Coomassie briljantsinist R-250.

2.5. Kasutatud statistilised meetodid

Kõik arvutused ja graafikud tehti andmetöötluse programmis MS Excel ning kasutati tulpdigrammi graafiku tüüpi. Võrdlusi populatsioonide vahel hinnati kui statistiliselt oluliselt erinev, kui p-väärtus oli väiksem kui 0,05 ja tulemuste põhjal statistiliselt väga oluliselt erinev, kui p-väärtus oli väiksem kui 0,01. Selleks kasutati t-test-i.

3. Tulemused

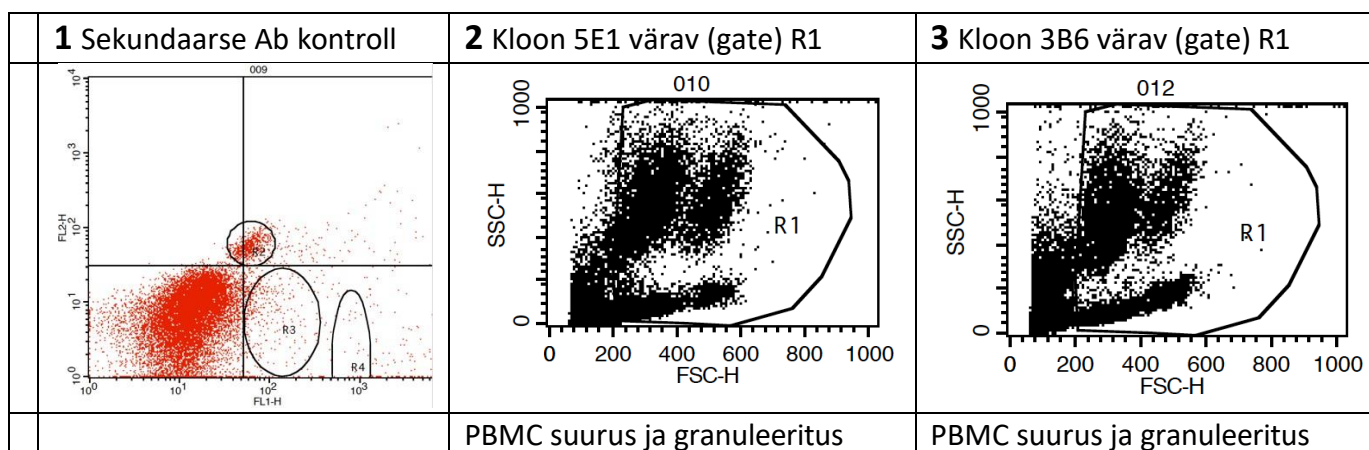
3.1. BD laboris ja TTÜ immunoloogia laboris saadud tulemuste võrdlus

Katse kordamiseks ja BD tulemuste reprodutseeritavuse testimiseks võtsime üles kõik kolm inimesevastast Gli3 kloni (5E1, 4G11 ja 3B6 – kõik IgM/k) ja kasutasime rakkude värvimiseks värsket hübriidomirakkude supernatanti lahjendamata kujul. Perifeerse vere mononukleaarsete rakkude (PBMC) doonoriks olid terved vabatahtlikud.

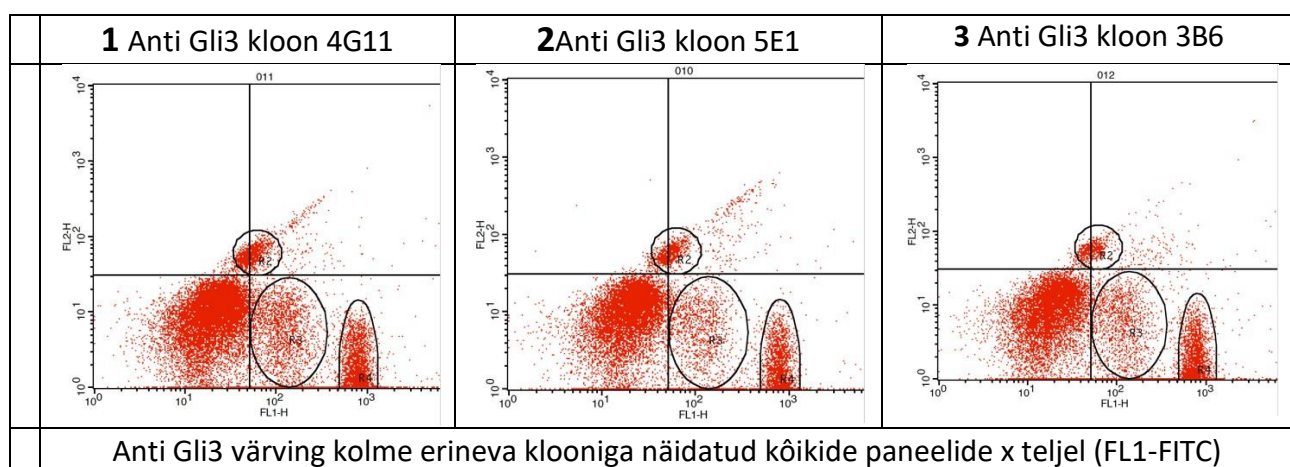
Joonisel 7 on näha, et kõik 3 Gli3 kloni värvivad samalt doonorilt pärinevat leukotsüütide populatsiooni kahe erineva tugevusega: nõrgalt värvunud rakkude populatsioon on tähistatud R3ga (Joonis 7B1 suur ring) ja tugevalt värvunud rakud R4ga (Joonis 7B1 parempoolne ellips). Kloni 4G11 R3=8,55%, R4=24,42%; kloni 5E1 R3= 6,78%, R4=26,9%, kloni 3B6 R3=8,01%, R4=29,88% kogu perifeerse vere leukotsüütide populatsioonist.

