

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát **Mgr. Petra Malátková**

Školitel **Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.**

Název disertační práce **Regulace exprese lidské karbonylreduktasy 3 (CBR3)**

Regulace exprese lidské karbonylreduktasy 3 (CBR3) byla až donedávna zcela neznámá a stále není plně objasněna. Transkripční regulace genu úzce souvisí s funkcí proteinu, který kóduje. Proto lze očekávat, že objasnění regulace CBR3 pomůže porozumět fyziologické funkci tohoto enzymu, která dodnes zůstává záhadou. Promotor genu CBR3 byl popsán v roce 2009. CBR3 promotor obsahuje několik potenciálních vazebných míst pro různé transkripční faktory. V roce 2010 jsme prokázali, že exprese CBR3 je regulována signální dráhou Nrf2/ARE. Šlo o první studii popisující transkripční regulaci CBR3. Zapojení Nrf2 do regulace CBR3 bylo nedávno potvrzeno studií jiného výzkumného týmu.

Funkční antioxidantní responzivní element (ARE) se nachází 2698 párů bází proti směru iniciace translace CBR3 (-2698ARE). Analýza promotoru CBR3 o délce 2500 párů bází nicméně naznačila přítomnost cis-regulačního elementu v sekvenci mezi 2500 a 500 párů bází proti směru transkripce. Zdá se tedy, že i jiný responzivní element než -2698ARE může regulovat CBR3. Protože promotor genu CBR3 obsahuje potenciální vazebná místa pro NFκB, může být CBR3 cílovým genem signální dráhy NFκB. Tuto hypotézu navíc podporují data z microarray analýz, která dokumentují zvýšení CBR3 mRNA v prozánětlivém prostředí. Teoretická část této disertační práce shrnuje dosavadní poznatky o lidských karbonylreduktasách. Úkolem experimentální práce bylo studium možného zapojení NFκB do regulace transkripce genu CBR3. Pomocí RT-PCR jsme zkoumali vliv aktivace a inhibice NFκB na množství CBR3 mRNA. Následně byl studován vliv aktivace NFκB na expresi proteinu použitím western blot analýzy. Posledním úkolem bylo prozkoumat úlohu potenciálních vazebných míst pro NFκB v transkripční regulaci CBR3.

Zjistili jsme, že exprese CBR3 mRNA je indukována v lidských nádorových buněčných liniích HT 29 a HepG2 prostřednictvím NFκB. Inkubace buněk HT-29 s TNF-α a buněk HepG2 s IL-1β ovlivnilo expresi CBR3 mRNA v závislosti na čase i na koncentraci. Odpověď v buněčných liniích HT-29 a HepG2 se značně lišila, a to jak v míře indukce CBR3 mRNA tak v jejím časovém průběhu. Zdá se proto, že regulace transkripce CBR3 je specifická pro buněčný typ. Metodou overexpresy vektorů kódujících podjednotky NFκB p65 a p50 bylo ověřeno, že indukční efekt na CBR3 mRNA je zprostředkován dráhou NFκB.

Zajímavým zjištěním bylo, že aktivace NFκB dráhy jednoznačně zvýšila hladinu CBR3 mRNA, ale tento efekt nekoreloval s expresí proteinu. Vystavení buněk HT-29 působení několika rozdílným koncentracím TNF-α způsobilo při různých časech inkubace jen nepatrné změny v expresi CBR3 proteinu. Metodou overexpresy NFκB podjednotek p65 a p50 se zvýšila exprese proteinu CBR3 jen mírně. Je často pozorováno, že množství mRNA a proteinu pro určitý gen spolu nekorelují. Příčinou nezvýšení exprese CBR3 proteinu může být regulace prostřednictvím miRNA.

V poslední části experimentální práce jsme určili oblasti promotoru CBR3, které regulují transkripci CBR3. Výsledky naznačují, že vazebné místo -1160NFκB je zodpovědné za konstitutivní aktivitu promotorového konstruktu CBR3 v buňkách HepG2. Vazebná místa -1160NFκB a -593NFκB mohou působit v přítomnosti aktivátorů NFκB jako funkční elementy zvyšující transkripci genu zprostředkovanou NFκB dráhou. Závěrem lze říci, že se podařilo prokázat zapojení signální dráhy NFκB do regulace genu CBR3.