

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá úlohou receptorů spřažených s G proteiny (GPCR) v regulaci reakce na poškození DNA (DDR). DNA je neustále vystavena působení různých faktorů, které ji mohou poškodit, a účinná oprava tohoto poškození je klíčová pro zachování buněčné integrity a prevenci mutací, které mohou vést ke vzniku rakoviny. GPCR jsou velkou rodinou receptorů na povrchu buněk, které regulují řadu fyziologických procesů prostřednictvím signalizace zprostředkované G proteiny. Tato práce zkoumá, jak může aktivace TRH receptoru (TRH-R), který patří mezi GPCR, ovlivnit proces opravy DNA a jaké jsou potenciální mechanismy, kterými mohou tyto receptory modulovat DDR.

V praktické části této bakalářské práce jsme se zaměřili na komplexy proteinu 53bp1 s jeho vazebnými partnery (především MDC1 a NBS1) po aktivaci TRH receptorů a sníženého množství β -arrestinu 2. Pro tento cíl bylo nezbytné optimalizovat postupy frakcionace a imunoprecipitace a ověřit účinnost transfekce pomocí siRNA proti β -arrestinu 2. Stanovených cílů jsme dosáhli použitím různých biochemických a molekulárně-biologických metod. Při frakcionaci nám jako kontrola účinnosti rozdělení buněčných kompartmentů sloužila detekce proteinů pomocí 1D-elektroforézy a imunoblotu. Protein-proteinové interakce byly sledovány pomocí metod jako ko-immunoprecipitace a imunoblot.

V této práci jsme úspěšně získali jadernou frakci z GH1 buněk, optimalizovali podmínky imunoprecipitace a ověřili účinnost transfekce pomocí siRNA proti β -arrestinu 2. Byly sledovány interakce 53bp1 s MDC1 a NBS1 a interakce mezi NBS1 a MDC1. Byl identifikován komplex 53bp1 s MDC1 a komplex NBS1 s MDC1, což naznačuje, že protein MDC1 tvoří s 53bp1 a NBS1 dva oddělené komplexy. Zvýšený imunesignál byl detekován po působení TRH jak v kontrolních, tak i transfekovaných buňkách. Podobný účinek byl sledován po působení taltirelinu pouze v kontrolních buňkách. Aktivace TRH receptoru by tedy za určitých podmínek mohla hrát roli v reakci na poškození DNA. Avšak změna ve fosforylaci H2AX po ovlivnění taltirelinem nebyla pozorována. Budoucí výzkum by se mohl zaměřit na pozorování účinku ligandů TRH receptoru při různém buněčném množství β -arrestinu 2 na fosforylaci H2AX. Pro detekci komplexů proteinu 53bp1 by mohla být použita metoda imunofluorescence pro potvrzení získaných výsledků. Tyto nové poznatky by mohly vyjasnit, zda aktivace TRH receptoru může ovlivnit odpověď na poškození DNA a její opravu.

Klíčová slova

GPCR, TRH, β -arrestin 2, poškození DNA