

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

# **DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Doktorský studijní program  
Lékařská chemie a biochemie**

**MOŽNOSTI PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE V ANALÝZE REAKCE  
BUNĚK NA GENOTOXICKÝ STRES**

**Possibilities of flow cytometry in analysis of cellular response to genotoxic stress**

**Mgr. RADIM HAVELEK**

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

Hradec Králové 2012

Obhajoba dne: .....



**Prohlášení:**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl 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, 2012



Úvodem bych rád poděkoval všem spolupracovníkům, kolegům a přátelům na Ústavu lékařské biochemie LF UK v Hradci Králové a Katedry radiobiologie FVZ UO, kteří přispěli ke vzniku této práce.

Mé poděkování patří především:

- paní školitelce doc. MUDr. Martině Řezáčové, Ph.D. za vynikající odborné vedení disertační práce, vytvoření příznivých pracovních podmínek, pomoc při řešení problému spojených se studiem a za její cenné rady a připomínky,
- paní prof. RNDr. Jiřině Vávrové, CSc. a paní doc. MVDr. Zuzaně Šinkorové z Katedry radiobiologie FVZ UO Brno děkuji za spolupráci, kritické připomínky, odborné konzultace práce a za možnost využívání instrumentálního zázemí,
- paní doc. MUDr. Aleně Stoklasové, CSc. a panu doc. MUDr. Jaroslavu Cermanovi za vstřícnost při plnění teoretických částí mého postgraduálního studia,
- MUDr. Tomášovi Soukupovi a kolektivu Ústavu histologie a embryologie za poskytování kmenových buněk a spolupráci,
- Mgr. Janě Čmielové Ph.D. za spolupráci a mikroskopické analýzy,
- laborantkám Nadě Mazánkové a Bc. Lence Mervartové za pečlivou technickou spolupráci a ozařování buněk,
- panu Ing. Jiřímu Knížkovi, CSc. z Ústavu lékařské biofyziky za pomoc při provedení statistických analýz,
- mé rodině za pochopení, podporu a trpělivost při postgraduálním studiu.



## OBSAH

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>12</b>
<b>2. CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>13</b>
<b>3. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY .....</b>	<b>15</b>
3.1. MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY REAKCE BUNĚK NA GENOTOXICKÝ STRES.....	15
3.1.1. Aktivace ATM kinasy.....	16
3.1.2. Aktivace ATR kinasy.....	17
3.1.3. Aktivace DNA-PKcs.....	18
3.2. HISTON H2AX.....	20
3.2.1. Histony a organizace DNA v buněčném jádře.....	21
3.2.2. Histon H2AX, varianta histonu H2A.....	22
3.2.3. Fosforylace histonu H2AX na serinu 139.....	23
3.2.4. Kinetika fosforylace a defosforylace histonu H2AX.....	24
3.2.5. Fosforylace histonu H2AX v buněčných procesech nezávislých na exogenním genotoxickém stresu.....	25
3.2.6. Role H2AX v opravě DSB DNA.....	27
3.2.7. $\gamma$ H2AX - indikátor genotoxického stresu.....	28
3.3. BUNĚČNÝ CYKLUS.....	30
3.3.1. Zástava buněčného cyklu.....	30
3.3.2. Checkpoint kinasy 1 a 2.....	32
3.4. POŠKOZENÍM DNA INDUKOVANÁ APOPTÓZA.....	33
3.5. STRESEM INDUKOVANÁ PŘEDČASNÁ SENESCENCE.....	37
3.6. VANADOCEN DICHLORID.....	40
<b>4. MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>41</b>
4.1. ZVÍŘATA.....	41
4.2. BUNĚČNÉ KULTURY A KULTIVAČNÍ PODMÍNKY.....	41
4.3. OZAŘOVÁNÍ.....	43
4.4. CYTOSTATIKA A INHIBITORY.....	44
4.5. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE.....	45
4.5.1. Kvantifikace histonu $\gamma$ H2AX.....	45
4.5.2. Stanovení apoptózy pomocí vazby Annexinu V a propidium jodidu.....	46
4.5.3. Analýza buněčného cyklu podle obsahu DNA.....	47
4.5.4. Stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidasy asociované se senescencí.....	48



4.5.5. Sledování změn optických vlastností buňky.....	49
4.6. IMUNOCYTOCHEMIE.....	49
4.7. ANALÝZA KREVNÍHO OBRAZU.....	50
4.8. CYTOCHEMIE.....	50
4.9. STATISTICKÁ ANALÝZA.....	50
4.10. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	51
<b>5. VÝSLEDKY.....</b>	<b>51</b>
5.1. FOSFORYLACE HISTONU H2AX NA SERINU 139 <i>IN VIVO</i> .....	51
5.1.1. Celotělové ozáření potkanů.....	51
5.1.2. Lokální ozáření oblasti hrudníku potkanů.....	56
5.2. ANALÝZA KREVNÍHO OBRAZU PO CELOTĚLOVÉM A LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ POTKANŮ.....	62
5.3. FOSFORYLACE HISTONU H2AX NA SERINU 139 <i>IN VITRO</i> .....	64
5.3.1. Vliv ionizujícího záření na množství $\gamma$ H2AX v kmenových buňkách.....	64
5.3.2. Vliv inhibice ATM kinasy na ionizujícím zářením-indukovanou tvorbu $\gamma$ H2AX v kmenových buňkách.....	67
5.3.3. Vliv vanadocen dichloridu, cisplatiny a ionizujícího záření na vznik $\gamma$ H2AX v buňkách lidské promyelocytární leukemie HL-60.....	70
5.4. ANALÝZA BUNĚČNÉHO CYKLU PO PŮSOBENÍ GENOTOXICKÝCH AGENS.....	76
5.4.1. Vliv ionizujícího záření na buněčný cyklus.....	76
5.4.2. Vliv inhibice ATM kinasy na zářením vyvolané změny buněčného cyklu... 80	
5.4.3. Vliv vanadocen dichloridu a cisplatiny na buněčný cyklus.....	84
5.5. APOPTÓZA DETEKOVANÁ POMOCÍ VAZBY ANNEXINU V A PROPIDIUM JODIDU PO PŮSOBENÍ GENOTOXICKÝCH AGENS.....	87
5.6. SENESCENCE PO PŮSOBENÍ IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ.....	92
<b>6. SHRUTÍ NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ.....</b>	<b>97</b>
<b>7. DISKUSE.....</b>	<b>99</b>
<b>8. ZÁVĚR.....</b>	<b>109</b>
<b>9. LITERATURA.....</b>	<b>111</b>
<b>10. PŘÍLOHY.....</b>	<b>131</b>

## SEZNAM ZKRATEK

53BP1	Protein p53 vázající protein 1
9-1-1	Komplex proteinů Rad9-Hus1-Rad1
Ala	Alanin
A-T	Ataxia-teleangiectasia
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintrifosfát
ATR	ataxia telangiectasia a rad-3-related
ATRIP	ATR-interacting protein
ATRIP	ATR interacting protein
BH	Bcl-2 homologní doména
bp	Pár bází
Brca1	Breast cancer 1
BRCT	Doména shodná s BRCA1 C-terminální
CAD	Kaspasou aktivované DNasy
Cdk	Cyklin dependentní kinasa
CP	Cisplatina
DDR	Odpověď na poškození DNA
DIPS	Léky indukovaná předčasná senescence
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	DNA-dependentní proteinkinasa
DNA-PKcs	DNA-dependentní proteinkinasa, katalytická podjednotka
DSB	Dvouvláknový zlom DNA
dsDNA	Dvouvláknová DNA
E2F	Transkripční faktor E2F
ERK	Extracelulárními signály regulovaná kinasa
FAT	Focal adhesion targeting doména
FITC	Fluorescein-isothiokyanát
Gy	Gray, jednotka dávky záření
H2AX	Histon H2AX
Chk1, 2	Check-point kinasa 1, 2
IC	Inhibiční koncentrace
IOD	Integrální optická denzita

IR	Ionizující záření
IRIF	Ionizujícím zářením indikované ložisko
JNK	Jun N-terminální kinasa
KBPL	Kmenové buňky periodontálního ligamenta
KBZP	Kmenové buňky zubní pulpy
MAPK	Mitogenem aktivovaná proteinkinasa
MAPKK	Mitogenem aktivovaná proteinkinasa kinasa
MKB KD	Mesenchymální kmenové buňky kostní dřevě
MKB	Mesenchymální kmenové buňky
MRN	Reparační komplex Mre11-Rad50-Nbs1
MTX	Mitoxantron
NBS1	Nijmegen breakage syndrome protein 1
NHEJ	Nehomologní spojení konců
p16	Cyklin-dependentní kinasy inhibující protein 2A
p21	Cyklin-dependentní kinasy inhibující protein 1
p53	TP53 nádorový supresor
p53	Tumor supresorový protein 53
PFGE	Pulzní gelová elektroforéza
PI	Propidium jodid
PI3K	Fosfoinositid-3-kinasa
Plk1	Polo-like kinase-1
PP2A	Protein fosfatasa 2A
PP4	Protein fosfatasa 4
PP6	Protein fosfatasa 6
PSR	Fosfatidylserin receptory
RB	Retinoblastoma
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní kyslíkové radikály
RPA	Replikační protein A
SA- $\beta$ -gal	$\beta$ -galaktosidasa asociovaná se senescencí
Ser	Serin
SIPS	Stresem indukovaná předčasná senescence
SSB	Jednovláknové zlomy
ssDNA	Jednovláknová DNA

Thr	Threonin
Tip60	K (lysin) acetyltransferasa 5, rovněž označována jako Kat-5
TOPBP1	DNA topoisomerase IIbeta binding protein 1
Tyr	Tyrosin
UV	Ultrafialové
VDC	Vanadocen dichlorid
$\gamma$ H2AX	Histon H2AX fosforylovaný na serinu 139
$\gamma$ HV68	$\gamma$ -herpesvirus 68

*Zkratky a názvy, u kterých se celý název neužívá nebo které nemají český ekvivalent, nejsou uvedeny.*

# 1. ÚVOD

Průtoková cytometrie je moderní analytická metoda, která umožňuje v reálném čase stanovit velikost a morfologické charakteristiky buněk spolu s analýzou vazby specifické protilátky konjugované s fluorochromem nebo s použitím fluorescenčních sond. V závislosti na konstrukci průtokového cytometru jsme schopni analyzovat vazbu několika protilátek či fluorescenčních sond včetně sledování intenzity této vazby. Výhody průtokové cytometrie spočívají v současném proměření mnoha znaků na jedné buňce, jedná se o metodu kvantitativní analýzy. Průtoková cytometrie umožňuje stanovení přítomnosti jak povrchových, tak intracelulárních znaků, dále určení procenta buněk nesoucích zvolené znaky v heterogenní populaci a měření intenzity jejich exprese. Genotoxické látky poškozují buňku vznikem jednovláknových a dvouvláknových zlomů DNA. Za nejzávažnější formu poškození DNA jsou považovány dvouvláknové zlomy. Dvouvláknové zlomy DNA vzniklé v genomu buňky jsou reparovány během dočasné zástavy buněčného cyklu. Pokud však nejsou dvouvláknové zlomy DNA úspěšně reparovány, dojde k buněčné smrti, nebo indukci senescence. Práce se zaměřila na detekci dvouvláknových zlomů DNA, změn buněčného cyklu a apoptózy po působení genotoxických agens, zejména ionizujícího záření, cisplatinu a vanadocenu dichloridu, pomocí vybraných metod průtokové cytometrie. Ke studiu byly použity různé modelové typy buněk, nádorové buněčné linie, mesenchymální kmenové buňky a lymfocyty izolované z periferní krve.

## 2. CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo prostudovat možnosti průtokové cytometrie v kvantifikaci buněčné odpovědi na genotoxický stres *in vivo* a *in vitro*. Detekovali jsme změny související s rozpoznáním poškození DNA a následnou buněčnou reakcí. Nejzávažnějším poškozením jaderné DNA buňky je vznik dvouvláknových zlomů DNA. Buňka se snaží poškození DNA reparovat dočasnou zástavou buněčného cyklu, je-li poškození nereparovatelné dochází k indukci apoptózy, nebo senescence.

Jednotlivé cíle byly stanoveny takto:

- Kvantifikovat změny v množství  $\gamma$ H2AX v lymfocytech izolovaných z periferní krve 1 h od celotělového a lokálního ozáření potkanů v závislosti na dávce ionizujícího záření pro účely biologické dozimetrie.
- Objasnit rozdíly ve výskytu  $\gamma$ H2AX v populaci lymfocytů po celotělovém a lokálním ozáření, kinetiku reparace radiačního poškození podle vymizení  $\gamma$ H2AX a možnost odložené analýzy  $\gamma$ H2AX.
- Stanovit změny v počtu periferních lymfocytů 24 hodin od celotělového a lokálního ozáření potkanů ve vztahu k dávkám záření použitým při kvantifikaci  $\gamma$ H2AX.
- Prostudovat časovou a dávkovou závislost vzniku  $\gamma$ H2AX *in vitro* v mesenchymálních kmenových buňkách po působení ionizujícího záření samostatně, nebo v kombinaci s inhibicí ATM kinasy.
- Stanovit, jak expozice ionizujícímu záření ovlivňuje distribuci mesenchymálních kmenových buněk v buněčném cyklu v kontextu obdržené dávky a času od ozáření.
- Objasnit kinetiku rozvoje senescence pomocí kvantifikace aktivity  $\beta$ -galaktosidasy spojené se senescencí u mesenchymálních kmenových buněk po ozáření.
- Zhodnotit pomocí průtokové cytometrie, zda inhibice ATM kinasy během ozáření ovlivní distribuci mesenchymálních kmenových buněk v buněčném cyklu.
- Objasnit, zda potenciální protinádorová látka vanadocen dichlorid indukuje dávkově závislý vznik  $\gamma$ H2AX a apoptózu u leukemických buněk HL-60 v porovnání s klasickou cytostatickou látkou cisplatinou.
- Zjistit, jestli potenciální protinádorová látka vanadocen dichlorid účinněji indukuje apoptózu u maligně transformovaných T-lymfocytů linie MOLT-4, nebo u zdravých lidských lymfocytů izolovaných z periferní krve v kontrastu s působením cisplatinou.

- Stanovit velikost mitoxantronem indukované apoptózy u T-lymfocytární leukemické linie MOLT-4 za inhibice ATM kinasy a MEK1/2 kinas.

### 3. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

#### 3.1. Molekulární mechanismy reakce buněk na genotoxický stres

Buňky vystaveny působení genotoxických agens fyzikální nebo chemické povahy (ionizující záření, cytostatika, reaktivní formy kyslíku a dusíku exogenního nebo endogenního původu) vykazují intenzivní poškození DNA charakterizované poškozením nukleových bází, intramolekulárním zesíťováním vláken DNA s jadernými bílkovinami, jedno a dvouřetězcovými zlomy DNA a další (Khanna et al. 2001). Typ a rozsah poškození genetické informace buňky závisí jak na druhu a délce působení genotoxického agens, tak na vnímavosti daného buněčného typu k jeho působení. Za nejzávažnější formu poškození jaderné DNA se považují dvojité (dvouvláknové) zlomy dvoušroubovice DNA (double strand breaks, DSB). DSB vznikají po působení exogenních genotoxických agens (ionizující záření, cytostatika), mohou rovněž vznikat během některých specializovaných buněčných funkcí, jako je replikace DNA, V(D)J rekombinace, meiotická rekombinace, class switching a apoptóza.

Dnes není sporu, že DSB představují nejvíce nebezpečnou formu poškození DNA. V některých literárních zdrojích se uvádí, že již jeden DSB může vyvolat buněčnou smrt, pokud není reparován. Ztráta kontinuity mezi fragmenty DNA a centromerou během mitózy může vyústit v delecii velké části genetické informace přenášené do dceřiných buněk. Pokud nejsou správně opraveny, DSB mohou způsobit změny v sekvenci DNA, chromosomální translokace, genetickou nestabilitu, eventuálně neoplastickou transformaci buňky. Není tedy překvapením, že buněčná odpověď na poškození DNA a především DSB představuje sofistikovaný soubor molekulárních reakcí vedoucích k detekci DSB a dále pak k jeho reparaci (Jackson 2002).

Poškození polynukleotidových řetězců jaderné DNA způsobuje remodelaci chromatinu za formování tzv. ohnisek, foků (v případě působení ionizujícího záření: ionising radiation-induced foci, IRIF) v místě poškozené DNA. Vzniklá ohniska během několika minut rekrutují a aktivují proteiny podílející se na detekci DSB. Mezi nejdůležitější proteiny detekující toto poškození patří MDC1, 53BP1, Mre11, Rad50, Nbs1 (proteiny reparačního komplexu MRN), Rad1, Rad9, Rad17, Rad26, Hus1, ssDNA vázající komplex známý jako protein RPA a mnoho dalších (Bekker-Jensen et al. 2006).

Po detekci poškození DNA dojde k aktivaci proteinů z rodiny tzv. serin/threonin



proteinkinas příbuzných fosfatidylinositol-3 kinase (PI3K): ataxia-teleangiectasia mutated (ATM), ataxia-teleangiectasia a Rad3-related (ATR) a katalytické podjednotky DNA-závislé proteinkinasy (DNA-PKcs) (Shiloh et al. 2003). O tom, která kinasa bude přednostně aktivována, rozhodne typ poškození genomu, doba od vzniku poškození, druh a kvantum působícího genotoxického agens. Tyto kinasy dále aktivují složitou, do dnes stále ne zcela prozkoumanou síť efektorových molekul, které ve vzájemné interakci soustřeďují své aktivity v závislosti na typu upřednostněné signální dráhy ve směru: opravy poškozené DNA, zástavy buněčného cyklu, indukce senescence nebo apoptózy (obr. 1).

### 3.1.1. Aktivace ATM kinasy

ATM kinasa je velice důležitá apikální signální molekula, která spouští signalizační kaskádu zahrnující široké modulační účinky na rozličné aspekty buněčné proliferace, nebo smrti. Serin/threoninová kinasa ATM je vysoce fosforylovaný protein o velikosti 370 kDa, který je tvořen z 3056 aminokyselin a je kódován genem o velikosti 150 kb lokalizovaném na chromosomu 11q22–23 (Chen et al. 1996). Inaktivovaný nebo mutovaný gen kódující ATM kinasu byl nalezen u autosomálně recesivní poruchy Ataxia telangiectasia (A-T). A-T je charakterizovaná cerebelární ataxií, imunodeficiencí, hypogonadismem, předčasným stárnutím, genomovou nestabilitou, 100x vyšším rizikem vzniku malignit, defekty v G1/S a G2/M kontrolních bodech buněčného cyklu a vysokou senzitivitou k ionizujícímu záření a látkám indukujícím DSB (Lavin et al. 1997). ATM proteinkinasa patří do rodiny proteinů, které vykazují serin/threonin kinasovou aktivitu. Všechny tyto proteiny obsahují doménu s motivem typickým pro lipidovou kinasu – fosfatidylinositol-3-kinasu (PI3K). PI3K mají společné tři domény: FAT, FATC a PI3K. Ve FAT doméně ATM kinasy je kinasa autofosforylována na Ser1981. Doména PI3K obsahuje fosfatidylinositol s katalytickým místem této kinasové rodiny. Aktivace ATM proteinkinasy se děje v buněčném jádře, v bezprostředním okolí vzniku DSB. Dochází k autofosforylaci ATM na Ser1981, což způsobí disociaci dimeru (nebo multimeru) ATM za vzniku jejího aktivního monomeru s kinasovou aktivitou (Rotman et al. 1999). Fosforylace Ser1981 je při dávce ionizujícího záření 0,5 Gy detekovatelná již po 30 sekundách a následně po dobu 24 hodin (Bakkenist et al. 2003). Aktivovaná ATM je potřebná pro zástavu buněčného cyklu v G1/S, zpomalení průchodu S a G2/M kontrolních bodech, napomáhá opravě DNA, nebo spouští apoptózu v závislosti na rozsahu poškození a buněčném typu. ATM protein kinasa fosforyluje mnoho dalších cílů

podílejících se na reparaci poškození: protein p53, Mdm2 a Chk2 vedou k zástavě buněčného cyklu v G1 kontrolním bodě; Nbs1, Chk1, Chk2, BRCA1, FancD2 a SMC1 vyvolávají přechodnou zástavu buněčného dělení v S fázi; a BRCA1 a hRad17, Chk1 v G2 kontrolním bodě buněčného cyklu (Bakkenist et al. 2003). Spolu s ATM proteinkinasou se v okolí DSB lokalizuje Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) komplex, který figuruje jako DSB senzor pro ATM proteinkinase, rekrutuje ji do místa poškození a napomáhá její aktivaci. Řada substrátů ATM se podílí na reparaci poškození – Nbs1, BRCA1, hRad17. Aktivovaná ATM kinasa fosforyluje další klíčový protein, histon H2AX, jehož fosforylace napomáhá tvorbě signálních a reparačních ohnisek (Bekker-Jensen et al. 2006).

### 3.1.2. Aktivace ATR kinasy

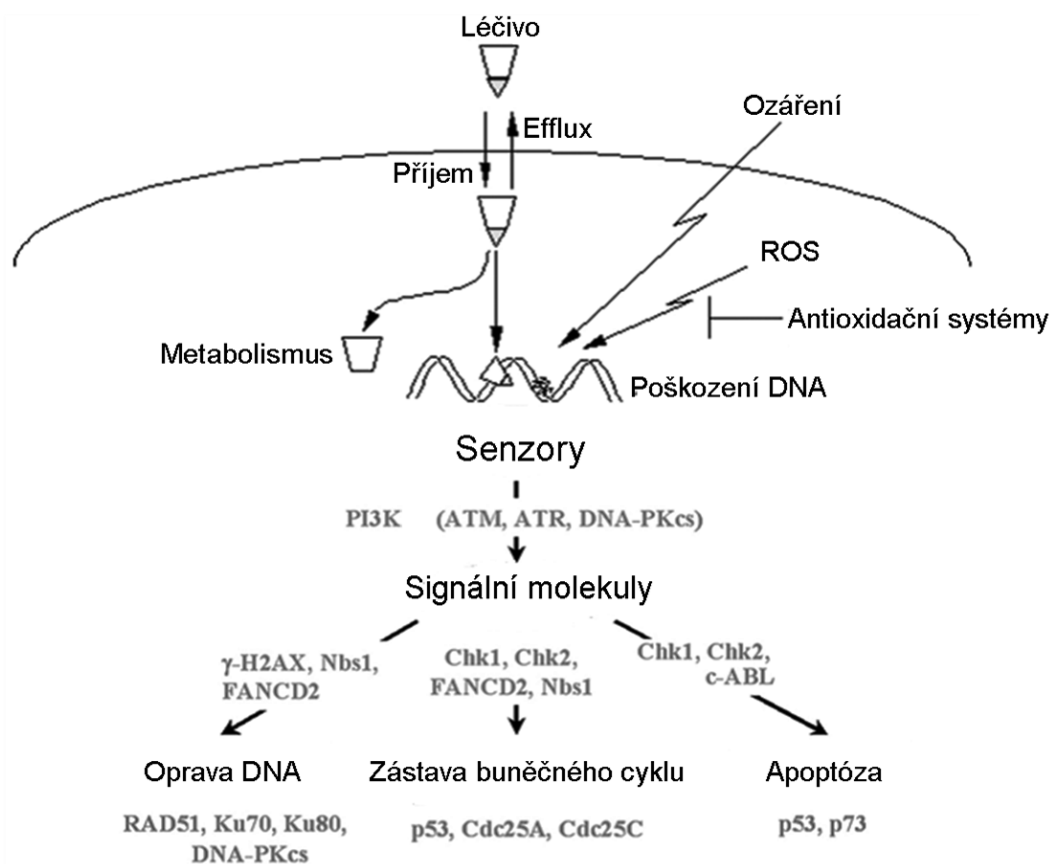
ATR (ATM a Rad3-related) je 300 kDa velká serin/threoninová kinasa, která je kódována genem lokalizovaným na lokusu 3q22-24 chromosomu 3 (Mannino et al. 2001). Ztráta obou alel kódujících protein ATR je letální již během embryonálního vývoje, což svědčí o esenciální roli ATR kinasy pro život buňky (de Klein et al. 2000). Frekvence heterozygotní formy mutace v populaci není dosud známa. Mutace genu kódujícího ATR byla popsána u několika typů lidské rakoviny, jako je rhabdomyosarkom (Smith et al. 1998), malobuněčný typ karcinomu plic (Levin et al. 1994), nádory žaludku (Menoyo et al. 2001) a vzácného Seckel syndromu (O'Driscoll et al. 2003). Aktivace ATR signální dráhy je iniciována různorodými typy genotoxického stresu, jako jsou DSB, adukty bazí, meziřetězcové kroslinky, replikační stres a především nelze opomenout jednovláknové zlomy DNA, přesněji specifikováno je ATR aktivována jakoukoliv jednovláknovou DNA (ssDNA) povlečenou ssDNA- vázajícím proteinem RPA. Samotný mechanismus vedoucí k aktivaci ATR je zprostředkován přes navázání ATRIP (ATR-interacting protein) spolu s již zmíněným replikačním proteinem A (replication protein A complex-RPA), který ssDNA obaluje (Cortez et al. 2001, Ball et al. 2007). Komplex ATR/ATRIP se následně kolokalizuje s Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1) komplexem, což zajistí vlastní aktivaci ATR (Majka et al. 2006). Některé zdroje mluví o nezbytnosti působení topoisomerase-interacting protein (TOPBP1) na aktivaci ATR v komplexu ATR/ATRIP/9-1-1, tento model je dnes obecně přijímán (Bartek a Mailand 2006). TOPBP1 je BRCT doménu obsahující protein, nezbytný pro aktivaci ATR, který dramaticky stimuluje aktivitu ATR *in vitro*. Mechanismus, jakým vazba TOPBP1 aktivuje ATR je zatím málo znám, málo informací je i o posttranslačních modifikacích komplexu ATR-ATRIP

(Cimprich a Cortez 2008). Aktivovaná ATR fosforyluje celou řadu substrátů, z nichž asi nejdůležitější je Chk1 proteinkinasa (Ser 317 a Ser 345), která je zodpovědná za zpomalení průchodu S fází, nebo zástavu v G2/M fázi buněčného cyklu, a tedy za checkpointovou funkci celé ATR dráhy (Cortez et al. 2001). K dalším významným substrátům ATR patří protein Rad17, s nímž ATR kinasa významně asociuje po ovlivnění buněk hydroxyureou, UV a IR zářením. Protein Rad17 je také v různém časovém odstupu od poškození DNA fosforylován na serinu 635 a 645 ATR kinasou, což se jeví jako rovněž důležité pro zástavu buněčného cyklu v G2/M kontrolním bodě (Post et al. 2001). Mezi další cíle ATR patří histon H2AX (Ward et al. 2001), tumor supresor protein p53 (Zhao et al. 2001), BRCA1 a Polo-like kinase-1 (Plk1). Zde se cesty ATM a ATR kinasy částečně prolínají. ATR fosforyluje protein p53 *in vitro* na serinu 15 a 37. Tato fosforylace se primárně děje následkem expozice buněk UV záření. ATR kinasa se ale také podílí na fosforylaci p53 po působení ionizujícího záření, a to společně s ATM kinasou. Zářením indukovaná cesta fosforylace p53 ATR kinasou se ovšem objevuje v pozdějším čase, než fosforylace zprostředkovaná ATM. Tento fakt možná vysvětluje, proč ztráta obou alel pro ATM u buněk způsobí opožděnou kinetiku fosforylace proteinu p53, ale zdaleka ne její úplnou absenci po vzniku DSB (Tibbetts et al. 1999). Lze shrnout, že v G1 a G2 fázi buněčného cyklu vzniklé DSB aktivují odpověď zprostředkovanou ATM, v S fázi (minoritně G2 fázi) přispívá k této odpovědi především ATR (Cimprich a Cortez 2008).

### 3.1.3. Aktivace DNA-PKcs

DNA-dependentní proteinkinasa (DNA-PKcs) je jaderná serin/threonin kinasa, jejíž aktivita je stimulována volnými konci dvouvláknové DNA (Burma et al. 2004). DNA-PKcs hraje roli v rozličných buněčných procesech zahrnujících opravu DNA, V(D)J rekombinace, procesu udržování funkčních telomer, aktivace či průběhu apoptózy. DNA-PKcs se skládá z 470 kDa velké katalytické podjednotky (DNA-PKcs) a DNA vázajícího, regulatorního heterodimeru formovaného z 70 a 86 kDa velkých podjednotek (častěji označovaných jako Ku70 a 80). Aktivace DNA-PKcs po vzniku poškození DNA, nejčastěji DSB (po působení IR, UV, apoptózou-indukovaných) zahrnuje její autofosforylaci na několika serin/threoninových zbytcích, nejvýznamnější je threonin 2609 (Chen et al. 2005). Hlavní funkce DNA-PKcs spočívá v opravě DSB vzniklých po poškození DNA genotoxickými agens. Proces, kterého se DNA-PKcs účastní, je známý jako non-homologous end joining (NHEJ). Pokud toto

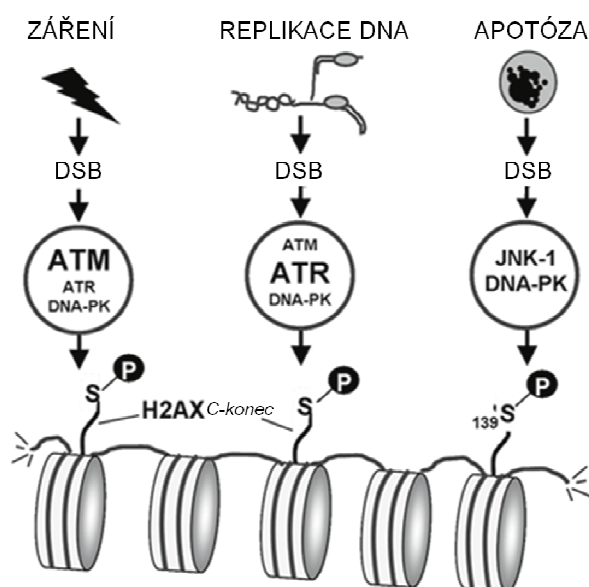
poškození není možné opravit je indukována apoptóza. Buňky postrádající jakoukoliv komponentu komplexu DNA-PKcs vykazují defekt v opravě DBS a zároveň jsou velice vnímavé k působení ionizujícího záření (Smith a Jackson 1999). U stejně postižených buněk zároveň selhává proces V(D)J rekombinace. Jednotky Ku za změny své konformace zprostředkovávají vazbu DNA-PKcs k DNA, rekrutují ji do místa poškození a napomáhá její aktivaci. Přesný mechanismus není momentálně znám. Enzymatické vlastnosti DNA-PKcs jsou velice potenceovány vazbou Ku, komplex DNA-PKcs-Ku je nazýván DNA-PK. Rovněž inhibice holoenzymu DNA-PK vede ke zvýšení vnímavosti buněk k ionizujícímu záření (Allen et al. 2003). DNA-PK fosforyluje celou řadu proteinů (Ku70, Ku80, p53, RNA-polymerasu II, RPA, topoisomerasy, hsp90, SV-40 velký T antigen, a velké množství transkripčních faktorů jako c-Jun, c-Fos, oct-1, sp-1, c-Myc, TFIID, XLF, Artemis a DNA ligasu IV, histon H2AX a mnoho dalších), fosforyluje sama sebe na skupině označované PQR (Ser 2023–Ser 2056), ABCDE (Thr 2609–Thr 2647), 2671 (Thr 2671–Thr2677), Thr 3950 a Ser 3205. DNA-PK je také fosforylována ATM a ATR kinasou. Tyto posttranslační fosforylace DNA-PK představují děje vedoucí zejména k inaktivaci serin/threonin kinasové aktivity, jedná se také o děje regulační (Yajima et al. 2006, Mukherjee et al. 2006).



**Obr. 1.** Schéma molekulárních mechanismů aktivovaných po působení genotoxických agens

## 3.2. Histon H2AX

Histon H2AX figuruje jako tumor supresor, který se za své fosforylace podílí na udržování genomové integrity buňky. H2AX je velmi masivně a zároveň rychle fosforylován na okraji vzniklých DSB v chromatinu buňky. Fosforylace je zprostředkována rodinou aktivovaných fosfatydilinositol-3 kinas: ATM, ATR a DNA-PK, v závislosti na druzích genotoxického agens a typu buněčné odpovědi (obr. 2). Fosforylaci histonu H2AX lze tedy do jisté míry považovat za jednu z křížovatek molekulárních cest odpovědi buněk na genotoxický stres (Bonner et al. 2008). Dále se budeme věnovat úloze histonu H2AX v organizaci buněčného jádra, rozdílným aspektům jeho funkce a biochemie včetně úlohy v reakci na vznik DSB. Přiblížíme mechanismus fosforylace H2AX za tvorby ohnisek v buněčném jádře společně se stechiometrií ohnisek ve vztahu k DSB formovaných po působení exogenních genotoxických agens. Je nutné popsat úlohu fosforylovaného histonu H2AX v průběhu procesů spojených s přirozeným metabolismem buňky a dějů nezávislých na exogenním genotoxickém stresu. Další část je věnována účasti H2AX v procesu opravy poškozené DNA. Fosforylovaný H2AX zde působí jako afinitní platforma pro akumulaci a udržení reparačních proteinů, stejně jako faktorů remodelace chromatinu nebo molekul účastnících se zástavy buněčného cyklu. Opomenout nelze ani význam fosforylovaného histonu H2AX jako indikátoru vzniku DSB a apoptózy.



**Obr. 2.** Fosforylace H2AX v závislosti na typu děje indukujícího DSB.

### 3.2.1. Histony a organizace DNA v buněčném jádře

Jádro typické eukaryotické buňky má průměr mezi 5-8  $\mu\text{m}$  a obsahuje DNA o délce zhruba dvou metrů. U eukaryot je DNA v jádru rozdělena mezi sadu různých chromosomů. Každý chromosom obsahuje jednu molekulu dvouvláknové DNA (dsDNA), která působí ve funkci genoforu. Tato DNA se označuje jako chromosomová, nebo též jaderná DNA. Geny, které jsou na této DNA lokalizovány, jsou označovány jako jaderné. Struktura chromosomu se mění v závislosti na fyzikálním a chemickém stavu chromatinu (jaderné hmoty). Chromatin je složen z dsDNA, histonů a proteinů nehistonové povahy. Podle fáze buněčného cyklu se mění jeho stav – v interfázi je rozvolněný, označuje se jako euchromatin, což umožňuje přístup proteinů potřebných pro expresi genů, nebo replikaci DNA. Před vstupem do mitózy dochází k postupnému sbalování chromatinu, tvoří se heterochromatin, a dále vznikají vysoce kondenzované mitotické chromosomy (Campos et al. 2009). Základní jednotka chromatinu je nukleosom. Každý nukleosom obsahuje oktamer histonů, jednu molekulu spojovacího histonu H1, která není součástí histonového oktameru, úsek DNA o průměrné délce 200 bp (146 nukleotidových párů je omotáno kolem jádra nukleosomu a průměrně 50 nukleotidových párů spojuje sousední jádra nukleosomů), který tvoří dvě otáčky (dva závity) kolem histonového oktameru. Histony jsou relativně malé proteiny, jejich molekulová hmotnost je mezi 11 kDa (H4) - 15 kDa (H3) s vysokým obsahem kladně nabitých bazických aminokyselin lysinu a argininu. Tyto aminokyseliny se vyskytují především ve flexibilních koncích histonů. Pozitivní náboje těchto aminokyselin při neutrálním pH umožňují pevné navázání histonů na negativně nabitou pentosa-fosfátovou kostru DNA bez ohledu na nukleotidovou sekvenci. Celkový obsah histonů je v buňce značný, kolem 60 milionů molekul od každého typu v jedné buňce a jejich celková hmotnost je přibližně stejná jako DNA samotné. Na základě poměrů argininu k lysinu, velikosti a náboje se rozlišuje 5 druhů histonů, H1, H2A, H2B, H3, H4. Histony H2A a H2B tvoří stabilní dimery, kdežto histony H3 a H4 se spojují do stabilních tetrametrů. Histony jsou evolučně jedny z nejvíce konzervativních proteinů u eukaryot. To platí především pro histony H3 a H4. Každý histon je v oktameru nukleosomu zastoupen dvakrát. Histon H1 se pojí k nukleosomu z vnější strany a podílí se na spojování sousedních nukleosomů v nukleosomovém řetězci. Histonový oktamer si lze představit jako válec o šířce 10 – 11 nm a výšce 6 nm. Je tvořen histonovým tetrametrem  $(\text{H3})_2$ - $(\text{H4})_2$  a dvěma dimery H2A a H2B. Flexibilní (volné) N- a C- terminální konce histonů prodělávají četné posttranslační modifikace. Jedná se o fosforylaci, methylaci, acetylaci, ADP-ribosilaci,

biotinylací, nebo nakonec degradační ubikvitinací. Tyto modifikace způsobují přestavbu chromatinu a tak tvoří epigenetický regulační mechanismus, uplatňující se jak v normálních, tak patologických buněčných procesech. Epigenetické změny ovlivňují nejen selektivní proces řízení exprese genů nutných například pro buněčnou diferenciaci, ale i expresi genů nutných pro reparaci DNA (Ramakrishnan 1997, Řezáčová et al. 2011, Alberts et al. 1994).

### **3.2.2. Histon H2AX, varianta histonu H2A**

Rodina histonů H2A se rozděluje na základě elektroforetické mobility v přítomnosti kyseliny octové, Tritonu X-100 a močoviny na podskupiny, tzv. majoritní varianty H2A1 a H2A2. Druhou skupinou jsou tzv. minoritní varianty H2AZ, H2AX, makroH2A1, makroH2A2 a H2A-Bbd. Rodina histonů H2A představuje velice heterogenní skupinu. Ačkoliv jsou histony všeobecně velice konzervativní, neměnné struktury co se týče složení, tak například varianta histonu H2AZ se liší od běžné varianty H2A1 v 15 aminokyselinách. Subtyp histonu H2AX představuje z celé rodiny H2A nejvíce mezidruhově konzervativní variantu, tvoří 2-25 % z celkového množství histonu H2A, množství záleží na typu organismu nebo typu studovaných buněk, např. v normálních lidských fibroblastech je to cca 10 %, 2 % v lymfocytech nebo buňkách HeLa. Podobně jako ostatní histonové proteiny obsahuje H2AX centrální globulární doménu a dva volné boční konce, tzv. N-terminální serinovou a C-terminální tyrosinovou část, obě představují místo pro posttranslační modifikace. Většina těchto modifikací se děje na N-konci, významně i na C-konci a mají specifické funkce v metabolismu DNA a pro zpřístupnění poškozené DNA během její reparace (Pinto et al. 2010). H2AX na rozdíl od ostatních členů rodiny H2A má na 4. pozici od C-konce serin (označuje se jako omega-4), u člověka je to 139. aminokyselina v řetězci. Čtyři C-koncové aminokyseliny představují velice konzervativní motiv, u všech druhů jde o sekvenci serin-glutamin-kyselá aminokyselina-hydrofobní aminokyselina (Redon et al. 2002). Po vzniku DSB dochází k rychlé fosforylaci omega-4-serinových residuí a tvorbě tzv.  $\gamma$ H2AX, což je uznávané označení pro histon fosforylovaný na serinu 139 (Rogakou et al. 1998, Řezáčová et al. 2011).

### 3.2.3. Fosforylace histonu H2AX na serinu 139

Vznik DSB různého původu během několika minut (s maximem ~ 30 až 60 minut) spouští v okolí zlomu fosforylaci histonu H2AX. **Fosforylaci zejména zprostředkovává aktivována ATM** proteinkinasa, a to na serinu 139, který je součástí SQ domény v C-terminální oblasti molekuly H2AX (Rogakou et al.1998, Burma et al. 2001). V závislosti na induktoru DSB může fosforylaci zprostředkovávat také Rad3-related proteinkinasa (ATR) (Furuta et al. 2003) a DNA-závislá proteinkinasa (DNA-PK) (Park et al. 2003). Ionizujícím zářením indukované DSB vedou k fosforylaci H2AX zejména prostřednictvím ATM kinasy (Bekker-Jensen et al. 2006), po působení UV záření nebo replikačního stresu se naopak uplatňuje ATR kinasa (Zhou et al. 2000). DNA-PK je zodpovědná za fosforylaci H2AX během fragmentace DNA jakožto děje charakteristického pro průběh apoptózy nebo hypertonických podmínek, zatímco ATM kinasa se na tomto procesu v této fázi reakce buněk na genotoxický stres nepodílí (Mukherjee et al. 2006). Fosforylace H2AX zprostředkovaná DNA-PK byla rovněž detekována v odpovědi po působení ligandu TRAIL na receptory smrti (Shrivastav et al. 2009). Bylo definováno, že po ozáření dávkou 1 Gy záření gama vzniká v buňce cca 40 DSB a okolo 1 % H2AX je fosforylováno. Každý DSB vyvolá fosforylaci přibližně 2000 molekul H2AX, což odpovídá zhruba 0,03 % chromatinu (Rogakou et al. 1998, 1999, Redon et al. 2003). Tato fosforylace se šíří po sousedním chromatinu za vzniku ložisek, do kterých se rekrutuje celá řada proteinů souvisejících s reparačními a smrtíci pochody (Rogakou et al. 1998). Mezi proteiny, které se kolokalizují s  $\gamma$ H2AX patří NBS1, 53BP1, MDC1, BRCA1, MRE11, Rad50, Rad 51, Tip 60, HDAC4 (Kinner et al. 2008). Úloha těchto proteinů v buněčné odpovědi na DSB se liší. Proteiny MRE11 Rad 50 a Nbs1 vytvářejí funkční komplex, který působí jako senzor pro detekci DSB a stabilizuje volné konce DNA. Histonacetyltransferasa Tip 60 a histondeacetylase HDAC4 modulují acetylaci chromatinu a ovlivňují rozvolnění terciární struktury DNA. Proteiny 53BP1 a MDC1 působí jako adaptorové molekuly a zprostředkovávají interakce ostatních proteinů s poškozeným místem (Řezáčová et al. 2011).

Jak je to se vzájemnou stechiometrií poměru vzniku DSB a tvorby  $\gamma$ H2AX? Částečně odpověděly předchozí řádky. Rothkamm a Lobrich (2003) zkoumali indukci DSB u primárních lidských fibroblastů v G1 fázi buněčného cyklu pomocí stanovení fosforylace histonu H2AX a pulzní gelové elektroforézy (PFGE). Průměrně bylo stanoveno 36  $\gamma$ H2AX foci/Gy/jedna buňka 3 minuty po ozáření v dávkovém rozpětí 0,2 nebo 2 Gy. Pomocí korelace



s PFGE došli k závěru, že množství  $\gamma$ H2AX foci odpovídá rozsahu vzniku DSB.

Fosforylace H2AX a vznik  $\gamma$ H2AX ložisek jsou dnes přijímány jako kvantitativní ukazatel DSB, který dobře koreluje s množstvím vzniklých DSB (Sedelnikova et al. 2002). Fosforylovaná forma histonu H2AX může být detekovaná imunocytochemicky pomocí monoklonálních protilátek, které specificky reagují s C – terminálním peptidem CKATQA[fosfoS]QEY odpovídajícím 134-142 aminokyselině histonu H2AX.

Histon H2AX je důležitý pro udržení integrity genomu. Ztráta obou alel genu kódujícího histon H2AX vede u myši k těžké genomové nestabilitě; H2AX (-/-) myši jsou radiosenzitivní, retardované v růstu a imunodeficientní (Celeste et al. 2002). Dokonce i haploinsuficience pro H2AX (+/-), u níž je přítomná pouze jedna funkční alela, poruší genetickou integritu a zároveň zvýší náchylnost k rakovině (Celeste et al. 2003).

### **3.2.4. Kinetika fosforylace a defosforylace histonu H2AX**

Studium kinetiky fosforylace histonu H2AX prokázalo na dávce záření závislý vzestup  $\gamma$ H2AX s počátkem 1 – 2 minuty od ozáření a maximem 10 minut (Rogakou et al. 1999). Deset minut od ozáření jsou ohniska již dobře zřetelné a obsahují reparační faktory DSB, jako jsou 53BP1, MRE11 a RAD50, což naznačuje aktivní zahájení reparačního procesu (Paull et al. 2000, Sedelnikova et al. 2008). Během první hodiny od vzniku DSB obsah histonu  $\gamma$ H2AX v buňce dosahuje vrcholu a zároveň se nemění. Po jedné hodině je popisován pomalý pokles, kdy většina ohnisek v silné závislosti na buněčném typu zmizí během 8 hodin po ozáření (Rogakou et al. 1999, Sedelnikova et al. 2002, 2004, Cucinotta et al. 2008, Redon et al. 2009). Avšak některé práce uvádějí, že zvýšené množství  $\gamma$ H2AX ohnisek v jádře buňky je detekovatelné ještě během 48 h až do doby 7 dnů po expozici záření v dávce větší než je 1 Gy (Redon et al. 2009, Bhogal et al. 2010). Předpokládá se, že tyto reziduální ohniska mohou být kritický faktor pro to, zda buňka v dlouhodobé perspektivě přežije (Banath et al. 2010). Jiný důvod pro tak dlouhou přítomnost  $\gamma$ H2AX ohnisek může být aktivní průběh apoptózy, zástava reparace, perzistující chromozomové aberace, signalizace zástavy buněčného cyklu, aktivace buněčné senescence. Kinetika tvorby  $\gamma$ H2AX ohnisek je tedy do značné míry závislá na typu buňky a formě, s jakou je schopna reparovat poškození DNA ve formě DSB (Goodhead 1994; Nikjoo et al. 2001, Banath et al. 2010).

Dalším důležitým dějem z pohledu kinetiky a časového okna pro záchyt fosforylovaného histonu H2AX je průběh defosforylace histonu H2AX jakožto negativního

regulátoru jeho funkce. Hned na začátku je nutné podotknout, že přesný mechanismus odstraňování  $\gamma$ H2AX foci během reparace DSB je prozatím stále ne zcela objasněný. Několik proteinů z rodiny fosfatas jako je například protein fosfatasa 2A (PP2A), protein fosfatasa 4 (PP4); protein fosfatasa 6 (PP6) a fosfatasa WIP1 se podílí na defosforylaci  $\gamma$ H2AX (Chowdhury et al. 2005, 2008, Keogh et al. 2006, Macurek et al. 2010). Komplexy podílející se na remodelaci chromatinu jako je Tip 60 v lidských buňkách, INO80-C a SWR-C v buňkách kvasinky také přispívají k odstraňování  $\gamma$ H2AX z chromatinu výměnou histonů za nově exprimované histony (Thiriet a Hayes 2005). Spojení mezi Tip 60 a UBC13 je zvýšené po poškození DNA a koreluje s acetylací H2AX na lysinu 5, což je důležité pro jeho ubiquitinaci pomocí UBC13 a uvolnění z chromatinu (Kusch et al. 2004, Ikura et al. 2007). Dnes se předpokládá, že oba děje, a to jak defosforylace histonu H2AX, tak vlastní odstranění fosforylovaného histonu H2AX působí společně (Chowdhury et al. 2005).

Sníženou kinetiku fosforylace a defosforylace histonu H2AX lze pozorovat u některých stavů provázených deficiencí DSB reparačního potenciálu buňky. Například snížená rychlost tvorby ionizujícím zářením indukovaných  $\gamma$ H2AX ohnisek a reparačního komplexu DSB je pozorována u buněk z tkání starších jedinců, obzvláště pomalu tento proces probíhá v buňkách pacientů s Wernerovým syndromem (Sedelnikova et al. 2008).

### **3.2.5. Fosforylace histonu H2AX v buněčných procesech nezávislých na exogenním genotoxickém stresu**

H2AX (-/-) null myši (myši, jež ztratily na obou alelách chromosomu gen kódující histon H2AX) jsou neschopny provést isotypový přesmyk (class switch recombination), což vede k primární imunodeficienci. Myši mají také nižší počet lymfocytů, které prodělaly V(D)J rekombinaci (Celeste et al. 2002).

V průběhu meiózy dochází k výměně nukleotidových sekvencí mezi homologními chromosomy. Vznik křížových vazeb mezi nesesterskými chromatidami podmiňuje správné rozdělení chromosomových párů při prvním meiotickém dělení. Meióza je charakterizována tvorbou DSB katalyzovaných proteinem SPO11 (meióza specifický protein SPO11), který spouští iniciaci homologní rekombinace (Li a Ma 2006). Během homologní rekombinace fáze meiózy I jsou v chromatinu buňky proteinem SPO11 indukovaná DSB, jež vedou k tvorbě ohnisek  $\gamma$ H2AX. Ohniska  $\gamma$ H2AX následně zmizí v době, kdy se homologní chromatidy spárují v pozdní pachytenní fázi (3. fáze profáze I. meiotického dělení). Funkční gen kódující

histon H2AX je důležitý pro správný průběh meiózy (Celeste et al. 2002).

Telomery jsou specializované nukleoproteinové struktury na konci eukaryotických chromosomů. Jejich integrita a funkce jsou rozhodujícími faktory pro délku života eukaryotických buněk. Telomery zajišťují stabilitu chromosomů, a tím i celého genomu buňky. Vlastní telomerická DNA se sestává u savců z tandemových opakování (5'-TTAGGG-3')<sub>n</sub>. Jelikož běžné DNA polymerasy nedovedou dokončit syntézu opožďujícího se vlákna, je při každé replikaci DNA ztraceno přibližně kolem 50 – 200 bp telomerické sekvence, a telomery se tak postupně zkracují (de Lange 2004). Finální stádium eroze telomer, které doprovází dělení somatických buněk (buňky s telomerami, které jsou dlouhé přibližně 10-12 kb jsou schopny dělení 50-60 krát), působí jako DSB a aktivuje celou DNA damage response (DDR) včetně fosforylace histonu H2AX (Takai et al. 2003). Tento mechanismus může vyústit k indukci apoptózy (Karlseder et al. 1999), nebo aktivaci replikační senescence (van Steensel et al. 1998).

Nežádoucí DSB mohou vzniknout v průběhu replikace nebo transkripce, kdy jsou jednovláknové zlomy (SSB) konvertovány na DSB. SSB genomové DNA jsou produkovány širokou škálou exogenních a endogenních agens jako je záření, ROS, genotoxická agens, defektní proces reparace DNA (Pommier et al. 2006).

