

**Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Alžběta Filipová

2017

**Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Doktorský studijní program
Lékařská chemie a biochemie**

Primární řasinka a její význam v reakci buněk na expozici ionizujícímu záření a cytostatikům.

Primary cilia and its importance in cell response to ionizing radiation exposure and chemotherapy drugs.

Mgr. Alžběta Filipová

Školitel: prof. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D.

Hradec Králové, 2017

Obhajoba dne:

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou dizertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 2017

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce prof. MUDr. Martině Řezáčové, Ph.D. za trpělivost, veškerou pomoc, cenné rady, odborné vedení během mého studia a za připomínky při zpracování této práce. Dále děkuji kolektivu zaměstnanců Ústavu lékařské biochemie a Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a Katedry radiobiologie FVZ UO Hradec Králové za rady, pomoc a poskytnutí prostorů při zhotovení praktické části. Rovněž patří můj dík rodině za podporu, pochopení a vytvoření potřebného zázemí při studiu.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Současný stav problematiky.....	10
2.1. Primární řasinka – historie a současný pohled	10
2.2. Stavba primární řasinky a její senzoričké funkce	11
2.3. Primární řasinka a buněčný cyklus	13
2.3.1. Regulační proteiny buněčného cyklu a primární řasinky.....	14
2.4. Primární řasinka a její senzoričká funkce.....	15
2.5. Primární řasinka a signální dráha Hedgehog	16
2.5.1. Primární řasinka a inhibitory signální dráhy Hedgehog.....	17
2.6. Poruchy primární řasinky u nádorových onemocnění.....	19
2.6.1. Primární řasinka u nádorů prsu	19
2.7. Primární řasinka a ionizující záření	20
2.8. Odpověď primární řasinky na metabolický stres indukovaný hladověním.....	21
2.9. Primární řasinka a cytotoxický stres vyvolaný chemickými látkami	22
2.9.1. Doxorubicin a taxol.....	22
3. Cíl práce	24
4. Materiál a metodiky	25
4.1. Buněčné linie a jejich kultivace.....	25
4.1.1. C2C12.....	25
4.1.2. MDA-MB-231.....	25
4.1.3. BT-549	25
4.1.4. Izolované lidské fibroblasty ze zdravé tkáňe	25
4.2. Izolace lidských fibroblastů z kožní biopsie.....	26
4.3. Ozařování.....	26
4.4. Metabolický stres indukovaný hladověním.....	26
4.5. Cytostatika	27
4.6. Stanovení viability a proliferace pomocí WST-1 testu	27
4.7. Detekce apoptózy	27
4.8. Stanovení cytotoxicity	27
4.9. Imunocytochemie	28
4.10. Transmisní elektronová mikroskopie.....	28
4.11. Analýza buněčného cyklu	29
4.12. Statistická analýza.....	29
5. Výsledky	30
5.1. Hodnocení změn primární řasinky po ozáření u C2C12	30
5.1.1. Hodnocení viability a proliferace u C2C12 po ozáření.....	30

5.1.2.	Hodnocení buněčného cyklu u ozářených C2C12	31
5.1.3.	Indukce apoptózy	33
5.1.3.1.	Detekce apoptózy pomocí barvení DAPI	33
5.1.3.2.	Aktivita kaspáz	33
5.1.4.	Detekce primární řasinky u buněčné linie C2C12	35
5.1.4.1.	Detekce primární řasinky po ionizujícím záření.....	36
5.1.4.2.	Výskyt vícečetné řasinky po ionizujícím záření.....	38
5.2.	Změny primární řasinky po metabolickém stresu indukovaného hladověním.....	40
5.2.1.	Hodnocení viability a proliferace po hladovění u C2C12.....	40
5.2.2.	Hodnocení buněčného cyklu po hladovění u C2C12.....	41
5.2.3.	Detekce primární řasinky po hladovění u C2C12	42
5.3.	Změny primární řasinky u buněčných linií triple negativního karcinomu prsu a kožních fibroblastů po ovlivnění cytostatiky	44
5.3.1.	Hodnocení viability a proliferace po ovlivnění doxorubicinem.....	44
5.3.2.	Stanovení buněčného cyklu po ovlivnění doxorubicinem	45
5.3.3.	Detekce primární řasinky u kožních fibroblastů	49
5.3.3.1.	Ovlivnění kožních fibroblastů doxorubicinem zvyšující incidenci buněk s primární řasinkou.....	49
5.3.3.2.	Kožní fibroblasty ovlivněné doxorubicinem vykazující přítomnost vícečetné řasinky	49
5.3.4.	Hodnocení viability a proliferace po ovlivnění taxolem.....	52
5.3.5.	Hodnocení buněčného cyklu po ovlivnění taxolem	54
5.3.6.	Detekce primární řasinky u kožních fibroblastů	55
5.3.6.1.	Ovlivnění kožních fibroblastů taxolem zapříčiňující zvýšení počtu primární řasinky, avšak pouze u nízkých koncentrací	55
5.3.7.	Absence primární řasinky u triple negativních linií karcinomu prsu po ovlivnění kombinací doxorubicinu a taxolu	59
6.	Diskuze	60
6.1.	Diskuze k otázkám vlivu ionizujícího záření na primární řasinku	60
6.2.	Diskuze k otázkám vlivu metabolického stresu indukovaného hladověním na primární řasinku	65
6.3.	Diskuze k otázkám vlivu chemoterapie na primární řasinku	68
7.	Závěr.....	75
8.	Literatura.....	77

Použité zkratky

APC/C - Anafázi podporující komplex

Arl13b - ADP-ribosylation factor-like protein 13B

ATM - Ataxia telangiectasia proteinkináza

ATR - Ataxia telangiectasia Rad-3 related proteinkináza

Bcl-2 - Antiapoptotický protein B-buněk leukemia/lymphoma 2

BT-549 - Lidská nádorová buněčná linie triple negativního karcinomu prsu

Cdk - Cyklin-dependentní kináza

Cdc25 - Serin/threonin proteinfosfatáza

C2C12 - Myší buněčná linie myoblastů izolována ze svalové tkáně

Dapi - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole

DHh - Desert hedgehog

DISC - Smrt indukující signální komplex

DMEM - Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium

DMSO - Dimethyl sulfoxide

DOX - Doxorubicin

EGFR - Receptor pro epidermální růstový faktor

FBS - Fetální bovinní sérum

FGFb - Růstový faktor fibroblastů (basic)

FGFR - Receptor pro růstový faktor fibroblastů

Gy - Gray, jednotka dávky záření

HDAC6 - Histon deacetyláza 6

HEK293 - Lidská buněčná linie odvozená z embryonálních buněk ledvin

Her-2/neu - Receptor pro epidermální růstový faktor 2 (erbB2)

Hh - Hedgehog signální dráha

Chk1 - Checkpoint kináza 1

Chk2 - Checkpoint kináza 2

IFT - Intraflagellar transport
IFT88 - Intraflagellar transport protein 88 homolog
IFT172 - Intraflagellar transport protein 172 homolog
Ihh - Indian hedgehog
KIF3 - Kinesin-related protein 3
LC₅₀ - Střední letální koncentrace
LDH - Laktátdehydrogenáza
MDA – MD - 231 - Lidská nádorová buněčná linie triple negativního karcinomu prsu
PBS - Fosfátový pufr
PDGFR - Receptor pro růstový faktor destiček
PLK - Polo-like kináza
PTC - Patched
Ptch1 - Patched homolog 1
Ptch2 - Patched homolog 2
ROS - Reaktivní kyslíkové radikály
SEM - Střední chyba průměru
SHh - Sonic hedgehog
Smo – Smoothened
Sufu - Suppressor of fused homolog
TcTex1 - Dynein light chain Tctex-type 1
TEM – Transmisní elektronová mikroskopie
VEGF - Vaskulární endoteliální růstový faktor
Wnt - Wingless/Int-1
WST-1 - 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium, monosodná sůl

1. Úvod

Ionizující záření, metabolický stres vyvolaný hladověním a genotoxický stres působí na buňky v několika úrovních. Ovlivňují cytoskeletální stabilitu a morfologii buňky, způsobují poškození DNA – jednovláknovými anebo dvouvláknovými zlomy. Pro buňku jsou nejkritičtější zlomy dvouvláknové. Pokud dojde k poškození DNA, dochází k zástavě buněčného cyklu a k reparaci poškození. Pokud toto poškození není opraveno, nastává buněčná smrt apoptózou, mitotická katastrofa nebo senescence. Primární řasinky jsou mikrotubulární organely, které působí jako fyzikálně-chemické senzory a jejich biologické funkce zahrnují vnímání extracelulárního prostředí, regulaci organogeneze a buněčnou polaritu. Primární řasinky jsou dynamicky regulovány během progresu buněčného cyklu. Dnes je již dobře známo, že porucha nebo ztráta primární řasinky vede k rozvoji ciliopathií a dalších civilizačních onemocnění, do kterých můžeme zařadit kardiovaskulární onemocnění, artrózu a v neposlední řadě nádorová onemocnění. V současné době se také uvádí, že dočasná přítomnost a tvorba primární řasinky je nezbytná pro reparaci poškození některých typů buněk.

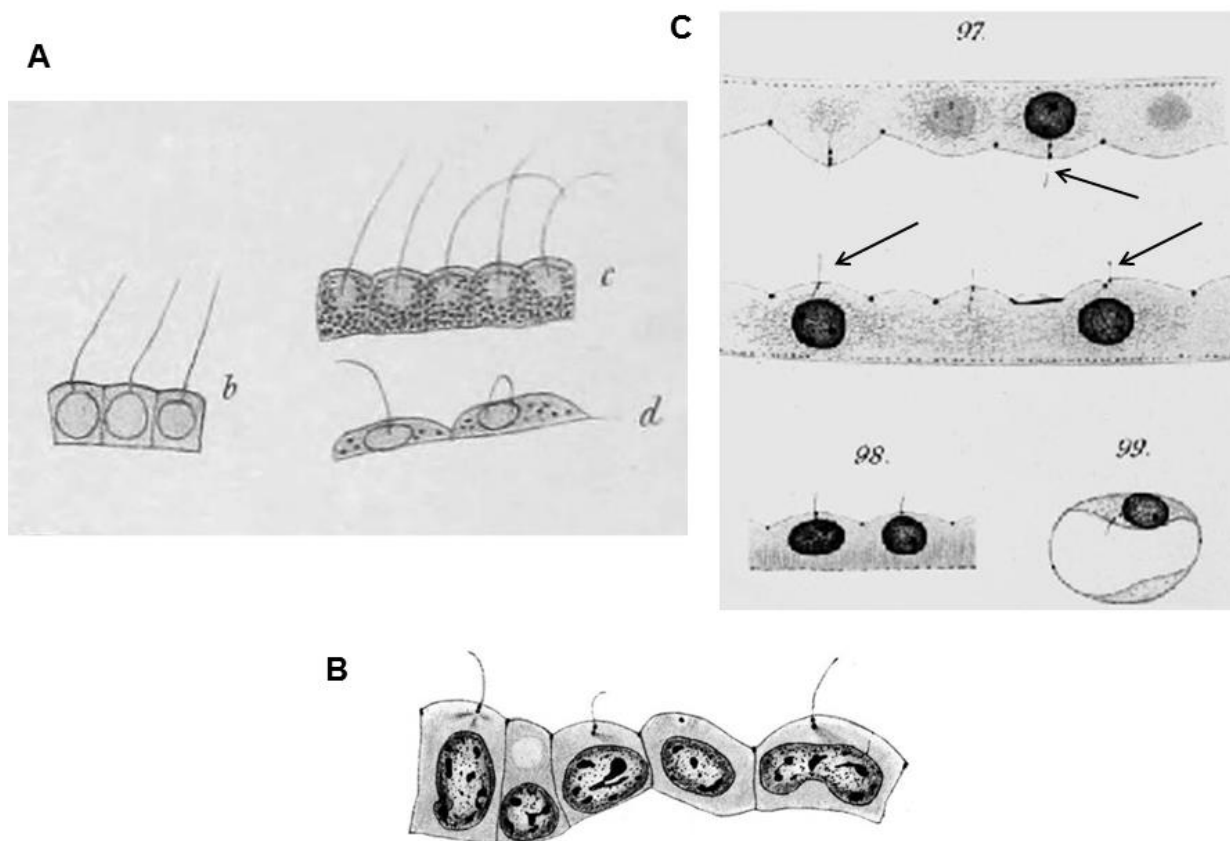
Tato práce je zaměřena na hodnocení změn primární řasinky vyvolaných působením ionizujícího záření, metabolického stresu indukovaného hladověním a cytostatiky taxolu a doxorubicinu v *in vitro* podmínkách.

2. Současný stav problematiky

Tato část práce pojednává a stručně se věnuje historii a současnému pohledu na primární řasinku, její stavbě, sensorické a signální funkci. Dále shrnuje poznatky o přítomnosti primární řasinky u nádorového onemocnění a reakci této sensorické organely na různé typy environmentálního stresu.

2.1. Primární řasinka – historie a současný pohled

Primární řasinka je sensorická, solitární, membránově vázaná, nepohyblivá struktura spojená s centriolem buňky. První doložený důkaz o existenci primárních řasinek se datuje již od roku 1675, kdy van Leeuwenhoek prokázal jejich přítomnost u obratlovců. V průběhu 19. století byla primární řasinka popsána u různých druhů živočichů. Jako první byla detekována Eckerem (1844) u mihule mořské a poté o 23 let později Kowalwskym (1867). V roce 1876 popsal Langerhans primární řasinku u mihule kopinatce a také jako první zaznamenal nepohyblivost této organely (Obr. 1A). Henneguy a Lenhossék objevili v roce 1898 vzájemnou závislost mezi primární řasinkou přítomnou na povrchu buněk a mitotickou aktivitou buněk. Tento objev vedl k vypracování teorie, která se zabývá vzájemnou závislostí mezi primární řasinkou a buněčným cyklem a je platná dodnes (Fonte et al. 1971; Dvořák 2015). Studiu primární řasinky se věnoval i švýcarský anatom K. W. Zimmermann, který poprvé zaznamenal přítomnost primární řasinky na buňkách savců včetně buněk člověka. Zařadil je do kategorie nepohyblivých řasinek a dal jim nový název - centrální bičíky (Obr. 1A, 1B). Zimmermann také teoretizoval o smyslové funkci této organely, nicméně jeho poznatky byly zapomenuty na téměř 110 let (Sloboda 2009). Změna nastala až s vývojem transmisní elektronové mikroskopie, kdy v roce 1962 došlo k opětovnému objevení těchto membránově vázaných struktur a Sorokin jim v roce 1968 přiřadil název „primární řasinky“. Ten je uznáván a používán dodnes (Sorokin 1968). Své znovuobjevení zažívá studium primární řasinky od počátku 21. století. V průběhu několika let se stala nejbouřlivěji studovanou organelou v oblasti buněčné biologie, fyziologie a patofyziologie. Studia jsou zaměřena zejména na poruchy tvorby, struktury a funkcí primární řasinky u onemocnění a vývojových vad (Dvořák 2015).

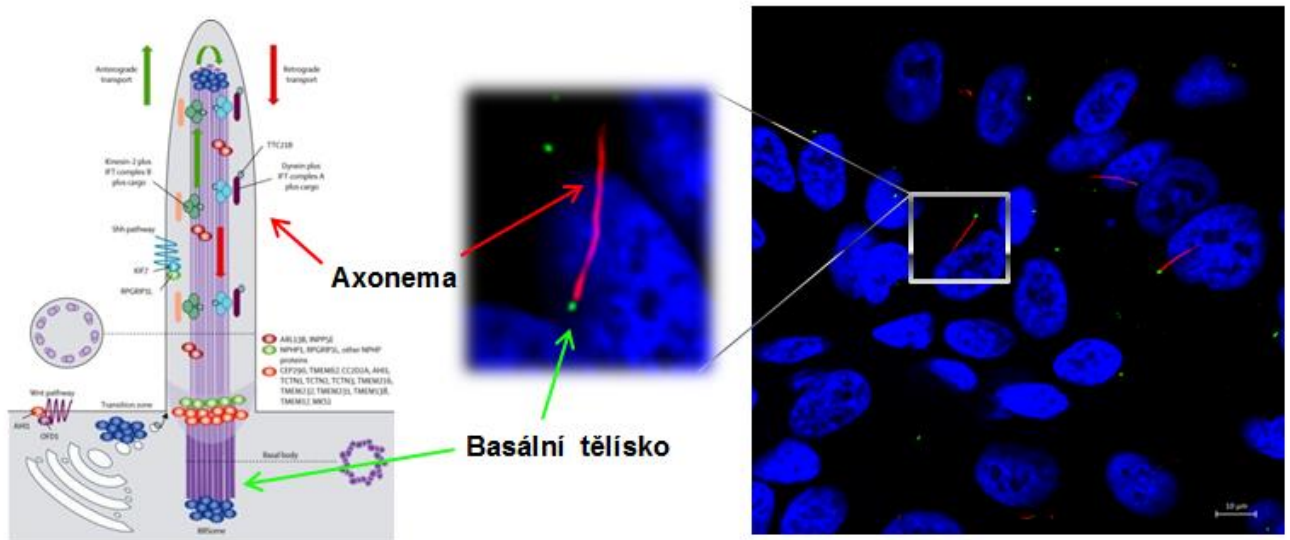


Obr. 1: Kresba primární řasinky. (A) Peritoneální epitelium jater (b), trávicího traktu (c), a vaječníku (d) s primární řasinkou zakreslených Paulem Langerhansem v roce 1876. **(B)** Epitel ledvinového kanálku u králíka s primární řasinkou. **(C)** Lidské epiteální buňky kanálků varlete s primární řasinkou (šipka). Kresby B a C zakresleny Karlem Wilhemem Zimmermannem roku 1898. Převzato z: SLOBODA, R.D. Primary cilia. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press, 2009. ISBN 978-0-08-096282-5.

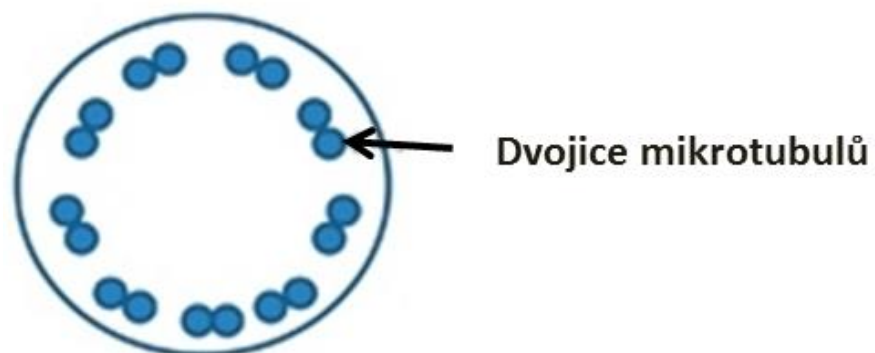
2.2. Stavba primární řasinky a její senzorické funkce

V současné době je známo, že primární řasinku nalezneme na většině buněk obratlovců s výjimkou červených krvinek, adipocytů (Alieva and Vorobjev 2004) a hepatocytů (Sloboda 2009). Primární řasinka je tvořena podlouhlou axonemou z mikrotubulů, jejíž hlavní složkou je α -tubulin. Axonema vyrůstá z bazálního tělíska, které je tvořeno γ -tubulinem (Obr. 2). Délka primární řasinky se pohybuje mezi 2-10 μm a může být až 200-300 nm široká. Tyto rozměry se mění při hladovění, hypoxii, cytotoxickém stresu nebo po ozáření (Sloboda 2009; Yuan et al. 2010; Filipová et al. 2015). Dalším poznávacím znakem pro primární řasinky je typické seskupení mikrotubulů axonemy v počtu 9 + 0 (Obr. 3). Každá buňka má obvykle pouze jednu primární řasinku (Obr. 2) a ta je zapojena svými receptory do morfogeneze a signalizace, které jsou důležité pro proliferaci a diferenciaci buněk (Malone et al. 2007;

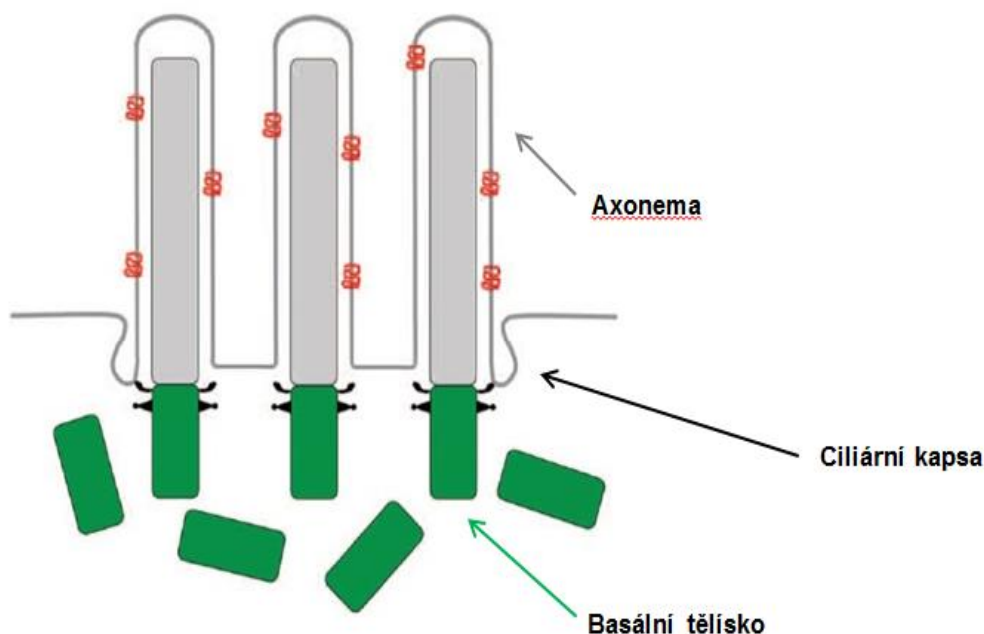
Luesma et al. 2013). Pokud dojde ke zmnožení centrozomů, projeví se to větším počtem primárních řasinek na povrchu buněk o stejné délce a stavbě. Nejčastěji vyrůstají vícečetné primární řasinky ze stejné ciliární kapsy (Obr. 4). Vícečetné řasinky jsou zaznamenány nejvíce u nádorů (Nigg 2006; Nigg et al. 2014), po ozáření (Conroy et al. 2012; Filipová et al. 2015) a nebo u ciliopatií (Lee et al. 2011).



Obr. 2: Stavba primární řasinky. Schematický obrázek převzat z: Romani, M., Alessia, M., Valente, E.M. Joubert syndrome: congenital cerebellar ataxia with the molar tooth. *Lancet Neurol*, 2013, vol. 12, no. 9, s. 894-905.



Obr. 3: Uspořádání mikrotubulů axonemy u primární řasinky. 9 dvojic vnějších mikrotubulů (9 + 0). Upraveno a převzato z: Forsythe, E., Beales, P.L. Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2013, vol. 21, no. 1: s. 8-13.

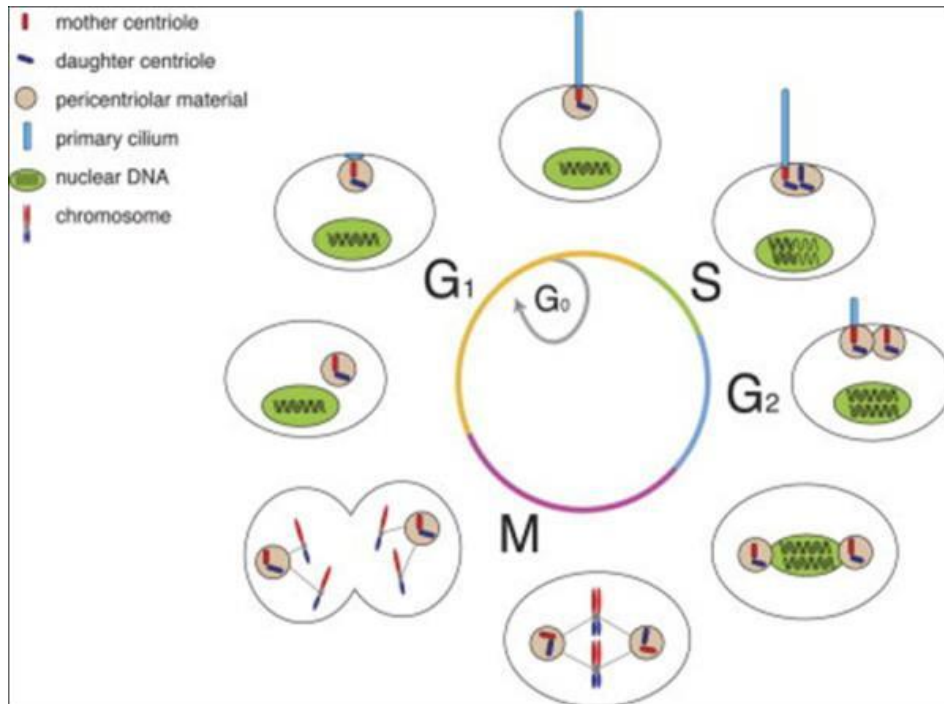


Obr. 4: Vícečetná primární řasinka vyrůstající z jedné ciliární kapsy. Převzato z: Mahjoub, M.R. The importance of a single primary cilium. *Organogenesis*, 2013, vol. 9, no. 2, s. 61-9.

2.3. Primární řasinka a buněčný cyklus

Tvorba a růst primární řasinky je závislá na intraflagelárním transportu (IFT), jehož hlavní úlohou je přeprava strukturálních a signálních proteinů důležitých pro její vznik. Primární řasinky jsou dynamicky regulovány během progresu buněčného cyklu a v průběhu G0/G1 fáze buněčného cyklu a jsou resorbovány před vstupem do mitózy v procesu spojeném s deacetylací tubulinu, díky HDAC6 - Histon deacetyláze 6 (Obr. 5; Pugacheva et al. 2007). K resorpci dochází na přechodu G0/G1 fáze, S a G2/M fáze. Přesný moment rozpuštění primární řasinky je závislý na typu buněk a dále na expresi genů, které ovlivňují resorpci, jako je *Aurora A*, *Plk1*, *TcTex-1* (Spalluto et al. 2013; Li et al. 2011). Po resorbování primární řasinky se centrozom přemístí k jádru buňky, je uvolněn centriol, ten plní roli mitotického vřeténka v průběhu mitózy (Plotnikova et al. 2008, Plotnikova et al. 2009; Seeley and Nachury 2010; Kim and Tsiokas 2011). Po dokončení mitózy se centrozom přesune k povrchu buňky a opět formuje bazální tělisko z mateřské centrioly, což je základ pro růst a prodlužování primární řasinky. Musíme si zde uvědomit, že bazální tělisko a mateřský centriol je v podstatě stejná mikrotubulární struktura, která se pohybuje v závislosti na buněčném cyklu. Při mitóze jde o centriol, který organizuje mitotické vřeténko. Při tvorbě

primární řasinky mluvíme o bazálním tělisku (Seeley and Nachury 2009). Dalším důkazem, že primární řasinka je ovlivňována a ovlivňuje buněčný cyklus, je výrazné prodloužení primární řasinky u buněk, které vykazují oddálení přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu (Kim et al. 2011; Kim and Tsiokas 2011).



Obr. 5: Schématické znázornění buněčného cyklu a cyklu primární řasinky. Převzato z: Lessman, C.A. Centrioles in the zebrafish (*Danio rerio*): a review including the related basal body. *Cilia*, 2012, vol. 1, no. 1, s. 9.

2.3.1. Regulační proteiny buněčného cyklu a primární řasinky

Vztah mezi buněčným cyklem a primární řasinkou je velmi těsný. Již víme, že spolu sdílí stejnou mikrotubulární strukturu (mateřský centriol/bazální tělisko). Dále pak mají podobnost i na úrovni regulačních proteinů (Pan and Snell 2007). Jedním z proteinů shodných pro regulaci buněčného cyklu a depolymeraci mikrotubulů primární řasinky je Aurora kináza A (Pugacheva et al. 2007). Aurora kináza A ovlivňuje dynamické procesy v primární řasince, jako je resorpce a regenerace v proliferujících buňkách, protože tato mitotická kináza se v pozdní G1 a rané S fázi nachází hned vedle centrozomu. Aktivovaná Aurora kináza A mimo S fázi podporuje vstřebávání primární řasinky při opětovném vstupu do G₀/G₁ fáze a inhibuje její regeneraci. Aurora kináza A také depolymeruje mikrotubuly a tudíž i přispívá k resorpci primární řasinky. K resorpci dochází díky aktivované Aurora kináze A a aktivovanému

HDAC6, které spouští deacetylaci α -tubulinu, jež je hlavní složkou axonemy primární řasinky (Pugacheva et al. 2007). Zvýšená exprese Aurory kinázy A i amplifikace stejnojmenného genu může souviset s rozvojem některých typů karcinomů, jako je karcinom plic, prsu, hlavy a krku (Goto et al. 2013).

2.4. Primární řasinka a její senzorycká funkce

Primární řasinka hraje významnou roli v buněčné signalizaci v průběhu embryonálního vývoje obratlovců, působí jako fyzikálně-chemický senzor a její biologická funkce zahrnuje vnímání extracelulárního prostředí, regulaci organogeneze a buněčnou polaritu. Primární řasinky se nachází u různých typů buněk. V závislosti na typu buňky primární řasinka exprimuje různé typy receptorů, iontových kanálů a aktivních signálních drah (Pazour and Witman 2003). Nejdůležitějšími signálními receptory, ovlivňujícími proliferaci a přežití, jsou EGFR (Epidermal growth factor receptor), PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor) a FGFR (Fibroblast growth factor receptor). Ze signálních drah, které mohou ovlivňovat funkci jednoho nebo více orgánů, jmenujme Hedgehog (Hh), Notch, nebo Wnt. Díky receptorům a signálním drahám plní primární řasinka také funkci chemosenzoryckou. Tato funkce umožňuje primárním řasinkám detekovat specifické ligandy pro Notch (Leitch et al. 2014), hormony a biologicky aktivní látky, jako serotonin nebo somatostatin (Satir et al. 2010). Mezi další specifické funkce, které vykazuje primární řasinka o rozdílné délce, můžeme zařadit reakci na změnu teploty, gravitace a osmolality (Dvořák 2015).

Některé signální dráhy, jako je Hh, jsou umístěny výhradně v primárních řasinkách (Schneider et al. 2005). Musíme si uvědomit, že signální dráha Hh je velmi důležitá z důvodu lokalizace klíčových signálních proteinů v primární řasince, ovlivňuje růst buněk a jejich diferenciaci během vývoje a defekt Hh signální dráhy je často prvním krokem ke karcinogenezi (Peluso et al. 2014).

Primární řasinka má další významnou roli u několika lidských onemocnění - ciliopathií. Ciliopathiemi jsou označovány vady signálních drah lokalizovaných v primární řasince. Jsou spojeny například s fibrózou jater, slepotou, hluchotou, polydaktylií, mentální retardací, obezitou a diabetem. Tyto syndromy jsou závislé na správném uspořádání a schopnosti přenosu signálů v primární řasince (Kiprilov et al. 2008; Fry et al. 2014).

2.5. Primární řasinka a signální dráha Hedgehog

Tato signální dráha se nazývá podle polypeptidového ligandu, mezibuněčné signální molekuly s názvem Hedgehog (Hh). Samotný gen Hedgehog a signální dráha pro něj byly popsány v roce 1980 Dr. E. Wieschaussem a Dr. C. Nusslei-Volhardovou při genetické analýze segmentace octové mušky *Octomilky* obecné (*Drosophily melanogaster*) (Dvořák 2015). Za tento objev jim později byla udělena Nobelova cena. Počátkem devadesátých let bylo zjištěno, že obratlovci mají tři geny Hh: *Sonic hedgehog (SHh)*, *Desert hedgehog (DHH)* a *Indian hedgehog (IHH)*, které kódují stejnojmenné proteiny (Xie 2008). Proteiny Hh jsou sekreční molekuly s účinky na sousední a vzdálené buňky. Ze tří ligandů a stejnojmenných genů Hh savců se *SHh* nejvíce podobá homologu Hh u *Drosophily* a je nejlépe prostudován (Saqui-Salces and Merchant 2010).