Hs Gli3 vastase antikeha kloonidega värvunud rakkude populatsioonide suuruseid, on tulemused suhteliselt sarnased BD laboris saadud tulemustele, kus kloni 5E1 värving T rakkudes näitas 24,34%. (Joonis 8 kolmas paneel). Lisaks T rakkudele värviti Gli3 vastase antikeha kloni 5E1 supernatandiga ka B rakud ja NK rakud (Joonis 8 esimene ja teine paneel).

A



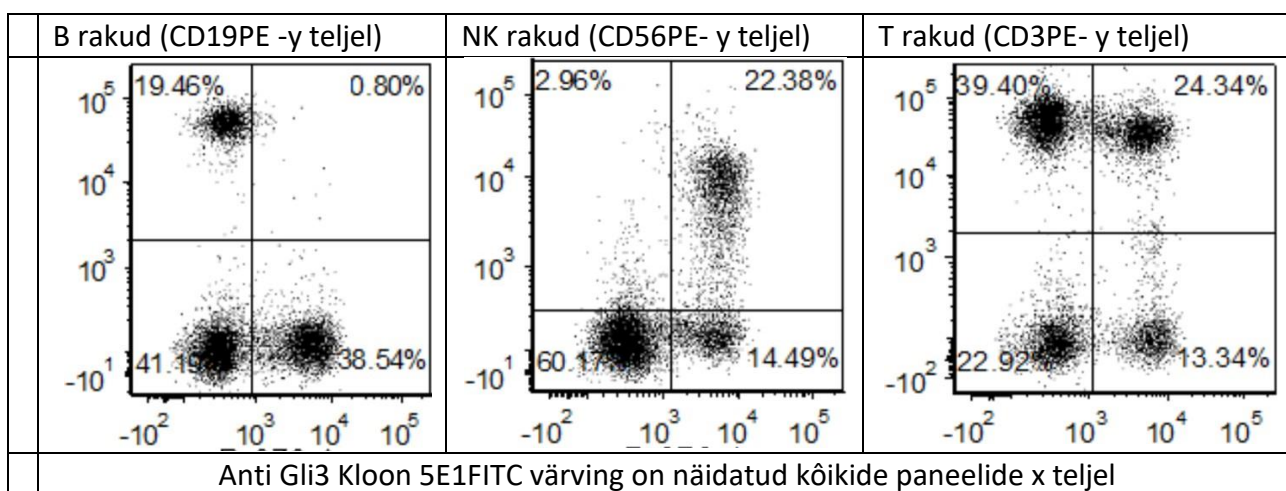
B



Joonis 7. FACS analüüsi tulemused: Gli3 värving inimese vere rakkudel (tulemused saadud Tallinna Tehnikaülikooli immunoloogia laboris)

A 1: Inimese perifeerse vere leukotsüüte värviti kontrolliks ka ainult sekundaarse antikehaga milleks oli FITC-konjugeeritud hiire IgM vastane polüklooraalne antikeha (Nordic Biosite). A2 ja A3: Kloonide 5E1 ja 3B6 värvava R1 valik kaasates nii monotsüüdid kui kahe erineva suurusega neutrofiilide populatsioonid. Leukotsüütide suurus on näidatud x-teljel ja granulaarsus y-teljel.

B: Inimese perifeerse vere leukotsüüdid värvitud anti-Gli3 antikeha kloonide 4G11, 5E1 ja 3B6 (B1-B3) ja sama sekundaarse antikehaga, mille kontrollvärving on toodud paneelil A1. Kontrollvärving näitas 2 kuni 4% difuusset värvimist (Joonis 7A1), mis erines selgesti inimese Gli3-vastasest värvimisest PBMC-rakkudes.



Joonis 8. FACS analüüsi tulemused: Gli3 värving inimese vere rakkudel (BD laboris saadud tulemused). BD laboris inimese perifeerse vere lümfotsüüte B raku, NK raku ja T raku liinispetsiifiliste markeritega saadud tulemused näitavad, et kõik NK rakud ja osa inimese T rakkudest on Gli3-positiivsed.