Fosforylace histonu H2AX byla pozorována také v průběhu virové infekce buněk. Jedná se pravděpodobně o mechanismus přímé interakce viru s DNA, nebo o proces atakující metabolismus DNA hostitelské buňky virovými onkoproteiny. Virová infekce způsobí leze DNA v hostitelské buňce za aktivace buněčných molekulárních mechanismů odpovědí na poškození DNA (Daniel et al. 2004, Xie a Scully 2007). Myší  $\gamma$ -herpesvirus 68 ( $\gamma$ HV68) rovněž aktivně indukuje fosforylaci histonu H2AX pomocí exprese virové kinasy orf36. Tento děj pravděpodobně hraje aktivní roli důležitou pro replikaci genomu tohoto viru v hostitelské buňce (Tarakanova et al. 2007).

Malé množství DSB-indukovaných  $\gamma$ H2AX je v buňce normálně přítomno jako následek fyziologických a metabolických procesu buňky. V žijících buňkách je DNA podrobena neustálému působení reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou produkovány uvnitř buňky jako nežádoucí následek jejího metabolismu. Je odhadováno, že během jednoho buněčného cyklu vznikne na 5000 SSB následkem působení ROS. Přibližně 1 % těchto zlomů je transformováno do DSB především během replikace. Zbytek SSB je opraveno. Takto vznikne během buněčného cyklu v jednom buněčném jádře okolo 50 endogenních DSB, které (pokud nejsou plně opraveny) přispívají ke stárnutí buňky nebo mohou vyvolat neoplastickou transformaci (Vilenchik et al. 2003).

### 3.2.6. Role H2AX v opravě DSB DNA

H2AX je multifaktoriální hráč v molekulární odpovědi buněk na poškození DNA. Fosforylace H2AX vytváří zóny na okraji DSB usnadňující koncentraci DNA reparačních a signalizačních proteinů, které se nevyhnutelně podílí na rekonstrukci poškozené DNA a/nebo dočasné zástavě buněčného cyklu (Bonner et al. 2008). Histon  $\gamma$ H2AX rekrutuje do okolí DSB proteiny kohesiny, které se účastní opravy DNA závislé na neporušených sesterských chromatidách, jež jsou využity jako templáty pro obnovu (Unal et al. 2004). Histon  $\gamma$ H2AX rovněž brání disociaci zlomených konců DNA po vzniku DSB (Bassing et al. 2004). Ionizujícím zářením indukované dvouvláknové zlomy DNA jsou rozpoznány reparačním komplexem MRN. Reparační komplex MRN se skládá z proteinů Mre11, Rad50 a NBS1. Aktivovaná kinasa ATM fosforyluje H2AX na serinu 139 (Rogakou et al. 1998). První takto vznikající molekuly  $\gamma$ H2AX dále udržují ATM v okolí DSB, a tak dojde k další amplifikaci signálu odpovědi na poškození DNA. Tvorba  $\gamma$ H2AX figuruje jako děj, který spouští v časové posloupnosti přísně regulovaný vznik reparačních proteinů BRCA1, 53BP1, MDC1, Rad51 v okolí DSB (Huen et al. 2010). Histon  $\gamma$ H2AX se účastní mobilizace BRCA1 v odpovědi na poškození DNA. Některé práce naopak svědčí o možné  $\gamma$ H2AX nezávislé akumulaci BRCA1, která je pozorována u buněk H2AX (-/-) null, pravděpodobně pochodem asociovaným s MRN komplexem (Greenberg 2008, Yuan a Chen 2010). Komplex remodelace chromatinu Tip 60-UBC13, který se rovněž účastní v opravě DNA, je rekrutován do okolí DSB pomocí  $\gamma$ H2AX, což zároveň umožní  $\gamma$ H2AX acetylaci a ubiquitinaci v pochodu jeho defosforylace či reparačního odstranění z okolí DSB (Ikura et al. 2007). Mimo serinu 139, H2AX C-koncový tyrosinový zbytek 142 (Tyr142) může být rovněž fosforylován pomocí WSTF tyrosinkinasy (Cook et al. 2009, Xiao et al. 2009). Fosforylace Tyr142 zbytku reguluje tvorbu  $\gamma$ H2AX. Tato fosforylace je konstitutivní ve zcela zdravých buňkách. Po poškození DNA dojde k defosforylaci fosfoTyr142 pomocí EYA1 nebo EYA 3 fosfatasy, což je důležité pro vznik  $\gamma$ H2AX, následovanou akumulací s MDC1 a procesem reparace poškozené DNA. Avšak pokud během buněčné odpovědi na genotoxický stres nedojde k defosforylaci fosfoTyr142, buněčná odpověď cesty reparace přejde na molekulární cestu signalizace směřující k apoptóze (Cook et al. 2009). MDC1 pracuje ve velice úzké souvislosti s  $\gamma$ H2AX a má nezastupitelnou roli pro vznik  $\gamma$ H2AX foci. V odpovědi na DSB, MDC1 přímo váže  $\gamma$ H2AX přes svojí BRCT doménu (Stucki et al. 2005). Fosforylace specifických repetitivních úseků v N terminální doméně MDC1 pomocí kasein kinas hraje roli v atrakci proteinu NBS1 a společně se pak

podílí na tvorbě komplexu s ATM kinasou a následné regulaci zástavy buněčného cyklu (Wu et al. 2008).

### 3.2.7. $\gamma$ H2AX - indikátor genotoxického stresu

Stanovení fosforylovaného histonu H2AX je možné využít jako indikátoru přítomnosti DSB v DNA buňky. Počet molekul fosforylovaného histonu H2AX odpovídá počtu DSB, jedná se tedy o znak, který nám poskytne obraz jak kvalitativní (přítomnost nebo nepřítomnost DSB), tak kvantitativní (rozsah DSB v genomu buňky). Amplifikace signálu, kdy vznik jednoho DSB vede k fosforylaci přibližně stovek až tisíců molekul H2AX, umožňuje velmi citlivě stanovit rozsah vzniku DSB v DNA eukaryotní buňky (Rothkamm et al. 2003).

Ke vzniku DSB dochází také v průběhu apoptózy. Jedním z hlavních znaků apoptózy je fragmentace DNA. Ke štěpení dochází v internukleosomálních sekvencích působením nukleas. Dodnes bylo identifikováno několik nukleas zprostředkovávajících fragmentaci DNA, nejlépe popsána je tzv. kaspasami aktivovaná DNasa I, DNasa-II a endonukleasa G. Fosforylaci H2AX objevující se během apoptózy lze pozorovat ve stejné době, kdy se začínají tvořit vysokomolekulární fragmenty DNA, ale před fází spojenou s tvorbou internukleosomálních fragmentů (Rogakou et al. 2000). K tvorbě  $\gamma$ H2AX v průběhu apoptózy dochází primárně prostřednictvím DNA-PK a c-Jun N-terminální kinasy (JNK) kinasy (Lu et al. 2006; Mukherjee et al. 2006; Sluss a Davis 2006). Během apoptózy je fosforylace H2AX obvykle značně masivní, v jádře vykazující pan-nukleární charakteristiku (Solier et al. 2009). Mimo fosforylace serinu 139 hraje roli v procesu apoptózy fosforylace a defosforylace i jiných C-terminálních koncových aminokyselin histonu H2AX. Jedná se například o tyrosin 142 (Cook et al. 2009). Fosforylace H2AX na tyrosinu 142 je generována WSTF tyrosinkinase, je konstitutivní a defosforylace pomocí EYA1/3 fosfatasy se objevuje po poškození DNA. Tyrosin 142 defosforylace je nutná pro správný průběh opravy DNA, vznik  $\gamma$ H2AX a vazbu adaptorové molekuly MDC1 (Stucki 2009).

Zvýšené množství  $\gamma$ H2AX foci je přítomno v celé škále lidských nádorových buněčných linií. Jedná se např. o rakovinné buňky odvozené z karcinomu děložního hrdla, melanomu, kolorektálního karcinomu, fibrosarkomu, osteosarkomu, gliomu, neuroblastomu. Vyšší hodnoty  $\gamma$ H2AX foci byly zjištěny i u nádorů *in vivo* odebraných pomocí biopsie ve srovnání se zdravými buňkami přilehlé tkáně (Banath et al. 2004, Warters et al. 2005, Martin

a Bonner 2006, Yu et al. 2006). Tyto výsledky potvrzují, že zvýšený stupeň poškození DNA je charakteristický pro rozvoj a následný průběh maligního onemocnění (Bartkova et al. 2005). Zvýšená tvorba  $\gamma$ H2AX foci byla rovněž nalezena u kolonocytů odebraných od pacientů trpících ulcerózní kolitidou, která je dnes pokládána za prekancerosu (Risques et al. 2008). Poškozené telomery jsou odpovědné za valnou část endogenně vzniklých DSB, což má přímou souvislost s nádory vznikajícími na podkladě jistého stupně dysfunkce telomer (Nakamura et al. 2009).

Stav charakterizovaný vyčerpáním proliferačního potenciálu primárních somatických buněk a buněčných linií z nich získaných je znám pod pojmem buněčná senescence. Poprvé byl tento jev popsán u normálních fibroblastů (Hayflick 1965) a byl označen jako replikační senescence. Druhým způsobem vzniku senescence je tzv. onkogeny vyvolaná senescence, spojená s vlivem genotoxických látek. Senescence je často spojována s kmenovými buňkami získanými ze starých dárců, kdy buňky plní některé svoje funkce v organismu, ale nejsou schopny se dále dělit. Faktory hrající důležitou roli v rozvoji buněčné senescence v důsledku stárnutí zahrnují postupné zkracování telomer během opakující se replikace, akumulaci poškození DNA, či porušení nebo snížení DNA reparačního potenciálu buňky (Reddel 2010, Zhao et al. 2009). Vzestup  $\gamma$ H2AX foci byl pozorován u buněk, které přešly do senescence následkem vyčerpání své proliferační kapacity – tzv. replikační senescence. Zvýšená tvorba  $\gamma$ H2AX byla pozorována rovněž u buněk senescentních pod vlivem DNA-poškozujících látek, oxidačního stresu apod., tzv. stresem indukovaná předčasná senescence (Nakamura et al. 2008).

Stanovení fosforylovaného histonu H2AX se dá bezesporu využít k monitorování průběhu a účinnosti chemoterapie a/nebo radioterapie. Většina léčebných postupů zaměřených na potlačení nádorového bujení je spojena s přímou, nebo nepřímou tvorbou DSB, a to ne jen v DNA buněk leukemických, nebo nádorových tak, jak by bylo primárně žádoucí (Bonner et al. 2008). Stanovení tvorby  $\gamma$ H2AX ve vhodném biologickém vzorku může poskytnout klinicky cenné informace o individuální odpovědi pacienta na léčbu. Na základě těchto výsledků může být terapie individualizována, a tak lze dojít k potlačení nežádoucích vedlejších účinků radioterapie či chemoterapie u konkrétního pacienta (Fong et al. 2009). Je potřeba zdůraznit, že aplikace stanovení  $\gamma$ H2AX v buňkách exponovaných genotoxickému stresu *in vivo* jsou dnes stále ve fázi vývoje, jelikož korelace získaných dat a následná interpretace výsledku ve vztahu k odpovědi organismu je nelehká. V nedávné minulosti však byly již provedeny první úspěšné pokusy v rámci studie I fáze klinického zkoušení za přispění detekce  $\gamma$ H2AX. Jednalo se o studii vlivu kombinace klofarabinu

(inhibitor ribonukleotid-reduktasy a DNA polymerasy) a cyklofosfamidu (oxazafosforinový derivát s alkylačním mechanismem účinku) na refrakterní akutní myeloidní leukemii. Za použití této kombinační terapie byl pozorován vzestup tvorby  $\gamma$ H2AX v leukemických buňkách u 12 z 13 pacientů, což se později v kontextu s dalšími vyšetřeními projevilo jako pozitivní odpověď na terapii (Karp et al. 2007).

### 3.3. Buněčný cyklus

Buněčný cyklus eukaryotní buňky je tradičně rozdělován do čtyř fází. První tři fáze buněčného cyklu ukončuje mitóza, tzn. dělení jádra následované procesem cytokineze, souhrnně nazývaná jako M fáze. Doba mezi dvěma M fázemi je nazývaná interfáze. Interfáze je rozdělována do tří fází buněčného cyklu - G1, S a G2. G1 fáze (gap 1) je období mezi koncem M fáze a začátkem S fáze. Je to období, kdy nedochází k syntéze žádné DNA, avšak probíhá syntéza RNA a proteinů. G1 je obvykle nejdelší fází cyklu, ale její délka značně závisí na typu buňky. U rychle dělících se buněk jako jsou buňky leukemických linií je G1 fáze poměrně krátká. Buňky, které dosáhly plné diferenciaci, mohou vystoupit z cyklu z G1 fáze do fáze klidové (quiescentní), označované jako G0. Buňky v G0 fázi buněčného cyklu v těle neproliferují, ale soustřeďují se na výkon specializovaných funkcí v rámci organismu. Buňky ve fázi G0, které již nejsou schopné návratu do buněčného cyklu, se nazývají terminálně diferencované. Jiné buňky v G0 fázi se mohou do cyklu vrátit pod vlivem stimulace okolními mitogenními růstovými faktory nebo cytokiny. Dále rozlišujeme S fázi, neboli syntetickou fázi. Buňka zcela replikuje svoji jadernou DNA, což je základní předpoklad pro buněčné dělení. Během tohoto stádia se také často duplikují centrioly. G2 fáze (gap 2) je stádium mezi koncem S fáze a začátkem M fáze. Během této fáze nastávají konečné přípravy na buněčné dělení, syntéza tubulinu pro mitotický aparát a akumulace dostatečných zásob ATP pro průběh mitózy. Během vlastní mitózy jsou syntetické pochody utlumeny (Alberts et al. 1994).

#### 3.3.1. Zástava buněčného cyklu

Savčí buňka disponuje různorodými mechanismy k udržení genetické integrity po působení genotoxických agens. Tyto mechanismy jsou často primárně závislé na dočasné zástavě buněčného cyklu v G1, S a G2/M kontrolních bodech. Zástava proliferace poskytne

nezbytný čas k opravě poškozené DNA, zabrání přenesení poškozené genetické informace do buněk dceřiných, jež by mohlo mít za následek rozvoj nádorového bujení.

Buněčný cyklus je kontrolován především pomocí komplexu regulačních serin/threonin specifických proteinkinás (cyklin-dependentní kinasy Cdk) a cyklinu. Cdk jsou enzymy kinasy, které fosforylují serin a threonin na jiných proteinech, a tím je zpravidla aktivují. Cdk jsou aktivní pouze v případě, když jsou navázány na určité cykliny za vytváření komplexu Cdk-cyklin (cyklin dependentní – cyklin závislé). Pro cykliny je charakteristické, že jsou druhově exprimovány v závislosti na fázi buněčného cyklu. Podílejí se na činnostech, které jsou rozhodující pro průběh resp. zástavu buněčného cyklu (Jeffrey et al. 1995). Během plynulého cyklu zůstávají intracelulární koncentrace Cdk konstantní. Naproti tomu koncentrace cyklinu vždy cyklicky vzrůstá a klesá mezi mitózami kontinuálně se dělících buněk. Aby bylo možné projít jednotlivými kontrolními body cyklu, musí být k dispozici dostatek komplexů Cdk-cyklin. Kontrolovaný průběh buněčného cyklu je důležitý pro udržení buněčné homeostázy. Regulační systém buňky je závislý na dvou hlavních kontrolních bodech, G1/S a G2/M. Kontrolní bod G1 kontroluje vstup do S fáze. Zahájení syntézy DNA (vstup do S fáze) vyžaduje cykliny typu D (D1, D2 a D3) a cyklin E. Cykliny typu D tvoří komplexy s Cdk4 a Cdk6 a aktivují je. Vazebný protějšek pro cyklin E je Cdk2. Je třeba doplnit, že cyklin E je tvořen zejména v pozdní G1 fázi. Průchod buněk S fází je závislý na formaci komplexu Cdk2/cyklin A. Průchod G1/S restričním bodem je důležitý z pohledu iniciace buněčného dělení. Proces je aktivován vytvořením komplexu Cdk4 a cyklinu D (později v průběhu cyklu také Cdk2-cyklin E), který hyperfosforylací proteinu pRb (produkt genu retinoblastoma) uvolní transkripční faktor E2F, který byl předtím vázán k pRb (Knudsen et al. 1997; Resnitzky et al. 1995). E2F aktivuje transkripci genů potřebných pro replikaci DNA. Zvýšená exprese genu pro protein pRb působí zástavu buněk v G1 fázi (Goodrich et al. 1991), zatímco mutace tohoto genu způsobí neschopnost aktivace G1 kontrolního bodu (Qin et al. 1992).

Progrese kontrolním bodem G2/M je pod regulací komplexu Cdk1 (starší název cdc2) a cyklinu B. Pokud se během průchodu těmito kontrolními body nevyskytne nějaký problém (např. poškození DNA, nedostatek živin), členové komplexů Cdk-cyklin jsou aktivováni fosforylací, nebo defosforylací. Aktivovaný komplex obratem fosforyluje různé transkripční faktory, které ve finále vedou k syntéze proteinů (enzymy, komponenty cytoskeletu, další Cdk a cykliny) nutných pro zdařilý průběh celého buněčného cyklu. Aktivita komplexu Cdk-cyklin je následně ukončena proteolytickou degradací.

V současnosti je popsáno několik mechanismů, které regulují aktivitu komplexu



Cdk/cyklin v průběhu buněčného cyklu. Prvním mechanismem je regulace exprese, kdy například exprese cyklinu typu D je regulována přítomností, nebo absencí mitogenních růstových faktorů (Matsushime et al. 1991). Za druhé, v opaku k regulaci syntézy cyklinů, existuje aktivní regulace jejich degradace pomocí označení cyklinu ubiquitinem a následné degradace v proteasomu (Peters 1998). Cdk/cyklin komplex musí být aktivován Cdk – aktivační kinasou, která fosforyluje Thr zbytek na molekule Cdk (Fisher et al. 1994). Naopak některé aminokyselinové zbytky v molekule Cdk musí být defosforylovány. Tento proces je zajišťován jednak inhibicí určitých kinas (Wee1/Myt1) a aktivací fosfatas (známé jako Cdc25 A, B a C). Konečně, aktivita komplexu Cdk/cyklin je kontrolována dalšími protein-protein interakcemi mezi Cdk, komplexy Cdk/cyklin a proteiny známými jako inhibitory cyklin/Cdk (CKIs) (Morgan 1995). CKIs se rozdělují na dvě skupiny, jedna skupina zahrnuje členy rodiny Cip/Kip: p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup>, a p57<sup>KIP2</sup>, jenž se jeví jako universální inhibitory aktivity komplexu Cdk/cyklin. Druhou skupinu tvoří inhibiční proteiny rodiny Ink4: p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, a p19<sup>INK4d</sup>. Tyto čtyři proteiny inhibují cyklin D asociované komplexy s Cdk4 a Cdk6. CKIs mohou být rovněž regulovány. Například p21<sup>WAF1/CIP1</sup> byl identifikován na podkladě toho, že protein p53 může indukovat jeho expresi (El-Deiry et al. 1993, Vávrová a Řezáčová, 2011). Z tohoto důvodu je dnes považován za jeden z efektorů p53 – zprostředkované zástavy buněčného cyklu po působení genotoxického agens (El-Deiry et al. 1994).

### 3.3.2. Checkpoint kinasy 1 a 2

Centrálními komponentami důležitými pro zástavu buněčného cyklu po působení genotoxických agens jsou již zmíněné ATM a ATR proteinkinasy. Gen kódující protein ATM je inaktivován u autosomálně recesivní nemoci Ataxia telangiectasia (A-T) (Savitsky et al. 1995). Buňky odvozené od pacientů trpících A-T jsou defektní v iniciaci G1, S a G2 zástavy buněčného cyklu po působení ionizujícího záření (Kastan et al. 1992; Paules et al. 1995). K důležitým substrátům ATM a ATR proteinkinasy patří checkpoint kinasy.

Checkpoint kinasy 1 a 2 (Chk1 a Chk2) jsou serin/threoninové kinasy fosforylované ATM a ATR proteinkinasy v odpovědi na genomové poškození. Jejich aktivace pomocí fosforylace vede k potlačení funkce fosfatas rodiny Cdc25.

Chk1 je po poškození DNA fosforylována preferenčně ATR kinasou v odpovědi na RPA-povlečenou ssDNA. Chk1 kontroluje zejména intra-S a G2/M kontrolní bod buněčného

cyklu přes regulaci množství Cdc25 fosfatas. Klíčové komponenty patří do rodiny Cdc25 fosfatas. Tři Cdc25 proteiny- Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C odstraňují inhibiční fosfátové skupiny z Cdk. Aktivovaná Chk1 inhibuje Cdc25 fosfatasy a jejich inhibice je doprovázená degradací. Fosforylace a aktivace Chk1 vyžaduje interakci vazebného partnera nazývaného Claspin, který zprostředkovává interakci ATR a Chk1. Po expozici UV záření ATR fosforyluje Chk1 na Ser317 a Ser345 regulatorní domény lokalizované na C-konci Chk1 (Liu et al. 2000). Fosforylace Chk1 na Ser345 se jeví jako konstitutivní, důležitá pro funkci Chk1. Mutace genu pro protein Chk1 vedoucí k záměně Ser345 za Ala345 nejsou slučitelné s životem buňky (Wilsker et al. 2008). Studie na mutantech proteinu **Chk1** odhalily **esenciální roli této kinasy** v růstu a běžném fungování buňky. Fosforylace Chk1 hraje roli v její subcelulární lokalizaci. V nestresovaných buňkách větší pool proteinu Chk1 zůstává vázán k chromatinu. K uvolnění dojde po fosforylaci Ser317 a Ser345 ATR kinasou (Smits et al. 2006).

Další homolog, Chk2, je aktivovaná posttranslačními modifikacemi pomocí fosforylace především ATM kinasou indukovanou DSB vznikajícími po působení genotoxických agens (Stracker et al. 2009). Je známo mnoho míst fosforylace Chk2, nejprozkoumanější je Thr68. V zástavě buněčného cyklu se uplatňuje inhibice funkce fosfatasy Cdc25C (ale i dalších fosfatas rodiny Cdc25) pomocí její fosforylace. Cdc25C může být fosforylována na několika místech, na Ser216 (Forkhead-associated domény-FHA) nebo na Thr48, Thr67, Thr130, Ser 122 a Ser214 na N-konci (SCD domény) (Matsuoka et al. 1998, Bonnet et al. 2008). Serin 216, jenž se jeví jako hlavní regulační místo, je fosforylován především Chk2, ale samozřejmě i Chk1. Zatímco fosforylace Ser216 aktivitu fosfatasy snižuje, N-terminální fosforylace aktivitu zvyšují. Serin 216 fosfatasy Cdc25C je regulační místo, které po fosforylaci určuje lokalizaci proteinu v buňce. Vazba Cdc25C na 14-3-3 vede k aktivnímu exportu fosfatasy z jádra, resp. inhibici importu do jádra (Kumagai et al. 1998), dále vede k její degradaci v cytoplasmě za potlačení defosforylace a aktivace Cdk1 (Weinert 1997).

### **3.4. Poškozením DNA indukovaná apoptóza**

Poškozením jaderné DNA je přednostně aktivovaná vnitřní, neboli mitochondriální cesta apoptózy. Celá řada faktorů nezávislých na receptorech smrti může spustit apoptózu vnitřní cestou, např. ionizující záření, UV záření, cytostatika, reaktivní formy kyslíku a

dusíku, viry, bakterie, změny metabolismu. Tedy všechny faktory působící na buňku potenciálně genotoxicky. Indukce apoptózy v důsledku ozáření buněk byla *in vitro* potvrzena v řadě studií, byl prokázán dávkově závislý nárůst apoptotické frakce buněk u různých typů buněčných linií (Vávrová et al. 2001, 2004, Mareková et al. 2003a, b) i lidských periferních lymfocytů (Vilasová et al. 2008).

Faktory zejména jako ionizující záření, UV záření, cytostatika, ROS musí samozřejmě působit v přiměřené dávce, jinak dojde upřednostnění buněčné nekrózy. Nekróza v kontrastu s apoptózou je označována jako nekontrolovaný, pasivní proces, na ATP nezávislý (Kaufmann et al. 2000).

Vnitřní a vnější (receptorová) cesty aktivace apoptózy se do jisté míry překrývají. To platí zejména pro děje v nižších patrech signální kaskády, jde o aktivaci prokaspasy-3 na aktivní kaspasu-3. Aktivní kaspasa-3 představuje hlavní exekuční kaspasu zodpovědnou za vlastní apoptotický proces. Kaspasy představují početnou rodinu (12 lidských) cysteinových proteas. V buňce se vyskytují jako zymogeny, které po své aktivaci za částečné proteolýzy na specifických aspartátových reziduích štěpí další strukturní a funkční proteiny buňky. Více než 500 proteinů buňky je podrobena různě rozsáhlému štěpení kaspasami během probíhající apoptózy (Fischer et al. 2003). Kaspasy se dělí podle funkce na kaspasy iniciátorové (kaspasa-2, -8, -9, -10) a kaspasy exekuční (kaspasa -3, -6, -7). Iniciátorovou kaspasou vnitřní cesty je kaspasa-9, exekučními kaspasami především kaspasa-3 a -6. Rozštěpení specifických substrátů exekučními kaspasami přispívá k charakteristickým morfologickým znakům apoptózy (Budihardjo et al. 1999). Jedná se o štěpení molekuly jaderné DNA, s následnou fragmentací jádra, degradací jaderných a cytoskeletárních proteinů a vytvořením apoptotických tělísek.

Například kaspasa-3 štěpí inhibitor nukleas ICAD (inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease), což umožní následné štěpení DNA v internukleosomálních sekvencích konstitutivně exprimovaným jaderným enzymem CAD (caspase-activated DNase) (Enari et al. 1998). Navíc kaspasa-3 aktivuje mnoho proteinkinás odštěpením jejich inhibičních domén za vzrůstu jejich aktivity (Earnshaw et al. 1999). Takto aktivovaná proteinkinasa C $\delta$  aktivuje PLSCR (phospholipid scramblase), která katalyzuje transfer fosfatidylserinu na povrch plazmatické membrány (Frasch et al. 2000).

V plazmatické membráně živých nepoškozených buněk jsou fosfolipidy asymetricky rozmístěny mezi vnějším a vnitřním povrchem lipidové dvojvrstvy. Cholin obsahující fosfolipidy - fosfatidylcholin a sfingomyelin, jsou lokalizovány na povrchu lipidové dvojvrstvy, tj. orientovány do mimobuněčného prostoru. Fosfatidylserin, fosfatidylinositol a

fosfatidylethanolamin jsou lokalizovány uvnitř, tj. směrem do cytosolu (Schroit et al. 1991). Externalizace fosfatidylserinu na povrchu plazmatické membrány je považována za znak časně apoptózy (Fadok et al. 1992). Přesun fosfatidylserinu na vnější stranu buněčné membrány úzce souvisí s ději podílejícími se na odstraňování buněk apoptotických, přestárných a senescentních *in vivo* činností monocyto-makrofágového systému (Chancerelle et al. 1994). Stanovení fosfatidylserinu je možno použít k detekci indukce apoptózy pomocí vazby Annexinu V (Andree et al. 1990).

Vnitřní cesta apoptózy je aktivovaná fosforylací proteinu p53 a vzestupem proapoptotických členů rodiny Bcl-2. Tumor supresor p53 hraje klíčovou roli v regulaci proteinů rodiny Bcl-2, avšak celý mechanismus této regulace dosud není jednoznačně objasněn. Rodina proteinů Bcl-2 kontroluje permeabilitu mitochondriální membrány, bylo identifikováno více jak 20 členů a dělí se do tří skupin na základě funkčních a strukturních kritérií. Skupinu I představují antiapoptotické Bcl-2-like faktory přežití: Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Boo/Diva, Nrf3, a Bcl-B. Všeobecně obsahují 4 krátké BH domény: BH1-BH4, a většina obsahuje C-koncovou transmembránovou doménu, která je zaměřuje na cytoplasmatický povrch rozličných intracelulárních membrán včetně mitochondrií a endoplazmatického retikula. Skupina II zahrnuje proapoptotické Bax-like faktory smrti: Bax, Bak, a Bok/Mtd, které postrádají N-koncovou doménu BH4, ale obsahují ostatní BH domény. Skupinu III tvoří proapoptotické BH3-onlies, mají jen doménu BH3: Bid, Bad, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa, Puma, a Bcl-G.

Současné poznatky naznačují, že členové skupiny II, rodiny Bcl-2, především Bax a Bak přímo zprostředkovávají uvolnění cytochromu c z intermembránového prostoru mitochondrií, a tak spouštějí efektorovou fázi apoptózy (Cory et al. 2003). Bax se za běžných okolností nachází v cytoplasmě nebo slabě navázán na povrchu mitochondrií zdravých buněk (Wolter et al. 1997). Po expozici buněk apoptotickým stimulům dojde k jeho vmezeření do vnější mitochondriální membrány na cytosolové straně mitochondrií. Bak, který je za fyziologických podmínek lokalizován na vnější mitochondriální membráně, je podroben konformačním změnám, jež vedou k jeho zanoření do vnější cytosolové mitochondriální membrány (Griffiths et al. 1999).

Zanoření Bax a Bak do vnější mitochondriální membrány je regulováno III skupinou proteinů rodiny Bcl-2, BH3-onlies (Kuwana et al. 2005). Polypeptidy III skupiny Bcl-2 působí jako kontroloři apoptotické signalizace a detekují rozdílné typy stresu, na které adekvátně reagují. Například Noxa a Puma jsou syntetizovány v p53-závislém směru v odpovědi na poškození DNA genotoxickým stresem (Oda et al. 2000). Overexprese genu

pro Puma *in vitro* je doprovázená zvýšenou expresí Bax následovanou uvolněním cytochromu c z mitochondrií a snížením mitochondriálního potenciálu (Liu et al. 2003). Naopak Noxa se na mitochondriální membráně lokalizuje s antiapoptotickými členy rodiny Bcl-2, dojde k zábraně jejich funkce, což potenciálně výústí až v aktivaci kaspasy-9 (Oda et al. 2000).

Aktivita polypeptidů III skupiny rodiny Bcl-2 je inhibována vazbou s polypeptidy skupiny I rodiny Bcl-2, čímž dojde potenciálně k inhibici uvolnění cytochromu c (a dalších apoptotických faktorů) z mitochondrií (Yang et al. 1997). Členové skupiny I, Bcl-x<sub>L</sub> a Bcl-w se váží ke všem testovaným polypeptidům BH3-onlies, vyjímaje Noxa, již od nanomolárních koncentrací. Ostatní členové jako Mcl-1 a A1 vážou Puma, Noxa, Bim s ještě vyšší afinitou (Cuconati et al. 2003).

Expese a aktivita členů skupiny I je přísně regulována. Antiapoptotické Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> a Mcl-1 jsou aktivovány mitogeny-aktivovanými protein (MAP) kinasami (Milella et al. 2001). Navíc aktivita skupiny I je regulována posttranslační modifikací pomocí fosforylace. Bcl-2 je fosforylován na Ser70 pomocí ERK (extracellular signal-regulated kinase) (Deng et al. 2000), a dalších skupinách (Deng et al. 2004). Podobně ERK-závisle je fosforylován a stabilizován i Mcl-1 ze III skupiny (Domina et al. 2000). Tyto výsledky poskytují alespoň částečné vysvětlení pro antiapoptotický efekt aktivace MAP kinas (Dent et al. 2001).

Proapoptotické a antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2 se setkávají na povrchu mitochondrií, kde regulují uvolnění cytochromu c. Shrňme nyní, jak se navzájem ovlivňují jednotliví členové rodiny Bcl-2. Skupina II členů rodiny Bcl-2 se vyznačuje přímou apoptotickou funkcí. Vmezeření Bax a/a nebo Bak do vnější mitochondriální membrány je přímo zodpovědné za uvolnění cytochromu c a dalších proapoptotických polypeptidů z intermembránového prostoru mitochondrií. První podskupina členů skupiny III BH3-onlies-Bim a Bid je zodpovědná za konformační a zároveň aktivační změny II skupiny členů rodiny Bcl-2 (Bax a Bak) vedoucí k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány. Druhá skupina BH3-onlies polypeptidů zahrnující Puma, Bmf a Bad ovlivňují Bax a/a nebo Bak-indukovanou permeabilizaci vnější mitochondriální membrány nepřímo tím, že neutralizují funkci antiapoptických členů rodiny Bcl-2 (Chen et al. 2005). Dále člen III. skupiny-Bad je schopný tvořit heterodimery s Bcl-2 a Bcl-x<sub>L</sub>, a tak neutralizovat jejich protektivní efekt a následně vyvolávat buněčnou smrt (Yang et al. 1995).

Cytochrom c spolu s Apaf-1 za aktivace prokaspasy-9 na kaspasu-9 vytváří komplex nazývaný apoptosom. Kaspasa-9 aktivuje exekuční kaspasy (především kaspasu-3) a dojde k vlastnímu apoptotickému procesu (Hill et al. 2004). V průběhu apoptózy jsou z mitochondrií uvolňovány tucty dalších proteinů (Ekert et al. 2005). Jmenujme zde Smac/

DIABLO (direct IAP-binding protein with low pI), Omi/ HtRA2, AIF (apoptosis-inducing factor), endonukleasu G a CAD (caspase-activated DNase). Smac/DIABLO a Omi/ HtRA2 figurují jako antagonisté inhibitorů apoptózy IAP (IAP1 a IAP2), jejichž funkcí je inhibice aktivovaných kaspas (Verhagen et al. 2000). Endonukleasa G způsobuje CAD-nezávislé štěpení DNA v internukleosomálních sekvencích. Deoxyribonukleová kyselina je nejčastěji štěpená v místě navázání chromatinové smyčky na nukleární matrix, což vede k vzniku oligonukleosomálních fragmentů (Li et al. 2001). Ke štěpení DNA na fragmenty o velikosti 300-50 kb dále přispívá translokace AIF do jádra (Joza et al. 2001). AIF a endonukleasa G fungují na kaspasách nezávisle. Dalším mitochondriálním faktorem štěpícím DNA na oligonukleosomální fragmenty je kaspasou-3 aktivovaná CAD (Enari et al. 1998). Na štěpení DNA se dále podílí  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ -závislé endonukleasy (Bortner et al. 1995).

Nízkomolekulární fragmenty DNA vzniklé v průběhu apoptózy je možné po permeabilizaci buněčné membrány z buňky extrahovat vysokomolekulárním hypotonickým citrát-fosfátovým puforem. Buňky jsou nejprve permeabilizovány vodnými roztoky ethanolu, methanolu, nebo acetonu. Následně dojde k jejich obarvení pomocí fluorochromů specifických k DNA, jako je například propidium jodid. Buňky apoptotické, u kterých došlo k vyplavení malých fragmentů DNA vzniklých následkem štěpení nukleasami, jsou ochuzeny o jisté kvantum DNA, tudíž mají nižší obsah DNA, než buňky ve fázi G1, díky čemuž mají nižší intenzitu fluorescence v porovnání s buňkami ve fázi G1. Apoptotické buňky analyzované na průtokovém cytometru tvoří vrchol, označován jako sub G1, nebo tzv. hypodiploidní peak (Darzynkiewicz et al. 1997).

### **3.5. Stresem indukovaná předčasná senescence**

Alternativním typem (k apoptóze nebo reverzibilní zástavě buněčného cyklu během opravy poškozené DNA) odpovědi některých druhů buněk na genotoxický stres je vstup do stavu stresem indukované senescence (SIS), označované také jako stresem indukovaná předčasná senescence (SIPS). Na vyvolání předčasné senescence u predisponovaných buněk se podílí řada faktorů. Přímé poškození DNA účinkem například ionizujícího záření (vznik DSB), poškození struktury chromatinu, oxidační stres, zvýšená onkogenní aktivita (DiLeonardo et al. 1994). Buněčná senescence se může rozvinout i z jiných příčin než působením genotoxického stresu. Neschopnost DNA polymerasy replikovat v somatických buňkách konce chromozomů (telomery) v podobě opakujících se sekvencí nukleotidů

(TTAGGG u obratlovců) během neustálé probíhajícího dělení buňky vede k rozvoji replikační senescence (Harley et al. 1990). Onkogeny indukovaná buněčná senescence zase představuje alternativní tumor supresorový mechanismus zabraňující propagaci časně neoplastických buněk v organismu (Serrano et al. 1997). Někteří autoři ještě rozlišují léky-indukovanou pseudo-senescenci, tzv. drug-induced pseudo-senescence (DIPS) po působení inhibitorů topoisomerasy II doxorubicinu a daunorubicinu (Mansilla et al. 2003). Senescentní buňky vykazují nezávisle na mechanismu, který senescenci vyvolal, některé charakteristické biochemické a morfologické rysy. Buňky zůstávají živé, metabolicky aktivní po mnoho týdnů, nedělí se, dojde k permanentní a nevratné zástavě buněčného cyklu. Fenotyp senescentních buněk zahrnuje změny v morfologii buňky, buňky jsou větší, dojde k jejich tvarovému zploštění a vzrůstu granularity cytoplasmy. Dochází ke změnám ve struktuře chromatinu, následované změnami ve složení exprimovaných genů, buňky ztrácí schopnost reagovat na mitogenní stimuly, zvýší se biogeneze mitochondrií a lysozomů, vzroste exprese  $\beta$ -galaktosidasy. Detekce aktivity  $\beta$ -galaktosidasy při pH 6 je užívána ke stanovení senescentních buněk (Dimri et al. 1995).

Aktivace SIPS po poškození DNA je doprovázená vzestupem exprese inhibitorů cyklin-dependentních kinas p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>. Cdk inhibitor p21 je důležitým transkripčním cílem proteinu p53 v rámci ATM kinasou-indukované signalizační kaskády. Z důvodu schopnosti interagovat s Cdk po aktivaci p53 je také nazýván jako CIP1 (Cdk interacting protein) nebo WAF1 (wild-type p53 activated factor). Cdk inhibitor p21 přednostně potlačuje aktivitu Cdk2 a Cdk4, což je důležité pro zástavu buněčného cyklu v G1/S kontrolním bodě. Navíc byla popsána role p21 v zástavě buněčného cyklu v G2/M fázi (Niculescu et al. 1998). Suprafyziologické hladiny p21 mohou inhibovat aktivitu komplexu Cdk1/cyklin B *in vitro* (Ball et al. 1996). Cdk1 a cyklin B jsou navíc sekvestrovány v cytoplasmě, což reguluje jejich biodostupnost v jádře. Cyklin B je navázán v blízkosti jaderné membrány na CARB (CIP1-associated regulator of cyclin B1), který kontroluje jeho subcelulární lokalizaci. Protein CARB je zase podřízen regulatornímu vlivu p21 (McShea et al. 2000).

Aktivace buněčné senescence je také doprovázená signifikantním zvýšením hladiny inhibitoru Cdk4 a Cdk6 proteinu p16. Protein p16 je členem signální kaskády p16-Rb protein (Alcorta et al. 1996). Jak je aktivovaná exprese genu kódující p16? Exprese je indukovaná dodnes málo definovanými typy buněčného stresu. Může se jednat o špatně nastavené kultivační podmínky *in vitro*, nebo například oxidační stres (Parrinello et al. 2003). Poškození DNA ve formě DSB, které stimuluje p53-závislou expresi p21, je v drtivé většině případů

doprovázeno expresí p16, avšak s opožděnou kinetikou oproti p21 (Stein et al. 1999). Expresí genu kódujícího p16 je také aktivovaná cestou MAPK a aktivovaným proto-onkogenem Ras u onkogeny indukované senescence. Onkogen Ras vede k akumulaci buněk v G1 fázi buněčného cyklu přes zvýšení hladiny proteinu p16 a p15 aktivací Raf-MEK-ERK signální dráhy (Lin et al. 1998, Malumbres et al. 2000). Je nutné konstatovat, že expresí proteinu p16 představuje ireverzibilní stav senescence buňky.

Centrální komponentou nutnou k udržení trvalé zástavy buněčného cyklu během aktivace buněčné senescence je Rb protein. Fosforylací (hyperfosforylací) proteinu pRb (produkt genu retinoblastoma) dojde k uvolnění transkripčního faktoru E2F, který byl předtím vázán k pRb. E2F aktivuje transkripci genů potřebných pro replikaci DNA (Resnitzky et al. 1995, Knudsen et al. 1997). Naopak nefosforylovaný (hypofosforylovaný), aktivní Rb protein váže E2F faktor, a tím brání jeho vazbě na DNA a funkci. Protein p21 inhibuje různé komplexy cyklin/cyklin-dependentních kinas (Cdk) (cyklin D-Cdk4/6 a Cyklin A, E-Cdk2), zodpovědné za fosforylací pRb, hypofosforylovaný pRb tak zabraňuje uvolnění S fázi-aktivujícího transkripčního faktoru E2F. Jiná rodina Cdk inhibitorů, p15 a p16, specificky inhibují komplexy cyklinů D-Cdks (Cdk4 a Cdk6) (Brehm et al. 1998).

Jak již bylo naznačeno, typickým znakem senescence je neschopnost buněk průchodu buněčným cyklem. Senescentní buňky jsou zastaveny v růstu, neproliferují, a tento stav nelze zvrátit mitogeny. V jaké fázi buněčného cyklu jsou buňky akumulovány? To silně závisí na typu a genetické výbavě buněk, v případě SIPS také na druhu a síle působícího genotoxického agens. Většina senescentních fibroblastů myšího původu se akumuluje v G1 fázi buněčného cyklu (zástava v G1-fázi buněčného cyklu platí zejména pro replikační senescenci), avšak defekt stres-signalní kinasy MKK7 způsobí akumulaci buněk v G2/M fázi (Wada et al. 2004). Nádorové buňky vystavené působení genotoxických agens používaných v protinádorové terapii vstupují do senescence za akumulace v S, nebo G2/M fázi buněčného cyklu (Campisi et al. 2007).

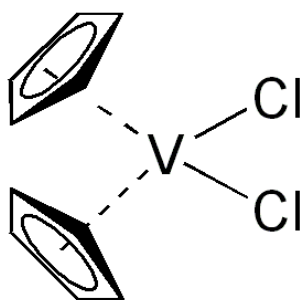
Jedním z prvních a zároveň dnes stále nejčastěji používaným markerem k identifikaci senescentních buněk je stanovení  $\beta$ -galaktosidasy spojené se senescencí (SA- $\beta$ -gal) detekované při pH 6. Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy stanovovaná při pH 6 je specifická jen pro senescentní buňky, nelze ji prokázat u zdravých presenescentních buněk, v buňkách immortalizovaných, klidových, nebo přirozeně diferenciovanych (Dimri et al. 1995). Ačkoliv kyselou lysozomální  $\beta$ -galaktosidasu (EC 3.2.1.23) je možné prokázat v mnoha typech savčích buněk, má pH optimum 4,0-4,5 blízké přirozenému milieu lysozomů, při pH 6 není její aktivita detekovatelná (van der Loo et al. 1998). Na druhou stranu, dodnes není uspokojivě



vysvětleno, zda SA- $\beta$ -gal představuje specifický enzym exprimovaný jen u buněk senescentních, nebo zda jde o tak markantně zvýšenou aktivitu klasické  $\beta$ -galaktosidasy, že jsme schopni detekovat pozitivitu i přes pro tento enzym sub-optimální pH. K detekci SA- $\beta$ -gal se většinou používá chromogenní substrát, detekce se provádí na sklíčku a k fixaci se používá mimo formaldehydu a glutaraldehydu teplo (inkubace s chromogenním substrátem při 37° C přes noc) (Dimri et al. 1995). Nejedná se tedy o nativní preparát. Modernější metodou je stanovení SA- $\beta$ -gal pomocí lipofilního fluorogenního substrátu, který se štěpí aktivitou  $\beta$ -galaktosidasy za vzniku fluoreskujícího produktu neschopného opustit kompartment zrodu. Výhodou této metody je, že detekce se provádí u živých buněk *in situ*, použitím fluoroforu je nezdědka dosaženo i vyšší citlivosti (Debacq-Chainiaux et al. 2009).

### 3.6. Vanadocen dichlorid

Metalloceny je název pro  $\eta$ -cyklopentadienylové komplexy s obecnou strukturou  $(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)_2\text{ML}_2$ , kde M představuje centrální atom kovu a L acidoligand. Vanadocen dichlorid (dichloro-bis( $\eta^5$ -2,4-cyklopentadien-1-yl) vanad; zkratka VDC, obr. 3) je sloučenina ze skupiny metallocenů, konkrétně metallocendihalogenidů skládající se ze dvou cyklopentadienových aromatických kruhů mezi nimiž je koordinován čtyřmocný (+IV) vanad pentahaptickou ( $\eta^5$ -) vazbou. Vanad je zde kovalentně spojen se dvěma chloridovými ligandy. Vanadocen dichlorid a další strukturně podobné metalloceny jsou v dnešní době intenzivně studovány pro potenciální cytostatické a kancerostatické účinky. Cytotoxický efekt vanadocen dichloridu byl prokázán na řadě nádorových buněčných linií (Dong et al. 2000, Ghosh et al. 2000). V předchozí práci prováděné na Ústavu lékařské biochemie LF UK v Hradci Králové byl cytotoxický účinek vanadocen dichloridu potvrzen i u buněčné linie HL-60 s  $\text{IC}_{50} = 150 \pm 30 \mu\text{mol.l}^{-1}$  (Doležalová 2009). Samotný mechanismus cytotoxického účinku vanadocen dichloridu však stále není zcela znám a jednotlivé závěry jsou často protichůdné. V literatuře byla popsána inhibice syntézy DNA působením vanadocen dichloridu (Köpf-Maier 1994), vazba vanadocen dichloridu na proteinkinasu C a topoisomerasu II (Harding et al. 2000), nebo vazba k fosfátové skupině nukleotidů (Yang et al. 1999).



**Obr. 3.** Vanadocen dichlorid

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1. Zvířata

V experimentech na zvířatech byly použity samice potkana kmene Wistar kvality SPF (specific pathogen-free), (Velaz, Česká republika), o hmotnosti 210 – 250 g. Potkani byli chováni v klimatizovaných místnostech s řízenou teplotou a vlhkostí vzduchu. Cykly světla a tmy se pravidelně střídaly vždy po 12 h. Standardní laboratorní dieta byla potkanům dostupná *ad libitum*. Veškeré pokusy prováděné na potkanech byly schváleny Komisí pro laboratorní zvířata FVZ UO v Hradci Králové. Každá experimentální skupina zahrnovala 6-9 zvířat.

### 4.2. Buněčné kultury a kultivační podmínky

Lidské buňky promyelocytární leukemie HL-60 a T-lymfocytární leukemie MOLT-4 byly získány z evropské sbírky buněčných kultur (European collection of animal cell cultures, Velká Británie). Buňky HL-60 a MOLT-4 byly kultivovány v Iskově modifikaci Dulbeccova media, IMDM (Sigma-Aldrich, USA) s přidavkem 20 % fetálního telecího séra, 2 mM L-glutaminu, 100 UI/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (vše od Sigma-Aldrich, USA). Buňky byly kultivovány ve vlhčeném inkubátoru při 37° C a v kontrolované 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Pasážování buněk bylo prováděno pravidelně, vždy každé dva až tři dny ředěním na koncentraci 2 x 10<sup>5</sup> buněk/ml media. Buňky byly počítány v Türkově roztoku s použitím Bürkerovy komůrky (hemocytometru); integrita buněčné membrány byla sledována pomocí barvení trypanovou modří. Ve všech experimentech byly použity buňky, které prošly pasážemi maximálně dvacetkrát.

Lidské nebo potkaní lymfocyty použité v experimentech byly izolovány z periferní

heparinizované krve pomocí přípravku Histopaque-1077 (Sigma Aldrich, USA) přesně dle instrukcí návodu výrobce. Zbylé erytrocyty v peletě buněk byly lyzovány pomocí EasyLyse™ (Dako Cytomation, Německo) dle instrukcí návodu výrobce. Lidské lymfocyty byly kultivovány během experimentů v Iskově modifikaci Dulbeccova media, IMDM (Sigma-Aldrich, USA) s přidavkem 20 % fetálního telecího séra, 2 mM L-glutaminu, 100 UI/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (vše od Sigma-Aldrich, USA). Lidské lymfocyty byly kultivovány ve vlhčeném inkubátoru při 37° C a v kontrolované 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Podle standardů Etické komise Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové dali dárci krve informovaný souhlas s odběrem biologického materiálu k experimentálním účelům.

Mesenchymální kmenové buňky (MKB) byly izolovány z kostní dřeně (MKB KD), periodontálního ligamenta (KBPL) a zubní pulpy (KBZP) kolektivem Ústavu histologie a embryologie LF UK v Hradci Králové. Kmenové buňky byly charakterizovány s ohledem na své biologické vlastnosti, proliferační a diferenciací potenciál, fenotyp, karyotyp s cílem co nejlépe definovat a optimalizovat kultivační podmínky nutné pro udržení cytogeneticky stabilní, nedegenerované a nediferencované buněčné linie. Všechny kmenové buňky studované v rámci zde uváděných experimentů byly připraveny v požadovaném množství pracovníky Ústavu histologie a embryologie LF UK v Hradci Králové dle standardních operačních postupů laboratoře tkáňových kultur ústavu.

Kostní dřeň (KD) byla získána od 4 pacientů (2 ženy a 2 muži, zdraví dárci, průměrný věk 46 let) podstupujících náhradu kyčelního kloubu. Deset mililitrů kostní dřeně bylo od dárců aspirováno, zředěno PBS (Invitrogen, USA) v poměru 1:1 a následně transportováno do laboratoře tkáňových kultur. Mononukleární buňky kostní dřeně byly izolovány pomocí přípravku Ficoll-Paque. Buňky byly dále purifikovány na základě svých schopností adherovat, výsledná populace buněk byla ochuzena o CD45+ a glykoforin A+ buňky použitím mikromagnetických kuliček (Miltenyi Biotec, USA) podle instrukcí v návodu výrobce (Soukup et al. 2006).

KBPL byly izolovány z třetích molárů získaných od zdravých dárců (2 ženy a 1 muž, průměrný věk dárců byl 19 let). Třetí moláry byly extrahovány z ortodontických důvodů, nebo pro zdravotní problémy, které vyvolávaly pacientům. Extrahované periodontální ligamentum bylo ze zubu separováno, promyto PBS a pak podrobeno disociaci působením kolagenasy (Sevapharma, Česká republika) a dispasy (Invitrogen, USA) po dobu 70 min. Po následné centrifugaci (600 G, 5 min) byla získána peleta buněk.

KBZP byly izolovány z třetích molárů od zdravých dárců (3 ženy a 1 muž, průměrný věk dárců byl 19 let). Zubní pulpa byla separována z třetího moláru ve sterilním prostředí a

rovněž za sterilních podmínek transportována do laboratoře tkáňových kultur. Zubní pulpa byla ze zubu extrahována a následně podrobena disociaci působením kolagenasy (Sevapharma, Česká republika) a dispasy (Invitrogen, USA) po dobu 70 min. Po následné centrifugaci (600 G, 5 min) byla získána peleta buněk. KBZP byly selektovány na základně positivity pro CD29, CD44, CD90 a HLA I (Suchánek et al. 2007, 2009).

