

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

Změny vybraných proteinů v reakci na genotoxický stres

Changes in protein expression in response to genotoxic stress

Mgr. Jana Čmielová

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

Hradec Králové, 2012

.....

Obhajoba dne:

Prohlášení:

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

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

Hradec Králové, 2012

Úvodem bych ráda poděkovala všem těm, kteří se podíleli na vzniku této práce.

Mé poděkování patří především:

- mé rodině, za pochopení a podporu v práci a studiu,
- školitelce doc. MUDr. Martině Řezáčové, Ph.D. za nasměrování, ochotu a pomoc při řešení problémů vznikajících během mého studia a za její cenné rady a připomínky,
- PharmDr. Darině Muthné, Ph.D. za přátelskou pomoc a provázení v začátcích a zpříjemnění pracovního prostředí,
- Mgr. Radimovi Havelkovi za spolupráci a flow-cytometrické analýzy,
- laborantkám Nadě Mazánkové a Boženě Janské za péči o buňky a spolupráci při elektroforézách,
- prof. RNDr. Jiřině Vávrové, CSc. a kolektivu z Katedry radiobiologie FVZ UO v Brně za spolupráci a ozařování buněk,
- MUDr. Tomášovi Soukupovi a kolektivu z Ústavu histologie a embryologie za poskytování kmenových buněk,
- doc. MUDr. Aleně Stoklasové, CSc. a doc. MUDr. Jaroslavu Cermanovi za snahu a ochotu pomoci při konzultacích a řešení problémů,
- a všem kolegům a přátelům z Ústavu lékařské biochemie za vytváření příjemného pracovního prostředí, které mě provázelo celým postgraduálním studiem.

Obsah:

1	ÚVOD DO PROBLEMATIKY	8
1.1	ATM KINASA A PROTEIN P53.....	8
1.2	PROTEIN P21.....	10
1.2.1	Protein p21 ^{Cip1/Waf1} v jádře.....	11
1.2.2	Protein p21 ^{Cip1/Waf1} v cytoplasmě.....	14
1.3	APOPTÓZA.....	17
1.4	SENESCENCE.....	17
1.5	KMENOVÉ BUŇKY.....	19
2	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	22
3	MATERIÁL A METODIKY	23
3.1	IZOLACE A KULTIVACE BUNĚK.....	23
3.2	OZAŘOVÁNÍ.....	25
3.3	OVLIVNĚNÍ BUNĚK INHIBITOREM ATM KINASY.....	25
3.4	ANALÝZA BUNĚČNÉHO CYKLU.....	25
3.5	DETEKCE APOPTÓZY.....	25
3.6	ELEKTROFORÉZA A WESTERN BLOTTING.....	26
3.7	ELISA.....	26
3.8	MĚŘENÍ AKTIVITY KASPAS.....	26
3.9	IMUNOHISTOCHEMIE.....	27
3.10	DETEKCE H2AX.....	27
4	VÝSLEDKY	28
4.1	REAKCE LIDSKÝCH DIPLOIDNÍCH EMBRYONÁLNÍCH FIBROBLASTŮ LINIE WI-38 NA IONIZUJÍCÍ ZÁŘENÍ.....	28
4.1.1	Viabilita buněk.....	28
4.1.2	Indukce apoptózy a aktivace kaspas.....	29
4.1.3	Ionizující záření způsobuje zástavu buněčného cyklu.....	30
4.1.4	Protein p53 a jeho fosforylace.....	30
4.1.5	Změny v expresi proteinu p21 a indukce senescence.....	31
4.2	REAKCE MESENCHYMÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK KOSTNÍ DŘENĚ NA IONIZUJÍCÍ ZÁŘENÍ 33.....	33
4.2.1	Viabilita, proliferace, indukce apoptózy a aktivace kaspas.....	33
4.2.2	Ionizující záření způsobuje zástavu buněčného cyklu u MKB kostní dřeně.....	35
4.2.3	Ionizující záření způsobuje aktivace proteinu p53 a indukuje jeho fosforylaci u MKB kostní dřeně.....	36
4.2.4	Změny v množství proteinu p21 ^{Cip1/Waf1} , p16 ^{INK4a} a indukce senescence.....	37
4.3	REAKCE MESENCHYMÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK ZUBNÍ PULPY A PERIODONTÁLNÍHO LIGAMENTA NA IONIZUJÍCÍ ZÁŘENÍ.....	38
4.3.1	Detekce fosforylace histonu H2AX.....	38
4.3.2	Analýza buněčného cyklu.....	41
4.3.3	Změny v expresi proteinů.....	43
4.3.4	Proliferace, viabilita a indukce apoptózy u KBZP a KBPL po ozáření.....	46
4.3.5	Ionizující záření indukuje zástavu buněčného cyklu u KBZP a KBPL.....	49
4.3.6	Protein p53 je u KBZP a KBPL po ozáření aktivován.....	50
4.3.7	Ionizující záření indukuje senescenci u KBZP a KBPL.....	50
5	SHRnutí NEJDůLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ	53
5.1	WI-38.....	53
5.2	MESENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY KOSTNÍ DŘENĚ.....	53
5.3	MESENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY ZUBNÍ PULPY A PERIODONTÁLNÍHO LIGAMENTA.....	54
6	DISKUSE	56
7	ZÁVĚR	64
8	POUŽITÁ LITERATURA	65

Použité zkratky:

AKT – serin/threonin proteinkinasa AKT
ASK1 – apoptotické signály regulující kinasa
A-T linie - ataxia telangiectasia linie
ATM – ataxia telangiectasia proteinkinasa
ATP – adenosintris-fosfát
ATR – ataxia telangiectasia Rad related proteinkinasa
BCA – bicinchoninová kyselina
Bcl-2 –antiapoptotický protein B-buněk leukemia/lymphoma 2
BRCA1 – protein nádoru prsu (breast cancer 1)
CAK – CDK-aktivující kinasa
Cdc25 – serin/threonin proteinfosfataza
Cdk – cyklin dependentní kinasa
Cip1 – inhibitor cyklin dependentní dinasy
DAPI – 4,6-diamidino-2-fenylindol
DMEM – Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium
DNA – deoxyribonukleová kyselina
DNA-PKcs – katalytická podjednotka DNA proteinkinasy
DSB – dvojité zlomy
E2F – transkripční faktor 2
EDTA – etylendiamintetraoctová kyselina
EGF – epidermální růstový faktor
ELISA – enzymová imunoabsorpční analýza
Erk – extracelulárním signálem regulovaná kinasa
FACS – fluorescencí aktivované buněčné třídění (fluorescence activated cell sorting)
FITC – fluorescein isothiokyanát
FTS – fetální telecí sérum
Gadd45 – protein vyvolávající zástavu buněčného cyklu
Chk1, Chk2 – check-point kinasa 1, 2
INK4a – inhibitor cyklin dependentní kinasy 2a
IR – ionizující záření
JNK - Jun N-terminální kinasa
KBPL – kmenové buňky periodontálního ligamenta
KBZP – kmenové buňky zubní pulpy
KU55933 – specifický inhibitor ATM dinasy

Ku80 – podjednotka DNA-PK

LT-HSC – kmenové buňky krve tvorby se schopností dlouhodobě repopulovat krev tvorbu

MAPK – mitogenem aktivovaná proteinkinasa

MAPKK - mitogenem aktivovaná proteinkinasa kinasa

MAPKKK - mitogenem aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa

Mdm2 – protein vázající p53 (murine double minute protein)

MKB – mesenchymální kmenové buňky

MOLT-4 – buňky lidské T-lymfocytární leukémie

Mre11 – protein reparující dvojité zlomy

MRN – reparační komplex Mre11, Rad50, Nbs1

Nbs1 – Nijmegen breakage syndrom protein 1

OD – optická densita

PBS – fosfátový pufr

PCNA – jaderný antigen proliferujících buněk (proliferating cell nuclear antigen)

PDGF – růstový faktor destiček

PI – propidium jodid

PVDF - polyvinyliden difluorid

Rad50 - DNA reparační protein

Rb - retinoblastoma protein

Rho – GTP vázající protein

RNA – ribonukleová kyselina

SA- β -galaktosidasa – β -galaktosidasa asociovaná se senescencí

SA-ložiska – ložiska asociovaná se senescencí

SAPK – mitogeny aktivovaná proteinkinasa 9

SDS-PAGE – elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného

Ser – serin

SIPS – předčasná senescence indukovaná stresem

ST-HSC – kmenové buňky krev tvorby se schopností krátkodobě repopulovat krev tvorbu