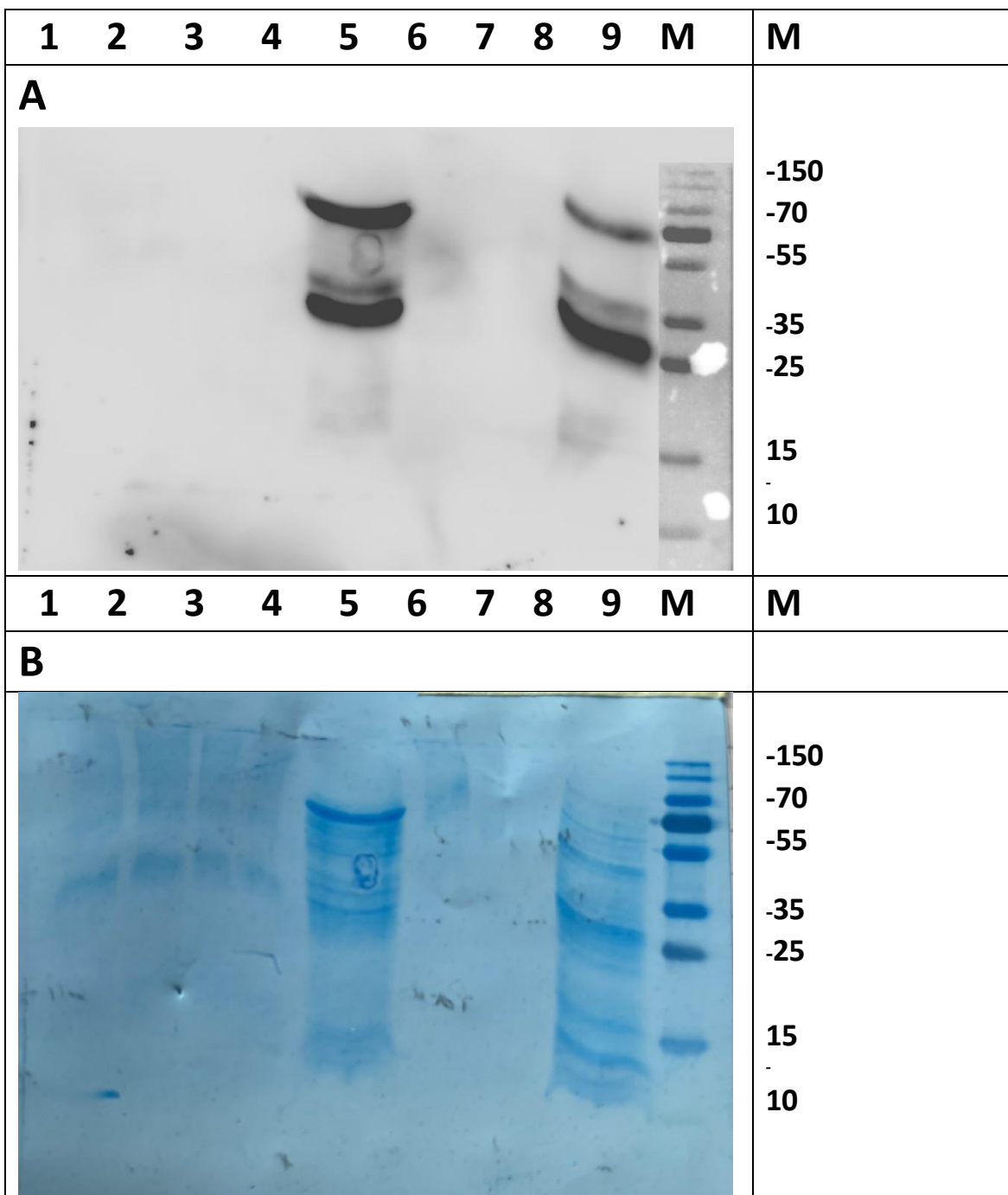
BD labor testis ainult klooni 5E1 ja selle värvingut inimese vere perifeersedel rakkudel (mida BD laboris esialgu plaaniti kasutada negatiivse kontrollina), mis värvis korduvalt osa (ca 24%) kõikidest T rakkudest. Gli3 värving T rakkudel näitas samuti nõrgema ja tugevama Gli3 ekspressiooniga T rakkude populatsioonide esinemist inimese perifeerses veres (Joonis 8).

Kokkuvõttes võib öelda, et BD laboris ja Tallinna Tehnikaülikooli immunoloogia laboris saadi sarnased üllatuslikud tulemused, mille kohaselt transkriptsioonifaktor Gli3 ekspresseerub osadel T rakkudel. BD labori ja Tallinna Tehnikaülikooli immunoloogia labori tulemused on Gli3 värvingu osas sarnased.

3.2. Kloon 5E1 näitab positiivset värvingut Western blotil

Selleks, et kontrollida Gli3 vastase mAb klooni 5E1 spetsiifilisust, otsustasime teha WB-i kudedest, kus Gli3 kindlasti ekspresseerub. Kuna ekspressioon oli näha inimese perifeerse vere rakkudel (ja muude kudede saamine inimeselt on väga keeruline), otsustasime WB-l kaasata inimese rakkude lüsaadid (Joonis 9A rajad 1-4) ja edasi hiirelt eraldatud koed, kus Gli3 ekspressioon oli varasemalt dokumenteeritud. Hiire kudede paigutus geelile on toodud joonisel 9 A: 5-emakas; 6-emakas; 7-põrn, 8-tüümus, 9-luuüdi. Nagu sama geeli Coomassi

värvingult on näha (Joonis 9B), on enamus radadel degradeerunud valk, ainult radadel 5 ja 9 on näha korralik lüsaat ja tõenäoliselt just selle tõttu saime WB-i positiivse signaali Gli3 värvingu osas ainult nendelt radadelt, kus oli degradeerumata valk (Joonis 9B rajad 5 ja 9).



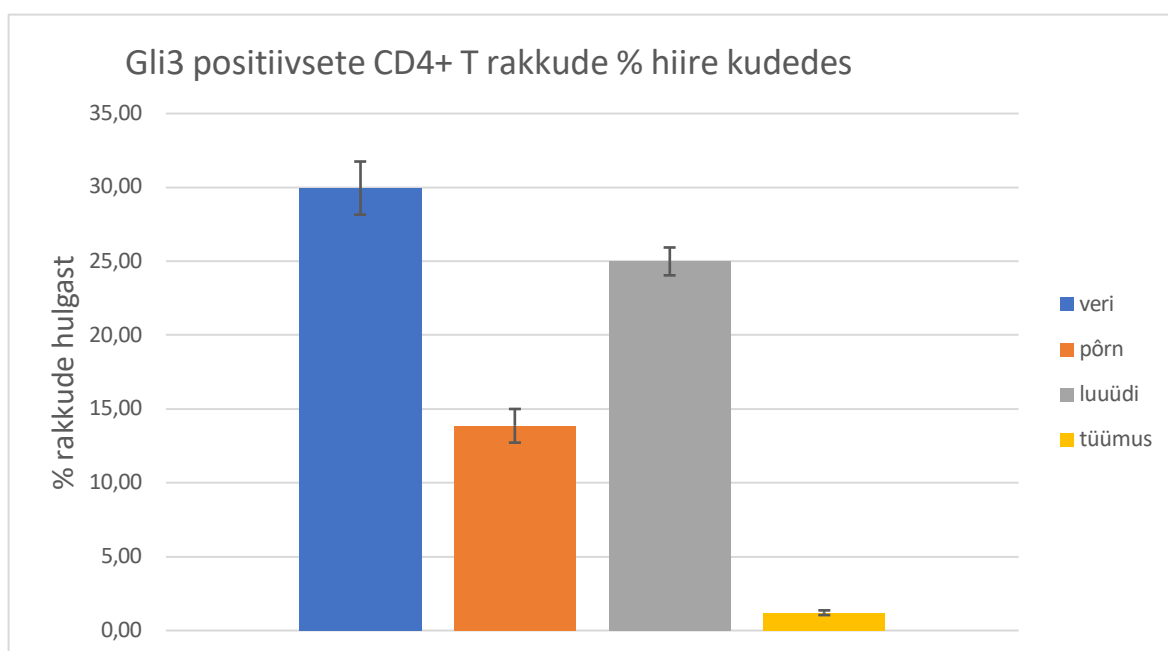
Joonis 9 A: Western blot SDS-PAGE 12%, B: Coomassi värv samast geelist Inimese PBMC lüsaadist rajad 1-4; edasi hiirelt eraldatud koed: 5-emakas; 6-emakas; 7-põrn, 8-tüümus, 9-luuüdi. Primaarne antikeha oli kloonis 5E1 supernatant, sekundaarne antikeha anti mouse IgM-HRP, Kemoluminestsents: ECL: SuperSignal West Femto.