Hlavním receptorem proteinů Hh je Patched (PTC), jeden PTC u *Drosophily* a dva PTC u obratlovců: Patched homolog 1 a 2 - *Ptch1* a *Ptch2* (Xie 2008). Buněčná odpověď na proteiny Hh je určována poměrem mezi počtem receptorů *Ptch* na buňce s navázaným proteinem Hh a počtem receptorů bez navázaného proteinu Hh (Casali and Struhl 2004). Všechny tři ligandy *SHh*, *DHH* a *IHH* se váží se stejnou afinitou k 12-transmembránovému receptoru Patched (*Ptch1*), který je produktem nádory suprimujícího genu (*Ptch1*). Tento protein brání signalizaci Hh tím, že inhibuje 7-transmembránový receptor spřažený s G proteinem Smoothened (*Smo*), který je produktem onkogenu *Smo* (Wong et al. 2009). V případě, že není přítomen ligand Hh, se *Smo* nachází intracelulárně. Cytoplazmatický ocas *Smo* slouží jako nidus pro akumulaci transkripčních faktorů rodiny Glioblastomu (Gli), které vytvářejí komplex s regulačními proteiny, například Costal 2 (*Cos*), Fused (*Fu*) a Suppressor of Fused (*Sufu*). Po vazbě ligandu Hh na *Ptch1* je uvolněna inhibice *Smo*, *Smo* migruje z buňky do membrány primární řasinky a Gli migruje k jádru, kde se váže na cílové geny. Tato hlavní signální dráha Hh, která je závislá na transkripčním faktoru Gli, se nazývá kanonická. Postupně přibývá důkazů, že kromě této kanonické signální dráhy Hh mohou všechny tři ligandy *SHh*, *DHH* a *IHH* aktivovat signální dráhy nezávislé na Gli, které se nazývají nekanonické a ty mohou mít význam například v angiogenezi (Jenkins 2009; Chinchilla et al. 2010).

Signální dráha Hh u *Drosophily*, kde byla objevena, se nenachází v primární řasince. Po objevu intraflagelárního transportu a jeho biochemické charakterizaci bylo zjištěno, že ústřední roli v signalizaci morfogenů Hh a Wnt obratlovců hraje primární řasinka (Huangfu

and Anderson 2005; Seeley and Nachury 2009). U obratlovců včetně člověka se signální dráhy Hh a Wnt u většiny typů buněk nachází v primární řasince. Doposud není objasněno, proč je primární řasinka potřebná k modulaci signalizace Hh a Wnt u obratlovců, nikoliv u nižších organismů (Seeley and Nachury 2009).

U obratlovců, včetně člověka, mají primární řasinka a intraflagelární transportní proteiny integrální roli v signální dráze Hh. K poruše signalizace Hh může dojít nejen mutací genu *Ptch*, *Smo* nebo *Gli*, ale i poruchou struktury nebo funkce primární řasinky, nejčastěji poruchou intraflagelárních transportních proteinů (IFT). Mutace intraflagelárního transportního proteinu IFT172 zapříčiňuje defekty neurální trubice na modelu myši (Huangfu and Anderson 2005). Řada následných prací prokázala, že *Ptch*, *Smo* a *Gli* jsou všechny lokalizovány v primární řasince, kde jsou v závislosti na Hh dynamicky dopravovány do a z primární řasinky (Corbit et al. 2005; Haycraft et al. 2005; Rohatgi et al. 2007). Defekty v tvorbě primární řasinky zabraňují tvorbě Gli a aktivační a represivní funkci Gli v závislosti na signálech Hh (Obr. 6; Liu et al. 2005; Haycraft et al. 2005).

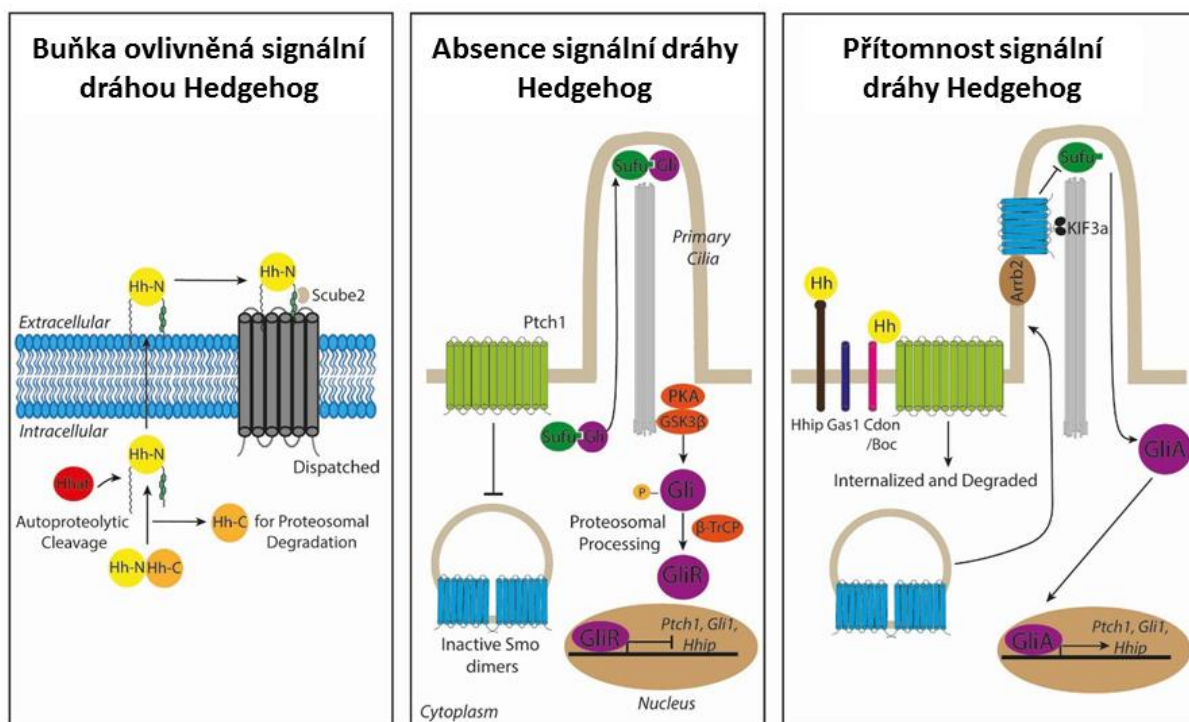
2.5.1. Primární řasinka a inhibitory signální dráhy Hedgehog

V současné době probíhá 46 klinických studií, hodnotících účinnost inhibitorů signální dráhy Hh u různých typů malignit (<http://clinicaltrials.gov>). Přímým inhibitorem proteinu SHh je synteticky připravená malá molekula robotnikinin (Stanton and Peng 2010). Protein Sonic hedgehog byl svými objeviteli pojmenován podle oblíbené dětské videohry z počátku devadesátých let O ježkovi Soníkovi. V této videohře má ježek Soník svého nepřítele jménem Dr. Robotnik. Objevitelé inhibitoru proteinu Sonic Hedgehog jej pojmenovali robotnikinin podle postavy Dr. Robotníka, v duchu původní terminologie.

Mezi studované inhibitory receptoru Smo patří cyklopamin, jervin, KAAD-cyklopamin, IPI-926, SANT1,2,3,4, Cur-61414, BMS-833923/XL139, PF-04449913, LDE-225, LEQ506a vismodegib (Stanton and Peng 2010; Merchant and Matsui 2010). Cyklopamin a jervin jsou steroidní alkaloidy, izolované z jednoděložné rostliny kýchavice kalifornské (*Veratrum californicum*). Mají teratogenní účinky, inhibicí signální dráhy Hh mohou způsobovat vývojové vady, včetně kyklopie. Cyklopamin je studován v léčbě bazocelulárního karcinomu, meduloblastomu a rabdomyosarkomu. KAAD-cyklopamin je chemicky modifikovaný derivát cyklopaminu se zvýšenou účinností a sníženou toxicitou. IPI-926 je další derivát cyklopaminu, perorální inhibitor receptoru Smo (Tremblay et al. 2009). V současné době probíhají I. a II. fáze klinických studií léčby IPI-926 karcinomu hlavy a krku, pankreatu,

chondrosakomu, a dalších. V současné době probíhají I. a II. fáze klinických studií, u kterých jsou použity malé molekuly, perorální inhibitory receptoru Smo - BMS-833923/XL139, PF-04449913, LDE-225 a LEQ506 (<http://clinicaltrials.gov>).

Jako velmi perspektivní se jeví synteticky připravený perorální inhibitor receptoru Smo vismodegib (dříve GDC-0449). Zatím jsou dostupná data z II. fáze klinické randomizované dvojitě zaslepené studie, jejíž výsledky byly prezentovány na výroční konferenci AACR v Orlando v dubnu 2011. Tato studie prokázala účinnost vismodegibu v prevenci vzniku bazocelulárního karcinomu u pacientů se syndromem névoidního bazaliomu (Tang et al. 2012). V současné době probíhají II. fáze klinických studií léčby vismodegibem bazocelulárního karcinomu, meduloblastomu, karcinomu prsu, metastatického kolorektálního karcinomu, karcinomu žaludku, pankreatu, malobuněčného karcinomu plic, chondrosarkomu a dalších (<http://clinicaltrials.gov>). Transkripci zprostředkovanou transkripčním faktorem Gli inhibuje staurosporinon, zerumbon, physalin B, physalin F, "Hh pathway inhibitor" (HPI-1,2,3,4), "Gli-antagonist" GANT58 a GANT61 (Stanton and Peng 2010; Merchant and Matsui 2010).



Obr. 6: Signální dráha Hedgehog a primární řasinka. Převzato a upraveno z: Cochrane, C.R., Szczepny, A., Watkins, D.N., Cain, J.E. Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*, 2015, vol. 7, no. 3, s. 1554-1585.

2.6. Poruchy primární řasinky u nádorových onemocnění

Primární řasinka je klíčovou organelou morfologické a funkční buněčné stability (Fry et al. 2014). Představuje důležitou buněčnou strukturu v interakci s mikroprostředím buňky. U některých druhů nádorů dochází k odpovědi na poškození DNA pomocí proteinů, které jsou aktivovány v premaligním stádiu onemocnění, avšak jsou potlačeny v pozdních stádiích tumoru. Tyto události ovlivňují funkční a morfologickou stabilitu buněk, stejně jako jejich schopnost reagovat na podněty mikroprostředí. Primární řasinka hraje důležitou roli u nádorových onemocnění. Společným rysem pro tato onemocnění je porucha nebo úplná ztráta primární řasinky. U nádorů, které vykazují mutaci aktivační dráhy Hedgehog, je možné detekovat buňky s primární řasinkou ve zvýšeném množství, s abnormální délkou a nepravidelnou strukturou mikrotubulů (7 + 3), (9 + 2), namísto (9 + 0) (Hassounah et al. 2013). Nedávné studie popisují výskyt primární řasinky u několika typů nádorů, jako například renální karcinom, karcinom vaječníků, prsu, slinivky břišní nebo prostaty (Schraml et al. 2009; Seeley et al. 2009; Gradilone et al. 2013; Egeberg et al. 2012; Hassounah et al. 2013; Basten et al. 2013), a to hlavně ve stromatu nádoru nebo na povrchu fibroblastů asociovaných s nádorem. Poškozená nebo chybějící primární řasinka u nádorových buněk může modulovat buněčnou odpověď v mikroprostředí nádoru (Hubbert et al. 2002) a vést k rychlosti jeho růstu a vývoje (Basten et al. 2013).

2.6.1. Primární řasinka u nádorů prsu

Během vývoje mléčné žlázy dochází k formování a rozvětvení mléčných kanálů. V této fázi vývoje se primární řasinka objevuje u buněk luminálního epitelu, dále pak u epitelových a stromálních buněk. Jakmile je větvení kanálů ukončeno, primární řasinka zmizí z luminálního epitelia, ale přetrvává v myoepiteálních a stromálních buňkách (McDermott et al. 2010). Bylo prokázáno, že lidské prsní nádorové tkáně nebo jejich odvozené buněčné linie vykazují sníženou frekvenci primární řasinky, nebo ji kompletně postrádají (Yuan et al. 2010; Nobutani et al. 2014). Pokud je primární řasinka přítomna u nádoru prsu, je to převážně u stromálních buněk spojených s nádorem, u buněčných linií odvozených od subtypu neoplázií triple negativního karcinomu prsu a u fibroblastů asociovaných s nádorem (Yuan et al. 2010). Primární řasinka detekovaná u buněk nádoru prsu bývá nejčastěji velmi krátká. Změny v délce primární řasinky mají za následek zhoršenou signalizaci a funkční abnormality (Menzl et al. 2014).

Ve studii na buněčné linii odvozené od zdravé prsní tkáně byla detekována primární řasinka u 70 % fibroblastů a 7-19 % epiteliálních buněk (Yuan et al. 2010). Z 11 sledovaných buněčných linií odvozených od karcinomu prsu byla primární řasinka pozorována pouze u 4 těchto linií a to ve velmi nízké frekvenci (0,3 % - 4 %), zatímco u zbývajících 7 buněčných linií nebyla primární řasinka vůbec detekována. Všechny buněčné linie, které vykazovaly přítomnost primární řasinky, i když ve velmi nízkém počtu, byly bazálního subtypu, což koresponduje s vlastnostmi triple negativního karcinomu prsu. Výskyt primární řasinky se snížil se zvyšující se progresí a transformací nádoru. Primární řasinka je vždy pozorována u fibroblastů a myoepiteliálních buněk. Nižší výskyt této organely je u luminálního epitelia z nenádorové tkáně. Ve studii s 26 vzorky karcinomu prsu byla primární řasinka detekována pouze ve výjimečných případech a to hlavně u epiteliálních buněk. Primární řasinka nebyla detekována u žádného triple negativního karcinomu prsu použitého v této studii. Výsledky studie ukazují na ztrátu primárních řasinek u karcinomu prsu a také na sdružení primárních řasinek s bazálním B podtypem rakoviny prsu (Yuan et al. 2010). Genotypově je triple negativní karcinom prsu charakterizován jako bazální subtyp B, fenotypově se vyznačuje nepřítomností estrogenových a progesteronových receptorů, receptorů Her2/neu (Habib and O'Shaughnessy 2016) a velmi sporadickou přítomností primárních řasinek.

2.7. Primární řasinka a ionizující záření

Pokud dojde u eukaryotické buňky k poškození DNA, je aktivována složitá signalizační kaskáda odezvy na poškození. Buněčný cyklus je zastaven v G1 / S nebo G2/M fázi, poté jsou spuštěny opravy DNA. Pokud nedojde k reparaci poškození, je aktivována kaskáda buněčné smrti apoptózou, mitotickou katastrofou nebo dojde k senescenci (stresem indukované předčasné stárnutí). Selhání těchto mechanismů vede k nestabilitě genomu a ke karcinogenezi. Nejnebezpečnější léze DNA jsou kompletní dvojité zlomy DNA, které mohou být vyvolané ionizujícím zářením. Během několika minut po ozáření dochází k aktivaci ataxie-telangiectasia-mutated (ATM) a ATM-related (ATR) kináz (Bakkenist and Kastan 2003). Aktivované ATM a ATR hrají klíčovou roli v odpovědi na poškození DNA, fosforylací přenášejí signály na mnoho následných cílů, včetně kontrolních bodů kináz Chk1 a Chk2 (Kastan and Bartek 2004; Lavin et al. 2005; Vávrová et al. 2013). V ozářených buňkách je takzvanou mitochondriální cestou převážně iniciována apoptóza vnitřní. Tato cesta je aktivována ionizujícím zářením, volnými radikály, působením virů, tedy všemi signály z vnitřního prostředí buňky. Prvním krokem k aktivaci je poškození DNA. Dále dochází k fosforylaci proteinu p53 a iniciaci proapoptotických členů rodiny Bcl-2 (Bax, Bam, Bim,

Bid, Puma, Noxa). Po ozáření buňky se aktivují proapoptotické členy rodiny Bcl-2, naváží se na mitochondriální membrány. To způsobí vylití cytochromu c do cytoplazmy a následné vytvoření apoptozomu. V apoptozomu dochází k aktivaci prokaspázy 9 na aktivní kaspázu 9 a ta pak aktivuje prokaspázu 3. Aktivní kaspáza 3 je nejvýznamnější efektorovou kaspázou a zodpovídá za vlastní apoptický proces. V buňce pak vznikají charakteristická apoptotická tělíska a ta jsou fagocytována řadou buněk, např. makrofágy (Řezáčová a Vávrová 2011).

Vznik a zánik primární řasinky je úzce spojen s duplikací centrozomu při buněčném cyklu, protože bazální tělísko je vytvořeno z mateřské centrioly. Za normálních podmínek dochází k duplikaci centrozomu pouze jednou v rámci celého buněčného cyklu. Duplikace centrozomu vyžaduje aktivitu cyklindependentních kináz tak, že je koordinována s replikací DNA, ale také zahrnuje procesy koordinace uvolnění a upevnění centriol (Nigg and Raff 2009; Inanç et al. 2010).

I když ozáření indukuje násobení centrozomů, účinek této skutečnosti na primární řasinku nebyl dosud dostatečně studován. Zvýšené procento buněk s jednočetnou primární řasinkou bylo pozorováno po ozáření gama paprsky a příležitostně byla pozorována vícečetná řasinka a to po ozáření u buněčné linie epitelu sítnice hTERT-RPE1 (Conroy et al. 2012), UV záření anebo vystavení tepelnému šoku (Villumsen et al. 2013). Abnormální vícečetné centrozomy byly pozorovány v buňkách s poškozenou DNA po vystavení ionizujícímu záření (Kawamura et al. 2004; Dodson et al. 2004; Bourke et al. 2007; Dodson et al. 2007; Inanç et al. 2010). Bylo také zjištěno, že inhibice ATM a ATR kinázy snižuje vícečetnost centrozomů (Dodson et al. 2004). Tento stav také ovlivňuje aktivita Chk1, což je zatím nevysvětleno. Avšak zdá se, že formování primární řasinky je závislé jak na funkčním přispění mateřské centrioly, tak i na zralé pericentriální matrix (Ishikawa et al. 2005; Graser et al. 2007; Moser et al. 2010; Conroy et al. 2012).

2.8. Odpověď primární řasinky na metabolický stres indukovaný hladověním

Hladovění je jedna z nejvíce používaných technik indukce stresu v molekulární biologii pro svoji rychlou a dynamickou odpověď. Mechanismus účinku hladovění spočívá v redukcii bazální aktivity. Jednotné snížení bazální aktivity intracelulárních signálních drah vede k synchronizaci proliferující buněčné kultury. Dochází k rychlejšímu vstupu do klidové G0/G1 fáze, kde mohou buňky setrvat a dochází tak k bloku v této fázi buněčného cyklu, než dojde k restimulaci sérem (Pirkmajer and Chibalin 2011). Aby buňka přežila tento typ stresu,

musí dojít k rozpadu proteinů, nukleových kyselin a organel, aby se nastartoval a znovu obnovil energetický metabolismu (Dvořák 2015). Buněčné hladovění se používá ve studiu molekulárních mechanismů zahrnující degradaci proteinů, aerofagii, apoptózu, anebo pro stimulaci patologických stavů, jako je hypoxie (Pirkmajer and Chibalin 2011).

Studie s buněčnou linií lidských embryonálních buněk ukazují, že hladovění po dobu 24 hodin způsobuje ciliogenezi téměř u 50 % buněk a také signifikantní prodloužení primární řasinky z 1 μm na \sim 4-6 μm (Kiprilov et al. 2008, Schneider et al. 2005). Dále způsobuje synchronizaci buněk, blok v G0/G1 fázi buněčného cyklu a tyto indukční stimuly zvyšují počet buněk s primární řasinkou, prodlužují její délku v závislosti na typu buněčné kultury (Dvořák 2015).

2.9. Primární řasinka a cytotoxický stres vyvolaný chemickými látkami

2.9.1. Doxorubicin a taxol

Cytotoxický účinek byl sledován u buněk s primární řasinkou po ovlivnění cytostatiky doxorubicinem a taxolem. Doxorubicin a taxol patří mezi chemoterapeutika užívaná jako standardní protinádorová léčba u karcinomu prsu spolu s cílenou terapií na α -HER2/neu receptor. Doxorubicin patří do skupiny antracyklinů, taxol řadíme mezi taxany. Doxorubicin je efektivní interkalační cytostatikum používané při léčbě různých druhů nádorů, nejčastěji se užívá v kombinaci s taxolem při neoadjuvantní a adjuvantní léčbě u pacientů s nádorem prsu (Hofman et al. 2015). Mechanismus účinku tohoto cytostatika spočívá v inhibici replikace DNA ve všech fázích buněčného cyklu a díky tomu dochází k zamezení množení buněk a růstu nádoru (Cheung-Ong et al. 2013). Taxol patří mezi cytostatika, která inhibují vývoj nádoru díky vazbě na mikrotubuly. Díky této vazbě dochází k inhibici depolarizace mikrotubulů, což se projeví omezením nebo úplným inhibováním M fáze buněčného cyklu, tedy dělení buňky (Kopczyńska 2015; Jordan et al. 1993). Tato dvě cytostatika také indukují fosforylaci bcl-2 přes předem determinovanou kaskádu dějů, které v podstatě mají vliv na buněčnou smrt formou apoptózy (Kopczyńska 2015).

Ve studiu účinku cytostatik na primární řasinku je nejvíce prací zaměřeno na vliv taxolu a na prodlužování nebo zkracování primární řasinky. Ve studii, kterou provedl Sharma et al., bylo prokázáno, že taxol, jež inhibuje depolymeraci mikrotubulů, blokuje prodlužování primárních řasinek buněk savců (Sharma et al. 2011). Avšak pokud je tento inhibitor podán buněčné kultuře v nízké koncentraci, dojde ke zvýšení množství volných podjednotek

tubulinu v cytosolu a to vede k prodloužení primárních řasinek (Bershteyn et al. 2010; Kim et al. 2010). Vyšší koncentrace taxolu způsobí vyšší a rychlejší inhibici depolymerace a tím zapříčiní i blokaci vzniku primární řasinky, jak uvádí Jesen et al. ve své práci (Jensen et al. 1987).

Studie, věnující se sledování změn primární řasinky po aplikaci doxorubicinu, nebyly zatím publikovány. V našich experimentech byly v tomto směru dosaženy zajímavé výsledky, viz. níže.

3. Cíl práce

Hlavním cílem mé dizertační práce bylo hodnocení vlivu faktorů vyvolávajících stresovou reakci na buňku s následnou nestabilitou cytoskeletu buňky se zaměřením na primární řasinku.

Práce zhodnocuje vliv následujících faktorů na primární řasinku, cytoskeletální nestabilitu, na průběh buněčného cyklu a buněčné smrti:

- a) fyzikálních faktory - ionizující záření;
- b) faktory ovlivňující buněčný metabolismus formou metabolického stresu vyvolaného sérovým hladověním;
- c) vliv chemické látky - cytostatika, používaná především v léčbě karcinomu prsu (doxorubicin a taxol).

4. Materiál a metodiky

4.1. Buněčné linie a jejich kultivace

4.1.1. C2C12

Myší buněčná linie myoblastů izolována ze svalové tkáně z firmy ATCC (USA, kat.číslo: CRL-1772). C2C12 byla kultivována v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium, Sigma-Aldrich, USA) s přidáním 10% fetálního telecího séra (PAA, USA), 1% penicilinem/streptomycinem (Gibco, UK) a 2% glutaminem (Gibco, UK) v 5% CO₂ při 37 °C.

4.1.2. MDA-MB-231

Buněčná linie triple negativního karcinomu prsu MDA-MB-231 byla poskytnuta od Mgr. Jaroslava Truksy, PhD. z Biotechnologického ústavu AV ČR, v.v.i. MDA-MB-231 byla kultivována v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium, Sigma-Aldrich, USA) s přidáním 10% fetálního telecího séra (PAA, USA), 1% penicilinem/streptomycinem (Gibco, UK) a 2% glutaminem (Gibco, UK) v 5% CO₂ při 37 °C.

4.1.3. BT-549

BT-549 – triple negativní linie karcinomu prsu byla zakoupena od firmy ATCC (USA, kat.číslo: HTB-122). Buněčná linie BT-549 byla kultivována v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium, Sigma-Aldrich, USA) s přidáním 10% fetálního telecího séra (PAA, USA), 1% penicilinem/streptomycinem (Gibco, UK) a 2% glutaminem (Gibco, UK) a 0.023 IU/ml inzulinem (Sigma, USA) v 5% CO₂ při 37 °C.

4.1.4. Izolované lidské fibroblasty ze zdravé tkáně

Izolované fibroblasty byly získány z biopsie kůže odebrané od pacientů po plastické operaci prsu. Všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas, který byl požadován etickou komisí Lékařské fakulty v Hradci Králové. Vyizolované lidské fibroblasty byly kultivovány v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium, Sigma-Aldrich, USA) s přidáním 10% fetálního telecího séra (PAA, USA), 1% penicilinem/streptomycinem (Gibco, UK) a 2% glutaminem (Gibco, UK) v 5% CO₂ při 37 °C. Pro všechny experimenty byly použity pasáže 10-12.

4.2. Izolace lidských fibroblastů z kožní biopsie

Kožní štěpy byly transportovány v základním roztoku na ledu. Základní roztok byl namíchan z 1,4625 g HBSS (Hanks' Balanced Salt solution, Sigma-Aldrich, USA), 0,0525 g NaHCO₃ (hydrogenuhličitan sodný), které byly rozpuštěny v 148,5 ml destilované vody a byl přidán Penicillin/Streptomycin (Gibco, UK). Za stálého míchání bylo změřeno pH 7,2 - 7,5. Ve vysterilizovaném laminárním boxu byl roztok přefiltrován do 50 ml zkumavek (Sigma-Aldrich, USA) a skladován při -20 °C po dobu 3 měsíců.

Poté byly štěpy opláchnuty v PBS (Phosphate Buffered Saline) a vloženy do roztoku dispázy, ve které byly inkubovány přes noc při 4 °C. Po uplynutí inkubace byly štěpy promyty vytemperovaným PBS a pomocí pinzet stáhnuty epidermis. Po dalším oplachu byla dermis nastříhána nůžkami na co nejmenší kousky a přenesena do plastové zkumavky s 10 ml digesčního roztoku. Digesční roztok vznikl smícháním 30 ml základního roztoku, 15,2 mg Collagenase I (Gibco, UK) a 57 mg Dispase II (Gibco, UK). Po úplném rozpuštění všech komponentů byl roztok přefiltrován a skladován po dobu 1 měsíce při -20 °C. Zkumavky s nastříhanou dermis byly přemístěny do skříňové třepačky (37 °C/230 rpm). Přesně po 6 hodinách byl obsah zkumavky přefiltrován do 50 ml zkumavky. Suspenze v plastové zkumavce byla zcentrifugována 10 minut/1200 rpm/22 °C. Supernatant byl dekantován a buněčný sediment byl resuspendován v 10 ml kultivačního média a přenesen do kultivační lahve T75 (TPP, Švýcarsko).

4.3. Ozařování

Myoblasty C2C12 byly ozařeny ⁶⁰CO γ -zářičem (Chisotron; Chirana, Česká republika). Příkon zářiče byl 0,4-2 Gy/min. Buňky byly ozařovány 1 m od stroje v ionizační komoře (Dosemeter PTW Unidos 1001, sériové číslo 11057, ionizační komora PTW TM 313, sériové číslo. 0012; RPD Inc., USA) dávkami 2, 6, 10 a 20 Gy. Po ozaření byly C2C12 inkubovány v 5% CO₂ při 37 °C po dobu 24, 72 a 144 hodin a poté zpracovány pro další analýzu.

4.4. Metabolický stres indukovaný hladověním

Buněčná linie C2C12 byla vyhladověna užitím kultivačního média se sníženým obsahem (0,5 %) FBS a byla inkubována při 37 °C/5% CO₂ po dobu 6, 12, 24, 48, 72 a 120 hodin.

4.5. Cytostatika

Pro experimenty na buněčných liniích MDA-MB-231, BT-549 a kožních fibroblastech byla použita cytostatika doxorubicin (Sigma-Aldrich, USA) a paklitaxel (obchodní název Taxol®; Sigma-Aldrich, USA). Doxorubicin a taxol byly rozpuštěny v 0,5% DMSO (dimethyl sulfoxide; Sigma-Aldrich, USA) a byl vytvořen zásobní roztok o koncentraci 1 mM. Před použitím byl doxorubicin rozředěn v kultivačním médiu v poměru 1:100 a taxol v poměru 1:1000. MDA-MB-231, BT-549 a kožní fibroblasty byly ovlivněny doxorubicinem o koncentracích 10, 20, 40, 80 a 120 nM a taxolem o koncentracích 1,25; 3,25; 5,25; 6,25 a 12,5 nM (72 h, 37 °C, 5% CO₂).

4.6. Stanovení viability a proliferace pomocí WST-1 testu

Ke zjištění viability a proliferace buněčné linie C2C12 72 hodin po ozáření dávkami 2, 6, 10 a 20 Gy a po hladovění (0,5% FBS) byl použit WST-1 test (Roche; Basel, Švýcarsko). C2C12 byly ozářeny nebo hladověny v 96 - jamkové destičce (Sigma-Aldrich, USA). WST-1 test byl dále použit u buněčných linií MDA-MB-231, BT-549 a kožních fibroblastů, které byly ovlivněny doxorubicinem o koncentracích 10, 20, 40, 80 a 120 nM a taxolem o 1,25; 3,25; 5,25; 6,25 a 12,5 nM a inkubovány v 96 – jamkových destičkách. Do každé jamky bylo nasazeno 1×10^3 buněk do 100 μ l kultivačního média a inkubováno 72 hodin v 5% CO₂ při 37 °C. Po uplynutí 72 hodin bylo přidáno do každé jamky 10 μ l WST-1 činidla. Výsledné měření bylo provedeno 3 hodiny po přidání činidla pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan Austria GmbH; Grödig, Rakousko) při vlnové délce 440 nm.

4.7. Detekce apoptózy

Pro detekci apoptózy bylo využito stanovení aktivace kaspáz 3/7, 8 a 9. Pro detekci byl použit Caspase-Glo Assay kit (Promega, USA). Kit byl použit dle pokynů výrobce. Programovaná buněčná smrt byla detekována 72 hodin po ozáření dávkou 10 a 20 Gy. Pro experimenty byla použita 96 - jamková destička. Do každé jamky bylo napipetováno 40 μ l média a přidáno 10^4 buněk do každé jamky. Výsledky byly analyzovány pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan Austria GmbH; Grödig, Rakousko).

4.8. Stanovení cytotoxicity

Pro detekci cytotoxicity byl použit PLUS-LDH kit (Roche Diagnostics, Czech Republic). Únik laktát dehydrogenázy byl detekován 72 hodin po ozáření dávkami 2, 6, 10, 20 Gy. Byly

použity dvě 96 - jamkové destičky. Do každé jamky bylo nasazeno 10^3 buněk. První destička byla použita jako pozitivní kontrola a do každé jamky bylo napipetováno 5 μ l lyzačního pufru, destička byla pak inkubována 15 minut při pokojové teplotě. Druhá destička obsahovala ozářené buňky a buňky ovlivněné cytostatiky doxorubicinem a taxolem. Do každé jamky bylo napipetováno 5 μ l lyzačního pufru a destička byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě. Po lýze buněk bylo do obou destiček přidáno 100 μ l reakční směny, která byla připravena podle pokynů výrobce. Destičky byly inkubovány po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí inkubační doby se přidalo do každé jamky 50 μ l STOP roztoku. Výsledky byly analyzovány pomocí spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan Austria GmbH; Grödig, Rakousko) při vlnové délce 490 nm.

4.9. Imunocytochemie

Krycí sklíčko bylo vloženo do každé jamky 6 - jamkové destičky. Buňky byly nasazeny v počtu 10^5 v každé jamce. Po hladovění, ovlivnění cytostatiky nebo po ozáření, byly buňky fixovány 4% paraformaldehydem po dobu 10 minut a 3x opláchnuty v PBS. Pro blokaci bylo použito kozí sérum (1:20; Jackson ImmunoResearch, UK) po dobu 20 minut. V dalším kroku byla použita primární protilátka anti-acetylated tubulin (1:800; Sigma-Aldrich, USA) a anti-gamma tubulin (1:300; Sigma-Aldrich, USA) po dobu 60 minut. Pak byly buňky 3x opláchnuty v PBS. Následně byla aplikovaná sekundární protilátka Cy3-conjugated donkey anti-mouse (1:300; Sigma-Aldrich, USA) a Alexa 488 conjugated donkey anti-rabbit (1:300; Jackson ImmunoResearch, UK) 45 minut ve tmě při pokojové teplotě. Poté byly buňky 3x opláchnuty v PBS. Jádra buněk byla obarvena pomocí DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole (Sigma-Aldrich, USA). Pro analýzu primární řasinky byl použit fluorescenční mikroskop Nikon Elipse (Nikon, Japonsko).

4.10. Transmisní elektronová mikroskopie

Transmisní elektronový mikroskop (Tesla, Česká republika) byl použit pro detekci primární řasinky u buněk po hladovění, ozáření dávkou 20 Gy a po ovlivnění taxolem a doxorubicinem. Buňky byly fixovány 3% glutaraldehydem (Sigma-Aldrich, USA) po dobu 5 minut při 37 °C a poté 3 hodiny při pokojové teplotě, opláchnuty v kakodylátovém pufru (0,1 M, pH 7,2) a následně fixovány v 1% OsO₄ po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Po oplachu v kakodylátovém pufru (0,1 M, pH 7,2), buňky byly dehydratovány v odstupňované řadě alkoholů (50%, 75%, 96%, 100%), poté projasněny v propylenoxidu a vloženy do směsi Epon 812 a Durcupan (1:1 Sigma Aldrich, USA) a ponechány polymerizovat po dobu 72

hodin při 60 °C. Polosilné řezy byly obarveny toluidinovou modří. Ultra tenké řezy byly nakrájeny na Ultratome Nova (LKB, Sweden), shromážděny na síťkách potažených uhlíkem. Pro dobarvení byl použit uranylacetát a citrát olovnatý. Výsledné řezy byly analyzovány transmisním elektronovým mikroskopem Tesla BS500 (při 90 kV, Tesla, Česká republika). Snímky byly pořízeny digitální kamerou MegaView G2 a analyzovány s iTEM softwarem (Olympus, Japan).

