

Katsetingimuste optimeerimine Gli3 repressordomääni aktiivsuse uurimiseks Lutsiferaasi reportertesti meetodil

Margot Liidemann

Geenitehnoloogia Instituut

Juhendaja: *MSc* **Robert Tsanev**

Gli valgud on transkriptsioonifaktorid, mis vahendavad Sonic Hedgehogi signaaliraja toimet ja seega omavad olulist rolli nii embrüogeneesis kui täiskasvanud organismides. Gli3 valk omab kesksel rollil jäsemete arengus, samuti on seda seostatud pärilike haiguste ja vähiga. Gli3 funktsioneerib transkriptsioonilise repressorina, omades N-terminuses repressordomääni.

Antud töös tehti rida katseid, et välja selgitada optimaalsed katsetingimused Gli3 valgu repressordomääni uurimiseks läbi transfektsiooni ja sellele järgnevate luminomeetriliste mõõtmiste. Samuti taheti välja selgitada, kas mittetäieliku Gli3RD konstrukti Lutsiferaasi aktiivsust alandav toime tuleneb repressordomääni järjestusele lisatud PTD valgujärjestusest või ebasobivatest katsetingimustest. Leitud tingimusi kontrolliti transfekteerides rakkudes erinevaid Gli3RD konstrukte.

Korduskatsete käigus leiti, et Gli3RD transfektsiooni jaoks kõige sobivam DNA üldkogus on ligikaudu 600ng, sealjuures on optimaalseim efektor-DNA kogus 100ng ning reporter-DNA kogus 350ng. Eelpool mainitud tingimustel transfekteeriti rakkudes viite erinevat konstrukti, millest üks oli GliRD ning ülejäänud kontrollid, mis sisaldasid Gli3RD'd modifitseeritud kujul, või tühja vektorit.

Luminomeetrilistel mõõtmistel saadud andmed näitasid, et Gli3RD ja vähesel määral PTD-Gli3RD mõjutavad Lutsiferaasi aktiivsust. Samuti alandas näitajaid PTD-Gli3RD Δ 182, kuid mitte Gli3RD Δ 182 ilma PTD'ta. Kaks viimati mainitud konstrukti peaksid mõlemad olema mitteaktiivsed, kuna sisaldavad mittetäielikku repressordomääni järjestust. Seega võib väita, et PTD valgujärjestuse lisamine Gli3RD Δ 182'le põhjustab konstrukti

Lutsiferaasi represserivat mõju. Ilmselt ei tulenenud nähtus ebasobivatest katsetingimustest ning käesolevas töös leitud tingimusi võiks kasutada Gli3 repressordomääni uurimiseks Lutsiferaasi reportertesti meetodil.