Western blotil oli näha kahte valgu signaali kahel proovil, ülemine on umbes 70 kDa ja alumine umbes 30 kDa. See tulemus on kooskõlas Millipore'i andmetega, mis näitasid Western blot andmeid inimese harknäärme kohta, kus tuvastati Gli3 värvingul samuti kaks valgu signaali, neist peamine valgu signaal ~ 70 kDa juures ja nõgem ~ 30 kDa juures. Meie Gli3 ekspressiooni positiivsed proovid WB-l olid hiire emakast ja luuüdist (isoleeritud reieluust), kasutades materjalina emast heterosügootset (AGAT+/-) hiirt, ja näitsid samuti 70 kDa ja 30 kDa suuruseid valgusignaale.

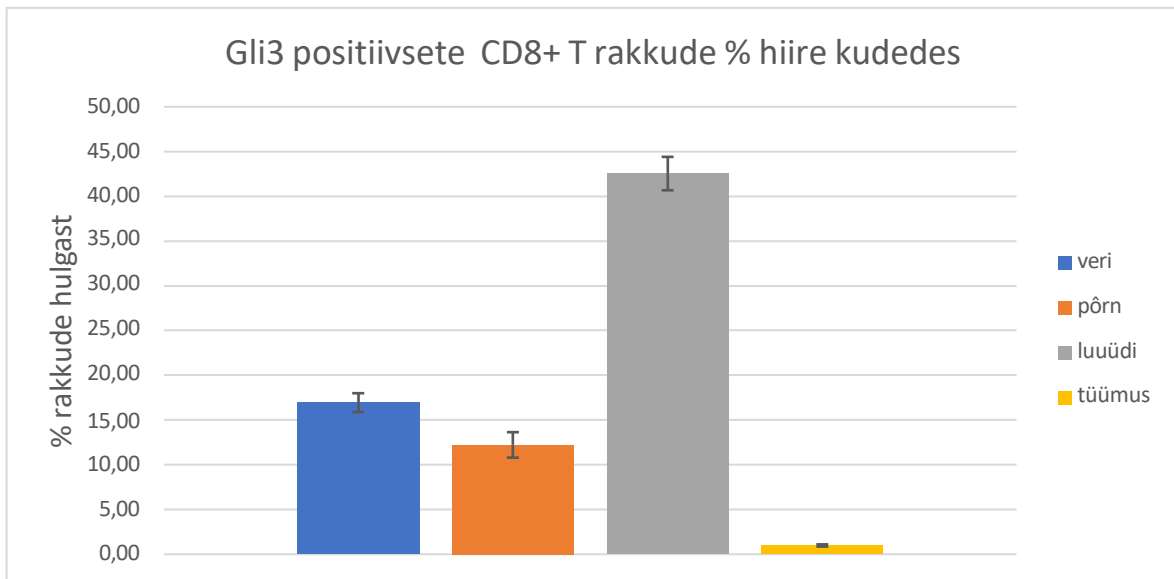
Kokkuvõttes võib öelda, et Kloon 5E1 näitab positiivset värvingut Western blotil hiire emakast ja luuüdist tehtud rakkude lüsaadis.

3.3 Gli3 membraanivärvingu suhtes positiivsed T rakud hiires

Et tuvastada Gli3 suhtes positiivsete rakkude osa hiire erinevates kudedes, tehti FACS värvingu jaoks rakkude suspensioon hiire verest, põrnast, luuüdist ja tuumusest. Gli3 suhtes positiivse membraanivärvingu andsid nii T abistaja (CD4+) kui tapja (CD8+) rakud eraldatud verest, põrnast ja luuüdist. Huvitaval kombel ei andnud tuumusest eraldatud rakkude suspensioon positiivset värvingu ei CD4+ ega ka CD8+ rakkude populatsioonides (Joonised 10 ja 11), kuigi Gli3 peaks tuumuses osalema T rakkude varajases arengus, kuid see protsess ilmselt ei vaja valgu ekspressiooni raku pinnal.



Joonis 10. Voolutsütomeetria analüüs hiire verest (sinine), põrnast (punane), luuüdist (hall) ja tuumusest (kollane) näitab Gli3 positiivsete rakkude hulka kõikidest T abistaja (CD4+) rakkudest antud organi rakkude suspensioonis.



Joonis 11. Voolutsütomeetria analüüs hiire verest (sinine), põrnast (punane), luuüdist (hall) ja tüümusest (kollane) näitab Gli3 positiivsete rakkude hulka kõikidest T abistaja (CD8+) rakkudest antud organi rakkude suspensioonis.

Kokkuvõttes võib öelda, et Gli3 membraanivärvingu suhtes positiivseid T rakke leidus hiire veres, põrnas ja luuüdis, aga mitte tüümuses.

4. Arutelu

Hedgehogi signaalirada on evolutsiooniliselt väga konserveerunud klassikaline raku ja rakkudevaheline kommunikatsioonitee, mis on kriitiline embrüonaalses arengus ja täiskasvanud kudede säilitamisel. GLI3 regulatiivne roll immuunsüsteemis hõlmab nii kaasasündinud kui ka adaptiivset immuunsust.