Podle standardů Etické komise Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové dali dárci, případně jejich zákonní zástupci informovaný souhlas s odběrem biologického materiálu k experimentálním účelům.

MKB KD, KBPL a KBZP byly kultivovány v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> při 37° C v mediu pro lidské mesenchymální kmenové buňky (Soukup et al. 2006) složeném z alfa-MEM (Invitrogen, USA) s nízkým 2% obsahem fetálního telecího séra (PAA, USA), s obsahem 10 ng/ml epidermálního růstového faktoru (PeproTech, USA), 10ng/ml platelet-derived growth factoru (PeproTech), kyseliny L-askorbové (Sigma-Aldrich, USA), 2% L-glutaminu (Invitrogen, USA), ATB penicilin/streptomycin (Invitrogen, USA) a gentamycin (Invitrogen, USA), dexamethason (Sigma-Aldrich, USA). MKB KD a KBPL byly nejprve kultivovány v primokultuře po dobu 5-7 dnů (KBZP 3-5 dnů) v kultivačních lahvích Cell<sup>+</sup> surface<sup>®</sup> (Sarstedt, USA). Neadherentní buňky a zbytky nedisociovaných tkání byly 24 h od inokulace buněk odmyty pomocí PBS. Po následné kultivaci byly v těchto lahvích selektovány malé kolonie kmenových buněk, pomocí roztoku trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, USA) disociovány a již v homogenní suspenzi KB nasazeny do běžných kultivačních lahví (TPP, Švýcarsko nebo NUNC, Dánsko). Každá z následujících pasáží byla provedena při dosažení 70% konfluence. Kontrola kvality se zakládala na imunofenotypizaci (CD45, CD29, CD44, CD73, CD90, CD166) každou 1., 3., 7. a 11. pasáž. Morfologie a viabilita byla testována každou pasáž, karyotyp byl kontrolován 5. a 10. pasáž a délka telomer každou 0., 2., 5., 7. a 10. pasáž. Během kultivace nebyly pozorovány žádné významné změny sledovaných parametrů. V experimentech byly vždy použity jen časné pasáže (MKB KD a KBPL 3 - 6, KBZP 5 - 7). Buňky byly nasazeny v množství 4 500 buněk/cm<sup>2</sup> a po dosažení konfluence 50 - 60 % byly ozářeny. Vždy každý čtvrtý den od ozáření bylo přidáno čerstvé kompletní kultivační medium.

### **4.3. Ozařování**

Exponenciálně rostoucí buňky v suspenzi o koncentraci 2 x 10<sup>5</sup> buněk/ml, kultury adherentních subkonfluentních (konfluence 50 – 60 %) proliferujících buněk tvořících

monolayer v denzitě 10 000 buněk/cm<sup>2</sup> byly v kultivačních lahvích, zkumavkách nebo Petriho miskách (TPP, Švýcarsko nebo Nunc, Dánsko) ozářeny při pokojové teplotě s použitím gama zářiče <sup>60</sup>Co (Chirana, Česká Republika) dávkovým příkonem 1 Gy/min, ve vzdálenosti 1 m od zdroje. Po ozáření byly lahve s buňkami umístěny do inkubátoru při 37° C se zvýšeným 5% obsahem CO<sub>2</sub>. V různých časech od ozáření byly odebrány příslušné alikvotní části buněk v suspenzi, případně buňky uvolněny od kultivačního povrchu odstraněním media, dvojmocných iontů a působením proteas, trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, USA) nebo Accutase (směs proteolytických a kolagenolytických enzymů, PAA, Rakousko).

Samice potkana kmene Wistar byly ozářeny celotělově (0,5-10 Gy) nebo lokálně na oblast plic (5-30 Gy). K celotělovému ozáření byl použit kobaltový gama zářič - <sup>60</sup>Co (Chirana, Česká Republika) s dávkovým příkonem 0,5-1 Gy/min ve vzdálenosti 1 m od zdroje. K provedení celotělového ozáření bylo použito kulatého boxu z plexiskla, kde můžeme ozařovat 10 zvířat najednou bez anestézie.

Lokálně ozařovaná zvířata byla ozařována v lehké anestézii i.m. (Narkamon 10 mg/kg a Rometar 1,2 mg/kg, Bioveta, Česká republika), upoutaná na prkénko (po jednom) z 0,5 m dávkovým příkonem 2,5-4 Gy/min pomocí <sup>60</sup>Co (Chirana, Česká Republika) gama zářiče. Lokální ozáření široké v průměru 3 cm bylo provedeno na hrudníku v oblasti plic. Ostatní partie těla zvířete byly kryty 10 cm silnou vrstvou olova, což zredukovalo dopadající dávku záření na zhruba 2-3 % dávky obdržené na hrudník bez krytí (Österreicher et al. 2004). S kontrolními zvířaty bylo zacházeno stejně, ale nebyly ozářeny.

#### 4.4. Cytostatika a inhibitory

V experimentech s cytostatiky *in vitro* byly použity zásobní roztoky vanadocen dichloridu - (dichloro-bis( $\eta$ 5-2,4-cyklopentadien-1-yl) vanad, cisplatiny (Sigma Aldrich, USA), mitoxantronu (Sigma Aldrich, USA), inhibitoru ATM kinasy KU55933 (Merck, Německo), kofeinu (Sigma Aldrich, USA), inhibitoru MEK1/2 kinas U0126 (Merck, Německo). Jako rozpouštědlo bylo použito příslušné kultivační médium (Sigma-Aldrich, USA) bez séra, aqua pro injectione, nebo dimethylsulfoxid (DMSO). Zásobní roztok inhibitoru KU55933 byl dodán již rozpuštěn v DMSO v koncentraci 10 mmol.l<sup>-1</sup>, ostatní agens bylo potřeba rozpustit. Zásobní roztoky cytostatik a inhibitorů byly připraveny vždy čerstvé před jejich použitím v experimentech. Vanadocen dichlorid 2,5 mmol.l<sup>-1</sup> v mediu, cisplatina 5 mmol.l<sup>-1</sup> v mediu, mitoxantron 1 mmol.l<sup>-1</sup> v aqua pro injectione, kofein 2 mmol.l<sup>-1</sup> v mediu, U0126 10 mmol.l<sup>-1</sup> v DMSO. Vanadocen dichlorid byl získán od doc. Ing. Jaromíra

Vinklárka, Ph.D., Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra obecné a anorganické chemie. Vanadocen dichlorid byl syntetizován ve farmaceutické kvalitě podle Wilkinson a Birmingham (Wilkinson et al.1954) a vyčištěn anaerobní extrakcí s dichlormethanem podle Soxhleta. Jeho čistota byla kontrolována elementární analýzou, IR, Ramanovou a EPR spektroskopií.

## 4.5. Průtoková cytometrie

### 4.5.1. Kvantifikace histonu $\gamma$ H2AX

Ke specifickému průkazu přítomnosti dvouvláknových zlomů DNA (DSB) po působení genotoxických agens v jaderném genomu buňky jsme použili metodu stanovení fosforylované formy histonu H2AX na serinu 139 ( $\gamma$ H2AX). Zkoumané buňky v suspenzi, adherentní buňky do suspenze převedené působením proteas trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, USA) nebo Accutase (směs proteolytických a kolagenolytických enzymů, PAA, Rakousko), periferní lymfocyty izolované z krve pomocí přípravku Histopaque (Sigma Aldrich, USA) - zbylé erytrocyty byly lyzovány pomocí EasyLyse<sup>TM</sup> (Dako Cytomation, Německo) dle instrukcí návodu výrobce, o počtu  $5 \times 10^5$  až  $1 \times 10^6$ , byly dvakrát promyty ledovým PBS a fixovány po dobu 15 minut na ledu 1% roztokem formaldehydu bez methanolu (Polysciences, USA) v PBS. Buňky byly dále promyty PBS a permeabilizovány pomocí 70% ethanolu, ethanol byl předem vychlazený na ledu. Ethanol působil na buňky minimálně po dobu 2 hodin až 2-3 týdnů v lednici při 4° C. V dalším kroku byl ethanol odstraněn, buňky byly opakovaně promyty roztokem 1% BSA + 0,2% Triton X-100 v PBS. Po centrifugaci vždy při 300 G, dokonalém odsátí reziduálního 1% BSA + 0,2% Triton X-100 v PBS bez porušení pelety na dně zkumavky byly buňky inkubovány s monoklonální myší IgG<sub>1</sub> protilátkou anti-fosfo-histon H2AX (pSer139)-FITC (Millipore, USA) 1 hodinu při pokojové teplotě a ve tmě. Následně buňky byly promyty v roztoku 1% BSA + 0,2% Triton X 100 v PBS, v roztoku samotného PBS a DNA byla značena roztokem propidium jodidu (PI) v přítomnosti RNasy A (1mg RNasy A/ml a 5  $\mu$ g PI/ml roztoku, vše Sigma-Aldrich, USA) při pokojové teplotě a ve tmě. Intenzita zelené (FITC) a červené (PI) fluorescence byla měřena na flow cytometru za použití 488 nm excitatačního laseru. Průměr intenzity fluorescence histonu  $\gamma$ H2AX-FITC byl hodnocen v gatu buněk pro G0/G1, S, G2 fázi buněčného cyklu nebo nezávisle na fázi buněčného cyklu jen pro gate studovaných buněk. V některých případech, samostatně, nebo paralelně se stanovením průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC bylo stanoveno

procento  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk na základně tzv. vnitřní ("programované") tvorby histonu  $\gamma$ H2AX v kontrolách (MacPhail et al. 2003). Analýza byla provedena pomocí vyhodnocovacího flow cytometrického softwaru Summit v4.3 (Beckman Coulter, USA).

Při analýze nebylo potřeba používat izotypovou kontrolu, protože se hodnotilo zvýšení imunofluorescence nad tzv. vnitřní ("programovanou") imunofluorescenci kontrol. Kontrola i studované vzorky byly inkubovány s protilátkou ve stejném množství, tudíž se předpokládá, že příspěvek nespecifické vazby protilátky jak v kontrole, tak ve vzorku, je za daných podmínek shodný. Pro každou skupinu bylo kultivováno a ovlivňováno  $5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  buněk. Pro stanovení  $\gamma$ H2AX bylo na průtokovém cytometru analyzováno  $5 \times 10^4$  buněk. K odstranění dubletů a vícenásobných multipletů při analýze  $\gamma$ H2AX spolu s analýzou obsahu DNA průtokovou cytometrií jsme použili soubor opatření, které měly zamezit výskytu těchto buněčných artefaktů ve vlastním analyzovaném vzorku. Dále jsme použili gatovací analýzy pomocí ovládacího softwaru cytometru v průběhu vyhodnocování vzorku. Každý vzorek byl před vlastní analýzou filtrován 70  $\mu$ m filtrem pro prevenci výskytu buněčných agregátů. Zbytek vyskytujících se dubletů a multipletů byl odstraněn gatovací analýzou. Při analýze programem Summit v4.3 (Beckman Coulter, USA) byl dle instrukcí manuálu výrobce softwaru vytvořen gate FSC versus šířka pulsu spolu s FSC versus SSC. Pomocí barevné vícenásobné gating analýzy byly vyřazeny agregáty s vysokou šířkou pulsu a barevně označené buňky s vysokými hodnotami FSC a SSC. Jelikož agregáty dvou a více buněčných jader procházejí přes paprsek laseru pomaleji, než jedno jádro G2/M buňky, mají buněčné agregáty větší hodnotu šířky pulsu.

#### **4.5.2. Stanovení apoptózy pomocí vazby Annexinu V a propidium jodidu**

Z buněk v suspenzi je nejprve v požadovaný čas odstraněno medium centrifugací, buňky jsou opakovaně promyty PBS a výsledná peleta zkoumaných buněk je resuspendována ve vazebném pufru s obsahem  $\text{Ca}^{2+}$  iontů ( $10^5$ - $10^6$  buněk/ml). Vazebný  $\text{Ca}^{2+}$  pufr z kitu je potřeba zředit 10x deionizovanou vodou a vychladit před použitím na ledu. Buňky v suspenzi v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů obsažených ve vazebném pufru jsou značeny Annexinem V konjugovaným s fluorescein isothiokyanátem (Annexin V-FITC) a propidium jodidem (PI) z APOPTEST<sup>TM</sup>-FITC kitu (DakoCytomation, Dánsko) podle instrukcí v návodu výrobce. Na konci značení a potřebné inkubace ve tmě a na ledu (15 minut) byla provedena analýza

na průtokovém cytometru. Pro každou skupinu bylo kultivováno a ovlivňováno  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  buněk. Pro stanovení vazby Annexinu V a PI bylo na průtokovém cytometru analyzováno  $5 \times 10^4$  buněk.

Kombinované použití Annexinu V konjugovaného s fluorochromem spolu s propidium jodidem dovolí rozlišit buňky živé (Annexin V a propidium jodid negativní), časně (Annexin V pozitivní a propidium jodid negativní) a pozdně apoptotické (Annexin V a propidium jodid double pozitivní). Nekróza doprovázená prostou rupturou plazmatické membrány (Annexin V negativní a propidium jodid pozitivní).

#### **4.5.3. Analýza buněčného cyklu podle obsahu DNA**

Přibližně  $1 \times 10^6$  buněk v buněčné suspenzi, nebo do ní převedeno působením proteas trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, USA) nebo Accutase (směs proteolytických a kolagenolytických enzymů, PAA, Rakousko), bylo dvakrát promyto PBS, fixováno a permeabilizováno v 70% ethanolu minimálně po dobu 1 h při 4° C. Po centrifugaci (300 G, 15 min, 4° C) a odstranění ethanolu byly buňky dvakrát promyty PBS a suspendovány v 0,5 ml PBS a 0,5 ml fosfátového pufru (192 ml 0,2 mmol.l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 8 ml 0,1 mmol.l<sup>-1</sup> kyseliny citrónové, pH=7,8) a inkubovány 5 min při pokojové teplotě pro extrakci nízkomolekulárních fragmentů DNA. V posledním kroku byly buňky značeny 0,5 ml Vindelova roztoku: 1ml 1 mol Tris, pH=8, 1 mg RNasy, 100 µl Triton X-100, 60 mg NaCl, 5 mg propidium jodidu (Sigma-Aldrich, USA) a destilovaná voda do 100 ml (Vindelov 1977) v termostatu 1 hod při 37 °C a po proběhlé inkubaci analyzovány na průtokovém cytometru. Propidium jodid je fluorescenční interkalační činidlo, které se ve stechiometrickém poměru váže na jadernou DNA. Intenzita fluorescence propidium jodidu odpovídá množství DNA v dané buňce. Výsledky flow cytometrie byly hodnoceny v programu Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, USA) nebo Summit v4.3 (Beckman Coulter, USA). Pro každý vzorek bylo stanoveno procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu, buněk proliferujících a/nebo buněk v sub-G1. Pro každou skupinu bylo kultivováno a ovlivňováno  $1 \times 10^6$  buněk. V každém vzorku bylo analyzováno minimálně  $1 \times 10^5$  buněk. Pokud procento buněk v sub-G1 bylo pod 0,5 %, analyzovali jsme jen procentuální zastoupení buněk v cyklu. Naopak pokud procento buněk v sub-G1 bylo vyšší, analyzovali jsme procentuální zastoupení všech čtyř populací, tj. sub-G1, G1, S a G2/M. K odstranění dubletů a vícenásobných



multipletů při analýze DNA průtokovou cytometrií jsme použili soubor opatření, které měly zamezit výskytu těchto buněčných artefaktů ve vlastním analyzovaném vzorku. Dále jsme použili gatovací analýzy pomocí ovládacího softwaru cytometru, nebo hodnotícího softwaru v průběhu vyhodnocování vzorku. Každý vzorek byl před vlastní analýzou filtrován 70  $\mu\text{m}$  filtrem pro prevenci výskytu buněčných agregátů. Zbytek vyskytujících se dubletů a multipletů byl odstraněn gatovací analýzou. 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 námi analyzovaném fluorescenčním kanálu (FL-emise nad 560 nm, nejčastěji FL3 613/620 nm). Jelikož agregáty dvou a více buněčných jader procházejí přes paprsek laseru pomaleji, než jedno jádro G2/M buňky, gatovali jsme homogenní populaci s nízkou šířkou a plochou pulsu. Doplnkově jsme vyřadili buňky s vysokou FSC a SSC, které svým výskytem nepatřily do homogenní populace. Při analýze programem Summit v4.3 (Beckman Coulter, USA) byl dle instrukcí manuálu výrobce vytvořen gate FSC versus šířka pulsu, spolu s FSC versus SSC. Pomocí barevné vícenásobné gating analýzy byly vyřazeny agregáty s vysokou šířkou pulsu a barevně označené buňky s vysokými hodnotami FSC a SSC.

#### 4.5.4. Stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidasy asociované se senescencí

Jedním z typických znaků senescence je zvýšená aktivita enzymu  $\beta$ -galaktosidasy spojené se senescencí (SA- $\beta$ -gal; angl. *senescence-associated  $\beta$ -galactosidase*). Proliferující presenescentní, immortalizované, nebo quiescentní buňky produkují enzym kyselá  $\beta$ -D-galaktosidasa (EC 3.2.1.23), který se vyskytuje v lysozomech a jeho pH optimum je mezi pH 4 – 4,5, což odpovídá přirozenému pH prostředí lysozomů. Pro buňky senescentní je charakteristická zvýšená aktivita  $\beta$ -galaktosidasy detekovatelná při pH 6, tato aktivita se označuje jako *senescence-associated* a naopak není stanovitelná u buněk klidových, diferenciovaných, presenescentních (Dimri et al. 1995). K detekci SA- $\beta$ -galaktosidasy jsme použili fluorogenní substrát 5-dodecanoylamino fluorescein di- $\beta$ -D-galactopyranoside ( $\text{C}_{12}\text{FDG}$ ) (Invitrogen, USA).  $\text{C}_{12}\text{FDG}$  je nefluorescenční prekurzor, který se po hydrolýze SA- $\beta$ -galaktosidasou mění na fluorofor  $\text{C}_{12}$ -fluorescein neschopný opustit kompartment zrodu. Prvním krokem detekce SA- $\beta$ -galaktosidasy byla indukce lysozomální alkalizace pomocí preinkubace buněk s bafilomycinem A1 (Sigma-Aldrich, USA), inhibitorem lysozomální  $\text{H}^+$ -ATPázy o finální koncentraci 100  $\text{nmol.l}^{-1}$  po dobu 1 hodiny. Po proběhlé inkubaci bylo přidáno 33  $\mu\text{l}$  2  $\text{mmol.l}^{-1}$   $\text{C}_{12}\text{FDG}$  pracovního roztoku na 2 ml kultivačního

média s obsahem bafilomycinu A1 s cílem získat finální koncentraci  $C_{12}FDG$  přibližně  $33 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Inkubace po dobu 2 hodin. V dalším kroku byl odstraněn roztok s bafilomycinem A1 a fluorogenním substrátem  $C_{12}FDG$ . Buňky se promyly 2 x PBS po dobu 30 s, na každé promytí bylo použito 2 ml PBS. Buňky se šetrně převedly do suspenze pomocí trypsinu-EDTA (Sigma-Aldrich, USA), proběhla centrifugace při  $4^\circ\text{C}$  a následně došlo k odlití media se sérem. Buňky jsme resuspendovali v PBS, koncentrace  $5 \times 10^5$  buněk/1 ml. Intenzita fluorescence  $C_{12}$ -fluorescein byla kvantifikována na FL1 kanálu (530/540 nm) detektoru průtokového cytometru a aktivita SA- $\beta$ -galaktosidasy byla vyjádřena jako průměr intenzity fluorescence  $C_{12}$ -fluorescein. Data byla někdy zobrazena ve formě logaritmu intenzity fluorescence  $C_{12}$ -fluorescein (osa y) vs. *side scatter* SSC (osa x) (Debacq-Chainiaux et al. 2009).

#### 4.5.5. Sledování změn optických vlastností buňky

Parametry, které analyzujeme jsou *forward scatter* (FSC) a *side scatter* (SSC). Buňky při analýze v průtokovém cytometru jsou unášeny proudem nosné kapaliny do měrné cely, kde postupně prochází paprskem laseru. Vlastnosti daného typu buňky způsobí, že na buňku dopadající paprsek je částečně odražen, nebo při interakci s buňkou ochuzen o jisté kvantum fotonů. Výsledné množství fotonů po interakci s buňkou je analyzováno fotonásobičem. FSC odpovídá velikosti buňky, tj. intenzita odraženého paprsku je měřena v předním úhlu (detektor je zařazený ve směru původního paprsku). SSC je intenzita rozptýleného světla měřená v pravém úhlu (detektor zařazený pod úhlem  $90^\circ$ ), která koreluje s granularitou buňky a je odrazem rozmanitosti jejich intracelulárních struktur. FSC je tedy parametr, který odpovídá velikosti buňky a SSC vnitřnímu uspořádání buňky.

#### 4.6. Imunocytochemie

Pomocí imunofluorescenční mikroskopie byla sledována lokalizace proteinu  $\gamma H2AX$  v buňce. Buňky byly fixovány 4% čerstvě připraveným paraformaldehydem 10 min při pokojové teplotě, promyty v PBS, permeabilizovány 0,2% Triton X-100/v PBS 15 minut při pokojové teplotě a opět promyty v PBS. Před inkubací s primární protilátkou (přes noc při  $4^\circ\text{C}$ ) byly buňky blokovány v 7% inaktivovaném fetálním bovinním séru s 2 % BSA po dobu 30 min při pokojové teplotě. K detekci histonu  $\gamma H2AX$  bylo použito myší monoklonální

protilátky anti-fosfo-histon H2AX (pSer139) (Millipore, USA). Sekundární protilátkou byla oslí anti-myší-FITC konjugovaná protilátka, nebo Cy3-konjugovaná protilátka (Jackson Laboratory, USA). Sekundární protilátky byly aplikovány po dobu 1 h ve tmě na jednotlivá sklíčka po jejich preinkubaci s 5,5% oslím sérem v PBS 30 min při pokojové teplotě. Nenavázána protilátka byla odstraněna opakovaným promytím v PBS (3 x 5 min). Jádra byla značená pomocí 4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid (DAPI), nebo propidium jodidu.

Fotografie byly získány pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse (Nikon, Japonsko). Expoziční čas a dynamika pásma kamery ve všech kanálech byla pro všechny fotografie srovnávané počítačovou analýzou obrazu nastavena na stejné hodnoty. Integrovaná optická denzita (IOD) jednotlivých jader byla měřena pomocí analýzy obrazu s použitím softwaru ImagePro 4.11 (MediaCybernetics, USA).

#### **4.7. Analýza krevního obrazu**

Stanovení bílého krevního obrazu bylo provedeno z periferní krve odebrané z myokardu jednotlivých potkanů v množství 5-7 ml pomocí automatického hematologického analyzátoru Sysmex XE-2100 (Sysmex-Toa, Japonsko).

#### **4.8. Cytochemie**

Pro stanovení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy byl použit Senescence bata-galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, USA) podle pokynů výrobce.

#### **4.9. Statistická analýza**

Výsledky byly hodnoceny v programech MS Excel 2003 (Microsoft, USA), GraphPad Prism 5 biostatistics (GraphPad Software, USA), NCSS 2004 (Number Cruncher Statistical System, USA) nebo Statistica 7 (StatSoft, USA). Všechny statisticky hodnocené experimenty *in vitro* byly provedeny v  $n = 3$ , *in vivo* v  $n = 6-9$ , pokud není uvedeno jinak. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Rozdíl na hladině  $p \leq 0,05$  byl považován jako statisticky významný. Použité testy jsou uvedeny ve výsledkové části. V případě hodnocení mediánu, graf znázorňoval hodnotu mediánu  $\pm$  1. a 3. kvartil. Statistická analýza byla vždy

provedena, případně konzultována Ing. Jiřím Knížkem, CSc. z Ústavu lékařské biofyziky Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Reprezentativní histogramy průtokové cytometrie a reprezentativní mikroskopické obrázky nebyly statisticky hodnoceny.

#### **4.10. Přístrojové vybavení**

Laboratorní potkani byli chováni ve viváriu Katedry radiobiologie, Univerzity obrany, Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové. Komerčně získané buněčné linie byly kultivovány na Ústavu lékařské biochemie. Izolaci a kultivaci buněk kmenových zajišťovala laboratoř tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie. K měření dat průtokové cytometrie byly použity průtokové cytometry Cell Lab Quanta (Beckman Coulter, USA), CyAn™ ADP (Beckman Coulter, USA) a FACSAria II (BD Biosciences, USA) umístěné na Ústavu lékařské biochemie a Katedře radiobiologie FVZ. Fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse a další potřebné laboratorní vybavení bylo umístěno na Ústavu lékařské biochemie.

## **5. VÝSLEDKY**

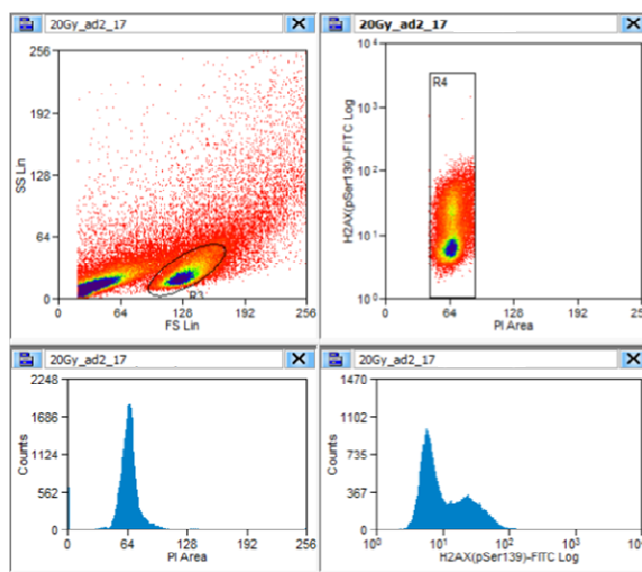
### **5.1. Fosforylace histonu H2AX na serinu 139 *in vivo***

#### **5.1.1. Celotělové ozáření potkanů**

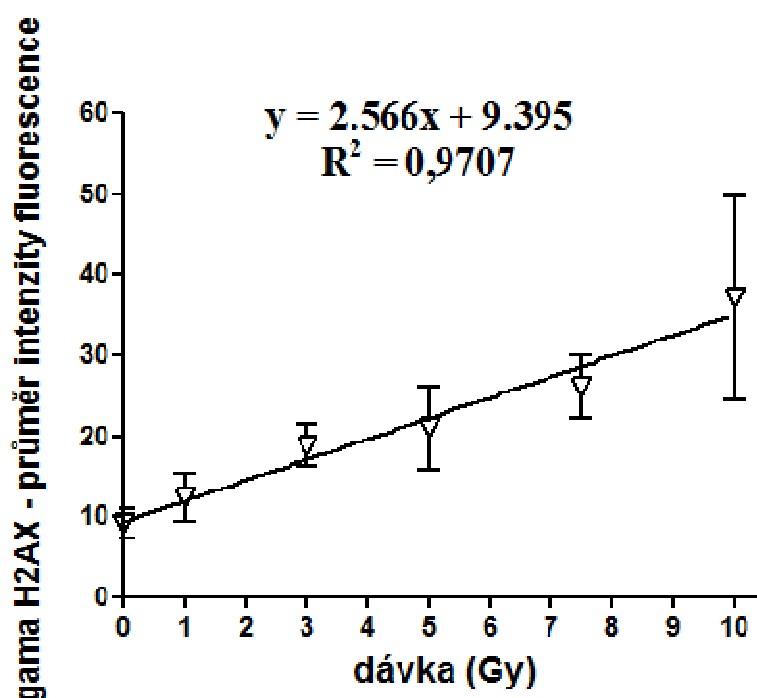
Obrázek č. 4 znázorňuje gating strategii při stanovení  $\gamma$ H2AX pomocí průtokové cytometrie. Jednu hodinu od celotělového ozáření potkanů ( $n = 6-9$ ) dávkami v rozmezí 1-10 Gy jsme metodou průtokové cytometrie kvantifikovali lineární dávkově závislý vzestup  $\gamma$ H2AX v lymfocytech izolovaných z periferní krve potkana. Statisticky významný vzestup  $\gamma$ H2AX oproti kontrole byl pozorován po dávkách 3, 5, 7,5 a 10 Gy ( $p \leq 0,05$ ), t-test (obr. 5). Z histogramů průtokové cytometrie (kontrola a dávka 10 Gy) je po ozáření patrný vzestup intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC (osa y) homogenně napříč celou lymfocytární populací (obr. 6). Vizuální detekci fosfoproteinů  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkana 1 hodinu od celotělového ozáření jsme provedli pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Obrázky ukazují dávkově závislý vzestup histonu  $\gamma$ H2AX (zelená barva – emise FITC) vždy homogenně

napříč všemi zobrazenými lymfocyty pro danou dávku gama záření (obr. 7). Stanovení integrální optické denzity (IOD) jednotlivých jader lymfocytů měřené pomocí analýzy obrazu rovněž prokázalo lineárně dávkově závislý vzestup histonu  $\gamma$ H2AX detekovaný pomocí imunofluorescenční mikroskopie (obr. 8). Analýza vzniku  $\gamma$ H2AX po celotělovém ozáření potkanů pomocí imunofluorescenční mikroskopie verifikovala data získaná z průtokové cytometrie.

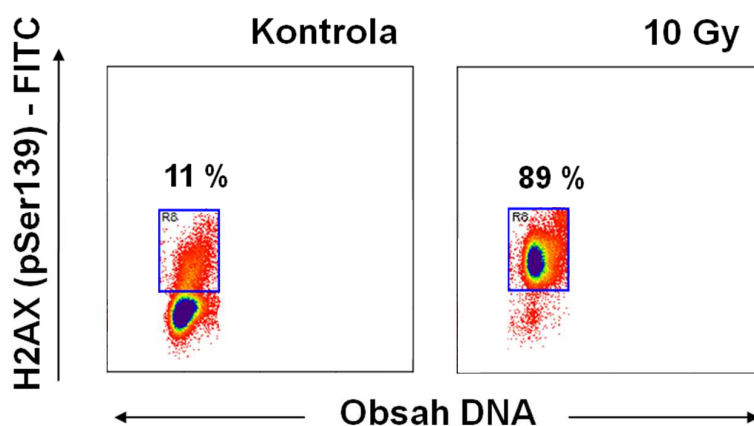
V dalších krocích jsme testovali stabilitu fosfoproteinu  $\gamma$ H2AX s ohledem na jeho význam jako potenciálního analytického markeru sloužícího k retrospektivnímu odhadu obdržené dávky gama záření. Jednu hodinu od celotělového ozáření potkanů dávkami v rozmezí 1 – 10 Gy jsme odebrali periferní krev do zkumavek s heparinem. Plná nesrážlivá krev odebraná 1 h od celotělového ozáření byla následně uchována *ex vivo* po dobu 23 hodin na ledu při 4° C v lednici. Po uplynutí času uchování jsme z této krve izolovali lymfocyty. Takto uchovávané lymfocyty jsme dále fixovali, permeabilizovali a značili. V jednotlivých vzorcích jsme kvantifikovali průměr intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC pomocí průtokové cytometrie. Výsledky jsme porovnávali se stanovením průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC u lymfocytů z krve izolovaných, fixovaných a permeabilizovaných neprodleně po odběru uskutečněném 1 od ozáření. Data byla analyzována neparametrickým Mann-Whitney U testem a na hladině statistické významnosti  $p \leq 0,05$  nebyl s výjimkou dávky 3 Gy pozorován statisticky významný rozdíl z pohledu kvanta  $\gamma$ H2AX mezi oběma typy zacházení s analytem (obr. 9).



**Obr. 4. Gating strategie při analýze průměru intenzity imunofluorescence FITC protilátky proti H2AX fosforylovanému na Serinu 139 v lymfocytech potkana. Analyzován lymfogate buněk G0/G1.**

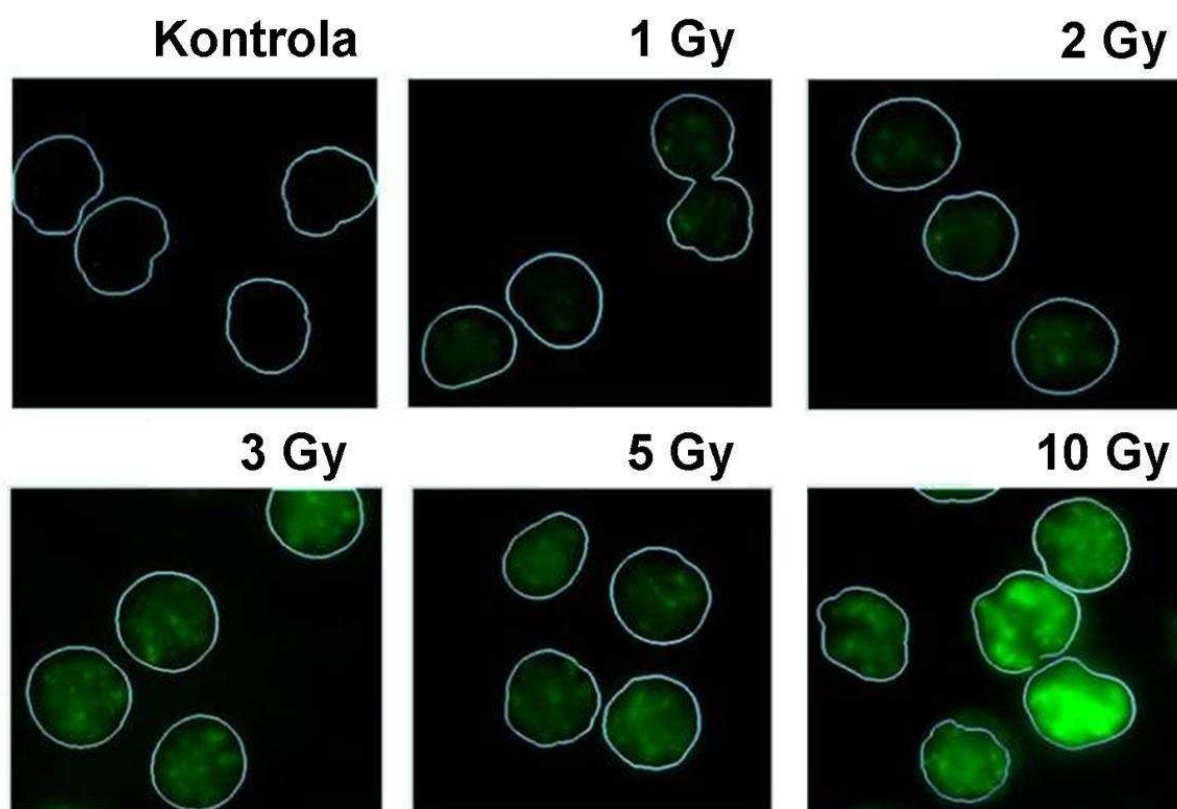


**Obr. 5.** Flow cytometrická kvantifikace imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v lymfocytech potkana 1 h od celotělového ozáření *in vivo*. Lymfocyty byly izolovány z heparinizované periferní krve kontrolních a ozářených (1-10 Gy) potkanů 1 h od ozáření. Průměr buněčné fluorescence byl analyzován průtokovou cytometrií pro buňky v G0/G1 fázi buněčného cyklu. Graf ukazuje aritmetický průměr intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v závislosti na dávce gama záření, n = 6-9,  $\pm$  směrodatná odchylka.

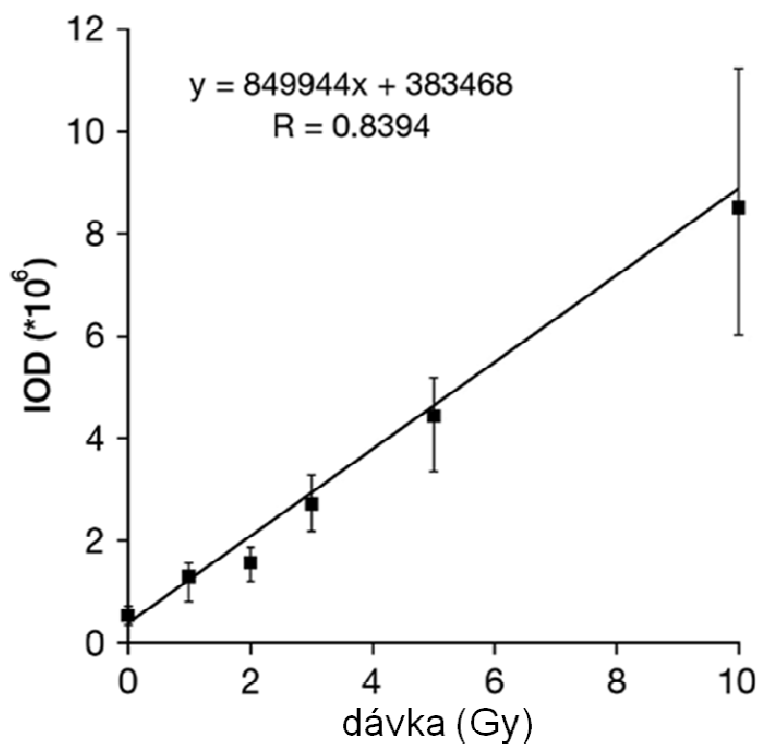


**Obr. 6.** Flow cytometrická detekce přítomnosti  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkanů 1 h od celotělového ozáření *in vivo*. Data z průtokové cytometrie jsou zobrazena jako dvourozměrné histogramy (tzv. “dot plot”) logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC na ose y versus intenzita fluorescence propidium jodidu (obsah jaderné DNA v jednotlivých fázích buněčného cyklu) na ose x. Obrázek je tvořen reprezentativními histogramy z 6-9 nezávisle

analyzovaných vzorků pro každou skupinu. Pro stanovení ionizujícím zářením indukované tvorby  $\gamma$ H2AX jsme využili gatovací analýzy. Jednotlivé gaty byly vytvořeny pomocí cytometrického softwaru s cílem ohraničit tzv. vnitřní (“programovanou”) tvorbu  $\gamma$ H2AX v kontrolách (modré rámečky). Procento buněk spadajících do těchto gatů bylo definováno jako procento buněk  $\gamma$ H2AX protein pozitivních (obsahujících protein  $\gamma$ H2AX), mimo tyto gaty byly buňky posuzovány jako negativní. Uvedeny reprezentativní histogramy z  $5 \times 10^4$  buněk.

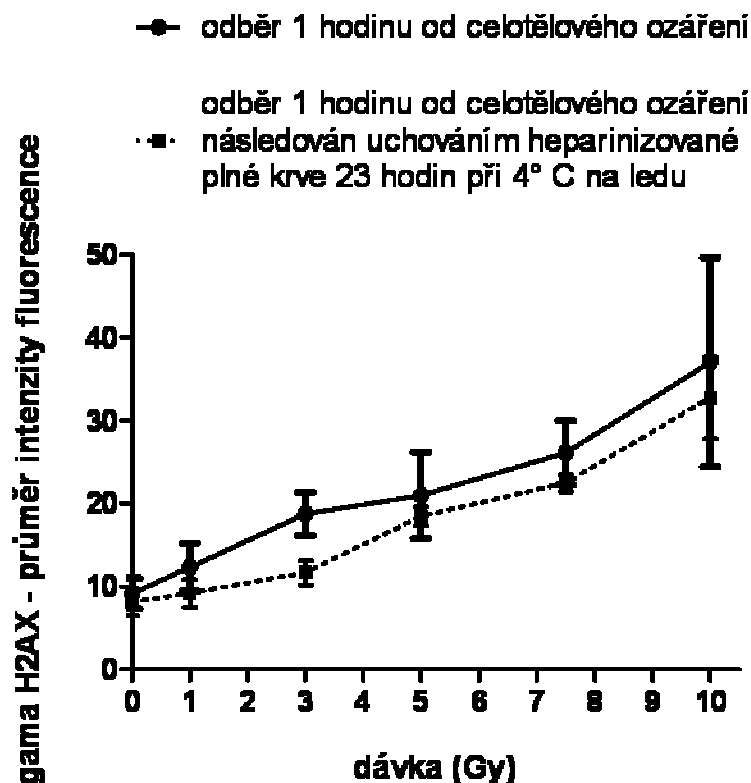


**Obr. 7. Mikroskopická vizualizace  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkana 1 h od celotělového ozáření *in vivo*.** Lymfocyty byly izolovány z heparinizované periferní krve kontrolních a ozářených (1-10 Gy) potkanů 1 h od ozáření, fixovány a  $\gamma$ H2AX byl detekován fosfo-epitop specifickou protilátkou. Obrázek ukazuje reprezentativní projekci z kontrol a ozářených ( $n = 6-9$ ) vzorků získaných pomocí fluorescenční mikroskopie. Histon  $\gamma$ H2AX je značen FITC – zelená barva, bílá linie ohraničuje buněčná jádra.



**Obr. 8. Dávková závislost vzestupu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkana měřená pomocí softwaru pro analýzu obrazu 1 h od celotělového ozáření *in vivo*.** Lymfocyty byly izolovány z heparinizované periferní krve kontrolních a ozářených (1-10 Gy) potkanů (n = 6-9) 1 h od ozáření, fixovány a  $\gamma$ H2AX byl detekován fosfo-epitop specifickou protilátkou. Graf ukazuje medián  $\pm$  1. a 3. kvartil denzity jednotlivých jader pro  $\gamma$ H2AX, n = 6-9 hodnocených skupin na jednotlivou dávku gama záření.





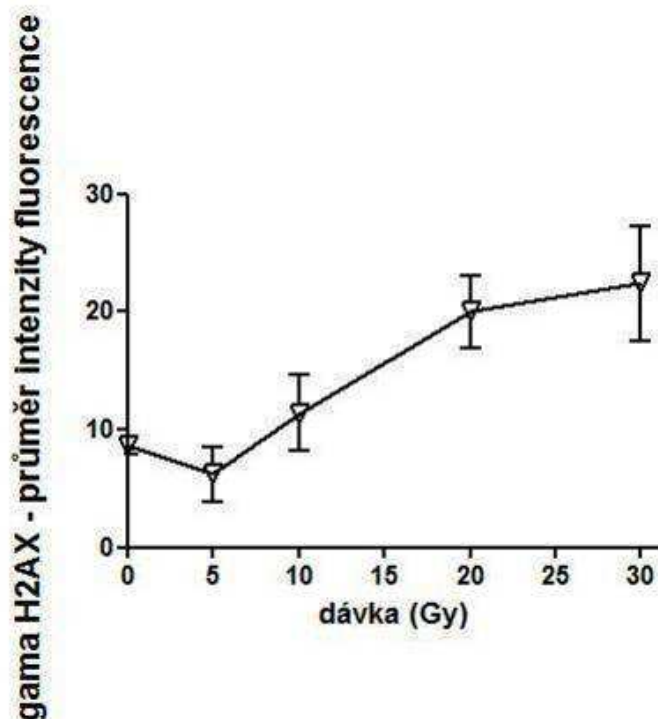
Obr. 9. Porovnání průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX v periferních lymfocytech izolovaných z plné krve ihned po odběru a izolovaných 23 hodin po odběru ze vzorků plné krve skladované na ledu při 4° C. Oba odběry periferní krve byly uskutečněny 1 h od celotělového ozáření. Při testování stability fosfoproteinu  $\gamma$ H2AX jsme 1 h od celotělového ozáření potkanů dávkami v intervalu 1-10 Gy odebrali periferní heparinizovanou krev. U první skupiny (plná čára) jsme lymfocyty izolovali neprodleně po odběru. U druhé skupiny (přerušovaná čára) byla plná krev odebrána 1 h od celotělového ozáření a následně uchována po dobu 23 hodin na ledu při 4° C, a až po tomto uchování z ní byly izolovány lymfocyty. Data jsou ve formě průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v závislosti na dávce gama záření, n = 6-9,  $\pm$  směrodatná odchylka.

### 5.1.2. Lokální ozáření oblasti hrudníku potkanů

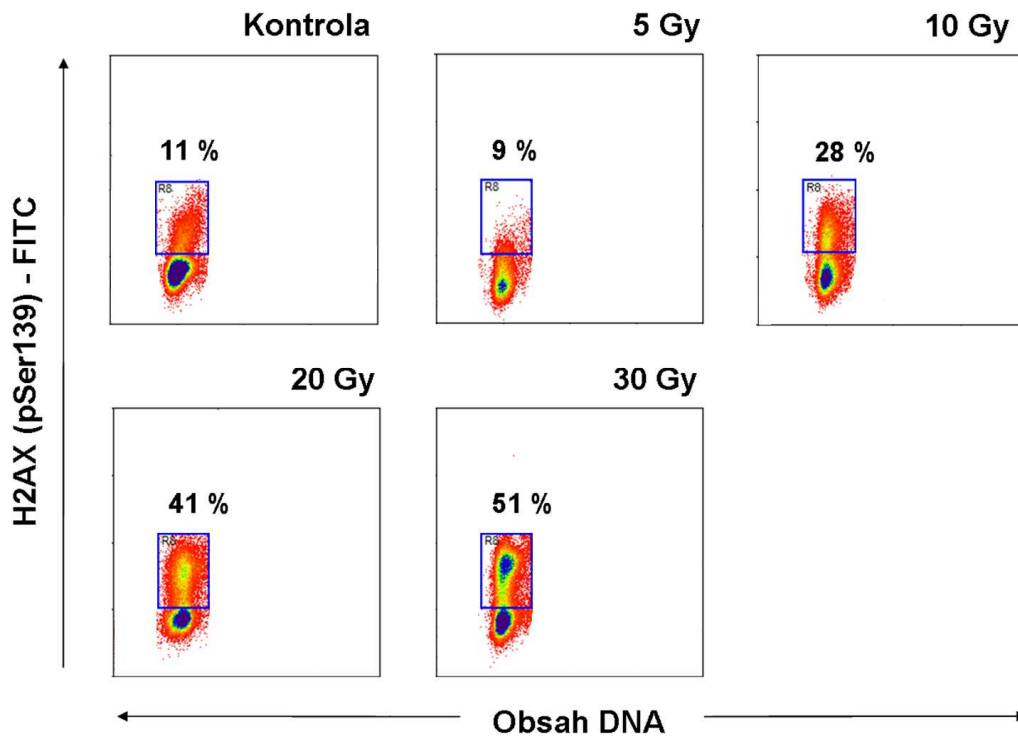
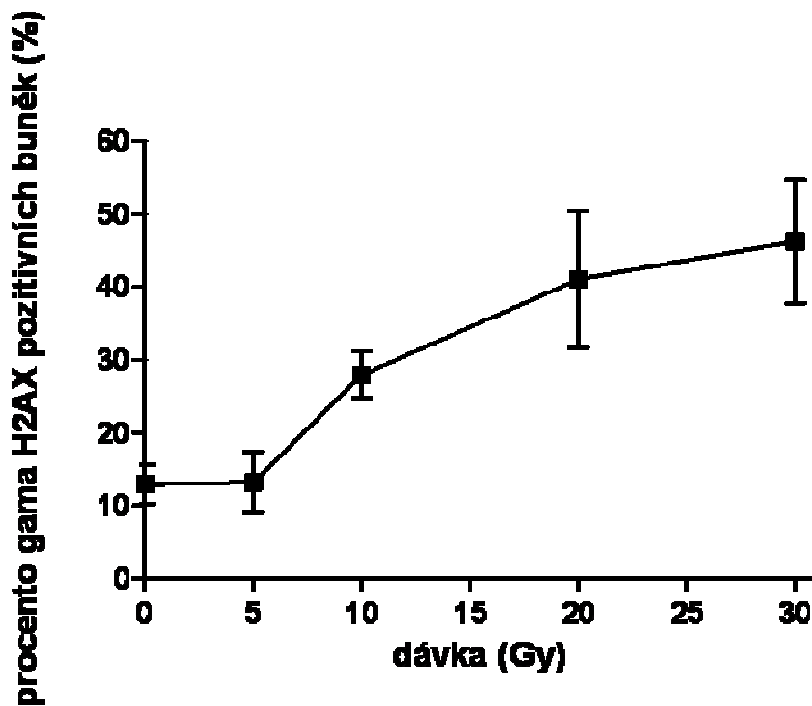
Jednu hodinu od ozáření hrudníku potkanů dávkami v rozmezí 5 – 30 Gy jsme pomocí průtokové cytometrie kvantifikovali vzestup imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC od dávky 10 Gy v lymfocytech periferní krve (obr. 10). Zvýšení bylo statisticky významné pro dávky 20 a 30 Gy (t-test;  $p \leq 0,05$ ). Histogramy průtokové cytometrie svědčí o vzestupu imunocytochemicky značeného histonu  $\gamma$ H2AX jen v části populace lymfocytů (obr.11 A), což je v kontrastu s výsledky získanými po celotělovém ozáření potkanů. Heterogenní výskyt  $\gamma$ H2AX v populaci lymfocytů 1 hodinu od ozáření hrudníku odráží stav, kdy ne všechny lymfocyty byly za daných experimentálních podmínek exponovány gama záření při průchodu

krve ozařovanou oblastí (oblast hrudníku) *in vivo*. Naše skupiny po ozáření tedy ve finále vždy obsahovaly různý poměr lymfocytů neozářených –  $\gamma$ H2AX negativních a ozářených –  $\gamma$ H2AX pozitivních v závislosti na obdržené dávce gama záření. Stav, kdy velikost výskytu fosfoproteinu  $\gamma$ H2AX ve studovaných lymfocytech není napříč buněčnou populací stejná potvrdila i vizuální detekce  $\gamma$ H2AX pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Imunofluorescenční mikroskopie ukázala nižší vzestup histonu  $\gamma$ H2AX v porovnání s celotělovým ozářením, a to i přes skutečnost, že byly použity vyšší dávky gama záření. Navíc se zde potvrdilo, že ne ve všech jádrech (ani při dávce 20 Gy) lymfocytů se tvoří histon  $\gamma$ H2AX (obr. 12). Jelikož také mikroskopie ukázala nehomogenní pozitivitu buněk na  $\gamma$ H2AX, data z průtokové cytometrie byla analyzována použitím gatovací analýzy s cílem určit procento  $\gamma$ H2AX-pozitivních buněk v závislosti na obdržené dávce gama záření. Pro stanovení ionizujícím zářením-indukovaného vzniku  $\gamma$ H2AX jsme použili cytometrický analytický software, kterým jsme v histogramech ohraničili vnitřní (“programovanou”) hladinu  $\gamma$ H2AX v kontrolách za vytvoření gatů (modré rámečky). Procento buněk spadajících do těchto gatů jsme definovali jako procento buněk  $\gamma$ H2AX protein pozitivních (fosforylujících protein H2AX), buňky nacházející se mimo tyto gaty byly posuzovány jako  $\gamma$ H2AX negativní. Pomocí identického nastavení gatů jsme hodnotili všechny další vzorky (n = 6) zkoumaných skupin. Graf vytvořený pomocí gatovací analýzy reprezentující procento  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk v závislosti na obdržené dávce lokálního gama záření potvrdil vzestup  $\gamma$ H2AX od dávky 10 Gy (obr. 11 B).

