

## Abstrakt

Zachování kontinuity chromozomů a úplné genetické informace v lidských buňkách je rozhodující pro přežití buňky resp. celého organismu a zabraňuje konverzi normálních diploidních buněk v buňky s nestabilním genomem. Buněčná DNA je však vystavována endogennímu i exogennímu stresu, který může vést k poškození její struktury. Během evoluce se ve vyšších eukaryotech vyvinulo několik molekulárních mechanismů, které tato poškození detekují a opravují, a zajišťují tak v buňkách chromosomovou stabilitu. Tato odpověď se nazývá buněčná odpověď na poškození DNA (DDR). Jedním z nejzávažnějších druhů poškození DNA jsou tzv. dvojřetězcové zlomy (DSB), kdy dojde v těsné blízkosti k přerušení kovalentní vazby mezi cukrem a fosfátem. DSB spouští vlnu posttranslačních modifikací, které regulují proteinové interakce, jadernou lokalizaci a katalytickou aktivitu desítek až stovek proteinů. Tyto modifikace zahrnují acetylaci, metylaci, SUMOylaci, ubikvitinylaci a zejména pak fosforylaci. Mezi nejvýznamnější kinázy účastnící se DDR jsou kinázy ATM, ATR a DNA-PK, jež jsou aktivovány bezprostředně po detekci poškozeného místa.

DAXX (death-associated protein 6) je adaptorový, převážně jaderný protein, který se se v buňkách účastní sbalování histonové varianty H3.3, remodelace chromatinu, modulace genové exprese či protivirové odpovědi. V roce 2006 byla publikována studie mapující substráty kináz ATM, ATR a DNA-PK. Mezi zhruba sedmi sty proteiny, které byly fosforylovány v rámci DDR, byl identifikován také protein DAXX.

V naší práci jsme studovali fosforylaci tohoto proteinu během DDR. DAXX je fosforylován na serinu 564 po tvorbě DSB indukovaných chemicky (etoposid, neokarzinostatin) i ionizačním zářením (IR). Tato fosforylace je zprostředkována specificky kinázou ATM, zatímco kinázy ATR či DNA-PK se na této fosforylaci nepodílí. Klíčovým negativním regulátorem této fosforylace je fosfatáza WIP1. V souladu s novými poznatky o onkogenní funkci WIP1 byla defosforylace S564 nejlépe pozorovatelná v nádorových buněčných liniích, ve kterých byla díky mutaci exprimována stabilnější forma WIP1.

Dále jsme ukázali, že jak fosforylace S564 tak i samotný DAXX nemají vliv na stabilitu a transkripční aktivitu proteinu p53. Potlačení exprese i genetická delece DAXX (metodou TALEN) neměla vliv na expresi transkripčních cílů p53 (GADD45a, NOXA, MDM2, p21, PUMA, SESN2, TIGAR a WIP1), čímž jsme vyvrátili dlouholetý model, dle kterého DAXX (včetně fosforylace S564) hraje klíčovou roli při stabilizaci p53. Naopak jsme identifikovali řadu genů, jejichž exprese je závislá na DAXX a že mechanismus této regulace je pravděpodobně epigenetického charakteru.