Thr – threonin

UV – ultrafialové záření

Waf1 - wild type p53 activační factor

WI-38 – lidské embryonální diploidní fibroblasty

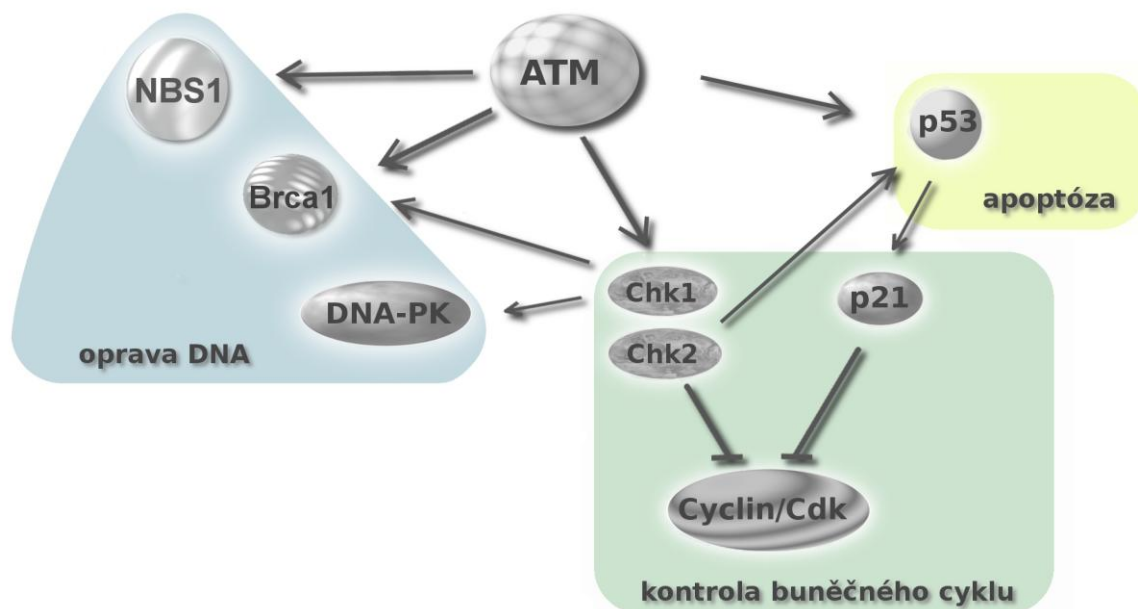
1 Úvod do problematiky

Cílem úvodní části je stručně shrnout poznatky o odpovědi buněk na poškození DNA, které se vztahují ke studovanému tématu.

1.1 ATM kinasa a protein p53

DNA eukaryotických buněk je neustále vystavena působení genotoxického stresu, tedy různým endogenním a exogenním vlivům jako je ionizující záření (IR), reaktivní formy kyslíku a dusíku, UV záření a chemické mutageny. Ty vyvolávají celou řadu poškození DNA, které vedou ke dvěma hlavním směrům biologické odpovědi v buňkách. Prvním je zástava buněčného cyklu v G1/S a G2/M kontrolních bodech, což umožňuje získání času pro reparaci poškození, druhým je pak indukce buněčné smrti mechanismem apoptózy, pokud jsou poškození příliš rozsáhlá (Tichý et al. 2007).

Jedno z nejzávažnějších poškození a velký zásah do integrity genomu představují DSB - dvojité zlomy DNA (Khana et Jackson, 2001). DSB způsobují remodelaci chromatinu a tvorbu tzv. ionizujícím zářením indukovaných ložisek. Prvním krokem v odpovědi savčích buněk na DSB indukované ionizujícím zářením je aktivace ATM kinasy. Ozářením buněk dochází k její rychlé autofosforylaci na serinu 1981 (Shiloh et al. 2003, Momčilovič et al. 2009), což způsobí disociaci dimeru ATM a jeho aktivaci (Bakkenist et Kastan, 2003). Aktivaci ATM podporuje komplex reparačních proteinů Mre11, Rad50, NBS1 (MRN komplex) a fosforylovaný histon H2AX (γ -H2AX), které se hromadí v blízkosti poškození. Právě fosforylace tisíců molekul histonu H2AX na serinu 139 je jedna z nejčasnějších odpovědí na indukci dvojitých zlomů DNA. Fosforylovaný H2AX tvoří ložiska v přítomnosti dvojitých zlomů DNA způsobených ionizujícím zářením a hraje důležitou roli v opravě poškození DNA. Reakce, při níž dochází k fosforylaci H2AX je velice rychlá, první fosforylované molekuly se objevují už ve 20 sekundách po ozáření a množství γ -H2AX se zvyšuje se vzrůstajícím poškozením. Tuto fosforylaci mohou katalyzovat ATM, ATR a DNA-dependentní proteinkinasa (Friesner et al. 2005). Dalším krokem po aktivaci ATM kinasy je rychlá fosforylace mnoha dalších signálních molekul (Obr. 1).



Obr. 1: Signalizační kaskáda odpovídající na poškození DNA dvojitými zlomy

Hlavními cíli ATM kinasy jsou proteiny BRCA1, Nbs1, p53 a kontrolní kinasy Chk1 a Chk2. Nádorový supresor BRCA1 hraje důležitou roli v řadě procesů spojených s poškozením DNA a jeho opravou, s průběhem buněčného cyklu a s apoptózou. V odpovědi na poškození DNA se BRCA1 přemísťuje do míst s dvojitými zlomy a podílí se na tvorbě ložisek. Zúčastňuje se jak homologní reparační MRN komplex (Mre11, Rad50 a Nbs1) působí jako senzor dvojitých zlomů DNA. Proteiny tohoto komplexu patří mezi substráty fosforylované ATM kinasou, která s MRN reaguje prostřednictvím Nbs1. Přítomnost MRN komplexu je nezbytná k dosažení plné aktivace ATM kinasy (Řezáčová et Vávrová 2011).

Aktivovaná ATM kinasa řídí průchod buněčným cyklem, a to ovlivněním aktivity kontrolních kinas Chk1 a Chk2. V odpovědi na ionizující záření fosforyluje ATM kinasa především Chk2 kinasu na threoninu 68 (Uto et al. 2004), ale fosforylovaná může být i Chk1 na serinech 317 a 345. Hlavním mechanismem kontroly buněčného cyklu je regulace aktivity Cdc25 fosfatasy právě pomocí kontrolních kinas Chk1 a Chk2 (Reinhardt et Yaffe, 2009).

Dalším ze substrátů ATM je protein p53. Nádorový supresor p53 je protein, který odpovídá na různé typy buněčných stresorů tím, že indukuje zastavení buněčného cyklu, apoptózu, senescenci, opravu DNA nebo změnu metabolismu

(Taylor et Stark, 2001). Aktivace proteinu p53 zahrnuje jeho stabilizaci, přeměnu latentní formy ve formu aktivní a umístění proteinu v jádře. V nestresovaných buňkách je protein p53 degradován pomocí Mdm2 proteinu, což je považováno za nejdůležitější mechanismus regulace aktivity p53. V normálních buňkách se tedy protein p53 nachází v nízkých hladinách. Mdm2 působí jako ubiquitin ligasa a exportuje p53 z jádra buňky do cytoplasmy k degradaci. Na poškození DNA navazuje vzestup množství p53 díky fosforylaci p53 v oblasti, kde se Mdm2 váže. Tato fosforylace se nejčastěji odehrává na serinu 15 působením kinas ATM a ATR. Kromě Mdm2 se na degradaci proteinu p53 v nestresovaných buňkách podílí také jun kinasa (JNK). Zatímco se komplexy Mdm2 a proteinu p53 vyskytují specificky v S a G2/M fázi buněčného cyklu, JNK – p53 komplexy se přednostně nacházejí v G0/G1 fázi. Bylo zjištěno, že Mdm2 a JNK působí nezávisle na sobě (Ljungman 2000).

Funkční protein p53 je významný transkripční faktor pro několik cílových genů, které jsou klíčové pro regulaci buněčného cyklu (zástava buněčného cyklu v G1/S kontrolním bodě aktivací proteinu p21), reparaci poškození genetického materiálu (protein Gadd 45 podněcuje reparaci DNA vyštěpením, a to buď přímo nebo v kooperaci s molekulami PCNA), navození apoptózy - významná úloha genu Bax (Uldrijan et al. 2002).

Za nejdůležitější posttranslační modifikace proteinu p53 v souvislosti s poškozením DNA jsou považovány fosforylace na Ser 15 a Ser 392. Fosforylace na Ser 15 představuje časnou odpověď buňky na genotoxický stres. Dochází k ní aktivací ATM kinas jak po UV záření, tak po ionizujícím záření a je spojována s indukcí apoptózy (Canman et al. 1998). Fosforylace proteinu p53 na Ser 392 zvyšuje asociační konstantu pro tetramerní formu tohoto proteinu a může zvyšovat vazbu specifických sekvencí DNA. Také již zmiňované Chk1 a Chk2 hrají roli i při stabilizaci a následné aktivaci proteinu p53 po poškození DNA, a to jeho fosforylací na serinu 20 (Poehlman et al. 2010).

