

## Abstrakt

Tato práce se zabývá buněčnou odpovědí na genotoxický stres; konkrétně odpovědí na protinádorovou léčbu s genotoxickým mechanismem účinku. Buněčná odpověď může mít některý z následujících průběhů: v případě závažného poškození DNA buňky většinou podstoupí apoptózu nebo vstoupí do senescence. Pokud je poškození méně závažné nebo pokud buňkám nefungují kontrolní mechanismy, mohou tyto pokračovat v buněčném cyklu, ať už s úspěšně opravenou nebo s mutovanou DNA. Díky selektivnímu tlaku se v buňkách hromadí ty mutace, které jim poskytují určitou růstovou výhodu v podmínkách trvajících genotoxického stresu a buňky se postupně stávají rezistentními. Ve své dizertační práci jsem se zaměřila na několik aspektů celého výše popsaného procesu.

V prvním projektu, kterého jsem se zúčastnila, bylo mým úkolem charakterizovat populaci radiorezistentních a anoikis-rezistentních buněk karcinomu prostaty. Tato populace byla získána po ozáření buněk 35 dávkami 2 Gy, což je režim běžně používaný v klinické praxi. Po takovémto ozařovacím procesu se objevila populace buněk s nízkou adhezí, která vykazovala zvýšenou expresi mezenchymálních a kmenových markerů. Nízká adhezivita těchto buněk byla vyvolána signální dráhou proteinu Snail a jejich resistance vůči anoikis byla umožněna díky signalizaci ERK1/2. Zjistili jsme, že po určité době byly tyto nízké adherentní buňky schopny přisednout na podklad a začít se znovu dělit. Kromě toho si uchovaly schopnost tvořit nádory, což bylo prokázáno jejich injekcí do myší s potlačenou imunitou. Přežití těchto buněk bylo zabráněno kombinovanou inhibicí signálních drah AKT a ERK1/2.

Dále jsem se podílela na studii, která zkoumala vliv buněk, přivedených do senescence pomocí chemoterapie, na růst nádorů. Zjistili jsme, že pokud k nesenescentním nádorovým buňkám přidáme buňky, které byly přivedeny do senescence pomocí docetaxelu nebo vysokými dávkami gama záření, urychlí se růst nádoru v myších s normálně fungujícím imunitním systémem. Jak samotný růst nádoru, tak zjištěný urychlující efekt nádorových buněk, byly navíc potlačeny imunoterapií – interleukinem 12.

Cílem třetího projektu, na kterém jsem spolupracovala, bylo najít specifický marker senescentních buněk. Povrchový protein L1CAM byl vybrán jako vhodný kandidát, protože hladina jeho mRNA i proteinu byla zvýšená u většiny zkoumaných buněčných linií, přivedených do senescence různými způsoby (násobné pasážování,  $\gamma$ -záření, bromodeoxyuridin, interferon  $\gamma$ , transformující růstový factor  $\beta$ ). Exprese proteinu L1CAM byla navíc úzce propojena s metabolismem, což bylo patrné díky tomu, že se jeho exprese měnila při kultivaci buněk v médiu s vysokým obsahem glukózy, při inhibici mevalonátové dráhy nebo při snížení hladiny mitochondriální ATP/ADP translokázy ANT2. Kromě toho byla potvrzena úloha L1CAM v buněčné migraci a adhezivitě. Na závěr byla také popsána reciproká negativní regulace mezi proteinem L1CAM a

signální dráhou ERK1/2, což mimo jiné vysvětlilo naše dřívější pozorování, že hladina proteinu L1CAM není zvýšena u senescence indukované signalizací H-RAS/MAPK.

V rámci svého vlastního projektu jsem se snažila lépe pochopit asociaci mezi proteinem PML a jadérkem, indukovanou genotoxickým stresem. Protein PML byl popsán jako nádorový supresor, který se podílí na indukci senescence, a přítomnost zvýšeného počtu jaderných tělísek tvořených tímto proteinem je zároveň jedním ze znaků senescence. Zjistili jsme, že inhibice RNA polymerázy I (RNAPI) spolu s topologickým stresem vedou k translokaci proteinu PML na jaderný povrch. Dále jsme identifikovali domény proteinu PML, které jsou pro tuto interakci důležité, přičemž jedna z nich je zároveň nezbytná pro interakci PML se SUMOylovanými proteiny. S využitím super-rezoluční a časosběrné mikroskopie jsme popsali, jak se jaderné asociace PML (PNAs) tvoří, jak se vyvíjejí a jaká je jejich 3D struktura. Kromě toho jsme ukázali, že PNAs obsahují ribozomální DNA (rDNA), kolokalizují se SUMO a ve své poslední fázi také akumulují proteiny, které se účastní metabolismu rDNA. Nakonec jsme popsali asociaci PNAs s histonem  $\gamma$ H2AX, který značí poškozenou DNA. Navrhujeme tedy model, kdy inhibice RNAPI kombinovaná s topologickým stresem vede ke specifickému poškození DNA, které má za následek přitáhnutí konkrétních SUMOylovaných proteinů a tvorbu PNAs. PNAs se pak podílejí na sekvestraci a procesování poškozených lokusů rDNA. Pokud tato místa zůstanou neopravena, přetrvávají v buňkách a pravděpodobně přispívají ke vzniku senescence.