

Summary (CZE)

Název dizertační práce: Proteomická analýza leukemických buněčných linií po ozáření

V této dizertační práci jsme se zaměřili na objasnění molekulárních mechanismů radiosensibilizace leukemické buněčné linie MOLT-4 specifickou inhibicí kináz z rodiny fosfatidylinositol-3-kináza příbuzných kináz (PIKKs). Byly testovány dva vysoce účinné a selektivní inhibitory VE-821 (inhibitor ATR) a KU55933 (inhibitor ATM), pro jejich účinky na proliferaci, viabilitu a buněčný cyklus neozářených a ozářených buněk MOLT4. Aplikace obou inhibitorů způsobila radiosensibilizaci MOLT-4 buněk a 10 μ M VE-821 navíc působil jako silné antiproliferativní agens i v neozářených MOLT-4 buňkách.

K dalšímu popisu mechanismů, které jsou zodpovědné za radiosensibilizaci MOLT-4 buněk VE-821 inhibitorem byly použity hmotnostně spektrometrické metody. Pomocí metod kvantitativní proteomiky jsme identifikovali a kvantifikovali změny v proteomu a fosfoproteomu (tj. změny na úrovni fosforylace proteinů) buněk, které byly způsobeny účinkem inhibitoru v ozářených buňkách. Protože detekce a kvantifikace fosforylovaných peptidů v komplexních vzorcích je komplikována mimo jiné jejich relativně nízkým zastoupením, zaměřili jsme se nejprve na výběr optimální metody pro jejich selektivní izolaci ze směsi s nemodifikovanými peptidy. Optimalizovaný protokol byl pak dále využit ke studiu změn v buňkách radiosensibilizovaných VE-821. Dle očekávání inhibitor nevyvolal žádné změny na úrovni proteomu hodinu po ozáření. Při studiu fosfoproteomu jsme ale našli 623 signifikantně změněných fosforylačních míst, z nichž většina (431) byla upregulována. Pomocí bioinformatických nástrojů jsme zjistili změny signálních drah a aktivity kináz přímo odpovídajících na poškození DNA, ale také signálních drah a kináz primárně souvisejících s regulací buněčného metabolismu. Detekovali jsme snížení v aktivitě mTOR kinázy, které bylo nejspíše způsobené nespecifickým působením inhibitoru v 10 μ M koncentraci. Tato snížená aktivita může pravděpodobně přispívat k zástavě proliferace buněk po podání vysoké dávky inhibitoru.

Vliv VE-821 na metabolismus ozářených buněk byl dále zkoumán pomocí cílené metabolické analýzy. V této analýze bylo kvantifikováno 206 intermediárních metabolitů. Při následné analýze dat bylo zjištěno, že VE-821 potencuje rozvrat energetického metabolismu a může ovlivňovat odpověď na oxidační stres způsobený ozářením. Dále jsme ukázali, že obnova poškozených deoxynukleotidů by mohla být negativně regulována VE-821.

V této práci jsme tedy komplexně popsali, jaké signální a metabolické dráhy by mohly být závislé na ATR nebo spuštěny ATR inhibicí VE-821 v ozářených MOLT-4 buňkách. Výsledky této práce mohou být dále použity jako zdroj informací pro další navazující studie.