

Cecilia Aquino Perez, M. Sc.

Abstrakt doktorské disertační práce

V této doktorské práci jsme se zaměřili na nalezení a pochopení nových mechanismů řídících buněčný cyklus v normálních podmínkách i v kontextu buněčné odpovědi na různé formy stresu. Nejdříve jsme se zaměřili na studium Polo-like kinázy 3, která byla již dříve popsána v aktivaci kontrolních bodů cyklu v důsledku poškození DNA. Pomocí technologie CRISPR/Cas9 jsme cíleně inaktivovali gen PLK3 v lidských RPE buňkách a paralelně rovněž potlačili expresi PLK3 pomocí RNA interference. Hlavním pozorováním bylo zjištění, že PLK3 není nezbytná pro kontrolu buněčné odpovědi na poškození DNA, hypoxii a osmotický stres. Metodou hmotnostní spektrometrie jsme identifikovali fosfatázu PP6 a její regulační podjednotky PPP6R1 a PPP6R3 jako nové interakční partnery PLK3. Dále jsme pozorovali, že PLK3 je fosforylována na konzervovaném zbytku Thr219 a že deplece PP6 zvyšuje úroveň fosforylace PLK3 ovšem bez vlivu na její enzymatickou aktivitu. Tyto výsledky naznačují možnou regulaci funkce PLK3 prostřednictvím PP6 a biologická relevance tohoto pozorování bude předmětem dalšího studia. Dále jsme provedli transkriptomovou analýzu v lidských RPE-FUCCI buňkách s cílem nalézt potencionální nové regulátory buněčného cyklu. V dalším studiu jsme se zaměřili na Family with sequence similarity 110 member A (FAM110A), jehož exprese byla vysoká v G2 fázi buněčného cyklu a protein lokalizoval na pólech dělicího vřeténka v průběhu mitozy. Po depleci FAM110A jsme pozorovali poruchy kongrese chromozomů, oddálený přechod mezi metafází a anafází a porušenou orientaci dělicího vřeténka. Pomocí hmotnostní spektrometrie mitotického FAM110A jsme identifikovali kinázy CK1 ϵ a CK1 δ a cytoskeletální proteiny tubulin, actin, α/β -catenin a α -actinin jako nové interakční partnery FAM110A. Pomocí *in vitro* a *in vivo* experiment jsme prokázali, že CK1 δ interaguje s C-terminální částí FAM110A a fosforyluje oblast Ser-252-255. Tato modifikace FAM110A je nezbytná pro vazbu tubulinu a pro správnou organizaci chromosomů v průběhu metafáze. Rovněž interakce FAM110A s dalšími cytoskeletálními proteiny byla nezbytná pro kongresi chromosomů a dynamiku aktinu v průběhu mitozy. Tato pozorování naznačují možnou funkci FAM110A v propojení cytoskeletálních systémů v průběhu mitozy a dávají základ pro další výzkum.