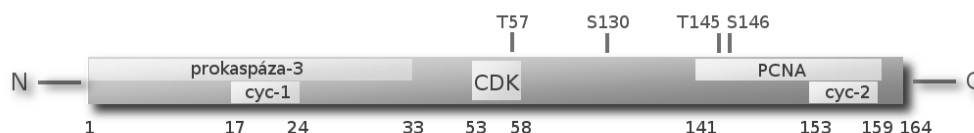
1.2 Protein p21

Protein p21^{Cip1/Waf1} byl identifikován jako první ze skupiny cyklin-kinasových inhibitorů. Efektivně inhibuje cyklin-dependentní kinas Cdk2, Cdk3, Cdk4 a Cdk6, které mají přímou úlohu v přechodu mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu. Díky schopnosti vázat se na Cdk je často označován jako CIP1 (Cdk interacting

protein). Také byl identifikován jako produkt genu aktivovaného wild-type p53 a byl pojmenován jako Waf1 (wild type p53 activated factor) (Gartel et Tyner, 1999).

Protein p21^{Cip1/Waf1} byl objeven v roce 1993 (Harper et al. 1993, El-Deiry et al. 1993). Je to polypeptid o 164 aminokyselinách a hmotnosti 20 kDa, kódovaný genem CDKN1A. Po poškození DNA blokuje přechod mezi G1 a S fází buněčného cyklu, avšak hraje klíčovou roli i v zástavě G2/M kontrolním bodu (Cazzalini et al. 2010, Taylor et Stark, 2001).

Funkce proteinu p21^{Cip1/Waf1} se liší v závislosti na jeho lokalizaci v buňce, jinou roli vykonává v jádře a jinou v cytoplasmě.



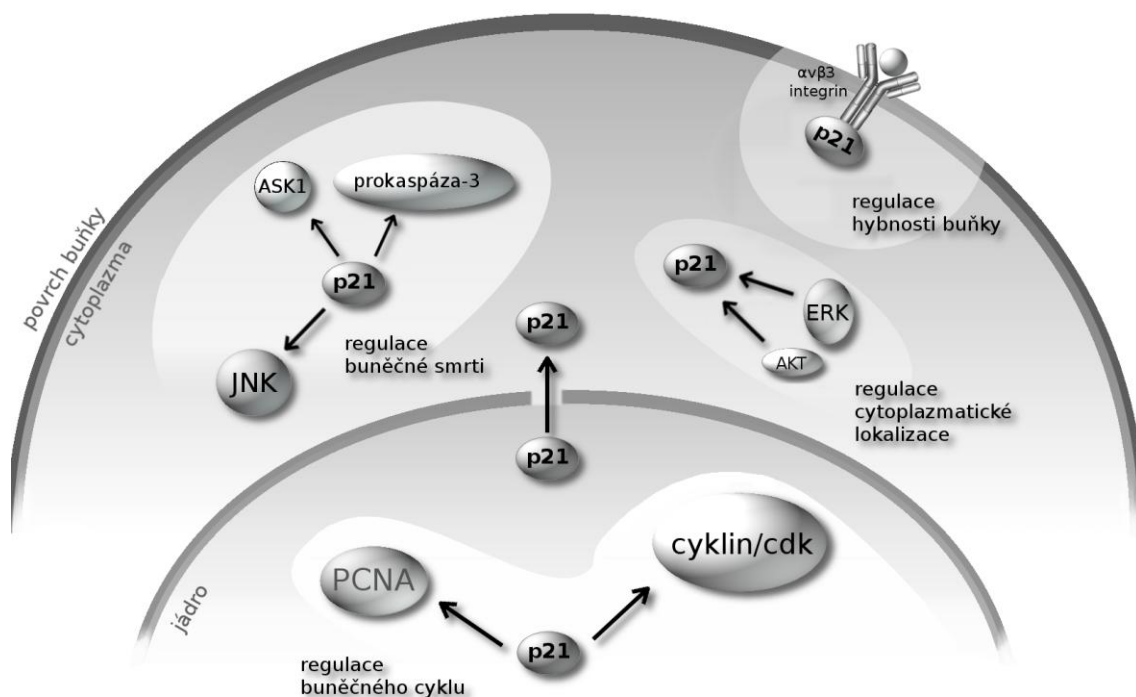
Obr. 2: Vazebná místa proteinu p21^{Cip1/Waf1} a jeho nejdůležitější fosforylace (cyc-1, cyc-2 – vazebná místa pro cykliny, CDK – vazebné místo pro cyklin-dependentní kinasy, PCNA – vazebné místo pro jaderný antigen)

1.2.1 Protein p21^{Cip1/Waf1} v jádře

U proteinu p53 bylo prokázáno, že se krátce po poškození DNA akumuluje v jádře, zatímco u nestresovaných buněk se většinou vyskytuje jen v cytoplasmě. V jádře působí jako transkripční faktor a reguluje transaktivaci několika proteinů, včetně proteinu p21^{Cip1/Waf1} (Solozobova et al. 2009). Naproti tomu hlavní funkcí proteinu p21^{Cip1/Waf1} v jádře je zástava buněčného cyklu v odpovědi na DNA poškození (viz obr. 3).

Normální buňky replikují DNA pouze jednou během S fáze buněčného cyklu. Další replikace DNA nemůže být znovu spuštěna bez průchodu mitózou. Pokud je DNA cyklující buňky poškozena, buňka se snaží rychle reagovat zástavou buněčného cyklu. To umožňuje opravu poškozené struktury DNA před vstupem do další fáze. Buňky postrádající p21^{Cip1/Waf1} nebo schopnost aktivovat expresi tohoto proteinu ale se syntézou DNA pokračují a to může mít za důsledek výskyt abnormální DNA

(Garner et Raj 2008). Zdá se, že p21^{Cip1/Waf1} se hromadí v místech poškození DNA stejně jako jiné faktory opravy DNA (Mre11, Rad50) (Cazzalini et al. 2010).



Obr 3. Interakce proteinu p21^{Cip1/Waf1} v závislosti na subcelulární lokalizaci (JNK - Jun N-terminal kinase, ASK1 - apoptosis signal-regulating kinase 1, ERK - extracellular regulated MAP kinase, PCNA – proliferating cell nuclear antigen, cyklin/cdk – komplex cyklinu s cyklin dependentní kinasou)

Protein p21^{Cip1/Waf1} hraje významnou roli v regulaci kontrolního bodu G1/S. Kontrolní bod G1/S je zodpovědný za znemožnění replikace poškozené DNA. Jak už bylo zmíněno dříve, protein p21^{Cip1/Waf1} má schopnost inhibovat aktivitu cyklinů v G1 kontrolním bodě a ovlivnit přechod buněk z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu. Za normálních okolností v časně fázi G1 komplexy Cdk4,6/CyklinD specificky fosforylují protein Rb (retinoblastoma protein). Na konci G1 fáze je pro kompletní fosforylaci Rb proteinu důležitý komplex Cdk2/CyklinE, který vede buňky skrze kontrolní bod. Plně fosforylovaný Rb protein následně uvolňuje z vazby E2F faktor, který umožňuje transkripci genů S fáze (Satyanarayana et al. 2008, Brugarolas et al. 1999).

Po poškození DNA protein p21^{Cip1/Waf1} specificky inhibuje aktivitu Cdk2. To vede k akumulaci hypofosforylovaného Rb proteinu, který se může vázat na E2F faktor. Tím p21^{Cip1/Waf1} blokuje přechod z G1 fáze do S fáze a působí zástavu buněčného cyklu (Cazzalini et al. 2010, Ju et al. 2006). Rb protein je navíc schopen inhibovat aktivitu JNK kinasy, která po poškození DNA indukuje apoptózu (Garner et Raj 2008).

Druhým způsobem, kterým je protein p21^{Cip1/Waf1} schopen ovlivňovat G1/S kontrolní bod, je interakce s jadřným antigenem proliferujících buněk (PCNA). PCNA je kofaktor DNA polymeras δ a ϵ , jejichž funkce je nezbytná pro replikaci a opravu DNA (Lee et al. 2009). PCNA se v buňce vyskytuje po celou dobu buněčného cyklu. Na konci G1 fáze a během S fáze je ale v jádře exprimován ve zvýšené míře a zároveň přesunut z cytoplasmy do jádra, slouží tak mimo jiné i jako marker pro buňky vyskytující se v S fázi buněčného cyklu. Protein p21^{Cip1/Waf1} reaguje s částí PCNA, která váže DNA polymerasy a inhibuje DNA replikaci zprostředkovanou DNA polymerasou δ . Afinita p21^{Cip1/Waf1} k PCNA je mnohem vyšší než afinita jakéhokoli jiného proteinu, který s PCNA reaguje (Prives et Gottifredi 2008, Li et al. 2006, Li et al. 1996). Vazbou proteinu p21^{Cip1/Waf1} na PCNA je regulována rovnováha mezi DNA replikací, opravou DNA a průběhem buněčného cyklu (Li et al. 1996).

Také regulace kontrolního bodu G2/M se uskutečňuje pomocí p21^{Cip1/Waf1}.