4.11. Analýza buněčného cyklu

Stanovení jednotlivých fází buněčného cyklu bylo detekováno u ozářených buněk, hladovějících buněk a buněk ovlivněných doxorubicinem a taxolem pomocí měření obsahu DNA průtokovou cytometrií. Po ovlivnění a uplynutí inkubační doby byly buňky ztrypsinizovány a promyty studeným PBS, fixovány a permeabilizovány 70% ethanolem a uchovány při 4 °C. V dalším kroku byly buňky zcentrifugovány a promyty PBS. Pro odstranění nízkomolekulárních fragmentů DNA byly buňky inkubovány v citrátovém pufru (192 ml 0,2 mol/l Na₂HPO₄ + 8 ml 0,1 mol/l kyselina citrónová, pH = 7,8) po dobu 5 minut a značeny propidiem jodidem pomocí Vindelova roztoku (1 ml 1 M Tris, pH=8, 1 mg RNázy, 100 µl Triton X-100, 60 mg NaCl, 5 mg propidium jodidu a destilovaná voda do 100 ml) 60 min, 37 °C. Buněčná suspenze byla měřena na průtokovém cytometru BD FACS Aria III (Becton, Dickinson and Company, USA) použitím 13 mW Coherent® Sapphire™ laseru s excitací při 488 nm nebo CyAn™ ADP (Becton, Dickinson and Company, USA). V průběhu akvizice dat byly odstraněny dublety, multiplety a agregáty, které by zkreslovaly naměřené výsledky. Při analýze programem Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, USA) byl vytvořen histogram šířky pulsu (pulse width) signálu versus jeho plocha (area) pro fluorescenční signál propidium jodidu v analyzovaném fluorescenčním kanálu.

4.12. Statistická analýza

Pro statistické vyhodnocení dat byl použit program GraphPad InStat v3 (GraphPad Software, USA). Není-li uvedeno jinak, jsou výsledky vyjádřeny jako průměr se střední chybou průměru (SEM). Statistická analýza byla provedena pomocí one-way ANOVA a Tukey post *hoc test* ze tří nezávislých experimentů a hodnoty $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$ byly považovány za statisticky signifikantní.

5. Výsledky

Hodnocení změn cytoskeletální stability pomocí primární řasinky bylo provedeno na základě několika *in vitro* experimentů spojených s vlivem ionizujícího záření, metabolickým stresem indukovaným hladověním a vlivem chemických látek – cytostatik na vybrané buněčné linie normálních a nádorových buněk.

5.1. Hodnocení změn primární řasinky po ozáření u C2C12

Vliv ionizujícího záření na cytoskeletální stabilitu primární řasinky byl sledován u C2C12. C2C12 byly ozářeny dávkou 2, 6, 10 a 20 Gy a 72 hodin po *in vitro* ozáření bylo provedeno hodnocení viability buněk pomocí WST-1, test úniku LDH, hodnocení buněčného cyklu, detekce apoptózy a imunofluorescenční detekce primární řasinky.

5.1.1. Hodnocení viability a proliferace u C2C12 po ozáření

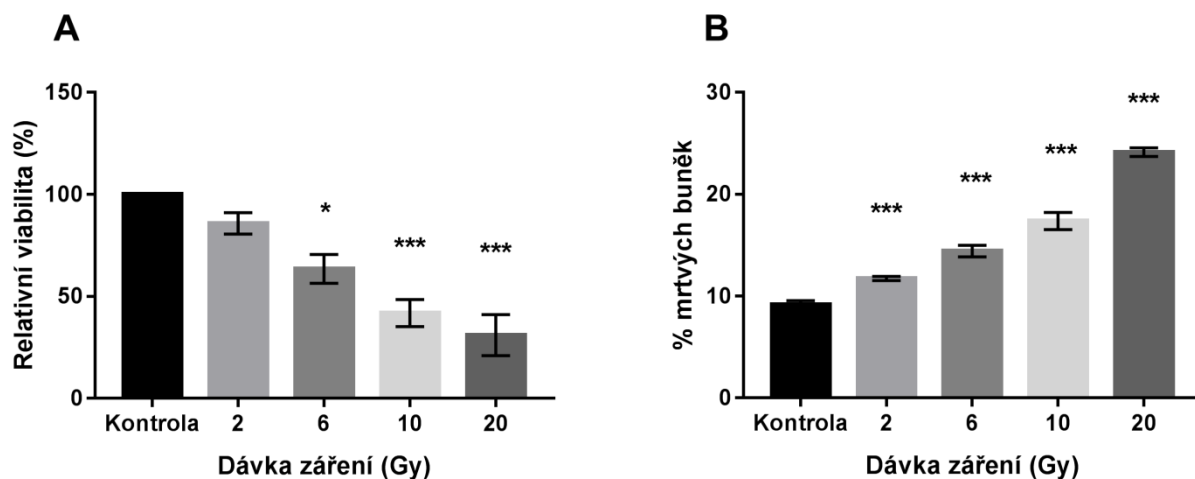
V experimentech byla sledována viabilita a proliferace ozářených C2C12, ve srovnání s neozářenou kontrolou. Pro detekci viability a proliferace byl použit WST-1 test, který byl proveden 72 hodin po ozáření dávkami 2, 6, 10 a 20 Gy.

Viabilita a proliferace C2C12 ozářených 2 Gy klesla na 85,8 %. K dalšímu snížení proliferace a viability o 22 % došlo po ozáření myoblastů dávkou 6 Gy. Pouze 42 % buněk bylo detekováno jako viabilních a proliferujících po ozáření dávkou 10 Gy a pouze 31 % ozářených myoblastů dávkou 20 Gy vykazovalo známky proliferace a viability. V experimentech bylo zjištěno, že zvyšující se dávka záření vede ke statisticky významnému snižování viability a proliferace buněk, ve srovnání s neozářenou kontrolou (Obr. 7A).

Jako další vhodná metoda, sloužící k doplnění informace k viabilitě buněk, byla použita metoda založená na měření luminiscence pro stanovení laktátdehydrogenázy (LDH). Detekce LDH byla provedena rovněž 72 hodin po ozáření dávkami 2, 6, 10 a 20 Gy.

U ozářených C2C12 dávkou 2 Gy došlo k statisticky signifikantnímu zvýšení procenta mrtvých buněk v porovnání s neozářenou kontrolou (2 Gy, ~12 %; kontrola, ~9 %). Dávka záření 6 Gy zvýšila významně procento mrtvých buněk na 14,4 %, ve srovnání s neozářenou kontrolou. K dalšímu signifikantnímu navýšení mrtvých buněk o 3 % došlo po ozáření dávkou 10 Gy, oproti neozářené kontrole. Dávka záření 20 Gy způsobila významný nárůst procenta mrtvých buněk na 24 %, ve srovnání s neozářenou kontrolou (Obr. 7B).

Procentuální snížení viability a proliferace a nárůst procenta mrtvých buněk byl lineární a z toho důvodů nebyla hodnocena signifikance mezi jednotlivými skupinami.

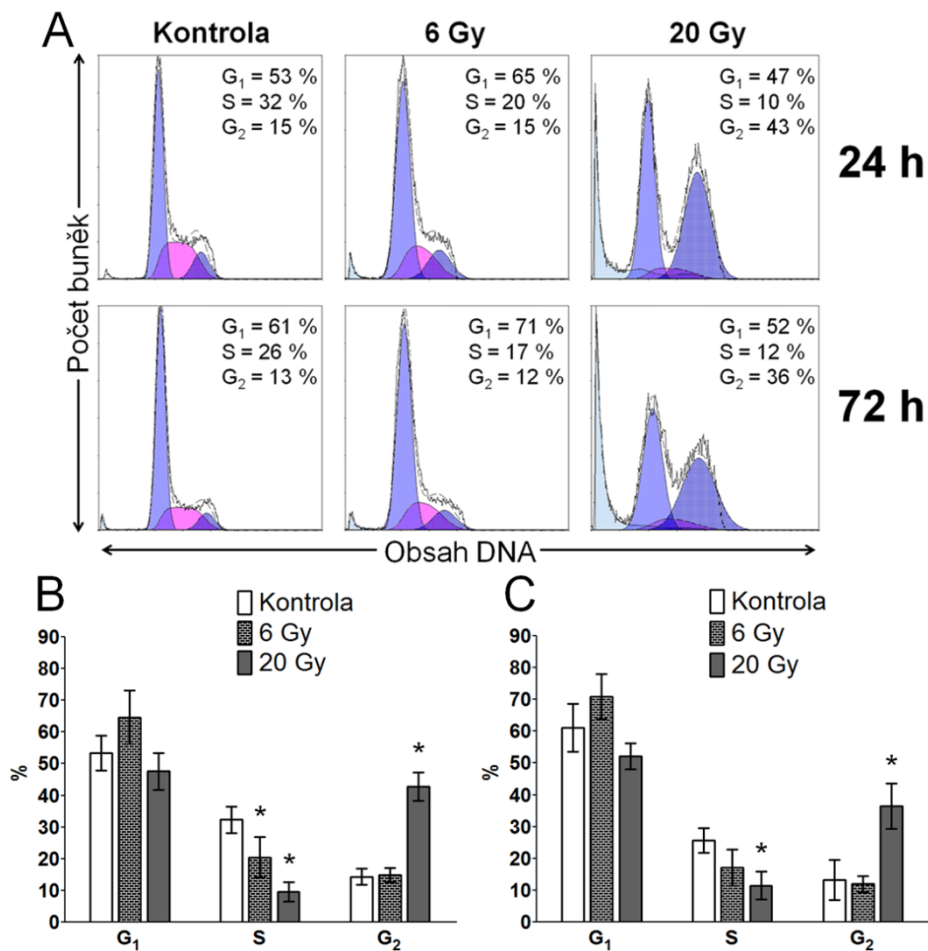


Obr. 7: Viabilita a proliferace u C2C12 po ozáření. (A) Reprezentuje procento živých buněk vyhodnocených pomocí WST-1 testem, 72 hodin po ozáření dávkami 2, 6, 10 a 20 Gy. (B) Znázorňuje procento mrtvých buněk detekovaných pomocí úniku laktátdehydrogenázy 72 hodin po ozáření dávkami 2, 6, 10 a 20 Gy, ve srovnání s neozářenou kontrolou. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

5.1.2. Hodnocení buněčného cyklu u ozářených C2C12

Buněčný cyklus byl analyzován pomocí průtokové cytometrie 24 a 72 hodin po ozáření dávkami 6 Gy a 20 Gy (Obr.8A). Hodnoty byly vztažné k neozářené kontrole kultivované za normálních podmínek. V experimentu 24 hodin po ozáření dávkou 6 Gy bylo zaznamenáno zvýšené procento buněk v G1 fázi buněčného cyklu. Po dávce 20 Gy došlo ke snížení procenta buněk, které však nebylo statisticky významné. Dále 24 hodin po ozáření dávkou 6 Gy a také dávkou 20 Gy byl zaznamenán statisticky významný pokles buněk v S fázi. Po ozáření dávkou 6 Gy nedošlo za 24 hodin k významným změnám v procentu buněk v G2 fázi, naopak při dávce 20 Gy bylo zaznamenáno významné zvýšení počtu buněk v G2 fázi (24 h, 42,8 %; kontrola, 14,4 %; Obr. 8B). 72 hodin po ozáření dávkou 6 Gy bylo zaznamenáno zvýšené procento buněk v G1 fázi a po dávce 20 Gy snížení procenta buněk v G1 fázi, které nebylo statisticky významné. Dále 72 hodin po ozáření dávkou 6 Gy byl zaznamenán statisticky nevýznamný pokles buněk v S fázi, oproti statisticky významnému poklesu po dávce 20 Gy (72 h, 12 %; kontrola, 26 %; Obr. 8C). Dávka 6 Gy nezpůsobila signifikantní změny v procentu buněk v G2 fázi 72 hodin po ozáření, naopak při

dávce 20 Gy bylo zaznamenáno statisticky významné zvýšení počtu buněk v G2 fázi za 72 hodin po ozáření (72 h, 36 %; kontrola, 14,4 %; Obr. 8C).



Obr. 8: Analýza buněčného cyklu u ozářených C2C12. (A) Znárodnuje procentuální zastoupení buněk ve G₁, S a G₂/M fázi buněčného cyklu 24 a 72 hodin po ozáření dávkou 6 Gy a 20 Gy a u neožárené kontroly. **(B)** Grafické vyjádření souhrnných údajů o rozdělení C2C12 v jednotlivých fázích buněčného cyklu za 24 hodin a **(C)** 72 hodin po ozáření. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. *p ≤ 0,05.

5.1.3. Indukce apoptózy

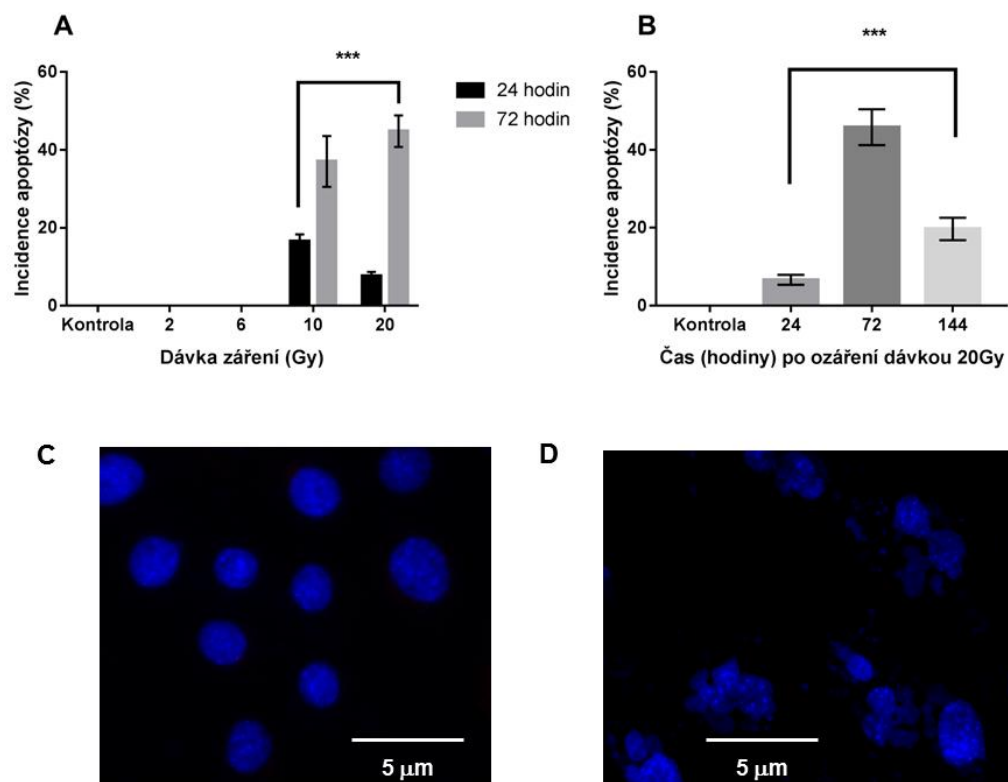
5.1.3.1. Detekce apoptózy pomocí barvení DAPI

Buněčná smrt byla detekována u ozářených C2C12 dávkou 10 Gy a 20 Gy, 24 a 72 hodin po ozáření ve srovnání s neozářenou kontrolou a v porovnání mezi skupinami. Apoptóza byla detekována pomocí imunofluorescenční metody s využitím barvení DAPI, které umožňuje detekci apoptózou asociované nukleární kondenzace a buněčné smrštění a také váčky plazmatické membrány (Obr. 9D).

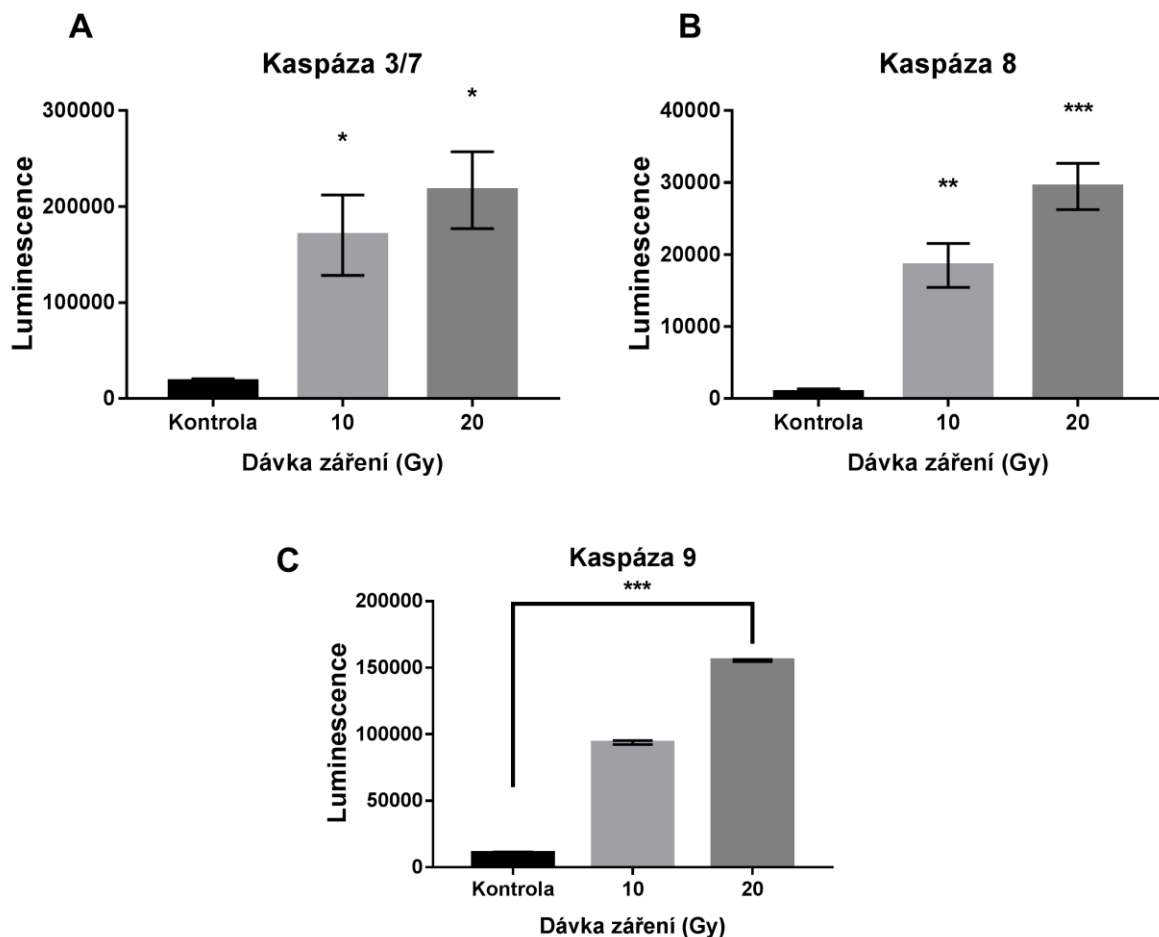
Apoptotické změny nebyly detekovány při dávkách ozáření 2 a 6 Gy (Obr. 9A, 9B) a u neozářené kontroly (Obr. 9C). Signifikantní nárůst procenta buněk v apoptóze byl detekován po ozáření dávkou 10 a 20 Gy za 24 hodin (10 Gy, 16,6 %; 20 Gy, 7,6 %) a vyvrcholil 72 hodin po ozáření dávkou 10 a 20 Gy (10 Gy, 37 %; 20 Gy, 45 %), ve srovnání s neozářenou kontrolou. U buněk ozářených dávkou 20 Gy (~16,6 %) bylo detekováno 24 hodin po ozáření významné procentuální snížení buněk v apoptóze oproti buňkám, které byly ozářeny dávkou 10 Gy (~7,6 %) a detekovány ve stejném čase. Procento buněk v apoptóze 72 hodin po ozáření dávkou 20 Gy bylo o 8 % vyšší než po ozáření dávkou 10 Gy, procentuální zvýšení nebylo signifikantní (Obr. 9A). Mezi skupinami ozářených buněk bylo detekováno významně zvýšené procento apoptotických buněk 72 hodin po ozáření dávkou 10 a 20 Gy, v porovnání s 24 a 144 hodinovým intervalem (Obr. 9B).

5.1.3.2. Aktivita kaspáz

V experimentech pro sledování indukce apoptózy byla použita detekce aktivity kaspáz. U C2C12 byla 72 hodin po ozáření dávkou 10 Gy a 20 Gy sledována aktivace efektorové kaspázy 3/7, iniciační kaspázy 8 a kaspázy 9. Aktivita kaspázy 3/7 byla významně zvýšená po dávce záření 10 a 20 Gy, v porovnání s neozářenou kontrolou (Obr. 10A). Signifikantní rozdíl v aktivitě nebyl zaznamenán, pokud byly porovnány ozářené skupiny dávkou 10 a 20 Gy mezi sebou. Stejný výsledek byl detekován u aktivity kaspázy 8. Aktivita kaspázy 8 signifikantně stoupala se zvyšující se dávkou záření, oproti neozářené kontrole. Mezi skupinami ozářenými 10 Gy a 20 Gy byl detekován nárůst aktivity kaspázy 8, který ale nebyl signifikantní (Obr. 10B). Aktivita kaspázy 9 byla významně zvýšena po dávce záření 10 a 20 Gy, v porovnání s neozářenou kontrolou a zároveň byl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi aktivitou kaspázy 9 u buněk ozářených dávkou 10 Gy a buněk po ozáření dávkou 20 Gy (Obr. 10C).



Obr. 9: Detekce apoptózy u ozářených C2C12. (A) Prezentuje procentuální zastoupení buněk s apoptickou morfologií za 24 a 72 hodin po ozáření dávkami 2, 6, 10 a 20 Gy. (B) dynamická indukce apoptózy po ozáření dávkou 20 Gy. (C) Kontrolní neozářené C2C12. (D) C2C12 ozářené dávkou 20 Gy po 72 hodinách vykazující známky apoptózy. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. *** $p \leq 0,001$.



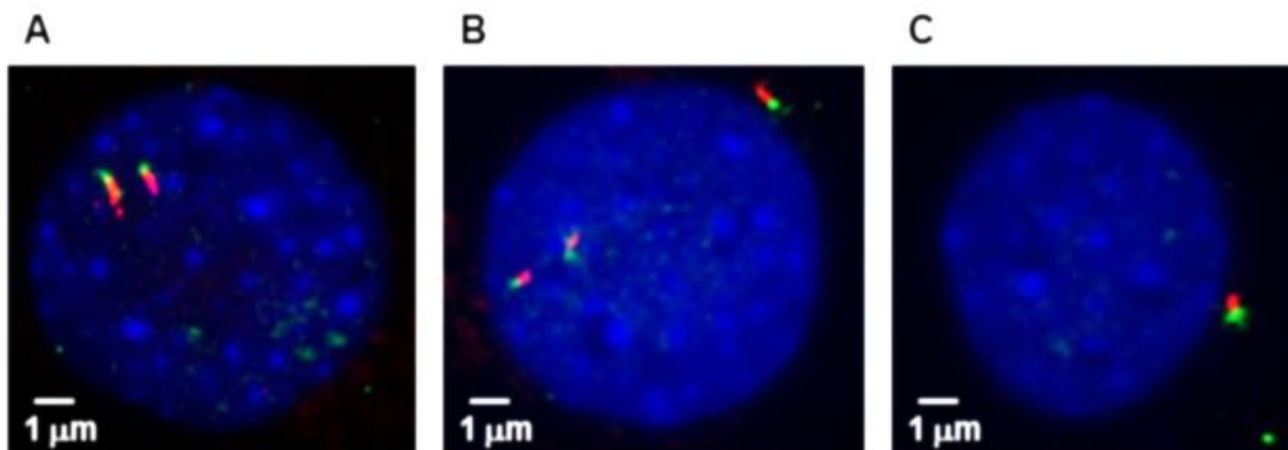
Obr. 10: Hodnocení aktivity kaspáz. (A) Aktivita efektorové kaspázy 3/7 (B) Aktivita iniciační kaspázy 8 a (C) aktivita iniciační kaspázy 9 po 72 hodin od ozáření dávkou 10 Gy a 20 Gy u C2C12. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.1.4. Detekce primární řasinky u buněčné linie C2C12

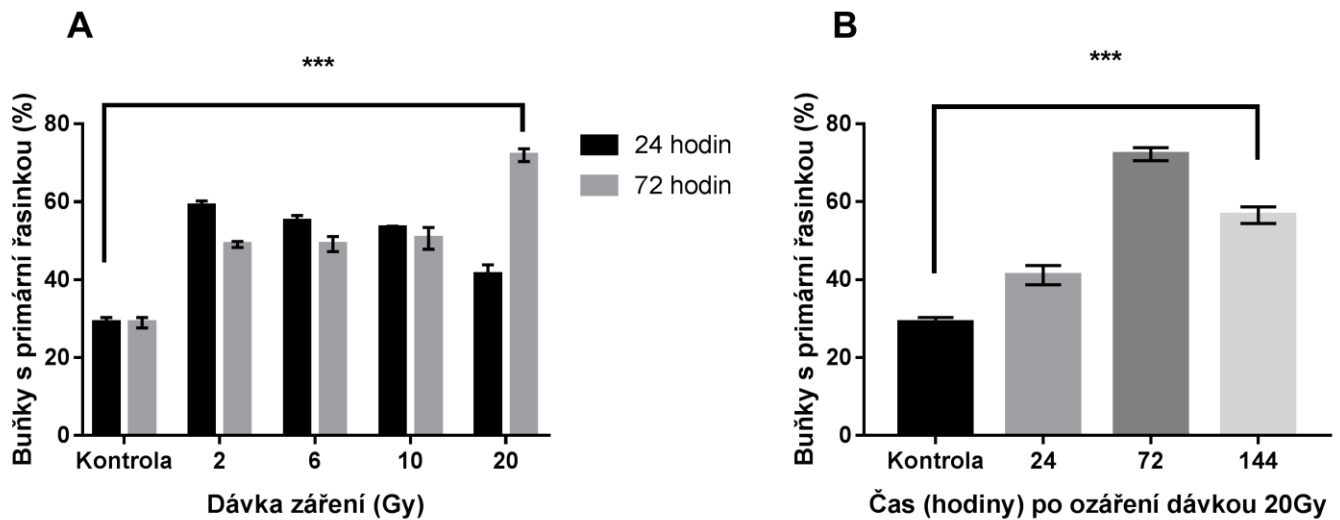
V další fázi experimentů byla prováděna detekce primární řasinky pomocí imunocytochemické metody barvení acetylovaného α -tubulinu a γ -tubulinu. Touto metodou bylo prokázáno, že buněčná linie C2C12 je nositelem primární řasinky. Přítomnost primární řasinky byla prokázána také transmisní elektronovou mikroskopií (TEM).

5.1.4.1. Detekce primární řasinky po ionizujícím záření

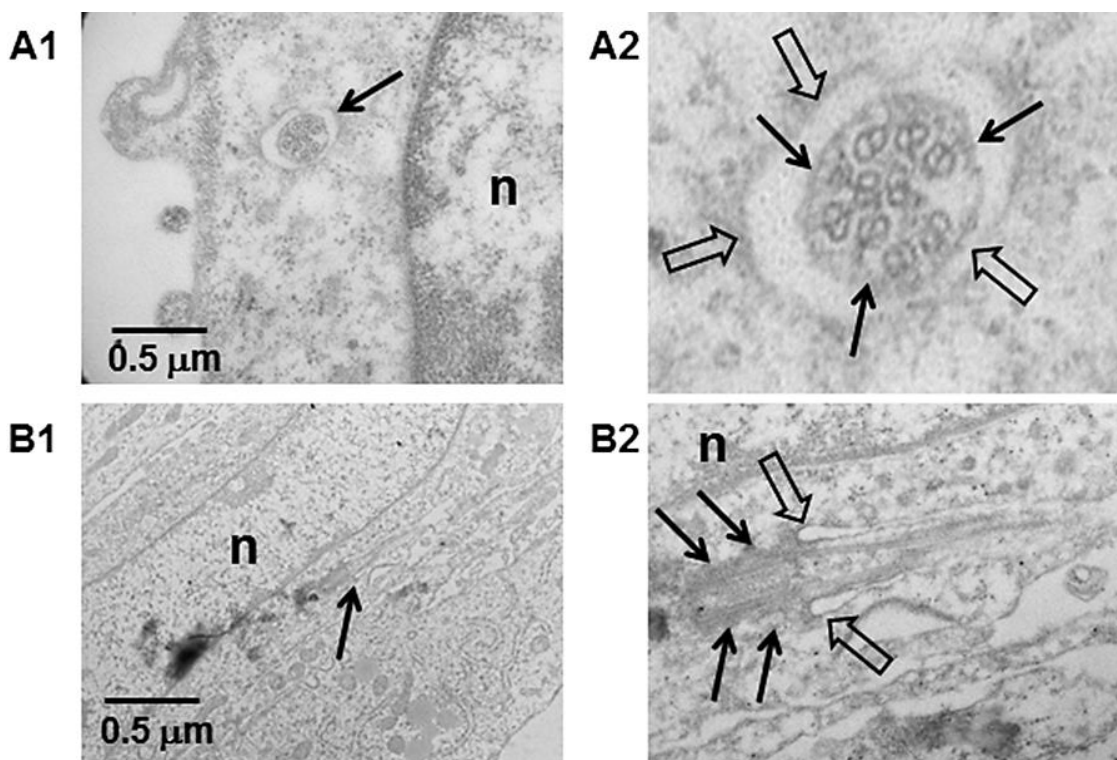
Prvotní experimenty s ozařováním byly provedeny u C2C12 dávkami 2, 6, 10 a 20 Gy. V experimentech 24 a 72 hodin po ozáření byla provedena imunodetekce primární řasinky (Obr. 11). U dávky záření 20 Gy byla pozorována jedna primární řasinka (Obr. 11C) u každé buňky, tak zároveň i řasinka vícečetná 72 hodin po ozáření (Obr. 11A, 11B). Výrazně vyšší počet buněk s primární řasinkou byl pozorován 24 hodin po ozáření v rámci sledování celé dávkové řady a při srovnání s neozářenou kontrolou. Nejvyšší incidence primární řasinky za 24 hodin byla u ozáření dávkou 2 Gy (~59 %; Obr. 12A). V závislosti na tomto zjištění byla dále provedena analýza detekce primární řasinky 72 hodin po ozáření a tyto výsledky ukázaly, že dochází ke stálému narůstání procenta buněk s primární řasinkou v závislosti na dávce, v porovnání s neozářenou kontrolou. Nejvyšší procento buněk s primární řasinkou bylo detekováno 72 hodin po ozáření dávkou 20 Gy (~72 %; Obr. 12A). Při porovnání ozářených C2C12 za 24 a 72 hodin bylo detekováno signifikantní zvýšení po dávce 20 Gy 72 hodin (~72 %), oproti 24 hodinovému intervalu (~41 %). Sledování primární řasinky v časové závislosti prokázalo významné zvýšení primární řasinky 72 hodin po ozáření dávkou 20 Gy (~72 %), oproti detekci za 24 (~41 %) a 144 hodin po ozáření (~56 %; Obr. 12B). Přítomnost primární řasinky byla ověřena také pomocí TEM a to 72 hodin po ozáření dávkou 20 Gy (Obr. 13).



Obr. 11: Výskyt primární řasinky u ozářených C2C12. Reprezentativní fotografie primární řasinky u C2C12. Detekce primární řasinky byla provedena pomocí imunofluorescence. Červeně je nabarvena axonema primární řasinky tvořená alfa tubulinem a zeleně se barví bazální tělísko tvořené gamma tubulinem. Jádra byla barvena modře pomocí DAPI. **(A)** a **(B)** vícečetná řasinka byla pozorována 72 hodin po ozáření 20 Gy. **(C)** Jednoduchá primární řasinka po ozáření dávkou 20 Gy 72 hodin po ozáření.