Mis võib olla Gli3 (või selle repressormotiivi) funktsioon osade T rakkude pinnal, seda võib uuringu praeguses etapis ainult oletada:

1. CD4+ T rakud on osa adaptiivsest immuunsüsteemist ja võivad polariseeruda erinevateks Th rakkude alarühmadeks. Th saatuse valik määratakse kindlaks pärast seda, kui naiivsed CD4+ T rakud puutuvad esmakordselt kokku antigeeniga, mille nende T raku retseptor ära tunneb. Adaptiivne immuunsüsteem, mis on evolutsiooniliselt palju noorem kui kaasasündinud, näib olevat kohandanud iidse Hedgehog signaaliülekanne CD4+ rakkude edasise saatuse määramiseks.

Huvitaval kombel on T rakkude ja antigeeni esitavate rakkude poolt moodustatud immuunsünaps morfoloogiliselt ja funktsionaalselt väga sarnane primaarsele ripsmele/tsiliumile (Joonis 4) ning on näidatud, et Hedgehogi signalisatsioon immunoloogilises sünapsis on T rakkude järgneva polarisatsiooni jaoks kriitilise tähtsusega. [14; 15] Kuna immunoloogilises sünapsis toimub sarnaselt primaarsele tsiliumile samuti Hedgehogi signalisatsioon, siis tõenäoliselt transporditakse sinna ka Gli valgud, mis sünapsi katkemisel võivad membraanile liikuda.

Sarnasused primaarse ripsme ja T rakkude immuunsünapsi vahel, samuti Hedgehogi hästi aktsepteeritud roll raku saatuse otsuste kontrollimisel paljudes kudedes, muudavad Hedgehogi atraktiivseks signaalirajaks uurimaks CD4+ T abistaja rakkude polarisatsiooni ja sellele järgnevat raku saatuse valikut.

2. Võimlik, et Gli3 on vajalik Th2 tüüpi rakkude polarisatsiooniks?

On näidatud, et inimese Th0-kultuurid sekreteerivad Shh-ga töötlemisel supernatantides kõrgemaid IL-2, IL-10 ja IFN γ tasemeid [16; 17], eeldades Th1 suunavalikut. Kui uuriti Th1 ja Th2 alarühmade polarisatsiooni transgeensetest Gli2A hiirtest pärinevate CD4+ T-rakkude puhul, mis kandsid potentsiaalset Hedgehogga „*in-of-function*“ fenotüüpi, toimus Th rakkude diferentseerumine *in vitro* Th2 suunas. [18]

Huvitav on see, et Th2 rakud on ainus Th-liin, mis ekspresseerib ise suurel määral Shh-d. [19] See tulemus on kooskõlas Prof. Standing'i grupi tööga, mis näitab, et eosinofiilid võivad eksogeensetele Shh-ligandidele reageerides IL-4 ekspressiooni üles reguleerida [20], sest IL4 on tsütokiin, mis orienteerib Th rakke Th2 suunas.

Kokkuvõttes pakub see potentsiaalselt alternatiivset mudelit, mille puhul endogeenne Hedgehogi signalisatsioon ei mõjuta Th2 liinide valikut iseenesest, kuid kui Th2 liinivalik on tehtud, siis Th2 rakud eritavad Shh-d, mis paneb eosinofiile täiendavalt IL-4 tootma, mis omakorda juhib 2-tüüpi immuunvastust *in vivo*.

3. Võibolla on Gli3 membraaniekspressioon vajalik Th17 rakkude polarisatsiooniks?

Th rakkude polarisatsiooni korral on ka Th17 rakuliin, mis ekspresseerib kõiki Hedgehogi signaaliülekande transduktsiooniks vajalikke põhikomponente (Ihh ligand, Ptch, Smo ja kõiki Gli (1-3) transkriptsioonifaktoreid). [19] Kuid Th17 rada aktiveerub ainult siis, kui nii IL-6 kui ka TGF β ekspresseeruvad samaaegselt ja toimivad „kooskokkupuute detektorina“, et tagada ja hoida Th17 polarisatsiooni. [21]

Prof. Hanna grupi uuring näitas et Hedgehogi *knockout*-hiired on kaitstud koliitide eest Th17 rakkude polarisatsiooni ja infiltratsiooni vähenemise tõttu käärsooles ja samas ka Th17 rakkude transdiferentseerumine Th1 rakkudeks oli selles mudelis blokeeritud. [19]

Järelikult Hedgehogi rada koos Gli valkudega võib kontrollida „Th-plastilisust“, mille puhul Th rakud on võimelised transdiferentseeruma ühest Th alamliigist teise.

On teada, et Hedgehogi signalisatsioon kontrollib Th17 polarisatsiooni raku siseselt transkriptsioonifaktor Gli3 kaudu. [19] Gli3 on uus Th17-i suunav transkriptsioonifaktor, mis reguleerib Th17 polarisatsiooni koos juba tuntud transkriptsioonifaktoritega nagu ROR γ t, ROR α ja STAT3. [22] Võimalik, et sarnane regulatsioon toimub ka ILC3- ja $\gamma\delta$ 17 T rakkudes.

4. Kuna luuüdi on paljude T mälurakkude resideerumiskoht ja FACS hiire luuüdist näitas positiivset värvingut, siis võib Gli3/Gli3R olla mälurakkude homöostaasi hoidja.

4.1. Järeldused

1. BD laboris ja Tallinna Tehnikaülikooli immunoloogia laboris saadi sarnsed üllatuslikud tulemused, mille kohaselt transkriptsioonifaktor Gli3 ekspresseerub osadel T rakkudel.

