

Abstrakt

Pro mnohobuněčné organismy včetně savců představuje regenerace tkání důležitý proces pro zachování jejich životaschopnosti. Vzhledem k tomu, že je proliferace buněk klíčová i pro vznik nádorů, musely si organismy vyvinout mechanismy chránící je proti zhoubnému bujení. Buněčná senescence jako permanentní zástava buněčného cyklu představuje jednu z bariér proti vzniku nádorů po poškození DNA. Pochopení tohoto procesu proto může vést k nalezení nových terapeutických cílů a optimalizaci chemoterapie u pacientů s rakovinou.

V první části disertační práce jsme se zabývali aktivací signální dráhy JAK/STAT u buněčné senescence vyvolané chemoterapeutiky jak v normálních tak nádorových buňkách. Pro tento účel jsme použili genotoxické látky afidikolin, kamptotecin, 5-brom-2'-deoxyuridin, etoposid nebo tymidin. Zjistili jsme, že všechny tyto chemikálie jsou schopny dlouhodobě aktivovat signální dráhy JAK/STAT ve sledovaných buňkách. Aktivace těchto drah byla doprovázena zvýšením exprese genů stimulovaných interferony (ISGs), jako jsou MX1, IRF1, IRF7 a PML. IRF1 a IRF7 se můžou přímo podílet na indukci genů kódujících interferony a u chemicky indukovaných senescentních buněk jsme skutečně zjistili zvýšenou expresi a sekreci IFN β a IFN γ , avšak překvapivě ne genů ze skupiny IFN α . Inhibice JAK1 jakožto hlavní kinázy umožňující přenos signálu z membránových receptorů stimulovaných interferony vedla jak k potlačení aktivace proteinu STAT1 tak k zástavě exprese ISGs, což podporuje dominantní roli JAK1 v aktivaci interferonové odpovědi u chemicky indukovaných senescentních buněk. Kromě interferonů jsme našli výrazně zvýšenou expresi a sekreci některých dalších cytokinů, jako jsou prozánětlivé cytokiny IL1, IL6, IL8 a IL10 nebo TNF α . Vzhledem k tomu, že je signalizace JAK/STAT v buňce aktivována nejen přes interferony, ale obecně přes složitou síť cytokinů, naše výsledky naznačují pozitivní zpětnou vazbu mezi sekrecí cytokinů a dlouhodobou signalizací JAK/STAT pozorovanou u chemicky indukovaných senescentních buněk.

PML je jedním z nádorových supresorů a jeho zvýšená hladina byla detekována u všech forem buněčné senescence. Tento protein je nezbytnou součástí jaderných struktur známých jako jaderná tělíska PML, jejichž zvýšená akumulace se vyskytuje během reakce na stres. Bylo popsáno, že tato tělíska představují důležité místo pro aktivaci či modifikaci mnoha proteinů spojených s regulací buněčného cyklu, včetně proteinů p53 a Rb. Jak ukazujeme v naší práci,

tělíska PML jsou také lokalizována do míst vzniku zlomu DNA dvoušroubovice. Zjistili jsme, že zvýšení hladiny proteinu PML, základní stavební složky PML tělísek, se u chemicky indukovaných senescentních buněk děje nejen na základě stabilizace proteinu, ale také zvýšením exprese genu PML. PML patří do skupiny genů stimulovaných interferony a překvapivým nálezem bylo zjištění, že zvýšení jeho exprese u senescence indukované chemicky je zprostředkováno signální dráhou JAK/STAT a ne skrze aktivaci p53, jehož schopnost indukovat expresi PML byla popsána u onkogeně indukované senescence. Zablokováním všech kináz z rodiny JAK u chemicky indukovaných senescentních buněk jsme docílili jak inaktivace proteinů STAT1 a STAT3, tak i snížení hladiny exprese genu PML a tvorby PML tělísek na rozdíl od blokace p53 proteinu, která neměla na expresi genu PML žádný vliv. Dále jsme zjistili, že exprese PML je řízena prostřednictvím konkrétní sekvence na promotoru PML (ISRE - Interferon Stimulated Response Element), která představuje vazebné místo pro transkripční faktor STAT1. Odstraněním této sekvence byla u chemicky indukovaných senescentních buněk transkripce genu PML potlačena.

