

Abstrakt

Karlova Univerzita

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študent: Martin Svoreň

Školiteľ: PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Školiteľ-špecialista: Doc. Bernd Evert, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Analýza oblastí genómu viazaných a regulovaných ataxínom 3

Spinocerebelárna ataxia typu 3 (SCA3), známa tiež ako Machado-Josephova choroba, je dominantne dedičné neurodegeneratívne ochorenie. Je spôsobené mutantným proteínom ataxínom 3 (ATXN3), ktorý obsahuje abnormálne dlhý polyglutamínový segment kódovaný opakujúcim sa CAG kodónom. ATXN3 je schopný viazať DNA a interaguje s celým radom transkripčných faktorov. Tieto fakty poukazujú na priamu rolu ataxínu 3 v transkripcii. Je pravdepodobné, že mutantný ATXN3 spúšťa mnohé, vzájomne prepojené patogénne kaskády, vedúce k neuronálnej toxicite, no hlavný patomechanizmus zodpovedný za rozvoj tejto neurodegeneratívnej choroby na molekulárnej úrovni ostáva neznámy. Nedávno sa sekvenovaním imunoprecipitovaných chromatinových fragmentov viazaných ataxínom 3 podarilo identifikovať 16 genómových oblastí, ktoré boli za účelom potvrdenia prítomnosti väzby ataxínu 3 na DNA ďalej analyzované pomocou PCR. Zvýšenú väzbovosť špecifickú pre ATXN3 vykazalo 5 oblastí v blízkosti týchto génov: CCAAT/enhancer viažúci proteín delta (CEBPD), preiodický cirkadiálny clock-2 (PER2), fosfatázový a tenzínový homológ (PTEN), inhibítor serínových proteáz rodiny F2 (SERPINF2) a trombospondín-1 (THBS1). Tieto genómové oblasti boli následne vklonované do luciferázových reporterov za účelom preskúmania možného regulačného efektu sprostredkovaného ataxínom 3. Následne bol pripravenými reporterami transfekovaný divoký typ (wild type) a hemizigotný ATXN3-knockoutovaný podtyp bunkovej línie ľudského neuroblastómu (SH-SY5Y). V ďalšom kroku bola analyzovaná ataxínom 3 modulovaná luciferázová aktivita. V knockoutovanej bunkovej línie bol pozorovaný pokles luciferázovej aktivity sprostredkovaný ataxínom 3 v prípade genómových oblastí spojených s CEBPD a THBS1, naznačujúc, že ATXN3 sa viaže na tieto oblasti

genómu za účelom vystupňovania alebo udržania transkripčnej represie. V bunkách, ktoré nadmerne exprimovali normálny alebo mutantný ATXN3 bol taktiež pozorovaný regulačný efekt mediovaný jednotlivými izoformami ataxínu 3 v prípade CEBPD a THBS1, čo poukazuje na možný vplyv ataxínu 3 na transkripčú reguláciu spomínaných génov. Identifikované a analyzované oblasti ľudského genómu by sa mohli podieľať na patogenetických procesoch vedúcich k SCA3 manifestácii.