

ABSTRAKT

MikroRNA jsou nekódující RNA navozující sekvenčně specifickou inhibici genové exprese na posttranskripční úrovni. MikroRNA představují hlavní skupinu malých endogenních RNA v savčích buňkách. V současnosti je známo více než 2500 lidských mikroRNA, které potencionálně regulují více než 60% lidských genů kódujících proteiny. MikroRNA se účastní většiny buněčných procesů a změny v jejich expresi byly popsány u různých patologií, včetně rakoviny.

V současnosti neexistuje žádná malá chemická sloučenina schopná efektivního ovlivnění aktivity dráhy mikroRNA. Nicméně, malé chemické sloučeniny představují skvělé nástroje pro výzkum procesů, ve kterých dráhy sekvenčně specifického umlčování RNA (RNA silencing) hrají roli. Navíc by mohly být využitelné i pro biotechnologické aplikace a mohly by mít i značný terapeutický potenciál. Tato práce je součástí širokého projektu, jehož konečným cílem je: (i) najít soubor malých molekul umožňujících stimulaci a inhibici drah sekvenčně specifického umlčování RNA a (ii) identifikovat případy, kdy se tyto dráhy vzájemně ovlivňují s jiných buněčnými drahami. Tato práce shrnuje výsledky prvních dvou fází projektu, vývoj vysoce výkonných metod testování s vysokou propustností a vysoce výkonné testování s vysokou propustností (high-throughput screening, HTS) dostupných knihoven malých sloučenin.

Abychom mohli monitorovat aktivitu dráhy mikroRNA, vyvinuli jsme a optimalizovali jednu biochemickou *in vitro* metodu založenou na měření změny fluorescence po modulaci aktivity enzymu Dicer a dále několik metod založených na měření změny luminiscence po modulaci dráhy mikroRNA přímo v buňkách. Naší strategií bylo získat data umožňující tříditi výsledky z HTS na základě různých parametrů tak, abychom mohli zohlednit například buněčně-specifické efekty, mikroRNA specifické efekty, popřípadě určit v jaké fázi jsou dráhy sekvenčně specifického umlčování RNA ovlivněny. S pomocí optimalizovaných metod byl proveden HTS ~30,000 malých chemických sloučenin. Kombinací dat ze všech HTS jsme získali desítky potencionálně zajímavých sloučenin, které je potřeba dále ověřit. Vybrané sloučeniny budou dále analyzovány řadou metod s cílem určit jejich farmakokinetické vlastnosti, místo jejich působení na dráhy sekvenčně specifického umlčování RNA a jejich regulační potenciál v různých modelových systémech.