V dnešní době je už ale známo, že protein p21 hraje významnou roli také v přechodu buněk z G2 fáze buněčného cyklu do mitózy. Před přechodem buňky z G2 fáze do mitózy je Cdk1/CyklinB inaktivní, Cdk1 je fosforylována na Tyr15 a Thr14. Při vstupu do mitózy je Cdk1 aktivována odstraněním těchto inhibičních fosfátových skupin pomocí Cdc25 fosfatasy (Taylor et Stark, 2001). K tomu aby buňka mohla zastavit buněčný cyklus na rozhraní G2/M fází, je zapotřebí udržet komplex Cdk1/CyklinB v inaktivní formě. Hlavním mechanismem zástavy buněčného cyklu v G2/M kontrolním bodu je regulace aktivity Cdc25 fosfatas pomocí check-point kinas 1 a 2 (Chk1, Chk2). Bylo však zjištěno, že aktivita komplexu Cdk1/CyklinB je regulována i pomocí interakcí s p21^{Cip1/Waf1}. Afinita komplexu Cdk1/CyklinB k proteinu p21^{Cip1/Waf1} je v porovnání s jinými Cdk/Cyklin komplexy všeobecně nízká, ale po aktivaci kontrolního bodu G2/M bylo malé množství komplexu Cdk1/CyklinB nalezeno ve vazbě s proteinem p21^{Cip1/Waf1} (Cazzalini et al. 2010, Nicolescu et al. 1998).

Cdk1 může být pomocí p21^{Cip1/Waf1} inhibována třemi způsoby:

1. Pokud je v buňce protein p21^{Cip1/Waf1} přítomen ve vysokém množství, je schopen se přímo vázat na komplex Cdk/Cyklin.
2. Cdk1 je aktivována fosforylací na Thr161 pomocí CAK (Cdk activating kinase). CAK je tvořena Cdk7, cyklinem H a Mat1 (CDK-activating kinase assembly factor). Protein p21^{Cip1/Waf1} interferuje s aktivační fosforylací Cdk1 katalyzovanou CAK (Taylor et Stark, 2001).
3. Zdá se, že zástava buněčného cyklu v G2 fázi je způsobena také interakcí p21^{Cip1/Waf1} s proteinem PCNA (Taylor et Stark, 2001, Prives et Gottifredi 2008).

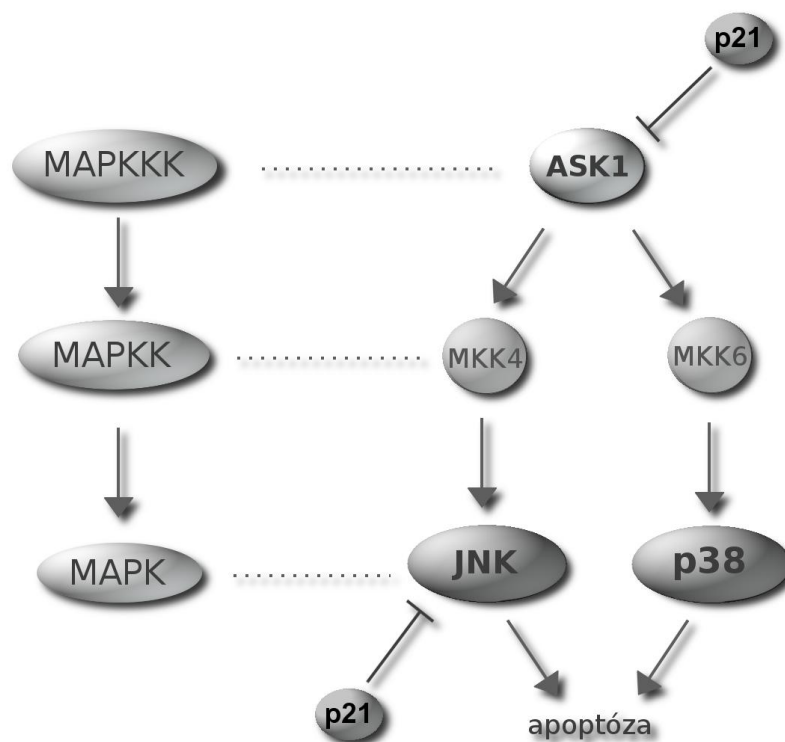
1.2.2 Protein p21^{Cip1/Waf1} v cytoplasmě

Funkce p21^{Cip1/Waf1} v odpovědi na poškození DNA pravděpodobně závisí na míře jejího poškození. Při malém rozsahu poškození DNA se množství p21^{Cip1/Waf1} zvyšuje, protein je stabilizován, indukuje zástavu buněčného cyklu a má i antiapoptotickou aktivitu, zatímco po masivním poškození DNA je jeho množství redukováno a buňka je vedena do apoptózy (Cazzalini et al. 2010). Zatímco pro

zástavu buněčného cyklu je zapotřebí přítomnosti proteinu p21^{Cip1/Waf1} v jádře, anti-apoptická aktivita vyžaduje přítomnost p21^{Cip1/Waf1} v cytoplasmě (viz obr. 3).

Cytoplasmatický protein p21^{Cip1/Waf1} je schopen vázat se na prokaspasu 3 (interakcí s 33 aminokyselinami na N konci, viz obr.1) a bránit tak její aktivaci na kaspáu 3. Tím je inhibována hlavní exekuční dráha apoptózy a vazba p21^{Cip1/Waf1} na prokaspasu 3 tak efektivně blokuje jak receptorově zprostředkovanou vnější cestu indukce apoptózy (membránové receptory smrti → iniciační kaspasa 8 → kaspasa 3), tak její vnitřní mitochondriální cestu (p53 → proapoptičtí členové rodiny bcl-2 → apoptosom → iniciační kaspasa 9 → kaspasa 3) (Cazzalini et al. 2010, Coqueret 2003, Child et Mann, 2006).

Tato antiapoptotická role je ještě podpořena schopností p21^{Cip1/Waf1} vázat a inhibovat tak pro-apoptické kinasy ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) (Cazzalini et al. 2010) a JNK (Sohn et al. 2006). ASK1 je jedním z klíčových elementů v mechanismu stresem a cytokiny indukované apoptózy a členem rodiny MAPKKK (kinase of mitogen-activated protein kinase kinase). Aktivuje dvě různé skupiny MAPKK, SEK1 (MAP2K4 mitogen-activated protein kinase kinase 4, také MKK4) a MKK6 (MAP kinase kinase 6), které dále aktivují stresem aktivované proteinkinasy (SAPK, známy také jako JNK) a p38 skupinu MAP kinas (viz obr. 4). Zvýšená exprese ASK1 indukuje apoptózu. Protein p21^{Cip1/Waf1} tvoří komplex s ASK1 a inhibuje tak aktivaci SAPK/JNK (Asada et al. 1999).



Obr. 4: Inhibice proapoptické MAPK signalizace proteinem p21^{Cip1/Waf1} (MAPK - mitogen-activated protein kinase, MAPKK - kinase of mitogen-activated protein kinase, MAPKKK - kinase of mitogen-activated protein kinase kinase, ASK1 - apoptosis signal-regulating kinase 1, MKK4, MKK6 – MAP kinase kinase 4 and 6, JNK - Jun N-terminal kinase)

Protein p21^{Cip1/Waf1} a další inhibitory cyklin-dependentních kinas (p27, p57) mohou rovněž ovlivňovat cytoskeletární struktury a hybnost buňky inhibicí signální dráhy Rho. Rho GTPasy ovlivňují morfologii a hybnost buňky skrze reorganizaci aktinových filament, v poslední době se však ukazuje, že regulují i genovou expresi a průběh buněčného cyklu, a podílí se i na regulaci transkripce p21^{Cip1/Waf1} (Coleman et al. 2006). Dále se předpokládá, že p21^{Cip1/Waf1} je schopen ovlivňovat funkci integrinových receptorů na povrchu buňky a regulovat tak hybnost buňky (Coqueret 2003).

1.3 Apoptóza

Apoptóza je v dnešní době již dobře prozkoumaný děj. Je to programovaný zánik buněk nenavozující zánětlivou odpověď jako je tomu u nekrózy. Zda buňka zanikne apoptózou či nekrózou, záleží na několika faktorech. Především je to typ buňky, energetická rovnováha a schopnost syntetizovat nové ATP. Při apoptóze buňka ztrácí nejprve asymetrii fosfolipidů v membráně, dochází ke kondenzaci chromatinu, redukcii velikosti jádra a ke štěpení internukleosomové DNA. Poté nastává svrašťení buňky, vydouvání membrány a buňka se rozpadá na apoptotická tělíška obklopená zbytky membrány, která jsou v konečné fázi fagocytována (Vávrová et al. 2002).

V apoptotických buňkách je specificky aktivována skupina cysteinových proteas, které jsou mezi sebou homologní a jsou součástí velké rodiny proteinů známých jako kaspasy. Kaspasy jsou považovány za hlavní vykonavatele apoptotické cesty, protože zprostředkují většinu změn charakterizujících buněčnou smrt. Jsou syntetizovány jako neaktivní proenzymy tvořené třemi doménami. Signální dráhy vedoucí k apoptóze lze rozdělit na vnější cestu, která vede přes receptory smrti s klíčovým iniciátorem kaspasou 8, a vnitřní cestu, aktivující kaspasu 9, především uvolněním některých faktorů (cytochrom c) z aktivovaných mitochondrií. Ionizujícím zářením je především aktivována vnitřní, neboli mitochondriální cesta apoptózy (Řezáčová, Vávrová 2011).