2. Klooni 5E1 näitab positiivset värvingut Western blotil hiire emakast ja luuüdist tehtud rakkude lüsaadis.

3. Gli3 membraanivärvingu suhtes positiivseid T rakke leitud hiire veres, põrnas ja luuüdis, aga mitte tüümuses.

Kliiniline tähtsus

Autoimmuunhaiguste patofüsioloogia mõistmine ja nende vastu võitlemiseks sihipärase ravi väljatöötamine on meditsiinis esmatähtis ülesanne. Autoimmuunhaiguste koormus suureneb kiiresti, kusjuures ainuüksi põletikulise soolehaiguse (IBD) aastane ülemaailmne koormus on hinnanguliselt üle miljoni invaliidsusega elatud aasta, mis on viimase 30 aasta jooksul rohkem kui kahekordistunud.

Võime moduleerida põletikulist mikrokeskkonda on peamine terapeutiline strateegia autoimmuunhaiguste vastu võitlemiseks. Arvestades Hedgehogi signaliseerimise laialdast rolli T rakkude diferentseerumisel ja autoimmuunse põletiku tekkel, on selle raja farmakoloogiline moduleerimine väga paljulubav ravivõimalus, eriti kui see võimaldaks T rakkude vastust suunata. [23; 24]

Seda arvesse võttes tuleb paljusid Hedgehogi signaliseerimise aspekte ja Gli3 ekspressiooni T rakkude bioloogias veel uurida, nagu näiteks

- I) signaaliülekanne põhilised molekulaarsed alused CD4+ T rakkudes,
- II) Hedgehogi raja olulisus teistes veel uurimata Th rakkudes nimelt Th9, Th22 ja Tfh,
- III) Hedgehogi signaliseerimise ja Gli3 ekspressiooni roll Th rakkude vahelise plastilisuse reguleerimisel,
- IV) Hedgehogi signaliseerimise funktsioon laiemalt Th17-ga seotud (tüüp 3) immuunvastuses, sealhulgas need, mida vahendavad ILC3-d ja $\gamma\delta$ 17 T rakud.

Tänuavaldused

Sooviksin tänada ja ka tänan Sirje Rützel Boudinot'd juhendamise ja võimaluse eest tegeleda põneva uurimisteemaga. Samuti kevadist laborikaaslast Caroline Khaddaj, kes asjakohaste märkuste, nõuannete ja juhendamisega WB osas oli suureks abiks.

Kasutatud kirjanduse loetelu

- [1] Hunt, R., Bragina, O., Drews, M., Kasak, L., Timmusk, S., Valkna, A., Kogerman, P. 293 and Jarvekulg, L. (2007) *Hybridoma (Larchmt)* 26, 131-9. 294
- [2] Laht S., Meerits, K., Altroff, H., Faust, H., Tsanev, R., Kogerman, P., Järvekülg, L., Paalme, V., Valkna, A. and Timmusk, S. (2008) Generation and Characterization of a Single-Chain Fv Antibody Against Gli3, a Hedgehog Signaling Pathway Transcription Factor. *Hybridoma* Vol. 27, No. 3
- [3] Kuuse S., Maimets T., et al. "Rakubioloogia" 2023 peatükk 5, lk.502-504.
- [4] Lodish *et al.*, "Molecular Cell Biology", 8. trükk, 2016, peatükk 16, lk.719-774.
- [5] Ashley N. Sigafos, Brooke D. Paradise and Martin E. Fernandez-Zapico Hedgehog/GLI Signaling Pathway: Transduction, Regulation, and Implications for Disease. *Cancers MDPI* 2021, 13, 3410. <https://doi.org/10.3390/cancers13143410>
- [6] Matissek and Elsawa. *Cell Communication and Signaling* (2020) 18:54 <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00540-x>
- [7] Ruppert, J. M., Kinzler, K. W., Wong, A. J., Bigner, S. H., Kao, F.-T., Law, M. L., Seunanez, H. N., O'Brien, S. J., Vogelstein, B. The GLI-Kruppel family of human genes. *Molec. Cell. Biol.* 8: 3104-3113, 1988. [PubMed: [2850480](#), [related citations](#)] [[Full Text](#)]
- [8] Laclef, C., Anselme, I., Besse, L., Catala, M., Palmyre, A., Baas, D., Paschaki, M., Pedraza, M., Metin, C., Durand, B., Schneider-Maunoury, S. The role of primary cilia in corpus callosum formation is mediated by production of the Gli3 repressor. *Hum. Molec. Genet.* 24: 4997-5014, 2015. [PubMed: [26071364](#), [related citations](#)] [[Full Text](#)]
- [9] Ruppert, J. M., Vogelstein, B., Arheden, K., Kinzler, K. W. GLI3 encodes a 190-kilodalton protein with multiple regions of GLI similarity. *Molec. Cell. Biol.* 10: 5408-5415, 1990. [PubMed: [2118997](#),
- [10] S. Jiang, C. Dong A complex issue on CD4(+) T-cell subsets *Immunol. Rev.*, 252 (1) (2013), pp. 5-11
- [11] S. Krishnarajah, B. Becher T(H) Cells and Cytokines in Encephalitogenic Disorders. *Front Immunol.*, 13 (2022), Article 822919
- [12] E. Schmitt, M. Klein, T. Bopp Th9 cells, new players in adaptive immunity *Trends Immunol.*, 35 (2) (2014), pp. 61-68
- [13] Q. Jiang, G. Yang, F. Xiao, J. Xie, S. Wang, L. Lu, D. Cui Role of Th22 Cells in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases *Front Immunol.*, 12 (2021), Article 688066
- [14] M. de la Roche, A.T. Ritter, K.L. Angus, C. Dinsmore, C.H. Earnshaw, J.F. Reiter, G.M. Griffiths Hedgehog signaling controls T cell killing at the immunological synapse *Science*, 342 (6163) (2013), pp. 1247-1250