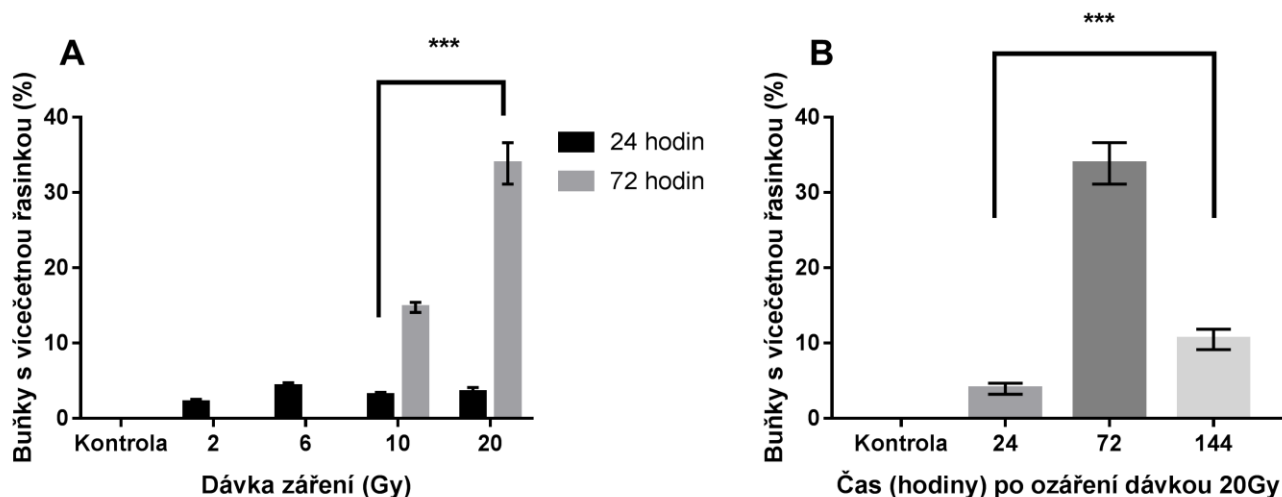
Obr. 12: Zvyšující se výskyt primární řasinky po ozáření. (A) Procentuální zastoupení primární řasinky u C2C12 za 24 hodin a 72 hodin po ozařování dávkami 2, 6, 10 a 20 Gy. **(B)** Zastoupení buněk s primární řasinkou (%) u C2C12 po 1, 3 a 6 dnech po ozáření dávkou 20 Gy s největším nárůstem 72 hodin po ozáření. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. *** $p \leq 0,001$.



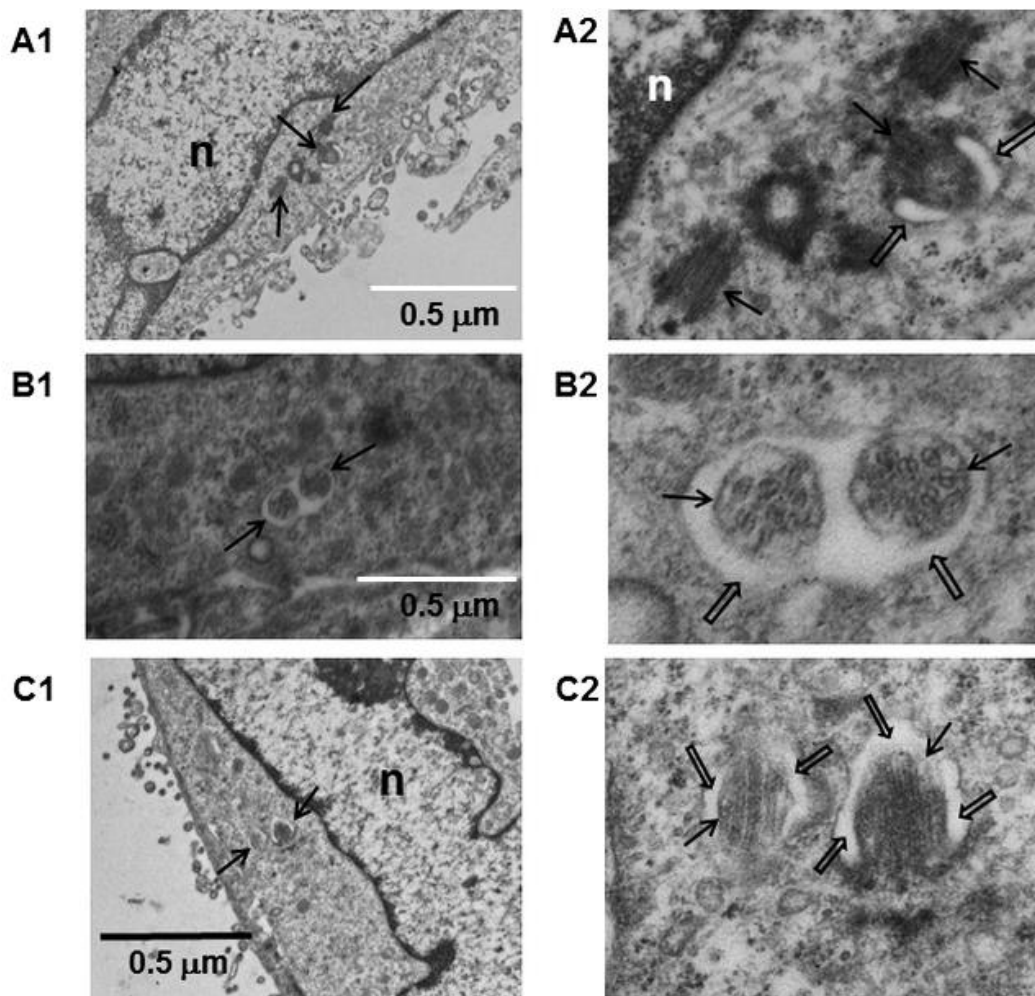
Obr. 13: Reprezentativní fotografie z TEM. (A1, A2) Příčný řez primární řasinkou u C2C12 po ozáření dávkou 20 Gy a sledovaných 72 hodin po ozáření. Černé šipky ukazují osm dvojic mikrotubulů, které jsou typické pro primární řasinku. Prázdné šipky zobrazují cytoplazmatickou membránu a ciliární kapsu okolo primární řasinky. n= nukleus. **(B1, B2)** Podélný řez primární řasinkou u C2C12 ozářených dávkou 20 Gy 72 hodin po ozáření, zvětšen pomocí počítačového softwaru PhotoFiltre. Primární řasinka se vynořuje z bazálního tělíska (černá šipka). Proximální oblast primární řasinky se nachází v ciliární kapse (prázdné šipky); n=nukleus.

5.1.4.2. Výskyt vícečetné řasinky po ionizujícím záření

Buňky s vícečetnými řasinkami byly detekovány u ozářených C2C1272 hodin po ozařování. Žádná vícečetná řasinka nebyla pozorována u neozářených C2C12 ani po ozařeni dávkami 2 Gy a 6 Gy (Obr. 14A). U 2 až 4 % ozářených myoblastů byly detekovány vícečetné primární řasinky a to 24 hodin po ozařeni v rámci celé dávkové řady (2-20 Gy), oproti neozářené kontrole. Další významný nárůst buněk s vícečetnou řasinkou byl pozorován 72 hodin po ozařeni dávkou 10 Gy a 20 Gy (15 a 34 %; Obr. 14A, 14B), v porovnání s neozářenou kontrolou. V porovnání mezi ozářenými skupinami za 24 a 72 hodin došlo k signifikantnímu zvýšení procenta buněk s vícečetnou řasinkou po dávce 10 Gy (~15 %) a 20 Gy (~34 %), oproti buňkám ozářených dávkami 10 Gy (~3 %) a 20 Gy (~3,5 %) za 24 hodin. V dalším kroku byla provedena analýza ozářených myoblastů dávkou 20 Gy a byla zhodnocena přítomnost primární řasinky za 24, 72 a 144 hodin po ozařeni. Nejvyšší procento buněk s vícečetnou řasinkou bylo detekováno 72 hodin po ozařeni dávkou 20 Gy (~34 %) v porovnání s neozářenou kontrolou a buňkami 24 hodin (~4 %) a 144 hodin (~10,5 %) po ozařeni (Obr. 14B). Přítomnost mnohočetné řasinky u buněk ozářených dávkou 20 Gy byla prokázána pomocí imunofluorescence (Obr. 11A, 11B) a pomocí TEM (Obr. 15A, 15B, 15C).



Obr. 14: Incidence vícečetné řasinky u C2C12 po ionizujícím záření. (A) Procentuální zastoupení vícečetné řasinky 24 a 72 hodin po ozařeni dávkou 2-20 Gy. **(B)** Zvyšující se procento buněk se 2 a více řasinkami u ozářených C2C12 dávkou 20 Gy. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. *** $p \leq 0,001$.



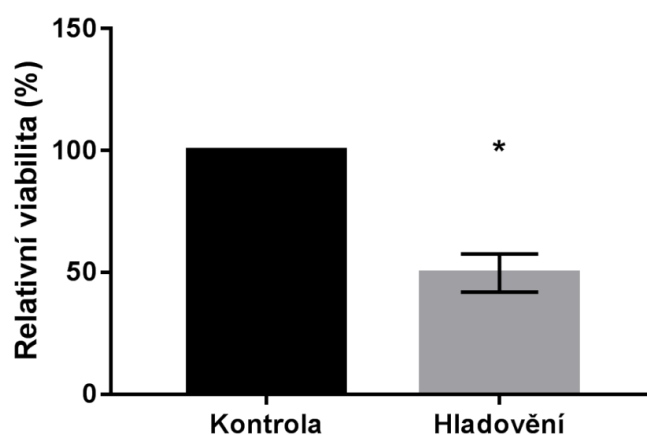
Obr. 15: TEM analýza vícečetné řasinky u C2C12 72 hodin po ozáření dávkou 20 Gy. (A1) C2C12 se třemi centrioly (černé šipky). (A2) Primární řasinka vyrůstající z jednoho centriolu (černé šipky), která tvoří její bazální tělísko a je uzavřena v ciliární kapse (prázdné šipky). (B1) Vícečetná řasinka 72 hodin po ozáření dávkou 20 Gy u C2C12 (černé šipky). (B2) Příčný řez dvěma řasinkami (černé šipky) uzavřených v jejich ciliární kapse (prázdné šipky). (C1, C2) Podélný řez dvěma řasinkami (černé šipky) obklopenými ciliární kapsou (prázdné šipky) 72 hodin po ozáření dávkou 20 Gy u C2C12. (A2), (B2), (C2) zvětšen pomocí počítačového softwaru PhotoFiltre; n=nukleus.

5.2. Změny primární řasinky po metabolickém stresu indukovaného hladověním

Metabolický stres indukovaný hladověním zvyšuje frekvenci primární řasinky a má také vliv na cytoskeletální stabilitu buňky. V této části práce byly experimenty provedeny na modelu využívající buněčnou linii C2C12, které byly vystaveny hladovění způsobeným snížením fetálního telecího séra (FBS) z 10% na 0,5%. Následně bylo provedeno hodnocení viability a proliferace buněk pomocí WST-1, hodnocení buněčného cyklu a imunofluorescenční detekce primární řasinky. Vzhledem k tomu, že v průběhu těchto experimentů nebyly detekovány apoptotické buňky, nebyla apoptóza hodnocena.

5.2.1. Hodnocení viability a proliferace po hladovění u C2C12

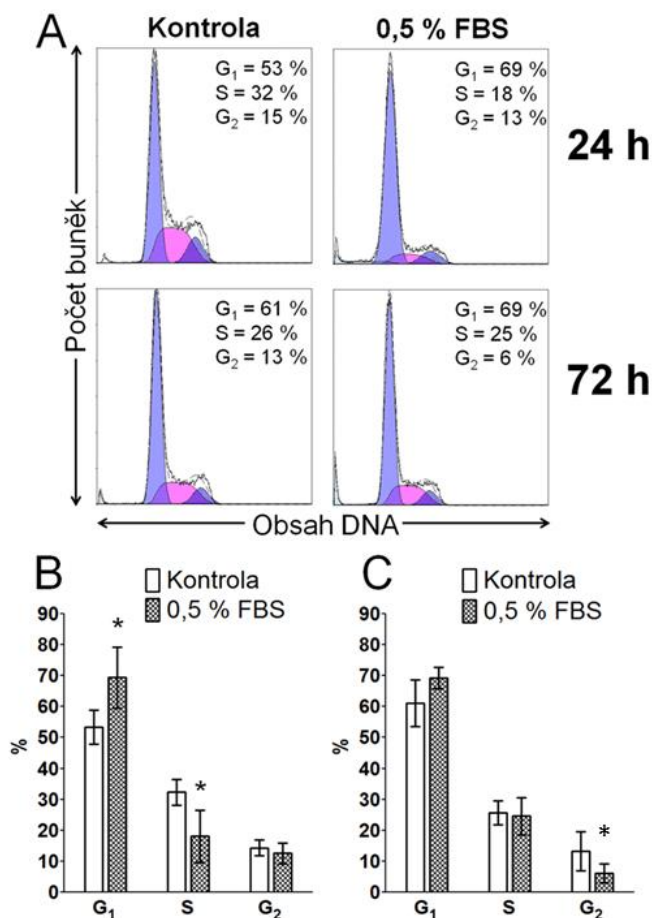
Další fáze práce byla zaměřena na detekci primární řasinky po metabolickém stresu indukovaného hladověním buněk. Viabilita a proliferace byla testována pomocí WST-1 testu. Snižujícím se obsahem fetálního telecího séra byla prokázána 72 hodin po ovlivnění statisticky významně se snižující viabilita a proliferace, a to o 50 %, ve srovnání s neovlivněnou kontrolou (Obr. 16). Detekce LDH byla provedena taktéž 72 hodin po hladovění. Výsledky ukázaly, že buňky neproliferovaly, ale přežívaly, a tak nebyly nalezeny buňky mající známky apoptózy.



Obr. 16: Stanovení viability a proliferace u C2C12 po hladovění. Viabilita a proliferace byla detekována pomocí WST-1 testu 72 hodin po hladovění. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. * $p \leq 0,05$.

5.2.2. Hodnocení buněčného cyklu po hladovění u C2C12

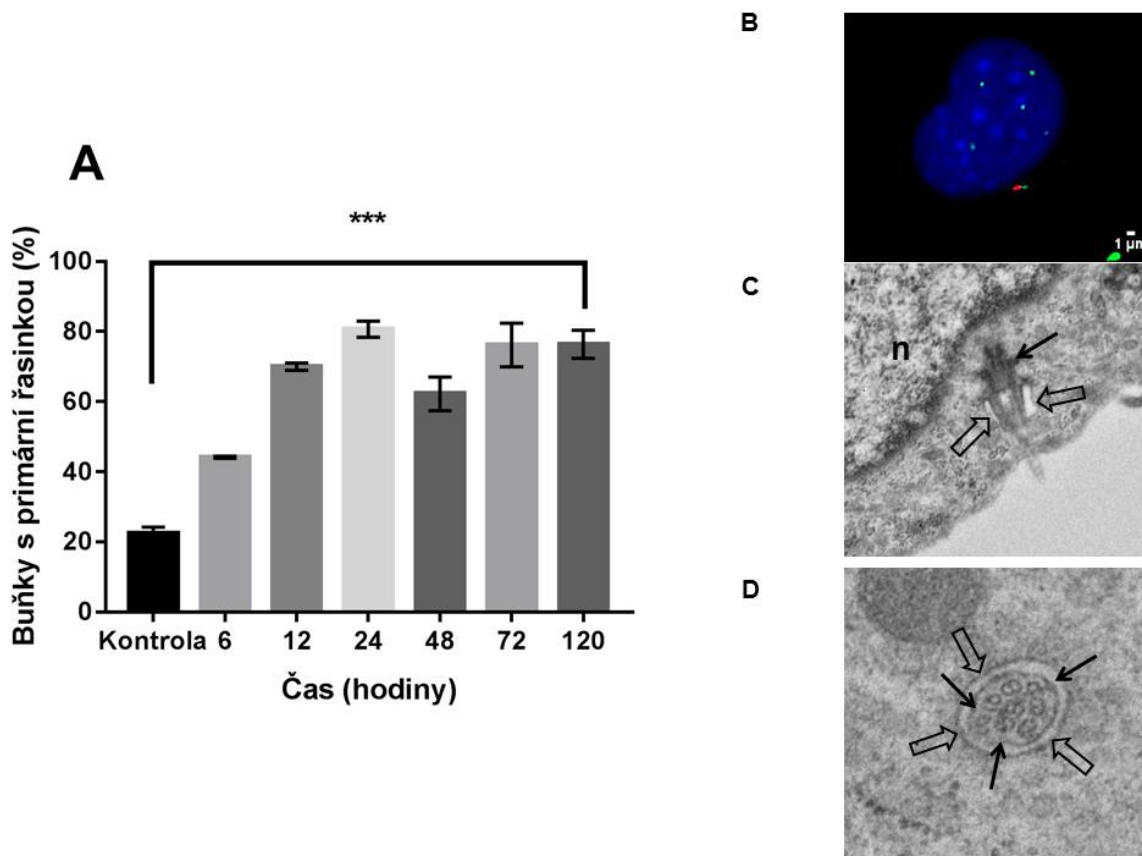
Buněčný cyklus byl analyzován 24 a 72 hodin po hladovění pomocí průtokové cytometrie. C2C12 vykazovaly 24 hodin po hladovění signifikantní zvýšení počtu buněk v G1 fázi buněčného cyklu (~69 %) a signifikantní pokles buněk v S fázi buněčného cyklu, oproti kontrole kultivované za normálních podmínek (~53 %; Obr. 17A, 17B). Další výsledky ukázaly, že 72 hodinové hladovění navodilo především významný pokles buněk v G2 fázi buněčného cyklu (~6 %; Obr. 17C). Zjištěná změna v počtu buněk v G2 fázi po 72 hodinách oproti buňkám, které hladověly pouze 24 hodin (~13 %) byla statisticky významná.



Obr. 17: Analýza buněčného cyklu u C2C12 po hladovění. (A) Horní a dolní panel znázorňuje procentuální zastoupení buněk ve G₁, S a G₂/M fázi buněčného cyklu 24 a 72 hodin po hladovění (0,5% FBS) a u kontroly. (B) Grafické vyjádření souhrnných údajů o rozdělení C2C12 v jednotlivých fázích buněčného cyklu za 24 hodin a (C) za 72 hodin po hladovění. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. *p ≤ 0,05.

5.2.3. Detekce primární řasinky po hladovění u C2C12

Primární řasinka byla zkoumána 6, 12, 24, 48, 72 a 120 hodin po metabolickém stresu indukovaného hladověním (Obr. 18A). Počet buněk s primární řasinkou signifikantně vzrůstal již 6 hodin po hladovění v porovnání s kontrolou kultivovanou za standardních podmínek. Nejvyšší procento buněk s primární řasinkou, téměř 80 %, bylo detekováno 24 hodin po hladovění. Po 48 hodinách došlo k mírnému úbytku buněk s primární řasinkou, ale po 72 hodinách se opět zopakoval trend se zvyšujícím se počtem buněk s primární řasinkou. Počet buněk s primární řasinkou se již nezměnil do konce časového intervalu 120 hodin po hladovění (Obr. 18B). Výše popisované změny byly ve srovnání s neovlivněnou kontrolou statisticky významné v celém časovém intervalu (6-120 hodin) hladovění. Pokud byly porovnány skupiny mezi sebou, došlo k signifikantnímu nárůstu procenta buněk s primární řasinkou za 24, 48, 72 a 120 hodin oproti 6 hodinovému intervalu. Dále došlo k významnému snížení 48 hodin po hladovění (~62 %), oproti 24 hodinám po hladovění (~80 %). Ostatní změny, které proběhly, nebyly statisticky významné. Vzhledem k výše uvedeným výsledkům byla pro další průkaz primární řasinky vybrána metoda TEM, která prokázala přítomnost primární řasinky 24 hodin po hladovění (18C, 18D).



Obr. 18: Výskyt primární řasinky u C2C12 po metabolickém stresu indukovaného hladověním. (A) reprezentuje procentuální zastoupení buněk s primární řasinkou po hladovění (0,5% FBS). Detekce byla provedena 6, 12, 24, 48, 72 a 120 h. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. *** $p \leq 0,001$. (B) Reprezentativní fotografie primární řasinky. Detekce primární řasinky byla provedena pomocí imunofluorescence. Červeně je nabarvena axonema primární řasinky tvořená alfa tubulinem a zeleně se barví bazální tělísko tvořené gamma tubulinem. Jádra byla barvena modře pomocí DAPI. (C) Reprezentativní fotografie z TEM. C2C12 24 hodin po hladovění. Primární řasinka se nachází v blízkosti jádra (n) a plazmatické membrány buňky. Primární řasinka se vynořuje z bazálního tělíska (černá šipka). Proximální oblast primární řasinky se nachází v ciliární kapse (prázdné šipky) a prostupuje ven z plazmatické membrány; n=nukleus. (D) Reprezentativní mikrofotografie příčného řezu axonemou primární řasinky u C2C12 24 hodin po hladovění. Černé šipky ukazují osm dvojic mikrotubulů, které jsou typické pro primární řasinku. Prázdné šipky zobrazují cytoplazmatickou membránu a ciliární kapsu okolo primární řasinky. (C) a (D) zvětšen pomocí počítačového softwaru PhotoFiltre.

5.3. Změny primární řasinky u buněčných linií triple negativního karcinomu prsu a kožních fibroblastů po ovlivnění cytostatiky

V této části práce bylo provedeno hodnocení viability a proliferace buněk pomocí WST-1, test úniku LDH, hodnocení buněčného cyklu, detekce apoptózy a imunofluorescenční detekce primární řasinky po ovlivnění cytostatiky (cytotoxický stres) doxorubicinem a taxolem u buněčné linie MDA-MB-231, BT-549 a kožních fibroblastů.

5.3.1. Hodnocení viability a proliferace po ovlivnění doxorubicinem

MDA-MB-231, BT-549 a kožní fibroblasty byly ovlivněny 10, 20, 40, 80 a 120 nM doxorubicinem. Byl proveden test viability a proliferace 72 hodin po expozici cytostatika u ovlivněných MDA-MB-231, BT-549 a kožních fibroblastů pomocí WST-1 testu.

Viability a proliferace BT-549 signifikantně klesla o 32 % po ovlivnění 10 nM doxorubicinem, oproti neovlivněné kontrole. Po ovlivnění 20 nM doxorubicinu bylo detekováno pouze 48 % viabilních a proliferujících buněk a k dalšímu významnému snížení došlo po ovlivnění 40 nM doxorubicinem (~42 %) v porovnání s neovlivněnou kontrolou. Použití 80 nM a 120 nM doxorubicinu mělo za následek statisticky významné snížení viability a proliferace o více než 50 % (Obr. 19A).

Po ovlivnění 10 a 20 nM doxorubicinem nedošlo k signifikantnímu snížení viability a proliferace u MDA – MB – 231, oproti neovlivněné kontrole. První významné snížení bylo detekováno po ovlivnění 40 nM doxorubicinem (~57 %). K dalšímu snížení došlo po použití 80 nM a 120 nM doxorubicinu. Viability a proliferace byla dále signifikantně snížena po použití 80 nM a 120 nM doxorubicinu, kde bylo detekováno pouze 48 % a 40 % viabilních a proliferujících buněk, oproti neovlivněné kontrole (Obr. 19B).

Kožní fibroblasty vykazovaly významné snížení viability a proliferace již po ovlivnění 10 nM doxorubicinem (~61 %), oproti neovlivněné kontrole. Použití doxorubicinu o koncentraci 20 nM způsobilo signifikantní snížení viability a proliferace buněk na 46 %. Další významné snížení bylo detekováno po ovlivnění buněk 40 nM (~32 %) a 80 nM doxorubicinem (~32 %), oproti neovlivněné kontrole. Pouze 20 % viabilních a proliferujících buněk bylo detekováno po koncentraci doxorubicinu 120 nM (Obr. 19C).

Test úniku laktátdehydrogenázy (LDH) byl proveden po 72. hodinové expozici doxorubicinem se stejnými koncentracemi (10, 20, 40, 80, 120 nM) jako u WST-1 testu.

U ovlivněných BT – 549 koncentrací doxorubicinu 10, 20 a 40 nM nedošlo k statisticky signifikantnímu zvýšení procenta mrtvých buněk, oproti neovlivněné kontrole. Doxorubicin o koncentraci 80 nM vyvolal u ovlivněných buněk významné zvýšení procenta mrtvých buněk, a to o více než 50 %. U koncentrace doxorubicinu 120 nM bylo detekováno 59 % mrtvých buněk, v porovnání s neovlivněnou kontrolou (Obr. 19D).

U MDA – MB – 231 ovlivněných 10 a 20 nM doxorubicinem nebylo detekováno signifikantní zvýšení procenta mrtvých buněk v porovnání s neovlivněnou kontrolou (10 nM, 13 %; 20 nM, 14 %; kontrola, 11 %). Statisticky významný nárůst procenta mrtvých buněk byl zaznamenán po ovlivnění 40 nM (~18,9 %) a 80 nM (~19 %) doxorubicinem, oproti neovlivněné kontrole (~11 %). Po ovlivnění 120 nM doxorubicinem bylo detekováno 26 % mrtvých MDA – MB – 231, což bylo signifikantní zvýšení, oproti neovlivněné kontrole (~11 %; Obr. 19E).

I u kožních fibroblastů vzrůstalo po aplikaci vyšších koncentrací doxorubicinu procento mrtvých buněk. Po ovlivnění 10 nM a 20 nM nedošlo k signifikantnímu nárůstu, oproti neovlivněné kontrole. Po koncentraci 40 nM doxorubicinu bylo detekováno 20 % mrtvých buněk a u koncentrace 80 nM došlo k dalšímu zvýšení na 23 %. Obě tyto hodnoty byly signifikantní, oproti neovlivněné kontrole (~5 %). Další signifikantní nárůst procenta mrtvých buněk byl analyzován u 120 nM doxorubicinu (~22 %), oproti neovlivněné kontrole (~5 %; Obr. 19F).

Výsledky WST-1 testu ukazují, že proliferace a viabilita ovlivněných buněk klesá se zvyšující se koncentrací cytostatika, což koreluje s testem úniku LDH a zvyšujícím se procentem mrtvých buněk.

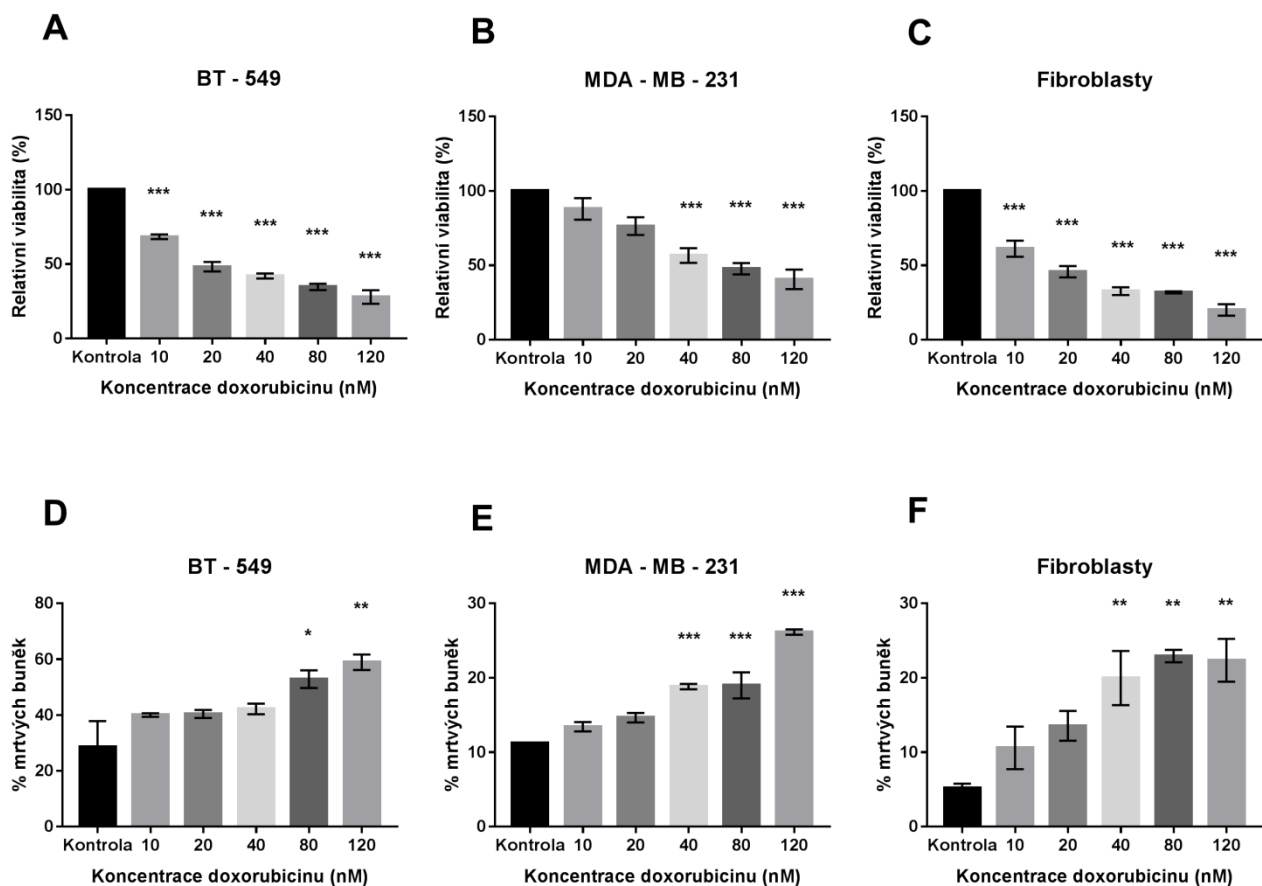
5.3.2. Stanovení buněčného cyklu po ovlivnění doxorubicinem

BT-549 a MDA-MB-231 byly ovlivněny koncentracemi 10, 20 a 40 nM po dobu 72 hodin. Fibroblasty byly ovlivněny 10, 20, 40, 80 a 120 nM doxorubicinem v časovém rozpětí 72 hodin. Koncentrace byly vybrány na základě předchozích experimentů detekce viability a proliferace WST-1 testem.

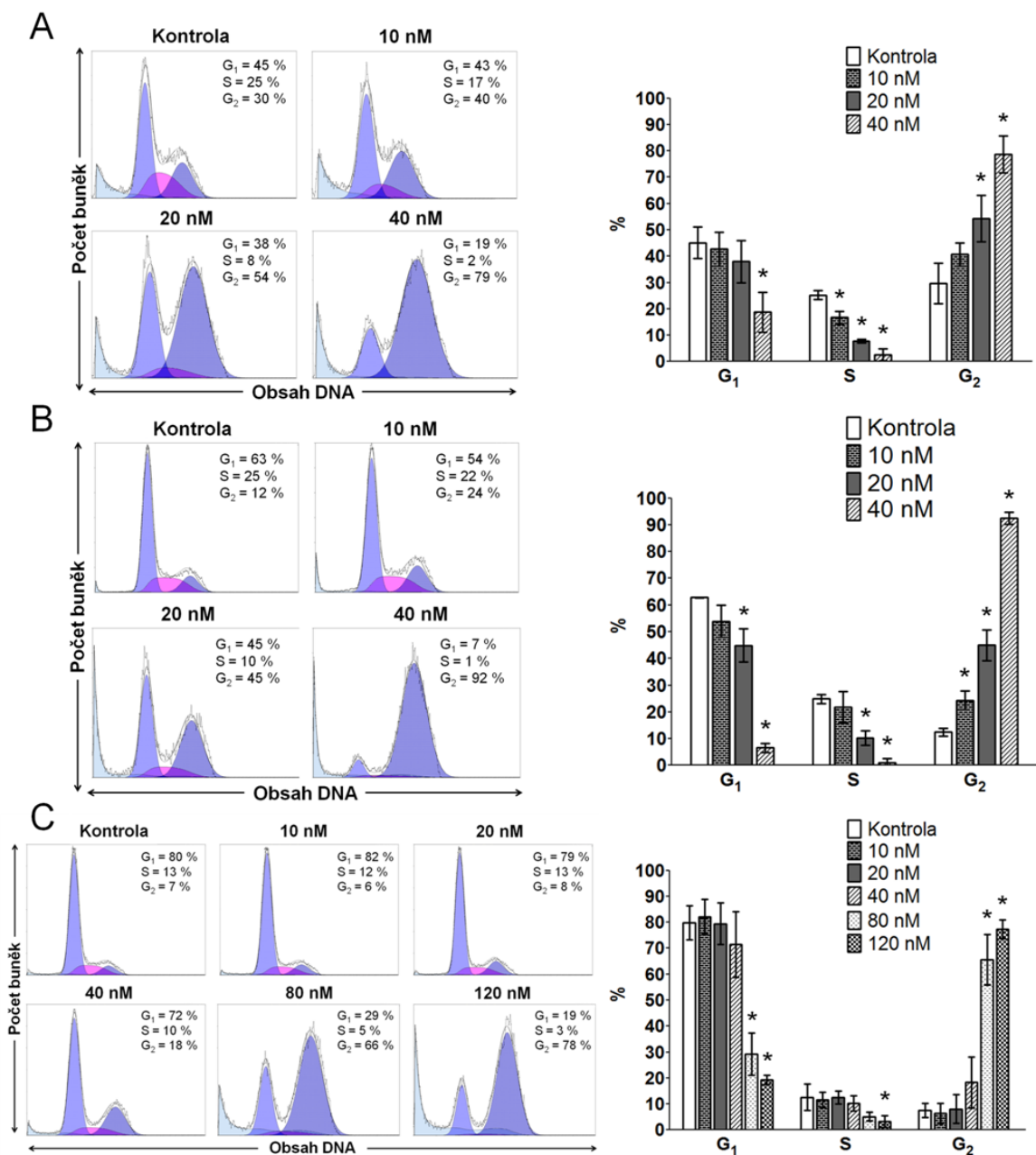
BT-549 ovlivněny 40 nM doxorubicinem vykazovaly statisticky významný pokles zastoupení buněk v G1 fázi (~19 %) buněčného cyklu v porovnání s neovlivněnou kontrolou (~45 %). Ovlivnění BT-549 10, 20 a 40 nM doxorubicinem také způsobilo signifikantní pokles počtu buněk v S fázi (~2 %), oproti neovlivněné kontrole (~25 %), což bylo doprovázeno signifikantní akumulací buněk v G2 fázi buněčného cyklu 72 hodin po ovlivnění (Obr.19A). Výsledkem ovlivnění BT-549 20 nM doxorubicinem bylo zvýšení procenta buněk v G2 fázi buněčného cyklu (54 %), oproti neovlivněné kontrole (30 %). Po ovlivnění BT-549 40 nM doxorubicinem bylo v G2 fázi buněčného cyklu detekováno 79 % buněk (Obr. 20A).

