

Abstract (Czech)

Buňky našeho těla reagují na genotoxický stres aktivací signální dráhy, která se nazývá buněčná odpověď na poškození DNA (DNA damage response; DDR). V závislosti na typu poškození DNA, DDR dráha vede k dočasnému zastavení buněčného cyklu v kontrolních bodech (tzv. checkpointech), trvalému zastavení růstu (senescence) nebo k programované buněčné smrti (apoptóza). Aktivace kontrolních bodů buněčného cyklu brání progresi buněk a usnadňuje opravu poškozené DNA. DDR představuje bariéru před nárůstem genomové nestability a chrání buňky před vznikem rakoviny. WIP1 (kódovaná genem *PPM1D*) fosfatasa je hlavním negativním regulátorem DDR dráhy a je nezbytná pro ukončení kontrolních bodů buněčného cyklu. Tato práce přispěla k pochopení molekulárních mechanismů funkce WIP1 fosfatasy a popisuje, jak může být WIP1 fosfatasa zapojena při vzniku nádorů. Nejprve jsme popsali, že hladina WIP1 klesá během mitózy pomocí APC-Cdc20 komplexu, který způsobuje proteasomální degradaci proteinu. WIP1 je v průběhu mitózy fosforylovaná na několika aminokyselinách, což vede k inhibici její enzymatické aktivity. Navrhujeme, že inhibice WIP1 v mitóze umožňuje reagovat na nízkou hladinu DNA poškození, ke které dochází v průběhu nenarušené mitózy. Dále jsme identifikovali nové aktivační (gain-of-function) mutace genu *PPM1D*, které vedou k expresi zkráceného proteinu WIP1 z C-konce. Zkrácené varianty WIP1 jsou enzymaticky aktivní a vykazují se zvýšenou stabilitou proteinu v buňkách. V důsledku, že buňky mají více katalyticky aktivní WIP1, dochází k účinné inhibici p53 a k narušení kontrolního bodu v G1. Tyto mutace byly identifikovány v nádorových buněčných liniích U2OS a HCT116 a také v periferní krvi pacientů s nádorem prsu a kolorektálním karcinomem. Navrhujeme, že tyto mutace genu *PPM1D* mohou predisponovat nositele k rozvoji rakoviny. V poslední části jsme *in vitro* validovali komerčně dostupné inhibitory WIP1 na buňkách s inaktivovaným genem *PPM1D* pomocí CRISPR-Cas9 technologie. Potvrdili jsme, že alosterický modulátor GSK2830371 specificky inhibuje WIP1 fosfatasu. Inhibice WIP1 významně snižuje proliferaci nádorových buněčných linií, které nesou amplifikaci *PPM1D*. Inhibice WIP1 neovlivnila proliferaci netransformovaných buněk, které mají nízkou hladinu WIP1 proteinu. Ukázali jsme, že inhibice WIP1 pomocí GSK2830371 zvyšuje citlivost buněk rakoviny prsu s amplifikací *PPM1D* a wild-type alelou p53 k účinkům drog způsobující DNA poškození a k antagonistům MDM2 (Nutlin-3). Ve snaze přispět k dalšímu poznání WIP1 fosfatasy jsme si také dali za cíl určit její krystalovou strukturu. Avšak do této doby se nám nepodařilo optimalizovat žádné krystalizační podmínky. Tato část je zahrnuta jako nepublikované výsledky. Ve shrnutí, získané výsledky během této doktorské práce přispívají k porozumění, jak WIP1 negativně reguluje DDR. WIP1 fosfatasa se podle našich výsledků jeví, jako vhodný farmakologický cíl, jehož inhibice může zvýšit odpověď nádorových buněk na chemoterapii.