1.4 Senescence

Některé buňky po působení genotoxického stresu nepodléhají apoptóze, ale zůstávají permanentně v bloku buněčného cyklu a neproliferují. Po dosažení tzv. Hayflickova limitu buňky nejsou schopny proliferovat a jejich růst je permanentně zablokovan. Tento stav je označován jako replikativní senescence a je charakterizován několika znaky, z nichž nejmarkantnějším je zástava buněčného cyklu v G1 fázi, kdy se buňky dále nedělí. Replikativní senescence buněk nastává po zkrácení telomer, speciálních nukleoproteinových struktur, které se nacházejí na koncích eukaryotických chromosomů a jsou tvořeny opakující se sekvencí TTAGGG. Telomerická oblast reaguje s různými proteiny, které chrání konec chromosomu a

zabraňuje spuštění signálních cest, reagujících na poškození DNA. Telomerické sekvence prodlužuje enzym telomerasa, reverzní transkriptasa skládající se z RNA komponenty a katalytické podjednotky, která kompenzuje zkracování telomer během replikace a zabraňuje předčasné senescenci (Uldrijan et al. 2002). Kriticky krátké telomery mohou být považovány za určitou formu DNA poškození a označeny fosforylovaným histonem H2AX za vzniku ložisek (Collado et al. 2007).

Replikativní senescence je tedy navozena zkracováním telomer po dosažení Hayflickova limitu. Bylo však prokázáno, že senescence může být navozena i předčasně ději nesouvisejícími se zkracováním telomer. Mohou to být různé vlivy, které způsobují poškození DNA, především její dvojité zlomy. Tento stav se nazývá stresem indukovaná předčasná senescence a může být vyvolána UV zářením, ionizujícím zářením, peroxidem vodíku nebo různými chemoterapeutiky, jako jsou doxorubicin, cisplatina a kamptotecin (Suzuki and Boothman 2008).

Buňky jak v replikativní senescenci, tak v předčasné senescenci mají speciální morfologii, jsou větší, mají rozmanitější škálu morfotypů, menší buněčnou denzitu a s tím spojenou citlivější kontaktní inhibici mezi buňkami. Důležitým znakem buněčné senescence je také zvýšené množství β -galaktosidasy, což je hydrolasa vyskytující se v lyzosomech, kterých je u senescentních buněk více a zvětšují svůj objem.

Vstup do senescence zprostředkovávají dvě základní signální cesty – p53/p21 a p16/Rb. Protein p21^{Cip1/Waf1} jako inhibitor proliferace má v indukci jak replikativní tak stresem indukované předčasně senescence důležitou roli. Zvýšená exprese proteinu p21^{Cip1/Waf1} spojená s délkou života buněk ve tkáních byla prokázána např. v epitelu rohovky, vaskulární hladké svalovině u aterosklerózy nebo v kosterní svalovině. Upregulace tohoto proteinu je zároveň první známkou indukce replikativní senescence, zatímco další markery se objevují až týdny po zastavení buněčného cyklu (Ju et al. 2006). U lidských fibroblastů či mesenchymálních kmenových buněk po vystavení ionizujícímu záření byla v buňkách navozena předčasná senescence a zároveň pozorována indukce proteinu p21^{Cip1/Waf1} (Mirzayans et al. 2010, Muthna et al. 2010). Ta je však spojena pouze s krátkodobou zástavou buněčného cyklu a pak je snížena téměř na množství proteinu v nesenescentních buňkách (Muthna et al. 2010, Cmielova et al. 2011, Roninson 2002).

Stav trvalé zástavy buněčného cyklu udržuje jiný cyklin-kinasový inhibitor – protein p16, který inhibuje aktivitu kinas Cdk4 a Cdk6 a indukuje hypofosforylaci Rb proteinu. Tím je znovu inhibován přechod buněk z G1 do S fáze buněčného cyklu (Suzuki et Boothman, 2008).

Stresem indukovanou předčasnou senescenci můžeme považovat za mechanismus vedoucí k zástavě růstu buněk s rizikem nádorového zvrhnutí. Nádorové buňky totiž exprimují telomerasu a nevstupují do replikativní senescence. Bylo prokázáno, že ionizující záření a různá chemoterapeutika používaná pro léčbu nádorů způsobují stresem indukovanou senescenci jak u normálních buněk, tak také u buněk nádorových. Působení ionizujícího záření nebo chemoterapeutik neovlivňuje délku telomer, způsobuje však poškození DNA, zejména dvojité zlomy, a tím vyvolává předčasnou senescenci.

1.5 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou zvláštním typem buněk, které se mohou vyskytovat téměř ve všech typech tkání po celý život. Byly izolovány například z kostní dřeně, mozku, kůže, vlasových folikulů, kosterní svaloviny nebo zubní pulpy. Kmenové buňky charakterizuje řada výjimečných vlastností. Nejdůležitější z nich je vysoký proliferační potenciál, schopnost nekonečné sebeobnovy (schopnost proliferace přes 50 buněčných populací) a schopnost diferencovat se do široké škály buněčných typů. Těmto jedinečným biologickým vlastnostem odpovídá jejich morfoloická charakteristika – vysoký poměr mezi jádrem a cytoplasmou, vysoká fluidita membrán a absence markerů přítomných u specializovaných buněk. Hlavní úlohou kmenových buněk je zajišťovat rozvoj tkáně, udržovat tkáňovou homeostázu a opravu tkáně při jejím poškození.

Nejlépe prozkoumanou populací kmenových buněk jsou linie izolované z kostní dřeně. Kostní dřeň obsahuje jednak hematopoetické kmenové buňky, jednak kmenové buňky pocházející ze stromatického kompartmentu, označované jako mesenchymální kmenové buňky (Řezáčová et Vávrová 2011).

Mesenchymální kmenové buňky jsou nehematopoetické kmenové buňky přítomné v kostní dřeni a schopné diferencovat se do různých typů buněčných linií – osteoblastů, chondrocytů, buněk endotelu a také do buněčných linií podobných neuronům. Do osteogenní linie se mohou diferencovat působením dexametazonu, 10% fetálního telecího séra, β -glycerolfosfátu a askorbátu. Po jednom týdnu je možné pozorovat akumulaci vápníku a nárůst aktivity alkalické fosfatasy 4–10krát. Chondrogenní diferenciaci je pozorována po působení transformujícího růstového faktoru β 3 (Tocci et Forte 2003). Mesenchymální kmenové buňky mohou být využity

v systémových transplantacích u celkových onemocnění, lokálních implantací při místním tkáňovém poškození nebo jako nosič genů v genové terapii. Byly izolovány na základě své adherence k plastovým povrchům. Pro získání čisté populace mesenchymálních kmenových buněk se používá monoklonální protilátka Stro-1. Mesenchymální kmenové buňky s podobnou biologickou charakteristikou jako buňky z kostní dřeně byly izolovány také z periferní krve, pupečnickové krve, synoviálních membrán a pulpy mléčného chrupu (Kassem et al. 2004).

Pro využití kmenových buněk v klinické praxi je důležitá jejich relativně snadná dostupnost pro izolaci. Takovýmto zdrojem buněk je zubní pulpa nebo periodontální ligamentum (Gronthos et al. 2000, Gay et al. 2007). Kmenové buňky zubní pulpy a periodontálního ligamenta mají podobné vlastnosti jako mesenchymální kmenové buňky kostní dřeně: jsou vysoce proliferativní a mohou expandovat za Hayflickův limit. Velkou výhodou kmenových buněk zubní pulpy a periodontálního ligamenta v porovnání s jinými kmenovými buňkami je však jejich snadná dostupnost, vysoká interaktivita s biomateriály, což z nich činí potenciální ideální elementy pro rekonstrukci tkáně.

Otázkou je, jak kmenové buňky reagují na genotoxický stres vyvolaný ionizujícím zářením. Ionizující záření způsobuje jedno z nejzávažnějších poškození DNA – dvojité zlomy. Situace je poměrně dobře zmapována u hematopoetických kmenových buněk. U lidských hematopoetických CD133+ buněk ozářených *in vitro* byl pozorován pokles klonogenní kapacity a pokud nebylo poškození opraveno, buňky vstoupily do apoptózy (Vávrová et al. 2002). Hematopoetické kmenové buňky můžeme rozdělit pomocí čtyřbarevné flowcytometrie na buňky dlouhodobě obnovující krevetvorbu (LT-HSC), které odpovídají na ozáření především indukci senescence, a dále buňky rychle obnovující krevetvorbu (ST-HSC) a buňky progenitorové, které odpovídají na ozáření především indukci apoptózy. U LT-HSC je vznik senescence spojován s nedostatečnou funkcí těchto buněk ve stáří. Je třeba si uvědomit, že buňky v senescenci se nemohou dělit, a tudíž při další zátěži organismu genotoxickým stresem nemohou obnovit např. poškozenou krevetvorbu. Byla také prokázána akumulace γ H2AX ložisek u LT-HSC izolovaných od starých myši (Rossi et al. 2007).