Pouze 45 % ovlivněných MDA-MB-231 se nacházelo v G1 fázi buněčného cyklu po aplikaci 20 nM doxorubicinu. Procento buněk přítomných v G1 fázi buněčného cyklu se snižovalo přímo úměrně se zvyšující se koncentrací a po použití 40 nM doxorubicinu bylo pouze 7 % ovlivněných buněk přítomno v G1 fázi buněčného cyklu. MDA - MB – 231 vykazují významný pokles v S fázi buněčného cyklu po ovlivnění 20 nM (10 %) a 40 nM (1 %) doxorubicinem (Obr. 19B). Výsledkem ovlivnění MDA-MB-231 doxorubicinem je akumulace buněk v G2 fázi, a to po použití tří zvolených koncentrací 10 nM (24 %), 20 nM (45 %) a 40 nM (92 %), v porovnání s neovlivněnou kontrolou (12 %; Obr. 20B).

Ovlivnění kožních fibroblastů 80 nM a 120 nM doxorubicinem způsobilo signifikantní snížení procenta buněk v G1 fázi. Pouze 3 % ovlivněných buněk byla po použití 120 nM doxorubicinu v S fázi buněčného cyklu, zatímco u neovlivněných kontrolních buněk je v S fázi buněčného cyklu 13 % (Obr. 19C). U ovlivněných kožních fibroblastů nebyl zaznamenán signifikantní nárůst buněk v G2 fázi 72 hodin po ovlivnění 10, 20 and 40 nM doxorubicinem. Bylo pozorováno, že po aplikaci 80 nM doxorubicinu bylo 66 % buněk v G2 fázi buněčného cyklu a až 78 % buněk po použití 120 nM doxorubicinu, na rozdíl od 7 % v neovlivněných buňkách (Obr. 20C).



Obr. 19: Viabilita po ovlivnění doxorubicinem. WST-1 test 72 hodin po ovlivnění doxorubicinem (10, 20, 40, 80, 120 nM) u BT-549 (A), MDA-MB-231 (B) a kožní fibroblasty (C). Vyjádření buněčné smrti pomocí vyplavení laktát dehydrogenázy (%) 72 hodin po ovlivnění doxorubicinem (10, 20, 40, 80, 120 nM) u BT-549 (D), MDA-MB-231 (E) a kožní fibroblasty (F). Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.



Obr. 20: Analýza buněčného cyklu po ovlivnění doxorubicinem. BT-549 (A), MDA-MB-231 (B) a kožní fibroblasty (C) byly ovlivněny doxorubicinem a analyzovány po 72 hodinách. Reprezentativní histogramy ukazují procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu 72 hodin po ovlivnění doxorubicinem. Sloupcové grafy reprezentují souhrnné údaje o zastoupení buněk v G₁, S a G₂ fázi 72 hodin po ovlivnění doxorubicinem. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. *p ≤ 0,05.

5.3.3. Detekce primární řasinky u kožních fibroblastů

V další fázi experimentů byla provedena detekce primární řasinky. Metodou imunocytochemie bylo prokázáno, že kožní fibroblasty jsou nositeli primární řasinky. Druhou srovnávací metodou, která potvrdila přítomnost primární řasinky, byla transmisní elektronová mikroskopie (TEM).

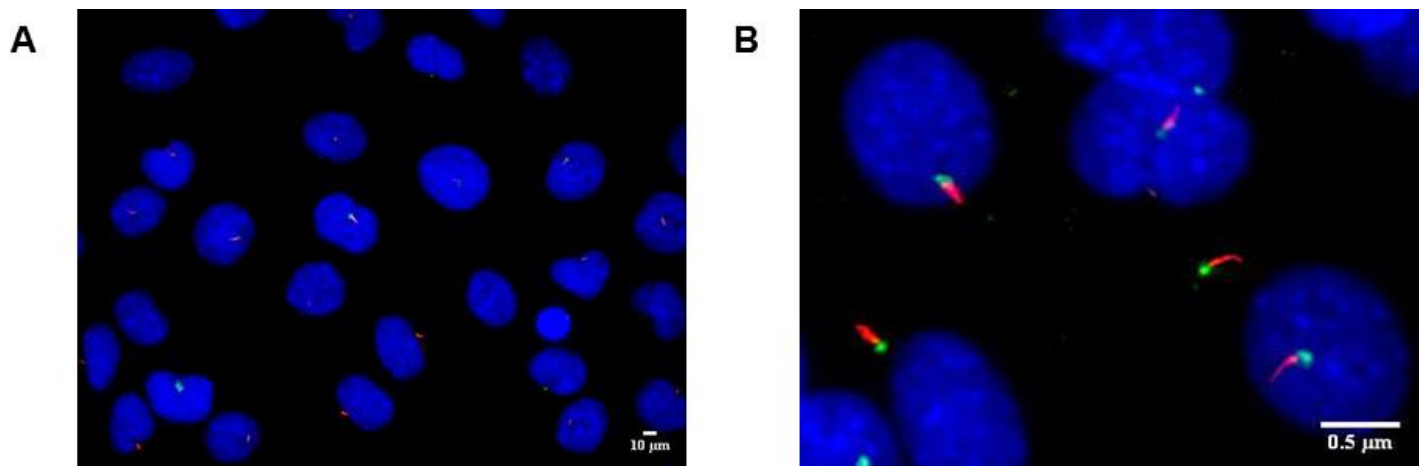
5.3.3.1. Ovlivnění kožních fibroblastů doxorubicinem zvyšující incidenci buněk s primární řasinkou

Po 72 hodinách inkubace ovlivněných buněk doxorubicinem byla detekována primární řasinka pomocí imunocytochemie (Obr. 21A, 21B). Významný nárůst buněk s primární řasinkou byl pozorován již po ovlivnění 10 nM doxorubicinem (~59 %), oproti neovlivněné kontrole (~43 %). U kožních fibroblastů ovlivněných 20 nM doxorubicinem bylo detekováno 62 % buněk s primární řasinkou, což bylo signifikantní zvýšení, oproti neovlivněné kontrole. Po ovlivnění 40 nM doxorubicinem došlo k mírnému poklesu procenta buněk s primární řasinkou na 58 % a v porovnání s neovlivněnou kontrolou nebyla zaznamenána statistická významnost. Po užití 80 nM došlo k opětovnému nárůstu procenta buněk s primární řasinkou a to na 64 % a o další 4 % u buněk ovlivněných 120 nM doxorubicinem (Obr. 23A). Obě tyto hodnoty byly signifikantně vyšší, oproti neovlivněné kontrole. Srovnání skupin mezi sebou nevykazovalo žádné statisticky významné změny. Jako další ověření přítomnosti primární řasinky u kožních fibroblastů ovlivněných doxorubicinem byla provedena analýza pomocí TEM (Obr. 24).

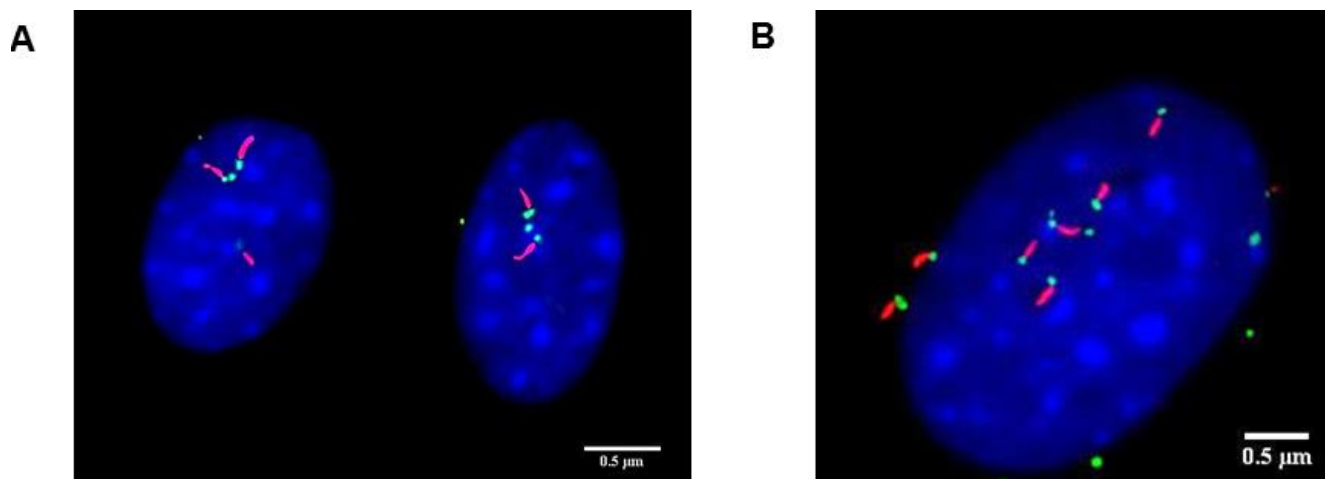
5.3.3.2. Kožní fibroblasty ovlivněné doxorubicinem vykazující přítomnost vícečetné řasinky

Buňky s vícečetnou řasinkou byly detekovány u kožních fibroblastů po aplikaci 20-120 nM doxorubicinu pomocí imunofluorescence (Obr. 22A, 22B). Vícečetná řasinka nebyla pozorována u neovlivněných kontrolních buněk a buněk ovlivněných 10 nM doxorubicinem (Obr. 23B). Po ovlivnění 20 nM doxorubicinem došlo k nárůstu procenta buněk s primární řasinkou o 25 % a o další 4 % po ovlivnění 40 nM doxorubicinem. Obě tato zvýšení byla signifikantní, oproti neovlivněné kontrole (0 %). Nejvyšší procento buněk s primární řasinkou bylo detekováno po ovlivnění 80 nM doxorubicinem (~39 %) a jednalo se statisticky významný nárůst v porovnání s neovlivněnou kontrolou. Po ovlivnění 120 nM doxorubicinem bylo analyzováno signifikantní procento buněk s primární řasinkou (~38 %), ve srovnání s neovlivněnou kontrolou (Obr. 23B). Porovnání skupin mezi sebou přineslo významný rozdíl

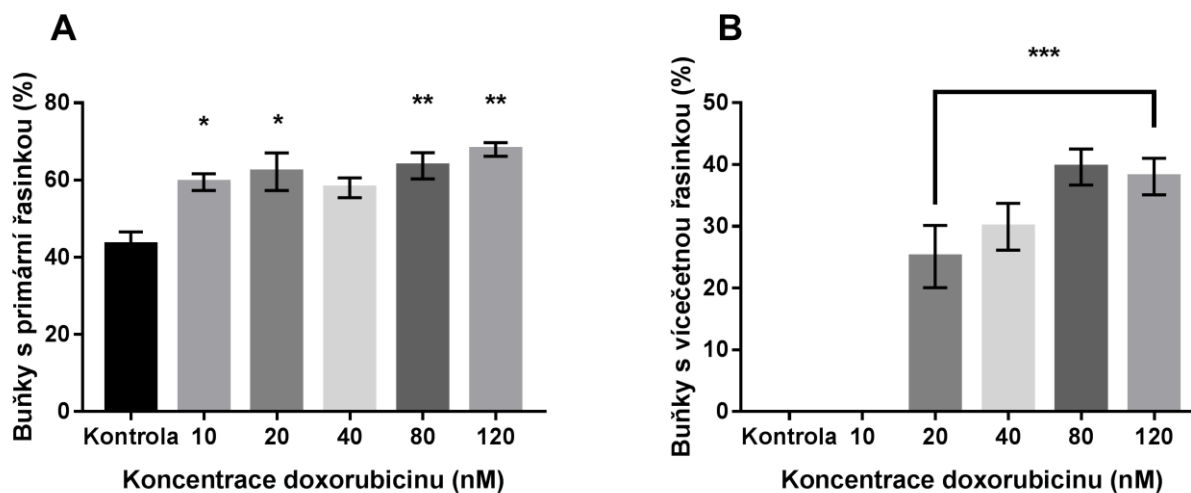
pouze v porovnání s koncentrací doxorubicinu 10 nM (10 nM, 0 %; 20 nM, 25 %; 40 nM, 29 %; 80 nM, 39 %; 120 nM, 38 %).



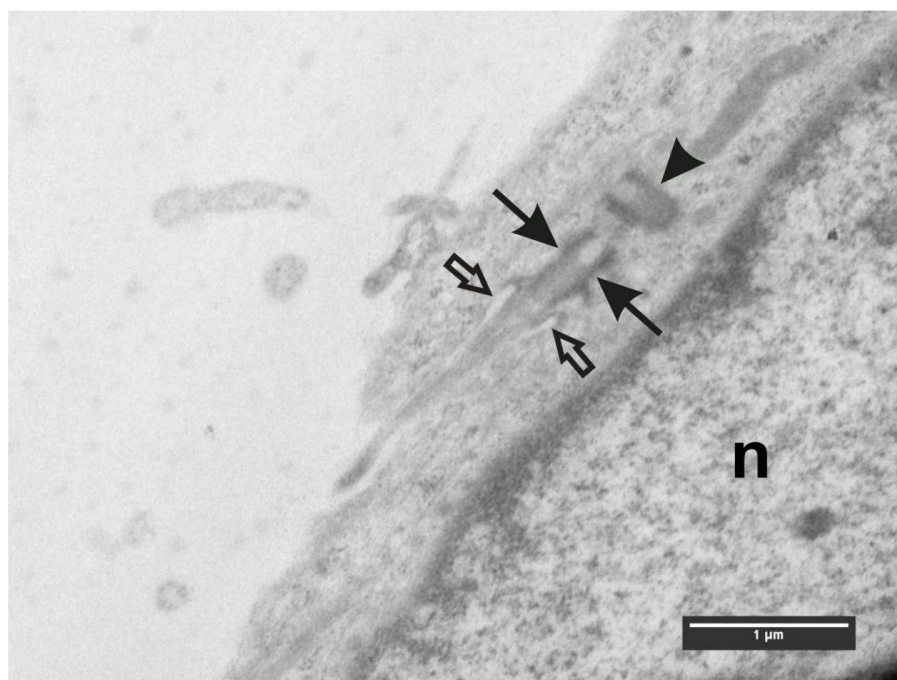
Obr. 21: Reprezentativní fotografie primární řasinky u buněk kožních fibroblastů. Detekce primární řasinky byla provedena pomocí imunofluorescence. Červeně je nabarvena axonema primární řasinky tvořená alfa tubulinem a zeleně se barví bazální tělísko tvořené gamma tubulinem. Jádra byla barvena modře pomocí DAPI. **(A)** Primární řasinka detekována 72 hodin po ovlivnění 10 nM doxorubicinem. **(B)** Primární řasinka detekována 72 hodin po ovlivnění 20 nM doxorubicinem.



Obr. 22: Reprezentativní fotografie vícečetné řasinky u buněk kožních fibroblastů. Detekce primární řasinky byla provedena pomocí imunofluorescence. Červeně je nabarvena axonema primární řasinky tvořená alfa tubulinem a zeleně se barví bazální tělísko tvořené gamma tubulinem. Jádra byla barvena modře pomocí DAPI. **(A)** Vícečetná řasinka detekována 72 hodin po ovlivnění 40 nM doxorubicinem. **(B)** Vícečetná řasinka detekována 72 hodin po ovlivnění 80 nM doxorubicinem.



Obr. 23: Výskyt primární řasinky po ovlivnění doxorubicinem u kožních fibroblastů. (A) představuje procentuální zastoupení buněk s primární řasinkou u kožních fibroblastů 72 hodin po ovlivnění doxorubicinem (10, 20, 40, 80, 120 nM). (B) Procento buněk s vícečetnou řasinkou u kožních fibroblastů ovlivněných doxorubicinem (10, 20, 40, 80, 120 nM) a barvených 72 hodin po ovlivnění. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.



Obr. 24: Reprezentativní fotografie z TEM. Podélný řez primární řasinkou u kožních fibroblastů ovlivněných 120 nM doxorubicinem. Primární řasinka se vynořuje z bazálního tělíska (černá šipka). Proximální oblast primární řasinky se nachází v ciliární kapse (prázdné šipky). Dceřiná centriola je uspořádána do pravého úhlu k přilehlému bazálnímu tělísku primární řasinky (šipka); n=nukleus.

5.3.4. Hodnocení viability a proliferace po ovlivnění taxolem

MDA-MB-231, BT-549 a kožní fibroblasty byly ovlivněny taxolem o koncentracích 1,25; 3,25; 5,25; 6,25 a 12,5 nM. Následně byl proveden test proliferace a viability ovlivněných MDA-MB-231, BT-549 a fibroblastů pomocí WST-1 testu a testu úniku LDH 72 hodin po expozici cytostatiku.

BT – 549 byly ovlivněny 1,25 nM taxolem a jejich viabilita a proliferace se snížila na 87 %, oproti neovlivněné kontrole. Po ovlivnění buněk 3,25 nM taxolem viabilita a proliferace signifikantně klesla o 18 % v porovnání s neovlivněnou kontrolou. Pouze 56 % BT – 549 bylo metabolicky aktivních po ovlivnění 5,25 nM taxolem a koncentrace 6,25 nM snížila viabilitu a proliferaci o další 2 %. Obě tato snížení byla vyhodnocena jako signifikantní, ve srovnání s neovlivněnou kontrolou. Nejvyšší použitá koncentrace taxolu 12,5 nM snížila signifikantně viabilitu a proliferaci buněk na 33 %, oproti neovlivněné kontrole (Obr. 25A).

Koncentrace taxolu 1,25 nM nevyvolala žádné signifikantní změny u ovlivněných MDA – MB – 231, oproti neovlivněné kontrole. Po ovlivnění buněk 3,25 nM a 5,25 nM taxolem byla viabilita proliferace signifikantně snížena na 64 % v porovnání s neovlivněnou kontrolou. Další významné snížení bylo detekováno po koncentraci 6,25 nM, u které pouze 55 % buněk vykazovalo známky metabolické aktivity, ve srovnání s neovlivněnou kontrolou. Pouze 45 % buněk bylo viabilních po ovlivnění 12,5 nM taxolem, což bylo vyhodnoceno jako signifikantní pokles, oproti kontrole (Obr. 25B).

Kožní fibroblasty nevykazovaly žádné signifikantní změny viability a proliferace po ovlivnění nejnižší koncentrací taxolu – 1,25 nM. Statisticky významná změna ve snížení viability a proliferace buněk byla detekována po ovlivnění 3,25 nM (~66 %) taxolem, oproti neovlivněné kontrole. Použití vyšších koncentrací taxolu – 5,25 nM a 6,25 nM způsobilo snížení metabolické aktivity fibroblastů na 54 %. Toto snížení bylo signifikantní, ve srovnání s neovlivněnou kontrolou. Pouze 50 % kožních fibroblastů bylo viabilních po použití taxolu o koncentraci 12,5 nM. Opět se jednalo o signifikantní změnu, oproti kontrole (Obr. 25C).

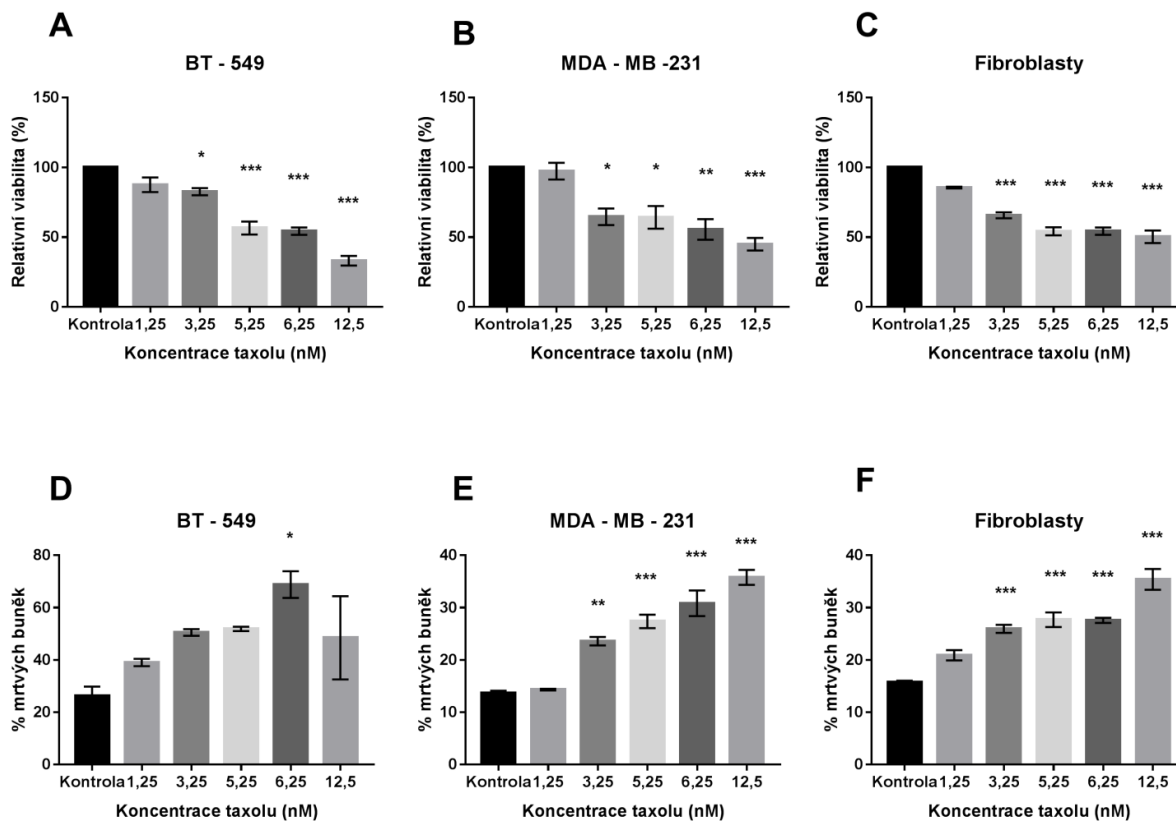
Test úniku laktátdehydrogenázy (LDH) byl proveden po ovlivnění BT – 549, MDA – MB – 231 a kožních fibroblastů cytostatikem taxolem v předem určených koncentracích 1,25 nM; 3,25 nM; 5,25 nM; 6,25 nM a 12,5 nM.

Po ovlivnění BT – 549 koncentracemi 1,25 nM, 3,25 nM a 5,25 nM došlo ke zvýšení procenta mrtvých buněk, avšak toto zvýšení nebylo vyhodnoceno jako signifikantní, oproti neovlivněné kontrole (1,25 nM, 39 %; 3,25 nM, 50 %; 5,25 nM, 52 %; kontrola, 26 %). Koncentrace taxolu 6,25 nM signifikantně zvýšila procento mrtvých buněk na 69 %, ve srovnání s kontrolou (~26 %). Ovlivnění 12,5 nM taxolem nevyvolalo signifikantní změny, v porovnání s kontrolou (Obr. 25D).

MDA – MB – 231 nevykazovaly změny v procentu mrtvých buněk ovlivněných 1,25 nM taxolem (~14 %), oproti neovlivněné kontrole (~13,6 %). Koncentrace taxolu 3,25 nM zvýšila signifikantně procento mrtvých buněk na 23,5 %, ve srovnání s kontrolou. Další významné zvýšení o 4 % bylo detekováno po ovlivnění 5,25 nM taxolem. Koncentrace taxolu 6,25 nM zvýšila procento mrtvých buněk na 30 % a k dalšímu zvýšení o 5 % došlo při použití koncentrace taxolu 12,5 nM. Obě tato zvýšení byla analyzována jako signifikantně významná, oproti neovlivněné kontrole (Obr. 25E).

Po ovlivnění kožních fibroblastů 1,25 nM taxolem (~21 %) nebyl detekován signifikantní nárůst procenta mrtvých buněk, oproti neovlivněné kontrole (~16 %). Koncentrace taxolu 3,25 nM zvýšila významně procento mrtvých buněk na 26 %. Ovlivnění buněk koncentrací 5,25 nM a 6,25 nM zvýšilo procento mrtvých buněk na 28 %. Všechna tato tři zvýšení byla signifikantní v porovnání s neovlivněnou kontrolou. Rovněž při použití nejvyšší koncentrace taxolu 12,5 nM bylo detekováno signifikantní procento mrtvých buněk (~35 %), ve srovnání s kontrolou (Obr. 25F).

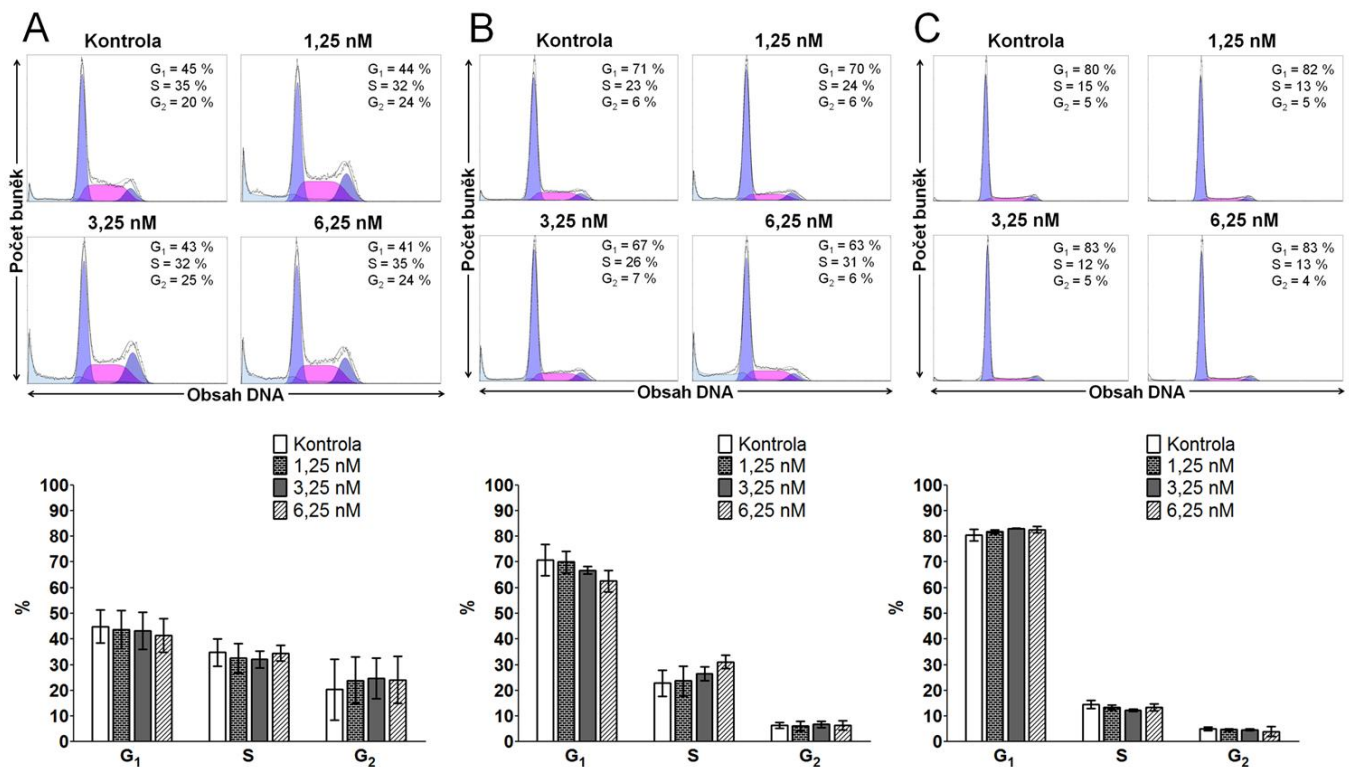
Výsledky WST-1 testu ukazují, že proliferace a viabilita ovlivněných buněk klesá se zvyšující se koncentrací cytostatika, což koreluje s testem úniku LDH a zvyšujícím se procentem mrtvých buněk.



Obr. 25: Viabilita po ovlivnění taxolem. WST-1 test 72 hodin po ovlivnění 1,25, 3,25, 5,25, 6,25 a 12,5 nM taxolem u BT-549 (A), MDA-MB-231 (B) a kožních fibroblastů (C). Vyjádření buněčné smrti pomocí vyplavení laktát dehydrogenázy (%) 72 hodin po ovlivnění 1,25, 3,25, 5,25, 6,25 a 12,5 nM taxolem u BT-549 (D), MDA-MB-231 (E) a kožních fibroblastů (F). Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

5.3.5. Hodnocení buněčného cyklu po ovlivnění taxolem

Analýza buněčného cyklu byla provedena u BT-549, MDA-MB-231 a kožních fibroblastů po ovlivnění taxolem po dobu 72 hodin. Na základě předchozích experimentů byly vybrány tři vhodné koncentrace taxolu – 1,25; 3,25; 6,25 nM, které byly použity pro ovlivnění BT-549, MDA-MB-231 a kožních fibroblastů. Výsledky analýzy ukazují, že ovlivnění buněk taxolem nezpůsobilo žádné signifikantní změny v distribuci buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu u BT-549 (Obr. 26A), MDA-MB-231 (Obr. 26B) ani u kožních fibroblastů (Obr. 26C).



Obr. 26: Analýza buněčného cyklu po ovlivnění taxolem. BT-549 (A), MDA-MB-231 (B) a kožní fibroblasty (C) byly analyzovány 72 hodin po ovlivnění taxolem. Barevné histogramy ukazují procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Sloupcové grafy reprezentují souhrnné údaje o zastoupení buněk v G1, S a G2 fázi. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3.

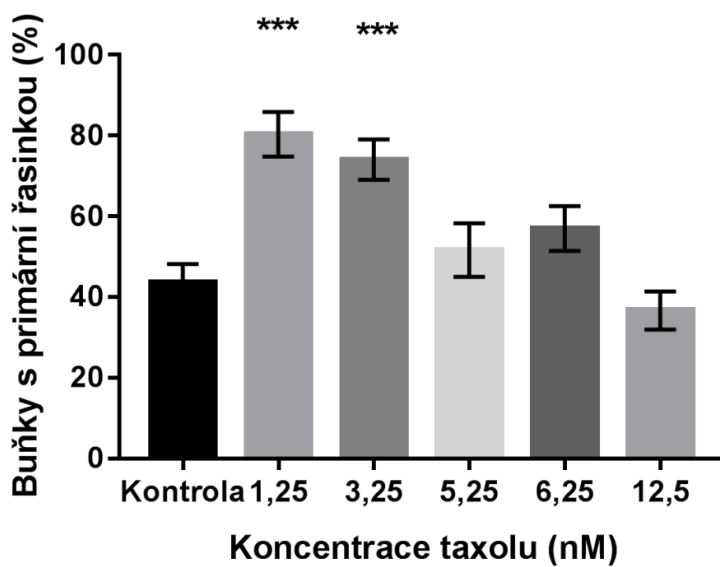
5.3.6. Detekce primární řasinky u kožních fibroblastů

Primární řasinka byla detekována pomocí imunocytochemických metod. Tímto barvením bylo prokázáno, že buněčná linie fibroblastů je nositelem primární řasinky. Druhá metoda, která prokázala přítomnost primární řasinky u fibroblastů, byla transmisní elektronová mikroskopie (TEM).