V dalších experimentech jsme studovali změny ve výskytu  $\gamma$ H2AX v lymfocytech *in vivo* v závislosti na čase od lokálního ozáření pomocí flow cytometrické kvantifikace. Dvacet čtyři hodin od ozáření hrudníku jsme pozorovali markantní pokles výskytu  $\gamma$ H2AX v lymfocytech *in vivo* se zachováním reziduální, statisticky nevýznamné přítomnosti nad úroveň kontrol (obr. 13). Toto zbytkové reziduální zvýšení se zcela smaže do 21. dne od ozáření, jak nám ukazují výsledky kvantifikace  $\gamma$ H2AX pro dávku 20 Gy lokálního záření (obr. 14).

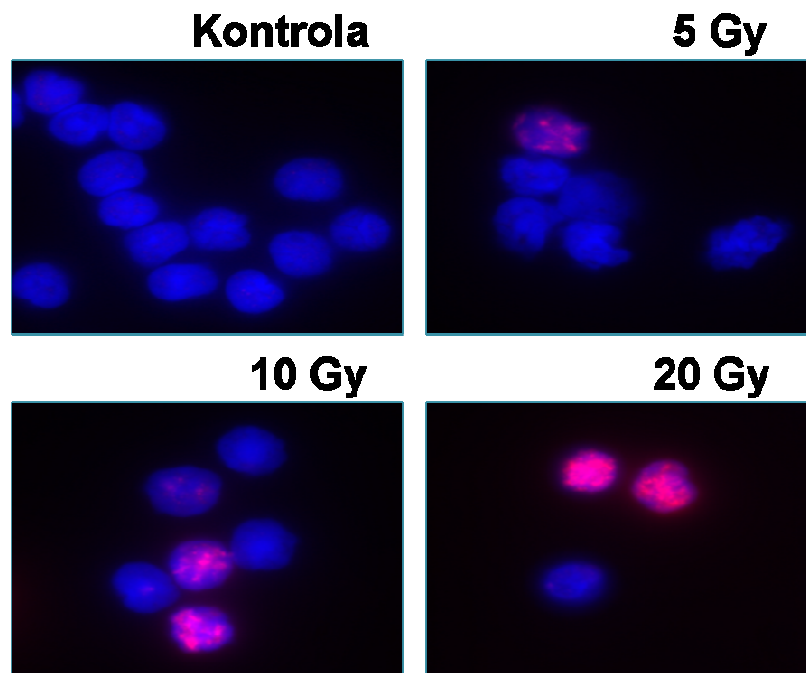


**Obr. 10.** Flow cytometrická kvantifikace imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v lymfocytech potkana 1 h od lokálního ozáření *in vivo*. Lymfocyty byly izolovány z heparinizované periferní krve kontrolních a ozářených (5-30 Gy) potkanů 1 h od ozáření hrudníku. Průměr buněčné fluorescence byl analyzován průtokovou cytometrií pro buňky v G0/G1 fázi buněčného cyklu. Graf ukazuje aritmetický průměr intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v závislosti na dávce gama záření,  $n = 6$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. Vzestup imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC je statisticky významný oproti kontrole pro dávky 20 a 30 Gy ( $p \leq 0,05$ ), t-test.

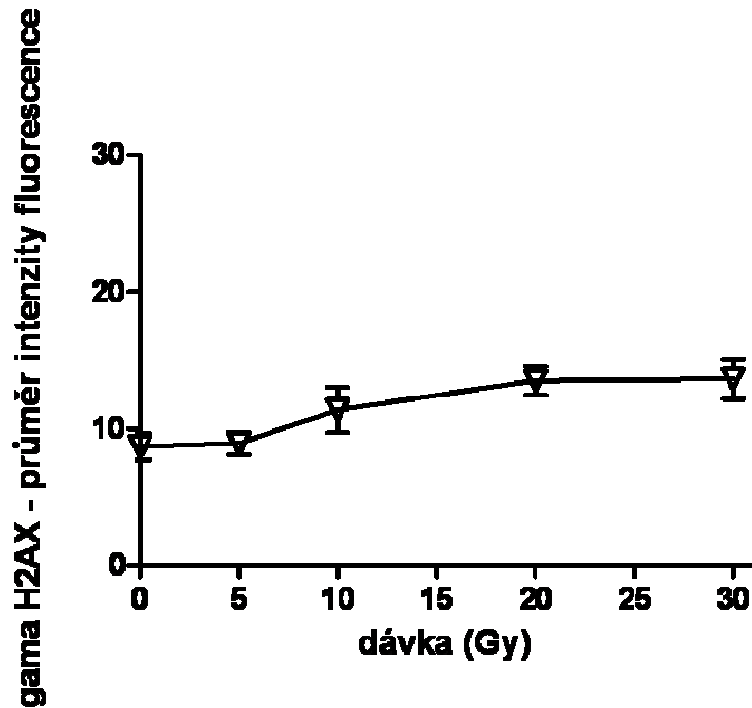
**A****B**

Obr. 11. Flow cytometrická kvantifikace přítomnosti  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkana 1 h od lokálního ozáření *in vivo* (A); procento  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk v závislosti na obdržené dávce gama záření určené pomocí gating analýzy (B). A. Data z průtokové

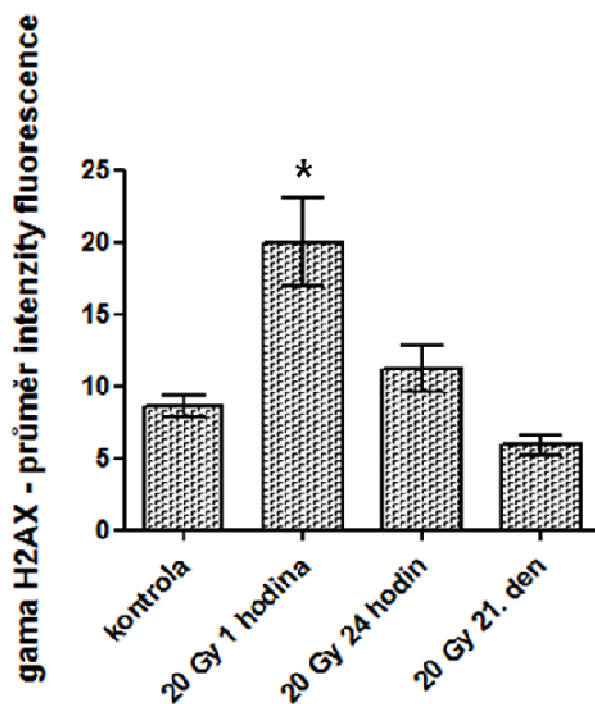
cytometrie jsou zobrazena jako dvourozměrné histogramy (tzv. “dot plot”) logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC na ose y versus intenzita fluorescence propidium jodidu (obsah jaderné DNA v jednotlivých fázích buněčného cyklu) na ose x. Obrázek je tvořen reprezentativními dot-ploty z šesti nezávisle analyzovaných vzorků pro každou skupinu. K stanovení záření indukované tvorby  $\gamma$ H2AX jsme využili gatovací analýzy. Jednotlivé gaty byly vytvořeny pomocí cytometrického softwaru s cílem ohraničit tzv. vnitřní (“programovanou”) formaci  $\gamma$ H2AX v kontrolách (modré rámečky). Procento buněk spadajících do těchto gatů bylo definováno jako procento buněk  $\gamma$ H2AX protein pozitivních (obsahujících protein  $\gamma$ H2AX), mimo tyto gaty byly buňky posuzovány jako negativní. Uvedeny reprezentativní histogramy z  $5 \times 10^4$  buněk. B. Graf vytvořený pomocí gatovací analýzy A. znázorňuje procento  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk v závislosti na obdržené dávce lokálního gama záření,  $n = 6$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. Výsledky statisticky významné (t-test,  $p \leq 0,05$ ) pro dávky 10, 20 a 30 Gy.



**Obr. 12. Mikroskopická vizualizace  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkana 1 h od lokálního ozáření *in vivo*.** Lymfocyty byly izolovány z heparinizované periferní krve kontrolních a ozářených (5-20 Gy) potkanů 1 h od ozáření hrudníku, fixovány a  $\gamma$ H2AX byl detekován fosfo-epitop specifickou protilátkou. Obrázek ukazuje reprezentativní projekci kontrol a ozářených ( $n = 6$ ) vzorků získaných pomocí fluorescenční mikroskopie. Histon  $\gamma$ H2AX je značen Cy3 – červená barva, jádra jsou označena modře – 4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid (DAPI), spojený obraz.



**Obr. 13.** Flow cytometrická kvantifikace imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v lymfocytech potkana 24 h od lokálního ozáření *in vivo*. Lymfocyty byly izolovány z heparinizované periferní krve kontrolních a ozářených (5-30 Gy) potkanů 24 h od ozáření. Průměr buněčné fluorescence byl analyzován průtokovou cytometrií pro buňky v G0/G1 fázi buněčného cyklu. Graf ukazuje aritmetický průměr intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v závislosti na dávce gama záření,  $n = 6$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. Dvacet čtyři hodin od ozáření nebyl pozorován statisticky významný vzestup ( $p \leq 0,05$ , t-test) imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC.



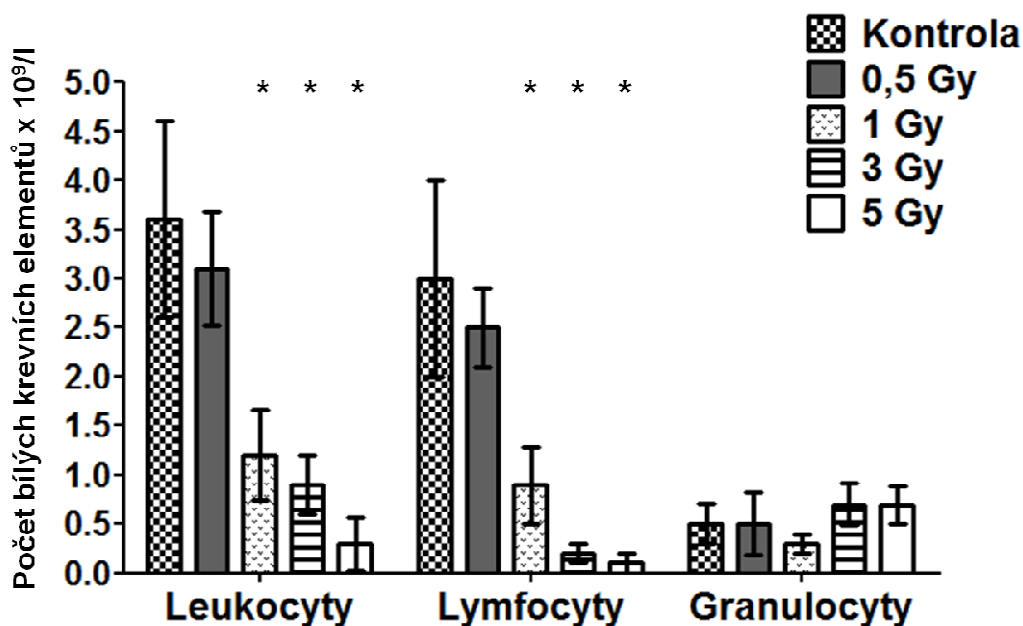
**Obr. 14. Změna průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v lymfocytech potkana *in vivo* v závislosti na čase od lokálního ozáření stanovená pomocí průtokové cytometrie.** Lymfocyty byly izolovány z heparinizované periferní krve kontrolních a ozářených (20 Gy) potkanů v intervalech 1 hodina, 24 hodin a 21 dní od ozáření hrudníku. Průměr buněčné imunofluorescence byl analyzován průtokovou cytometrií pro buňky v G0/G1 fázi buněčného cyklu. Graf ukazuje aritmetický průměr intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC pro dávku 20 Gy v závislosti na čase od ozáření,  $n = 6$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), t-test.

## 5.2. Analýza krevního obrazu po celotělovém a lokálním ozáření potkanů

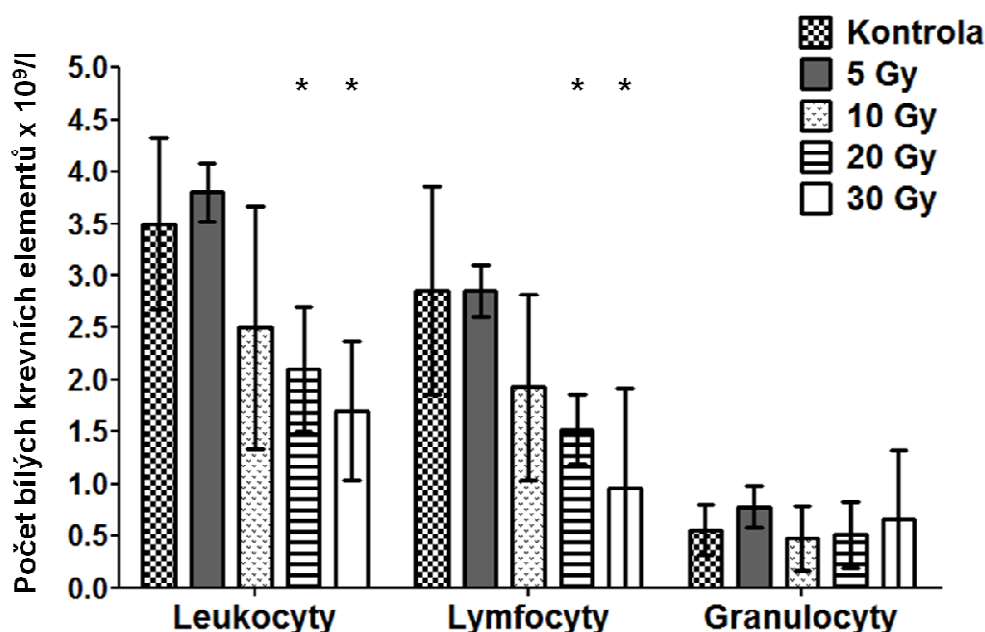
Dvacet čtyři hodin od ozáření jsme odebrali potkanům ze srdce krev a stanovili počet bílých krevních elementů analýzou krevního obrazu. Z výsledků stanovení krevního obrazu po celotělovém ozáření byl patrný dávkově závislý pokles počtu lymfocytů v periferní krvi potkanů. Pokles byl statisticky významný ( $p \leq 0,05$ ) oproti kontrolní skupině po dávkách 1, 3 a 5 Gy. Počet granulocytů v tomto časovém intervalu nevykazoval změny oproti neozářené skupině (obr. 15).

V dalším experimentu jsme počet lymfocytů stanovovali po lokálním ozáření na oblast hrudníku dávkami v rozmezí 5-30 Gy. Z obrázku č. 16 je patrný dávkově závislý pokles počtu lymfocytů v periferní krvi lokálně ozářených potkanů až od vyšší dávky v porovnání s celotělově ozářenými potkany. Pokles byl statisticky významný ( $p \leq 0,05$ ) oproti kontrolní

skupině po dávkách 20 a 30 Gy. Granulocyty nevykazovaly za daných experimentálních podmínek 24 h od ozáření signifikantní změny oproti neozářené skupině.



**Fig. 15. Bílý krevní obraz 24 hodin od celotělového ozáření.** Sloupce grafu znázorňují počet bílých krevních elementů  $\times 10^9/l$  v periferní krvi potkana po celotělové expozici rozdílným dávkám gama záření. Graf reprezentuje aritmetický průměr,  $n = 6$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), t-test.



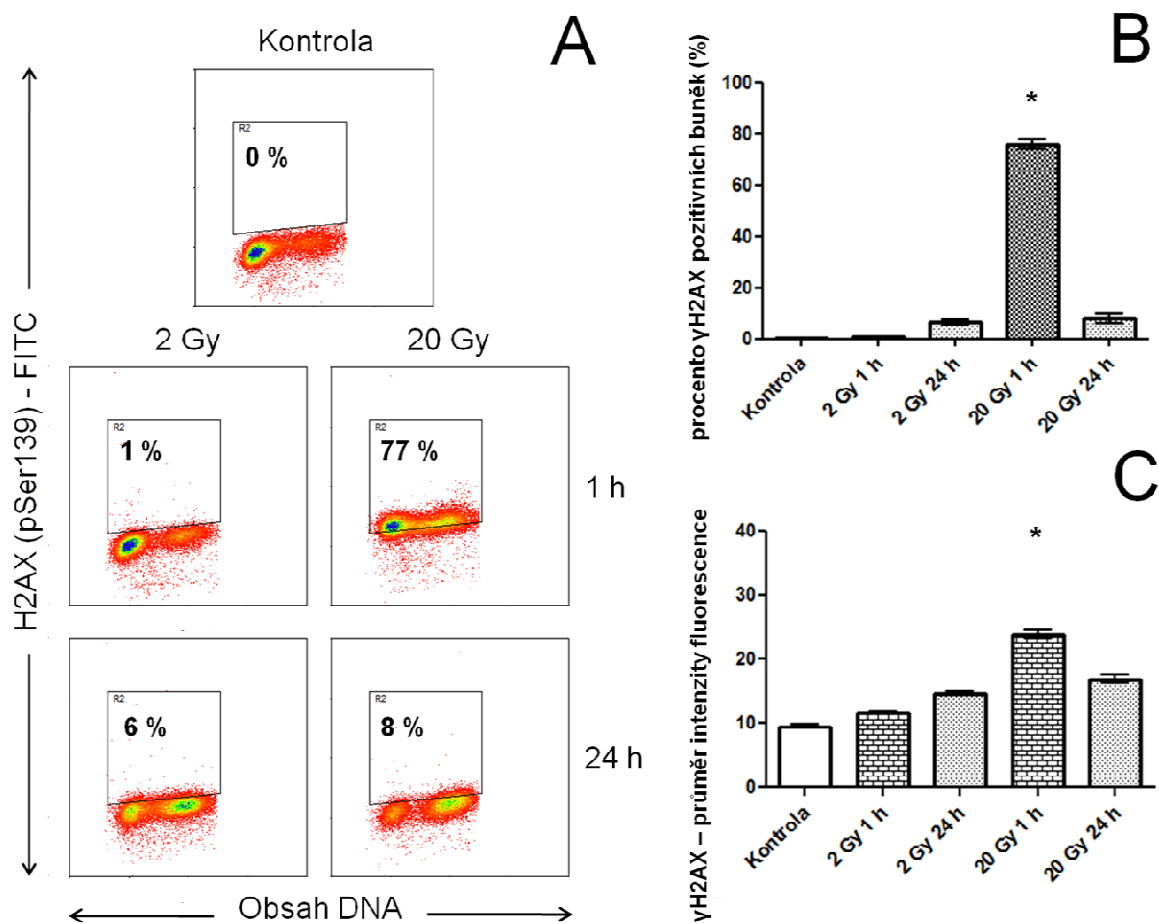
**Fig. 16. Bílý krevní obraz 24 hodin od ozáření hrudníku.** Sloupce grafu znázorňují počet bílých krevních elementů  $\times 10^9/l$  v periferní krvi potkana po expozici na oblast hrudníku rozdílným dávkám gama záření. Graf reprezentuje aritmetický průměr,  $n = 6$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), t-test.



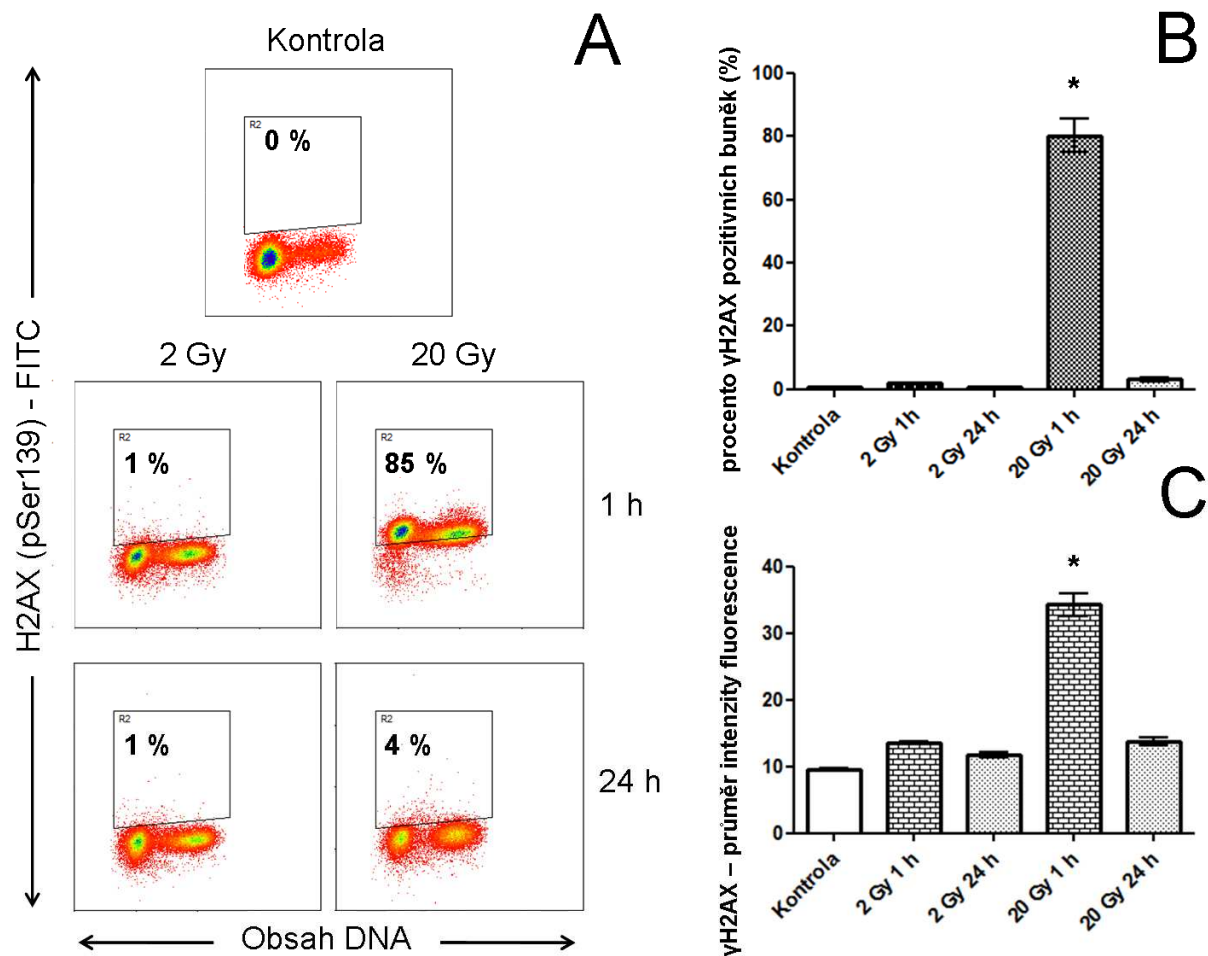
### 5.3. Fosforylace histonu H2AX na serinu 139 *in vitro*

#### 5.3.1. Vliv ionizujícího záření na množství $\gamma$ H2AX v kmenových buňkách

Pomocí průtokové cytometrie jsme sledovali množství DSB po ozáření *in vitro* prostřednictvím fosforylace histonu H2AX v MKB zubní pulpy a periodontálního ligamenta. Ke studiu tvorby histonu  $\gamma$ H2AX v MKB jsme použili dvě dávky gama záření, relativně nízkou, běžně používanou ve frakcionované radioterapii nádorů (2 Gy) a extrémní (20 Gy). Stanovení  $\gamma$ H2AX jsme provedli pro každý typ buněk 1 a 24 hodin od ozáření, vždy ve třech nezávislých experimentech. U obou typů MKB jsme 1 hodinu od ozáření dávkou 20 Gy pozorovali masivní, statisticky významný vzestup  $\gamma$ H2AX (zubní pulpy 77 %  $\gamma$ H2AX-pozitivních buněk, periodontálního ligamenta 85 %  $\gamma$ H2AX-pozitivních buněk). Dvacet čtyři hodin od ozáření byl u skupin ozářených dávkou 20 Gy pozorován pokles výskytu  $\gamma$ H2AX, nebylo však dosaženo úrovně kontrolní neozářené skupiny. Výsledné hodnoty  $\gamma$ H2AX 24 hodin od ozáření dávkou 20 Gy se však na hladině statistické významnosti  $p \leq 0,05$  nelišily od kontrol pro oba buněčné typy. Reziduální  $\gamma$ H2AX však stále představovaly mezi 4 a 8 % buněk v oblasti vysoké imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC. Dávka 2 Gy nevedla 1 h od ozáření obou typů kmenových buněk k detekovatelnému vzestupu  $\gamma$ H2AX pomocí průtokové cytometrie (obr.17, 18).



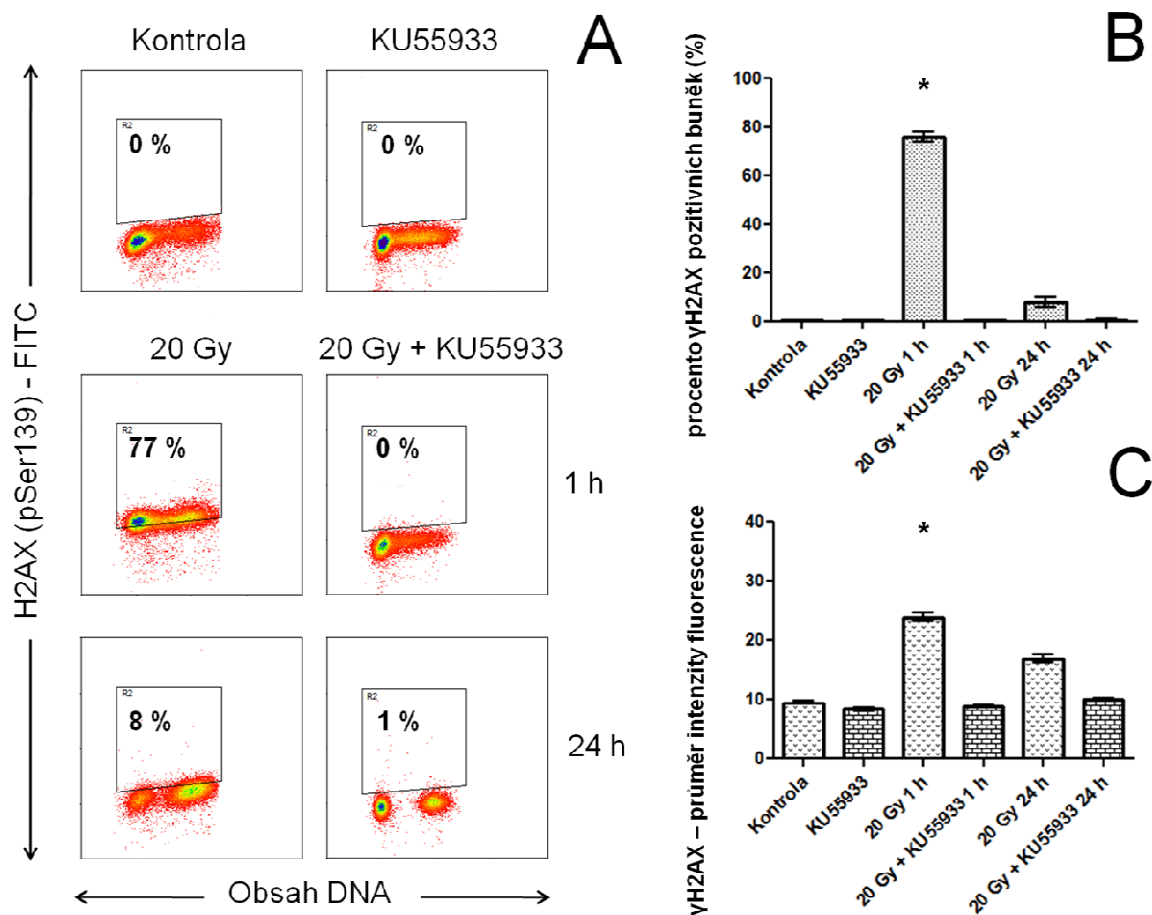
**Obr. 17. Histogramy stanovení  $\gamma$ H2AX (A), procento  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk určené pomocí gating analýzy (B) a graf intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC (C) v kmenových buňkách zubní pulpy 1 a 24 h od ozáření dávkami 2 a 20 Gy *in vitro*. Kmenové buňky zubní pulpy kontrolní; ozářené  $\gamma$  zářením v dávce 2 a 20 Gy byly ponechány v kultuře po dobu 1 nebo 24 hodin. Přítomnost  $\gamma$ H2AX byla měřena imunocytochemicky pomocí primární fosfo-epitop specifické protilátky konjugované s fluorescein isothiokyanátem (FITC) spolu s analýzou buněčného cyklu podle obsahu DNA (vazba propidium jodidu). **A.** Data jsou ve formě dvourozměrných histogramů logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC na ose y versus intenzita fluorescence propidium jodidu na ose x. Jsou zobrazeny reprezentativní výsledky ze tří experimentů. Ionizujícím zářením indukovaná tvorba  $\gamma$ H2AX byla určena pomocí gatovací analýzy. Jednotlivé gaty byly vytvořeny pomocí cytometrického softwaru s cílem ohraničit tzv. vnitřní (“programovanou”) tvorbu  $\gamma$ H2AX v kontrolách (rámečky). Procento buněk spadajících do těchto gatů bylo definováno jako procento buněk  $\gamma$ H2AX protein pozitivních (obsahujících protein  $\gamma$ H2AX), mimo tyto gaty byly buňky posuzovány jako negativní. Jsou uvedeny reprezentativní histogramy z  $5 \times 10^4$  buněk. **B.** Sloupcový graf vytvořený pomocí gatovací analýzy znázorňuje procento  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk v závislosti na obdržené dávce a čase od ozáření,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. **C.** Sloupcový graf aritmetického průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC pro dávky 2 a 20 Gy a intervaly 1 a 24 h od ozáření,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), t-test.**



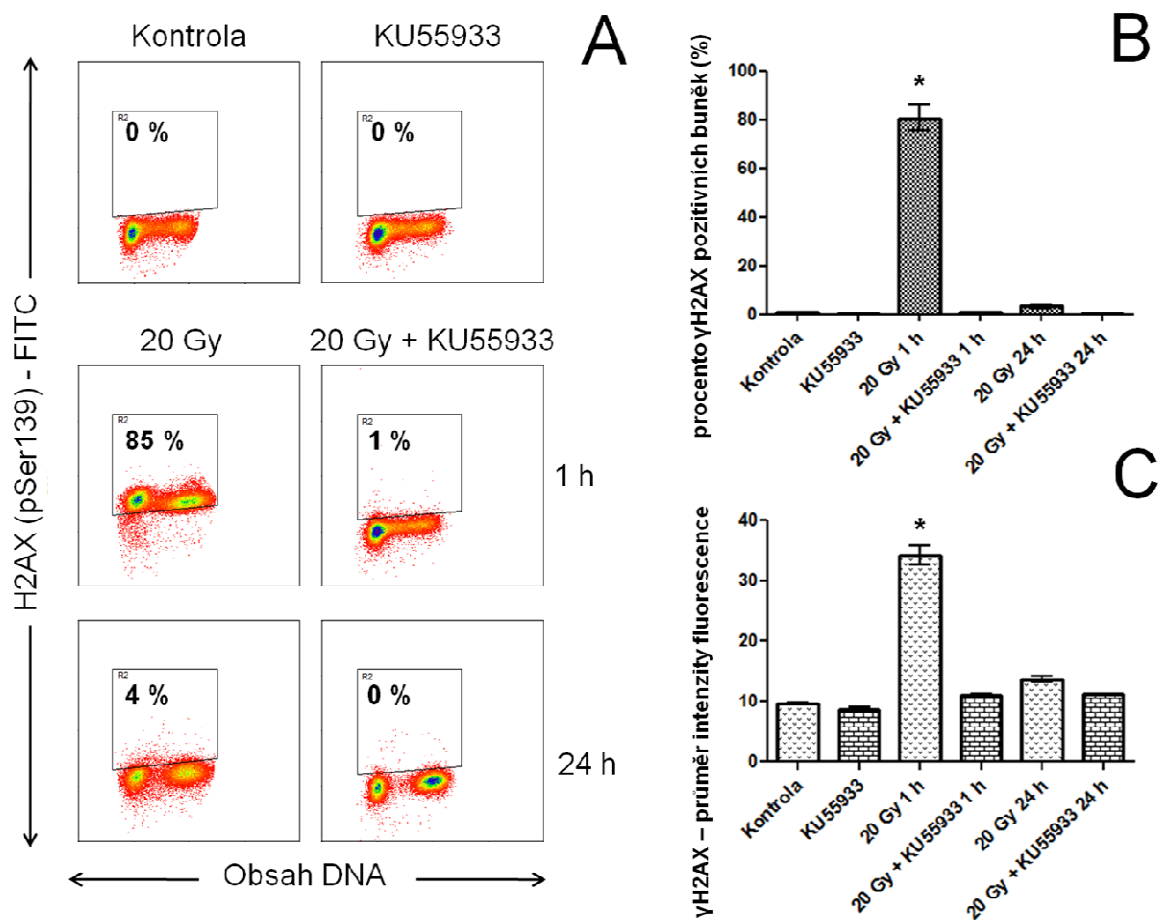
**Obr. 18. Histogramy stanovení  $\gamma$ H2AX (A), procento  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk určené pomocí gating analýzy (B) a graf intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC (C) v kmenových buňkách periodontálního ligamenta 1 a 24 h od ozáření dávkami 2 a 20 Gy *in vitro*. Kmenové buňky periodontálního ligamenta kontrolní; ozářené  $\gamma$  zářením v dávce 2 a 20 Gy byly ponechány v kultuře po dobu 1 nebo 24 hodin. Přítomnost  $\gamma$ H2AX byla měřena imunocytochemicky pomocí primární fosfo-epitop specifické protilátky konjugované s fluorescein isothiokyanátem (FITC) spolu s analýzou buněčného cyklu podle obsahu DNA (vazba propidium jodidu). A. Data jsou ve formě dvourozměrných histogramů logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC na ose y versus intenzita fluorescence propidium jodidu na ose x. Jsou zobrazeny reprezentativní výsledky ze tří experimentů. Ionizujícím zářením indukovaná tvorba  $\gamma$ H2AX je určena pomocí gatovací analýzy. Jednotlivé gaty byly vytvořeny pomocí cytometrického softwaru s cílem ohraničit tzv. vnitřní (“programovanou”) tvorbu  $\gamma$ H2AX v kontrolách (rámečky). Procento buněk spadajících do těchto gatů bylo definováno jako procento buněk  $\gamma$ H2AX protein pozitivních (obsahujících protein  $\gamma$ H2AX), mimo tyto gaty byly buňky posuzovány jako negativní. Jsou uvedeny reprezentativní histogramy z  $5 \times 10^4$  buněk. B. Sloupcový graf vytvořený pomocí gatovací analýzy znázorňuje procento  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk v závislosti na obdržené dávce a čase od ozáření,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. C. Sloupcový graf aritmetického průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC pro dávky 2 a 20 Gy a intervaly 1 a 24 h od ozáření,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), t-test.**

### **5.3.2. Vliv inhibice ATM kinasy na ionizujícím zářením-indukovanou tvorbu $\gamma$ H2AX v kmenových buňkách**

Ke sledování dopadu inhibice ATM kinasy na fosforylaci histonu H2AX po působení ionizujícího záření jsme využili komerčně dostupného inhibitoru KU55933. KU55933 je vysoce účinný, selektivní kompetitivní inhibitor ATM kinasy. Při vlastním provedení experimentů jsme 1 hodinu před ozářením subkonfluentních MKB (buňky byly nasazeny 24 h předem v kompletním mediu bez inhibitoru) do kultivačního media přidali zásobní roztok KU55933 v DMSO v takovém množství, aby bylo dosaženo finální koncentrace v mediu  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Kontrolní buňky byly kultivovány v přítomnosti  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  inhibitoru, bylo s nimi zacházeno shodně, avšak nebyly ozářeny. Inhibitor byl přítomný v mediu po celou dobu kultivace buněk a to jak buněk ozářených, tak neozářených. Obě linie MKB reagovaly na ozáření v dávce 20 Gy z pohledu výskytu  $\gamma$ H2AX podobně. Samotné ozáření vedlo ke statisticky významné tvorbě  $\gamma$ H2AX 1 h od vystavení buněk dávce 20 Gy. Při inhibici ATM kinasy došlo u ozářených kmenových buněk zubní pulpy (obr. 19) a periodontálního ligamenta (obr. 20) k signifikantnímu utlumení fosforylace histonu H2AX. Tento fakt potvrdili oba typy analýzy dat z průtokové cytometrie.



**Obr. 19. Histogramy stanovení  $\gamma$ H2AX (A), procento  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk určené pomocí gating analýzy (B) a graf intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC (C) v kmenových buňkách zubní pulpy 1 a 24 h od ozáření dávkou 20 Gy *in vitro*. Kmenové buňky zubní pulpy kultivované v kompletním mediu, kultivované v přítomnosti 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  KU55933, preinkubované po dobu 1 h před ozáření (20 Gy) s 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  KU55933 byly ponechány v kultuře po dobu 1 nebo 24 h. Histon  $\gamma$ H2AX byl stanoven imunocytochemicky pomocí primární fosfo-epitop specifické protilátky konjugované s fluorescein isothiokyanátem (FITC) spolu s analýzou buněčného cyklu podle obsahu DNA (vazba propidium jodidu). **A.** Data jsou ve formě dvourozměrných histogramů logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC na ose y versus intenzita fluorescence propidium jodidu na ose x. Jsou zobrazeny reprezentativní výsledky ze tří experimentů. Ionizujícím zářením indukovaná tvorba  $\gamma$ H2AX je určena pomocí gatovací analýzy. Jednotlivé gaty byly vytvořeny pomocí cytometrického softwaru s cílem ohraničit tzv. vnitřní (“programovanou”) tvorbu  $\gamma$ H2AX v kontrolách (rámečky). Procento buněk spadajících do těchto gatů bylo definováno jako procento buněk  $\gamma$ H2AX protein pozitivních (obsahujících protein  $\gamma$ H2AX), mimo tyto gaty byly buňky posuzovány jako negativní. Uvedeny reprezentativní histogramy z  $5 \times 10^4$  buněk. **B.** Sloupcový graf je vytvořen pomocí gatovací analýzy znázorňuje procento  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk v závislosti na obdržené dávce a čase od ozáření,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. **C.** Sloupcový graf aritmetického průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC pro dávku 20 Gy a intervaly 1 a 24 h od ozáření,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), t-test.**



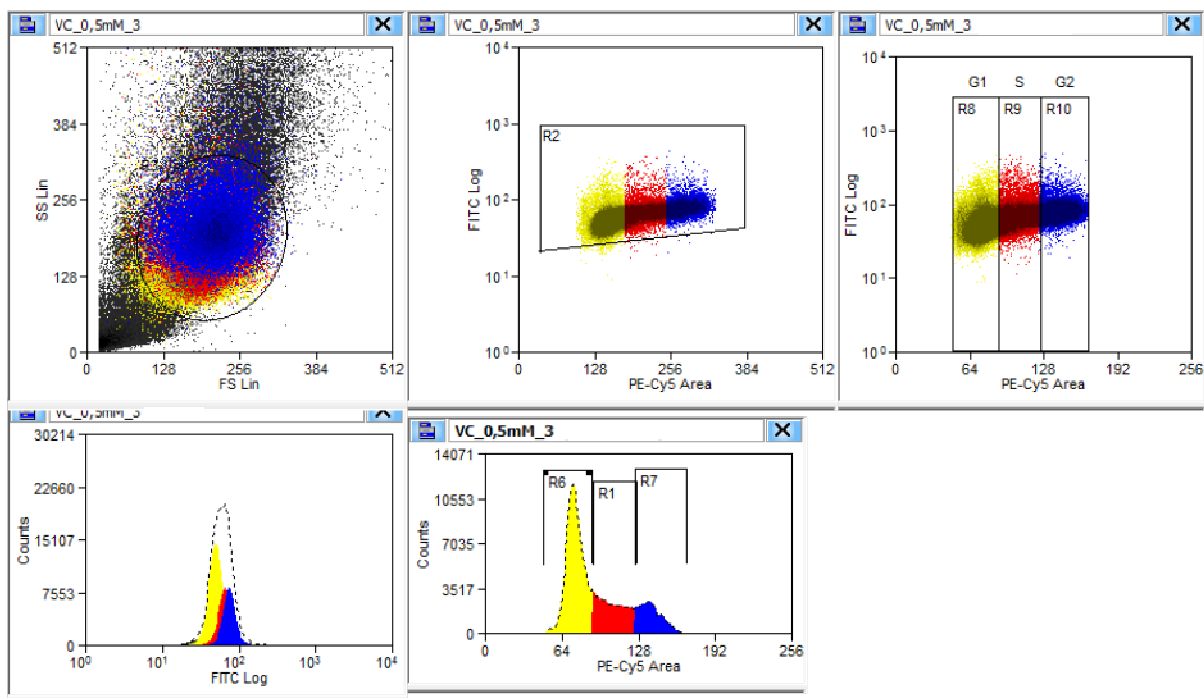
**Obr. 20. Histogramy stanovení  $\gamma$ H2AX (A), procento  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk určené pomocí gating analýzy (B) a graf intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC (C) v kmenových buňkách periodontálního ligamenta 1 a 24 h od ozáření dávkou 20 Gy *in vitro*. Kmenové buňky periodontálního ligamenta kultivované v kompletním mediu, kultivované v přítomnosti  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  KU55933, preinkubované po dobu 1 h před ozáření (20 Gy) s  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  KU55933 byly ponechány v kultuře po dobu 1 nebo 24 h. Histon  $\gamma$ H2AX byl stanoven imunocytochemicky pomocí primární fosfo-epitop specifické protilátky konjugované s fluorescein isothiokyanátem (FITC) spolu s analýzou buněčného cyklu podle obsahu DNA (vazba propidium jodidu). **A.** Data jsou ve formě dvourozměrných histogramů logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC na ose y versus intenzita fluorescence propidium jodidu na ose x. Jsou zobrazeny reprezentativní výsledky ze tří experimentů. Ionizujícím zářením indukovaná tvorba  $\gamma$ H2AX je určena pomocí gatovací analýzy. Jednotlivé gaty byly vytvořeny pomocí cytometrického softwaru s cílem ohraničit tzv. vnitřní (“programovanou”) tvorbu  $\gamma$ H2AX v kontrolách (rámečky). Procento buněk spadajících do těchto gatů bylo definováno jako procento buněk  $\gamma$ H2AX protein pozitivních (obsahujících protein  $\gamma$ H2AX), mimo tyto gaty byly buňky posuzovány jako negativní. Uvedeny reprezentativní histogramy z  $5 \times 10^4$  buněk. **B.** Sloupcový graf vytvořený pomocí gatovací analýzy znázorňuje procento  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk v závislosti na obdržené dávce a čase od ozáření,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. **C.** Sloupcový graf aritmetického průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC pro dávku 20 Gy a intervaly 1 a 24 h od ozáření,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), t-test.**

### 5.3.3. Vliv vanadocen dichloridu, cisplatiny a ionizujícího záření na vznik $\gamma$ H2AX v buňkách lidské promyelocytární leukemie HL-60

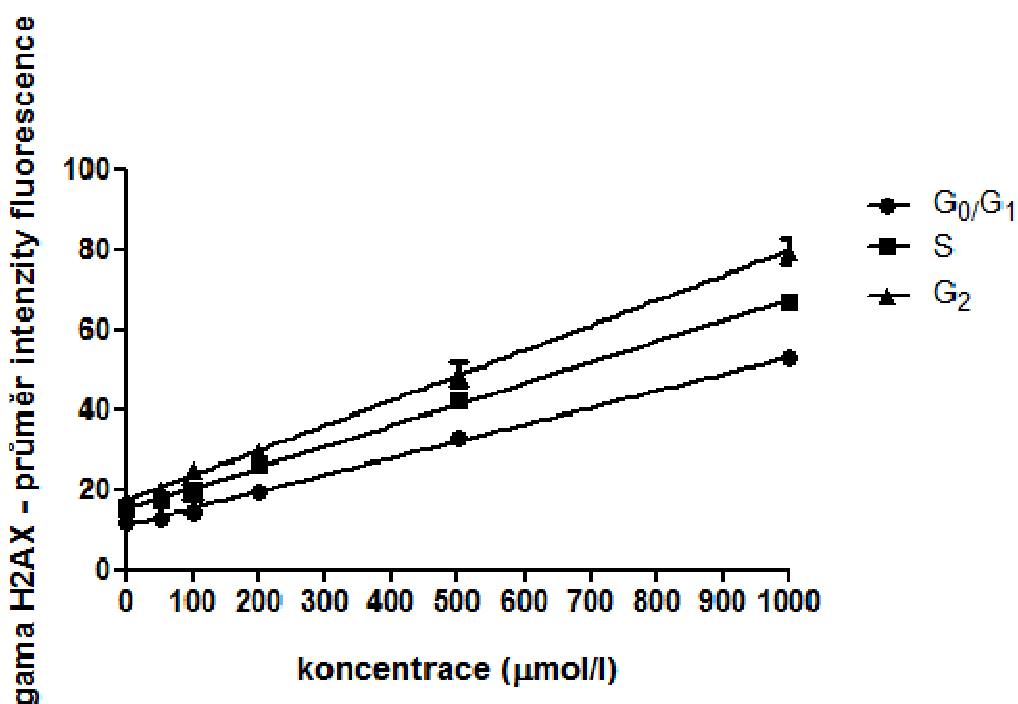
Obrázek č. 21 znázorňuje gating strategii při stanovení  $\gamma$ H2AX pro jednotlivé fáze buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Vanadocen dichlorid po svém jednohodinovém působení na buňky lidské promyelocytární leukemie HL-60 v koncentraci 0-1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  vyvolal lineární dávkově závislé zvýšení průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC. Zvýšení průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC po působení vanadocen dichloridu se ukázalo jako velice masivní a nezávislé na fázi buněčného cyklu HL-60. Statisticky významný vzestup ( $p \leq 0,05$ , t-test) byl pozorován od dávky 100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  pro S a G2 fázi, a 200  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  pro G0/G1 fázi buněčného cyklu (obr. 22). Koncentrace 1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  indukovala tvorbu histonu  $\gamma$ H2AX v 100 % buněk HL-60, ve srovnání s kontrolou, kde bylo detekováno 0 % buněk obsahujících  $\gamma$ H2AX. Výskyt  $\gamma$ H2AX klesal úměrně s klesající dávkou vanadocen dichloridu a naopak (obr. 23).

Cisplatina způsobila dávkově závislý vzestup fosforylace H2AX na serinu 139. Statisticky významný vzestup ( $p \leq 0,05$ , t-test) byl pozorován od dávky 100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  pro S a G2 fázi, a 200  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  pro G0/G1 fázi buněčného cyklu (obr. 24). Koncentrace cisplatiny 1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  vyvolala tvorbu  $\gamma$ H2AX u 49 % buněk. Největší vzestup  $\gamma$ H2AX byl pozorován primárně u buněk v S fázi, méně G1 fázi buněčného cyklu. Je nutné podotknout, že vzestup  $\gamma$ H2AX po působení cisplatiny není tak masivní, jako v případě vanadocen dichloridu (obr. 25).

Expozice buněk gama záření v dávkách 2, 6 a 20 Gy vedla 1 hodinu od ozáření k dávkově závislému vzestupu  $\gamma$ H2AX. Tento fakt je zřejmý jak z grafů průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v závislosti na obdržené dávce záření (obr. 26), tak z jednotlivých histogramů průtokové cytometrie (obr. 27). Statisticky významný vzestup ( $p \leq 0,05$ , t-test) byl pozorován od dávky 2, 6 a 20 Gy pro všechny fáze buněčného cyklu. Dávka 20 Gy vyvolala pozitivitu na  $\gamma$ H2AX u 94 % buněk HL-60, kontrolní buňky vykazovaly 0%  $\gamma$ H2AX pozitivitu.



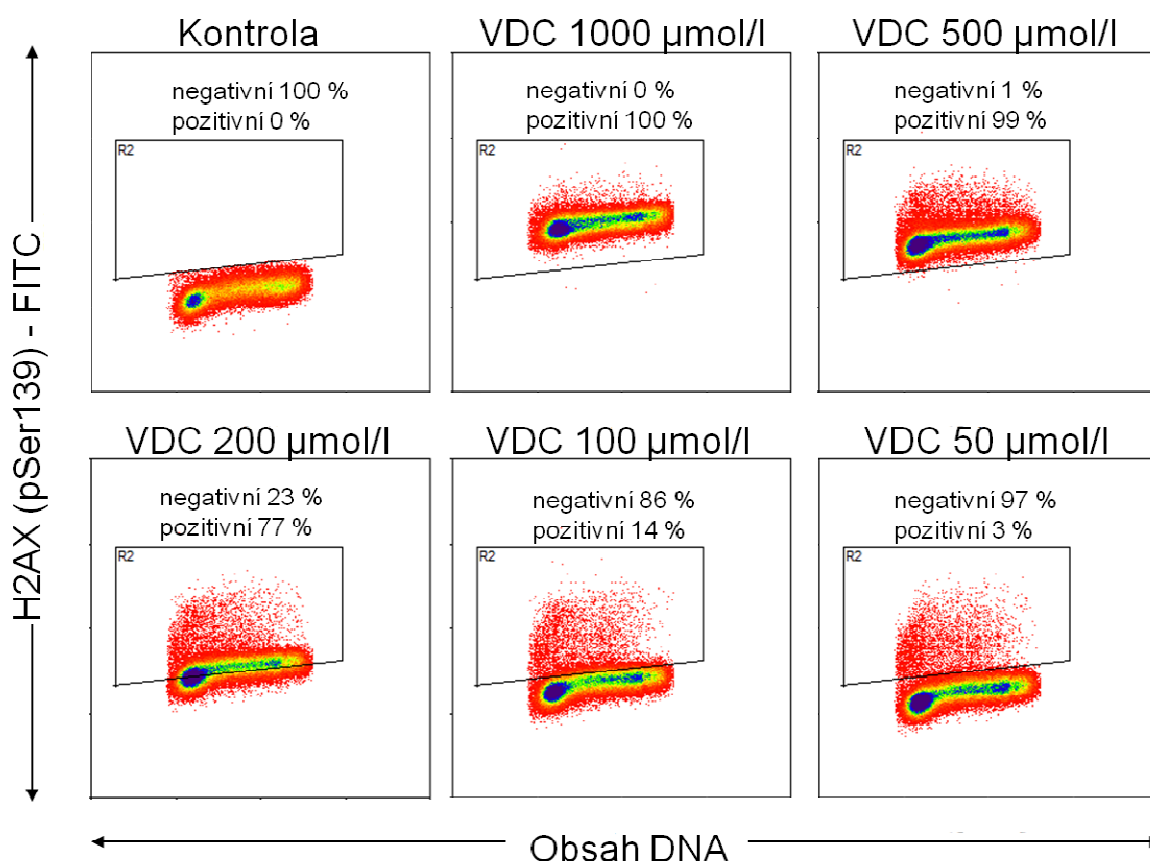
Obr. 21. Gating strategie při analýze průměru intenzity imunofluorescence FITC protilátky proti H2AX fosforylovanému na Serinu 139 pro jednotlivé fáze buněčného cyklu.