Lidské embryonální fibroblasty jsou často používanou linií pro studium buněčné senescence (Lawless et al. 2010, Raffetto et al. 2001). Buňky linie WI-38 v časných pasážích reagují na subcytotoxické dávky UVB záření spuštěním stresem-indukované předčasné senescence (Straface et al. 2007). Také busulfan (alkylační

látka způsobující DNA poškození) vyvolává u lidských fibroblastů (linie WI38) senescenci především přes aktivaci extracelulárních signálů aktivujících kinasu Erk a p38 MAPK (mitogen activated protein kinase). Tato kaskáda je nezávislá na cestě aktivované přes p53 (Probin et al. 2007). Indukce senescence busulfanem je aktivována reaktivními formami kyslíku. Je-li zabráněno vzniku kyslíkových radikálů např. inkubací s N-acetylcysteinem, snižuje se aktivace Erk a p38 MAPK kinas a také klesá senescence indukovaná busulfanem.

Mesenchymální kmenové buňky izolované z kostní dřeně neumírají po ozáření apoptózou, ale ztrácejí svou schopnost proliferace. Po ozáření dávkou 2,5 – 15 Gy dochází ke zkracování telomer, buňky se nedělí, ale ani nejsou zničeny. Zároveň stoupá aktivita β -galaktosidasy, což je typickým znakem senescence (Serakinci et al. 2007).

Kmenové buňky zubní pulpy a periodontálního ligamenta vzhledem ke své snadné dostupnosti představují velice slibný nástroj pro široké terapeutické využití v klinické praxi, konkrétně v buněčné terapii. Pro jejich další využití je však nutné důkladné poznání jejich vlastností, zejména regulace proliferace a indukce senescence a apoptózy. Kmenové buňky přetrvávají ve tkáních dlouhodobě a při poruše jejich genomu hrozí, že bude docházet ke kumulaci výsledných poruch. Navíc podle nedávných výzkumů je známo, že i nádory obsahují tzv. nádorové KB, z nichž nádorová masa roste. Ochrana zdravých tkání před indukcí senescence může vést k novým protinádorovým strategiím chránícím normální tkáň před senescencí a indukující u nádorových buněk apoptózu.

2 Cíle disertační práce

Cílem naší práce bylo zjistit účinky ionizujícího záření na embryonální diploidní fibroblasty WI-38 a na mesenchymální kmenové buňky izolované z kostní dřeně, zubní pulpy a periodontálního ligamenta, a to konkrétně:

- Jak ionizující záření ovlivňuje buněčný cyklus, zda způsobuje zástavu v některé z fází buněčného cyklu a zda je tato zástava vedena přes p53-závislou indukci proteinu p21^{Cip1/Waf1}?
- Zda a případně po jakých dávkách vyvolává ionizující záření u našich studovaných linií indukci apoptózy?
- Zda a jaké dávky záření vedou buňky do senescence?
- Je zástava buněčného cyklu po ozáření u kmenových buněk závislá na aktivaci ATM?
- Zda a případně po jakých dávkách vyvolává ionizující záření indukci apoptózy u KBZP a KBPL po inhibici ATM kinasy?
- Zda a jaké dávky záření vedou KBZP a KBPL do senescence po inhibici ATM kinasy?

3 Materiál a metodiky

3.1 Izolace a kultivace buněk

WI-38: Buňky WI-38 (lidské embryonální plicní diploidní fibroblasty) získány z European Collection of Cell Cultures byly kultivovány v 5% CO₂ ve 37° C. Bylo použito DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma, USA) obohacené o 10% fetální telecí sérum (PAA, USA), 2% glutamin (Gibco, UK), penicilin/streptomycin (Gibco, UK) a 1% neesenciální aminokyseliny. Buňky byly pasážovány pomocí trypsin-EDTA (Gibco, UK). Ve všech experimentech byly použity buňky z časných pasáží (< 10) a každá pasáž dosáhla přibližně 70% konfluence. Pro počítání živých a mrtvých buněk bylo použito barvení trypanovou modří.

Kmenové buňky (KB): Kmenové buňky byly získány z materiálu odebraného od pacientů. Všichni podepsali informovaný souhlas požadovaný etickou komisí Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Mesenchymální KB kostní dřevě: Kostní dřevě byla získána postupně od 4 pacientů (2 muži a 2 ženy, zdraví dárce), kteří podstoupili operaci kyčelního kloubu. Průměrný věk dárců byl 46 let (37 - 56). Kostní dřevě o objemu 10 ml byla naředěna PBS (Invitrogen, USA) v poměru 1:1 a transportována do laboratoře tkáňových kultur. MKB kostní dřevě byly izolovány pomocí gradientové centrifugace s Ficoll-Paque (Soukup et al. 2006).

Mesenchymální KB zubní pulpy: Byly izolovány 4 linie KBZP z extrahovaných třetích molárů získaných od 4 zdravých dárců (3 ženy, 1 muž). Průměrný věk dárců byl 19 let (12 - 23). Zuby byly indikovány k extrakci z ortodontických důvodů ve sterilních podmínkách a transportovány do laboratoře tkáňových kultur. Po separaci kořenů (nebo i v případě, kdy kořeny ještě nebyly vyvinuty) jsme použili extirpační jehlu nebo ostrý exkavátor (Henry Schein, UK) pro izolaci zubní pulpy. Zubní pulpa i zub byly vystaveny působení

enzymů – kolagenasy (Sevapharma, CZE) a dispasy (Gibco, UK) na dobu 70 min. Následovala centrifugace (600g, 5 min).

Mesenchymální KB periodontálního ligamenta: Byly izolovány 3 linie KBPL z extrahovaných třetích molárů získaných od 3 zdravých dárců (2 ženy, 1 muž). Průměrný věk dárců byl 19 let (16 – 23). Zuby byly indikovány k extrakci z ortodontických důvodů ve sterilních podmínkách a transportovány do laboratoře tkáňových kultur. Před extrakcí zubní pulpy bylo separováno periodontální ligamentum a promyto v PBS. Periodontální ligamentum bylo vystaveno působení enzymů – kolagenasy (Sevapharma, CZE) a dispasy (Invitrogen, USA) na dobu 70 min. Následovala centrifugace (600g, 5 minut).

Všechny linie mesenchymálních kmenových buněk byly kultivovány v atmosféře s 5% CO₂ a teplotě 37 °C v médiu s nízkým obsahem fetálního telecího séra tvořeného MEM (Gibco, UK), 2% FTS (PAA, USA), 10ng/ml EGF (PeproTech, USA), 10ng/ml PDGF (PeproTech, USA), L-askorbová kyselina (Sigma, USA), 2% glutamin (Gibco, UK), penicilin/streptomycin (Gibco, UK), gentamycin (Gibco, UK) a dexametason (Sigma, USA). Buňky byly kultivovány 3-5 dní v kultivačních lahvích s povrchem Cell⁺ surface[®] (Sarstedt, USA). Objevily se malé kolonie, které byly pomocí trypsin-EDTA roztoku (Gibco, UK) přesazeny do standardních kultivačních lahví (TPP, Swizerland nebo NUNC, Denmark). Buňky v každé další pasáži dosáhly minimálně 70% konfluence. Z důvodu kontroly kvality buněčné populace byly 1., 3., 7. a 11. pasáž kontrolovány fenotypové charakteristiky (CD45, CD29, CD44, CD73, CD90, CD166). Morfologie a viabilita byla kontrolována s každou pasáží, karyotyp byl kontrolován v 5. a 10. pasáži a délka telomer byla měřena v pasážích 0, 2, 5, 7 a 10. Během kultivace nebyly pozorovány žádné signifikantní změny. Pro všechny experimenty byly použity buňky z časných pasáží (5-7). Byly nasazeny v hustotě 4500 buněk/cm² a po dosažení 50% konfluence byly transportovány k ozáření (24 hodin po manipulaci). Každý čtvrtý den po ozáření bylo přidáno nové médium. Viabilita a populační zdvojení buněk byly analyzovány pomocí Vi-Cell analyzátoru a Z2-Counter (Beckman Coulter, USA).

3.2 Ozařování

K ozáření buněk byl použit ^{60}Co γ -zářič (Chisotron, Chirana, CZE) o dávkovém příkonu 1 Gy/min ve vzdálenosti 1 m od zdroje. Byly použity dávky 2, 6 a 20 Gy. Byla použita ionizační komora (Dosemeter PTW Unidos 1001, serial No. 11057, ionizační komora PTW TM 313, serial No. 0012; RPD Inc., USA); set byl validován Českým metrologickým institutem – Inspektorát pro ionizující záření (protokol číslo 9011-OL-U4124/2005). Po ozáření byly buňky umístěny zpět do inkubátoru s 5% CO_2 a 37 °C a použity v daných časech pro analýzu. Každé 3 dny bylo v lahvích po trypsinizaci a centrifugaci vyměněno médium, takže do analýzy byly zahrnuty i apoptotické plovoucí buňky.

3.3 Ovlivnění buněk inhibitorem ATM kinasy

Pro inhibici ATM kinasy byly buňky preinkubovány 1 hodinu před ozářením s inhibitorem KU55933 (Merck, CZE).

