

ABSTRAKT

Karlova Univerzita v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Autor: Lukáš Dušek

Supervisor: Ing. Lucie Křivčíková, Asist. Vid Mlakar, B. Sc. microbial., Ph.D.

Název práce: **Identifikace DNA sekvence vázané C/EBP a C/EBPb proteiny zapojené v expresi RANKL**

Osteoporóza, nebo také řídnutí kostí, je celosvětovým problémem v lidském zdraví, které neustále nabývá na významu. Johnell a Kanis ve své studii odhadli, že v roce 2000 došlo k více jak 9 miliónům osteoporotických zlomenin, což ve výsledku znamená 3 zlomeniny způsobené osteoporózou každou vteřinu [1]. Vzhledem k provázanosti kostní hustoty (BMD) s věkem a stárnutí světové populace je možné očekávat nárůst významu tématu kostního zdraví a osteoporózy zvláště. Objev osy osteoprotegerin (OPG) / receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK) / RANK-ligand (RANKL) v pozdních 90. letech vložil vědcům do rukou významný cíl budoucího zkoumání kostního metabolismu a odhalil zajímavá propojení s kardiovaskulárními chorobami, imunitním systémem, přežívání rakovinových buněk a kostnímu cílení metastáz.

Tato práce v sobě nesla jeden experimentální a dva teoretické cíle. Experimentálním a také primárním cílem bylo identifikovat transkripční faktory a vazebná místa v oblasti -662 až -438 od promotorové oblasti genu *RANKL* ovlivňujících jeho expresi. V teoretické části byla provedena identifikace léčivých látek v současnosti používaných k léčbě osteoporózy a seznámení s potenciálním vztahem této osy k různým zdravotním stavům.

K identifikaci vazebných míst byl použit plasmidový konstrukt pGI3-F3 s vloženou sekvencí promotoru genu pro RANKL, který po transfekci do buněk lidského osteosarcomu (HOS) řady CRL-1543™ vykazoval nejvýznamnější pokles exprese RANKLu v porovnání s jinými konstrukty pGI3. (*Mlakar-nepublikovaná data*). Norris Medical Library odhalila dvě potenciální vazebná místa v tomto plasmidu (A, B). Efekt mutací těchto vazebných míst byl měřen pomocí metody Dual Luciferase Assay a k identifikaci transkripčních faktorů, vázajících se na mutovaná místa byla provedena gelová zpomalovací analýza (EMSA) za pomoci protilátek proti faktorům GATA1, Lyf a C/EBPβ.

Při porovnání konstruktů řady F2 a F3 vedla mutace místa A (-512) a B (-502) vedla k 43.38% obnovení exprese RANKL a v druhém případě 19.06% obnovení. Výsledky ukazují, že na obou místech dochází k vazbě represoru exprese. EMSA potvrdila vazbu C/EBP β , ale nikoliv GATA1 k místu B a u místa A vyloučila vazbu Lyf. Zajímavý byl výsledek použití kompetitivních oligomerů místa B, kdy došlo ke snížení signálu celého komplexu, zatímco u kompetitorů místa A bylo pozorováno snížení intenzity pouze signálu horního. Kompetitivní oligomery nesoucí mutaci použité pro kontrolu specificity vazby nebyly schopny navázat biotinilované oligomery ani při 200 násobném přebytku.

Studie prokázala, že mutace místa A je schopna částečně obnovit expresi RANKLu. Efekt místa B nedosáhl hranice statistické významnosti. O to významnější se zdají výsledky EMSA, kdy místo B hrálo zásadní roli pro zformování celého komplexu, neboť výsledky poukazují na sekvenční mechanismus jeho vzniku, kdy místo A může být vázáno teprve tehdy, když místo B je již obsazené. Pravděpodobně zde dochází ke vzniku homo nebo heterodimeru C/EBP β . Byly tak pozorované konfliktní výsledky mezi funkčním testem a gelovou zpomalovací analýzou. Důvodem tohoto jevu může být případná nedostatečná síla mutace místa B. Dále byl vyloučen vliv faktorů GATA1 a Lyf na vazbu těchto dvou míst. Pro budoucí směřování a přezkoumání výsledků bylo navrženo použití protilátek C/EBP a vložení větší mutace do místa B.

- [1] Johnell, O., Kanis, J.A., 2006. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int*, 2006, **17**, 1726–1733.