

## ABSTRAKT

TRAIL ligand spouští apoptózu interakcí se svými dvěma pro-apoptotickými receptory TRAIL-R1 (DR4) a TRAIL-R2 (DR5). Jeho schopnost indukovat apoptózu nezávisle na statusu p53 a selektivně zabíjet rakovinné buňky *in vitro* a *in vivo* zapříčinila, že tento ligand patřící do rodiny cytokinů TNF se jevil atraktivním cílem výzkumu terapie nádorových onemocnění. Avšak rezistence mnoha primárních nádorových buněk, neuspokojivý výsledek klinických testů a nedávné studie, které ukazují protichůdné výsledky a to konkrétně, že TRAIL může za specifických podmínek podporovat místo toho, aby inhiboval progresi nádorů, vyvolaly v oblasti výzkumu signalizace indukované ligandem TRAIL nové množství otázek, které je potřeba zodpovědet.

Ačkoliv jsou oba receptory DR4 a DR5 rovnoměrně exprimovány, různé typy nádorů vykazují preferenci pro jeden nebo druhý z receptorů. Relativní účast signalizace DR4 a DR5 indukované TRAIL ligandem je málo známá. Abychom analyzovali signalizaci ligandu TRAIL specifickou pro jednotlivé receptory, připravili jsme trimerizované varianty rekombinantního lidského ligandu TRAIL, značené pomocí Strep-tag, s vysokou afinitou pro receptory DR4 nebo DR5. Zjistila jsem, že rozdíl od pankreatických rakovinových buněk PANC-1 rezistentních k apoptóze indukované ligandem TRAIL, probíhá tvorba komplexu DISC a počáteční autoaktivace kaspázy-8 v rezistentních kolorektálních buňkách HT-29 srovnatelně jak v buňkách aktivovaných DR4, tak i DR5 ligandem. Apoptóza indukovaná ligandem TRAIL probíhala v obou buněčných liniích mnohem efektivněji prostřednictvím receptoru DR5. Potlačení exprese receptorů DR4 a DR5 pomocí shRNA v buňkách HT-29 také ukázalo na významnější přínos receptoru DR5 v apoptóze indukované ligandem TRAIL. Na rozdíl od apoptotické buněčné smrti jsem nezaznamenala statisticky významné rozdíly v nekroptotické signalizaci, která byla srovnatelně aktivována jak ligandy specifickými pro DR4, tak i DR5 receptor. Aktivace dalších signálních drah, zahrnujících NF- $\kappa$ B a stresové kinázy p38 a JNK, probíhala za apoptotických podmínek hlavně DR5-dependentním způsobem, zatímco tyto signalizační cesty byly v průběhu nekroptózy srovnatelně aktivovány.

V dizertační práci jsem dále také ukázala, že sekundární metabolit streptomycét Manumycin A je ve srovnání s příbuzným Manumycinem B nebo Asukamycinem účinným senzitivátorem apoptózy indukované ligandem TRAIL v buněčných liniích RKO a SW-620 kolorektálního

karcinomu. Dokázala jsem, že inkubace RKO a SW-620 s Manumycinem A v kombinaci s TRAIL ligandem nebo ABT199/737, vedla ke statisticky významnému zvýšení apoptózy. Také jsem ukázala, že společná inkubace Manumycinu A s ligandem TRAIL vedla k silnější aktivaci kaspáz -8 / -9 a kaspázy-3, stejně jako k zvýšenému štěpení proteinů PARP a tBid. Důležité bylo zjištění, že tento ko-aktivační efekt je pravděpodobně způsoben produkcí ROS generovaných mitochondriemi.

Závěrem, údaje ze spolupráce s Vladimírem Vinarským a kol. ukazují, že lidské embryonální kmenové buňky (hESC) a lidské pluripotentní kmenové buňky (hiPSC) exprimují receptory DR4 i DR5, ale jsou rezistentní vůči apoptóze indukované ligandem TRAIL. Souběžná inkubace s inhibitorem translace homoharringtoninem a ligandem TRAIL vedla k senzitivaci buněk k apoptóze indukované ligandem TRAIL a ke snížení exprese dvou antiapoptotických proteinů Mcl-1 a cFLIP. Ukázala jsem, že potlačení exprese cFLIP pomocí shRNA vedla ke zvýšené citlivosti hESC, a že cFLIP pravděpodobně představuje důležitý regulační uzel ve vnější dráze apoptózy indukované ligandem TRAIL v lidských pluripotentních kmenových buňkách.

Souhrnně vzato, představila jsem první systematický pohled na DR4-/DR5-specifickou signalizaci v kolorektálních a pankreatických rakovinných buňkách, kde jsem použitím několika přístupů prokázala, že pro-apoptotická, ale ne nekroptotická, receptor-specifická signalizace ligandu TRAIL může v kontrastu s posledními studiemi do značné míry probíhat prostřednictvím receptoru DR5. Také jsem ukázala, že Manumycin A je efektivním senzitivátorem apoptózy indukované ligandem TRAIL a poskytla jsem první důkaz, že pluripotentní kmenové buňky, nezávisle na jejich původu, exprimují kanonické složky vnějšího apoptotického systému a vlivem stresových faktorů mohou aktivovat apoptózu zprostředkovanou receptory indukující buňečnou smrt.