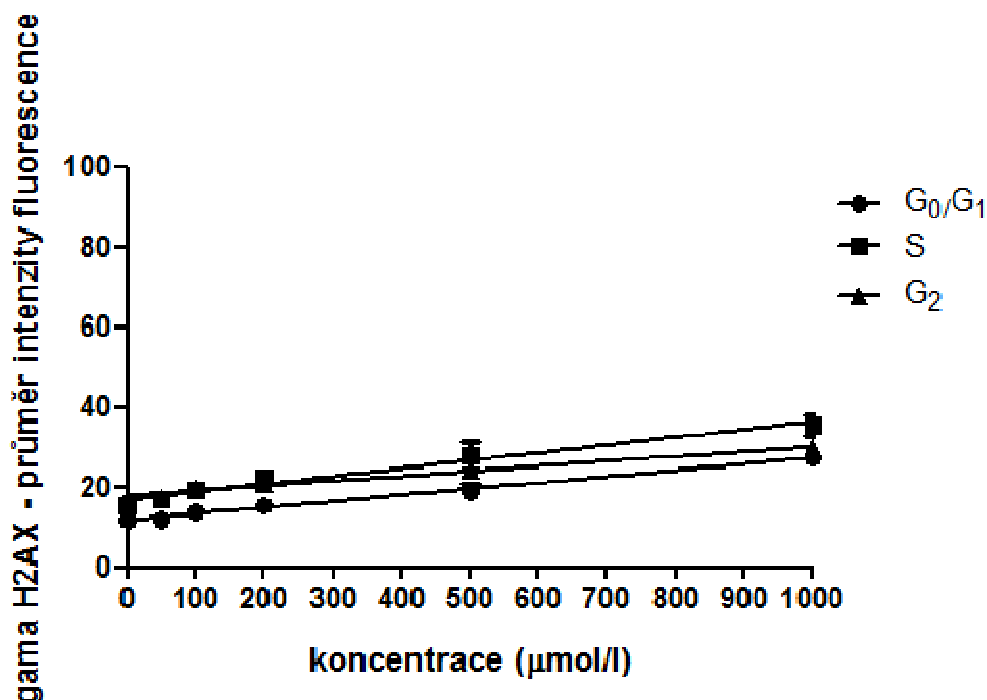
Obr. 22. Flow cytometrická kvantifikace imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v buňkách HL-60 po 1 h inkubaci s vanadocen dichloridem *in vitro*. Buňky HL-60 byly po dobu jedné hodiny inkubovány s vanadocen dichloridem v koncentraci 0 - 1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Histon  $\gamma$ H2AX byl detekován imunocytochemicky pomocí primární fosfo-epitop specifické protilátky konjugované s fluorescein isothiokyanátem (FITC) spolu s analýzou buněčného cyklu podle



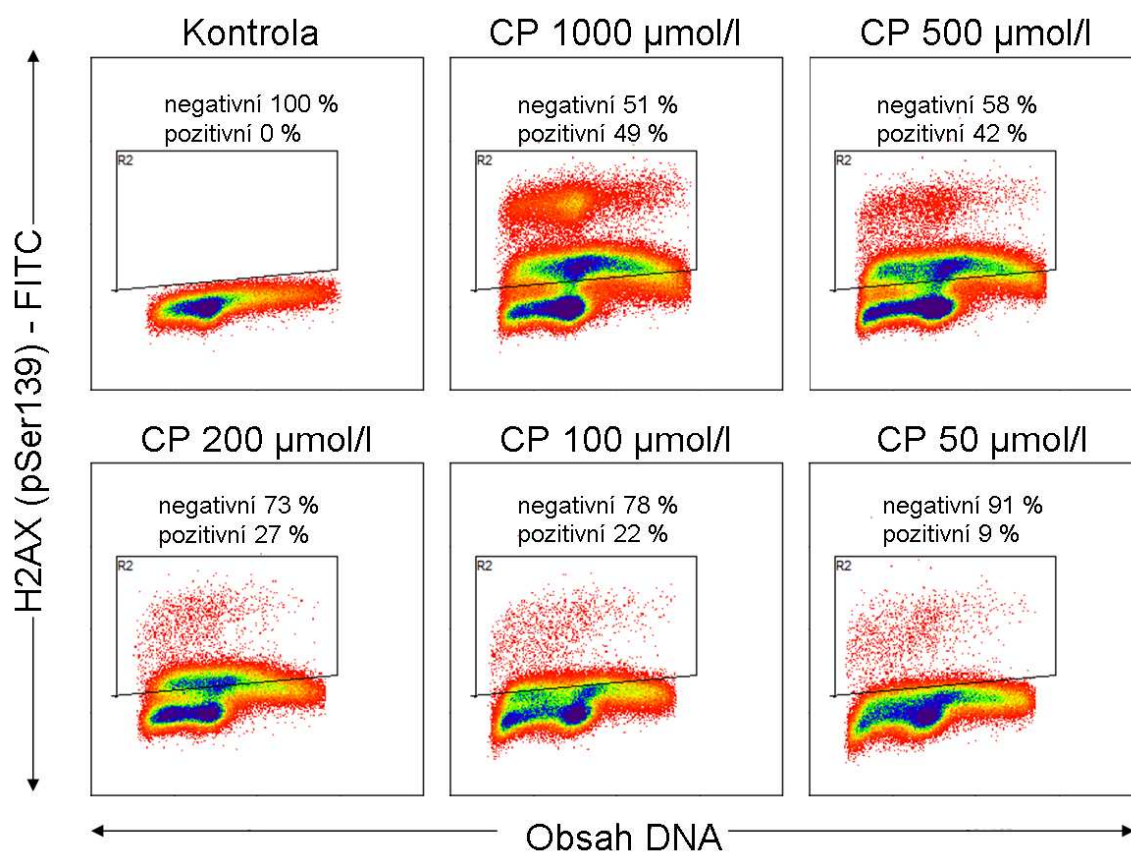
obsahu DNA (vazba propidium jodidu). Průměr buněčné imunofluorescence byl analyzován průtokovou cytometrií pro buňky v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Graf ukazuje aritmetický průměr imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v závislosti na koncentraci vanadocen dichloridu a jednotlivých fázích buněčného cyklu. Jednu hodinu od vystavení buněk vanadocen dichloridu byl pozorován lineární dávkově závislý vzestup intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Parametry lineární regresní křivky pro jednotlivé fáze buněčného cyklu: G0/G1:  $y = 41,84x + 11,20$ ,  $R^2 = 0,9984$ ; S:  $y = 52,84x + 15,11$ ,  $R^2 = 0,9984$ ; G2  $y = 62,32x + 17,42$ ,  $R^2 = 0,9990$ .  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. Statisticky významný vzestup intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC ( $p \leq 0,05$ , t-test) oproti kontrole po dávkách 200, 500 a 1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  pro G0/G1; 100, 200, 500 a 1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  pro S a G2 fázi buněčného cyklu.



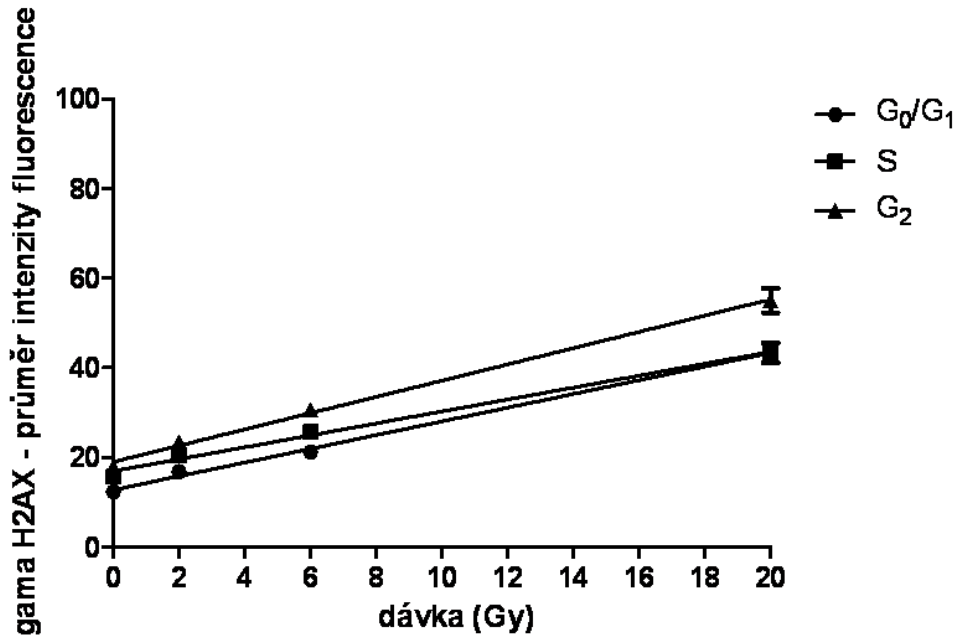
**Obr. 23. HL-60. Histogramy stanovení  $\gamma$ H2AX po 1 h inkubaci s vanadocen dichloridem *in vitro*.** Dvourozměrné histogramy (tzv. “dot plot”) logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC na ose y versus intenzita fluorescence propidium jodidu (obsah jaderné DNA v jednotlivých fázích buněčného cyklu) na ose x. Obrázek je tvořen reprezentativními dot-ploty z tří nezávisle analyzovaných vzorků pro každou skupinu. Pro stanovení VDC-indukované tvorby  $\gamma$ H2AX jsme využili gatovací analýzy. Jednotlivé gaty byly vytvořeny pomocí cytometrického softwaru s cílem ohraničit tzv. vnitřní (“programovanou”) tvorbu  $\gamma$ H2AX v kontrolách (rámečky). Procento buněk spadajících do těchto gatů bylo definováno jako procento buněk  $\gamma$ H2AX protein pozitivních (oblast vysoké imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC), mimo tyto gaty byly buňky posuzovány jako  $\gamma$ H2AX protein negativní (oblast nízké imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC). Uvedeny reprezentativní histogramy z  $5 \times 10^4$  buněk.



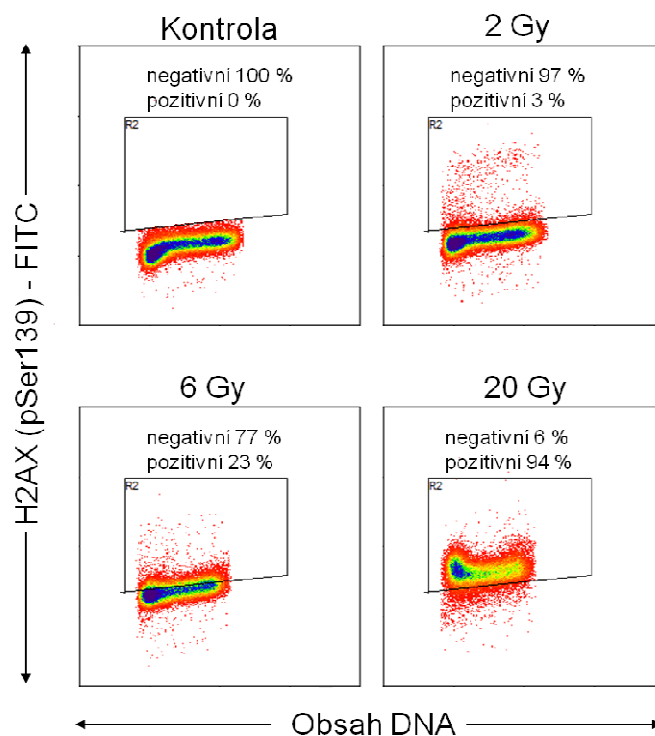
**Obr. 24. Flow cytometrická kvantifikace imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v buňkách HL-60 po 1 h inkubaci s cisplatinou *in vitro*.** Buňky HL-60 byly po dobu jedné hodiny inkubovány s cisplatinou v koncentraci 0 - 1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Histon  $\gamma$ H2AX byl detekován imunocytochemicky pomocí primární fosfo-epitop specifické protilátky konjugované s fluorescein isothiokyanátem (FITC) spolu s analýzou buněčného cyklu podle obsahu DNA (vazba propidium jodidu). Průměr buněčné fluorescence byl analyzován průtokovou cytometrií pro buňky v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Graf ukazuje aritmetický průměr intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v závislosti na koncentraci cisplatiny a jednotlivých fázích buněčného cyklu. Jednu hodinu od vystavení buněk cisplatině pozorován lineární dávkově závislý vzestup imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Parametry lineární regresní křivky pro jednotlivé fáze buněčného cyklu: G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>:  $y = 15,49x + 11,75$ ,  $R^2 = 0,9878$ ; S:  $y = 19,54x + 16,85$ ,  $R^2 = 0,9698$ ; G<sub>2</sub>  $y = 12,21x + 17,81$ ,  $R^2 = 0,9767$ .  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. Statisticky významný vzestup intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC ( $p \leq 0,05$ , t-test) oproti kontrole po dávkách 200, 500 a 1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  pro G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>; 100, 200, 500 a 1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  pro S a G<sub>2</sub> fázi buněčného cyklu.



**Obr. 25. HL-60. Histogramy stanovení  $\gamma\text{H2AX}$  po 1 h inkubaci s cisplatinou *in vitro*.** Dvourozměrné histogramy (tzv. “dot plot”) logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma\text{H2AX}$ -FITC na ose y versus intenzita fluorescence propidium jodidu (obsah jaderné DNA v jednotlivých fázích buněčného cyklu) na ose x. Obrázek je tvořen reprezentativními dot-ploty z tří nezávisle analyzovaných vzorků pro každou skupinu. Pro stanovení cisplatinou-indukované tvorby  $\gamma\text{H2AX}$  jsme využili gatovací analýzy. Jednotlivé gaty byly vytvořeny pomocí cytometrického softwaru s cílem ohraničit tzv. vnitřní (“programovanou”) tvorbu  $\gamma\text{H2AX}$  v kontrolách (rámečky). Procento buněk spadajících do těchto gatů bylo definováno jako procento buněk  $\gamma\text{H2AX}$  protein pozitivních (oblast vysoké imunofluorescence  $\gamma\text{H2AX}$ -FITC), mimo tyto gaty byly buňky posuzovány jako  $\gamma\text{H2AX}$  protein negativní (oblast nízké imunofluorescence  $\gamma\text{H2AX}$ -FITC). Uvedeny reprezentativní histogramy z  $5 \times 10^4$  buněk.



**Obr. 26. Flow cytometrická kvantifikace imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v buňkách HL-60 1 h od ozáření *in vitro*.** Buňky HL-60 byly ozářeny dávkami v rozmezí 2-20 Gy. Jednu hodinu od ozáření byl  $\gamma$ H2AX detekován imunocytochemicky pomocí primární fosfoepitop specifické protilátky konjugované s fluorescein isothiokyanátem (FITC) spolu s analýzou buněčného cyklu podle obsahu DNA (vazba propidium jodidu). Průměr buněčné fluorescence byl analyzován průtokovou cytometrií pro buňky v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Graf ukazuje aritmetický průměr intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v závislosti na dávce gama záření a jednotlivých fázích buněčného cyklu. Parametry lineární regresní křivky pro jednotlivé fáze buněčného cyklu: G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>:  $y = 1,53x + 12,75$ ,  $R^2 = 0,9972$ ; S:  $y = 1,32x + 17,22$ ,  $R^2 = 0,9885$ ; G<sub>2</sub>  $y = 1,84x + 19,01$ ,  $R^2 = 0,9968$ . Jednu hodinu od expozice buněk gama záření byl pozorován lineární dávkově závislý vzestup intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v jednotlivých fázích buněčného cyklu,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. Statisticky významný vzestup intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC ( $p \leq 0,05$ , t-test) oproti kontrole po dávkách 2, 6 a 20 Gy pro G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub> fázi buněčného cyklu.



**Obr. 27. HL-60. Histogramy stanovení  $\gamma$ H2AX 1 h od ozáření *in vitro*.** Dvourozměrné histogramy (tzv. “dot plot”) logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC na ose y versus intenzita fluorescence propidium jodidu (obsah jaderné DNA v jednotlivých fázích buněčného cyklu) na ose x. Obrázek je tvořen reprezentativními dot-ploty z tří nezávisle analyzovaných vzorků pro každou skupinu. Pro stanovení záření-indukované tvorby  $\gamma$ H2AX jsme využili gatovací analýzy. Jednotlivé gaty byly vytvořeny pomocí cytometrického softwaru s cílem ohraničit tzv. vnitřní (programovanou) tvorbu  $\gamma$ H2AX v kontrolách (rámečky). Procento buněk spadajících do těchto gatů bylo definováno jako procento buněk  $\gamma$ H2AX protein pozitivních (oblast vysoké imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC), mimo tyto gaty byly buňky posuzovány jako  $\gamma$ H2AX protein negativní (oblast nízké imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC). Uvedeny histogramy z  $5 \times 10^4$  buněk.

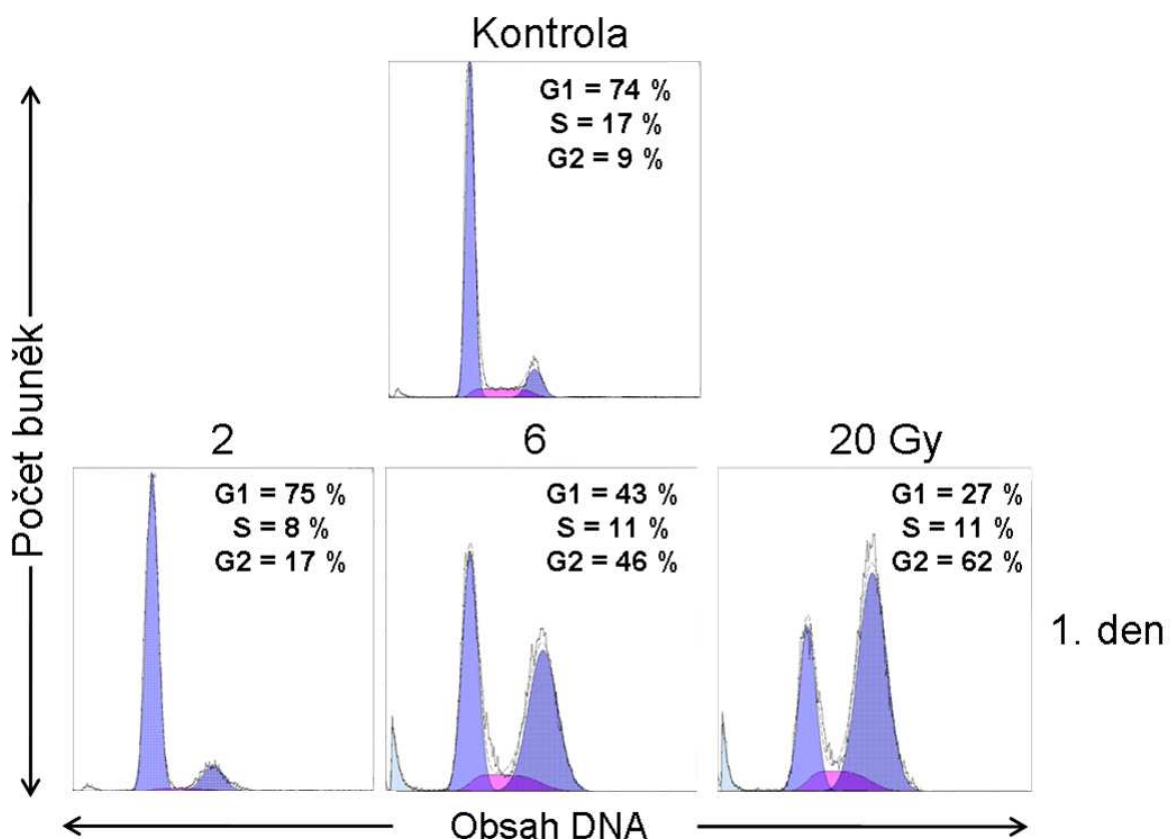
#### 5.4. Analýza buněčného cyklu po působení genotoxických agens

##### 5.4.1. Vliv ionizujícího záření na buněčný cyklus

Expozice MKB periodontálního ligamenta a kostní dřeně gama záření v dávce 6 a 20 Gy vedlo k dávkově závislé (MKB periodontálního ligamenta: 6 Gy 46 %, 20 Gy 62 %, kontrola 9 %), nebo dávkově nezávislé (MKB kostní dřeně: 6 Gy 36 %, 20 Gy 35 %, kontrola 12 %) akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu 1. den od ozáření (obr. 28 a 29 ). Akumulace MKB v G2 fázi buněčného cyklu přetrvávala po ozáření 20 Gy až do konce pokusu (6. den od ozáření). V G2 fázi buněčného cyklu bylo u MKB periodontálního ligamenta 1.

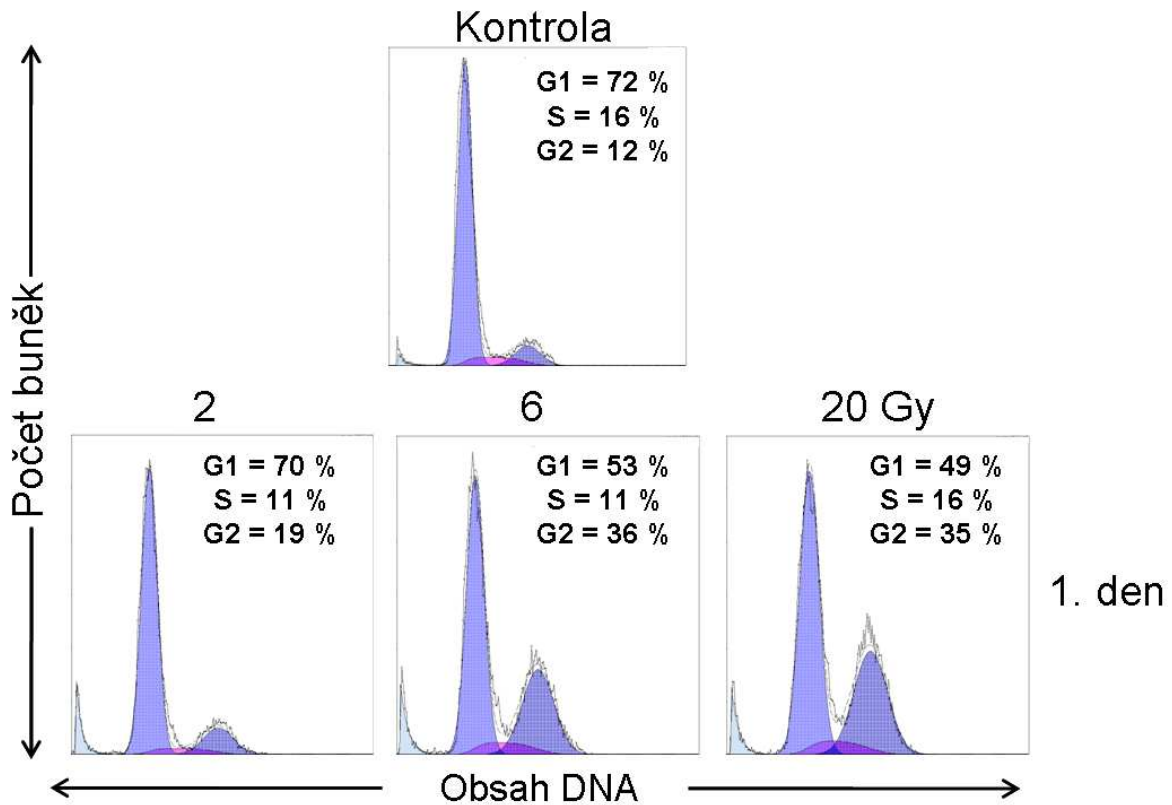
den 62 % a 6. den 58 % buněk. U MKB kostní dřeně nebyl vzestup počtu buněk v G2 fázi tak markantní, jako u buněk MKB periodontálního ligamenta, nicméně vzestup byl patrný celý sledovaný interval (1. den 35 %, 6. den 36 %). Apoptóza nebyla pozorována. Procento buněk v sub-G1 fázi bylo u kmenových buněk vždy pod 0,5 %. Hodnotili jsme tedy jen buňky v cyklu (obr. 30 a 31).

Podobně jako u kmenových buněk, tak i u buněk lidské promyelocytární leukémie vedla expozice ionizujícímu záření v dávce 6 Gy první den od ozáření ke G2 bloku (70 % buněk v G2 fázi buněčného cyklu). Na rozdíl od kmenových buněk jsme u buněk HL-60 pozorovali indukci apoptózy. Apoptóza byla nejvyšší 3. den od ozáření. Zástava buněčného cyklu v G2 fázi nebyla 3. den od ozáření již detekována, neboť většina buněk zahynula apoptózou (obr. 32). Apoptotické buňky byly detekovány v sub-G1 peaku. Procento apoptotických buněk vzrůstalo v závislosti na čase od ozáření, 5 % 1. den a 78 % 3. den od ozáření.

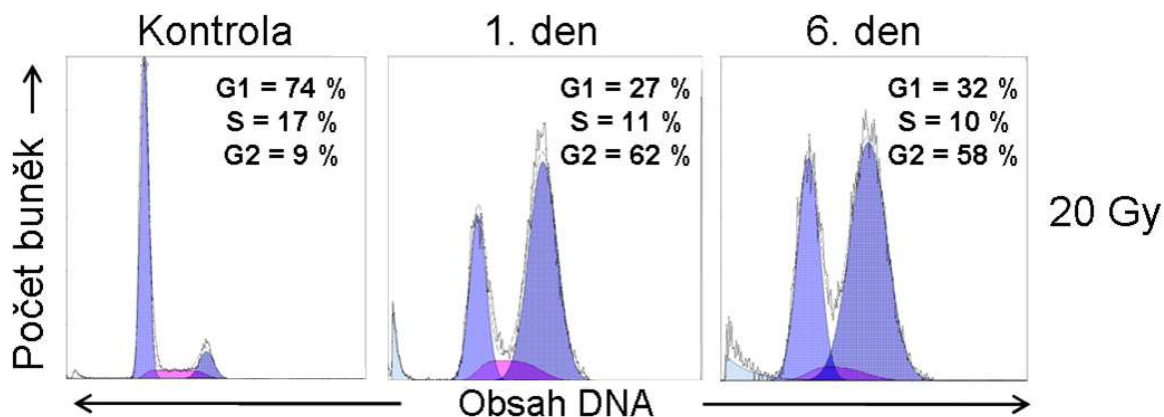


**Obr. 28. Kmenové buňky periodontálního ligamenta. Analýza buněčného cyklu 1. den od ozáření *in vitro*, dávková závislost.** Kmenové buňky periodontálního ligamenta kultivované v kompletním mediu byly ozářeny dávkami 2, 6 a 20 Gy a následně ponechány v kultuře po

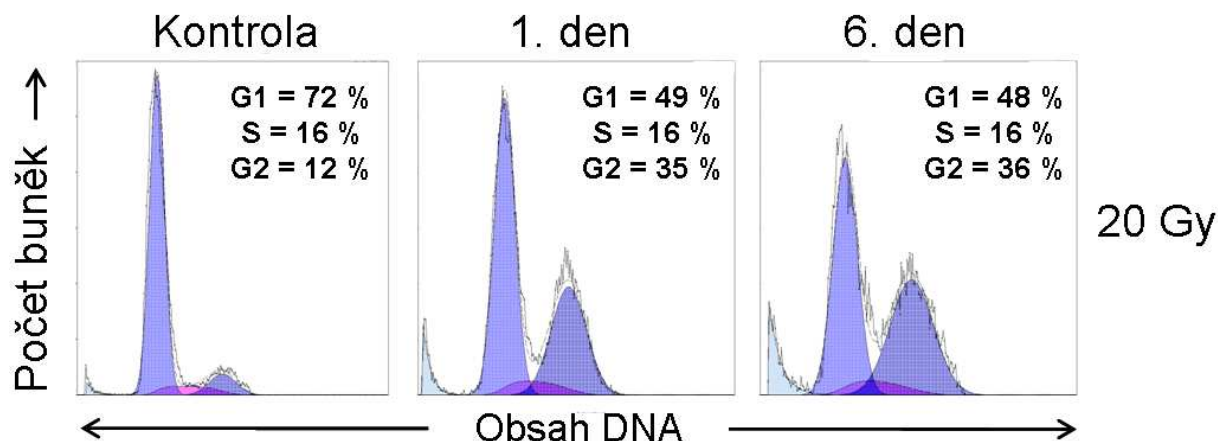
dobu 24 hodin. Procento buněk v cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. G1, S a G2 – procento buněk v G1-, S- a G2- fázi. Expozice gama záření v dávce 6 a 20 Gy vedla k dávkově závislé akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Procento sub-G1 < 0,5. Uvedeny reprezentativní histogramy analýzy buněčného cyklu podle obsahu DNA z  $1 \times 10^5$  buněk.



**Obr. 29. Kmenové buňky kostní dřeně. Analýza buněčného cyklu 1. den od ozáření *in vitro*, dávková závislost.** Kmenové buňky kostní dřeně kultivované v kompletním mediu byly ozářeny dávkami 2, 6 a 20 Gy a následně ponechány v kultuře po dobu 24 hodin. Procento buněk v cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. G1, S a G2 – procento buněk v G1-, S- a G2- fázi. Expozice gama záření v dávce 6 a 20 Gy vedla k částečné akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Procento sub-G1 < 0,5. Uvedeny reprezentativní histogramy analýzy buněčného cyklu podle obsahu DNA z  $1 \times 10^5$  buněk.

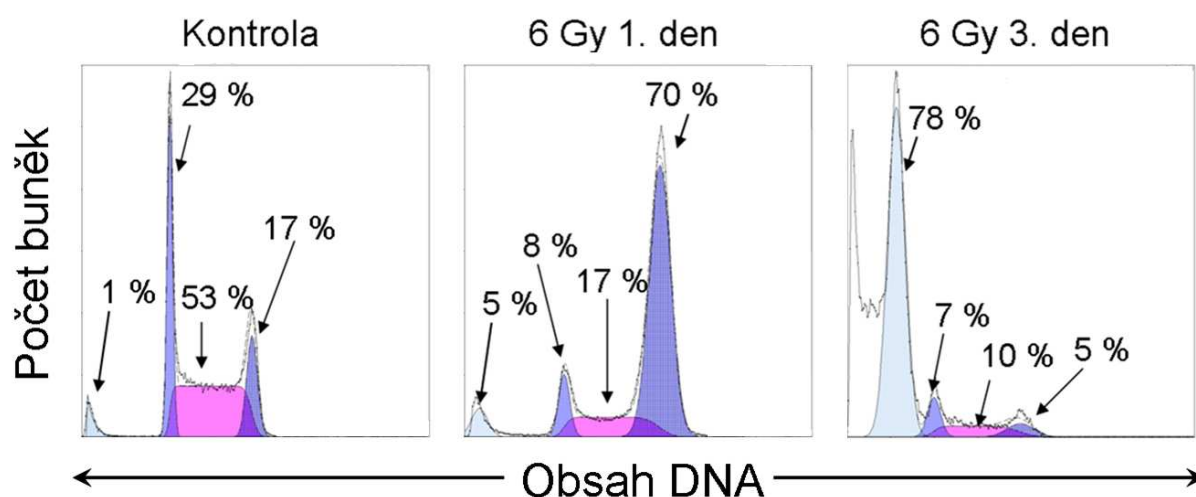


**Obr. 30. Kmenové buňky periodontálního ligamenta. Analýza buněčného cyklu 1. a 6. den od ozáření *in vitro*, časová závislost.** Kmenové buňky periodontálního ligamenta kultivované v kompletním mediu byly ozářeny 20 Gy a následně ponechány v kultuře po dobu 1 nebo 6 dnů. Procento buněk v cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. G1, S a G2 – procento buněk v G1-, S- a G2- fázi. Zástava buněčného cyklu v G2 fázi přetrvala u nadpoloviční většiny buněk do šestého dne od ozáření. Procento sub-G1<0,5. Uvedeny reprezentativní histogramy analýzy buněčného cyklu podle obsahu DNA z  $1 \times 10^5$  buněk.



**Obr. 31. Kmenové buňky kostní dřeně. Analýza buněčného cyklu 1. a 6. den od ozáření *in vitro*, časová závislost.** Kmenové buňky kostní dřeně kultivované v kompletním mediu byly ozářeny 20 Gy a následně ponechány v kultuře po dobu 1 nebo 6 dnů. Procento buněk v cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. G1, S a G2 – procento buněk v G1-, S- a G2- fázi. Zvýšené množství buněk v G2 fázi přetrvalo do šestého dne od ozáření. Procento sub-G1<0,5. Uvedeny reprezentativní histogramy analýzy buněčného cyklu podle obsahu DNA z  $1 \times 10^5$  buněk.





**Obr. 32. HL-60. Analýza buněčného cyklu 1. a 3. den od ozáření *in vitro*, časová závislost.** Buňky lidské promyelocytární leukemie HL-60 kultivované v kompletním mediu byly ozářeny dávkou 6 Gy a následně ponechány v kultuře po dobu 24 nebo 72 hodin. Procento buněk v sub-G1 apoptotickém peaku, G1-, S- a G2- fázi buněčného cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. Čísla znázorňují procenta buněk pro jednotlivé fáze buněčného cyklu včetně sub-G1. První den od ozáření došlo k akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu, třetí den od ozáření byl detekován apoptotický peak buněk sub-G1. Uvedeny reprezentativní histogramy z  $1 \times 10^5$  buněk.

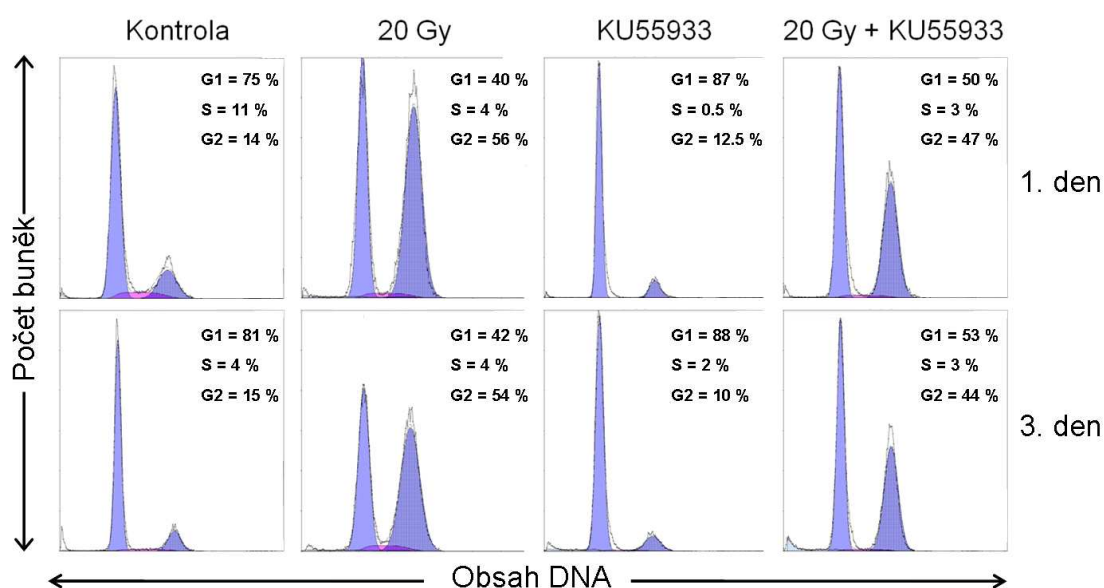
#### 5.4.2. Vliv inhibice ATM kinasy na zářením vyvolané změny buněčného cyklu

V dalších experimentech jsme studovali efekt KU55933 specifického inhibitoru ATM kinasy na buněčný cyklus MKB po ozáření dávkou 20 Gy. Inhibitor byl ke kmenovým buňkám přidán 60 minut před ozářením a jeho přítomnost v mediu byla zachována po celou dobu trvání experimentů v neměnné koncentraci. MKB byly vystaveny  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  KU55933, ionizujícímu záření nebo jejich kombinaci a analyzovány 1. nebo 3. den od ozáření. Studovali jsme vliv KU55933 na potlačení nebo naopak prohloubení ionizujícím záření-indukované zástavy buněčného cyklu MKB (akumulace v G2 fázi známá z předchozích experimentů viz. výše). Porovnávali jsme zejména rozdíl mezi buňkami ozářenými a ozářenými v přítomnosti inhibitoru. Skupiny byly analyzovány v tripletu, experimenty probíhaly paralelně.

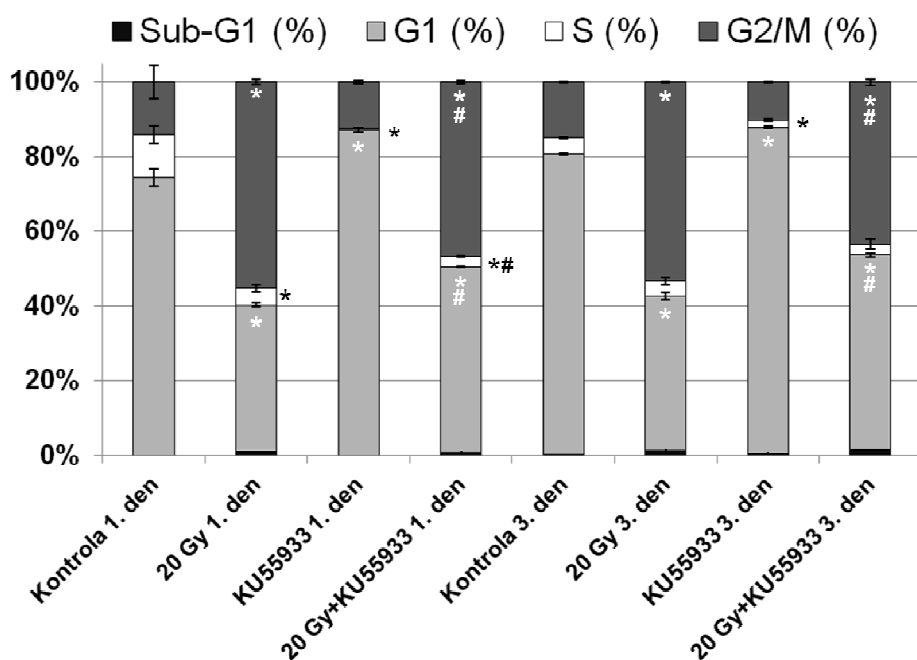
Expozice obou typů MKB ionizujícímu záření bez přítomnosti KU55933 vedla k akumulaci buněk v G2/M fázi buněčného cyklu již první den od ozáření a tato akumulace nadále přetrvávala do třetího dne od ozáření (KBZP: G2/M: 56 % -1. den, 54 % - 3. den), (KBPL:G2/M: 51 % -1. den, 49 % - 3. den). Inhibice ATM kinasy před ozářením zapůsobila na MKB rozdílně. U MKB zubní pulpy došlo k potlačení gama zářením-indukované akumulace buněk v G2/M fázi buněčného cyklu (47 % -1. den, 44 % - 3. den) (obr. 33).

Naopak u MKB periodontálního ligamenta vedla kombinace KU55933 a ionizujícího záření ke zvýšení procenta buněk akumulovaných G2/M fázi buněčného cyklu, oproti skupině ozářené bez přítomnosti inhibitoru (68 % -1. den, 65 % - 3. den) (obr. 34). KU55933 u neozářených buněk vedl k potlačení syntetické fáze buněčného cyklu (S fáze: Kontrola 11 %, KU55933 0,5 %) a indukoval akumulaci MKB zubní pulpy v G1 fázi buněčného cyklu (G1 fáze: Kontrola 75 %, KU55933 87 %). Syntetická fáze buněčného cyklu MKB periodontálního ligamenta nebyla KU55933 zásadně ovlivněna, mírná akumulace v G1 fázi buněčného cyklu se objevila jen první den během kultivace buněk (G1 fáze: Kontrola 71 %, KU55933 77 %).

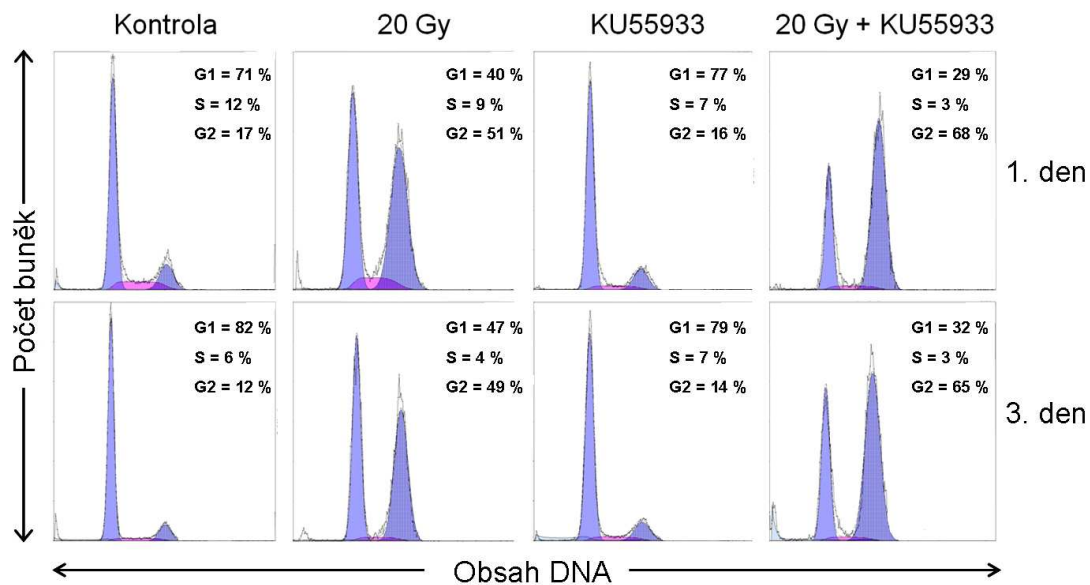
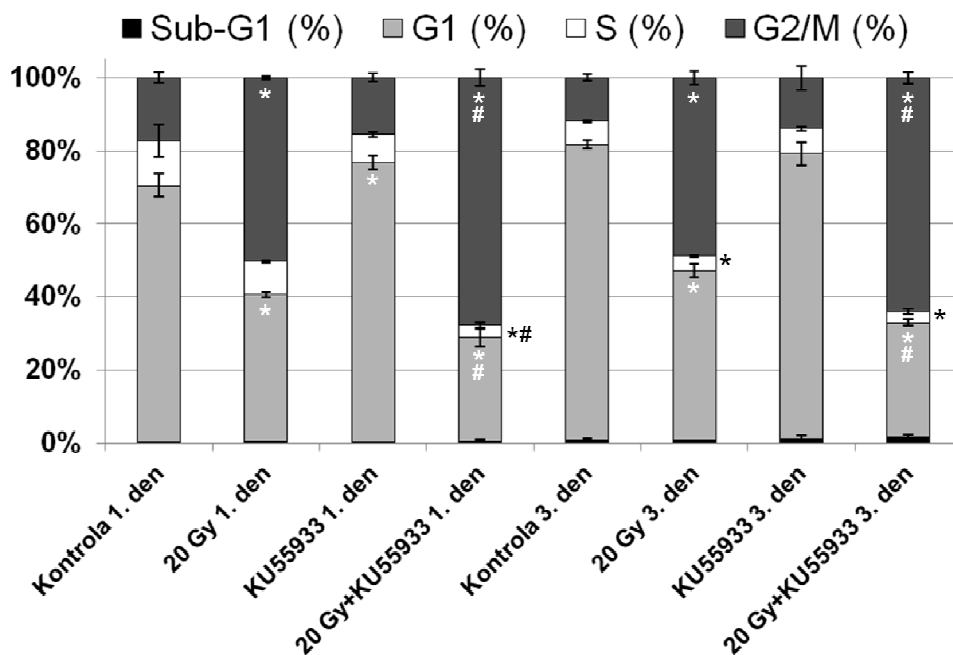
**A.**



**B.**



**Obr. 33. Kmenové buňky zubní pulpy. Reprezentativní histogramy analýzy buněčného cyklu (A), procento buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu (B) 1. a 3. den od ozáření *in vitro*.** Kmenové buňky zubní pulpy kultivované v kompletním mediu, kultivované v kompletním mediu s  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  KU55933, ozářené, preinkubované po dobu 1 h před ozářením s  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  KU55933 a následně ozářeny v přítomnosti  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  KU55933 byly ponechány v kultuře po dobu 1 nebo 3 dnů. Procento buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. Sub-G1, G1, S a G2 – procento buněk v sub-G1-, G1-, S- a G2- fází. **A.** Zobrazeny reprezentativní histogramy analýzy buněčného cyklu podle obsahu DNA z  $1 \times 10^5$  buněk. Hodnoceno procento buněk v cyklu. **B.** Graf reprezentující procento buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), t-test; # - statisticky významný rozdíl oproti samotnému ozáření ( $p \leq 0,05$ ), t-test.

**A****B**

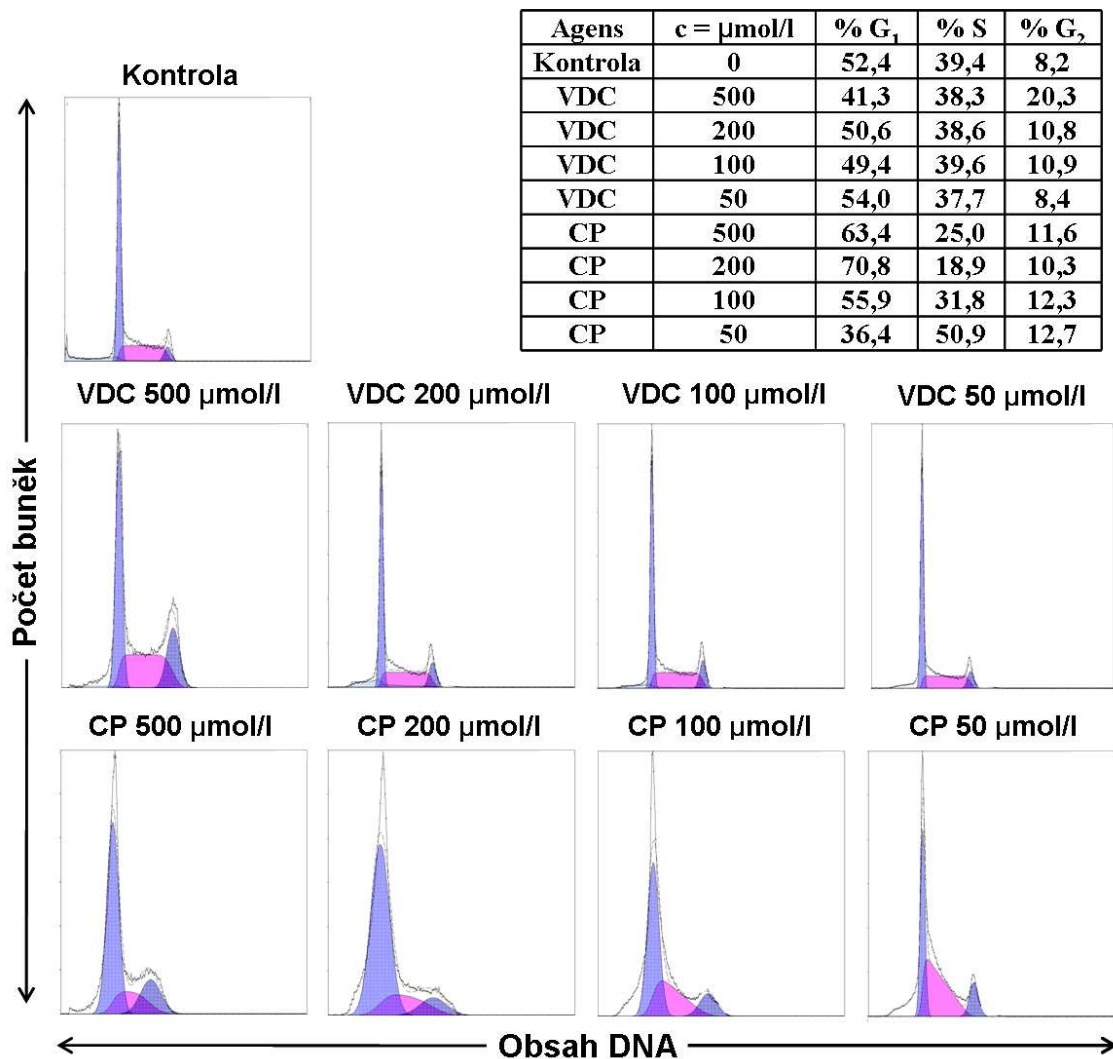
**Obr. 34. Kmenové buňky periodontálního ligamenta. Reprezentativní histogramy analýzy buněčného cyklu (A), procento buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu (B) 1. a 3. den od ozáření *in vitro*.** Kmenové buňky periodontálního ligamenta kultivované v kompletním mediu, kultivované v kompletním mediu s  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  KU55933, ozářené, preinkubované po dobu 1 h před ozářením s  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  KU553933 a následně ozářeny v přítomnosti  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  KU553933 byly ponechány v kultuře po dobu 1 nebo 3 dnů. Procento buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. Sub-G1, G1, S a G2 – procento buněk v sub-G1-, G1-, S- a G2- fázi. **A.** Zobrazeny reprezentativní histogramy analýzy buněčného cyklu podle obsahu DNA z  $1 \times 10^5$  buněk. Hodnoceno procento buněk v cyklu. **B.** Graf reprezentující procento buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), t-test; # - statisticky významný rozdíl oproti samotnému ozáření ( $p \leq 0,05$ ), t-test.