- [15] M. de la Roche, Y. Asano, G.M. Griffiths Origins of the cytolytic synapse *Nat. Rev. Immunol.*, 16 (7) (2016), pp. 421-432
- [16] G.A. Stewart, J.A. Lowrey, S.J. Wakelin, P.M. Fitch, S. Lindey, M.J. Dallman, J.R. Lamb, S.E. Howie Sonic hedgehog signaling modulates activation of and cytokine production by human peripheral CD4⁺ T cells *J. Immunol.*, 169 (10) (2002), pp. 5451-5457
- [17] A. Ballester, A. Guijarro, B. Bravo, J. Hernandez, R. Murillas, M.I. Gallego, S. Ballester Hedgehog Signalling Modulates Immune Response and Protects against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis *Int J. Mol. Sci.*, 23 (6) (2022)
- [18] A.L. Furmanski, J.I. Saldana, M. Ono, H. Sahni, N. Paschalidis, F. D'Acquisto, T. Crompton Tissue-derived hedgehog proteins modulate Th differentiation and disease *J. Immunol.*, 190 (6) (2013), pp. 2641-2649
- [19] J. Hanna, F. Beke, L.M. O'Brien, C. Kapeni, H.C. Chen, V. Carbonaro, A.B. Kim, K. Kishore, T.E. Adolph, M.O. Skjoedt, *et al.* Cell-autonomous Hedgehog signaling controls Th17 polarization and pathogenicity *Nat. Commun.*, 13 (1) (2022), Article 4075
- [20] A.S.I. Standing, D.C. Yanez, R. Ross, T. Crompton, A.L. Furmanski *Frontline Science: Shh production and Gli signaling is activated in vivo in lung, enhancing the Th2 response during a murine model of allergic asthma* *J. Leukoc. Biol.*, 102 (4) (2017), pp. 965-976
- [21] K. Yasuda, Y. Takeuchi, K. Hirota The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases *Semin Immunopathol.*, 41 (3) (2019), pp. 283-297
- [22] E.R. Miraldi, M. Pokrovskii, A. Watters, D.M. Castro, N. De Veaux, J.A. Hall, J.Y. Lee, M. Ciofani, A. Madar, N. Carrero, *et al.* Leveraging chromatin accessibility for transcriptional regulatory network inference in T Helper 17 Cells *Genome Res.*, 29 (3) (2019), pp. 449-463
- [23] J.A. Harker, C.M. Lloyd T helper 2 cells in asthma *J. Exp. Med.*, 220 (6) (2023)
- [24] A. Basu, G. Ramamoorthi, G. Albert, C. Gallen, A. Beyer, C. Snyder, G. Koski, M.L. Disis, B.J. Czerniecki, K. Kodumudi Differentiation and Regulation of T(H) Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.*, 12 (2021), Article 669474

Annotatsioon

GLI geenid tuvastati esmakordselt inimestel, kui kõrge ekspressiooniga geenid inimese glioomides. [7] GLI3 on embrüogeneesis olulise hedgehog (Hh) signaaliraja transkriptsioonifaktor, mis osaleb ka kudede ja immuunrakkude arengus ning vähi tekkes.

Immuunsüsteemis reguleerib GLI3 B, T ja NK rakke ning võib olla seotud gramm-negatiivsete bakterite äratundmisega tolli sarnase retseptori 4 (TLR4) kaudu.

Hh ja Gli signaaliraja käivitamine põhjustab transkriptsioonifaktorite Gli1, 2 ja/või 3 valgu aktiveerimise, et muuta rakuvälise ligandi seondumine geeniekspressiooni vastuseks. Gli perekonna valkudel on valdavalt tuuma lokalisatsioon, kuid neid transporditakse ka plasmamembraani lähedal asuvasse primaarsesse ripsmesse, mis oma olemuselt sarnaneb väga immunoloogilise sünapsiga. [15]

TTÜ immunoloogia laboris tehti aastal 2005 Gli3 repressiivse domeeni vastased monoklonaalsed antikehad (mAb), aastal 2023 soovis Becton, Dickinson and Company (BD) ühe Gli3 vastas kloonid ära osta. Klooni kontrollimise käigus selgus üllatuslikult, et Gli3 avaldub inimese vere osade T rakkude pinnal. Minu bakalaureusetöö sisuks saidki osad nendest kontrollkatsetest, eesmärgiga kontrollida klooni 5E1 funktsionaalsust ja viia läbi katsed kontrollimaks Gli3 avaldumist inimese perifeerse vere rakkudel ning hiire kudedes. Minu töö käigus selgus, et nii BD laboris kui ka Tallinna Tehnikaülikooli immunoloogialaboris saadi sarnsed üllatuslikud tulemused, mille kohaselt transkriptsioonifaktor Gli3 ekspresseerub tõesti osadel (ca 25%) inimese T rakkudel. Lisaks töötas Gli3 vastane antikeha ka hiire WBs tundes ära vastava valgu nii hiire emakas kui luuüdis, kus Gli3 rakusisest ekspressiooni on varasemalt näidatud.

Gli3 valgu funktsiooni plasmamembraanil ei ole varem dokumenteeritud, kuid on näidatud, et Hh/Gli valgud esinevad immunoloogilises sünapsis ja sellele järgnevas diferentseerumises mitme T abistajaraku alapopulatsiooni puhul ning võivad olla seal homöostaasi hoidjad. Kuid ei ole välistatud ka et Gli3 ekspressioon on seotud tsütotoksilise funktsiooniga, kuna BD katsed näitasid, et Gli3 pinnaekspressioon esines kõigil NK rakkudel ja ei esinenud B rakkudel.

Kuna Gli3 on tänapäeval farmakoloogiliselt moduleeritav, võib meie avastus olla kliiniliselt tähtis, kuna just T rakkude diferentseerumisest oleneb paljude autoimmuunhaiguste patofüsioloogia.