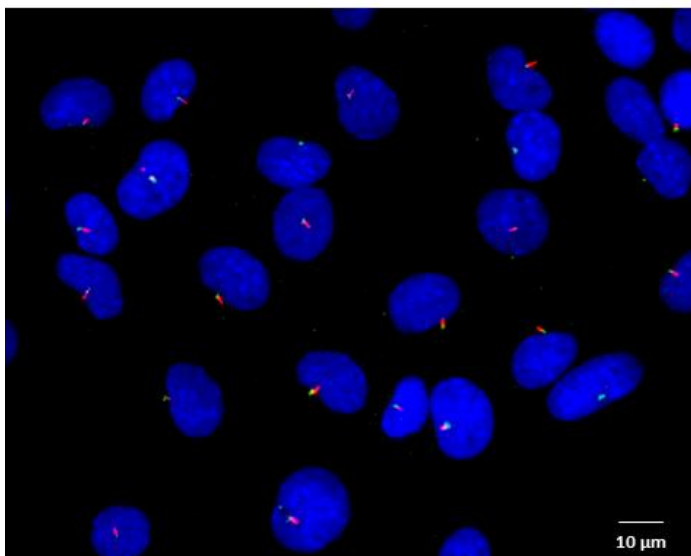
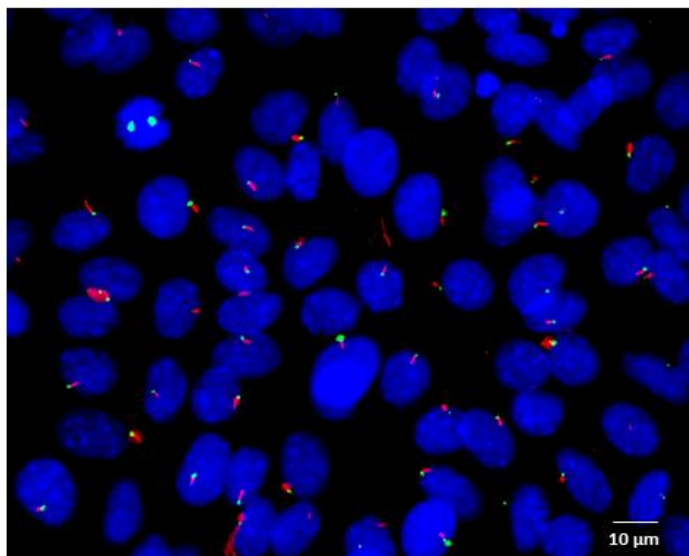
5.3.6.1. Ovlivnění kožních fibroblastů taxolem zapříčiňující zvýšení počtu primární řasinky, avšak pouze u nízkých koncentrací

Kožní fibroblasty byly ovlivněny taxolem v následujících koncentracích 1,25; 3,25; 5,25; 6,25 a 12,5 nM po dobu 72 hodin. Primární řasinka byla detekována díky použití imunofluorescence (Obr. 28A, 28B, 29A, 29B). Procento buněk s primární řasinkou se významně zvýšilo po ovlivnění fibroblastů 1,25 nM (~80 %) a 3,25 nM taxolem (~74 %; Obr. 27). Avšak po ovlivnění fibroblastů koncentracemi taxolu, 5,25; 6,25 a 12,5 nM byl

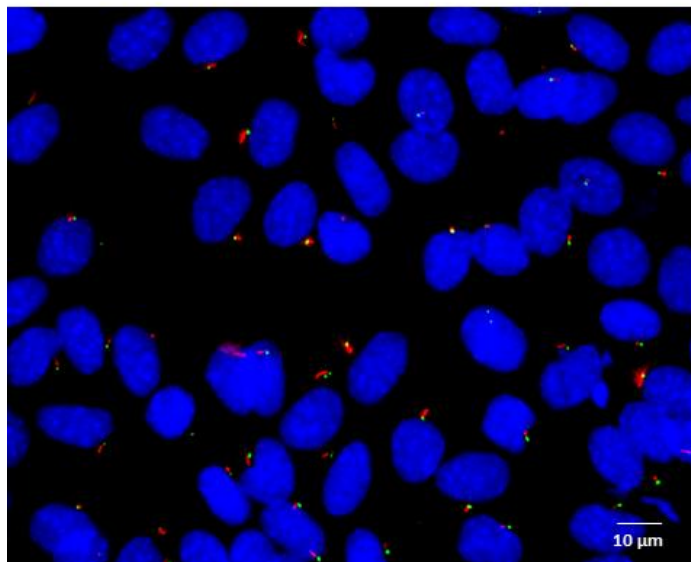
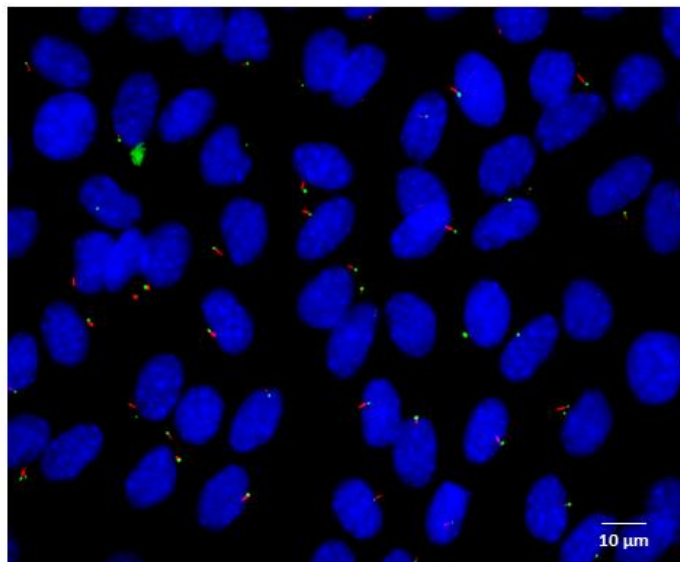
zaznamenán pokles buněk s primární řasinkou v porovnání s nižšími koncentracemi taxolu (1,25 a 3,25 nM), takže počet buněk s primární řasinkou nevykazoval signifikantní odlišnost od neovlivněné kontroly (Obr. 27). V dalším kroku byla primární řasinka detekována pomocí TEM (Obr. 30). Vícečetná řasinka nebyla pozorována 72 hodin po aplikaci taxolu, na rozdíl od kožních fibroblastů ovlivněných doxorubicinem.



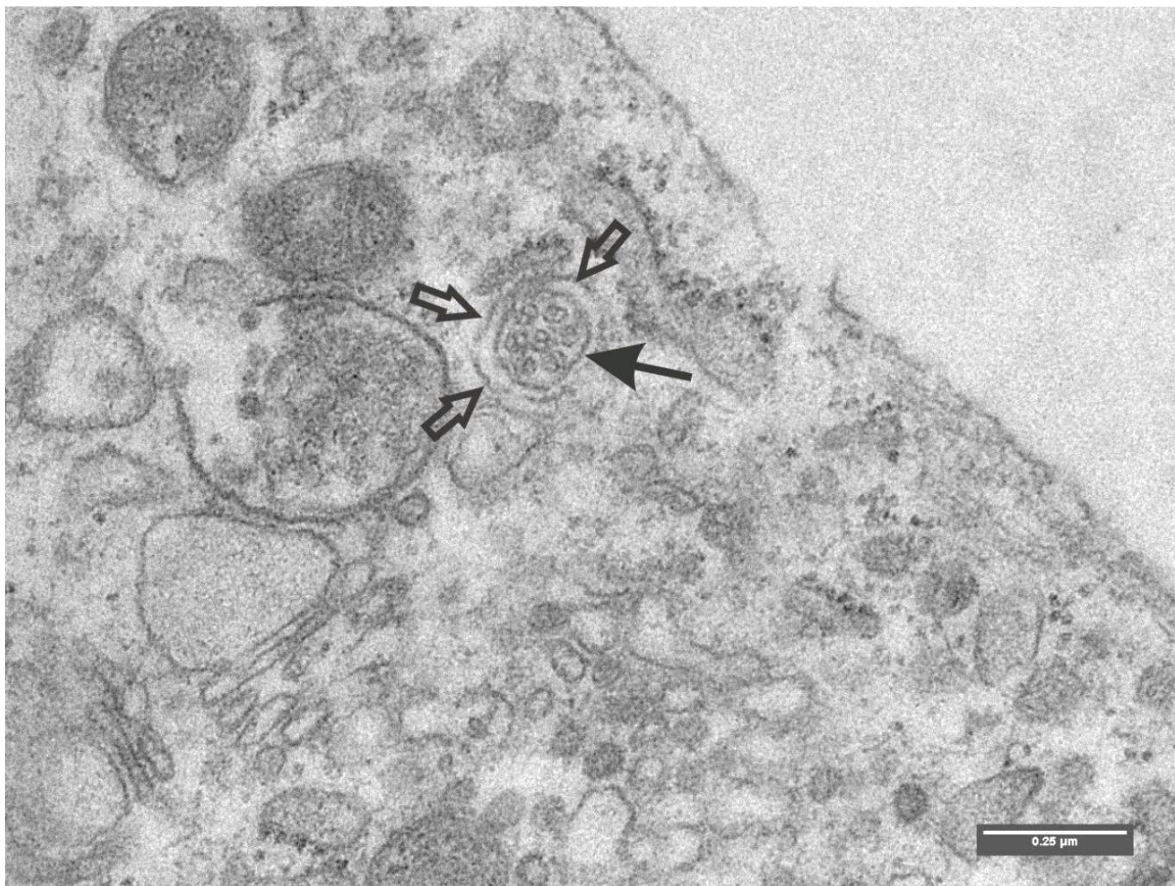
Obr. 27: Výskyt primární řasinky u kožních fibroblastů po ovlivnění taxolem. Procentuální vyjádření počtu primární řasinky u kožních fibroblastů po ovlivnění 1,25; 3,25; 5,25; 6,25 a 12,5 nM taxolem. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. *** $p \leq 0,001$.

A**B**

Obr. 28: Reprezentativní fotografie kožních fibroblastů ovlivněných taxolem. Primární řasinka byla detekována pomocí imunofluorescence. Červeně je nabarvena axonema primární řasinky tvořená alfa tubulinem a zeleně se barví bazální tělísko tvořené gamma tubulinem. Jádra byla barvena modře pomocí DAPI. **(A)** Primární řasinka detekována 72 hodin po ovlivnění 1,25 nM taxolem. **(B)** Primární řasinka detekována 72 hodin po ovlivnění 3,25 nM taxolem.

A**B**

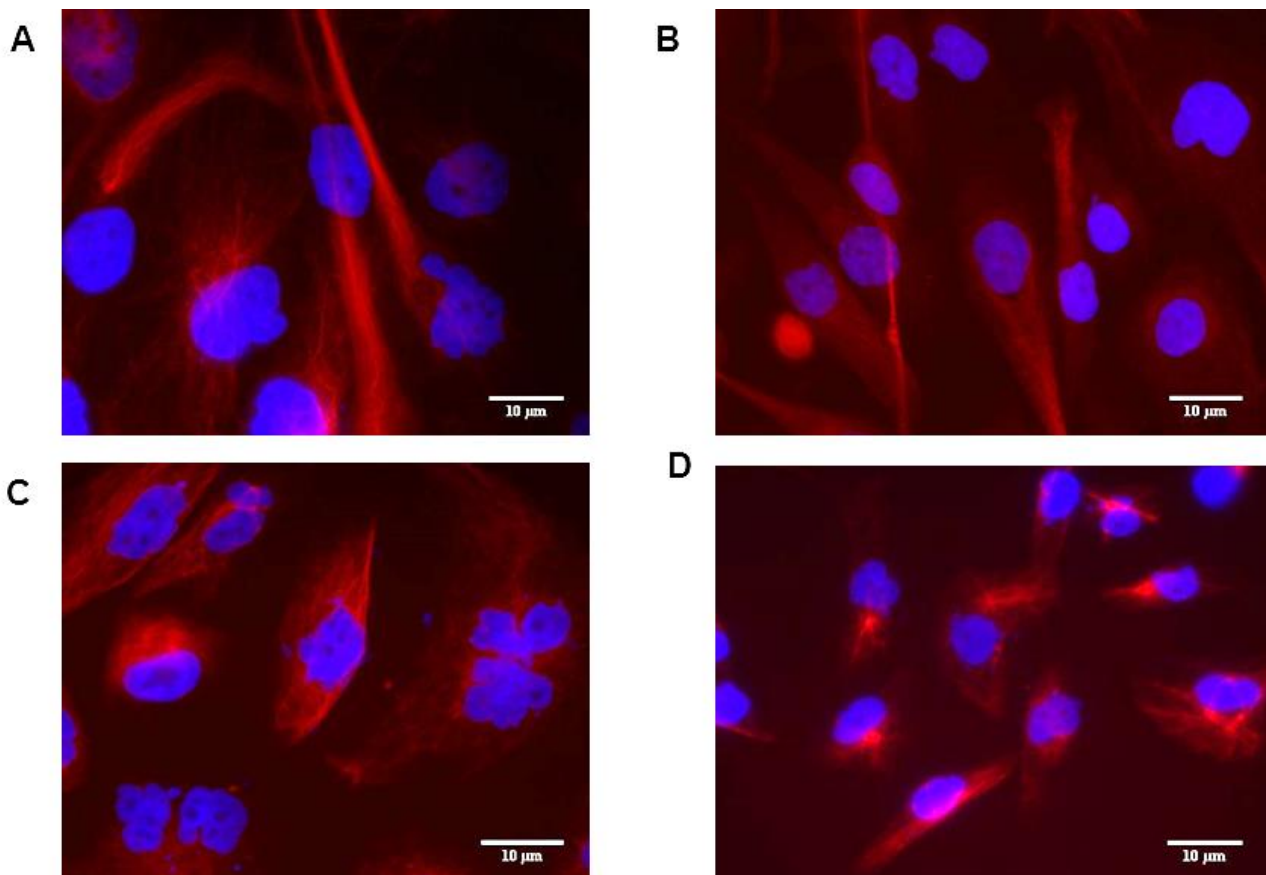
Obr. 29: Reprezentativní fotografie kožních fibroblastů ovlivněných taxolem. Primární řasinka byla detekována pomocí imunofluorescence. Červeně je nabarvena axonema primární řasinky tvořená alfa tubulinem a zeleně se barví bazální tělísko tvořené gamma tubulinem. Jádra byla barvena modře pomocí DAPI. **(A)** Primární řasinka detekována 72 hodin po ovlivnění 5,25 nM taxolem. **(B)** Primární řasinka detekována 72 hodin po ovlivnění 6,25 nM taxolem.



Obr. 30: Reprezentativní fotografie z TEM. Fotografie kožních fibroblastů ovlivněných 1,25 nM taxolem demonstruje příčný řez primární řasinkou s odhalenou strukturou axonemy (černá šipka). Řez axonemou odhaluje 6 dvojic mikrotubulů uspořádaných okolo jednoho centrálního dvojitého mikrotubulu. Prázdné šipky znázorňují vnější plazmatickou membránu ciliární kapsy.

5.3.7. Absence primární řasinky u triple negativních linií karcinomu prsu po ovlivnění kombinací doxorubicinu a taxolu

U buněčných MDA-MB-231 a BT-549 byla zjištěna totální absence primární řasinky jak bez aplikace cytostatika, tak po ovlivnění doxorubicinem (10, 20, 40, 80 a 120 nM) či taxolem (1,25; 3,25; 5,25; 6,25 a 12,5 nM) po sledovanou dobu 72 hodin (Obr. 31).



Obr. 31: Reprezentativní fotografie MDA-MB-231 a BT-549 po ovlivnění taxolem. Barvení pomocí imunofluorescence acetylovaným alfa tubulinem (červená). Jádra jsou obarvena DAPI (modrá). BT-549 (A) a MDA-MB-231 (B) byly ovlivněny 3.25 nM taxolem. Primární řasinka nebyla pozorována ani u jednoho typu buněčné linie 72 hodin po ovlivnění. (C) Primární řasinka nebyla pozorována 72 hodin po ovlivnění 10 nM doxorubicinem u BT-549, ani u MDA-MB-231 při stejné koncentraci doxorubicinu.

6. Diskuze

Primární řasinka je solitární, senzorická, mikrotubulární struktura, která se v klidové části buněčného cyklu nachází na povrchu většiny typů lidských buněk (buněk obratlovců), včetně buněk embryonálních, kmenových a buněk stromatu nádorů (Dvořák 2015). Primární řasinku a její morfologické změny, jako např. počet, délka, ale také změny na molekulární úrovni ve smyslu např. exprese různých proteinů, můžeme považovat za jednoho z kandidátů majících prediktivní hodnotu ve vztahu k různým formám poškození buněk. V současné době již víme, že poruchy primárních řasinek se podílí na vzniku široké škály lidských onemocnění, od vzácných multiorgánových syndromů a vývojových vad, až po nejčastější civilizační onemocnění jako jsou nádorová (Dvorak et al. 2014; Gerhardt et al. 2016) a kardiovaskulární onemocnění (Van der Heiden et al. 2011; Dvořák et al. 2012a; Mohieldin et al. 2016), polycystická choroba ledvin (Dvořák et al. 2013, Goggolidou and Wilson 2016) či artróza (Dvořák et al. 2012b, Ruhlen and Marberry 2014). Byly také zaznamenány další informace o tom, že dočasná tvorba primárních řasinek je nezbytná, např. pro reparaci po poranění některých typů buněk, např. řasinkového epitelu dýchacích cest (Jain et al. 2010), ale v současné době také v regenerativní medicíně (Bodle et al. 2016). Ve své dizertační práci jsem se zaměřila na experimenty spojené s hodnocením morfologických změn primární řasinky. Morfologické změny byly vyvolány působením ionizujícího záření, metabolického stresu indukovaného hladověním a působení chemických látek spojených s chemoterapií (cytostatiky) v *in vitro* podmínkách. Vzhledem k rozdílným faktorům působení na buňku a její morfologickou stabilitu je další diskuze rozdělena s cílem objektivně posoudit prediktivní význam zjištěných změn primární řasinky v prezentovaných experimentech.

6.1. Diskuze k otázkám vlivu ionizujícího záření na primární řasinku

Ionizující záření svojí povahou ovlivňuje různé buněčné úrovně. Mimo již známé efekty na úrovni DNA a další molekulární mechanizmy (Řezáčová a Vávrová 2011) ovlivňuje cytoskeletální stabilitu buňky, a tím také její morfologické struktury. Primární řasinka jako solitární, senzorická, mikrotubulární struktura představuje vhodný objekt pro studium změn na cytoskeletální úrovni. Ionizující záření indukuje poškození DNA, zejména vznik tzv. dvojitých zlomů DNA (Goodhead 1994). Toto poškození se dosud považuje za základní mechanismus buněčné smrti spojený s určitou prahovou dávkou záření, která aktivuje mechanismus signalizace k apoptóze. Molekulární procesy poškození jsou ale také spojeny se schopností jejich opravy a reparace. Vliv záření na buňku je z pohledu homeostázy

dynamickým procesem, kde je limitujícím faktorem indukce apoptózy (Roos and Kaina 2013).

Účinek záření na normální i nádorové buňky v *in vitro* podmínkách má charakter deterministických (nestochastických) účinků, které nejsou náhodné a mají prahovou hodnotu (1–3 Gy). Nad prahovou dávkou roste závažnost poškození přibližně lineárně. Obecně platí, že po ozáření savčích buněk *in vitro* jsou získány dva hlavní typy křivek přežití, a to – exponenciální a sigmoidální (Řezáčová a Vávrová 2011). V našich *in vitro* experimentech s buněčnou linií C2C12 byly použity dávky záření modelující situaci radiačního poškození spojeného se změnami na úrovni stability cytoskeletu – primární řasinky. V první části *in vitro* experimentů byla provedena analýza závislosti efektu na dávce záření a to z pohledu hodnocení viability a proliferace buněk, hladiny uvolněné LDH a aktivity kaspáz, změn buněčného cyklu a primární řasinky jako indikátorů radiačního poškození. Obecně platí, že se stoupající dávkou záření dochází také k zvyšování počtu mrtvých buněk. Radiosenzitivita nebo radiorezistence je podmíněna celou řadou faktorů, ale stále platí základní radiobiologický zákon formulovaný v roce 1906 francouzskými vědci Bergonié a Tribondeauovou. Tvrdí, že radiosenzitivní tkáně jsou tkáně s velkým počtem rychle se dělících málo diferencovaných buněk. Naopak, že radiorezistentní jsou tkáně s málo se dělícími anebo nedělícími se diferencovanými buňkami.

Radiosenzitivita a radiorezistence tkání a buněk je základním parametrem pro koncipování *in vivo* a *in vitro* experimentů. Modelové *in vitro* experimenty využívající normální nebo nádorové buněčné linie musí v první fázi pokusů jasně určit radiosenzitivitu použité buněčné linie, neboť tato se významně liší - některé linie jsou významně radiosenzitivní, jako např. krvetvorné buňky a linie z nich odvozené, nebo naopak některé nádorové linie jsou méně senzitivní (Vávrová a Filip 2002). Radiosenzitivitu v *in vitro* podmínkách můžeme určit celkem jednoduchým cytochemickým testem stanovení viability, stanovení hladiny LDH, která je přítomna v cytoplazmě buněk a do extracelulárního prostředí se uvolňuje již při mírném tkáňovém poškození - jako nespecifický marker rozpadu buněk. Volba vhodné buněčné linie vycházela z předpokladu, že buňky budou radiosenzitivní a také budou vykazovat cytoskeletální aktivitu v podobě primární řasinky. Z těchto důvodů byla použita buněčná linie C2C12, se kterou jsme měli již dřívější dobré experimentální zkušenosti (Filipová et al. 2015).

V našich *in vitro* experimentech bylo zjištěno, že záření způsobuje dávkově závislé snížení buněčné viability a proliferace se signifikantním počtem mrtvých buněk a únikem LDH z cytoplazmy poškozených buněk po ozáření dávkou 6 Gy. Signifikantně nejvyšší snížení viability buněk bylo pozorováno po dávce 20 Gy. Vzhledem k výše uvedeným výsledkům můžeme buněčnou linii C2C12 hodnotit jako radiosenzitivní.

Významné snížení viability buněk vyvolané zářením dokladuje situaci, kdy dochází ke změnám indukovaným poškozením DNA a dalších buněčných struktur. V případě, že oprava zářením indukovaných změn a poškození DNA je pomalá nebo nedostatečná, dochází na úrovni mnohobuněčného organismu k zahájení programované buněčné smrti poškozených buněk – apoptóze. Apoptóza je způsob aktivně řízené buněčné smrti, při kterém dochází k sériové aktivaci proteáz, endonukleáz a destrukci buňky, kterou doprovází typické morfologické změny, jako např. ztráta asymetrie fosfolipidů buněčné membrány, kondenzace chromatinu, fragmentace jádra, výdutě cytoplazmatické membrány a další. Tyto změny vedou k rozpadu buňky za vzniku apoptotických tělísek, která jsou v konečné fázi *in vivo* fagocytována. Apoptóza je indukována tzv. vnější, nebo vnitřní cestou. Aktivace vnější cesty je přes receptory smrti a dojde k vytvoření signálního komplexu DISC (death-inducing signaling complex), kde klíčovou molekulou je iniciátorová kaspáza-8. Kaspáza-8 aktivuje prokaspasu-3 a kaspáza-3 je pak odpovědná za vlastní apoptotický proces. Při aktivaci vnitřní cesty, která je spouštěná při poškození DNA, je aktivována kaspáza-9, a to především v důsledku uvolnění cytochromu c (cyt-c) z aktivovaných mitochondrií. Prokaspáza-9 vytvoří komplex (apoptozom) s apoptotickým, proteázu aktivujícím faktorem (Apaf-1) a cyt-c. Kaspáza-9 aktivuje především prokaspázu-3, následně kaspázu-3 a tím apoptózu (Delhalle et al. 2003, Xu and Shi 2007). Ionizujícím zářením je převážně iniciována apoptóza vnitřní neboli mitochondriální cestou (Jin and El-Deiry 2005).

V našich dalších analýzách, navazujících na hodnocení viability buněk, byla aktivita efektorové kaspázy 3/7, iniciační kaspázy 8 a kaspázy 9 měřena 72 hodin po ozáření dávkou 10 Gy a 20 Gy. Výsledky ukazují, že aktivita sledovaných kaspáz významně stoupala se zvyšující se dávkou záření, což bylo průkazné pro detekci apoptózy u buněčné linie myoblastů v závislosti na dávce záření. Po dávkách 10 a 20 Gy jsme rovněž pozorovali typické morfologické změny - fragmentaci jádra a kondenzaci chromatinu. Po nižších dávkách tento efekt nebyl patrný.

Pokud v eukaryotických buňkách dojde k poškození DNA, je aktivována signalizační kaskáda odpovědi na poškození DNA, což spouští zastavení buněčného cyklu, opravy DNA, aktivovanou buněčnou smrt apoptózou nebo mitotickou katastrofu či stresem vyvolané předčasné stárnutí. Selhání těchto mechanismů vede ke genomické nestabilitě a karcinogenezi. Nejnebezpečnější léze jsou dvojité zlomy na DNA, které mohou být způsobeny ionizujícím zářením. Během několika minut po ozáření dojde k aktivaci ATM a ATR (Bakkenist and Kastan, 2003). Aktivované ATM a ATR následně fosforylují cílové substráty, včetně kináz kontrolních bodů (Chk1 a Chk2) a proteinu p53, který působí jako signální snímač, jež iniciuje mj. zastavení buněčného cyklu (Kastan and Bartek 2004, Lavin et al. 2005, Vavrova et al. 2013).

Zástava buněčného cyklu má několik mechanismů a může vyústit v blokování jak v G1/S fázi, tak v G2/M fázi. Tento mechanismus brání buňkám s nereparovaným poškozením ve vstupu do vlastní mitózy. Z výše uvedeného vyplývá, že důležitou roli při reparaci mají tzv. kontrolní body buněčného cyklu, v nichž se progrese v cyklu při poškození DNA zastaví a tím je poskytnut čas k reparaci poškození. Je známo, že u některých typů buněk záření zablokuje buněčnou populaci v G2/M fázi. Zpoždění vstupu do mitózy, které tím vznikne, vzrůstá s dávkou a je podstatně větší pro záření s vysokou hustotou ionizace (Řezáčová a Vávrová 2012).

V našem experimentu při hodnocení vlivu záření na buněčný cyklus u C2C12 bylo zjištěno, že 24 a 72 hodin po ozáření dávkou 6 Gy dochází k zablokování buněk v G1 fázi buněčného cyklu. Dávka 20 Gy vyvolává zablokování buněk v G2 fázi a také významný pokles buněk v S fázi buněčného cyklu. Akumulace buněk v G2 fázi znamená, že léze DNA přetrvávají z předcházející S fáze. Hlavní úlohu v regulaci bloku buněčného cyklu v G2 fázi hrají kinázy Chk1 a Chk2 a následná deregulace fosfatáz rodiny Cdc25. Tento mechanismus se také uplatňuje při vzniku radiorezistence, např. u nádorových buněk s mutovanou formou p53, kdy dochází k dlouhému zablokování buněk v G2 fázi. V důsledku tohoto bloku je poškození vyvolané zářením reparováno a buňky mohou být pak více rezistentní k účinku záření (Teyssier et al. 1999).

Záření ovlivňuje přímo přes již výše popsané mechanismy poškození na úrovni DNA další regulační úrovně, také úroveň buněčných organel, cytoskeletu a s ním spojené v našich experimentech sledování primární řasinky. Vznik a zánik primární řasinky je úzce spojen s duplikací centrozomu během buněčného cyklu, neboť bazální tělísko je formováno

z mateřské centrioly. Při normálních podmínkách k duplikaci centrozomu dochází právě jednou za buněčný cyklus. Během S fáze se mateřská a dceřiná centriola uvolní a každá z nich nukleuje procentriol. Tyto procentrioly se prodlužují a zrají během pozdní S fáze a G2 fáze. Z toho důvodu jsou duplicitní centrozomy připoutány k sobě. Toto připoutání umožňuje volné spojení mezi proximálními konci obou dvou rodičovských centriol a je odstraněno až během pozdní G2 fáze, aby se mohlo formovat mitotické vřeténko (Nigg and Stearns, 2011). Duplikace centrozomů vyžaduje aktivitu cyklindependentních kináz; takto je koordinována s replikací DNA, ale také zahrnuje procesy koordinace rozpojení a uvazování centriol (Nigg and Raff, 2009, Inanç et al. 2010). Abnormální multiplikace centrozomů byla pozorována u buněk vystavených vlivům, které poškozují DNA, jako je ionizující záření (Dodson et al. 2004, Kawamura et al. 2004, Bourke et al. 2007, Dodson et al. 2007, Inanç et al. 2010).

Mechanismus, který umožňuje hyperamplifikaci centrozomů v buňkách, u kterých přetrvává poškození DNA, není zatím znám. Bylo zjištěno, že inhibice ATM a ATR kinázy snižuje hyperamplifikaci centrozomů (Dodson et al. 2004) a také je vyžadována aktivita Chk1 (Bourke et al. 2007). Při ionizujícím záření dochází k uvolnění centriol z centrozomů v G2 fázi buněčného cyklu a k aktivaci separazy (Conroy et al. 2012), která se podílí na rozpuštění vazeb u centriol (Prosser et al. 2012).

Jedním z úkolů našich experimentů byla detekce změn souvisejících s primární řasinkou během 24 a 72 hodin po ozáření dávkami 2, 6, 10 a 20 Gy. Imunocytochemickou metodou bylo zjištěno, že signifikantní zvýšení a nejvyšší procento buněk s primární řasinkou bylo detekováno 72 hodin po ozáření dávkou 20 Gy. Buňky s vícečetnou řasinkou byly detekovány 72 hodin po ozáření dávkami 10 Gy a 20 Gy, tedy po dávkách, které indukují signifikantní blok buněčného cyklu v G2 fázi (Filipová et al. 2015). Naše zjištění ukazují, že ozářené myoblasty byly nejen plně schopny ciliogeneze, ale také vytvořily vícečetné primární řasinky. Conroy et al. (2012) pozoroval vícečetné řasinky u ozářených TERT-RPE1 epiteliálních buněk sítnice. Detekované vícečetné řasinky pravděpodobně vyrůstají z jedné ciliární kapsy. Tato pozorování naznačují, že znásobení centrozomů po poškození DNA ozářením by mohlo být následováno tvorbou vícečetné řasinky.

Zvýšené procento buněk s primární řasinkou bylo pozorováno po ozáření gamma paprsky (Conroy et al. 2012, Filipová et al. 2015), UV zářením nebo po teplotním stresu (Villumsen et al. 2013). Ciliace vyvolaná UV zářením nebo tepelným stresem závisí na p38, která vyvolává posunutí satelitních centriolárních faktorů, jako je například 5 - azacytidin

indukovaný protein 1, Pericentriolar material 1 a centrozomální protein 290 kDa. Nicméně, toto nebylo pozorováno po rentgenovém záření (Villumsen et al., 2013). Zdá se, že tvorba primární řasinky závisí na funkční stavbě mateřské centrioly stejně jako zralé pericentrální matrix (Ishikawa et al., 2005; Graser et al., 2007; Moser et al., 2010, Conroy et al. 2012).

6.2. Diskuze k otázkám vlivu metabolického stresu indukovaného hladověním na primární řasinku

Dalším faktorem, který může významně ovlivňovat cytoskeletální stabilitu buněk, je metabolický buněčný stres, který může být indukován jak zvýšeným přísunem látek potřebných k životu buněk, tak hladověním. V *in vitro* experimentech, zabývajících se problematikou buněčné fyziologie metabolismu a poruch metabolismu, je používán model založený na sníženém obsahu séra (FBS – fetal bovine serum) nebo jeho úplné absence v kultivačním médiu (Pirkmajer and Chibalin 2011). Metabolický buněčný stres indukovaný hladověním, je založen na využívání různých nízkých koncentrací séra (FBS) v kultivačním médiu a časovém intervalu, kdy jsou buňky vystaveny hladovění. Je možné využít rozdílných koncentrací FBS 0,1% - 0,5% (Levin et al. 2010) až 2-5% (Clemente et al. 2005) nebo extrémně nízké koncentrace 0,05% (Kuznetsov et al. 2011a), různých časových intervalů hladovění od 15 až 30 minut nebo několika hodin až týdnů (Pirkmajer and Chibalin 2011). Podobně jako *in vitro* vlivy ionizujícího záření na buňku, má i hladovění celou řadu shodných patofyziologických procesů, a to především z pohledu indukce apoptózy (Terra et al. 2011) a dalších úrovní molekulárních mechanismů poškození, jako např. degradace proteinů (Epstein et al. 1975), reakce na buněčný stres (Arrington and Schnellmann 2008) nebo také na cytoskeletální stabilitu – primární řasinku (Kim et al. 2016).

V našich experimentech byla použita buněčná linie C2C12. Jako model pro indukci změn po hladovění byl použit podíl 0,5% FBS a délka expozice hladovění byla 72 hodin. Tento použitý časový interval vycházel z dřívějších, zatím nepublikovaných experimentů, dokladujících, že metabolický stres indukovaný hladověním buněk statisticky významně snižuje viabilitu a proliferaci 72 hodin po ovlivnění.

Při hladovění můžeme zaznamenat reakce indukující mimo jiné také stresové nebo reparační mechanismy. Vychází to někdy z nepřesného předpokladu, že buňky, které jsou kultivovány v médiu se sníženým obsahem séra a jsou vystaveny sérovému hladovění, mají sníženou buněčnou aktivitu (Codeluppi et al. 2011). V těchto podmínkách ale probíhají další reakce spojené se stresovou reakcí, která je právě opakem hypoaktivního stavu. Levin et al.

v proteomické studii jasně ukázal odlišné odpovědi na 24 hodinové hladovění buněk v médiu obsahujícím 0,5% FBS (Levin et al. 2010) a podobně u jiných autorů, kde byly studovány reakce bez přítomnosti séra v kultivačním médiu (Ching et al. 2010) nebo stavy, kdy bylo kultivační médium obohacené navíc o 50% FBS ve srovnání s normální koncentrací (Balsalobre et al. 1998).