3.4 Analýza buněčného cyklu

Buňky v množství 1×10^6 pro každou skupinu byly promyty v ledově studeném PBS a fixovány v 70% etanolu. Poté byly inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě v pufru (192 ml 0,2 mol/l Na_2HPO_4 + 8 ml 0,1 mol/l kyselina citrónová, pH 7,8) a obarveny propidium jodidem ve Vindelově roztoku po dobu 60 min při 37 °C. Obsah DNA byl změřen pomocí průtokového cytometru Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA) použitím 15 mW argon-iontového laseru s excitací při 488 nm a emisí přes 560 nm. Data byla analyzována použitím software Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, Inc.) a CXP (Beckman Coulter, USA).

3.5 Detekce apoptózy

Pro detekci apoptózy byl použit Apoptest-FITC kit (DakoCytomation, CZE). Annexin V se na povrchu buněk váže na fosfatidylserin v přítomnosti vápenatých iontů. Propidium jodid je markerem propustnosti membrán. Měření bylo provedeno na přístroji Cell Lab Quanta (Beckman Coulter, USA); data byla analyzována použitím software WinMDI 2.9. Pro každou skupinu bylo použito 1×10^6 buněk.

3.6 Elektroforéza a western blotting

Pro analýzu byly připraveny celobuněčné lyzáty podle pokynů výrobce (Cell Lysis Buffer, Cell Signaling Technology, USA). Celkové množství proteinů ve vzorku bylo stanoveno pomocí BCA metody (bicinchoninová kyselina; Sigma-Aldrich, USA). Na gel bylo nanášeno stejné množství proteinů (20 µg). Proteiny byly přeneseny na PVDF membránu (Bio-Rad Laboratories., CZE), membrána byla blokována v TBS s 5% mlékem (non-fat dry milk, Bio-Rad, CZE) a inkubována s primární protilátkou p53, p53_S15, p53_S392, ATM, ATM_S1981, mdm2, mdm_S166, p21, p16, Chk1, Chk1_S345, Chk2, Chk2_T58, DNA-PKcs, Ku80 (p53, p53_S392-Exbio, CZE; β-actin, p21 – Sigma-Aldrich, USA; p53_S15-Calbiochem-Merck, CZE; mdm2_S166, ATM, ATM_S1981, Chk1, Chk1_S345, Chk2, Chk2_T58, DNA-PKcs - Cell Signaling Technology, USA) při 4 °C po dobu 24 hodin. Pak byla provedena inkubace s polyklonální anti-myší nebo anti-králičí sekundární protilátkou (DakoCytomation, CZE). Pro detekci byl použit chemiluminiscenční detekční kit (Roche, CZE). Pro kontrolu nanášky vzorků byla každá membrána znovu inkubována pro stanovení β-aktinu.

3.7 ELISA

Pro kvantitativní stanovení množství proteinu p21 byl použit PathScan Sandwich ELISA kit od Cell Signaling Technology podle pokynů výrobce. Optická densita byla měřena při 450 nm v závislosti na dávce záření (v Gy). Pro výsledná měření byl použit Tecan Infinite 200 (Schoeller Instruments, CZE).

3.8 Měření aktivity kaspas

Detekci aktivity kaspasy 3/7, kaspasy 8 a kaspasy 9 byl použit kit Caspase-Glo Assays (Promega, USA) podle pokynů výrobce. Pro výsledná měření byl použit Tecan Infinite 200 (Schoeller Instruments). Signifikantní rozdíly byly stanoveny pomocí Studentova t-testu s hodnotou $p \leq 0,05$. Byla provedena 4 nezávislá měření.

3.9 Imunohistochemie

Pro stanovení aktivity β -galaktosidasy byl použit Senescence beta-galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, USA) podle pokynů výrobce. Pro detekci vimentinu a γ H2AX bylo ozářeno 1×10^4 buněk, buňky byly centrifugovány, promyty v PBS a fixovány v paraformaldehydu 10 min při laboratorní teplotě, poté promyty v PBS. Buňky byly blokovány v roztoku s 7% FTS a 2% BSA a obarveny patřičnou primární protilátkou (anti-Vimentin – DakoCytomation, CZE; γ H2AX - Cell Signaling Technology, USA; p16 – Sigma, USA) 24 hodin při 4 °C. Na každé sklíčko byla aplikována sekundární protilátka (po jejich pre-inkubaci s 5,5% oslím sérem v PBS po dobu 30 min při laboratorní teplotě) a inkubaci 1 hodinu ve tmě byla sklíčka promyta (3x5 min) v PBS. Jádra byla obarvena pomocí DAPI roztoku (Sigma, USA), inkubace 8 min, promytí a fixace. Pro analýzu obrazu byl použit fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse; expozice a další parametry kamery ve všech kanálech byly nastaveny na stejné hodnoty pro každé sklíčko pro získání kvantitativně srovnatelných výsledků.

3.10 Detekce γ H2AX

Pro detekci γ H2AX byla optimalizována metoda, kterou publikoval Huang et Darzynkiewicz (2006). Suspenze buněk byla 2x propláchnuta v PBS a poté fixována v ledově studeném 1% formaldehydu. Buňky byly dále propláchnuty 1% BSA-0,2%-Triton X-100 v PBS a obarveny antifosfohistonem H2AX (Ser139)-FITC konjugovanou primární protilátkou (Millipore, USA) při laboratorní teplotě 1 hodinu ve tmě. Po promytí byly buňky suspendovány v propidium jodidu (0,1% RNase, PI 5 μ g/mL in PBS), inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 30 min ve tmě a analyzovány okamžitě po inkubaci pomocí FACS analyzer CyAn DakoCytomation (Beckman Coulter, USA). Data byla zpracována pomocí software Summit 4.3v (Beckman Coulter, USA).

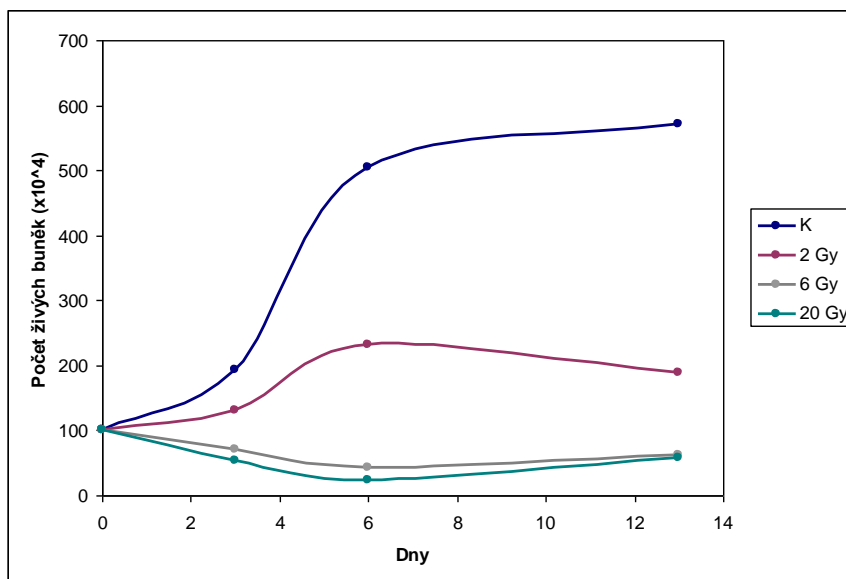
4 Výsledky

4.1 Reakce lidských diploidních embryonálních fibroblastů linie WI-38 na ionizující záření

4.1.1 Viabilita buněk

Buňky WI-38 (100×10^4) byly ozářeny dávkami 2, 6 a 20 Gy a počítány po 3, 6 a 13 dnech. Po 3 dnech buňky v kontrolní skupině zdvojnásobily svůj počet a proliferovaly dál po celou dobu experimentu. Dávka 2 Gy inhibovala proliferační schopnost buněk pouze po dobu 3 dní, buňky přežily (5 % mrtvých buněk) a po 3 dnech začaly znovu proliferovat. Po 6 dnech zdvojnásobily svůj počet.

Ozáření dávkou 6 a 20 Gy způsobilo pokles v počtu živých buněk (3. den bylo v obou skupinách 70×10^4 buněk, 6. den po dávce 6 Gy 84 % buněk a po dávce 20 Gy 76 % buněk). Po 13 dnech se procento živých buněk ještě snížilo (66 % po 6 Gy, 56 % po 20 Gy) (Graf 1).

