

Lühikirjeldus

Aju-päritolu neurotroofne tegur (BDNF) omab olulist rolli nii närvisüsteemi arengus kui ka selle funktsioneerimisel täiskasvanud organismis. BDNFi iseloomustab keerukas geeniekspressioon, mis on sõltuv mitmest stiimulist, näiteks neuraalsest aktiivsusest ning signaliseerimisest läbi BDNFi enda retseptori TrkB. Üldiselt on BDNF geeni transkriptsiooni palju uuritud, kuid BDNF geeni distaalseid reguleerivad alad on kirjeldatud ainult paaris töös. Sellest tulenevalt otsustasime antud magistritöö raames uurida stiimul-sõltuvaid BDNF geeni enhanseralasid, mis osalevad neuraalsest aktiivsusest indutseeritud BDNF geeni ekspressioonis või TrkB signaliseerimisest sõltuvas BDNF geeni autoregulatsioonis roti primaarsetes kortikaalsetes neuronites.

Sobilike alade valimiseks kasutasime GeneGards andmebaasis leiduvat enhanseralade ennustust. Kuna GeneGardi ennustused põhinevad inimese genomil, kuid meie laboris on uuritavaks mudelsüsteemiks roti primaarsed neuronid, jälgisime me enhanseralade valimisel nii ala konserveerumist imetajates kui ka bioinformaatsiliselt ennustusel põhinevat tõenäosust, et antud alad on BDNF geeni enhanserid. Kokku valisime uurimiseks seitse potentsiaalset BDNF reguleerivat ala: -840 kb, -450 kb, -400 kb, -40 kb, +37 kb, +60 ja +240 kb. Kasutades eelnevalt avaldatud CHIP- ja RNA-sekveneerimise tulemusi, hindasime valitud potentsiaalsete BDNF enhanseralade konserveerumist, histoonimärgiseid, kahesuunalist enhanser-RNAde transkriptsiooni ning transkriptsioonifaktorite ja RNA polümeraasi seondumist. Enhansereid on iseloomustatud kui orientatsioonist sõltumatuid promootoreid ning on teada, et enhanserite aktiivsus korreleerub nende sihtmärkgeenide transkriptsiooniga. Seetõttu kloneerisime enhanseralad mõlemas orientatsioonis vahetult lutsiferaasi reportergeeni ette, transfekteerisime roti primaarseid kortikaalseid neuroneid vastavate reporterkonstruktiividega, töötlesime rakke KCl ning BDNF valguga ja hindasime vastavate alade käitumist promootoritena. -840 kb, -450 kb ja -40 kb enhanser-regioonid näitasid teistest tugevamat indutseeritavust stiimulite toimel. Et kontrollida nimetatud kolme enhanseralade endogeenset funktsiooni, kasutasime CRISPR/dCas9 repressiooni- ja aktivatsioonisüsteemi. Meie katse tulemustest selgus, et -450 kb ja -40 kb regioonid ei ole BDNF geeni enhanseralad, kuid -840 kb regioon on tõenäoliselt raku-, arengu- ning stiimulspetsiifiline BDNFi enhanser, mis osaleb BDNFi autoregulatsioonis mõnes teises rakutüübis peale kortikaalsete neuronite.

Käesoleva töö raames saadud tulemused vajavad edasist uurimist. Oluline on välja selgitada -840 kb regiooni olulisus BDNF geeni transkriptsiooni reguleerimises, eelkõige just BDNFi autoregulatsioonis ning seeläbi saada uusi teadmisi BDNFi ekspressioonist.