Počet jaderných tělísek PML se liší u různých typů buněk. Na základě výsledků zmiňovaných výše jsme analyzovali, zda-li je transkripce PML u buněk regulována pomocí drah JAK/STAT také na bazální úrovni. K tomuto experimentu jsme použili tři modelové buněčné linie s nízkou (U2OS), střední (HeLa) a vysokou (BJ) hladinou PML. Zjistili jsme, že počet tělísek PML stejně jako hladina mRNA a proteinu PML koreluje s aktivací STAT3, ale ne STAT1 nebo STAT5. Podobná korelace byla pozorována mezi hladinou sekretovaného IL6 - hlavního aktivátoru STAT3 signální dráhy - a počtem tělísek PML. Snížení hladiny STAT3 pomocí specifické siRNA stejně jako neutralizace IL6 v médiu pomocí specifické protilátky snížily bazální hladinu PML v buňkách. Zjistili jsme, že IL6 je sám o sobě schopen aktivovat transkripci PML u exponovaných buněk. Pomocí chromatinové imunoprecipitace jsme prokázali přímou vazbu STAT3, ale ne STAT5 na promotor genu PML.

Aktivace STAT3 představuje hlavní cíl signalizace spouštěné IL6, nicméně několik prací naznačilo aktivaci NFkapaB závislou na IL6. NFkapaB je transkripční faktor regulující geny podílející se na řízení imunitních reakcí, zánětu, proliferace nebo odpovědi na poškození DNA a to prostřednictvím signální dráhy IL6/PI3K/Akt. Zjistili jsme, že snížení exprese proteinu NEMO, který je nezbytný pro aktivaci NFkapaB, vedlo ke snížení transkripce PML. Další

experimenty prokázaly, že NFkapaB reguluje transkripci PML regulací exprese IL6 spíše než přímou indukcí PML.

Bylo popsáno, že tělíska PML hrají důležitou roli v regulaci řady proteinů zapojených do odpovědi na poškození DNA a rozvoje senescence, včetně proteinů zapojených do tvorby tzv. "se senescencí-asociovaných heterochromatinových fokusů" (SAHF) jako je Hira, HP1 a Rb. Zatímco role faktorů z rodiny HP1 v tvorbě heterochromatinu je již dlouho známa, utváření SAHF po vyvázání Rb proteinu tělísky PML bylo popsáno teprve nedávno. Zvýšená tvorba tělísek PML byla zjištěna u všech typů senescence, proto jsme testovali, zda-li toto platí i pro SAHF, což by z nich činilo univerzální marker senescence, který doposud není znám. Zjistili jsme, že všechny testované typy buněk tvořily SAHF v případě onkogenně indukované senescence, ale po vyvolání senescence chemikáliemi jako je etoposid, doxorubicin, hydroxyurea nebo bakteriálními genotoxiny, byl vznik SAHF závislý na buněčném typu. I když jsme nedetekovali SAHF ve všech případech senescence a nemůžeme je tudíž použít jako univerzální marker, objevili jsme korelaci mezi tvorbou SAHF a hromaděním inhibitoru cyklin-dependentních kináz p16INK4A v buňkách. Vzhledem k tomu, že byla popsána role SAHF v umlčování genů regulujících buněčnou proliferaci, naše výsledky naznačují, že tyto tento typ heterochromatinizace není nezbytně nutný pro indukci senescence. Nicméně pokud se tyto struktury v buňce vyskytnou, podporují vznik senescence přes aktivaci/stabilizaci p16/Rb dráhy.