

SOUHRN

Tato práce se zabývá molekulárními mechanismy aktivovanými ionizujícím zářením, které vedou k reparaci vzniklého poškození DNA nebo k indukci apoptózy. Využity byly lidské leukemické buněčné linie lišící se expresí nádorového supresoru, proteinu p53 (pozitivní u T-lymfocytární linie MOLT-4 a negativní u promyelocytární linie HL-60).

U buněk MOLT-4 byla prokázána funkční signální dráha závislá na ATM kinase, klíčovém enzymu, který aktivuje celou řadu substrátů účastnících se zástavy buněčného cyklu a opravy DNA. Významným zjištěním je, že u těchto buněk nedochází k efektivní reparaci, jelikož zde není fosforylován důležitý komponent reparačního komplexu MRN, protein Nbs1, což pokládáme za jeden z důvodů jejich zvýšené radiosensitivity.

Zářením indukovaná aktivace ATM kinasy vede k rychlé fosforylaci checkpoint kinasy-2 a k upregulaci a fosforylaci p53 a jeho negativního regulátoru, onkoproteinu Mdm2.

Kromě reparace DNA, která je nutná pro další proliferaci buněk, jsme se věnovali studiu buněčné smrti. U obou studovaných linií jsme potvrdili aktivaci jak receptorové, tak mitochondriální cesty indukce apoptózy. V obou liniích po subletální (nikoli letální) dávce množství antiapoptotického proteinu Mcl-1 vzrůstalo a s nástupem apoptózy pokleslo. Záření také indukovalo aktivaci proapoptotického proteinu Bid a uvolnění cyt-c z mitochondrií. Zajímavým zjištěním však bylo, že v p53 pozitivních podmínkách (MOLT-4) dochází k simultánní aktivaci iniciačních kaspas-8 a -9, kdežto v podmínkách p53 negativních (HL-60) je kaspasa-9 aktivována s výrazným časovým zpožděním. To naznačuje, že pokud chybí protein p53, hraje důležitější úlohu v indukci zářením navozené apoptózy kaspasa-8. Obě linie se též liší typem apoptózy. Buňky MOLT-4 vykazují značnou nesourodost v čase indukce apoptózy po ozáření a umírají většinou tzv. mitotickou apoptózou. Na druhou stranu buňky HL-60 podléhají po nízkých dávkách tzv. oddálené apoptóze, které předchází akumulace buněk v G2 bloku nutná pro opravu poškozené DNA, nebo umírají rychlou apoptózou, která je navozena supra/letálními dávkami několik hodin po ozáření.

Prokázali jsme fosforylaci p53 na Ser¹⁵, která jeví výraznou dávkovou závislost v oblasti do 3 Gy (kromě Western blottingu ověřeno metodou ELISA) a proto jsme tento protein navrhli jako molekulární indikátor využitelný v biodozimetrii pro zpětné určení obdržené dávky IZ. Na signální dráze ATM/Chk-2/p53 jsme též prokázali inhibiční efekt kofeinu (kombinace nízkých dávek a koncentrace 2 mmol/l), který zvyšuje cytotoxické účinky IZ a je látkou potenciálně využitelnou v kombinované terapii nádorových onemocnění.