Obecně platí, že dostupnost živin není podmínkou pro jejich využití. Jejich skutečné využití je dáno celou řadou změn spojených navíc s buněčným prostředím a homeostázou. Někteří autoři poukazují na to, že základní kultivační médium obsahuje klíčové makroelementy (glukóza, aminokyseliny atd.) a vzhledem k tomu nebyly zjištěny časné změny v metabolismu buňky (Pirkmajer and Chibalin 2011). Jiná situace může nastat u pacientů např. s diabetem I. typu, kdy jsou buňky vystaveny hladovění navzdory tomu, že mají přístupné základní živiny a přesto dochází ke katabolickému stavu se všemi svými důsledky. Přítomnost nebo absence séra nebo zvláštní doplňky, jako např. růstové faktory mohou ovlivnit buněčné interakce a funkce nebo také fenotypové charakteristiky buněk (Morrison and DeVellis 1981; Zander and Bemark 2008; Kempná et al. 2010; Codeluppi et al. 2011). Eliminace séra z kultivačního média snižuje bazální aktivitu buněk, populace proliferujících buněk je více homogenní, synchronizovaná, buněčný cyklus je zablokován a buňky setrvávají v klidové G0/G1 fázi buněčného cyklu (Dalman et al. 2010). S tím souvisí přežití hladovějících buněk a to díky velmi malé spotřebě energie a zároveň recyklací konstrukčních prvků. Synchronizace buněk pomocí sérového hladovění s použitím 0,5% FBS v intervalu 24 až 168 hodin před kryokonzervací byla použita také při testování fibroblastů po rozmrazení. Buňky vystavené sérovému hladovění delšímu než 24 hodin byly lepší než kultury po synchronizaci buněk v G0/G1 fázi (Lima-Neto et al. 2010). V našich experimentech byl analyzován buněčný cyklus 24 a 72 hodin po hladovění (0,5% FBS). Zjistili jsme signifikantní zvýšení počtu buněk v G1 fázi buněčného cyklu a s tím spojený významný pokles buněk v S fázi buněčného cyklu 24 hodin po ovlivnění. Hladovění po dobu 72 hodin způsobilo signifikantní pokles buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Dalším důležitým výsledkem bylo zjištění, že buňky linie C2C12 nevykazovaly morfologické známky apoptózy ani 72 hodin po hladovění. Sérové hladovění je vhodným modelem pro analýzu buněčného cyklu, cirkadiálního rytmu a výzkumu buněčného metabolismu (Sarabia et al. 1992; Balsabore et al. 1998; Lemos et al. 2007; Ching et al. 2010). Postupy fyziologické extrapolace získaných výsledků z buněk ovlivněných sérovým hladověním mají celou řadu problémů, které souvisí s přítomností, nebo absencí séra. Synchronizace navozená sérovým hladověním

je jenom jednou stránkou problému a nemusí být právě výhodná, jak bylo uvedeno výše. Druhým problémem je otázka doby vystavení buněk sérovému hladovění ve vztahu k potenciálu buněk vybrané linie k možnosti reparace poškození (Whorwood et al. 2001). Buňky reagují na hladovění zapojením mitochondriální dráhy apoptózy.

Odejmutí stimulačních růstových faktorů indukuje buněčnou smrt apoptózou u několika typů buněk *in vitro*. Apoptóza buněčné linie HEK293 indukovaná hladověním je prezentována zvýšenou aktivitou kaspázy 3. Avšak kaspáza 3 nebyla aktivována v reakci na hladovění u myotubů a u buněčné linie HEK293. Zdá se, že aktivace kaspázy 3 se může měnit v závislosti na délce hladovění (Pirkmajer and Chivalin 2011). Vzhledem k tomu, že v našich experimentech nebyly pozorovány morfologické změny buněk ani po 72 hodinách vystavení hladovění (0,5% FBS) spojené s apoptózou, v dalších analýzách nebylo provedeno vyšetření kaspáz (na rozdíl od analýzy vlivu ionizujícího záření). Pro kultivaci buněk, které vykazují zvýšenou aktivitu tvorby řasinky (ciliogeneze) je důležité použití vhodného kultivačního média. Jedním z určujících faktorů ciliogeneze je právě vhodná kombinace séra a růstových faktorů. Otázkou zůstává, zda samotné hladovění je dostačujícím stimulujícím faktorem pro ciliogenezi. Především proto, že mnoho *in vitro* studií prováděných na různých typech tkání s využitím sérového hladovění po dobu 24 a 72 hodin prokázalo ciliogenezi (Schröder et al. 2007; Yoshimura et al. 2007; Nauli et al. 2013). Naopak Geerts et al. s cílem dosáhnout u buněk vyšší úroveň ciliogeneze používali 2% FBS v kombinaci s růstovým endotelovým faktorem (VEGF) a L-glutaminem (Geerts et al. 2011), zatímco Iomini et al. používali kombinaci 20% FBS a 4% lidské sérum v kombinaci s VEGF a fibroblastovým růstovým faktorem (FGFb) a heparinem (Iomini et al. 2004). V obou případech bylo dosaženo konfluencí buněk, ale nebyla dosažena vyšší míra ciliogeneze, i když je známo, že pro konfluentní buňky v kultivačním médiu, které obsahuje nízké, nebo nulové koncentrace séra a jsou indukovány do stavu diferenciací, se zvýší pravděpodobnost výskytu řasinky – ciliace (Prasad et al. 2014). V našich experimentech byla u myoblastů primární řasinka detekována již po 6 hodinách sérového hladovění a signifikantně nejvyšší počet buněk s primární řasinkou byl detekován 24 hodin po sérovém hladovění. Z výše uvedeného obecně platí, že výskyt řasinky závisí na kultivačních podmínkách, které jsou pro různé typy tkání specifické.

6.3. Diskuze k otázkám vlivu chemoterapie na primární řasinku

Ztráta nebo porucha primární řasinky je charakteristickým rysem většiny typů solidních nádorů. Přibývá poznatků o mimomitotických účincích regulačních proteinů buněčného cyklu na cyklus primární řasinky. Na povrchu buněk většiny typů nádorů se primární řasinky nenachází vůbec, nebo pouze ve velmi nízké frekvenci, též porušené stavbě a funkci. V této souvislosti se primární řasinka někdy nazývá jako „struktura suprimující solidní nádory“ (Mans et al. 2008; Seeley et al. 2009). Výjimkou jsou nádory závislé na aktivační mutaci signální dráhy Hedgehog, u kterých se primární řasinky vyskytují ve zvýšené frekvenci (Liu et al. 2001, Dvořák et al. 2011). Na vzniku řady typů nádorů se podílí porucha signálních drah Hedgehog, Wnt, NOTCH a Hippo, které jsou aktivní v primárních řasinkách. Jejich nesprávná signální transdukce může být proto způsobena i poruchou tvorby, struktury nebo funkcí primárních řasinek (Gerhart et al. 2016).

V poslední části našich experimentů jsme se zaměřili na analýzu změn souvisejících s primární řasinkou u nádorových buněčných linií triple negativních linií karcinomu prsu BT-549 a MDA-MB-231 a kožních fibroblastů. Buňky byly vystaveny působení cytostatik, které jsou běžně používány v rámci standardních chemoterapeutických režimů při léčbě karcinomu prsu.

V období morfogeneze mléčné žlázy, kdy dochází k tvorbě a větvení mlékovodů (ducti lactiferi), se primární řasinky nacházejí na buňkách luminálního epitelu, na buňkách myoepitelových a buňkách stromatu. Po ukončení větvení mlékovodů primární řasinky mizí z buněk luminálního epitelu a zůstávají na buňkách myoepitelových a buňkách stromatu (McDermott et al. 2010). Ve studii na buněčných a tkáňových kulturách zdravého prsu se primární řasinky vyskytovaly přibližně u 70 % fibroblastů a 7-19 % epitelových buněk (Yuan et al. 2010). Z 11 studovaných buněčných linií karcinomu prsu se primární řasinky vyskytovaly ve 4 buněčných liniích v nízké frekvenci 0,3 % - 4 % a nebyly vůbec přítomny u zbývajících 7 buněčných linií. Všechny buněčné linie karcinomu prsu, u kterých se primární řasinky vyskytovaly (i když v nízké frekvenci), byly bazálního B subtypu, který je analogický trojitě negativnímu karcinomu prsu (Yuan et al. 2010).

Triple negativní karcinom prsu je charakterizován genotypicky bazálním B subtypem, fenotypickou nepřítomností estrogenových progesteronových a Her2/neu receptorů, a část triple negativních karcinomů biologickou přítomností primárních řasinek. Je pravděpodobné, že i v rámci trojitě negativního karcinomu prsu se skrývá několik podtypů nádorů. Důvod

výlučné přítomnosti primárních řasinek u buněčných linií bazálního B subtypu zatím není jasný. Jako možné teoretické vysvětlení se nabízí, že tento typ nádorových buněk je závislý na aktivační mutaci v horní části signální dráhy Hh (hedgehog pathway), a tím i na primární řasince, podobně jako to bylo prokázáno u většiny bazocelulárních karcinomů a meduloblastomů (Gerhart et al. 2016).

V léčbě karcinomu prsu se uplatňují především cytostatika ze skupiny antracyklinů (doxorubicin, epirubicin), taxany (taxol, docetaxel), deriváty platiny (cisplatina, carboplatina) a jejich kombinace. Hlavním mechanismem účinku volného doxorubicinu (DOX) je jeho interkalace do DNA a inhibice topoizomerázy II. Svým účinkem způsobují zlomy DNA a navíc poškozují buňky vytvářením toxických kyslíkových radikálů (ROS). Některé sekundární mechanismy účinku DOX jsou popsány jako DOX-indukované produkce ROS v rámci oxidačního stresu, poškození buněčné membrány pomocí peroxidace lipidů (Lüpertz et al. 2010; Tacar et al. 2013), indukce apoptózy, generování toxických metabolitů (Bains et al. 2013). Při používání cytostatika doxorubicinu v *in vitro experimentech* byla řešena důležitá otázka související s tím, že lék doxorubicin nebo daunorubicin je po aplikaci metabolizován v játrech na doxorubicinol nebo daunorubicinol. Bains et al. řešil otázku, zda léčivo doxorubicin/daunorubicin je více toxické než jejich metabolit doxorubicinol/daunorubicinol. Tato otázka je spojena s tím, jak je daná buněčná linie schopná metabolizovat léčivo na metabolit v čase. Autoři ve svých experimentech testovali buněčné linie z různých tkání srdce, prostaty, vaječníků, slinivky břišní, prsu, jater, tlustého střeva, plic a ledviny, jež vystavili 24 hodinovému působení doxorubicinu nebo daunorubicinu. Ve své práci dokladovali na základě hodnoty LC_{50} , že hlavní metabolit je podstatně méně cytotoxický než příslušné léčivo. To platilo i pro buněčnou linii karcinomu prsu (Bains et al. 2013). V našich experimentech byly použity chemosenzitivní triple negativní linie karcinomu prsu BT-549 a MDA-MB-231 a normální buňky linie kožních fibroblastů. Buněčné linie byly ovlivněné 10, 20, 40, 80 a 120 nM doxorubicinem po dobu 72 hodin. Prokázali jsme, že při zvyšující se koncentraci cytostatika dochází k poklesu počtu viabilních buněk, což korelovalo také s nárůstem procenta mrtvých buněk detekovaných pomocí testu úniku LDH.

Z dosavadních výsledků je známo, že antracykliny (doxorubicin) zprostředkovávají zastavení buněčného cyklu v nádorových buňkách v G0/G1 fázi a přitom G2 kontrolní bod může být regulován p53. Kuznetsov et al. zjistili, že doxorubicin inhibuje proliferaci buněk prostřednictvím zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi a jeho efekt je závislý na dávce (Kuznetsov et al. 2011b). Lüpertz et al ve svých experimentech pozorovali zastavení

buněčného cyklu v G2/M fázi a p53/p21 indukci vyvolanou po aplikaci 1 μ M doxorubicinu. Dále také zjistili, že dochází k G1 zástavě, která je doprovázena fosforylací a aktivací p53, ale ne větší expresí p21 po aplikaci 5 μ M doxorubicinu (Lüpertz et al. 2010).

V našich experimentech bylo potvrzeno, že ovlivnění buněčné linie BT-549 doxorubicinem 20 nM a 40 nM způsobilo signifikantní zvýšení počtu buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Podobně to bylo u buněčné linie MDA-MB-231, a to po 10, 20 a 40 nM doxorubicinem. S těmito výsledky souvisí signifikantní pokles buněk v G1 a S fázi buněčného cyklu u BT-549 i MDA-MB-231. Signifikantní procento buněk kožních fibroblastů bylo zablokováno v G2 fázi buněčného cyklu až po ovlivnění vyšší dávkou doxorubicinu (80 nM a 120 nM). V důsledku toho bylo zaznamenáno signifikantní snížení v G1 fázi buněčného cyklu po ovlivnění 80 nM a 120 nM doxorubicinem a v S fázi buněčného cyklu pouze u koncentrace doxorubicinu 120 nM. Z výše uvedeného vyplývá, že normální buňky linie kožních fibroblastů jsou méně chemosenzitivní na doxorubicin, a že k vyvolání změn v buněčném cyklu je potřeba podstatně vyšší koncentrace doxorubicinu.

Z pohledu mechanismu indukce apoptózy je známo, že doxorubicin kromě indukce poškození DNA výrazně zvyšuje šance na genomovou nestabilitu a evoluci transformovaných vlastností v proliferujících buňkách normální buněčné populace. Pokud byly buňky, které se nacházely v S fázi buněčného cyklu, ovlivněny doxorubicinem v trvání jedné hodiny, došlo u těch to buněk k prodloužení G2 fáze buněčného cyklu po dobu alespoň 72 hodin. Přesto nejméně 14 % buněk začalo v této době opět proliferovat bez ohledu na ovlivnění doxorubicinem. Výskyt 52 % centriol uvolněných a 10 % centriol dodatečných byl pozorován 72 hodin po poškození DNA. Douthwright a Sluder zjistili, že APC/C nebo činnost PLK může uvolnit centriol po poškození DNA, ačkoli se oba obvykle doplňují. Všechny uvolněné centrioly jsou spojeny s gama-tubulinem a markery vyzrávání, a proto by měly být v zásadě schopny zdvojení a organizování pólů vřeténka. Nízký výskyt zdvojených nebo uvolněných centriol během G2 fáze buněčného cyklu souvisí s p53-závislou expresí p21 a následnou ztrátou aktivity Cdk2. Dále zjistili, že 26 % buněk, které prochází mitózou po poškození DNA obsahuje volné nebo nadbytečné centrioly. Toto by mohlo vytvářet genomovou nestabilitu prostřednictvím přechodné nebo trvalé multipolarity vřeténka (Douthwright a Sluder 2014).

Dalšími důležitými léky, které jsou používány v léčbě karcinomu prsu, jsou rostlinné alkaloidy ze skupiny taxanů – taxol či docetaxel. Jejich cytostatický účinek spočívá v působení na dělicí se vřeténko buňky. Působením na mikrotubuly buněk zabrání jejich

depolymerizaci během buněčného dělení, a tím transportu chromosomů k pólům dělicí se buňky. Bylo prokázáno, že docetaxel zvyšuje polymerizaci tubulinu, podporuje sestavení mikrotubulů, a také inhibuje depolymerizaci tubulinu. Nicméně není dosud stanoven mechanismus, jak docetaxel indukuje aktivaci apoptotické smrti buněk, nebo kaspázy. Lze předpokládat, že taxany jsou schopny indukovat fosforylaci Bcl-X (L)/ Bcl-2 a tak inaktivují jejich anti-apoptotické kapacity. Snížená regulace Bcl-2 a nebo zvýšená regulace p53 a p21/WAF1 jsou jistě jedním z důležitých způsobů indukce apoptózy pomocí taxanů (Ganansia-Leymarie et al. 2003; Han et al. 2016).

Narušení mikrotubulů vede k indukci nádorového supresoru p53, k inhibici cyklin-dependentních kináz a aktivaci/deaktivaci několika proteinkináz. Jako důsledek jsou buňky blokovány v G2/M fázi buněčného cyklu, po kterém buď podstoupí apoptózu nebo nekrózu. Může však dojít k překonání G2/M blokace a dojde k pokračování dělení buňky, často směrem k post-mitotické buněčné smrti (Wang et al. 1999; Miglietta et al. 2002). Na druhou stranu bylo zjištěno, že taxol působí v relativně nízkých koncentracích (3 ± 6 nM), kdy může zcela inhibovat buněčnou proliferaci a to bez blokování buněk v mitóze (Giannakakou et al. 2001). U některých buněčných linií, které nemají expresi p53, se při použití nízké koncentrace taxolu nepodařilo vyvolat G1 a G2 blokádu buněčného cyklu. Buněčné linie, které mají zvýšenou aktivitu p53 jako výsledek reakce na taxol, podstupují výlučně mitotickou a postmitotickou zástavu buněčného cyklu (Giannakakou et al. 2001). Zvýšení koncentrace taxolu vede k mitotickému skluzu, čímž se eliminuje další G1 fáze a dochází k postmitotické blokádě. Obecně platí, že taxol přímo ovlivňuje buňky pouze v mitóze a doba trvání mitózy určuje další osud buňky (Demidenko et al. 2008). Buňky mohou buď zemřít během mitózy, nebo vyjít z mitózy bez buněčného dělení (mitotický prokluz) a vytvořit tetraploidní buňky, které mají obsah 4C DNA (Rieder and Maiato 2004; Blagosklonny 2007). Vzhledem k podobným mechanismům je blokace G1 fáze buněčného cyklu při použití doxorubicinu a nízkých dávek taxolu identická, právě proto, že obě léčiva přímo vyvolávají indukci p53 v G1 fázi buněčného cyklu a tím zablokují buňky před vstupem do S fáze (Demidenko et al. 2008).

V našich experimentech byly použity buněčné linie karcinomu prsu BT-549 a MDA-MB-231 a kožní fibroblasty ovlivněné taxolem o koncentracích 1,25; 3,25; 5,25; 6,25 a 12,5 nM po dobu 72 hodin. Ve sledovaných koncentracích klesá počet buněk i jejich viabilita a proliferace, avšak bez signifikantních změn rozložení buněk mezi fázemi buněčného cyklu.

V normálních buňkách je vývoj řasinky dynamický proces probíhající v závislosti na buněčném cyklu. Zahájení tvorby řasinky v G0 a G1 fázi buněčného cyklu, obvykle v S / G2 fázi buněčného cyklu, avšak téměř bez výjimky se řasinka vstřebává před vstupem do mitotického dělení, aby se znovu objevila v post-cytokinetické fázi buňky. Toto periodické vstřebávání řasinek souvisí s buněčným cyklem a má vliv na citlivost buněk, které jsou asociované vlivem vnějších signálů s receptory řasinek (Plotnikova et al. 2009).

Podle dosavadních zkušeností z našich experimentů víme, že primární řasinka není přítomna u triple negativních linií karcinomu prsu – BT-549 a MDA-MB-231. Důvodem absence primární řasinky u triple negativních linií karcinomu prsu je ztráta funkce supresorového genu p53, což je následek dominantní negativní mutace tohoto genu (Alli et al. 2007). Při zprostředkování buněčné odpovědi na různé typy stresu hraje klíčovou roli p53 tím, že aktivuje nebo potlačuje řadu genů zapojených do zástavy buněčného cyklu, stárnutí, apoptózy, opravy DNA a angiogeneze. Díky této důležité funkci a činnosti je p53 řízen velmi složitým způsobem, včetně několika automatických regulačních smyček a prostřednictvím zásahu desítek modulátorů proteinů. Mutace p53 jsou pozorovány u řady nádorů např. nádorů prsu (Lacroix et al. 2006).

Primární řasinka, je detekována při zástavě buněčného cyklu u buněčné linie fibroblastů, hraje důležitou roli v kontrole buněčného růstu, přenosu signálu z extracelulárního prostředí přes primární řasinky na buňky a pro řízení a správnou funkci tkáňové homeostázy (Schneider et al. 2005).

Novým a zatím nepublikovaným nálezem v našich experimentech byla detekce vícečetné řasinky po ovlivnění fibroblastů 20 nM, 40 nM, 80 nM a 120 nM doxorubicinem. Nejvyšší procento buněk s vícečetnou řasinkou bylo detekováno 72 hodin po použití 80 nM doxorubicinu.

Vícečetné primární řasinky byly pozorovány, pokud bylo přítomno více centrozomů, například u některých nádorových buněk nebo po vystavení buněčné kultury ionizujícímu záření (Nigg et al. 2014, naše výsledky viz kapitola 5.1.4.2.).

Ve studii Sharma et al. bylo prokázáno, že taxol inhibuje depolymeraci mikrotubulů (Stinchcombe et al. 2011) a tím dochází ke zkrácení délky primární řasinky a zároveň blokuje její prodlužování u buněk savců *in vitro* a zvyšuje frekvenci buněk bez primární řasinky (Sharma et al. 2011). Inhibitory polymerace a depolymerace mikrotubulů, jako je například:

jasplakinolide, forskolin, cytochalasin D a cytochalasin B, podané buněčné kultuře v nízké koncentraci spolu s taxolem, vyvolaly zvýšení množství volných podjednotek tubulinu v cytosolu, což vedlo k prodloužení primárních řasinek, ale nebyl zaznamenán její nárůst (Kim et al. 2010; Berstheheyn et al. 2010; Sharma et al. 2011), ve vyšší koncentraci avšak tvorbu primárních řasinek blokuje (Jensen et al. 1987; Ripardelli et al. 2013). Lze tedy říci, že použití farmakologických látek ovlivňujících síť mikrotubulů a množství volného tubulinu ovlivňuje i délku primární řasinky. Nelze jednoznačně říci, že se jedná o souvislost mezi mechanismy a signály, které buňka používá k vyvážení polymerace a depolymerace mikrotubulů a do jaké míry tyto změny ovlivňují signalizaci nebo smyslové schopnosti primární řasinky.

V našich experimentech byla primární řasinka detekována pomocí imunocytochemie u fibroblastů 72 hodin po ovlivnění 1,25; 3,25; 5,25; 6,25 a 12,5 nM taxolem. Statisticky signifikantní a zároveň nejvyšší procento buněk s primární řasinkou bylo detekováno po ovlivnění 1,25 nM taxolem. Nebyly ale detekovány vícečetné řasinky jako u doxorubicinu.

Zvláštní otázkou je detekce vícečetné primární řasinky při nadpočetném množství centrozomů v buňce. Podle našich dalších nepublikovaných výsledků se ukazuje, že tato otázka pro pochopení procesů, např. vztahu ciliogeneze a karcinogeneze, bude důležitá. V tomto směru plánuji dále pokračovat a ve své další experimentální práci se zaměřit na sledování vícečetné řasinky a na změny spojené s jejím prodlužováním a zkracováním. Dokladem toho, že tento směr je správný, je celá řada již publikovaných výsledků. U řady nádorů (Nigg et al. 2006; Nigg et al. 2014) a některých ciliopatií (Lee et al. 2011) je přítomen aberantní počet centrozomů v buňce. Vícečetné centrozomy se vyskytují v nádorových buňkách, například při mutaci nádory suprimujícího genu p53 (Fukasawa et al. 1996) nebo BRCA1 (breast-related cancer antigen) a BRCA2 (Tutt et al. 1999; Deng et al. 2002; Nigg et al. 2002). Na povrchu buněk s větším počtem centrozomů se nachází větší počet primárních řasinek (2-6) stejné stavby a obdobné délky. Celkové množství receptorů Smo, serotoninových receptorů typu 6, proteinu fibrocystinu a proteinu Arl13b (ADP-ribosylation factor-like protein 13b) na vícečetných primárních řasinkách buňky odpovídá celkovému množství těchto receptorů a specializovaných proteinů solitární primární řasinky. Protože celkové množství těchto proteinů na primárních řasinkách jedné buňky zůstává stále stejné, čím je počet (součet celkové délky) primárních řasinek na buňce větší, tím je množství těchto proteinů v přepočtu na jednotku délky primární řasinky menší - jejich hustota je nižší. Takovéto naředění hustoty receptorů může vést k oslabení signalizace (Mahjoub and Stearns

2012), což bylo pozorováno v případě kanonické větve signální dráhy Wnt u buněk s dvěma primárními řasinkami (Lancaster et al. 2011).

Většina vícečetných primárních řasinek (95%) vytváří trs, a sdílí společnou prohlubeň primárních řasinek – ciliární kapsu. U 5% vícečetných primárních řasinek, které nebyly v trsu, a nesdílely společnou prohlubeň primárních řasinek, byla hustota proteinu Arl13b podobná jako u solitární primární řasinky. Proto se předpokládá, že strukturou, která určuje koncentraci receptorů a specializovaných proteinů v primárních řasinkách, je prohlubeň primární řasinky (Mahjoub and Stearns 2012).

Na myších ortotopických xenograftech lidských karcinomů prsu nebyly primární řasinky ve většině případů pozorovány. Pokud byla primární řasinka detekována, bylo to pouze v extrémně nízké frekvenci - 1 buňka karcinomu prsu s velmi tenkou a krátkou primární řasinkou na 30-80 mm² vyšetřeného histologického vzorku (Nobutani et al. 2014). Frekvenci výskytu primárních řasinek lidské buněčné linie trojitě negativního karcinomu prsu MDA-MB-231 nelze zvýšit hladověním buněčné kultury, na rozdíl od frekvence výskytu primárních řasinek zdravých buněk (Yuan et al. 2010). V experimentu byly vytvořeny myší xenografy buněčné linie MDA-MB-231, které následně metastazovaly do plic myší. V mikroprostředí plic došlo ke zvýšení podílu buněk v klidové G0 fázi buněčného cyklu na více než polovinu metastatických buněk plic. Avšak ani takováto změna mikroprostředí nezvýšila frekvenci výskytu primárních řasinek trojitě negativního karcinomu prsu MDA-MB-231 (Nobutani et al. 2014).

7. Závěr

Výsledky předložené v této dizertační práci korespondují s cíli, které byly stanoveny na začátku studia. Hlavním cílem práce bylo hodnocení vlivu faktorů vyvolávajících stresovou reakci na buňku s následnou nestabilitou cytoskeletu buňky se zaměřením na primární řasinku. Sekundární cíle byly zaměřeny na hodnocení vlivu ionizujícího záření, nutričního stresu vyvolaného sérovým hladověním a vlivu cytostatik (doxorubicinu a taxolu) na buněčné linie v *in vitro* podmínkách.

Vlastní výsledky korespondují s dosavadními publikovanými pracemi:

- Ionizující záření způsobuje dávkově závislé snížení buněčné viability s významně stoupající aktivitou kaspáz C2C12;
- Ozářením dávkou 6 Gy dochází k zástavě buněčného cyklu v G1 fázi a dávka záření 20 Gy blokuje buněčný cyklus v G2 fázi;
- Metabolický stres indukovaný hladověním buněk statisticky významně snižuje viabilitu a proliferaci C2C12 72 hodin po ovlivnění;
- Analýza buněčného cyklu 24 a 72 hodin po hladovění prokázala signifikantní zvýšení počtu buněk v G1 fázi buněčného cyklu a s tím spojený pokles procenta buněk v S fázi a G2 fázi buněčného cyklu;
- Sérové hladovění buněk C2C12 po dobu 72 hodin nevyvolává morfologické známky apoptózy;
- Signifikantně nejvyšší počet buněk s primární řasinkou byl detekován 24 hodin po sérovém hladovění C2C12;
- Zvyšující se koncentrace cytostatik způsobuje pokles proliferace a viability buněk, což koreluje s nárůstem procenta mrtvých buněk;
- Ovlivnění buněčné linie BT-549 doxorubicinem 20 nM a 40 nM, linie MDA-MB-231 10, 20 a 40 nM doxorubicinem i kožních fibroblastů 80 nM a 120 nM doxorubicinem způsobilo signifikantní zvýšení počtu buněk v G2 fázi buněčného cyklu.
- BT-549, MDA-MB-231 a kožní fibroblasty byly blokovány v G1 fázi buněčného cyklu po ovlivnění 1,25 nM; 3,25 nM a 6,25 nM taxolem;
- Statisticky signifikantní a zároveň nejvyšší procento buněk s primární řasinkou bylo detekováno 72 hodin po ovlivnění 1,25 nM taxolem;

Vlastní výsledky - mající charakter priority:

- Nejvyšší procento buněk s primární řasinkou bylo detekováno 72 hodin po ozáření dávkou 20 Gy a vícečetná řasinka byla detekována 72 hodin po ozáření dávkami 10 Gy a 20 Gy C2C12;
- Nejvyšší procento buněk experimentálně testovaných buněčných linií s vícečetnou řasinkou bylo detekováno 72 hodin po použití 80 nM doxorubicinu;
- Novým a zatím nepublikovaným nálezem v našich experimentech byla detekce vícečetné řasinky po ovlivnění 20 nM, 40 nM, 80 nM a 120 nM doxorubicinem.

Vzhledem k výše uvedeným výsledkům plánuji dále pokračovat v problematice sledování morfologických změn cytoskeletální stability pomocí detekce vícečetné řasinky a změn spojených s jejím prodlužováním a zkracováním. Dále s tím spojenou analýzou molekulárně biologických mechanismů, které souvisí s ciliogenezí a karcinogenezí.

8. Literatura

ALIEVA, I.B., VOROBEV, I.A. Vertebrate primary cilia: a sensory part of centrosomal complex in tissue cells, but a “sleeping beauty” in cultured cells? *Cell Biology International*. 2004, vol. 28, no. 2, s. 139–150.

ALLI, E., YANG, J.M., HAIT, W.N. Silencing of stathmin induces tumor-suppressor function in breast cancer cell lines harboring mutant p53. *Oncogene*, 2007, vol. 26, no. 7, s. 1003-1012.

ARRINGTON, D. D., SCHNELLMANN, R.G. Targeting of the molecular chaperone oxygen-regulated protein 150 (ORP150) to mitochondria and its induction by cellular stress. *American journal of physiology. Cell physiology*, 2008, vol. 294, s. C641–C650.

BAINS, O.S., SZEITZ, A., LUBIENIECKA, J.M., CRAGG, G.E., GRIGLIATTI, T.A., RIGGS, K.W., REID, R.E. A correlation between cytotoxicity and reductase-mediated metabolism in cell lines treated with doxorubicin and daunorubicin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2013, vol. 347, no. 2, s. 375-387.

BAKKENIST, C.J., KASTAN, M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003, vol. 421, no. 6922, s. 499-506.

BALSALOBRE, A., DAMIOLA, F., SCHIBLER, U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 1998, vol. 93, no. 6, s. 929–937.

BASTEN, S.G., WILLEKERS, S., VERMAAT, J.S., SLAATS, G.G., VOEST, E.E., VAN DIEST, P.J., GILES, R.H. Reduced cilia frequencies in human renal cell carcinomas versus neighboring parenchymal tissue. *Cilia*, 2013, vol. 2, no. 1, s. 2.

BERSHTEYN, M., ATWOOD, S.X., WOO, W.M., LI, M., ORO, A.E. MIM and Cortactin Antagonism Regulates Ciliogenesis and Hedgehog Signaling. *Developmental Cell*, 2010, vol. 19, no. 2, s. 270–283.

BLAGOSKLONNY, M.V. Mitotic arrest and cell fate: why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. *Cell Cycle*, 2007, vol. 6, no. 1, s. 70–74.

BODLE, J.C., LOBOA, E.G. Concise Review: Primary Cilia: Control Centers for Stem Cell Lineage Specification and Potential Targets for Cell-Based Therapies. *Stem Cells*, 2016, vol. 34, no. 6, s. 1445-1454.