### 5.4.3. Vliv vanadocen dichloridu a cisplatiny na buněčný cyklus

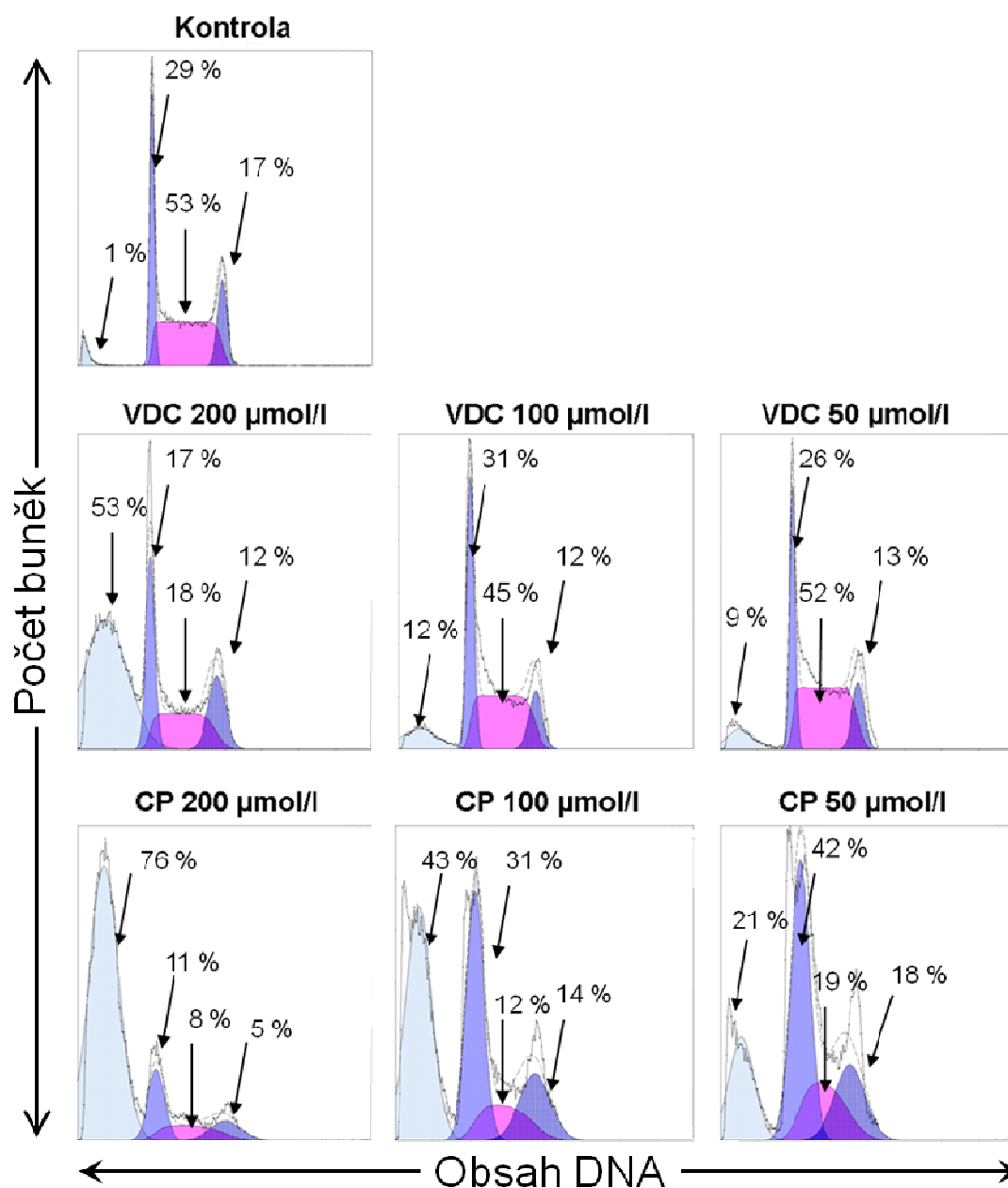
Ke studiu vlivu vanadocen dichloridu na buněčný cyklus byly použity leukemické linie MOLT-4 a HL-60. Buňky byly vystaveny zkoumanému agens po dobu jedné hodiny, poté byl vanadocen dichlorid odmyt a buňky byly následně kultivovány po dobu 16 hodin v čerstvém kompletním mediu bez agens a analyzovány. Efekt vanadocen dichloridu na buněčný cyklus byl porovnáván s působením cisplatiny ve stejném experimentálním uspořádání.

Hodinová preinkubace lidské T-lymfocytární leukemie MOLT-4 s vanadocen dichloridem vedla po 16 hodinách k částečné akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu ( $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  20 %, kontrola 8 % buněk v G2 fázi). Mechanismus působení cisplatiny byl rozdílný, došlo k akumulaci buněk v G1 fázi buněčného cyklu ( $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  63 %, kontrola 52 % buněk v G1 fázi). Procento sub-G1 buněk bylo  $<0,5$  %, a tak apoptotický sub-G1 peak nebyl u buněk MOLT-4 analyzován (obr. 35).

Hodinová expozice vanadocen dichloridu v koncentraci  $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$  se u buněk HL-60 o 16 hodin později projevila indukcí apoptózy nahromaděním 53 % buněk v sub-G1 fázi buněčného cyklu. Tento jev byl dávkově závislý, 12 % pro koncentraci  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a 9 % pro koncentraci  $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , kontrola 1 %. Cisplatina vykazovala ve srovnání s vanadocen dichloridem ještě větší apoptotický efekt. Koncentrace  $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$  vedla k akumulaci 76 % buněk v sub-G1 fázi buněčného cyklu 16 hodin od hodinového ovlivnění. Tento jev byl i v případě cisplatiny dávkově závislý, 43 % pro koncentraci  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a 21 % pro koncentraci  $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . K akumulaci buněk v G1 fázi buněčného cyklu došlo po působení cisplatiny v koncentraci  $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$  - 42 % buněk v G1 fázi buněčného cyklu, kontrola 29 % buněk v G1 fázi buněčného cyklu (obr. 36).



**Obr. 35. MOLT-4. Analýza buněčného cyklu 16 h po 1 h působení vanadocen dichloridu a cisplatinou *in vitro*.** Lidské buňky T-lymfocytární leukemie MOLT-4 byly po dobu jedné hodiny inkubovány s vanadocen dichloridem nebo cisplatinou v koncentraci 0 – 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a následně ponechány v kultuře v čerstvém mediu bez agens po dobu 16 hodin. Procento buněk v cyklu bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub> – procento buněk v G<sub>1</sub>-, S- a G<sub>2</sub>- fázi. Procento sub-G<sub>1</sub> < 0,5. Jedn hodinová inkubace buněk s cisplatinou způsobila akumulaci buněk v G<sub>1</sub> a S fázi, zatímco působení vanadocen dichloridu vedlo k mírné akumulaci buněk v G<sub>2</sub>/M fázi buněčného cyklu. Uvedeny reprezentativní histogramy z  $1 \times 10^5$  buněk.



**Obr. 36. HL-60. Analýza buněčného cyklu 16 h po 1 h působení vanadocen dichloridu a cisplatinu *in vitro*.** Lidské buňky promyelocytární leukemie HL-60 byly po dobu 1 hodiny inkubovány s vanadocen dichloridem nebo cisplatinou v koncentraci 0 – 200  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a následně ponechány v kultuře v čerstvém mediu bez agens po dobu 16 hodin. Procento buněk v sub-G1 apoptotickém peaku, G1-, S- a G2- fázi bylo stanoveno pomocí vazby propidium jodidu. Jedn hodinová inkubace buněk s cisplatinou a vanadocen dichloridem vedla k dávkově závislé apoptotické fragmentaci DNA. Uvedeny reprezentativní histogramy z  $1 \times 10^5$  buněk.

## 5.5. Apoptóza detekovaná pomocí vazby Annexinu V a propidium jodidu po působení genotoxických agens

Nejprve jsme studovali vliv vanadocen dichloridu v porovnání s působením cisplatinou na lidské periferní lymfocyty izolované z krve a buňky lidské T-lymfocytární leukemie (MOLT-4). Schéma experimentů bylo pro oba buněčné typy stejné. Buňky byly po dobu jedné hodiny inkubovány s vanadocen dichloridem nebo cisplatinou v koncentraci 0 - 1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a následně ponechány v kultuře v čerstvém mediu bez agens (5% atmosféra  $\text{CO}_2$ , 37° C) po dobu 72 hodin. Obrázek č. 37 zobrazuje gating strategii FSC versus SSC při stanovení vazby Annexinu V a propidium jodidu.

Na obr.č. 38 je znázorněn efekt vanadocen dichloridu a cisplatinou v koncentraci 0 - 1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  na apoptózu lymfocytů 72 h od ovlivnění. Zdravé, klidové, lidské lymfocyty byly citlivější k účinkům vanadocen dichloridu, než k účinkům cisplatinou. VDC v koncentraci 1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  vykazoval vyšší procento pozdně apoptotických buněk (99 %, respektive 71 %), zatímco CP indukovala ve stejné koncentraci více než dvakrát nižší procento pozdně apoptotických buněk (42 %, respektive 29 %). Z tohoto důvodu není překvapením, že více živých buněk nebo buněk časně apoptotických bylo stanoveno po působení CP v porovnání s VDC (koncentrace 1000 a 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Při nižších koncentracích (200, 100 a 50  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) bylo procento buněk pozdně apoptotických po působení VDC nižší nebo téměř srovnatelné s CP.

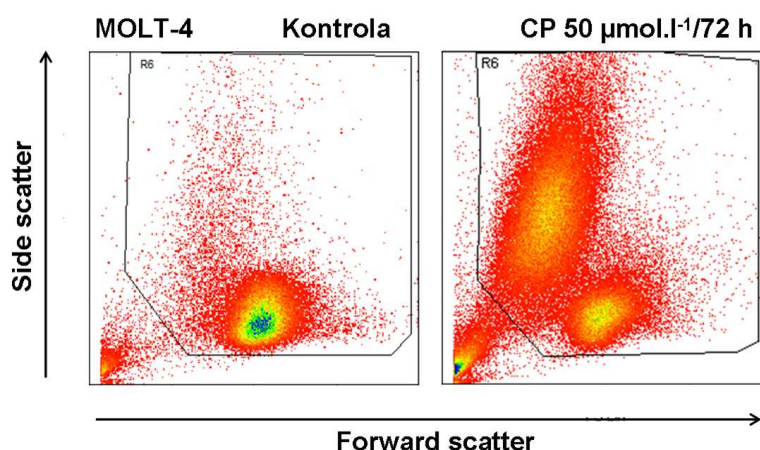
Obr. č. 39 ukazuje vliv VDC a CP v koncentraci 0 - 1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  na apoptózu leukemických buněk MOLT-4 72 h od ovlivnění. Odpověď leukemických buněk MOLT-4 byla rozdílná oproti reakci lymfocytů. Jednohodinová preinkubace s VDC a CP (koncentrace 1000 a 500  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) vedla k totální eradikaci leukemické linie MOLT-4 během 72 hodin od expozice. Tato eradikace byla způsobena rovněž nižšími koncentracemi (200 a 100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) CP, vyjímaje nejnižší studovanou koncentraci 50  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ , kde bylo v pozdní fázi apoptózy 48 % buněk. Tyto nižší koncentrace VDC nevedly k vyvolání apoptózy u leukemické linie MOLT-4 a celkové výsledky byly srovnatelné s kontrolou.

Dále jsme studovali vliv mitoxantronu, kofeinu, U0126 nebo jejich kombinace (vždy mitoxantron a kofein nebo U0126) na apoptózu lidské T-lymfocytární leukemické linie MOLT-4. Kofein (1,3,7-trimethylxanthin) je nespecifický inhibitor ATM kinasy, U0126 (1,4-diamino-2,3-dikyano-1,4-bis[2-aminofenylthio]butadien) je komerčně dodávaný nekompetitivní inhibitor MEK1/2 kinas. MEK inhibitor U0126 je uměle syntetizovaná organická sloučenina, která inhibuje aktivaci MAPK (ERK 1/2) inhibicí kinasové aktivity

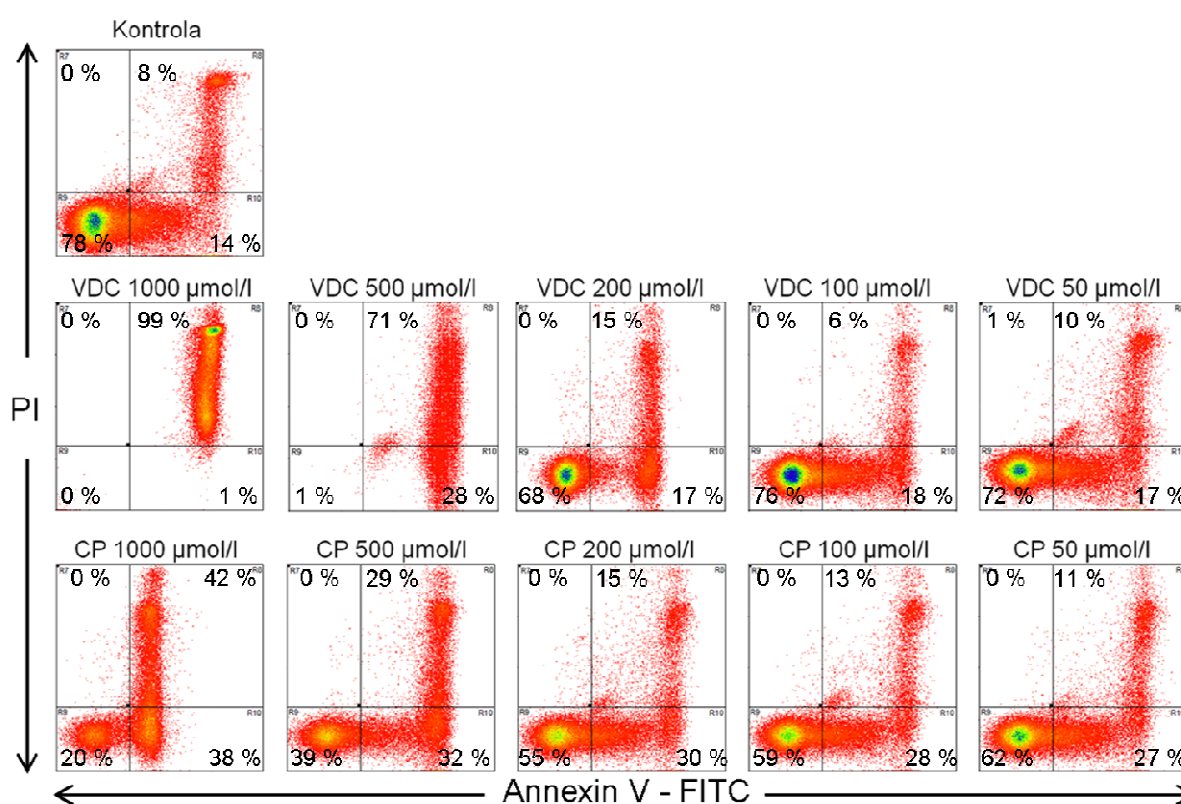


MAPK Kinas (MAPKK) - MEK 1/2. MEK1/2 kinas patří do široké rodiny tzv. mitogen aktivovaných proteinkinás (MAPK). Aktivace kinas rodiny MAPK přispívá k přežití buňky po poškození DNA, tvoří tedy jakousi protiváhu signálních cest vedoucích k buněčné smrti (aktivace ATM kinas-Chk1/2-p53). Ačkoliv některé kinas z rodiny MAPK jsou známy pro svůj pro-apoptotický efekt, aktivace signální dráhy MEK1/2-ERK1/2 je důležitá pro přežití buňky po poškození DNA a působí anti-apoptoticky. Na protipólu stojí ATM kinasa, jež je na počátku signálních drah, které mohou vyústit v buněčnou smrt. Mitoxantron (1,4-dihydroxy-5,8-bis[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]amino] antraquinone) patří mezi antracenové deriváty. Působí interkalaci mezi řetězci dvoušroubovice DNA, inhibuje topoisomerasu II. Řadí se mezi fázově nescifická cytostatika. Tvorbou kovalentního komplexu s topoisomerasou II brání rozvolnění DNA během replikace. Tento stav vede ke vzniku DSB. Cílem experimentů bylo prostudovat, jak se projeví inhibice příslušné kinas na velikost mitoxantronem indukované apoptózy.

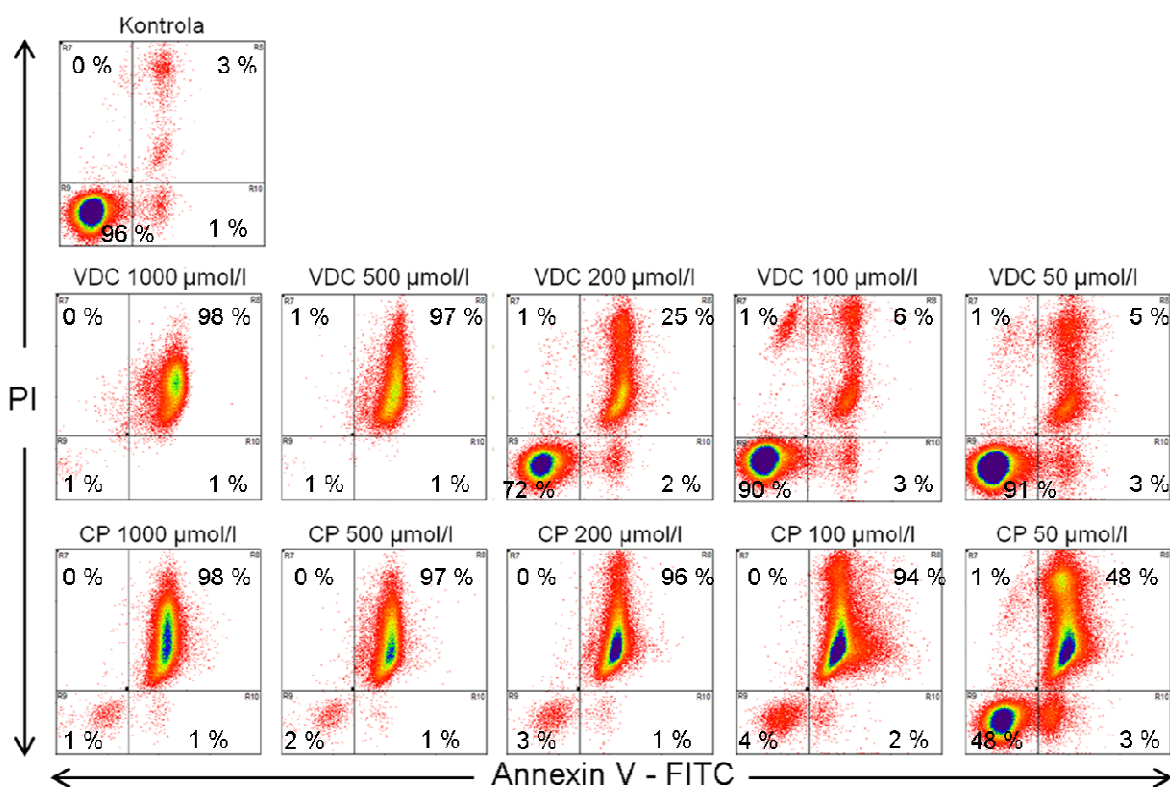
Obr. č. 40 ukazuje výsledky stanovení vazby Annexinu V-FITC a propidium jodidu u leukemických buněk MOLT-4 24 hodin po aplikaci MTX, kofeinu a U0126. Expozice buněk samotným inhibitorům nevedla ke zvýšení množství apoptotických buněk oproti kontrole. Avšak expozice buněk MTX v dávce  $5 \text{ nmol.l}^{-1}$  se 24 hodin později projevila masivním zvýšením procenta časně (29 %) a pozdně (28 %) apoptotických buněk oproti kontrole (časně 5 %, pozdně 14 %). Preinkubace buněk po dobu 45 minut s kofeinem před přidáním MTX se projevila v tomto časovém úseku protektivním účinkem k vyvolání mitoxantronem-indukované apoptózy. Jen 9 % buněk bylo časně a 12 % pozdě apoptotických 24 h po působení MTX za inhibice ATM kinas kofeinem. Naopak kombinované působení U0126 (přidán 30 minut před MTX) a MTX vedlo k potenciaci apoptotického účinku MTX (26 % časně a 49 % pozdně apoptotických buněk).



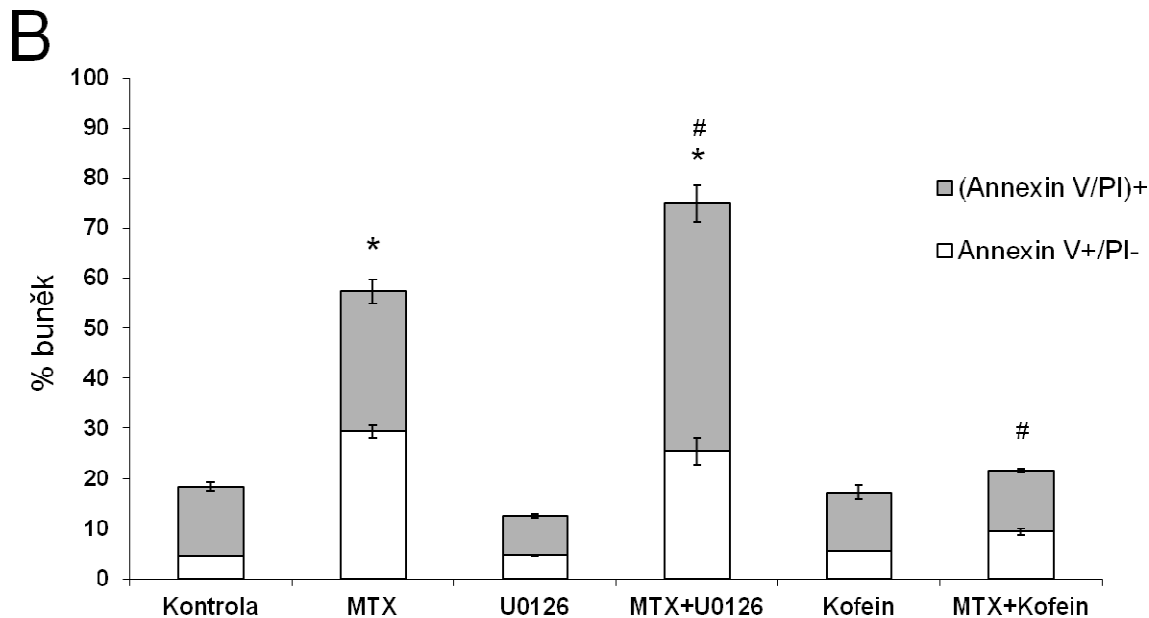
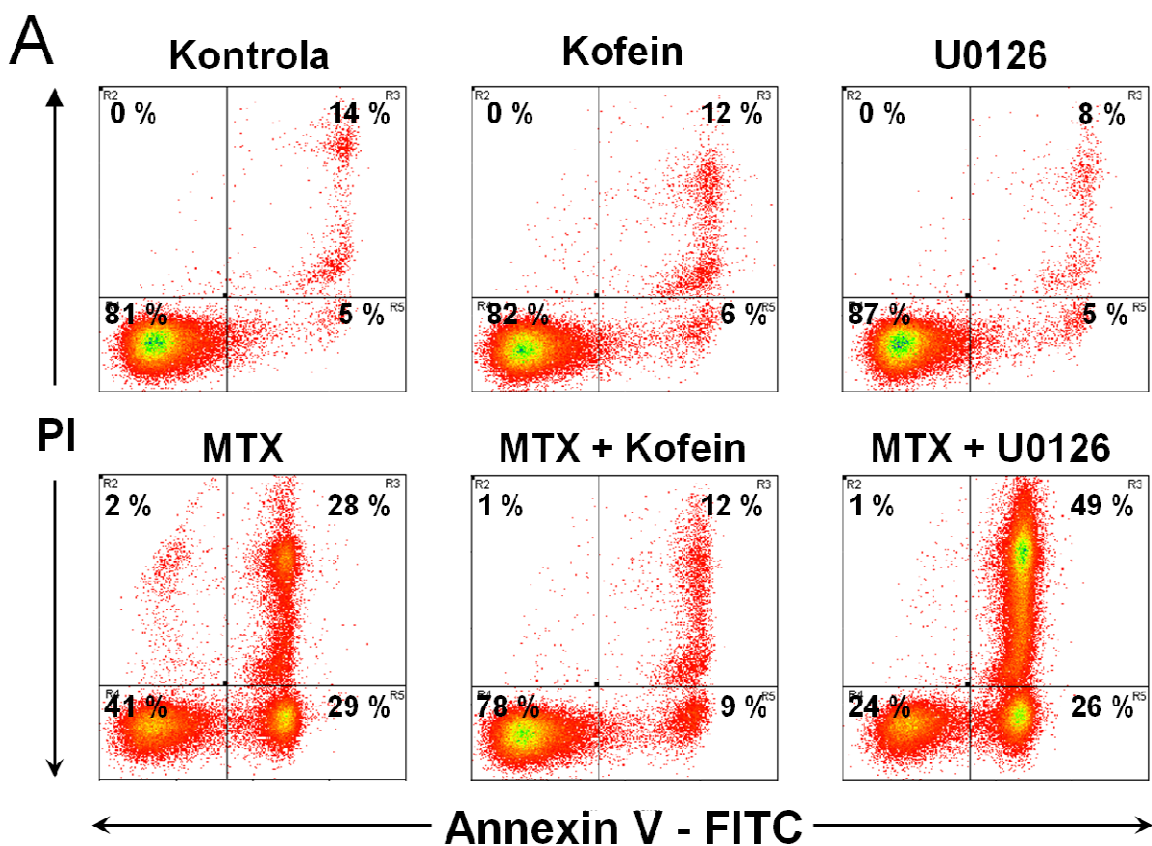
Obr. 37. Gating strategie při analýze vazby Annexinu V a propidium jodidu.



Obr. 38. Lymfocyty. Stanovení vazby Annexinu V a propidium jodidu po působení vanadocen dichloridu a cisplatinu *in vitro*. Lidské lymfocyty izolované z krve zdravých dárců byly po dobu jedné hodiny inkubovány s vanadocen dichloridem nebo cisplatinou v koncentraci 0 - 1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a následně ponechány v čerstvém mediu bez agens po dobu 72 hodin. Data jsou ve formě dvourozměrných histogramů logaritmu intenzity fluorescence Annexinu V-FITC na ose x versus logaritmus intenzity fluorescence propidium jodidu na ose y. Histogramy spolu s příslušnými procenty reprezentují zastoupení tří typů buněk, buněk negativních (buněk živých), Annexin V pozitivních / PI negativních (buněk, které jsou v časně fázi apoptózy) a Annexin V /PI dvojitě pozitivních (buňky, které jsou v pozdní fázi apoptózy/mrtvé). Uvedeny reprezentativní výsledky v podobě histogramů s  $5 \times 10^4$  buněk.



**Obr. 39. MOLT-4. Stanovení vazby Annexinu V a propidium jodidu po působení vanadocen dichloridu a cisplatinu *in vitro*.** Lidské buňky T-lymfocytární leukemie MOLT-4 byly po dobu jedné hodiny inkubovány s vanadocen dichloridem nebo cisplatinou v koncentraci 0 - 1000  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a následně ponechány v kultuře v čerstvém mediu bez agens po dobu 72 hodin. Data jsou ve formě dvourozměrných histogramů logaritmu intenzity fluorescence Annexinu V-FITC na ose x versus logaritmus intenzity fluorescence propidium jodidu na ose y. Histogramy spolu s příslušnými procenty reprezentují zastoupení tří typů buněk, buněk negativních (buněk živých), Annexin V pozitivních / PI negativních (buněk, které jsou v časně fázi apoptózy) a Annexin V /PI dvojitě pozitivních (buňky, které jsou v pozdní fázi apoptózy/mrtvé). Uvedeny reprezentativní výsledky v podobě histogramů z  $5 \times 10^4$  buněk.



**Obr. 40. MOLT-4. Stanovení vazby Annexinu V a propidium jodidu po působení mitoxantronu, kofeinu, U0126 nebo jejich kombinace *in vitro*. Lidské buňky T-lymfocytární leukemie MOLT-4 byly po dobu 24 hodin inkubovány s mitoxantronem, kofeinem, U0126 nebo v kombinaci. Mitoxantron působil v koncentraci  $5 \text{ nmol.l}^{-1}$  v mediu. Kofein byl rozpuštěn v mediu v takovém množství, aby bylo dosaženo po ředění zásobního**

roztoku finální koncentrace  $2 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Roztok U0126 v DMSO byl přidán do media v takovém množství, aby bylo dosaženo finální koncentrace  $10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ . V případě kombinace byl kofein aplikován 45 minut a U0126 30 minut před přidáním mitoxantrou. **A.** Data jsou ve formě dvourozměrných histogramů logaritmu intenzity fluorescence Annexinu V-FITC na ose x versus logaritmus intenzity fluorescence propidium jodidu na ose y. Reprezentativní histogramy z  $1 \times 10^5$  buněk spolu s příslušnými sloupcovými grafy (**B.**) prezentují procentuální zastoupení tří typů buněk, buněk negativních (buněk živých), Annexin V pozitivních / PI negativních (buněk, které jsou v časné fázi apoptózy) a Annexin V / PI dvojité pozitivních (buněk, které jsou v pozdní fázi apoptózy/mrtvé). Jsou zobrazeny reprezentativní histogramy ze tří nezávislých experimentů. Graf ukazuje procenta jednotlivých skupin buněk pro  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), t-test; # - statisticky významný rozdíl oproti samotnému mitoxantrou ( $p \leq 0,05$ ), t-test.

## 5.6. Senescence po působení ionizujícího záření

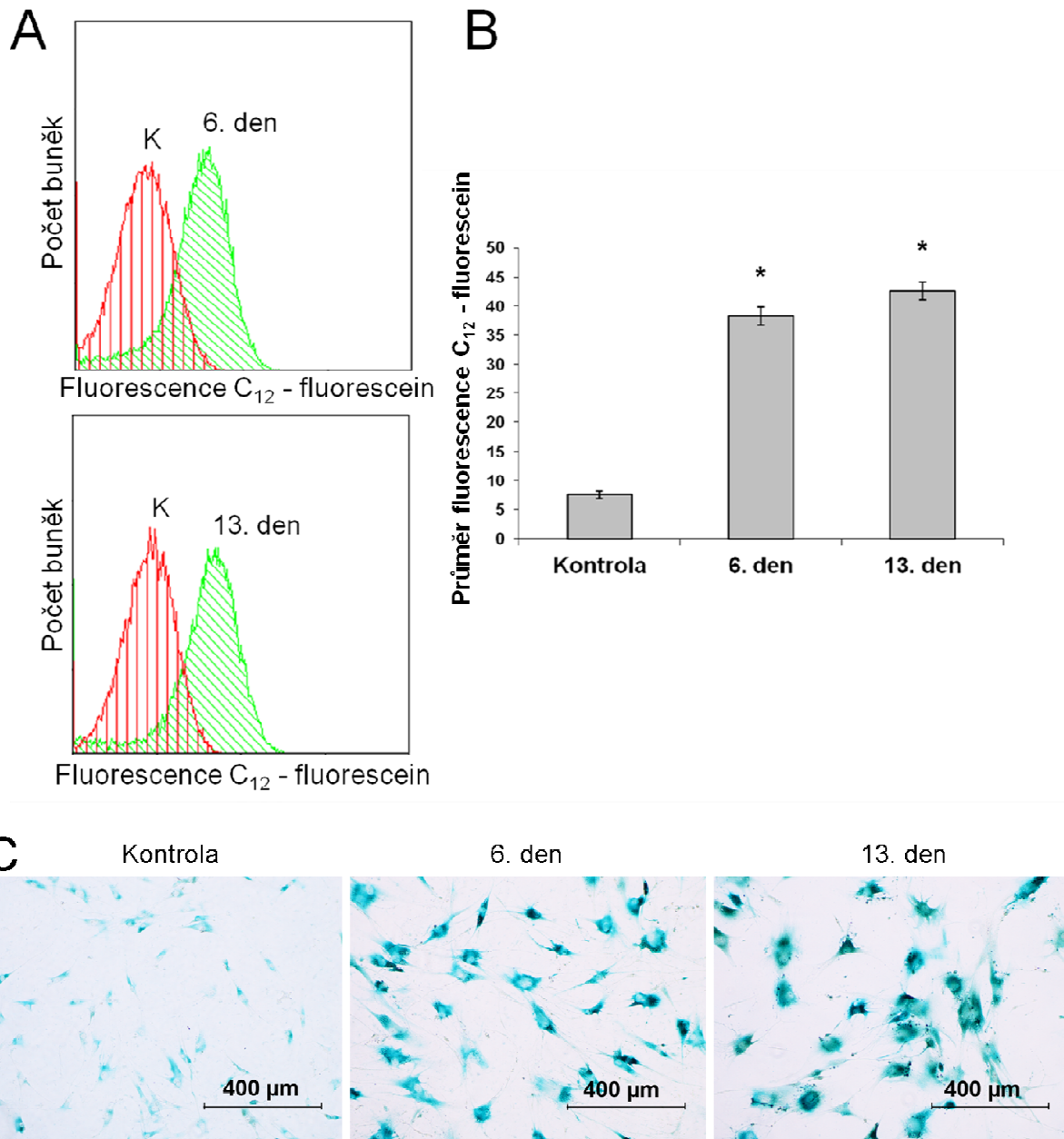
Vzhledem k tomu, že u mesenchymálních kmenových buněk jsme po ozáření vysokou dávkou 20 Gy neprokázali indukci apoptózy, předpokládali jsme, že je u těchto buněk po ozáření indukována senescence. Pro stanovení aktivity  $\beta$ -galaktosidasy spojené se senescencí (SA- $\beta$ -galaktosidasy) jsme využili fluorogenní substrát 5-dodecanoylamino fluorescein di- $\beta$ -D-galactopyranoside ( $C_{12}$ FDG).  $C_{12}$ FDG je nefluorescenční lipofilní prekurzor, který se po hydrolýze SA- $\beta$ -galaktosidasou mění na fluorofor  $C_{12}$ -fluorescein neschopný opustit svůj kompartment zrodu. Kvantifikaci jsme provedli pomocí průtokové cytometrie. Druhou metodou analýzy byla mikroskopická detekce pomocí chromogenního substrátu.

Obr. č. 41 prezentuje výsledky stanovení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy v lidských MKB kostní dřeně 6. a 13. den od ozáření dávkou 20 Gy. Z výsledku je patrný statisticky významný ( $p \leq 0,05$ ) vzestup aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy 6. a 13. den od ozáření. Vzestup byl vizuálně potvrzen mikroskopickou detekcí.

Stanovení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy po ozáření jsme provedli také u lidských MKB periodontálního ligamenta (obr. 42). Analogicky jako v případě MKB kostní dřeně došlo k vzestupu fluorescence  $C_{12}$ -fluorescein za zvýšení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy 6. a 13. den od ozáření dávkou 20 Gy. Z grafu je patrné, že aktivita SA- $\beta$ -galaktosidasy u kmenových buněk periodontálního ligamenta dosáhla svého vrcholu 6. den od ozáření. Vzestup byl statisticky významný ( $p \leq 0,05$ ) 6. a 13. den od ozáření. Výsledky byly potvrzeny vizuálně mikroskopickou detekcí.

Obr. č. 43 ukazuje výsledky stanovení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy v závislosti na čase od ozáření dávkou 6 Gy u lidských MKB zubní pulpy. První den od ozáření byla pomocí průtokové cytometrie pozorována zvýšená aktivita SA- $\beta$ -galaktosidasy těsně na hranici statistické významnosti ( $p \leq 0,05$ ). Aktivita SA- $\beta$ -galaktosidasy detekovaná jako fluorescence

C<sub>12</sub>-fluorescein dosáhla maxima 6. den od ozáření a dále od 6. do 9. dne již nevzrůstala. Mikroskopická detekce ukázala vzestup SA-β-galaktosidasy 3. den od ozáření.

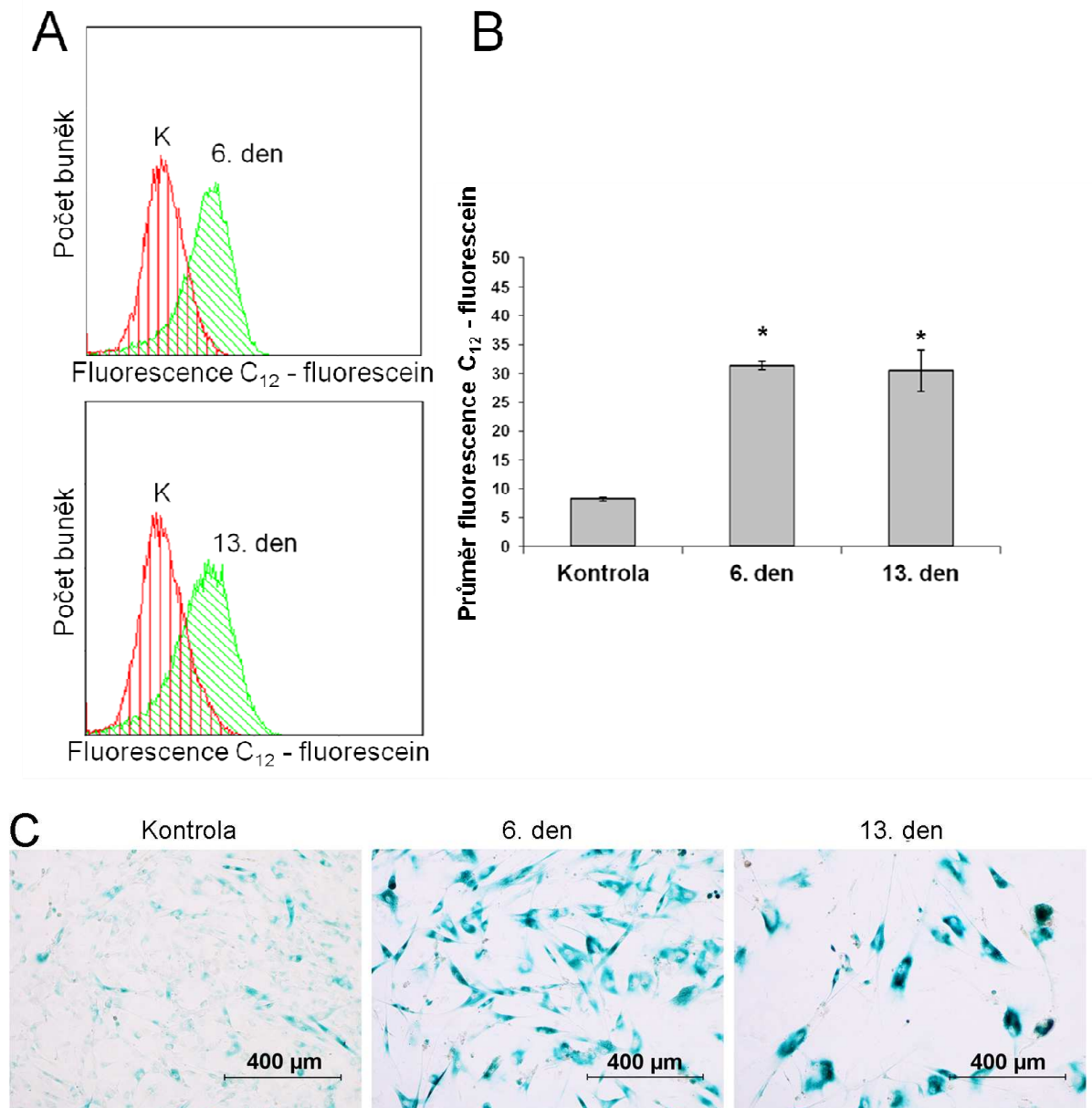


**Obr. 41. MKB kostní dřeně. Stanovení aktivity SA-β-galaktosidasy po ozáření dávkou 20 Gy.**

**A.** Subkonfluentní lidské MKB kostní dřeně kultivované v kompletním mediu byly ozářeny v kultivačních nádobách (75 cm<sup>2</sup>) a aktivita β-galaktosidasy spojené se senescencí byla kvantifikována pomocí průtokové cytometrie 6. a 13. den od ozáření. Data průtokové cytometrie jsou prezentována jako C<sub>12</sub>-fluorescein fluorescence single-parametr overlay histogramy. Intenzita fluorescence kontroly (K) a ozářených vzorků je znázorněná abscisa a počet buněk je znázorněn ordináta. Jsou zobrazeny reprezentativní výsledky ze tří nezávislých experimentů.

**B.** Sloupcový graf reprezentuje aritmetický průměr intenzity fluorescence C<sub>12</sub>-fluorescein kvantifikované v buňkách pomocí průtokové cytometrie v závislosti na čase od ozáření, chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku, n = 3 nezávislých experimentů. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole (p ≤ 0,05), t-test.

**C.** Mikroskopická detekce SA-β-galaktosidasy. Buňky byly ozářeny dávkou 20 Gy v komůrkách se sklíčky a pomocí chromogenního substrátu byla cytochemicky stanovena aktivita SA-β-galaktosidasy v daných časových intervalech. Obrázek ukazuje reprezentativní snímek kontroly a ozářených vzorků získaných pomocí mikroskopie.



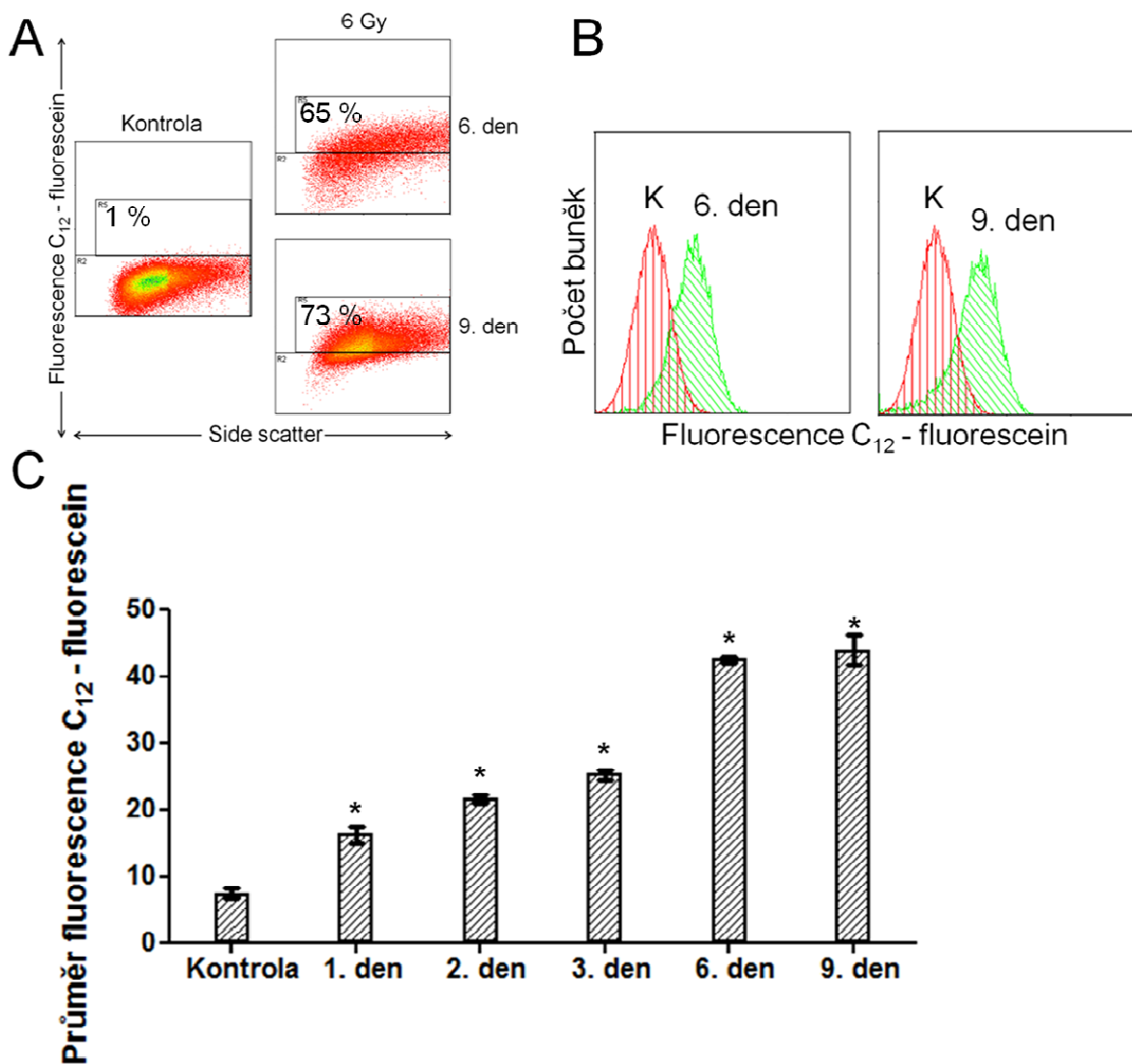
**Obr. 42. Kmenové buňky periodontálního ligamenta. Stanovení aktivity SA-β-galaktosidasy po ozáření dávkou 20 Gy.**

**A.** Subkonfluentní lidské kmenové buňky periodontálního ligamenta kultivované v kompletním mediu byly ozářeny v kultivačních nádobách (75 cm<sup>2</sup>) a aktivita β-galaktosidasy spojené se senescencí byla kvantifikována pomocí průtokové cytometrie 6. a 13. den od

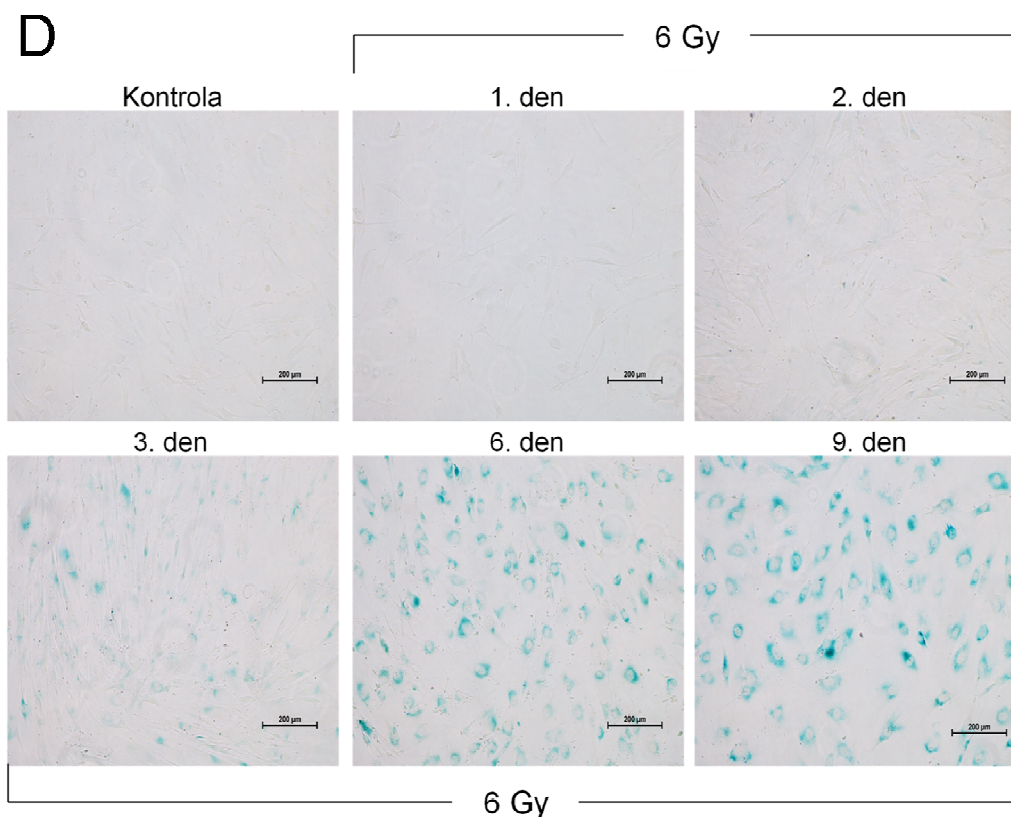
ozáření. Data průtokové cytometrie jsou prezentována jako C<sub>12</sub>-fluorescein fluorescence single-parametr overlay histogramy. Intenzita fluorescence kontroly (K) a ozářených vzorků je znázorněná abscisa a počet buněk je znázorněn ordináta. Jsou zobrazeny reprezentativní výsledky ze tří nezávislých experimentů.

**B.** Sloupcový graf reprezentuje aritmetický průměr intenzity fluorescence C<sub>12</sub>-fluorescein kvantifikované v buňkách pomocí průtokové cytometrie v závislosti na čase od ozáření, chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku, n = 3 nezávislých experimentů. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole (p ≤ 0,05), t-test.

**C.** Mikroskopická detekce SA-β-galaktosidasy. Buňky byly ozářeny dávkou 20 Gy v komůrkách se sklíčky a pomocí chromogenního substrátu byla cytochemicky stanovena aktivita SA-β-galaktosidasy v daných časových intervalech. Obrázek ukazuje reprezentativní snímek kontroly a ozářených vzorků získaných pomocí mikroskopie.







**Obr. 43. Kmenové buňky zubní pulpy. Kinetika aktivity SA-β-galaktosidasy po ozáření dávkou 6 Gy.**

**A.** Subkonfluentní lidské kmenové buňky zubní pulpy kultivované v kompletním mediu byly ozářeny v kultivačních nádobách (75 cm<sup>2</sup>) a aktivita β-galaktosidasy spojené se senescencí byla kvantifikována pomocí průtokové cytometrie v daných časových intervalech. Data jsou zobrazena ve formě dvourozměrných histogramů (dot plot) logaritmu intenzity fluorescence C<sub>12</sub>-fluorescein (osa y) versus side scatter SSC (osa x). Čísla v rozích gatů označují procento buněk v oblasti vysoké fluorescence. Jsou zobrazeny reprezentativní výsledky ze tří nezávislých experimentů pro kontrolu, 6. den a 9. den od ozáření.

**B.** Data průtokové cytometrie jsou prezentována jako C<sub>12</sub>-fluorescein fluorescence single-parametr overlay histogramy. Intenzita fluorescence kontroly (K) a ozářených vzorků je znázorněná abscisa a počet buněk je znázorněn ordináta. Jsou zobrazeny reprezentativní výsledky ze tří nezávislých experimentů pro kontrolu, 6. den a 9. den od ozáření.

**C.** Sloupcový graf reprezentuje aritmetický průměr intenzity fluorescence C<sub>12</sub>-fluorescein kvantifikované v buňkách pomocí průtokové cytometrie v závislosti na čase od ozáření, chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku, n = 3 nezávislých experimentů. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole (p ≤ 0,05), t-test.

**D.** Mikroskopická detekce SA-β-galaktosidasy. Buňky byly ozářeny dávkou 6 Gy v komůrkách se sklíčky a pomocí chromogenního substrátu byla cytochemicky stanovena aktivita SA-β-galaktosidasy v daných časových intervalech. Obrázek ukazuje reprezentativní snímek kontroly a ozářených vzorků získaných pomocí mikroskopie.

