

ABSTRAKT

Rezistence různých typů nádorů ke konvenční léčbě radiací nebo chemoterapeutiky patří mezi nejčastěji zkoumané fenomény v oblasti molekulární a klinické onkologie. Pro rekurentní onemocnění je charakteristická přítomnost metastáz, které jsou v 90% odpovědné za úmrtí pacientů. Frakcionované ionizující záření (fIR; *fractionated ionizing radiation*) v kombinaci s chirurgickým odstraněním nádoru nebo hormonální terapií představuje nejčastější typ léčby v případě lokalizovaného nebo lokálně pokročilého karcinomu prostaty (KP). Hlavní příčinou neúspěchu radioterapie KP je radiorezistence s následnou diseminací přeživších buněk do okolních tkání.

Ve snaze lépe pochopit fenotyp buněk asociovaný s radiorezistencí jsme vystavili čtyři buněčné linie KP derivované z metastáz (DU145, PC-3, LNCaP a 22RV1) klinicky relevantním, denně se opakujícím dávkám ionizujícího záření (fIR; 35 x 2 Gy), což mělo za následek vznik dvou přeživších buněčných populací - adherentních buněk vykazujících známky senescence včetně exprese markerů asociovaných se senescencí a neadherentních buněk rezistentních k anoikis, s rysy kmenových buněk, včetně aktivní signalizace Notch a exprese kmenových znaků CD133, Oct-4, Sox2 a Nanog. Zatímco radiorezistentní adherentní buňky byly schopné obnovit proliferaci krátce po skončení ozařování, neadherentní buňky začaly proliferovat pouze po readhezi, ke které docházelo několik dnů po ztrátě adheze indukované iradiací. Podobně jako neozářené parentální buňky si radiorezistentní readherentní buňky DU145 zachovaly tumorigenní potenciál po transplantaci do imunokompromitovaných myší. Ukázali jsme, že pozorovaná fenotypová plasticita buněk KP indukovaná fIR byla doprovázena epiteliálně-mesenchymální tranzicí (EMT; *epithelial-to-mesenchymal transition*), stejně jako opačným procesem - mesenchymálně-epiteliální tranzicí (MET; *mesenchymal-to-epithelial transition*). Ztráta adheze indukovaná pomocí fIR byla závislá na expresi transkripčního faktoru regulujícího EMT - Snail (SNAI1), jelikož krátkodobé (siRNA) nebo dlouhodobé (shRNA) snížení hladiny Snailu zabránilo inaktivaci mezibuněčného adhezivního proteinu E-kadherinu (CDH1) a ztrátě adheze. Na druhé straně přežití neadherentních buněk vyžadovalo aktivní signalizaci Erk, protože chemická inhibice Erk1/2 prostřednictvím selektivního inhibitoru kinázy Mek nebo tranzientní snížení kinázy Erk1/2 prostřednictvím siRNA mělo za následek buněčnou smrt (anoikis). Zatímco kombinovaná inhibice signalizace Erk a PI3K/Akt u neadherentních buněk indukovala

buněčnou smrt a měla za následek zablokování proliferace u adherentních buněk KP, toto kombinované ošetření mělo jen marginální efekt na růst normálních lidských diploidních buněk. Důležité je, že ozářené readherentní buňky tvořily v klonogenním testu méně kolonií se senescentním fenotypem a vykazovaly zvýšenou odolnost vůči anoikis po opětovném ozáření, což poukazuje na rozvoj získané radiorezistence.

Vzhledem k tomu, že dormantní neadherentní buňky, které přežily FIR, sdílejí společné rysy s buňkami dávajícími vznik vzdáleným metastázám, jako například sníženou schopnost proliferace, expresi znaků kmenových buněk a schopnost obnovit adherentní růst po ukončení působení genotoxického stresu, a protože o těchto vlastnostech je známo, že přispívají k rezistenci vůči terapii, k rozvoji metastáz a recidivy nádorového onemocnění, rozhodli jsme se studovat fenomén ztráty adheze po FIR podrobněji. Obdobnou fenotypovou plasticitu jsme pozorovali u ozářených (10 x 2 Gy) buněk adenokarcinomu prsu (MCF-7) a nádorových buněk děložního čípku (HeLa) po ošetření chemoterapeutikem 5-azacytidinem (4 μ M/24 hodin po dobu 7 dní), což naznačuje, že výskyt životaschopných neadherentních buněk není vázan na původ rakovinných buněk ani na typ aplikovaného genotoxického stresu. Jako další krok jsme provedli celogenomovou expresní analýzu několika radio-/chemo-rezistentních rakovinných buněčných populací. Analýza dat poukázala na exkluzivní expresní profil u neadherentních buněk rezistentních vůči radio-/chemo-terapii s aktivní cytokinovou signalizací a indukcí genů stimulovaných interferony.

Souhrnně vzato, tyto výsledky přispívají k lepšímu pochopení heterogenity lidských metastatických nádorových buněk prostaty přežívajících ozáření, dokumentují plasticitu přeživších buněk indukovanou radiací, popisují molekulární odpovědi na ozáření a naznačují možnosti, jak v rámci protinádorové terapie překonat radiorezistenci využitím cílených radiosenzitizujících látek.