

CHARACTERIZATION OF PHOSPHODIESTERASE 6 AS A CANCER-RETINA ANTIGEN

Vojtěch TAMBOR

Abstrakt

Lidská fosfodiesteráza 6 je fyziologicky produkován pouze v buňkách sítnice lidského oka a hraje klíčovou roli v kaskádě dějů vedoucích k vnímání světla. Nedávný výzkum odhalil, že spolu s dalšími proteiny z této kaskády je α podjednotka této fosfodiesterázy exprimována také v nádorových buňkách kůže. Tato nová skupina proteinů, produkováných výhradně v sítnici oka a v buňkách nádorového bujení, byla nazvána cancer-retina antigens (analogie s cancer-testis antigens).

Cílem mé práce bylo charakterizovat expresi β podjednotky fosfodiesterázy 6 (PDE6 β) v melanomové tkáni a buněčných liniích.

Mé úkoly byly následující:

1. Charakterizovat expresi PDE6 β jak v nádorové tkáni a buněčných liniích melanomu, tak ve zdravé tkáni, na mRNA i na proteinové úrovni.
2. Generovat specifické polyklonální protilátky proti PDE6 β .
3. Prozkoumat vliv inhibitorů fosfodiesterázy a specifických PDE6 β protilátek na melanomové buněčné linie *in vitro*.

V této práci byly použity standartní molekulárně-biologické metody. Expese mRNA byla charakterizována pomocí PCR, produkce proteinů pomocí western blot analýzy. Základní metody používané při pěstování buněčných kultur byly využity při cytotoxických testech a MTT test byl použit pro hodnocení účinku testovaných látek na buněčné linie. Kromě toho byly použity i následující metody – ELISA, izolace RNA, produkce cDNA, gelová extrakce, sekvenování DNA a *in silico* metody.

Při analýze expese jsme odhalili nádorově specifickou mRNA splicing variantu PDE6 β . Překvapivě však bylo zjištěno, že navzdory této mutaci produkuje 77% zkoumaných buněčných linií plnohodnotný PDE6 β protein. Cílem dalšího výzkumu je vysvětlit tento rozpor a objasnit zmíněnou mRNA mutaci.

Generování polyklonálních protilátek proti PDE6 β bylo neúspěšné, pravděpodobně kvůli nízké imunogenitě použitých imunizačních peptidů.

Zkoumané inhibitory fosfodiesterázy překvapivě stimulovaly buněčnou proliferaci, namísto očekávaného cytotoxického účinku. Podle doposud provedených testů je tento jev doprovázen poklesem hladiny cGMP v buňce.

Aby bylo možné poznat a vysvětlit faktory vedoucí k výše popsaným výsledkům, je nutno provést další výzkum v této oblasti, který je již naplánován. Tato práce otevírá možnosti pro zkoumání nové, nádorově specifické, PDE6 β mRNA splicing varianty, stejně jako výzkum proliferativních účinků inhibitorů fosfodiesterázy a jejich mechanismů.