## 6. SHRNUÍ NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ

Jednu hodinu od **celotělového ozáření** potkanů dávkami v rozmezí 1-10 Gy jsme kvantifikovali lineární dávkově závislý vzestup  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkana ozářených *in vivo*. Vzestup byl statisticky významný od dávky 3 Gy a homogenní napříč populací lymfocytů. Výsledky cytometrické kvantifikace byly verifikovány pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Dávkově závislý vzestup byl stanoven analýzou integrální optické denzity jednotlivých  $\gamma$ H2AX ohnisek imunofluorescenčně značeného  $\gamma$ H2AX v jádrech lymfocytů.

Celotělová expozice potkanů ionizujícímu záření vedla 24 h později k dávkově závislé leukopenii a lymfopenii. Pokles počtů leukocytů a lymfocytů byl statisticky významný od dávky 1 Gy. Počet granulocytů se neměnil.

Jednu hodinu od **ozáření oblasti hrudníku** dávkami v rozmezí 5-30 Gy jsme kvantifikovali dávkově závislý vzestup  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkana ozářených *in vivo*. Vzestup byl statisticky významný od dávky 20 Gy. Ve srovnání s celotělovým ozářením nebyl homogenní v celé populaci lymfocytů. Ve vyšetřovaných preparátech bylo i u vzorků ozářených nejvyšší dávkou ionizujícího záření (20 Gy) nalezeno jisté množství buněčných jader, které byly na přítomnost  $\gamma$ H2AX negativní. Dvacet čtyři hodin od ozáření hrudníku byl pozorován pokles  $\gamma$ H2AX na úroveň, která se z pohledu statistické významnosti nelišila od kontrol. Histon  $\gamma$ H2AX jako analyt vykazoval **stabilitu** během 23 h skladování v plné krvi na ledu při 4 °C.

Po ozáření hrudníku jsme pozorovali pokles počtu leukocytů a lymfocytů až od vyšší dávky v porovnání s celotělovým ozářením. Výsledky byly statisticky významné oproti kontrole pro dávky 20 a 30 Gy. Počet granulocytů se neměnil.

Expozice **MKB zubní pulpy a periodontálního ligamenta** dávce 20 Gy vede 1 h od ozáření k masivní statisticky významné tvorbě  $\gamma$ H2AX, která téměř zcela vymizí do 24 h od ozáření. Inhibicí ATM kinasy dojde k potlačení ionizujícím zářením-indukované fosforylace H2AX u MKB zubní pulpy a periodontálního ligamenta.

Z pohledu průtokové cytometrie MKB reagují na expozici gama záření akumulací buněk v G2 fázi buněčného cyklu, která po dávce 20 Gy přetrvává do 6. dne od ozáření. Apoptóza během tohoto intervalu nebyla pozorována. Inhibicí ATM kinasy došlo u MKB zubní pulpy k potlačení gama zářením-indukované akumulace buněk v G2 fázi buněčného

cyklu. Naopak u MKB periodontálního ligamenta došlo ke zvýšení procenta buněk v G2 fázi buněčného cyklu.

Stanovením aktivity  **$\beta$ -galaktosidasy spojené se senescencí** jsme u MKB kostní dřene a periodontálního ligamenta 6. a 13. den od ozáření dávkou 20 Gy stanovili senescenci. Výsledky byly nezávisle potvrzeny průtokovou cytometrií a mikroskopickou detekcí. Studium kinetiky aktivity  $\beta$ -galaktosidasy spojené se senescencí u MKB zubní pulpy jsme pomocí průtokové cytometrie stanovili zvýšení již 1. den od ozáření dávkou 6 Gy. Aktivita se nadále zvyšovala až do 6. dne, kdy dosáhla svého vrcholu. Principiálně odlišnou mikroskopickou detekcí jsme prokázali zvýšení aktivity  $\beta$ -galaktosidasy spojené se senescencí až od 3 dne po ozáření.

Jedn hodinová expozice leukemických buněk HL-60 **vanadocen dichloridu** způsobila lineárně dávkově závislou tvorbu  $\gamma$ H2AX. Vzestup  $\gamma$ H2AX byl vyšší v porovnání s působením cisplatin, která preferenčně indukovala tvorbu  $\gamma$ H2AX v S a G1 fázi buněčného cyklu.

Jedn hodinové vystavení buněk HL-60 působení vanadocen dichloridu se o 16 h později projevilo dávkově závislou apoptózou detekovanou jako sub-G1 peak v histogramech analýzy buněčného cyklu. Cisplatin indukovala u buněk HL-60 vyšší procento apoptotických buněk než vanadocen dichlorid. Buňky T-lymfocytární leukemie MOLT-4 ve stejném experimentálním uspořádání neodpověděly fragmentaci DNA, ale po dávce  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  reagovaly mírnou akumulací buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Cisplatin naopak po dávce  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$  vyvolávala akumulaci buněk v G1 fázi buněčného cyklu.

Porovnáním výsledků stanovení vazby Annexinu V a propidium jodidu 72 h po jedn hodinovém působení vanadocen dichloridu a cisplatin na leukemické buňky MOLT-4 a zdravé lidské lymfocyty izolované z periferní krve jsme dospěli k nečekaným závěrům. Vanadocen dichlorid působí více cytotoxicky na zdravé lymfocyty, naopak je méně cytotoxický na buňky leukemické linie MOLT-4. Cisplatin je v mechanismu cytotoxického působení daleko účinnější na buňky linie MOLT-4 a zároveň po působení cisplatin přežívá vyšší procento lymfocytů.

Mitoxantron během 24 h svého účinku indukuje u buněk MOLT-4 apoptózu detekovanou pomocí vazby Annexinu V a propidium jodidu. Inhibice ATM kinasy kofeinem na dobu 24 h potlačila mitoxantronem-indukovanou apoptózu. Naopak inhibice MEK1/2-ERK1/2 signální dráhy U0126 již během 24 h signifikantně zvýšila apoptózu-vyvolávající efekt mitoxantronu.

## 7. DISKUSE

V naší práci jsme studovali vliv ionizujícího záření, cytostatických látek (cisplatina, mitoxantron) a nově syntetizované potenciálně cytostatické látky vanadocen dichloridu na buňky nádorové (HL-60, MOLT-4), na mesenchymální kmenové buňky izolované z různých tkání a na lymfocyty periferní krve.

Ke studiu těchto nox jsme používali metodu průtokové cytometrie, která je schopna určit nejen imunofenotyp, ale i další charakteristiky zkoumaných buněk. K analýze využívá rozdílných schopností buněk odrážet světlo při průchodu světelným paprskem průtokového cytometru, dále pak stanovení emise fluorescence fluorochromů nebo fluorescenčních sond namířených proti specifickým strukturám buňky. Fluorochromy rozdílných vlastností jsou konjugovány se specifickými protilátkami, které jsou schopny je nasměrovat na základě reakce s determinantními skupinami antigenu. Fluorescenční sondy představují nevlastní fluorofory, které se ke zkoumané látce váží za vyvolání své fluorescence. K fluorescenčním sondám také můžeme řadit fluorogenní substráty, kdy při odštěpení zhášeče od sondy aktivitou enzymu dojde k aktivaci vlastních fluorescenčních vlastností sloučeniny. Průtoková cytometrie usnadňuje identifikaci odlišných buněčných typů, ale i rozdílných funkčních stavů buňky v heterogenní populaci včetně kvantitativní analýzy.

Zaměřili jsme se na kvantitativní stanovení hlavních dějů souvisejících s odpovědí buněk na poškození genomu buňky, stanovení DSB, zástavu buněčného cyklu během reparace poškození a v případě, že poškození není reparováno na stanovení indukce apoptózy a senescence.

V experimentech *in vivo* jsme kvantifikovali vznik DSB nepřímo prostřednictvím detekce  $\gamma$ H2AX v lymfocytech periferní krve po celotělovém a lokálním ozáření hrudníku potkanů.

Dnes není sporu, že expozice buněk gama záření *in vitro* vede k fosforylaci histonu H2AX na serinu 139 (Rogakou et al. 1998). Tato fosforylace je relativně brzy po ozáření (30-60 minut) dávkově (Vilasová et al. 2008, Andrievski et al. 2009), nebo lineárně dávkově závislá (Redon et al. 2009). Méně je známo o vzniku  $\gamma$ H2AX po ozáření *in vivo*.

Zjistili jsme, že jednu hodinu od celotělového ozáření ( $^{60}\text{Co}$  gama záření) potkanů stoupající dávkou 1-10 Gy dochází k lineárnímu dávkově závislému vzestupu  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkanů ozářených *in vivo*. Výsledky detekce histonu  $\gamma$ H2AX pomocí imunofluorescenční mikroskopie v lymfocytech potkana 1 hodinu od celotělového ozáření

nezávisle verifikovaly data z průtokové cytometrie. Naše výsledky stanovení  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkanů ozářených celotělově byly přijaty k publikaci v časopisu *Acta Veterinaria* v roce 2010, článek vyšel v roce 2011 (Havelek et al. 2011a). Ve stejném roce (2010) byl přijat a obratem publikován článek Christopha E. Redona a kolegů z Centra pro výzkum rakoviny, Národního institutu zdraví (USA), který popisuje imunofluorescenční kvantifikaci  $\gamma$ H2AX v lymfocytech periferní krve makaka rhesus (*Macaca mulatta*) po jeho celotělovém ozáření ( $^{60}\text{Co}$  gama záření) (Redon et al. 2010). Pravděpodobně s přihlédnutím k etickým aspektům experimentů na primátech a také omezenému počtu subjektů se autoři především zabývali časovou kinetikou vzniku a vymizení ložisek  $\gamma$ H2AX v lymfocytech ozářených *in vivo*. Ke studiu použili laser-scanning konfokální mikroskopie, kdy kvantifikovali průměrnou hodnotu ložisek  $\gamma$ H2AX na buňku, tzv. foci per cell-fpc (vyšetřeno 50–200 buněk,  $n = 6$ ). Maximální vzestup  $\gamma$ H2AX pozorovali 30 minut po *ex vivo* ozáření izolovaných lymfocytů, následně docházelo k poklesu, 2 dny od ozáření se množství  $\gamma$ H2AX pohybovalo na úrovni 3-5 % hodnot 30 minut po ozáření. Dávkově závislý vzestup  $\gamma$ H2AX foci v lymfocytech izolovaných z periferní krve stanovili mikroskopicky 7,2 h po ozáření *in vivo* v dávkovém rozmezí 1-3,5 Gy. Statisticky významné ( $p \leq 0,05$ , t-test) zvýšení počtu  $\gamma$ H2AX foci detekovali i v delším časovém období po ozáření (1., 2. a 4. den od ozáření) po vyšších dávkách záření v rozmezí 3,5-8,5 Gy. Je však potřeba dodat, že množství  $\gamma$ H2AX foci stanovených 4. den od ozáření již bylo relativně malé (do dvou fpc v průměru). Stejně jako v našem případě, detekce pomocí cytometrie a imunofluorescenční mikroskopie, vzestup  $\gamma$ H2AX analyzovaný pomocí konfokální mikroskopie byl homogenní napříč celou lymfocytární populací.

Při testování stability proteinu  $\gamma$ H2AX pro případ pozdější analýzy jsme jednu hodinu od celotělového ozáření potkanů dávkami v rozpětí 1 až 10 Gy odebrali periferní krev. U první skupiny jsme lymfocyty izolovali neprodleně po odběru. U druhé skupiny byla krev odebrána jednu hodinu od celotělového ozáření a následně skladována po dobu 23 h na ledu při 4° C, a až po tomto skladování byly z této krve izolovány lymfocyty. U obou skupin jsme následně kvantifikovali množství  $\gamma$ H2AX pomocí průtokové cytometrie. Rozdíl mezi skupinami byl analyzován neparametrickým Mann-Whitney U testem a na hladině statistické významnosti  $p \leq 0,05$ , vyjímaje dávku 3 Gy, nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v množství histonu  $\gamma$ H2AX mezi oběma skupinami. Na základě našich výsledků se můžeme domnívat, že *in vivo* gama zářením-poškozené lymfocyty obsažené v periferní krvi, která je odebrána a *ex vivo* skladována na ledu, nemohou opravit radiační poškození DNA. Zároveň ani nemohou být v případě neopravitelného poškození odstraněny činnosti monocyto-

makrofágového systému těla potkanů. Skladování při 4 °C na ledu navíc pravděpodobně inhibuje aktivitu všech enzymů včetně fosfatas a ubikvitin-proteasomového systému zodpovědných za vymizení  $\gamma$ H2AX foci během případné reparace DNA. Těchto poznatků je možné využít v případě odložené analýzy vzorku krve pro účely biologické dozimetrie.

V našich experimentech jsme dále studovali vliv lokálního ozáření oblastí plic na změny v množství  $\gamma$ H2AX 1 h od ozáření. Vzestup  $\gamma$ H2AX u potkanů ozářených na oblast hrudníku byl pozorován od dávky 10 Gy, statisticky významný vzestup ( $p \leq 0,05$ , t-test) byl vyhodnocen pro dávky 20 a 30 Gy. Po dávce 5 Gy na oblast plic ke zvýšení  $\gamma$ H2AX nedocházelo. Z výsledkových histogramů průtokové cytometrie logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC na ose y versus intenzita fluorescence propidium jodidu na ose x lze však vysledovat, že ozáření organismu je nerovnoměrné (vzestup  $\gamma$ H2AX jen v části populace lymfocytů). Je zřejmé, že lymfocyty krevního oběhu postupně přítomné během doby ozařování v ozařované oblasti vykazovaly vzestup  $\gamma$ H2AX, naopak v lymfocytech, které unikly působení záření se  $\gamma$ H2AX ohniska netvořila. Hodnocením procenta buněk obsahujících  $\gamma$ H2AX pomocí flow cytometrické gating analýzy (oblast vysoké imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC) jsme prokázali s dávkou záření zvyšující se procento  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk od dávky 5 Gy. Výsledky jsme potvrdili vizuální identifikací  $\gamma$ H2AX pomocí imunofluorescenční mikroskopie. V experimentech jsme také po lokálním ozáření dávkou 20 Gy sledovali časově závislé změny  $\gamma$ H2AX. Maximum imunofluorescence jsme pozorovali 1 h od ozáření, za 24 h byla fluorescence mírně zvýšena a 21 dní od ozáření byla pod úrovní kontrolní neozářené skupiny (Havelek et al. 2011b). Redon et al. (2011) využil při částečném ozáření makaka rhesus stanovení  $\gamma$ H2AX pomocí laser-scanning konfokální mikroskopie ve folikulech chlupů pocházejících z ozařované oblasti. Průměrné množství ohnisek  $\gamma$ H2AX na jednu buňku (tzv. foci per cell-fpc) po ozáření dávkami v rozmezí 1-6,5 Gy nepřesáhlo hodnoty 1 fpc. Po dávce 8,5 Gy pozoroval necelé 2,5 fcp  $\gamma$ H2AX v průměru. Maximální množství  $\gamma$ H2AX pozorovali do 24 hodin od ozáření dávkami v rozmezí 1-8,5 Gy. Na základě porovnání výsledků stanovení  $\gamma$ H2AX ve folikulech chlupů z ozářené a neozářené oblasti dospěli k názoru, že celkové množství  $\gamma$ H2AX pozitivních folikulů jedince závisí na dávce záření a ploše těla, která je záření vystavena. Podobně Horn a kolektiv pomocí průtokové cytometrie detekoval maximální imunofluorescenci  $\gamma$ H2AX v *in vitro* ozářených lidských lymfocytech 1 h od expozice buněk záření. Dvacet čtyři hodin od ozáření byla intenzita imunofluorescence nízká. Mísením rozdílných poměrů *in vitro* ozářených (4 Gy) a neozářených lymfocytů vytvořili směsnou populaci buněk, která obsahovala různý podíl  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk v závislosti na velikosti frakce ozářených

lymfocytů (Horn et al. 2011).

Z pohledu kinetiky tvorby a vymizení  $\gamma$ H2AX ohnisek v lymfocytech periferní krve se naše výsledky shodují se závěry publikovanými po ozáření lidských lymfocytů *in vitro*. Andrievski a kolegové studovali pomocí průtokové cytometrie dávkově a časově závislou tvorbu  $\gamma$ H2AX v CD4, CD8 a CD19 pozitivních lidských lymfocytech. Maximální vznik  $\gamma$ H2AX detekovali 1 h od ozáření, mezi 1. a 2. hodinou od ozáření množství  $\gamma$ H2AX neklesalo. Dvacet čtyři hodin od ozáření se imunofluorescence  $\gamma$ H2AX ozářených vzorků nelišila od hodnoty kontrol. Výsledky byly podobné pro jednotlivé lymfocytární subpopulace odlišené na základě CD znaků a jednotlivé dárce krve (n=7) (Andrievski et al. 2009). Analogické výsledky dosažené pomocí laser-scanning konfokální mikroskopie publikoval ve stejném roce team Redona. Maximum tvorby  $\gamma$ H2AX pozorovali 30 minut od ozáření lidských lymfocytů, další studovaný interval (4 h) od ozáření byl již pozorován dramatický pokles  $\gamma$ H2AX ohnisek, 24 hodin od ozáření byl pozorován pokles k úrovni kontrol (Redon et al. 2009).

Lymfocyty patří k nejvíce radiosenzitivním buňkám organismu. Po expozici jedince gama záření umírají apoptózou v množství proporcionálně stoupajícím s velikostí obdržené dávky gama záření. Již za 24 hodin je u lidí pozorován masivní pokles počtu lymfocytů s maximem 72 hodin od ozáření (Goans et al. 1997). Dávka 1 Gy vede k menšímu poklesu počtu lymfocytů, než dávka 3 Gy. Po působení dávky 1 Gy dojde do 30. dne od ozáření k obnovení absolutního počtu lymfocytů na výchozí hodnoty před ozářením, avšak po ozáření 3 Gy lymfopenie přetrvává až do 60. dne od ozáření (Cervený et al. 1999). *In vitro* lymfocyty umírají apoptózou. Šest hodin od ozáření dávkou 7 Gy se objevují první lymfocyty umírající apoptózou, za 24 h byly všechny buňky apoptotické (Vokurková et al. 2006). Na základě těchto charakteristik a jejich snadné dostupnosti jako biologického materiálu k analýze jsou využívány k účelům biologické dozimetrie (biodozimetrie). Z těchto důvodů jsme je rovněž použili ke stanovení histonu  $\gamma$ H2AX *in vivo*. V podmínkách *in vitro* je možné apoptotické lymfocyty snadno prokázat stanovením externalizace fosfatidylserinu pomocí vazby Annexin V komerčně konjugovaného s fluorochromy (Hertveldt et al. 1997, Louagie et al. 1998). Externalizace fosfatidylserinu patří k časnějším dějům probíhající apoptózy (van Engeland 1998). Důvodem nepoužitelnosti stanovení vazby Annexin V u lymfocytů izolovaných z periferní krve po ozáření je, že v prostředí *in vivo* je externalizace fosfatidylserinu silným signálem fagocytózy („eat me“ signálem) zejména pro makrofágy a dendritické buňky (Fadok et al. 1992). Makrofágy detekují fosfatidylserin přes své fosfatidylserin receptory (PSR), MFG-E8 a některé scavenger receptory jako jsou CD36 a SR-BI, které se přímo váží

k fosfatidylserinu (Fadok et al., 2000, Scott et al., 2001). Důsledkem je, že apoptotické lymfocyty externalizující fosfatidylserin v krvi *in vivo* ve zvýšeném množství neprokážeme. V prostředí *in vivo* jsou časně apoptické buňky rychle fagocytovány, a proto vhodnějším ukazatelem je stanovení absolutního počtu lymfocytů po ozáření v krvi exponovaných subjektů. Metoda v kontextu biodozimetrie má však svá úskalí. Počty lymfocytů v periferní krvi zdravých osob kolísají mezi  $1,5-3 \times 10^9/l$ , proto pro lepší odhad obdržené dávky by bylo vhodné znát počty lymfocytů v období před ozářením. V našich experimentech detekujících pokles lymfocytů po celotělovém a lokálním ozáření jsme použili až na výjimku shodných dávek jako v případě kvantifikace  $\gamma$ H2AX. Dvacet čtyři hodin od ozáření jsme prokázali dávkově závislý pokles počtu lymfocytů po celotělovém ozáření potkanů dávkami 0,5-5 Gy. Pokles byl statisticky významný od dávky 1 Gy. Lokální ozáření hrudníku vedlo 24 h od ozáření k podstatně menšímu poklesu počtu lymfocytů v periferní krvi, než ozáření celotělové. Po dávce 5 Gy se počet lymfocytů po ozáření hrudníku neměnil, k poklesu došlo po lokálním ozáření s dávkou 10 Gy. Výsledky byly statisticky významné pro dávky 20 a 30 Gy. Porovnáním statisticky významných výsledků poklesu počtu lymfocytů a vzestupu  $\gamma$ H2AX lze konstatovat, že dávky gama záření, které vyvolaly u zkoumané skupiny fosforylaci histonu H2AX, vedly ve většině případů (s výjimkou dávky 1 Gy) 24 hodin od ozáření k poklesu počtu lymfocytů periferní krve. Je pravděpodobné, že většina klidových lymfocytů fosforylujících H2AX jako následek vzniku DSB toto poškození DNA není schopné opravit a během 24 hodin umírají apoptózou. Oporou pro naše tvrzení mohou být experimenty s ozářeními lidskými klidovými lymfocyty *in vitro*, kdy dávka 4 Gy vyvolávající fosforylaci histonu H2AX 1 h od ozáření vedla 24 hodin později k apoptóze měřené vazbou Annexinu V a propidium jodidu (přes 42 % časně a pozdně apoptotických buněk) (Vilasová et al. 2008).

Na protipólu radiosenzitivních lymfocytů stojí relativně radiorezistentní mesenchymální kmenové buňky (MKB). Je známo, že expozice hematopoetických kmenových buněk ionizujícímu záření vede k apoptóze (Vávrová et al. 2002, Meng et al. 2003). Jak již bylo naznačeno, stejný osud často potká buňky hematopoetického původu jakou jsou lymfocyty periferní krve, nebo buňky leukemické (Řezáčová et al. 2008). MKB se ale chovají rozdílně, jsou do jisté míry rezistentní ke gama zářením-indukované apoptóze (Chen et al. 2006, Muthná et al. 2010, Schönmeyr et al. 2007). Po ozáření *in vitro* (1 h) dojde k dávkově závislé tvorbě  $\gamma$ H2AX napříč buněčnou populací MKB nezávisle na fázi buněčného cyklu. Vzestup  $\gamma$ H2AX dosahuje maxima 1 hodinu od ozáření u MKB izolovaných ze zubní pulpy a periodontálního ligamenta. Během 24 h však dojde k reparaci



většiny záření indukovaných DSB, kdy jen malé, relativně zanedbatelné procento buněk stále spadá do oblastí vysoké imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC ohraničené pomocí gating analýzy. Pro MKB zubní pulpy a periodontálního ligamenta toto množství představuje mezi 1 a 8 % v závislosti na dávce ionizujícího záření, které byly původně vystaveny. Tento trend potvrzují i hodnoty průměru buněčné imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC, které za 24 h zůstávají statisticky nevýznamně zvýšeny oproti kontrole. Kinetika formace a vymizení  $\gamma$ H2AX v MKB zubní pulpy a periodontálního ligamenta odpovídá poznatkům získaných studiemi fosforylace H2AX v nádorových buněčných liniích (Banath et al. 2004), v lidských lymfocytech (Andrievski et al. 2009, Redon et al. 2009), v lidských embryonálních kmenových buňkách (Momcilovic et al. 2009), ale i v lidských MKB kostní dřeně (Prendergast et al. 2011). Prendergast detekoval pomocí Western blot analýzy a imunofluorescenční mikroskopie maximální vzestup  $\gamma$ H2AX 2 h od ozáření MKB kostní dřeně dávkou 10 Gy. Tvorba  $\gamma$ H2AX byla nejdříve detekována 30 minut od ozáření, vrcholu dosáhla 6 h od ozáření a následně klesala (Prendergast et al. 2011). Momcilovic et al. detekovala mikroskopicky viditelná ohniska  $\gamma$ H2AX 20 minut od ozáření embryonálních kmenových buněk dávkou 1 Gy. Během následujících 4 h vymizela většina  $\gamma$ H2AX ohnisek, 6 h od ozáření se jejich množství nelišilo od hodnoty kontrol (Momcilovic et al. 2009). MKB zubní pulpy a periodontálního ligamenta poškození DNA ve formě DSB z větší části během 24 h od ozáření reparují, avšak za cenu zástavy buněčného cyklu. Již první den od ozáření dojde k akumulaci MKB v G2 fázi buněčného cyklu. V G2 fázi je po ozáření dávkou 20 Gy akumulována více než polovina MKB periodontálního ligamenta a zubní pulpy, u MKB kostní dřeně množství představuje více než celou třetinu buněk v cyklu. Tento trend se zjevně nemění do 6. dne od ozáření. MKB zůstávají v permanentní zástavě buněčného cyklu, nehynou významněji apoptózou. Tento fakt je markantnější v kontrastu se stanovením buněčného cyklu u relativně také radiorezistentních, p53 negativních leukemických buněk HL-60 (Vávrová et al. 2000). Dvacet čtyři hodin od ozáření buňky indukují výrazný G2 blok, apoptóza je v tuto dobu od ozáření minimální (5 %). Avšak 3. den od ozáření dojde k masivní smrti buněk apoptózou (78 %), detekovanou jako sub-G1 peak v histogramu analýzy buněčného cyklu. Tato buněčná smrt je označována jako oddálená apoptóza. Buňky se během 2 dnů pokusí opravit poškození DNA, nakonec ale dojde k apoptóze (Aldridge et al. 1998). Co se tedy dále děje s MKB pokud nehynou významněji apoptózou a to včetně oddálené apoptózy během 6 dnů? Vysvětlení poskytlo stanovení aktivity  $\beta$ -galaktosidasy spojené se senescencí (SA- $\beta$ -galaktosidasy) při vyšším pH. U všech třech typů MKB izolovaných z kostní dřeně, periodontálního ligamenta a zubní pulpy jsme detekovali rozvoj senescence. U

kmenových buněk zubní pulpy dojde ke zvýšení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy kvantifikované pomocí průtokové cytometrie již první den od ozáření dávkou 6 Gy. Od třetího dne po ozáření je tento vzestup potvrzen i pomocí detekce SA- $\beta$ -galaktosidasy použitím chromogenního substrátu a mikroskopie. Diskrepanci mezi výsledky kvantifikace SA- $\beta$ -galaktosidasy metodou průtokové cytometrie a mikroskopickou detekcí pravděpodobně způsobil rozdílný metodický základ obou analýz. Mikroskopie využívá barvení na sklíčku pomocí chromogenního substrátu a fixace teplem, na rozdíl od průtokové cytometrie využívající fluorogenního substrátu, který *in situ* v živých buňkách poskytne štěpením aktivitou enzymu C<sub>12</sub>-fluorescein. Vznik látky schopné po excitaci emitovat fluorescence pravděpodobně způsobí větší senzitivitu flow cytometrické metody. Ačkoliv je metoda relativně nová (Debacq-Chainiaux et al. 2009), k podobným závěrům se přiklánějí i další autoři experimentů na MKB (Schellenberg et al. 2011). Aktivita SA- $\beta$ -galaktosidasy se u MKB zubní pulpy dále zvyšuje až do 6. dne od ozáření, kdy dosáhne plató. Zvýšení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy jsme dále stanovili u MKB kostní dřeně a periodontálního ligamenta po dávce 20 Gy 6. a 13. den od ozáření. Závěrem lze konstatovat, že naše výsledky stanovení buněčného cyklu u MKB jsou v souladu s výsledky publikovanými Schönmeylem a kolegy, kteří studovali MKB izolované z kostní dřeně potkanů. Zjistili, že ozáření potkaních MKB dávkami 7 a 12 Gy způsobilo signifikantní akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu, která následně přetrvala minimálně po dobu 3 dnů u skupiny ozářené 7 Gy a alespoň 7 dnů u skupiny ozáření 12 Gy (Schönmeyle et al. 2007). Podobné výsledky, tj. preferenční akumulace buněk v G2 fázi buněčného cyklu byly pozorovány u ozářených MKB izolovaných ze zubní pulpy (Muthná et al. 2010) nebo záření exponovaných lidských embryonálních kmenových buněk (Filion et al. 2009). Na druhou stranu, výsledky Chen et al. (2006) popisují, že ozáření lidských MKB kostní dřeně dávkou 9 Gy se projeví o 36 h později akumulací buněk v G1 a G2 fázi buněčného cyklu. Prendergast et al. (2011) ve shodě s námi pozoroval reparaci záření-indukovaných DSB u lidských MKB kostní dřeně prostřednictvím vymizení ložisek  $\gamma$ H2AX do 24 h od ozáření. Schönmeyle et al. (2007) prokázal vzestup aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy v potkaních MKB kostní dřeně 3. a 7. den od ozáření dávkami 7 a 12 Gy. Muthná et al. (2010) detekovala vzestup aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy u MKB zubní pulpy po ozáření dávkou 20 Gy 3. až 13. den od ozáření. Naopak team Chen et al. (2006) nedetekoval vzestup aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy 5 dnů po ozáření MKB kostní dřeně dávkou 9 Gy. Bohužel, delší časové intervaly v této studii nebyly vyšetřovány.

V dalších fázích experimentů jsme sledovali, jak ovlivní inhibice ATM kinasy zářením indukovanou fosforylací H2AX a G2 zástavu buněčného cyklu u MKB periodontálního

ligamenta a zubní pulpy. Po ozáření buněk dochází k autofosforylaci ATM kinasy na Ser1981, což způsobí disociaci dimeru (nebo multimeru) ATM za vzniku jejího aktivního monomeru s kinasovou aktivitou (Rotman et al. 1999). ATM proteinkinasa fosforyluje mnoho dalších cílů podílejících se na reparaci radiačního poškození. K inhibici ATM kinasy je možné použít jednak nesespecifické inhibitory – kofein (Vávrová et al. 2003) nebo specifické inhibitory KU55933 (Hickson et al. 2004). K inhibici ATM kinasy jsme použili inhibitor KU55933 v koncentraci, jakou doporučuje výrobce. Ve výsledku jsme tak mohli porovnat reakci čtyř skupin MKB periodontálního ligamenta a zubní pulpy. MKB kultivované a) v kompletním mediu, b) v kompletním mediu s KU55933, c) v kompletním mediu ozářené, d) preinkubované po dobu 1 h před ozářením s KU55933 a následně ozářené v přítomnosti KU55933. Z dat je patrné, že inhibice ATM kinasy zcela potlačila ionizujícím zářením-indukovanou tvorbu  $\gamma$ H2AX u mesenchymálních kmenových buněk. Oba typy MKB reagovaly stejně, po ozáření nedošlo při inhibici ATM kinasy 1. h a 24. h od ozáření k významnému vzestupu  $\gamma$ H2AX. Analýza buněčného cyklu odhalila rozdíl v reakci MKB na inhibici ATM kinasy během záření indukované akumulace buněk v G2 fázi. V odpovědi na ozáření MKB periodontálního ligamenta kultivovaných v přítomnosti KU55933 vykazovaly zvýšené množství buněk v G2 fázi buněčného cyklu oproti buňkám vystavených jen záření. Naopak MKB zubní pulpy reagovaly na ozáření v přítomnosti KU55933 sníženým množstvím buněk v G2 fázi oproti buňkám vystavených jen záření. Kultivace kmenových buněk zubní pulpy se samotným inhibitorem vedla k akumulaci buněk v G1 fázi buněčného cyklu a k inhibici syntetické fáze cyklu. U MKB periodontálního ligamenta došlo k akumulaci v G1 fázi buněčného cyklu pod vlivem samotného inhibitoru jen 1. den během kultivace, S fáze nebyla ovlivněna. Lze uzavřít, že inhibice ATM kinasy u MKB periodontálního ligamenta statisticky významně potencovala akumulaci buněk v G2 fázi a u MKB zubní pulpy inhibovala akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Výsledky ukazující redukci zářením-indukované tvorby  $\gamma$ H2AX po inhibici ATM kinasy u MKB zubní pulpy a periodontálního ligamenta jsou ve shodě s daty publikovanými Prendergast et al. (2011) u MKB kostní dřevě. Inhibice ATM kinasy u MKB periodontálního ligamenta a zubní pulpy nevedla k potlačení akumulace buněk v G2 fázi buněčného cyklu, jak po působení KU55933 pozorovala Momcilovic et al. (2009) u lidských embryonálních kmenových buněk. I když je aktivní ATM kinasa důležitá pro průběh signální kaskády schopné spustit zástavu buněčného cyklu, u MKB zjevně v této funkci není nepostradatelná. Prendergast et al. (2011) ve své práci s lidskými MKB kostní dřevě, kde studoval molekulární cesty aktivované po expozici buněk záření za inhibice ATM a DNA-PK, vyzdvihuje význam DNA-PK. Možná právě aktivita zbylých

fosfatidylinositol-3 kinas aktivovaných po poškození DNA zde zastoupila úlohu ATM kinasy v kontrole buněčného cyklu.

S experimenty studujícími vliv inhibice ATM kinasy na apoptózu obohacené o inhibici MEK1/2 kinas jsme volně pokračovali u buněk leukemických. Vybrali jsme si p53- pozitivní T-lymfocytární leukemii MOLT-4. K inhibici ATM kinasy jsme použili nespecifického inhibitoru kofeinu. K inhibici MEK1/2 kinas jsme použili komerčně dodávaného inhibitoru U0126. Jako genotoxický agens, jehož vliv jsme samostatně, nebo v kombinaci s kofeinem a U0126 studovali, jsme volili inhibitor DNA topoisomerasy II a interkalační látku mitoxantron. Primárním mechanismem účinku mitoxantronu je tvorba kovalentního komplexu s topoisomerasou II, čímž dojde k zábraně rozvolnění dvoušroubovice DNA během její replikace. Ve finále tento stav vyústí ve vznik DSB (Kapuscinski a Darzynkiewicz 1985, Smart et al. 2008). U0126 působí inhibičně na aktivaci MEK1/2-ERK1/2 signální kaskády po vzniku DSB, která potencuje signální dráhy vedoucí k proliferaci a přežití buňky po poškození DNA (Golding et al. 2007). Kofein inhibuje ATM-Chk1/2-p53 signální kaskádu aktivovanou DSB, která naopak spouští molekulární cesty vedoucí k apoptóze (Vávrová et al. 2003). Dvacet čtyři hodin od přidání mitoxantronu došlo k významnému zvýšení procenta časně a pozdně apoptotických buněk. Spolupůsobení kofeinu a mitoxantronu vedlo k útlumu mitoxantronem-indukované apoptózy. Naopak společné působení U0126 a MTX vedlo k zesílení účinku mitoxantronu. Ačkoliv je kofein znám jako látka zvyšující cytotoxický efekt látek poškozujících DNA, jako je například ionizující záření (Valenzuela et al. 2000, Eastman 2004) nebo cisplatina (Kawahara et al. 2008), během studovaného intervalu se tento efekt neprojevil. Zvláště účinný je kofein v potlačení poškozením DNA indukované zástavy buněčného cyklu v G2 fázi u buněk s mutovanou formou, nebo bez p53. Zkrácení doby reparace během zástavy v G2 fázi vede ke zvýšení citlivosti buněk, záření a smrti mitotickou katastrofou. Po preinkubaci p53 negativních buněk HL-60 s kofeinem nedochází 24 h od ozáření dávkou 6 Gy k akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Radiační poškození není reparováno, buňky vstoupí do buněčného cyklu s nereparovanou DNA a dojde k indukci apoptózy během 7-10 dní od ozáření (Vávrová et al. 2003). V rozporu tedy je, že kombinace látek ze skupiny topoisomeras II (doxorubicin a mitoxantron) spolu s kofeinem vede k potlačení mitoxantronem-zprostředkovaného cytotoxického účinku (Traganos et al. 1993). Mimo potlačení aktivace signální kaskády vedoucí ke smrti u p53- pozitivní buňky během 24 h, může mít příčina i jiné vysvětlení. Za vším podle množících se zjištění stojí tvorba komplexů mezi mitoxantronem a kofeinem (a dalšími látkami ze skupiny inhibitorů topoisomeras II), který tak potlačí frakci

volného mitoxantronu schopného vykonání svého účinku (Piosik et al. 2002, Traganos et al. 1993). Dalším vysvětlením může být nástup apoptózy v pozdějším čase (Vávrová et al. 2003).

V rámci práce jsme se dále věnovali studiu cytotoxického potenciálu vanadocen dichloridu u p53-negativních leukemických buněk HL-60, p53-pozitivních MOLT-4 a zdravých lidských lymfocytů periferní krve. Cytotoxické působení vanadocen dichloridu je často porovnáváno se strukturně podobnou cisplatinou (Köpf-Majer et al. 1994). Jednu hodinu od počátku expozice buněk HL-60 VDC jsme stanovili lineární dávkově závislý vzestup průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC nezávisle na fázi buněčného cyklu. Vzestup po působení VDC byl homogenní napříč celou populací buněk. Naopak vzestup po působení CP nebyl homogenní, vydělila se populace buněk s vyšší hodnotou imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC zejména v S, minoritně také v G1 fázi buněčného cyklu. Jednu hodinu od ozáření buněk HL-60 jsme kvantifikovali homogenní dávkově závislý vzestup průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC nezávisle na fázi buněčného cyklu. VDC a CP indukuje apoptózu u buněk HL-60. Šestnáct hodin od 1 h expozice VDC jsme pozorovali dávkově závislou apoptózu u buněk HL-60 detekovanou jako sub-G1 vrchol v histogramech analýzy buněčného cyklu. Buňky HL-60 byly ale citlivější k účinku cisplatin. K zástavě buněčného cyklu v G1 fázi došlo u buněk HL-60 jen po působení nejnižší koncentrace cisplatin ( $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). U buněk MOLT-4 nebyl sub-G1 vrchol 16 h od jednohodinové expozice VDC a CP detekován. VDC způsobil akumulaci buněk MOLT-4 v G2 fázi buněčného cyklu po expozici v koncentraci  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Cisplatina ve stejné koncentraci vedla k akumulaci buněk MOLT-4 v G1 fázi buněčného cyklu. Metoda stanovení indukce apoptózy pomocí sub-G1 vrcholu není příliš vhodná pro buňky MOLT-4, neboť tyto buňky se relativně rychle rozpadají na malé fragmenty. Lepší metodou je stanovení vazby Annexinu V a propidium jodidu. Nepříjemným zjištěním za použití této metody bylo, že k účinkům VDC byly citlivější zdravé lidské lymfocyty periferní krve, než maligně transformované, klonálně proliferující buňky T-lymfocytární lidské leukemie MOLT-4. Cisplatina v porovnání s VDC vykazovala vysokou cytotoxicitu na buňky MOLT-4 již při nejnižší studované koncentraci, naopak celkové přežití lymfocytu bylo po působení CP vyšší v porovnání s VDC. Předcházející práce potvrdily cytotoxický (Doležalová 2009, Ghosh et al. 2000, Moebus et al. 1997) a apoptózu-vyvolávající účinek VDC u jaterních hepatocelulárních buněk HepG2 (Aubrecht et al. 1999) a buněk HL-60 (Doležalová 2009). Také naše výsledky potvrdily apoptózu-indukující vlastnosti VDC u leukemických buněk HL-60 (prostřednictvím fragmentace DNA detekované jako sub-G1 peak) a MOLT-4 (prostřednictvím vazby Annexinu V a propidium jodidu). Závěry, že CP indukuje apoptózu u buněk HL-60 a MOLT-

4, jsou v souladu se dříve publikovanými daty (Floros et al. 2003). Naše výsledky ukázaly akumulaci buněk MOLT-4 v G2 fázi buněčného cyklu po působení VDC. Ve shodě se zde prezentovanými výsledky, akumulace buněk v G2 fázi buněčného cyklu byla detekována u buněk Ehrlichova ascitova tumoru (Köpf-Maier et al. 1981), u buněk rakoviny prsu BT-20 a u buněk glioblastomu U373 (Navara et al. 2001). Zvýšená tvorba  $\gamma$ H2AX detekovaná přednostně v S fázi (méně během G1 fáze) buněčného cyklu po působení CP byla v souladu s výsledky publikovanými Olive a Banáth 2009. Autoři popisují vzestup  $\gamma$ H2AX přednostně v S fázi buněčného cyklu 2 h od přidání CP k buňkám. Po expozici vyšším dávkám CP pozorovali vzestup  $\gamma$ H2AX také v G1 fázi buněčného cyklu.

## 8. ZÁVĚR

Naše práce poukazuje na kvantitativní a kvalitativní rozdíly mezi buněčnou odpovědí a senzitivitou lidských nebo potkaních lymfocytů periferní krve, dospělých mesenchymálních kmenových buněk a buněk lidských leukemických linií na poškození DNA působením genotoxických agens rozdílného mechanismu účinku a dávky. Úkolem této práce bylo odpovědět na základní otázky definované dílčími cíly v úvodu.

Jednu hodinu od celotělového ozáření potkanů dávkami v rozmezí 1-10 Gy jsme kvantifikovali lineární dávkově závislý vzestup  $\gamma$ H2AX v lymfocytech izolovaných z periferní krve. Vzestup  $\gamma$ H2AX byl statisticky významný od dávky 3 Gy. Jednu hodinu od lokálního ozáření potkanů na oblast hrudníku dávkami v rozmezí 5-30 Gy jsme kvantifikovali dávkově závislý vzestup od 10 Gy, statisticky významný pro dávky 20 a 30 Gy. U celotělového ozáření došlo k vzestupu  $\gamma$ H2AX homogenně napříč populací lymfocytů, u lokálního ozáření došlo k vzestupu  $\gamma$ H2AX jen v subpopulaci lymfocytů. Výsledky byly stanoveny pomocí průtokové cytometrie a nezávisle potvrzeny pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Dvacet čtyři hodin od lokálního ozáření již nebyl prokázán statistický významný vzestup  $\gamma$ H2AX v lymfocytech izolovaných z krve. **Kvantifikace  $\gamma$ H2AX 1 h od celotělového ozáření lze využít jako zpětného molekulárního indikátoru obdržené dávky celotělového ozáření.** Pro celotělové ozáření potkana jsme vytvořili kalibrační křivku v rozmezí 1-10 Gy. **Stanovením  $\gamma$ H2AX jsme schopni rozlišit celotělové a lokální ozáření.** Histon  $\gamma$ H2AX je jako analyt stabilní během 23 h skladování v plné krvi na ledu při 4 °C, což umožňuje jeho využití v praxi.

Dávky ionizujícího záření, které vyvolaly 1 h od ozáření vzestup  $\gamma$ H2AX, vedly 24 h později k poklesu počtu lymfocytů periferní krve potkana.

**U mesenchymálních kmenových buněk zubní pulpy a periodontálního ligamenta** jsme 1 h od ozáření 20 Gy stanovili statisticky významný **vzestup  $\gamma$ H2AX**. Dvacet čtyři hodin od ozáření byl pozorován pokles  $\gamma$ H2AX, kdy stanovené hodnoty již nebyly statisticky významné. Inhibice ATM kinasy vedla k potlačení zářením indukované tvorby  $\gamma$ H2AX.

Vystavení mesenchymálních kmenových buněk účinku ionizujícího záření vedlo k **dávkově závislé akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu**. Po dávce 20 Gy tato akumulace přetrvala do 6. dne od ozáření. Inhibice ATM kinasy vedla u kmenových buněk zubní pulpy k potlačení zářením indukované akumulace buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Naopak u kmenových buněk periodontálního ligamenta inhibice ATM kinasy vedla ke zvýšení procenta buněk akumulovaných v G2 fázi buněčného cyklu.

První den od ozáření 6 Gy jsme použitím fluorogenního substrátu stanovili **zvýšení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy u kmenových buněk zubní pulpy**. Vzestup byl mikroskopicky potvrzen 3. den od ozáření pomocí chromogenního substrátu. Zvýšení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy bylo detekováno a kvantifikováno u mesenchymálních kmenových buněk kostní dřeně a periodontálního ligamenta 6. a 13. den od ozáření dávkou 20 Gy.

Vanadocen dichlorid indukuje dávkově závislou apoptózu u buněk HL-60 16 h po 1 h preinkubaci. Jednu hodinu od expozice buněk HL-60 vanadocen dichloridu jsme stanovili dávkově závislou formaci  $\gamma$ H2AX, která byla vyšší v porovnání s cisplatinou. Na základě výsledků stanovení  $\gamma$ H2AX se můžeme domnívat, že mechanismus cytotoxického působení vanadocen dichloridu je alespoň z části zprostředkován tvorbou DSB. Vanadocen dichlorid působí cytotoxicky indukcí apoptózy u buněk MOLT-4. Bohužel však naše výsledky ukazují, že **vanadocen dichlorid je v porovnání s cisplatinou méně cytotoxický vůči leukemickým buňkám (MOLT-4 a HL-60) a zároveň více toxický ke zdravým lymfocytům**.

Mitoxantron během 24 h svého permanentního působení indukuje apoptózu u leukemických buněk MOLT-4. **Inhibice ATM kinasy kofeinem sníží mitoxantronem-indukovanou apoptózu. Naopak inhibice MEK1/2-ERK1/2 signální kaskády U0126 potencuje působení mitoxantronu.**

## 9. LITERATURA

ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 3rd edition, 1994. New York (State of New York); Garland Science. ISBN-10: 0-8153-1619-4.

ALCORTA, D.A., XIONG, Y., PHELPS, D., HANNON, G., BEACH, D., BARRETT, J.C. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p 16(INK 4 a) in replicative senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, vol. 93, no. 24, s. 13742–13747.

ALDRIDGE, D.R., RADFORD, I.R. Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between hu-man lymphoid cell lines. *Cancer Research*, 1998, vol. 58, no. 1, s. 2817–2824.

ALLEN, C., HALBROOK, J., NICKOLOFF, J.A. Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining. *Molecular Cancer Research*, 2003, vol. 1, no. 12, s. 913–920.

ANDREE, H.A., REUTELINGSPERGER, C.P., HAUPTMANN, R., HEMKER, H.C., HERMENS, W.T., WILLEMS, G.M. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, vol. 265, no. 9, s. 4923–4928.

ANDRIEVSKI, A., WILKINS, R.C. The response of gamma-H2AX in human lymphocytes and lymphocytes subsets measured in whole blood cultures. *International Journal of Radiation Biology*, 2009, vol. 85, no. 4, s. 369–76.

AUBRECHT, J., NARLA, R.K., GHOSH, P., STANEK, J., UCKUN, F.M. Molecular genotoxicity profiles of apoptosis-inducing vanadocene complexes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1999, vol. 154, no. 3, s. 228–235.

BAKKENIST, CH.J., KASTAN, M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 2003, vol. 421, no. 1, s. 499–506.

BALL, H.L., EHRHARDT, M.R., MORDES, D.A., GLICK G.G., CHAZIN, W.J., CORTEZ D. Function of a conserved checkpoint recruitment domain in ATRIP proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, vol. 27, no. 9, s. 3367–3377.

BALL, K.L., LAIN, S., FAHRAEUS, R., SMYTHE, C., LANE, D.P. Cell-cycle arrest and inhibition of CDK4 activity by small peptides based on the carboxy-terminal domain of p21WAF1. *Current Biology*, 1996, vol. 7, no. 1, s. 71–80.

BANATH, J.P., KLOKOV, D., MACPHAIL, S.H., BANUELOS, C.A., OLIVE, P.L. Residual gammaH2AX foci as an indication of lethal DNA lesions. *BMC Cancer*, 2010, vol. 10, no. 4, s. 1–12.

BANATH, J.P., MACPHAIL, S.H., OLIVE, P.L. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Research*, 2004, vol. 64, no. 1, s. 7144–7149.



- BARTEK, J., MAILAND, N. TOPping up ATR activity. *Cell*, 2006, vol. 124, no. 5, s. 888–90.
- BARTKOVA, J., HOREJSI, Z., KOED, K., KRAMER, A., TORT, F., ZIEGER, K., GULDBERG, P., SEHESTED, M., NESLAND, J.M., LUKAS, C., ØRNTTOFT, T., LUKAS, J., BERTEK, J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 2005, vol. 434, no. 1, s. 864–70.
- BASSING, C.H., ALT, F.W. H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle*, vol. 3, no. 2, s. 149–153.
- BEKKER-JENSEN, S., LUKAS, C., KITAGAWA, R., MELANDER, F., KASTAN, M.B., BARTEK, J., LUKAS, J. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *The Journal of Cell Biology*, 2006, vol. 173, no. 2, s. 195–206.
- BHOGAL, N., KASPLER, P., JALALI, F., HYRIEN, O., CHEN, R., HILL, R.P., BRISTOW, R.G. Late residual gamma H2AX foci in murine skin are dose responsive and predict radiosensitivity in vivo. *Radiation Research*, 2010, vol. 173, no. 1, s. 1–9.
- BONNER, W.M., REDON, C.E., DICKEY, J.S., NAKAMURA, A.J., SEDELNIKOVA, O.A., SOLIER, S., POMMIER, Y. GammaH2AX and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2008, vol. 8, no. 1, s. 957–967.
- BONNET, J., MAYONOVE, P., MORRIS, M.C. Differential phosphorylation of Cdc25C phosphatase in mitosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, vol. 370, no. 3, s. 483–488.
- BORTNER, C.D., OLDENBURG, N.B., CIDLOWSKI, J.A. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 1995, vol. 5, no. 1, s. 21–26.
- BREHM, A., MISKA, E.A., MCCANCE, D.J., REID, J.L., BANNISTER, A.J., KOUZARIDES, T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*, 1998, vol. 391, no. 6667, s. 597–601.
- BUDIHardjo, I., OLIVER, H., LUTTER, M., LUO, X., WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1999, vol.15, no. 1, s. 269–90.
- BURMA, S., CHEN, D.J. Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair*, 2004, vol 3, no. 8, s. 909–918.
- BURMA, S., CHEN, B.P., MURPHY, M., KURIMASA, A., CHEN D.J. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no. 45, s. 42462–42467.
- CAMPISI, J., D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, vol. 8, no. 9, s. 729–740.
- CAMPOS, E.I., REINBERG, D. Histones: annotating chromatin. *Annual Review of Genetics*, 2009, vol. 43, no. 1, s. 559–599.

CELESTE, A., DIFILIPPANTONIO, S., DIFILIPPANTONIO, M.J., FERNANDEZ-CAPETILLO, O., PILCH, D.R., SEDELNIKOVA, O.A., ECKHAUS, M., RIED, T., BONNER, W.M., NUSSENZWEIG, A. H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell*, 2003, vol. 114, no. 3, s. 371–83.

