

## Abstrakt

Pro udržení integrity genomu využívají buňky extensivní signální síť nazývanou buněčná odpověď na poškození DNA (DNA damage response). DDR je schopná aktivovat kontrolní body buněčného cyklu (checkpoints), které brání dalšímu průchodu buněčným cyklem a umožňují buňce opravit poškozenou DNA. Poruchy těchto ochranných mechanismů se projevují závažnými lidskými onemocněními, především rozvojem rakoviny. Cílem této práce je přispět k porozumění toho jak buňky negativně regulují DDR a signalizaci kontrolních bodů buněčného cyklu. Zaměřili jsme se zejména na fosfatázu Wip1 (*PPM1D*), která je hlavním negativním regulátorem DDR a je nezbytná pro zotavení z kontrolních bodů. Nejprve jsme ukázali, že Wip1 je degradována během mitózy APC-Cdc20-dependetním mechanismem. Wip1 je dále v průběhu mitózy fosforylována na několika aminokyselinách, což vede k inhibici její enzymatické aktivity. Navrhujeme, že inhibice Wip1 umožňuje buňkám adekvátně reagovat i na nízkou hladinu poškození DNA, ke kterému dochází i při nenarušené mitóze. V následující publikaci jsme se zabývali tím, proč mitotické buňky spouštějí pouze časnou DDR a nepokračují k akumulaci opravných faktorů jako je 53BP1. Ukázali jsme, že 53BP1 je fosforylován kinázami CDK1 a Plk1 uvnitř motivu, který je zodpovědný za jeho vazbu na ubiquitin. Tyto fosforylace brání 53BP1 vázat se na ubiquitínované histony, dostat se do míst poškození DNA a ve výsledku brání efektivní opravě DNA. V zahrnutých nepublikovaných datech jsme ukázali, že Wip1 je po genotoxickém stresu fosforylována kinázami MK2 a p38. Funkční význam těchto fosforylací je však třeba dále objasnit. V další části práce jsme identifikovali nové aktivační (gain-of-function) mutace genu *PPM1D*, které způsobují expresi C-terminálně zkráceného proteinu Wip1. Zkrácená varianta Wip1 je katalyticky aktivní a vykazuje zvýšenou stabilitu. Ve výsledku mají tedy buňky více katalyticky aktivní Wip1, která účinně vypíná p53-dependentní kontrolní bod v G1. Tyto mutace jsme objevili v buněčných liniích U2OS a HTC116 a rovněž v periferní krvi pacientů s rakovinou prsu a konečníku. Navrhujeme, že tyto mutace mohou predisponovat nositele k rozvoji rakoviny. Nakonec jsme *in vitro* ukázali, že inhibice Wip1 drogou GSK2830371 specificky senzitivizuje buňky rakoviny prsu s amplifikací *PPM1D* a wild-type alelou p53 k účinkům drog poškozujících DNA a k antagonistům Mdm2, jako je Nutlin-3. Ve shrnutí, získané výsledky přispívají k porozumění toho jak buňky negativně regulují DDR. Věříme, že lepší porozumění molekulárních mechanismů DDR přispěje k lepší diagnostice a vývoji cílených léčiv proti rakovině.