

Annotatsioon

Sekreteeritav Shh ligand on morfogeen, mis inimese lootelises arengus ja täiskasvanud organismis tüvirakkude reparatsiooniks hädavajalik. Imetajates on Shh signaali vahendajaks Gli1, Gli2 ja Gli3 transkriptsioonifaktorid. Gli2 ja Gli3 valgud omavad nii aktivaator- kui ka repressordomeeni, kusjuures füsioloogiliselt on Gli2 kanda peamiselt aktivaatorroll, Gli3 aga repressorroll. Laboris varem tehtud katsetes leiti, et ainult GLI3-le omase unikaalse regiooni lisamine GLI2-le muudab selle tugevamaks repressoriks (Pata jt, avaldamata).

Antud töös püstitati eesmärgiks uurida erinevate GLI2 ja GLI3 aktivaator- ja repressorvormide ekspressiooni rakus mikroskoopia meetoditega. Konstrueeriti monomeerset RFP tagi sisaldavad GLI2A ja GLI2R ekspressiooniplasmiidid. Mõlemalt plasmiidilt kodeeritud liitvalgud andsid tugeva signaali immuunofluorestsentsmikroskoopias ja nende ekspressioonimustrid sarnanesid GLI2A-GFP, GLI2R-GFP ja FLAG-tagiga GLI2A ja GLI2R ekspressioonimustritele. Eri konstrukte võrreldi ka GLI-sõltuvas reporteranalüüsis, kus GLI2A-RFP näitas kõige madalamat aktiivsust.

Samuti uuriti läbi antud töö raames monomeerse GFP-tagiga ja FLAG-tagiga märgistatud GLI variantide lokalisatsiooni ja ekspressiooni ja seostati seda GLI-sõltuva reporteranalüüsi tulemustega. Nii GLI2UR-GFP kui ka GLI2UR-FLAG näitasid kõrgemat ekspressiooni taset võrreldes vastavalt GLI2R-GFP ja GLI2R-FLAG ekspressioonitasemetega, seega tõusis unikaalse regiooni lisamisega GLI2 ekspressioonitase ja/või valgu stabiilsus. Neid leidis ka palju väljaspool tuuma, see võib põhjustada nende GLI variantide s lokalisatsiooni kõrges esinemissageduses.

Antud töö tulemused viitavad sellele, et GLI variantide võimekus indutseerida reportergeeni/maha suruda GLI1 aktiivsust sõltub nii valgu lokalisatsioonist kui ka selle ekspressioonitasemest. Samuti võib monomeerse RFP tagi asukoht mõjutada GLI aktiivsust, vähemalt transientses katses. Leiti statistiliselt oluline HEK293 rakkude kuju muutus, mis oli põhjustatud GLI repressorite variantide üleekspressioonist.

Antud töö eesmärgid said täidetud. Täpsemate tulemuste saamiseks peaks kasutama automaatseid pilditöötlusprogramme ja testimise teisi GLI-sõltuva reporteranalüüsi tingimusi. Monomeersed GFP- ja RFP-tagitud GLI konstruktid võimaldavad edaspidi uurida Hh signaalirada kasutades rakkude eluskuvamist.