

Abstrakt

Buněčná odpověď na poškození DNA (DNA damage response) představuje kriticky důležitou signalizační síť, která ochraňuje celistvost genomu a brání vzniku rakoviny. Studium odpovědi na poškození DNA má tudíž zásadní klinický význam a proteiny účastnící se této signalizace jsou slibnými cíli léčiv. Ačkoliv byly dosaženy značné pokroky v popisu interakcí jednotlivých proteinů této signalizace, stále potřebujeme lépe porozumět komplexnímu chování celé signální sítě. Jedním z přístupů, který nám v tomto může pomoci, je popsání dynamiky klíčových proteinů této signalizace v různých podmínkách. Prvním cílem této práce bylo popsat časovou dynamiku vybraných proteinů odpovědi na poškození DNA po různých genotoxických insultech, konkrétně po γ -ozáření a UV-C ozáření. Ukázali jsme, že zatímco určité proteiny jsou aktivovány v jednom spojitým pulzu, jiné vykazují aktivaci v sérii pulzů. Na buněčné linii MCF7 jsme po γ -ozáření pozorovali již dříve popsané pulzy p53. Nicméně, na buněčné linii U2OS jsme po γ -ozáření detekovali spojitý nárůst hladin p53. Stejnou dynamiku p53 jsme pozorovali i po UV-C ozáření. Navrhujeme, že dynamika p53 závisí na účinném zapojení negativní zpětné vazby mezi kinázami aktivujícími p53 a fosfatázou Wip1. V druhé části této práce jsme se zaměřili na studium dynamiky Wip1 po UV-C ozáření a v průběhu buněčného cyklu. Ověřili jsme stávající a vytvořili nové nástroje pro studium Wip1; tyto zahrnují nové expresní vektory a stabilní monoklonální buněčné linie, exprimující fúzní protein Wip1. Ukázali jsme, že Wip1 je fosforylována po UV-C ozáření. Dále jsme identifikovali novou fosforylaci Wip1, která se vyskytuje pouze v mitóze. Toto naznačuje, že Wip1 je během mitózy odlišně regulována. Naše zjištění přispívají ke znalostem o chování buněčné odpovědi na poškození DNA a budou dále rozvíjena v budoucích studiích.