- BOURKE, E., DODSON, H., MERDES, A., CUFFE, L., ZACHOS, G., WALKER, M., GILLESPIE, D., MORRISON, C.G. DNA damage induces Chk1-dependent centrosome amplification. *EMBO reports*, 2007, vol. 8, no. 6, s. 603–609.
- CASALI, A., STRUHL, G. Reading the Hedgehog morphogen gradient by measuring the ratio of bound to unbound Patched protein. *Nature*, 2004, vol. 431, no. 7004, s. 76–80.
- CLEMENTE, C.F., CORAT, M.A., SAAD, S.T., FRANCHINI, K.G. Differentiation of C2C12 myoblasts is critically regulated by FAK signaling. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 2005, vol. 289, no. 3, s. R862-870.
- CODELUPPI, S., GREGORY, E.N., KJELL, J., WIGERBLAD, G., OLSON, L., SVENSSON, C.I. Influence of rat substrain and growth conditions on the characteristics of primary cultures of adult rat spinal cord astrocytes. *Journal of neuroscience methods*, 2011, vol. 197, no. 1, s. 118-127.
- CONROY, P.C., SALADINO, C., DANTAS, T.J., LALOR, P., DOCKERY, P., MORRISON, C.G. C-NAP1 and rootletin restrain DNA damage-induced centriole splitting and facilitate ciliogenesis. *Cell Cycle*, 2012, vol. 11, no. 20, s. 3769–3778.
- CORBIT, K.C., AANSTAD, P., SINGLA, V., NORMAN, A.R., STAINIER, D.Y., REITER, J.F. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature*, 2005, vol. 437, no. 7061, s. 1018–1021.
- DALMAN, A., EFTEKHARI-YAZDI, P., VALOJERDI, M.R., SHAHVERDI, A., GOURABI, H., JANZAMIN, E., FAKHERI, R., SADEGHIAN, F., HASANI, F. Synchronizing cell cycle of goat fibroblasts by serum starvation causes apoptosis. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 2010, vol. 45, no. 5, s. e46-53.
- DELHALLE, S., DUVOIX, A., SCHNEKENBURGER, M., MORCEAU, F., DICATO, M., DEMIDENKO, Z.N., KALURUPALLE, S., HANKO, C., LIM, C., BROUDE, E., BLAGOSKLONNY, M.V. Mechanizm of G1-like arrest by low concentration of paclitaxel:next cell cycled p53-dependent arrest with sub G1 DNA content mediated by prolonged mitosis. *Oncogene*, 2008, vol. 27, no. 32, s. 4402-4410.
- DENG, C.X. Roles of BRCA1 in centrosome duplication. *Oncogene*, 2002, vol. 21, no. 40, s. 6222-6227.

DIEDERICH, M. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, vol. 1010, s. 1-8.

DODSON, H., BOURKE, E., JEFFERS, L.J., VAGNARELLI, P., SONODA, E., TAKEDA, S., EARNSHAW, W.C., MERDES, A., MORRISON, C. Centriole amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G2 phase and involves ATM. *The EMBO Journal*, 2004, vol. 23, no. 19, s. 3864–3873.

DODSON, H., WHEATLEY, S.P., MORRISON, C.G. Involvement of Centriole Amplification in Radiation-Induced Mitotic Catastrophe. *Cell Cycle*, 2007, vol. 6, no. 3, s. 364–370.

DOUTHWRIGHT, S., SLUDER, G. Link between DNA damage and centriole disengagement/reduplication in untransformed human cells. *Journal of cellular physiology*, 2014, vol. 229, no. 10, s. 1427-1436.

DVOŘÁK, J., SITOROVÁ, V., NIKOLOV, D.H., MOKRÝ, J., RICHTER, I., FILIP, S., RYŠKA, A., PETERA, J. Primární řasinky a jejich biologické funkce. *Onkologie*, 2011, vol. 5, no. 4, s. 234-238.

DVOŘÁK, J., SITOROVÁ, V., NIKOLOV, D.H., MOKRÝ, J., RICHTER, I., FILIP, S., RYŠKA, A., PETERA, J. Primární řasinky buněk kardiovaskulárního aparátu. *Vnitřní Lékařství*, 2012a, vol. 58, no. 12, s. 938-942.

DVOŘÁK, J., DVOŘÁK, Z., SITOROVÁ, V., NIKOLOV, D.H., MOKRÝ, J., RICHTER, I., FILIP, S., RYŠKA, A., PETERA, J. Primární řasinky buněk pojivové tkáně. *Česká Revmatologie*, 2012b, vol. 20, no. 4, s. 170-174.

DVOŘÁK, J., SITOROVÁ, V., NIKOLOV, D.H., MOKRÝ, J., RICHTER, I., FILIP, S., RYŠKA, A., PETERA, J. Primární řasinky buněk epitelu ledvinných kanálků. *Aktuality v Nefrologii*, 2013, vol. 19, no. 3, s. 90-95.

DVORAK, J., SITOROVA, V., NIKOLOV, D.H., FILIPOVA, A., RYSKA, A., MELICHAR, B., RICHTER I., BUKA D., MOKRY J., FILIP S., PETERA J. Primary cilia in gastrointestinal stromal tumors. *Neoplasma*, 2014, vol. 61, no. 3, s. 305-308.

DVOŘÁK, J. *Primární řasinky*. Praha: Mladá fronta, Edice postgraduální medicíny, 2015. ISBN 978-80-204-3730-3.

EGEBERG, D.L., LETHAN, M., MANGUSO, R., SCHNEIDER, L., AWAN, A., JØRGENSEN, T.S., BYSKOV, A.G., PEDERSEN, L.B., CHRISTENSEN, S.T. Primary cilia and aberrant cell signaling in epithelial ovarian cancer. *Cilia*, 2012, vol. 1, no. 1, s. 15.

EPSTEIN, D., ELIAS-BISHKO, S., HERSHKO, A. Requirement for protein synthesis in the regulation of protein breakdown in cultured hepatoma cells. *Biochemistry*, 1975, vol. 14, no. 23, s. 5199-5204.

FILIPOVÁ, A., DIAZ-GARCIA, D., BEZROUK, A., ČÍŽKOVÁ, D., HAVELEK, R., VÁVROVÁ, J., DAYANITHI, G., ŘEZACOVÁ, M. Ionizing radiation increases primary cilia incidence and induces multiciliation in C2C12 myoblasts. *Cell Biology International*, 2015, vol. 39, no. 8, s. 943–953.

FONTE, V.G., SEARLS, R.L., HILFER, S.R. The relationship of cilia with cell division and differentiation. *The Journal of Cell Biology*, 1971, vol. 49, no. 1, s. 226–229.

FRY, A.M., LEAPER, M.J., BAYLISS, R. The primary cilium: Guardian of organ development and homeostasis. *Organogenesis*, 2014, vol. 10, no. 1, s. 62–68.

FUKASAWA, K., CHOI, T., KURIYAMA, R., RULONG, S., VANDE WOUDE, G.F. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science*, 1996, vol. 271, no. 5256, s. 1744-1747.

GANANSIA- LEYMARIE, V., BISCHOFF, P., BERGERAT, J.P., HOLL, V. Signal transduction pathways of taxanes-induced apoptosis. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents*, 2003, vol. 3, no. 4, s. 291-306.

GEERTS, W.J., VOCKING, K., SCHOONEN, N., HAARBOSCH, L., VAN DONSELAAR, E.G., REGAN-KLAPISZ, E., POST, J.A. Cobblestone HUVECs: a human model system for studying primary ciliogenesis. *Journal of structural biology*, 2011, vol. 176, no. 3, s. 350-359.

GERHARDT, C., LEU, T., LIER, J.M., RÜTHER, U. The cilia-regulated proteasome and its role in the development of ciliopathies and cancer. *Cilia*, 2016, vol. 10, no. 5, s. 14.

GIANNAKAKOU, P., ROBEY, R., FOJO, T., BLAGOSKLONNY, M.V. Low concentration of paclitaxel induce cell type- dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity. *Oncogen*, 2001, vol. 20, no. 29, s. 3806-3813.

- GOGGOLIDOU, P., WILSON, P.D. Novel biomarkers in kidney disease: roles for cilia, Wnt signalling and ATMIN in polycystic kidney disease. *Biochemical Society transactions*, 2016, vol. 44, no. 6, s. 1745-1751.
- GOODHEAD, D.T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International journal of radiation biology*, 1994, vol. 65, no. 1, s. 7-17.
- GOTO, H., INOKO, A., INAGAKI, M. Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013, vol. 70, no. 20, s. 3893–3905.
- GRADILONE, S.A., RADTKE, B.N., BOGERT, P.S., HUANG, B.Q., GAJDOS, G.B., LARUSSO, N.F. HDAC6 Inhibition Restores Ciliary Expression and Decreases Tumor Growth. *Cancer Research*, 2013, vol. 73, no. 7, s. 2259–2270.
- GRASER, S., STIERHOF, Y.D., LAVOIE, S.B., GASSNER, O.S., LAMLA, S., LE CLECH, M., NIGG, E. A. Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *The Journal of Cell Biology*, 2007, vol. 179, no. 2, s. 321–330.
- HABIB, J.G., O'SHAUGHNESSY, J.A. The hedgehog pathway in triple - negative breast cancer. *Cancer Medicine*, 2016, vol. 5, no. 10, s. 2989–3006.
- HAN, T.D., SHANG, D.H., TIAN, Y. Docetaxel enhances apoptosis and G2/M cell cycle arrest by suppressing mitogen-activated protein kinase signaling in human renal clear cell carcinoma. *Genetics and molecular research : GMR*, 2016, vol. 15, no. 1, s. 1-10.
- HASSOUNAH, N.B., NAGLE, R., SABODA, K., ROE, D.J., DALIKIN, B.L., MCDERMOTT, K.M. Primary Cilia Are Lost in Preinvasive and Invasive Prostate Cancer. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 7, s. e68521.
- HAYCRAFT, C.J., BANIZS, B., AYDIN-SON, Y., ZHANG, Q., MICHAUD, E J., YODER, B.K. Gli2 and Gli3 Localize to Cilia and Require the Intraflagellar Transport Protein Polaris for Processing and Function. *PLoS Genetics*, 2005, vol. 1, no. 4, s. e53.
- HOFMAN, J., SKARKA, A., HAVRANKOVA, J., WSOL, V. Pharmacokinetic interactions of breast cancer chemotherapeutics with human doxorubicin reductases. *Biochemical Pharmacology*, 2015, vol. 96, no. 3, s. 168–178.

HUANGFU, D., ANDERSON, K.V. Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, vol. 102, no. 32, s. 11325–11330.

HUBBERT, C., GUARDIOLA, A., SHAO, R., KAWAGUCHI, Y., ITO, A., NIXON, A., YOSHIDA, M., WANG, X.F., YAO, T.P. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 2002, vol. 417, no. 6887, s. 455–458.

CHEUNG-ONG, K., GIAEVER, G., NISLOW, C. DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. *Chemistry & Biology*, vol. 20, no. 5, s. 648–659.

CHING, J.K., RAJGURU, P., MARUPUDI, N., BANERJEE, S., FISHER, J.S. A role for AMPK in increased insulin action after serum starvation. *American journal of physiology. Cell physiology*, 2010, vol. 299, no. 5, s. C1171-C1179.

CHINCHILLA, P., XIAO, L., KAZANIETZ, M.G., RIOBO, N.A. Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle*, 2010, vol. 9, no. 3, s. 570–579.

INANÇ, B., DODSON, H., MORRISON, C.G. A Centriole-autonomous Signal That Involves Centriole Disengagement Permits Centriole Duplication in G2 Phase after DNA Damage. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, vol. 21, no. 22, s. 3866–3877.

IOMINI, C., TEJADA, K., MO, W., VAANANEN, H., PIPERNO, G. Primary cilia of human endothelial cells disassemble under laminar shear stress. *The Journal of cell biology*, 2004, vol. 164, no. 6, s. 811–817.

ISHIKAWA, H., KUBO, A., TSUKITA, S., TSUKITA, S. Odf2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to generate primary cilia. *Nature Cell Biology*, 2005, vol. 7, no. 5, s. 517–524.

JAIN, R., PAN, J., DRISCOLL, J.A., WISNER, J.W., HUANG, T., GUNSTEN, S.P., YOU, Y., BRODY, S.L. Temporal relationship between primary and motile ciliogenesis in airway epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2010, vol. 43, no. 6, s. 731-739.

JIN, Z., EL-DEIRY, W.S. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy*, 2005, vol. 4, no. 2, s. 139-163.

JENKINS, D. Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cellular Signalling*, 2009, vol. 21, no. 7, s. 1023–1034.

JENSEN, C.G., DAVISON, E.A., BOWSER, S.S., RIEDER, C.L. Primary cilia cycle in PtK1 cells: effects of colcemid and taxol on cilia formation and resorption. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 1987, vol. 7, no. 3, s. 187–197.

JORDAN, M.A., TOSO, R.J., THROWER, D., WILSON, L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, vol. 90, no. 20, s. 9552–9556.

KASTAN, M.B., BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 2004, vol. 432, no. 7015, s. 316–323.

KAWAMURA, K., FUJIKAWA-YAMAMOTO, K., OZAKI, M., IWABUCHI, K., NAKASHIMA, H., DOMIKI, C., MORITA, N., INOUE, M., TOKUNAGA, K., SHIBA, N., IKEDA, R., SUZUKI, K. Centromere hyperamplification and chromosomal damage after exposure to radiation. *Oncology*, 2004, vol. 67, no. 5–6, s. 460–470.

KEMPNÁ, P., HIRSCH, A., HOFER, G., MULLIS, P.E., FLÜCK, C.E. Impact of differential P450c17 phosphorylation by cAMP stimulation and by starvation conditions on enzyme activities and androgen production in NCI-H295R cells. *Endocrinology*, 2010, Vol. 151, no. 8, s. 3686–3696.

KIM, J., LEE, J.E., HEYNEN-GENEL, S., SUYAMA, E., ONO, K., LEE, K., IDEKER, T., AZA-BLANC, P., GLEESON, J.G. Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length. *Nature*, 2010, vol. 464, no. 7291, s. 1048–1051.

KIM, S., TSIOKAS, L. Cilia and cell cycle re-entry: more than a coincidence. *Cell Cycle*, 2011, vol. 10, no. 16, s. 2683–2690.

KIM, S., ZAGHLOUL, N.A., BUBENSHCHIKOVA, E., OH, E.C., RANKIN, S., KATSANIS, N., OBARA, T., TSIOKAS, L. Nde1-mediated inhibition of ciliogenesis affects cell cycle re-entry. *Nature Cell Biology*, 2011, vol. 13, no. 4, s. 351–360.

KIM, J.H., KI, S.M., JOUNG, J.G., SCOTT, E., HEYNEN-GENEL, S., AZA-BLANC, P., KWON, C.H., KIM, J., GLEESON, J.G., LEE, J.E. Genome-wide screen identifies novel

machineries required for both ciliogenesis and cell cycle arrest upon serum starvation. *Biochimica et biophysica acta*, 2016, vol. 1863, no. 6 Pt A, s. 1307-18.

KIPRILOV, E.N., AWAN, A., DESPRAT, R., VELHO, M., CLEMENT, C.A., BYSKOV, A.G., ANDERSEN, C.Y., SATIR, P., BOUHASSIRA, E.E., CHRISTENSEN, S.T., HIRSCH, R.E. Human embryonic stem cells in culture possess primary cilia with hedgehog signaling machinery. *The Journal of Cell Biology*, 2008, vol. 180, no. 5, s. 897–904.

KOPCZYŃSKA, E. Role of microRNAs in the resistance of prostate cancer to docetaxel and paclitaxel. *Contemporary Oncology*, 2015, vol. 19, no. 6, s. 423–427.

KUZNETSOV, A.V., KEHRER, I., KOZLOV, A.V., HALLER, M., REDL, H., HERMANN, M., GRIMM, M., TROPFMAIR, J. Mitochondrial ROS production under cellular stress: comparison of different detection methods. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2011a, vol. 400, no. 8, s. 2383-2390.

KUZNETSOV, A.V., MARGREITER, R., AMBERGER, A., SAKS, V., GRIMM, M. Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death. *Biochimica et biophysica acta*, 2011b, vol. 1813, no. 6, s. 1144–1152.

LACROIX, M., TOILLON, R.A., LECLERCQ, G. p53 and breast cancer, an update. *Endocrine-related cancer*, 2006, vol. 13, no. 2, s. 293-325.

LANCASTER, M.A., SCHROTH, J., GLEESON, J.G. Subcellular spatial regulation of canonical Wnt signalling at the primary cilium. *Nature cell biology*, 2011, vol. 13, no. 6, s. 700-707.

LAVIN, M.F., KOZLOV, S., GUEVEN, N., PENG, C., BIRRELL, G., CHEN, P., SCOTT, S. Atm and cellular response to DNA damage. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2005, vol. 570, s. 457–476.

LEE, K., BATTINI, L., GUSELLA, G.L. Cilium, centrosome and cell cycle regulation in polycystic kidney disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2011, vol. 1812, no. 10, s. 1263–1271.

- LEITCH, C.C., LODH, S., PRIETO-ECHAGÜE, V., BADANO, J.L., ZAGHLOUL, N.A. Basal body proteins regulate Notch signaling through endosomal trafficking. *Journal of Cell Science*, 2014, vol. 127, no. Pt 11, s. 2407–2419.
- LEMONS, D.R., GOODSPEED, L., TONELLI, L., ANTOCH, M.P., OJEDA, S.R., URBANSKI, H.F. Evidence for circadian regulation of activating transcription factor 5 but not tyrosine hydroxylase by the chromaffin cell clock. *Endocrinology*, 2007, vol. 148, no. 12, s. 5811–5821.
- LEVIN, V.A., PANCHABHAI, S.C., SHEN, L., KORNBLAU, S.M., QIU, Y., BAGGERLY, K.A. Different changes in protein and phosphoprotein levels result from serum starvation of high-grade glioma and adenocarcinoma cell lines. *Journal of proteome research*, 2010, vol. 9, no. 1, s. 179-191.
- LI, A., SAITO, M., CHUANG, J.Z., TSENG, Y.Y., DEDESMA, C., TOMIZAWA, K., KAITSUKA, T., SUNG, C.H. Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. *Nature Cell Biology*, 2011, vol. 13, no. 4, s. 402–411.
- LIMA-NETO, J.F., FERNANDES, C.B., ALVARENGA, M.A., GOLIM, M.A., LANDIM-ALVARENGA, F.C. Viability and cell cycle analysis of equine fibroblast cultured *in vitro*. *Cell Tissue Bank*. 2010, vol. 11, no. 3, s. 261-268.
- LIU, A., WANG, B., NISWANDER, L.A. Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development*, 2005, vol. 132, no. 13, s. 3103–3111.
- LUESMA, M.J., CANTARERO, I., CASTIELLA, T., SORIANO, M., GARCIA-VERDUGO, J.M., JUNQUERA, C. Enteric neurons show a primary cilium. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2013, vol. 17, no. 1, s. 147–153.
- LÜPERTZ, R., WÄTJEN, W., KAHL, R., CHOVOLOU, Y. Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology*, 2010, vol. 27, no. 3, s. 115–121.
- MAHJOUB, M.R., STEARNS, T. Supernumerary centrosomes nucleate extra cilia and compromise primary cilium signaling. *Current biology: CB*, 2012, vol. 22, no. 17, s. 1628-1634.

- MALONE, A.M., ANDERSON, C.T., TUMMALA, P., KWON, R.Y., JOHNSTON, T.R., STEARNS, T., JACOBS, C.R. Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, vol. 104, no. 33, s. 13325–13330.
- MANS, D.A., VOEST, E.E, GILES, R.H. All along the watchtower: is the cilium a tumor suppressor organelle? *Biochimica et biophysica acta*, 2008, vol. 86, no. 2, s. 114-25.
- MCDERMOTT, K.M., LIU, B.Y., TLSTY, T.D., PAZOUR, G.J. Primary cilia regulate branching morphogenesis during mammary gland development. *Current biology: CB*, 2010, vol. 20, no. 8, s. 731–737.
- MENZL, I., LEBEAU, L., PANDEY, R., HASSOUNAH, N.B., LI, F.W., NAGLE, R., WEIHS, K., MCDERMOTT, K.M. Loss of primary cilia occurs early in breast cancer development. *Cilia*, 2014, vol. 3, s. 7.
- MERCHANT, A.A., MATSUI, W. Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2010, vol. 16, no. 12, s. 3130–3140.
- MIGLIETTA, A., BOCCA, C., GABRIEL, L. Comparative studies on biological activity of certain microtubule-interacting taxanes. *Chemico-biological interactions*, 2002, vol. 139, no. 3, s. 283-299.
- MOHIELDIN, A.M., ZUBAYER, H.S., AL OMRAN, A.J., SATERNOS, H.C., ZARBAN, A.A., NAULI, S.M., ABOUALAIWI, W.A. Vascular Endothelial Primary Cilia: Mechanosensation and Hypertension. *Current hypertension reviews*, 2016, vol. 12, no. 1, s. 57-67.
- MORRISON, R.S., DE VELLIS, J. Growth of purified astrocytes in a chemically defined medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1981, vol. 78, no. 11, s. 7205-7209.
- MOSER, J.J., FRITZLER, M.J., OU, Y., RATTNER, J.B. The PCM-basal body/primary cilium coalition. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2010, vol. 21, no. 2, s. 148–155.

NAULI, S.M., JIN, X., ABUALAIWI, W.A., EL-JOUNI, W., SU, X., ZHOU, J. Non-motile primary cilia as fluid shear stress mechanosensors. *Methods in enzymology*, 2013, vol. 525, s. 1-20.

NIGG EA. Centrozome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nature reviews. Cancer*, 2002, vol. 2, no. 11, s. 815-825.

NIGG, E.A. Origins and consequences of centrozome aberrations in human cancers. *International Journal of Cancer*; 2006, vol. 119, no. 12, s. 2717–2723.

NIGG, E.A., RAFF, J.W. Centrioles, centrozomes, and cilia in health and disease. *Cell*, 2009, vol. 139, no. 4, s. 663–678.

NIGG, E.A., STEARNS, T. The centrozome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nature cell biology*, 2011, vol. 13, no. 10, s. 1154-1160.

NIGG, E.A., ČAJÁNEK, L., ARQUINT, C. The centrozome duplication cycle in health and disease. *FEBS letters*, 2014, vol. 588, no. 15, s. 2366–2372.

NOBUTANI, K., SHIMONO, Y., YOSHIDA, M., MIZUTANI, K., MINAMI, A., KONO, S., MUKOHARA, T., YAMASAKI, T., ITOH, T., TAKAO, S., MINAMI, H., AZUMA, T., TAKAI, Y. Absence of primary cilia in cell cycle-arrested human breast cancer cells. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanizms*, 2014, vol. 19, no. 2, 141–152.

PAN, J., SNELL, W. The primary cilium: keeper of the key to cell division. *Cell*, 2007, vol. 129, no. 7, s. 1255–1257.

PAZOUR, G.J., WITMAN, G.B. The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Current Opinion in Cell Biology*, 2003, vol. 15, no. 1, s. 105–110.

PELUSO, M.O., CAMPBELL, V.T., HARARI, J.A., TIBBITTS, T.T., PROCTOR, J.L., WHITEBREAD, N., CONLEY, J.M., WHITE, K.F., KUTOK, J.L., READ, M.A., MCGOVERN, K., FAIA, K.L. Impact of the Smoothened inhibitor, IPI-926, on smoothened ciliary localization and Hedgehog pathway activity. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 3, s. e90534.

PIRKMAJER, S., CHIBALIN, A.V. Serum starvation: caveat emptor. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 2011, vol. 301, no. 2, s. C272-279.

PLOTNIKOVA, O.V., GOLEMIS, E.A., PUGACHEVA, E.N. Cell cycle-dependent ciliogenesis and cancer. *Cancer Research*, 2008, vol. 68, no. 7, s. 2058–2061.

PLOTNIKOVA, O.V., PUGACHEVA, E.N., GOLEMIS, E.A. Primary cilia and the cell cycle. *Methods in Cell Biology*, 2009, vol. 94, s. 137–160.

PRASAD, R., JIN, X., NAULI, S. Sensing a sensor: identifying the mechanosensory function of primary cilia. *Biosensors*, 2014, vol. 4, no. 1, s. 47–62.

PROSSER, S.L., SAMANT, M.D., BAXTER, J.E., MORRISON, C.G., FRY, A.M. Oscillation of APC/C activity during cell cycle arrest promotes centrosome amplification. *Journal of cell science*, 2012, vol. 125, no. Pt 22, s. 5353-5368.

PUGACHEVA, E.N., JABLONSKI, S.A., HARTMAN, T.R., HENSKE, E.P., GOLEMIS, EA. HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell*, 2007, vol. 129, no. 7, s. 1351–1363.

RIEDER, C.L., MAIATO, H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Developmental cell*, 2004, no. 7, vol. 5, s. 637–651.

RIPARBELLI, M.G., CABRERA, O.A., CALLAINI, G., MEGRAW, T.L. Unique properties of Drosophila spermatocyte primary cilia. *Biology open*, 2013, vol. 2, no. 11, s. 1137-47.

ROHATGI, R., MILENKOVIC, L., SCOTT, M.P. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science*, 2007, vol. 317, no. 5836, s. 372–376.

ROOS, W.P., KAINA, B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer letters*, 2013, vol. 332, no. 2, s. 237-248.

RUHLEN, R., MARBERRY, K. The chondrocyte primary cilium. *Osteoarthritis and cartilage*, 2014, vol. 22, no. 8, s. 1071-1076.

ŘEZÁČOVÁ, M., VÁVROVÁ, J. *Molekulární mechanismy účinku ionizujícího záření*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2011. ISBN 978-80-87009-82-6.

SAQUI-SALCES, M., MERCHANT, J.L. Hedgehog signaling and gastrointestinal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2010, vol. 1803, no. 7, s. 786–795.

SARABIA, V., LAM, L., BURDETT, E., LEITER, L.A., KLIP, A. Glucose transport in human skeletal muscle cells in culture. Stimulation by insulin and metformin. *The Journal of clinical investigation*, 1992, vol. 90, no. 4, s. 1386-1395.

SATIR, P., PEDERSEN, L.B., CHRISTENSEN, S.T. The primary cilium at a glance. *Journal of Cell Science*, 2010, vol. 123, no. Pt 4, s. 499–503.

SEELEY, E.S., CARRIÈRE C., GOETZE, T., LONGNECKER, D.S., KORC, M. Pancreatic cancer and precursor pancreatic intraepithelial neoplasia lesions are devoid of primary cilia. *Cancer Research*, 2009, vol. 69, no. 2, s. 422–430.

SEELEY, E.S., NACHURY, M.V. Constructing and deconstructing roles for the primary cilium in tissue architecture and cancer. *Methods in Cell Biology*, 2009, vol. 94, s. 299–313.

SEELEY, E.S., NACHURY, M.V. The perennial organelle: assembly and disassembly of the primary cilium. *Journal of Cell Science*, 2010, vol. 123, no. Pt 4, s. 511–518.

SHARMA, N., KOSAN, Z.A., STALLWORTH, J.E., BERBARI, N.F., YODER, B.K. Soluble levels of cytosolic tubulin regulate ciliary length control. *Molecular Biology of the Cell*, 2011, vol. 22, no. 6, s. 806–816.

SCHNEIDER, L., CLEMENT, C.A., TEILMANN, S.C., PAZOUR, G.J., HOFFMANN, E.K., SATIR, P., CHRISTENSEN, S.T. PDGFR α signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Current biology*, 2005, vol. 15, no. 20, s. 1861–1866.

SCHRAML, P., FREW, I.J., THOMA, C.R., BOYSEN, G., STRUCKMANN, K., KREK, W., MOCH, H. Sporadic clear cell renal cell carcinoma but not the papillary type is characterized by severely reduced frequency of primary cilia. *Modern Pathology*, 2009, vol. 22, no. 1, s. 31–36.

SCHRØDER, J.M., SCHNEIDER, L., CHRISTENSEN, S.T., PEDERSEN, L.B. Ebf1 is required for primary cilia assembly in fibroblasts. *Current biology: CB*, 2007, vol. 17, no. 13, s. 1134–1139.

SLOBODA, R.D. *Primary cilia*. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press, 2009. ISBN 978-0-08-096282-5.

SOROKIN, S.P. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *Journal of Cell Science*, 1968, vol. 3, no. 2, s. 207–230.

SPALLUTO, C., WILSON, D.I., HEARN, T. Evidence for reciliation of RPE1 cells in late G1 phase, and ciliary localisation of cyclin B1. *FEBS open bio*, 2013, vol. 3, s. 334–340.

STANTON, B.Z., PENG, L.F. Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway. *Molecular bioSystems*, 2010, vol. 6, no. 1, s. 44–54.

STINCHCOMBE, J.C., SALIO, M., CERUNDOLO, V., PENDE, D., ARICO, M., GRIFFITHS, G.M. Centriole polarisation to the immunological synapse directs secretion from cytolytic cells of both the innate and adaptive immune systems. *BMC biology*, 2011, vol. 9, s. 45.

TACAR, O., SRIAMORNSAK, P., DASS, C.R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 2013, vol. 65, no. 2, s. 167-170.

TANG, J.Y., MACKAY-WIGGAN, J.M., ASZTERBAUM, M., YAUCH, R.L., LINDGREN, J., CHANG, K., COPPOLA, C., CHANANA, A.M., MARJI, J., BICKERS, D.R., EPSTEIN, E.H. Jr. Inhibiting the hedgehog pathway in patients with the basal-cell nevus syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 2012, vol. 366, no. 23, s. 2180–2188.

TERRA, L.F., GARAY-MALPARTIDA, M.H., WAILEMANN, R.A., SOGAYAR, M.C., LABRIOLA, L. Recombinant human prolactin promotes human beta cell survival via inhibition of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Diabetologia*, 2011, vol. 54, no. 6, s. 1388-1397.

TEYSSIER, F., BAY, J.O., DIONET, C., VERRELLE, P. Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation. *Bulletin du cancer*, 1999, vol. 86, no. 4, s. 345-357.

TREMBLAY, M.R., LESCARBEAU, A., GROGAN, M.J., TAN, E., LIN, G., AUSTAD, B.C., YU, L.C., BEHNKE, M.L., NAIR, S.J., HAGEL, M., WHITE, K., CONLEY, J., MANNA, J.D., ALVAREZ-DIEZ, T.M., HOYT, J., WOODWARD, C.N., SYDOR, J.R., PINK, M., MACDOUGALL, J., CAMPBELL, M.J., CUSHING, J., FERGUSON, J., CURTIS, M.S., MCGOVERN, K., READ, M.A., PALOMBELLA, V.J., ADAMS, J., CASTRO, A.C. Discovery of a potent and orally active hedgehog pathway antagonist (IPI-926). *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, vol. 52, no. 14, s. 4400–4418.

TUTT, A., GABRIEL, A., BERTWISTLE, D., CONNOR, F., PATERSON, H., PEACOCK, J., ROSS, G., ASHWORTH, A. Absence of Brca2 causes genome instability by chromosome

breakage and loss associated with centrosome amplification. *Current biology: CB*, 1999, vol. 9, no. 19, s. 1107-1110.

VAN DER HEIDEN, K., EGOROVA, A.D., POELMANN, R.E., WENTZEL, J.J., HIERCK, B.P. Role for primary cilia as flow detectors in the cardiovascular system. *International review of cell and molecular biology*, 2011, vol. 290, s. 87-119.

VÁVROVÁ, J., FILIP, S. *Radiosenzitivita hematopoetického systému*. Praha: Galén, 2002. Alma mater. ISBN 80-7262-200-5.

VÁVROVÁ, J., ZÁRYBNICKÁ, L., LUKÁŠOVÁ, E., ŘEZÁČOVÁ, M., NOVOTNÁ, E., SINKOROVÁ, Z., TICHÝ, A., PEJCHAL, J., DURÍŠOVÁ, K. Inhibition of ATR kinase with the selective inhibitor VE-821 results in radiosensitization of cells of promyelocytic leukaemia (HL-60). *Radiation and Environmental Biophysics*, 2013, vol. 52, no. 4, s. 471–479.

VILLUMSEN, B.H., DANIELSEN, J.R., POVLSEN, L., SYLVESTERSEN, K.B., MERDES, A., BELI, P., YANG, Y.G., CHOUDHARY, C., NIELSEN, M.L., MAILAND, N., BEKKER-JENSEN, S. A new cellular stress response that triggers centriolar satellite reorganization and ciliogenesis. *The EMBO journal*, 2013, vol. 32, no. 23, s. 3029–3040.

WANG, L.G., LIU, X.M., KREIS, W., BUDMAN, D.R. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 1999, vol. 44, no. 5, s. 355-361.

WHORWOOD, C.B., DONOVAN, S.J., WOOD, P.J., PHILLIPS, D.I. Regulation of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms and type I 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human skeletal muscle cells: a key role in the pathogenesis of insulin resistance? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2001, vol. 86, no. 5, s. 2296-2308.

WONG, S.Y., SEOL, A.D., SO, P.L., ERMILOV, A.N., BICHAKJIAN, C.K., EPSTEIN, E.H. Jr, DLUGOSZ, A.A., REITER, J.F. Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis. *Nature Medicine*, 2009, vol. 15, no. 9, s. 1055–1061.

XIE, J. Implications of hedgehog signaling antagonists for cancer therapy. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 2008, vol. 40, no. 7, s. 670–680.

XU, G., SHI, Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell research*, 2007, vol. 17, no. 9, s. 759-771.

YOSHIMURA, S., EGERER, J., FUCHS, E., HAAS, A.K., BARR, F.A. Functional dissection of rab gtpases involved in primary cilium formation. *The Journal of cell biology*, 2007, vol. 178, no. 3, s. 363–369.

YUAN, K., FROLOVA, N., XIE, Y., WANG, D., COOK, L., KWON, Y.J., STEG, A.D., SERRA, R., FROST, A.R. Primary cilia are decreased in breast cancer: analysis of a collection of human breast cancer cell lines and tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2010, vol. 58, no. 10, s. 857–870.

ZANDER, L., BEMARK, M. Identification of genes deregulated during serum-free médium adaptation of a Burkitt's lymphoma cell line. *Cell proliferation*, 2008, vol. 41, no. 1, s. 136-155.