Abstract

GLI genes were first identified in humans as highly expressed genes in human gliomas. [7] GLI3 is a transcription factor of the hedgehog (Hh) signaling pathway important for embryogenesis, which is also involved in the development of tissues and immune cells and the development of cancer. In the immune system, GLI3 regulates B, T, and NK cells and may be involved in the recognition of gram-negative bacteria via toll-like receptor 4 (TLR4). Activation of the Hh and Gli signaling pathway results in activation of the transcription factors Gli-1, 2 and/or 3 proteins to convert extracellular ligand binding into a gene expression response. Gli family proteins have a predominantly nuclear localization, but are also transported to the *primary cilium* near the plasma membrane, which is very similar in nature to the immunological synapse [15]. Monoclonal antibodies (mAb) against the repressive domain of Gli3 were made in the immunology laboratory of TUT in 2005, in 2023 Becton, Dickinson and Kompani (BD) wanted to buy a clone against Gli3. In the course of checking the clone, it was surprisingly revealed that Gli3 is expressed on the surface of a population of T cells in human blood. The contents of my bachelor's work were parts of these control experiments, with the aim of checking the functionality of clone 5E1 and conducting experiments to check the expression of Gli3 on human peripheral blood cells and mouse tissues. In the course of my work, it turned out that similar surprising results were obtained both in the BD laboratory and in the immunology laboratory of the Tallinn University of Technology, the transcription factor Gli3 is expressed in the certain population (about 25%) of human T cells. In addition, the anti-Gli3 antibody also worked in mouse WBs recognizing the corresponding protein in both mouse uterus and bone marrow, where intracellular expression of Gli3 has previously been shown. The function of Gli3 protein at the plasma membrane has not been previously documented, but it has been shown that Hh/Gli proteins are present at the immunological synapse and subsequent differentiation in several T helper cells subpopulations and may be homeostasis maintainers there. However, it is also not excluded that Gli3 expression is related to cytotoxic function, since BD experiments showed that surface expression of Gli3 was present on all NK cells and not on B cells. Since Gli3 can be pharmacologically modulated today, our discovery may be clinically important, since the pathophysiology of many autoimmune diseases depends on the differentiation of T cells.

Lisa 1.

Lisa rektori 07.04.2020 käskkirjale nr 1-8/17

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Priit Ties

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Transkriptsioonifaktor Gli3 ekspresseerub T rakkude pinnal,

mille juhendajateks on Sirje Rüütel Boudinot

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna
Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse
tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu,
sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse
kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

16.01.2025

Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingu tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.

Lisa 2.

Tabel 1. Hiire vere ja kudede FASC.

GLI3 positiivste ja negatiivsete T rakkude protsent hiire leukotsüütidest erinevates kudedes.

	veri				Gli+ rakkude % vastavate T rakkude populatsioonis	
	CD4+/Gli3+	CD4+/Gli3-	CD8+/Gli3+	CD8+/Gli3-	CD4+	CD8+
	8,24	16,81	1,40	8,03	32,89	14,85
	7,09	20,54	1,99	10,32	25,66	16,17
	6,96	17,13	1,46	8,09	28,89	15,29
	7,15	15,04	2,14	9,02	32,22	19,18
	6,23	19,32	2,18	8,16	24,38	21,08
	8,97	16,18	1,40	7,87	35,67	15,10
average	7,44	17,50	1,76	8,58	29,95	16,94
stdev	0,99	2,05	0,38	0,94	4,40	2,58
sem	0,40	0,84	0,16	0,38	1,80	1,05
	põrn				CD4+	CD8+
	3,53	18,32	2,64	12,33	16,16	17,64
	2,73	15,09	2,07	12,39	15,32	14,32
	4,32	22,65	1,32	12,21	16,02	9,76
	3,42	19,43	1,55	10,60	14,97	12,76
	3,02	24,40	1,06	12,45	11,01	7,85
	2,53	23,61	1,47	11,86	9,68	11,03
average	3,26	20,58	1,69	11,97	13,86	12,22
stdev	0,65	3,60	0,57	0,70	2,79	3,48
sem	0,26	1,47	0,23	0,29	1,14	1,42
	luuüdi				CD4+	CD8+
	7,09	23,26	2,34	2,68	23,36	46,61
	7,58	25,13	2,19	2,24	23,17	49,44
	7,86	22,39	2,23	3,26	25,98	40,62
	8,11	25,32	2,26	3,13	24,26	41,93
	7,49	23,83	1,90	2,99	23,91	38,85
	9,48	22,94	1,87	3,08	29,24	37,78
average	7,94	23,81	2,13	2,90	24,99	42,54
stdev	0,83	1,19	0,20	0,38	2,31	4,57
sem	0,34	0,49	0,08	0,15	0,94	1,87
	tüümus				CD4+	CD8+
	1,18	89,50	1,12	87,90	1,30	1,26
	1,00	86,43	1,24	91,60	1,14	1,34
	0,67	84,10	1,04	90,04	0,79	1,14
	1,39	85,24	0,56	85,61	1,60	0,65
	0,65	88,49	0,57	87,50	0,73	0,65
	1,43	85,42	0,73	84,96	1,65	0,85
average	1,05	86,53	0,88	87,94	1,20	0,98
stdev	0,34	2,07	0,29	2,54	0,39	0,31
sem	0,14	0,85	0,12	1,04	0,16	0,12

Lisa 3

Tabel 2. Inimese vere rakkude värvimise mahud ja materjalid-

sama skeemi järgi värviti rakud ka kloonide 4G11 ja 3B6 supernatate kasutades.

Proov nr.	Täisverd	Vereraku liini antikeha	Gli3 antikeha +sekAbFITC	Fluorokroom PE
1	100 µl	CD3 PE 7µl	5E1 5µl	7µl
2	100 µl	NK P44 7µl	5E1 5µl	7µl
3	100 µl	CD56 7µl	5E1 5µl	7µl
4	100 µl	CD8 PE 7µl	5E1 5µl	7µl
5	100 µl	Siglec 8 PE 7µl	5E1 5µl	7µl
6	100 µl	värvimata		
7	50 µl	CD3 PE 7µl	5E1 5µl	3,5µl
8	50 µl	NK P44 7µl	5E1 5µl	3,5µl
9	50 µl	CD56 7µl	5E1 5µl	3,5µl
10	50 µl	CD8 PE 7µl	5E1 5µl	3,5µl
11	50 µl	Siglec 8 PE 7µl	5E1 5µl	3,5µl
12	50 µl	värvimata		