

Abstract (CZ)

Rakovinné kmenové buňky (RKB), stejně jako normální kmenové buňky v tkáních, zodpovídají za zachování a růst nádorů. RKB představují malou frakci buněk uvnitř nádoru, která je charakteristická vlastní obnovovací kapacitou a schopností vyvolat nádor v myších s nefunkčním imunitním systémem. U buněk se zvýšenými kmenovými vlastnostmi se předpokládá, že jsou odpovědné za rezistenci nádorů k léčbě, tvorbu metastáz a návrat nádorového onemocnění.

První část této práce se zabývá rezistencí nádorů, která je často spojena se zvýšenou expresí „ATP-binding cassette” (ABC) transportérů pumpujících chemoterapeutikum ven z buněk. Pro účely této studie jsme použili *in vitro* model RKB založený na kultivaci buněk jako tzv. 3D "sféry". Expresní profil ukazuje, že náš model RKB odvozený z buněčných linií rakoviny prsu a prostaty exprimuje celkově vyšší hladinu ABC transportérů, zejména *ABCA1*, *ABCA3*, *ABCA5*, *ABCA12*, *ABCA13*, *ABCB7*, *ABCB9*, *ABCB10*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC5*, *ABCC8*, *ABCC10*, *ABCC11* a *ABCG2*. Analýza proteinové hladiny ABC transportérů v RKB prsu pak ukázala vyšší expresi transportérů *ABCB8*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC10* a *ABCG2* a naopak snížení hladiny proteinů *ABCB10* a *ABCF2*. V souladu s těmito daty, sféry připravené z buněčných linií T47D a MCF7 vykazují rezistenci k daunorubicinu a doxorubicinu, a zajímavě také vyšší citlivost k inhibitorům transportérů *ABCC1* a *ABCG2*. Tyto výsledky naznačují, že ABC transportéry mohou hrát důležitou roli při udržování fenotypu RKB, jež nesouvisí s transportem léčiv.

Nádory rostoucí nezávisle na přítomnosti estrogenu často ztratí estrogenový receptor α (ER α), což je spojeno s horší prognózou pacientek. Tento proces může být regulován pomocí mikroRNA, 22 nukleotidů dlouhých, jednořetězcových, nekódujících RNA, které negativně regulují genovou expresi vazbou na mRNA, což vede k inhibici translace mRNA a její degradaci. Dále jsme zjistili, že onkogenní microRNA-301a-3p (miR-301a-3p) je vysoce zvýšená v našem modelu prsních RKB, které vykazují pokles ER signalizace. Ukázali jsme, že miR-301a-3p negativně reguluje ER signalizaci přímou represí translace mRNA kódující ER α . Vysoká exprese miR-301a-3p snižuje citlivost estrogen dependentních MCF7 buněk k 17- β estradiolu a podobně vede k inhibici růstu nádoru pocházejícího z této buněčné linie v nahých myších, které mají poškozený imunitní systém. Vzniklé nádory nicméně vykazují významně zvýšenou expresi genů souvisejících s fenotypem RKB a epiteliálně-mezenchymální tranzicí, naznačující obohacení populace nádoru o RKB. Navíc exprese miR-301a-3p negativně koreluje

s hladinou exprese genu *ESR1* u biopsií z pacientů s rakovinou prsu. MiR-301a-3p tak může sloužit jako ukazatel závislosti růstu nádoru na estrogeneru a jeho rezistenci vůči anti-estrogenním lékům, ale také jako ukazatel prognózy pacienta.

Poslední část této práce je zaměřena na metabolismus železa v RKB. Železo je nepostradatelným prvkem, který je nutný jako kofaktor pro normální funkci mnoha enzymových proteinů, které se účastní buněčného dýchání, Krebsova cyklu, redoxních reakcí, ale také replikace a opravy DNA. Není divu, že deregulace metabolismu železa vede k mnoha patologickým situacím, včetně nádorového bujení. Naše data ukazují, že sféry odvozené z buněčné linie MCF7 vykazují vyšší množství volného železa, vyšší příjem železa s jeho převažující akumulací v mitochondriích a jsou citlivější k chelaci železa. Sféry z MCF7 buněk také vykazují aktivaci IRP/IRE systému, což potvrzuje vyšší absorpci železa a snížení feritinově vázaných železových zásob. Aktivita enzymů obsahujících železo-sírné klastry je ve sférách snížena, což naznačuje narušení mechanismu jejich biogeneze. Dále MCF7 sféry vykazují vyšší oxidační prostředí, které je odrazem vyšší tvorby reaktivních druhů kyslíku a nižší hladiny redukovaného glutationu. Expresní profil genů spojených s metabolismem železa u RKB odvozených z buněčných linií rakoviny prsu a prostaty odhalil specifický expresní genový profil založený na rozdílné expresi genů souvisejících s vychytáváním železa (*CYBRD1*, *TFRC*), detekcí hladiny železa a její regulací (*ACO1*, *IREB1*), mitochondriální syntézou hemu a železo-sírných klastrů (*ABCB10*, *GLRX5*), hypoxií (*EPAS1*, *QSOX1*), exportem železa a regulací jeho exportu (*HEPH*, *HFE*), což poukazuje na značné změny v metabolismu železa u RKB. Analýza hlavních komponent založená na tomto genovém profilu je navíc schopna rozlišit RKB od ostatních nádorových buněk *in vitro*. Tato data tak dokumentují důležité změny metabolismu železa v souvislosti s fenotypem RKB.

Závěrem lze konstatovat, že naše výsledky dále prohlubují poznatky o zásadní úloze RKB v biologii nádorů, přičemž vystihují rozdíly mezi normálními rakovinnými buňkami a RKB, které by mohly potenciálně sloužit při diagnostice nádorů a jejich léčbě.