

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie

Kandidát: Ivana Šachová

Školitelé: PharmDr. Jan Martin, PhD., Dipl. Ing. Mgr. Ferdinand Molnár, PhD.

Název diplomové práce: Příprava strategie pro studium interakcí mezi konstitutivním androstanovým receptorem (CAR) a koaktivátorem steroidního receptoru 1

Cílem této práce byla exprese wild type a mutovaných centrálních domén lidského SRC1 v buňkách *E. coli* BL21 DE3. Exprimované rekombinantní proteiny byly následně čištěny a použity pro studium SRC1-CAR interakcí za využití separace pomocí afinitních ligandů (pull down).

Konstitutivní androstanový receptor (CAR), nukleární receptor, je transkripční regulátor, který ovlivňuje expresi nejrůznějších proteinů, jako jsou enzymy biotransformace a transportery významné pro metabolismus jak endogenních tak exogenních látek. CAR může být plně aktivní pouze v přítomnosti koaktivátorů jako je např. koaktivátor steroidního receptoru 1 (SRC1). Nejdůležitější fragment SRC1 pro vazbu na nukleární receptor je centrální doména, tvořená třemi  $\alpha$ -helickými Leu-X-X-Leu-Leu (LXXLL) L1, L2, L3 motivy, v nichž L reprezentuje leucin a X znázorňuje jakoukoli aminokyselinu. hSRC1, stejně tak hCAR, mohou být produkovány pomocí exprese příslušných genů v kmenech *E. coli*. V případě SRC1, kodon optimalizované wild type a mutované centrální domény lidského SRC1 s některými odstraněnými LXXLL motivy byly exprimovány pomocí *E. coli* BL21DE3 buněk. Oba exprimované proteiny, hSRC1 a hCAR, jsou nositeli 6xHis-tag pro umožnění čištění pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (iMAC) za použití nosiče TALON. Všechny exprimované proteiny kromě F $\Delta$ L2, který obsahuje motivy L1 a L3, ale neobsahuje motiv L2, byly schopny se v pull-down experimentech (separace pomocí afinitních ligandů) vázat na CAR. Vyšší afinita ke CAR byla pozorována u L2 v porovnání s motivy L1 a L3. Afinita ke CAR byla překvapivě pozorována i u mutanty  $\Delta$ All, ve které chybí všechny tři motivy. Ligandový efekt u CITCO, SO7662 a klotrimazolu nebyl v pull down experimentech pozorován.