CELESTE, A., PETERSEN, S., ROMANIENKO, P.J., FERNANDEZ-CAPETILLO, O., CHEN, H.T., SEDELNIKOVA, O.A., REINA-SAN-MARTIN, B., COPPOLA, V., MEFFRE, E., DIFILIPPANTONINO, M.J., REDON, C., PILCH, D.R., OLARU, A., ECKHAUS, M., CAMERINI-OTERO, R.D., TESSAROLLO, L., LIVAK, F., MANOVA, K., BONNER, W.M., NUSSENZWEIG, M.C., NUSSENZWEIG, A. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, 2002, vol. 296, no. 5569, s. 922–7.

CEREVNY, T.J., MACVITTIE, T.J., YOUNG, R.W. *Medical consequence of nuclear warfare*. TMM Publications, 1999, Armed Forces Radiobiology Research Institute, Kapitola 2, Acute radiation syndrome in humans, s.15–36.

CIMPRICH, K.A., CORTEZ, D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, vol. 9, no. 8, s. 616–27.

COOK, P.J., JU, B.G., TELESE, F., WANG, X., GLASS, C.K., ROSENFELD, M.G. Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature*, 2009, vol. 458, no. 1, s. 591–596.

CORTEZ, D., GUNTUKU, S., QIN, J., ELLEDGE, S.J. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*, 2001, vol. 294, no. 5547, s. 1713–6.

CORY, S., HUANG, D.C., ADAMS, J.M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 2003, vol. 22, no. 53, s. 8590–607.

CUCINOTTA, F.A., PLUTH, J.M., ANDERSON, J.A., HARPER, J.V., O'NEILL, P. Biochemical kinetics model of DSB repair and induction of gamma-H2AX foci by non-homologous end joining. *Radiation Research*, 2008, vol. 169, no. 2, s. 214–222.

CUCONATI, A., MUKHERJEE, C., PEREZ, D., WHITE, E. DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes & Development*, 2003, vol. 17, no. 23, s. 2922–32.

DANIEL, R., RAMCHARAN, J., ROGAKOU, E., TAGANOV, K.D., GREGER, J.G., BONNER, W., NUSSENZWEIG, A., KATZ, R.A., SKALKA, A.M. Histone H2AX is phosphorylated at sites of retroviral DNA integration but is dispensable for postintegration repair. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279, no. 1, s. 45810–45814.

DARZYNKIEWICZ, Z., JUAN, G., LI, X., GORCZYCA, W., MURAKAMI, T., TRAGANOS, F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, 1997, vol. 27, no. 1, s. 1–20.

DE KLEIN, A., MUIJTJENS, M., VAN O.S. R., VERHOEVEN, Y., SMIT, B., CARR, A.M., LEHMANN, A.R., HOEIJMAKERS, J.H. Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Current Biology*, 2000, vol. 10, no. 8, s.

479–82.

DE LANGE, T. T-loops and the origin of telomeres. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, vol. 5, no. 1, s. 323–329.

DEBACQ-CHAINIAUX, F., ERUSALIMSKY, J.D., CAMPISI, J., TOUSSAINZ, O. 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*, 2009, vol. 4, no. 12, s. 1798–1806.

DENG, X., GAO, F., FLAGG, T., MAY, W.S. Mono- and multisite phosphorylation enhances Bcl2's antiapoptotic function and inhibition of cell cycle entry functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, vol. 101, no.1, s. 153–158.

DENG, X., RUVOLO, P., CARR, B., MAY, W.S. Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, vol. 97, no. 4, s. 1578–83.

DENT, P., GRANT, S. Pharmacologic interruption of the mitogen-activated extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway: potential role of promoting cytotoxic drug action. *Clinical Cancer Research*, 2001, vol. 7, no. 4, s. 775–83.

DILEONARDO, A., LINKE, S.P., CLARKIN, K., WAHL, G. M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & Development*, 1994, vol. 8, no. 21, s. 2540–2551.

DIMRI, G.P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., MEDRANO, E.E., LINSKENS, M., RUBELJ, I., PEREIRA-SMITH, O., PEACOCKE, M., CAMPISI, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, vol. 92, no. 20, s. 9363–9367.

DOLEŽALOVÁ, P. *Stanovení buněčné cytotoxicity vybraných vanadocenových a 1,1'-dimethyl vanadocenových komplexů*. Pardubice: Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Katedra biologických a biochemických věd, 2009. 54 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jaromír Vinklár, Dr.

DOMINA, A.M., SMITH, J.H., CRAIG, R.W. Myeloid cell leukemia 1 is phosphorylated through two distinct pathways, one associated with extracellular signal-regulated kinase activation and the other with G2/M accumulation or protein phosphatase 1/2A inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol. 275, no. 28, s. 21688–94.

DONG, Y., NARLA, R.K., SUDBECK, E., UCKUN, F. M. Synthesis, X-ray structure, and antileukemic activity of oxovanadium(IV) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2000, vol. 78, no. 4, s. 321–330.

EARNSHAW, W.C., MARTINS, L.M., KAUFMANN, S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*, 1999, vol. 68, no. 1, s. 383–424.

EASTMAN, A. Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2004, vol. 91, no.2, s. 223–231.

EKERT, P.G., VAUX, D.L. The mitochondrial death squad - hardened killers or innocent bystanders. *Current Opinion in Cell Biology*, 2005, vol. 17, no. 6, s. 626–30.

EL-DEIRY, W.S., HARPER, J.W., O'CONNOR, P.M., VELCULESCU, V.E., CANMAN, C.E., JACKMAN, J., PIETENPOL, J.A., BURRELL, M., HILL, D.E., WANG, Y. WAF1/CIP1 Is Induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Research*, 1994, vol. 54, no. 5, s. 1169–1174.

EL-DEIRY, W.S., TOKINO, T., VELCULESCU, V.E., LEVY, D.B., PARSONS, R., TRENT, J.M., LIN, D., MERCER, W.E., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 1993, vol. 75, no. 4, s. 817–825.

ENARI, M., SAKAHIRA, H., YOKOYAMA, H., OKAWA, K., IWAMATSU, A., NAGATA, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 1998, vol. 391, no. 6662, s. 43–50.

FADOK, V. A., BRATTON, D. L., ROSE, D. M., PEARSON, A., EZEKEWITZ, R. A. B., HENSON, P. M. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, 2000, vol. 405, no. 4, s. 85–90.

FADOK, V.A., VOELKER, D. R., CAMPBELL P. A., COHEN, J. J., BRATTON, D. L., HENSON, P. M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology*, 1992, vol. 148, no. 7, s. 2207–2216.

FILON, T.M., QIAO, M., GHULE, P.N., MANDEVILLE, M., WIJNEN, A.J., STEIN, J.L., LIAN, J.B., ALTIERI, D.C., STEIN, G.S. Survival responses of human embryonic stem cells to DNA damage. *Journal of Cellular Physiology*, 2009, vol. 220, no. 3, s. 586–592.

FISHER, R.P., MORGAN, D.O. A novel cyclin associates with MO15/cdk7 to form the cdk-activating kinase. *Cell*, 1994, vol. 78, no. 4, s. 713–724.

FISCHER, U., JANICKE, R.U., SCHULZE-OSTHOFF, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death & Differentiation*, 2003, vol. 10, no. 1, s. 76–100.

FLOROS, K.V., THOMADAKI, H., LALLAS, G., KATSAROS, N., TALIERI, M., SCOROLAS, A. Cisplatin-induced apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells: differential expression of BCL2 and novel apoptosis-related gene BCL2L12. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, vol. 1010, no. 1, s. 153–158.

FONG, P.C., BOSS, D.S., YAP, T.A., TUTT, A., WU, P., MERGIU-ROELVINK, M., MORTIMER, P., SWAISLAND, H., LAU, A., O'CONNOR, M.J., ASHWORTH, A., CARMICHAEL, J., KAYE, S.B., SCHELLENS, J.H., DE BONO, J.S. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *The New England Journal of Medicine*, 2009, vol. 361, no. 2, s. 123–134.

FRASCH, S.C., HENSON, P.M., KAILEY, J.M., RICHTER, D.A., JANES, M.S., FADOK, V.A., BRATTON D.L. Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase C $\delta$ . *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol. 275, no. 30, s. 23065–73.

FURUTA, T., TAKEMURA, H., LIAO, Z.Y., AUNE, G.J., REDON, C., SEDELNIKOVA, O.A., PILCH, D.R., ROGAKOU, E.P., CELESTE, A., CHEN, H.T., NUSSENZWEIG, A., ALADJEM, M.I., BONNER, W.M., POMMIER, Y. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian topoisomerase I cleavage complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no. 22, s. 20303–20312.

GHOSH, P., CRUZ, O.J., NARLA, R.K., UNKUM, F.M. Apoptosis-inducing Vanadocene Compounds against Human Testicular Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2000, vol. 6, no. 4, s.1536–1545.

GOANS, R.E., HOLLOWAY, E.C., BERGER, M.E., RICKS, R.C. Early dose assessment following severe radiation accidents. *Health Physics*, 1997 vol. 72, no. 4, s. 513–8.

GOLDING, S. E., ROSENBERG, E., NEILL, S., DENT, P., POVIRK, L. F., VALERIE, K. Extracellular signal-related kinase positively regulates ataxia telangiectasia mutated, homologous recombination repair, and the DNA damage response. *Cancer Research*, 2007, vol. 67, no. 3, s. 1046–53.

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.

GOODRICH, D.W., WANG, N.P., QIAN, Y., LEE, E.Y.H.P., LEE W.H. The retinoblastoma gene product regulates progression through G 1 phase of the cell cycle. *Cell*, 1991, vol. 67, no. 2, s. 293–302.

GREENBERG, R.A. Recognition of DNA double strand breaks by the BRCA1 tumor suppressor network. *Chromosoma*, 2008, vol. 117, no. 4, s. 305–317.

GRIFFITHS, G.J., DUBREZ, L., MORGAN, C.P., JONES, N.A., WHITEHOUSE, J., CORFE, B.M., DIVE, C., HICKMAN J.A. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak *in vivo* precede the onset of apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 1999, vol. 144, no. 5, s. 903–14.

HARDING, M.M., MOKDSI, G. Antitumour metallocenes: structure-activity studies and interactions with biomolecules. *Current Medicinal Chemistry*, 2000 vol. 7, no. 12, s.1289–1303.

HARLEY, C.B., FUTCHER, A.B., GREIDER, C.W. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature*, 1990, vol. 345, no. 6274, s. 458–460.

HAVELEK, R., ŘEZÁČOVÁ, M., ŠINKOROVÁ, Z., ZÁRYBNICKÁ, L., PEJCHAL, J., VÁVROVÁ, J. Phosphorylation of histone H2AX in peripheral blood mononuclear cells after thoracic irradiation of rats. *Journal of Applied Biomedicine*, 2011b, vol. 9, no. 1, s. 209–218.

HAVELEK, R., ŘEZÁČOVÁ, M., ŠINKOROVÁ, Z., ZÁRYBNICKÁ, L., TICHÝ, A., VÁVROVÁ, J. Phosphorylation of histone H2AX as an indicator of received dose of gamma radiation after whole-body irradiation of rats. *Acta Veterinaria Brno*, 2011a, vol. 80, no. 1, s. 113–118.

HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 1965, vol. 37, no. 3, s. 614–636.

HERTVELD, K., PHILIPPE, J., THIERENS, H. Flow cytometry as a quantitative and sensitive method to evaluate low dose radiation induced apoptosis in vitro in human peripheral blood lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 1997, vol. 71, no. 4, s. 429–433.

HICKSON, I., ZHAO, Y., RICHARDSON, C.J., GREEN, S.J., MARTIN, N.M., ORR, A.I., REAPER, P.M., JACKSON, S.P., CURTIN, N.J., SMITH, G.C. Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Research*, 2004, vol. 64, no. 24, s. 9152–9159.

HILL, M.M., ADRAIN, C., DURIEZ, P.J., CREAGH, E.M., MARTIN, S.J. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO Journal*, 2004, vol. 23, no. 10, s. 2134–2145.

HORN, S., BARNARD, S., ROTHKAMM, K. Gamma-H2AX-based dose estimation for whole and partial body radiation exposure. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, no. 9, s. 25113–25113.

HUEN, M.S., SY, S.M., CHEN, J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, vol. 11, no. 1, s. 138–148.

CHANCERELLE, Y., MATHIEU, J., KERGONOU, J.F. Recognition and elimination of senescent erythrocytes: Implication of antibodies specific for malonic dialdehyde-protein adducts, as demonstrated by flow cytometry. *Biochemistry & Molecular Biology International*, 1994, vol. 34, no. 6, s. 1259–1270.

CHEN, L., WILLIS, S.N., WEI, A., SMITH, B.J., FLETCHER, J.I., HINDS, M.G., COLMAN, P.M., DAY, C.L., ADAMS, J.M., HUANG, D.C. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell*, 2005, vol. 17, no. 3, s. 393–403.

CHEN, B.P., CHAN, D.W., KOBAYASHI, J., BURMA, S., ASAITHAMBY, A., MOROTOMI-YANO, K., BOTVINICK, E., QIN, J., CHEN, D.J. Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no. 15, s. 14709–14715.

CHEN, G., LEE, E.Y.H.P. The product of the ATM gene is a 370-kDa nuclear phosphoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, vol. 271, no. 52, s. 33693–33697.

CHEN, M.F., LIN, C.T., CHEN, W.C., YANG, C.T., CHEN, C.C., LIAO, S.K., LIU, J.M., LU, C.H., LEE, K.D. The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, 2006, vol. 66, no. 1, s. 244–253.

CHOWDHURY, D., KEOGH, M.C., ISHII, H., PETERSON, C.L., BURATOWSKI, S., LIEBERMAN, J. Gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Molecular Cell*, 2005, vol. 20, no. 5, s. 801–809.

CHOWDHURY, D., XU, X., ZHONG, X., AHMED, F., ZHONG, J., LIAO, J., DYKXHOORN, D.M., WEINSTOCK, D.M., PFEIFER, G.P., LIEBERMAN J. A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Molecular Cell*, 2008, vol. 31, no. 1, s. 33–46.

IKURA, T., TASHIRO, S., KAKINO, A., SHIMA, H., JACOB, N., AMUNUGAMA, R., YODER, K., IZUMI, S., KURAOKA, I., TANAKA, K., KIMURA, H., IKURA, M., NISHIKUBO, S., ITO, T., MUTO, A., MIYAGAWA, K., TAKEDA, S., FISHEL, R., IGARASHI, K., KAMIYA, K. DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, vol. 27, no. 20, s. 7028–7040.

JACKSON S.P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 2002, vol. 23, no. 5, s. 687–96.

JEFFREY P.D., RUSSO, A.A., POLYAK, K., GIBBS, E., HURWITZ, J., MASSAGUE, J., PAVLETICH, N.P. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin A-CDK2 complex. *Nature*, 1995, vol. 376, no. 1, s. 313–320.

JOZA, N., SUSIN, S.A., DAUGAS, E., STANFORD, W.L., CHO, S.K., LI, C.Y., SASAKI, T., ELIA, A.J., CHENG, H.Y., RAVAGNAN, L., FERRI, K.F., ZAMZAMI, N., WAKEHAM, A., HAKEM, R., YOSHIDA, H., KONG, Y.Y., MAK, T.W., ZUNIGA-PFLUCKER, J.C., KROEMER, G., PENNINGER, J.M. Essential role of the mitochondrial apoptosis inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 2001, vol. 410, no. 6828, s. 549–554.

KAPUSCINSKI, J., DARZYNKIEWICZ, Z. Interactions of antitumor agents Ametantrone and Mitoxantrone (Novatrone) with double-stranded DNA. *Biochemical Pharmacology*, 1985, vol. 34, no. 24, s. 4203–4213.

KARLSEDER, J., BROCCOLI, D., DAI, Y., HARDY, S., DE LANGE, T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science*, 1999, vol. 283, no. 5406, s. 1321–1325.

KARP, J.E., RICKLIS, R.M., BALAKRISHNAN, K., BRIEL, J., GREER, J., GORE, S.D., SMITH, B.D., MCDEVITT, M.A., CARRAWAY, H., LEVIS, M.J., GANDHI, V. A phase I clinical-laboratory study of clofarabine followed by cyclophosphamide for adults with refractory acute leukemias. *Blood*, 2007, vol. 110, no. 6, s. 1762–1769.

KASTAN, M.B., ZHAN, Q., EL-DEIRY, W.S., CARRIER, F., JACKS, T., WALSH, W.V., PLUNKETT, B.S., VOGELSTEIN, B., FORNACE, A.J. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 1992, vol. 71, no. 4, s. 587–597.

KAUFMANN, S.H., EARNSHAW W.C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*, 2000, vol. 256, no. 1, s. 42–9.

KAWAHARA, M., TAKAHASHI, Y., TAKAZAWA, K., TSUCHIYA, H., TOMITA, K., YOKOGAWA, K., MIYAMOTO, K. Caffeine dose-dependently potentiates the antitumor effect of cisplatin on osteosarcomas. *Anticancer Research*, 2008 vol. 28, no. 3, s. 1681–1685.

KEOGH, M.C., KIM, J.A., DOWNEY, M., FILLINGHAM, J., CHOWDHURY, D., HARRISON, J.C., ONISHI, M., DATTA, N., GALICIA, S., EMILI, A., LIEBERMAN, J., SHEN, X., BURATOWSKI, S., HABER, J.E., DUROCHER, D., GREENBLATT, J.F., KROGAN, N.J. A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature*, 2006, vol. 439, no. 1, s. 497–501.

KHANNA, K.K., JACKSON, S.P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 2001, vol. 27, no. 1, s. 247–54.

KINNER, A., WU, W., STAUDT, CH., ILIAKIS, G.  $\gamma$ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, 2008, vol. 36, no. 17, s. 5678–5694.

KNUDSEN, E.S., WANG, J.Y.J. Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin- dependent kinase-mediated RB phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, vol. 17, no. 10, s. 5771–5783.

KÖPF-MAIER, P., Wagner, W. Cytokinetic behavior of Ehrlich ascites tumor after in vivo treatment with cis-diamminedichloroplatinum(II) and metallocene dichlorides. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1981, vol. 102, no. 1, s. 21–30.

KÖPF-MAJER, P. Complexes of metals other than platinum as antitumor agents. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1994, vol. 47, no. 1, s. 1–16.

KUMAGAI, A., YAKOWEC, P.S., DUNPHY, W.G. 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in *Xenopus* egg extracts. *Molecular Biology of the Cell*, 1998, vol. 9, no. 2, s. 345–354.

KUSCH, T., FLORENS, L., MACDONALD, W.H., SWANSON, S.K., GLASER, R.L., yates, J.R., ABMAYR, S.M., WASHBURN, M.P., WORKMAN, J.L. Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science*, 2004, vol. 306, no. 5704, s. 2084–2087.

KUWANA, T., BOUCHIER-HAYES, L., CHIPUK, J.E., BONZON, C., SULLIVAN, B.A., GREEN, D.R., NEWMAYER, D.D. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular Cell*, 2005, vol. 17, no. 4, s. 525–535.

LAVIN, M.F., SHILOH, Y. The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annual Review of Immunology*, 1997, vol. 15, no. 1, s. 177–202.

LEVIN, N.A., BRZOSKA, P., GUPTA, N., MINNA, J.D., GRAY, J.W., CHRISTMAN, M.F. Identification of frequent novel genetic alterations in small cell lung carcinoma. *Cancer*



*Research*, 1994, vol. 54, no. 1, s. 5086–91.

LI, L.Y., LUO, X., WANG, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 2001, vol. 412, no. 6842, s. 95–99.

LI, W., MA, H. Double-stranded DNA breaks and gene functions in recombination and meiosis. *Cell Research*, vol. 16, no. 1, s. 402–412.

LIN, A.W., BARRADAS, M., STONE, J.C., VAN AELST, L., SERRANO, M., LOWE, S.W. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes & Development*, 1998, vol. 12, no. 19, s. 3008–3019.

LIU, F.T., NEWLAND, A.C., JIA, L. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, vol. 310, no. 3, s. 956–962.

LIU, Q., GUNTUKU, S., CUI, X.S., MATSUOKA, S., CORTEZ, D., TAMAI, K., LUO G., CARATTINI-RIVERA, S., DEMAYO, F., BRADLEY, A., DONEHOWER, L.A., ELLEDGE, S.J. Chk1 is an essential kinase that is regulated by ATR and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes & Development*, 2000, vol. 14, no. 12, s. 1448–1459.

LOUAGIE, H., CORNELISSEN, M., PHILIPPE, J., VRAL, V., THIERSEN, H., DE RIDDER, L. Flow cytometric scoring of apoptosis compared to elektron microscopy in  $\gamma$  irradiated lymphocytes. *Cell Biology International*, 1998, vol. 22, no. 4, s. 277–283.

LU, C., ZHU, F., CHO, Y.Y., TANG, F., ZYKOVA, T., MA, W.Y., BODE, A.M., DONG, Z. Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Molecular Cell*, 2006, vol. 23, no. 1, s. 121–132.

MACPHAIL, S.H., BANATH, J.P., YU, Y., CHU, E., OLIVE, P.L. Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1 phase cells. *Radiation Research*, 2003, vol. 159, no. 6, s. 759–767.

MACUREK, L., LINDQVIST, A., VOETS, O., KOOL, J., VOS, H.R., MEDEMA, R.H. Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene*, 2010, vol. 29, no. 15, s. 2281–91.

MAJKA, J., NIEDZIELA-MAJKA, A., BURGERS, P.M. The Checkpoint Clamp Activates Mec1 Kinase during Initiation of the DNA Damage Checkpoint. *Molecular Cell*, 2006, vol. 24, no. 6, s. 891–901.

MALUMBRES, M., DE CASTRO, I.P., HERNANDEZ, M.I., JIMENEZ, M., CORRAL, T., PELLICER, A. Cellular response to oncogenic Ras involves induction of the CDK4 and CDK6 inhibitor p15(INK4b). *Molecular and Cellular Biology*, 2000, vol. 20, no. 8, s. 2915–2925.

MANNINO, J.L., KIM, W., WERNICK, M., NGUYEN, S.V., BRAQUET, R., ADAMSON, A.W., DEN, Z., BETZER, M.A., COLLINS, C.C., BROWN K.D. Evidence for alternate splicing within the mRNA transcript encoding the DNA damage response kinase ATR. *Gene*,

2001, vol. 272, no. 1, s. 35–43.

MANSILLA, S., PINA, B., PORTUGAL, J. Daunorubicin-induced variations in gene transcription: commitment to proliferation arrest, senescence and apoptosis. *Biochemical Journal*, 2003, vol. 372, no. 3, s. 703–711.

MAREKOVÁ, M., VÁVROVÁ, J., VOKURKOVÁ, D. Monitoring of premitotic and postmitotic apoptosis in gamma-irradiated HL-60 cells by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7. *General Physiology and Biophysics*, 2003a, vol. 22, no. 2, s. 191–200.

MAREKOVÁ, M., VÁVROVÁ, J., VOKURKOVÁ, D., PSUTKA, J. Modulation of ionizing radiation-induced apoptosis and cell cycle arrest by all-trans retinoic acid in promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Physiological Research*, 2003b, vol. 52, no. 5, s. 599–606.

MARTIN, O.A., BONNER, W.M. GammaH2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence. *Cell Cycle*, 2006, vol. 5, no. 24, s. 2909–2913.

MATSUOKA, S., HUANG, M., ELLEDGE, S.J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*, 1998, vol. 282, no. 5395, s. 1893–1897.

MATSUSHIME, H., ROUSSEL, M.F., ASHMUN, R.A., SHERR, C.J. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell*, 1991, vol. 65, no. 4, s. 701–713.

MCSHEA, A., SAMUEL, T., EPPEL, J.T., GALLOWAY, D.A., FUNK, J.O. Identification of CIP-1-associated regulator of cyclin B (CARB), a novel p21-binding protein acting in the G2 phase of the cell cycle. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol. 275, no. 30, s. 23181–23186.

MENG, A., WANG, Y., BROWN, S.A., Van, Z.G., Zhou, D. Ionizing radiation and busulfan inhibit murine bone marrow cell hematopoietic function via apoptosis-dependent and independent mechanisms. *Experimental Hematology*, 2003 vol.1, no. 2, s. 1348–1356.

MENOYO, A., ALAZZOUZI, H., ESPIN, E., ARMENGOL, M., YAMAMOTO, H., SCHWARTZ, S. Somatic mutations in the DNA damage-response genes ATR and CHK1 in sporadic stomach tumors with microsatellite instability. *Cancer Research*, 2001, vol. 61, no. 21, s. 7727–30.

MILELLA, M., KORNBLAU, S.M., ESTROV, Z., CARTER, B.Z., LAPILLONNE, H., HARRIS, D., KONOPLEVA, M., ZHAO, S., ESTEY, E., ANDREEFF, M. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 2001, vol.108, no. 6, s. 851–859.

MOEBUS, V.J., STEIN, R., KIEBACK, D.G., RUNNEBAUM, I.B., SASS, G., KREIENBERG, R. Antitumor activity of new organometallic compounds in human ovarian cancer cell lines and comparison to platinum derivatives. *Anticancer Research*, 1997, vol. 17, no. 2, s. 815–821.

MOMČILOVIČ, O., CHOI, S., VARUM, S., BAKKENIST, C., SCHAZTEN, G., NAVARA,

C. Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated-dependent checkpoint signaling and G(2) but not G(1) cell cycle arrest in pluripotent human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2009, vol. 27, no. 8, s. 1822–1835.

MORGAN, D.O. Principles of CDK regulation. *Nature*, 1995, vol. 374, no. 6518, s. 131–134.

MUKHERJEE, B., KESSINGER, C., KOBAYASHI, J., CHEN, B.P., CHEN D.J., CHATTERJEE, A., BURMA, S. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair*, 2006, vol. 5, no. 5, s. 575–590.

MUTHNA, D., SOUKUP, T., VÁVROVÁ, J., MOKRY, J., CMIELOVA, J., VISEK, B., JIROUTOVA, A., HAVELEK, R., SUCHANEK, J., FILIP, S., ENGLISH, D., REZACOVA, M. Irradiation of Adult Human Dental Pulp Stem Cells Provokes Activation of p53, Cell Cycle Arrest and Senescence but not Apoptosis. *Stem Cells and Development*, 2010, vol. 19, no. 12, s. 1855–1862.

NAKAMURA, A.J., CHIANG, Y.J., HATHCOCK, K.S., HORIKAWA, I., SEDELNIKOVA, O.A., HODES, R.J., BONNER, W.M. Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics & Chromatin*, 2008, vol. 6, no. 1, s. 1–12.

NAKAMURA, A.J., REDON, C.E., MARTIN, O.A. Where did they come from? The origin of them endogenous gamma-H2AX foci in tumor cells. *Cell Cycle*, 2009, vol. 8, no. 15, s. 2324–2324.

NAVARA, C.S., BENYUMOV, A., VASSILEV, A., NARLA, R.K., GHOSH, P., UCKUN, F.M. Vanadocenes as potent anti-proliferative agents disrupting mitotic spindle formation in cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*, 2001, vol. 12, no. 4, s. 369–376.

NICULESCU, A.B., CHEN, X., SMEETS, M., HENGST, L., PRIVES, C., REED, S.I. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, vol. 18, no. 1, s. 629–643.

NIKJOO, H., O'NEILL, P., WILSON, W.E., GOODHEAD, D.T. Computational approach for determining the spectrum of DNA damage induced by ionizing radiation. *Radiation Research*, 2001, vol. 156, no. 5, s. 577–583.

O'DRISCOLL, M., RUIZ-PEREZ, V.L., WOODS, C.G., JEGGO P.A., GOODSHIP, J.A. A splicing mutation affecting expression of ataxia–telangiectasia and Rad3–related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nature Genetics*, 2003, vol. 33, no. 1, s. 497–501.

ODA, E., OHKI, R., MURASAWA, H., NEMOTO, J., SHIBUE, T., YAMASHITA, T., TOKINO, T., TANIGUCHI, T., TANAKA, N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53 induced apoptosis. *Science*, 2000, vol 288, no. 5468, s. 1053–1058.

OLIVE, P.L., BANÁTH J.P. Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Cytometry B Clinical Cytometry*. 2009, vol. 76, no. 2, s. 79–90.

ÖSTERREICHER, J., PEJCHAL, J., ŠKOPEK, J., MOKRÝ, J., VILASOVÁ, Z., PSUTKA, J., VÁVROVÁ, J., MAZUROVÁ, Y. Role of type II pneumocytes in pathogenesis of radiation pneumonitis: dose response of radiation-induced lung changes in the transient high vascular permeability period. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2004, vol. 56, no. 3, s.181–187.

PARK, E.J., CHAN, D.W., PARK, J.H., OETTINGER, M.A., KWON, J. DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic Acids Research*, 2003, vol. 31, no. 23, s. 6819–6827.

PARRINELLO, S., SAMPER, E., KRTOLICA, A., GOLDSTEIN, J., MELOV, S., CAMPISI, J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative life span of murine cells. *Nature Cell Biology*, 2003, vol. 5, no. 8, s. 741–747.

PAULES, R.S., LEVEDAKOU, E.N., WILSON, S.J., INNES, C.J., RHODES, N., TLSTY, T.D., GALLOWAY, D.A., DONEHOWER, L.A., TAINSKY, M.A., KAUFMANN, W.K. Defective G2 Checkpoint Function in Cells from Individuals with Familial Cancer Syndromes. *Cancer Research*, 1995, vol. 55, no. 8, s. 1763–1773.

PAULL, T.T., ROGAKOU, E.P., YAMAZAKI, V., KIRCHGESSNER, C.U., GELLERT, M., BONNER, W.M. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology*, 2000, vol. 10, no. 15, s. 886–895.

PETERS, J.M. SCF and APC: the yin and yang of cell cycle regulated proteolysis. *Current Opinion in Cell Biology*, 1998, vol. 10, no. 6, s. 759–768.

PINTO, D.M., FLAUS, A. Structure and Function of Histone H2AX. *Subcellular Biochemistry*, 2010, vol. 50, no. 1, s. 55–78.

PIOSIK, J., ZDUNEK, M., KAPUSCINSKI, J. The modulation by xanthenes of the DNA damaging effect of polycyclic aromatic agents. Part II. The stacking complexes of caffeine with doxorubicin and mitoxantrone. *Biochemical Pharmacology*, 2002, vol. 63, no. 4, s. 635–646.

POMMIER, Y., BARCELO, J.M., RAO, V.A., SORDET, O., JOBSON, A.G., THIBAUT, L., MIAO, Z.H., SEILER, J.A., ZHANG, H., MARCHAND, C., AGAMA, K., NITISS, J.L., REDON, C. Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology*, 2006, vol. 81, no. 1, s. 179–229.

POST, S., WENG, Y.C., CIMPRICH, K., CHEN, L.B., XU, Y., LEE, E.Y. Phosphorylation of serines 635 and 645 of human Rad17 is cell cycle regulated and is required for G(1)/S checkpoint activation in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, vol. 98, no. 23, s. 13102–13107.

PRENDERGAST, A.M., CRUET-HENNEQUART, S., SHAW, G., BARRY, F.P., CARTY, M.P. Activation of DNA damage response pathways in human mesenchymal stem cells exposed to cisplatin or  $\gamma$ -irradiation. *Cell Cycle*, 2011, vol. 10, no. 21, s. 3768–3777.

QIN, X.Q., CHITTENDEN, T., LIVINGSTON, D., KAELIN, W.G. Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes & Development*, 1992,

vol. 6, no. 6, s. 953–64.

RAMAKRISHNAN, V. Histone structure and the organization of the nucleosome. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1997, vol. 26, no. 1, s. 83–112.

REDDEL, R.R. Senescence: an antiviral defense that is tumor suppressive? *Carcinogenesis*, 2010, vol. 31, no. 1, s. 19–26.

REDON, C.E., DICKEY, J.S., BONER, W.M., SEDELNIKOVA, O.A.  $\gamma$ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Advances in Space Research*, 2009, vol. 43, no. 8, s. 1171–1178.

REDON, C.E., NAKAMURA, A.J., GOULIAEVA, K., RAHMAN, A., BLAKELY, W.F., BONNER, W.M. The use of gamma-H2AX as a biodosimeter for total-body radiation exposure in non-human primates. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 11, s. 1–8.

REDON, C., PILCH, D., ROGAKOUS, E., SEDELNIKOVA, O., NEWROCK, K., BONNER, W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2002, vol. 12, no. 2, s. 162–169.

REDON, C., PILCH, D.R., ROGAKOU, E.P., ORR, A.H., LOWNDES, N.F., BONNER, W.M. Yeast histone 2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage. *EMBO reports*, 2003, vol. 4, no. 7, s. 678–684.

REDON, C.E., NAKAMURA, A.J., GOULIAEVA, K., RAHMAN, A., BLAKELY, W.F., BONNER, W.M. Q( $\gamma$ -H2AX), an analysis method for partial-body radiation exposure using  $\gamma$ H2AX in nonhuman primate lymphocytes. *Radiation Measurements*, 2011, vol. 46, no. 9, s. 877–881.

RESNITZKY, D., REED, S.I. Different roles for cyclins D1 and E in the regulation of the G1-S transition. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, vol. 15, no. 7, s. 3463–3469.

ŘEZÁČOVÁ, M., HAVELEK, R., LUKÁŠOVÁ, E., VÁVROVÁ, J. Fosforylovaný histon H2AX – nový indikátor poškození DNA. *Chemické listy*, 2011, vol. 105, s. 108–113.

ŘEZÁČOVÁ, M., TICHÝ, A., VÁVROVÁ, J., VOKURKOVÁ, D., LUKÁŠOVÁ, E. Is defect in phosphorylation of Nbs1 responsible for high radiosensitivity of T-lymphocyte leukemia cells MOLT-4? *Leukemia Research*, 2008, vol. 32, no. 8, s. 1259–1267.

RISQUES, R.A., LAI, L.A., BRETNALL, T.A., LI, L., FENG, Z., GALLAHER, J., MANDELSON, M.T., POTTER, J.D., BRONNER, M.P., RABINOVITCH, P.S. Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: evidence from telomere attrition and DNA damage. *Gastroenterology*, 2008, vol. 135, no. 2, s. 410–8.

ROGAKOU, E.P., BOON, C., REDON, C., BONNER, W.M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 1999, vol. 146, no. 5, s. 905–916.

ROGAKOU, E.P., NIEVES-NEIRA, W., BOON, C., POMMIER, Y., BONNER, W.M.

Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol. 275, no. 13, s. 9390–9395.

ROGAKOU, E.P., PILCH, D.R., ORR, A.H., IVANOVA, V.S., BONNER, W.M. DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol. 273, no. 1, s. 5858–5868.

ROTHKAMM, K., LÖBRICH, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, vol. 100, no. 9, s. 5057–5062.

ROTMAN, G., SHILOH, Y. ATM: A mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene*, 1999, vol. 18, no. 45, s. 6135–6144.

SAVITSKY, K., BAR-SHIRA, A., GILAD, S., ROTMAN, G., ZIV, Y., VANAGAITE, L., TAGLE, D.A., SMITH, S., UZIEL, T., SFEZ, S. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, 1995, vol. 268, no. 5218, s. 1749–1753.

SCHELLENBERG, A., LIN, Q., SCHÜLER, H., KOCH, C.M., JOUSSEN, S., DENECKE, B., WALENDA, G., PALLUA, N., SUSCHEK, C.V., ZENKE, M., WAGNER, W. Replicative senescence of mesenchymal stem cells causes DNA-methylation changes which correlate with repressive histone marks. *Aging*, 2011, vol. 3, no. 9, s. 873–88.

SCHÖNMEYR, B.H., WONG A.K., SOARES, M., FERNANDEZ, J., CLAVIN, N., MEHRA, B.J. Ionizing radiation of mesenchymal stem cells results in diminution of the precursor pool and limits potential for multilineage differentiation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2007, vol. 122, no. 1, s. 64–76.

SCHROIT, A.J., ZWAAL, R.F. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, vol. 1071, no. 3, s. 313–329.

SCOTT, R. S., MCMAHON, E. J., POP, S. M., REAP, E.A., CARICCHIO, R., COHEN, P.L., EARP, H. S., MATSUSHIMA G.K. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*, 2001, vol. 411, no. 1, s. 207–11.

SEDELNIKOVA, O.A., ROGAKOU, E.P., PANYUTIN, I.G., BONNER, W.M. Quantitative detection of (125) IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiation Research*, 2002, vol. 158, no. 4, s. 486–492.

SEDELNIKOVA, O.A., HORIKAWA, I., REDON, C., NAKAMURA, A., ZIMONJIC, D.B., POPESCU, N.C., BONNER, W.M. Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging. *Aging Cell*, 2008, vol. 7, no. 1, s. 89–100.

SEDELNIKOVA, O.A., HORIKAWA, I., ZIMONJIC, D.B., POPESCU, N.C., BONNER, W.M., BARRETT, J.C. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nature Cell Biology*, 2004, vol. 6, no. 1, s. 168–170.

SERRANO, M., LIN, A.W., MCCURRACH, M.E., BRACH, D., LOWE, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 1997, vol. 88, no. 5, s. 593–602.

SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Reviews Cancer*, 2003, vol. 3, no. 1, s. 155–168.

SHRIVASTAV, M., MILLER, C.A., DE HARO, L.P., DURANT, S.T., CHEN, B.P., CHEN, D.J., NICKOLOFF, J.A. DNA-PKcs and ATM co-regulate DNA double-strand break repair. *DNA repair*, 2009, vol.8, no. 8, s. 920–929.

SLUSS, H.K., DAVIS, R.J. H2AX is a target of the JNK signaling pathway that is required for apoptotic DNA fragmentation. *Molecular Cell*, 2006, vol. 23, no. 2, s. 152–153.

SMART, D.J., HALICKA, H.D., SCHMUCK, G., TRAGANOS, F., DARZYNKIEWICZ, Z., WILLIAMS, G.M. Assessment of DNA double-strand breaks and gammaH2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone. *Mutation Research*, 2008, vol. 641, no. 1, s. 43–47.

SMITH, G.C., JACKSON, S.P. The DNA-dependent protein kinase. *Genes & Development*, 1999, vol. 13, no. 8, s. 916–934.

SMITH, L., LIU, S.J., GOODRICH, L., JACOBSON, D., DEGNIN, C., BENTLEY, N., CARR, A., FLAGGS, G., KEEGAN, K., HOEKSTRA, M., THAYER, M.J. Duplication of ATR inhibits MyoD, induces aneuploidy and eliminates radiation-induced G1 arrest. *Nature Genetics*, 1998, vol. 19, no. 1, s. 39–46.

SMITS, V.A., REAPER, P.M., JACKSON, S.P. Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Current Biology*, 2006, vol.16, no. 2, s. 150–159.

SOLIER, S., POMMIER, Y. The apoptotic ring: a novel entity with phosphorylated histones H2AX and H2B and activated DNA damage response kinases. *Cell Cycle*, 2009, vol. 8, no. 12, s. 1853–1859.

SOUKUP, T., MOKRÝ, J., KARBANOVÁ, J., PYTLÍK, R., SUCHOMEL, P., KUCEROVÁ, L. Mesenchymal stem cells isolated from the human bone marrow: cultivation, phenotypic analysis and changes in proliferation kinetics. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2006, vol. 49, no. 1, s. 27–33.

STEIN, G.H., DRULLINGER, L.F., SOULARD, A., DULIC, V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, vol. 19, no. 3, s. 2109–2117.

STRACKER, T.H., USUI, T., PETRINI, J.H. Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair*, 2009, vol. 8, no. 9, s. 1047–1054.

STUCKI, M. Histone H2A.X Tyr142 phosphorylation: a novel sWItCH for apoptosis? *DNA Repair*, 2009, vol. 8, no. 7, s. 873–876.

STUCKI, M., CLAPPERTON, J.A., MOHAMMAD, D., YAFFE, M.B., SMERDON, S.J., JACKSON, S.P. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular

responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 2005, vol. 123, no. 7, s. 1213–1226.

SUCHÁNEK, J., SOUKUP, T., IVANČÁKOVÁ, R., KARBANOVÁ, J., HUBKOVÁ, V., PYTLÍK R., KUCEROVÁ, L. Human dental pulp stem cells— isolation and long term cultivation. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2007, vol. 50, no. 3, s. 195–201.

SUCHÁNEK, J., SOUKUP, T., VÍSEK, B., IVANČÁKOVÁ R., KUCEROVÁ, L., MOKRÝ J. Dental pulp stem cells and their characterization. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic*, 2009, vol. 153, no. 1, s. 31–35.

TAKAI, H., SMOGORZEWSKA, A., DE LANGE, T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Current Biology*, 2003, vol. 13, no. 17, s. 1549–1556.

TARAKANOVA, V.L., LEUNG-PINEDA, V., HWANG, S., YANG, C.W., MATATALL, K., BASSON, M., SUN, R., PIWNICA-WORMS, H., SLECKMAN, B.P., VIRGIN, H.W. Gamma-herpesvirus kinase actively initiates a DNA damage response by inducing phosphorylation of H2AX to foster viral replication. *Cell Host & Microbe*, 2007, vol. 1, no. 4, s. 275–86.

THIRIET, C., HAYES, J.J. Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair. *Molecular Cell*, 2005, vol. 18, no. 6, s. 617–622.

TIBBETTS, R.S., BRUMBAUGH, K.M., WILLIAMS, J.M., SARKARIA, J.N., CLIBY, W.A., SHIEH, S.Y., TAYA, Y., PRIVES, C., ABRAHAM, R.T. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes & Development*, 1999, vol. 13, no. 2, s. 152–157.

TRAGANOS, F., KAPUSCINSKI, J., GONG, J., ARDELT, B., DARZYNKIEWICZ, R.J., DARZYNKIEWICZ Z. Caffeine prevents apoptosis and cell cycle effects induced by camptothecin or topotecan in HL-60 cells. *Cancer Research*, 1993, vol. 53, no. 19, s. 4613–4618.

UNAL, E., ARBEL-EDEN, A., SATTLER, U., SHROFF, R., LICHTEN, M., HABER, J.E., KOSHLAND, D. DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Molecular Cell*, 2004, vol. 16, no. 6, s. 991–1002.

VALENZUELA, M.T., MATEOS, S., RUIZ, J.M., MCMILLAN T.J. Variation in sensitizing effect of caffeine in human tumour cell lines after gamma-irradiation. *Radiotherapy & Oncology*, 2000, vol. 54, no. 3, s. 261–271.

VAN DER LOO, B., FENTON, M. J., ERUSALIMSKY, J. D. Cytochemical detection of a senescence-associated b-galactosidase in endothelial and smooth muscle cells from human and rabbit blood vessels. *Experimental Cell Research*, 1998, vol. 241, no. 2, s. 309–315.

VAN ENGELAND, M., NIELAND, L.J., RAMAEKERS, F.C., SCHUTTLE, B., REUTELINGSPERGER, C.P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 1998, vol. 31, no. 1, s. 1–9.

VAN STEENSEL, B., SMOGORZEWSKA, A., DE LANGE, T. TRF2 protects human



telomeres from end to-end fusions, *Cell*, 1998, vol. 92, no. 3, s. 401–413.

VÁVROVÁ, J., MAREKOVÁ, M., VOKURKOVÁ, D. Lidské hematologické nádorové linie a jejich citlivost k účinkům ionizujícího záření. *Vojenské zdravotnické listy*, 2000, vol. 69, no. 6, s. 267–276.

VÁVROVÁ, J., MAREKOVÁ, M., VOKURKOVÁ, D. Radiation-induced apoptosis and cell cycle progression in TP53-deficient human leukemia cell line HL-60. *Neoplasma*, 2001, vol. 48, no. 1, s. 26–33.

VÁVROVÁ, J., MAREKOVÁ, M., VOKURKOVÁ, D., PSUTKA J. Cell cycle alteration, apoptosis and response of leukemic cell lines to gamma radiation with high- and low-dose rate. *Physiological Research*, 2004, vol. 53, no.1, 335–342.

VÁVROVÁ, J., MAREKOVÁ-ŘEZÁČOVÁ, M., VOKURKOVÁ, D., SZKANDEROVÁ, S.S., PSUTKA, J. Caffeine induces a second wave of apoptosis after low dose-rate gamma radiation of HL-60 cells. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2003 vol. 42, no. 3, s. 193–199.

VÁVROVÁ, J., ŘEZÁČOVÁ, M. Importance of Senescence in Ionizing Radiation-Induced Tumor Suppression. *Folia Biologica*, 2011, vol. 57, no. 2, s. 41–46.

VÁVROVÁ, J., VOKURKOVÁ D., MAREKOVÁ M., BLÁHA M., JEBAVÝ L., FILIP S. Antiapoptotic cytokine IL-3 \_ SCF \_ FLT3L influence on proliferation of gamma-irradiated AC133 \_ /CD34 \_ progenitor cells. *Folia Biologica*, 2002, vol. 48, no. 2, s. 51– 57.

VERHAGEN, A.M., EKERT, P.G., PAKUSCH, M., SILKE, J., CONNOLLY, L.M., REID, G.E., MORITZ, R.L., SIMPSON, R.J., VAUX, D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 2000, vol. 102, no. 1, s. 45–53.

VILASOVÁ, Z., REZÁČOVÁ, M., VÁVROVÁ, J., TICHÝ, A., VOKURKOVÁ, D., ZOELZER, F., ŘEHÁKOVÁ, Z., OSTERREICHER, J, LUKÁŠOVÁ, E. Changes in phosphorylation of histone H2A.X and p53 in response of peripheral blood lymphocytes to gamma irradiation. *Acta Biochimica Polonica*, 2008, vol. 55, no. 2, s. 381–90.

VILENCHIK, M.M., KNUDSON, A.G. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, vol. 100, no. 22, s. 12871–12876.

VINDELOV, L.L. Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. *Virchows Archiv - B: Cell Pathology*, 1977, vol. 24, no. 1, s. 227–242.

VOKURKOVÁ. D., SINKORA, J., VÁVROVÁ, J., ŘEZÁČOVÁ, M., KNÍŽEK, J., OSTERREICHER, J. CD8+ natural killer cells have a potential of a sensitive and reliable biosimetric marker in vitro. *Physiological Research*, 2006, vol. 55, no. 6, s. 689–98.

WADA, T., JOZA, N., CHENG, H.Y., SASAKI, T., KOZIERADZKI, I., BACHMAIER, K., KATADA, T., SCHREIBER, M., WAGNER, E.F., NISHINA, H., PENNINGER, J.M.

MKK7 couples stress signaling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nature Cell Biology*, 2004, vol. 6, no. 3, s. 215–226.

WARD, I.M., CHEN, J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no. 51, s. 47759–47762.

WARTERS, R.L., ADAMSON, P.J., POND, C.D., LEACHMAN, S.A. Melanoma cells express elevated levels of phosphorylated histone H2AX foci. *Journal of Investigative Dermatology*, 2005, vol. 124, no. 4, s. 807–81.

WEINERT, T. A DNA damage checkpoint meets the cell cycle engine. *Science*, 1997; vol. 277, no. 5331, s. 1450–1451.

WILKINSON, G., BIRMINGHAM, J.M. Dicyclopentadienyl compounds of titanium, zirconium, vanadium, niobium, and tantalum. *Journal of the American Chemical Society*, 1954, vol. 76, no. 1, s. 4281–4284.

WILSKER, D., PETERMANN, E., HELLEDAY, T., BUNZ, T. Essential function of Chk1 can be uncoupled from DNA damage checkpoint and replication control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, vol. 105, no. 52, s. 20752–20757.

WOLTER, K.G., HSU, Y.T., SMITH, C.L., NECHUSHTAN, A., XI X.G., YOULE R.J. Movements of bax from cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 1997, vol.139, no. 5, s. 1281–1292.

WU, L., LUO, K., LOU, Z., CHEN, J. MDC1 regulates intra-S-phase checkpoint by targeting NBS1 to DNA double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, vol. 105, no. 32, s. 11200–11205.

XIAO, A., LI, H., SHECHTER, D., AHN, S.H., FABRIZIO, L.A., ERDJUMENT-BROMAGE, H., ISHIBE-MURAKAMI, S., WANG, B., TEMPST, P., HOFMANN, K., PATEL, D.J., ELLEDGE, S.J., ALLIS, C.D. WSTF regulates the H2A. X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature*, 2009, vol. 457, no. 1, s. 57–62.

XIE, A., SCULLY, R. Hijacking the DNA damage response to enhance viral replication: gammaherpesvirus 68 orf36 phosphorylates histone H2AX. *Molecular Cell*, 2007, vol. 27, no. 2, s. 178–179.

YAJIMA, H., LEE, K.J., CHEN, B.P. ATR-dependent phosphorylation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in response to UV-induced replication stress. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, vol. 26, no. 20, s. 7520–7528.

YANG, E., ZHA, J., JOCKEL, J., BOISE, L.H., THOMPSON, C.B., KORSMEYER, S.J. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 1995, vol. 80, no. 2, s. 285–291.

YANG, J., LIU, X., BHALLA, K., KIM, C.N., IBRADO, A.M., CAI, J., PENG, T.I., JONES, D.P., WANG, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 1997, vol. 275, no. 5303, s. 1129–1132.

YANG, P., GUO, M. Interactions of organometallic anticancer agents with nucleotides and DNA. *Coordination Chemistry Reviews*, 1999, vol. 185, no. 1, s. 189–211.

YU, T., MACPHAIL, S.H., BANATH, J.P., KLOKOV, D., OLIVE, P.L. Endogenous expression of phosphorylated histoneH2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability. *DNA Repair*, 2006, vol. 5, no. 8, s. 935–946.

YUAN, J., CHEN, J. MRE11-RAD50-NBS1 complex dictates DNA repair independent of H2AX. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, vol. 285, no. 2, s. 1097–1104.

ZHAO, B., BENSON, E.K., QIAO, R., WANG, X., KIM, S., MANFREDI, J.J., LEE, S.W., AARONSON, S.A. Cellular enescence and organismal ageing in the absence of p21(CIP1/WAF1) in ku80(–/–) mice. *EMBO reports*, 2009, vol. 10, no. 1, s. 71–78.

ZHAO, H., PIWNICA-WORMS, H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, vol. 21, no. 13, s. 4129–4139.

ZHOU, B.B., ELLEDGE, S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 2000, vol. 408, no. 6811, s. 433–439.

## 10. PŘÍLOHY

1. HAVELEK, R., ŘEZÁČOVÁ, M., ŠINKOROVÁ, Z., ZÁRYBNICKÁ, L., TICHÝ, A., VÁVROVÁ, J.

**Phosphorylation of histone H2AX as an indicator of received dose of gamma radiation after whole-body irradiation of rats.**

*Acta Veterinaria Brunensis*, 2011, vol. 80, no. 1, s. 113-118.