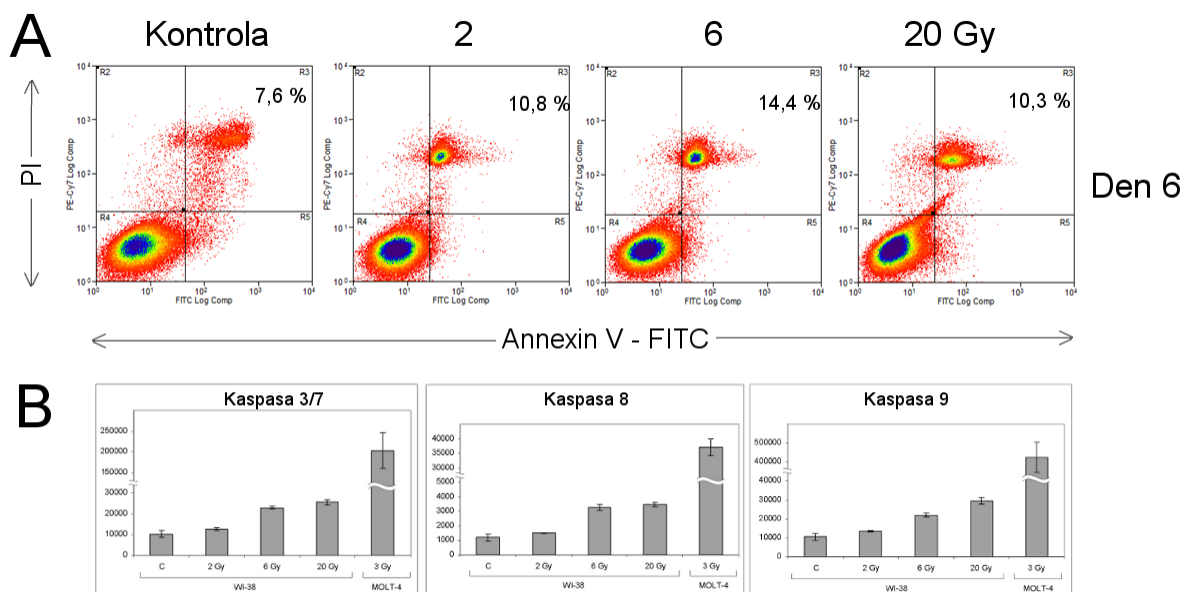


Graf 1: Počet živých buněk WI-38 po ozáření dávkami 2, 6 a 20 Gy v intervalu 3, 6 a 13 dní.

4.1.2 Indukce apoptózy a aktivace kaspas

U buněk WI-38 je po ozáření mírně indukována apoptóza po 6 dnech (10,8 % po 2 Gy, 14,4 % po 6 Gy a 10,3 % po 20 Gy; kontrola 7,6 %) (Obr. 5A).

Studovali jsme také účinek ionizujícího záření o dávce 2, 6 a 20 Gy na aktivitu kaspas 3/7, 8 a 9. Po 1 a 3 dnech nebyly pozorovány žádné signifikantní změny v aktivitě kaspas. Po 6 dnech byla aktivita kaspas 3/7, 8 a 9 mírně zvýšena po ozáření dávkami 6 a 20 Gy ($p < 0,05$) (Obr. 5B). Ve srovnání s aktivitou kaspas u leukemické linie MOLT-4 24 hodin po ozáření dávkou 3 Gy (100% indukce apoptózy) byla ale u ozářené linie WI-38 asi 10x nižší.



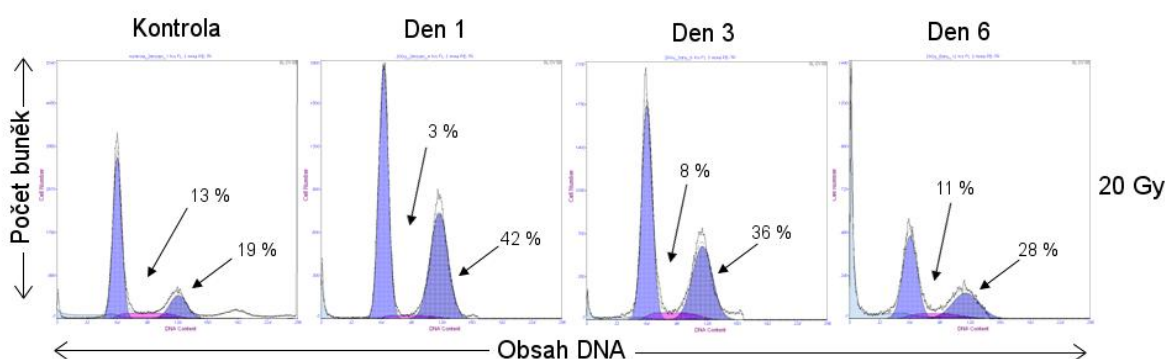
Obr. 5: Účinek IR na WI-38 dávkou 2, 6 a 20 Gy na indukci apoptózy

A: Detekce apoptózy pomocí Annexin V/propidium jodid barvení. Apoptóza 6 dní po ozáření dávkami 2, 6 a 20 Gy.

B: Aktivita kaspas 3, 8 a 9 byla stanovena 6 dní po ozáření dávkami 2, 6 a 20 Gy u WI-38 buněk a po ozáření dávkou 3 Gy u linie MOLT-4, která byla použita jako pozitivní kontrola.

4.1.3 Ionizující záření způsobuje zástavu buněčného cyklu

K analýze buněčného cyklu WI-38 po ozáření byla použita průtoková cytometrie. Ozáření dávkou 2 Gy má pouze malý vliv na rozdělení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu – mírná akumulace buněk v G2 fázi (26 % 1. den, 22 % 3. den, 21 % 6. den; kontrola 19 % v G2 fázi) a pokles počtu buněk v S fázi (4 % 1. den, 6 % 3. den, 9 % 6. den; kontrola 13 % v S fázi) (Obr. 6). Po ozáření dávkami 6 a 20 Gy byla pozorována zástava v G2 fázi už od prvního dne, počet buněk v G2 bloku klesal v čase (40 % resp. 42 % 1. den, 30 % resp. 36 % 3. den, 11 % resp. 28 % 6. den; kontrola 19 %) (Obr. 6).



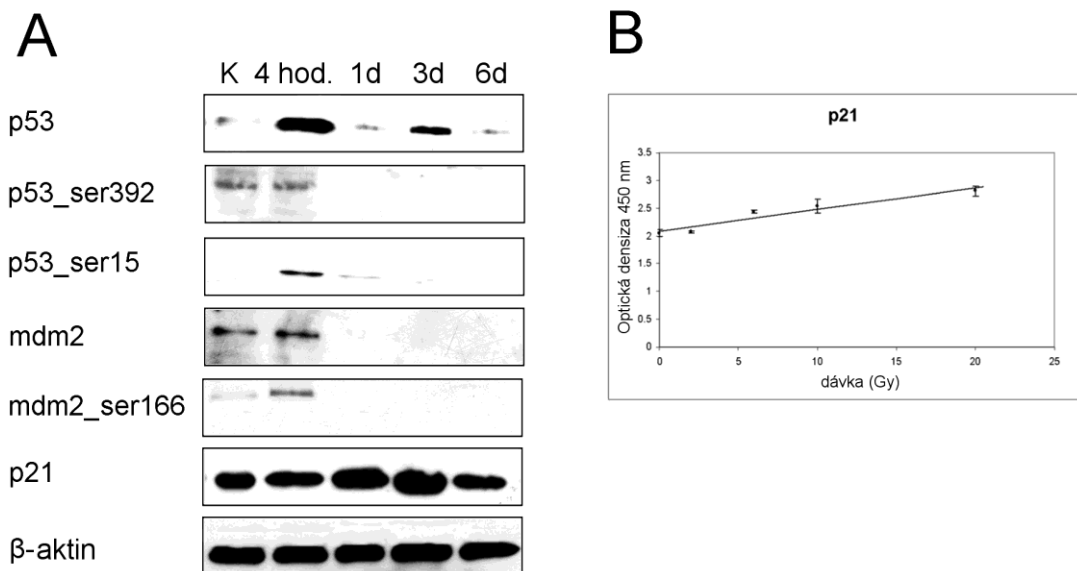
Obr. 6: Vliv ozáření na rozmístění buněk WI-38 v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

Rozmístění buněk v buněčném cyklu bylo měřeno pomocí průtokové cytometrie. Buněčný cyklus byl analyzován 1, 3 a 6 dní po ozáření dávkou 20 Gy.

4.1.4 Protein p53 a jeho fosforylace

Ionizující záření způsobuje signifikantní upregulaci proteinu p53. Za 4 hodiny po ozáření bylo množství tohoto proteinu v buňkách WI-38 zvýšeno a dosáhlo maxima. Exprese proteinu p53 poklesla 1. den po ozáření, 3. den byla opět zvýšená a pak rapidně klesala v průběhu času. Fosforylace proteinu p53 na serinu 15 se objevila už po 4 hodinách po ozáření a 6 den po ozáření byla opět na úrovni kontrolních buněk. Také fosforylace na serinu 392 dosáhla maxima 4 hodiny po ozáření a klesla na kontrolní hladinu po 1. dni.

Protein mdm2, negativní regulátor proteinu p53, je aktivován fosforylací na serinu 166. Mdm2 protein i jeho fosforylace na serinu 166 byla zvýšena 4 hodiny po ozáření (Obr. 7A).



Obr. 7: Indukce a aktivace proteinů u WI-38 buněk

A: WI-38 buňky byly ozářeny dávkou 20 Gy. Změny v expresi proteinu p53 a jeho fosforylací na serinech 15 a 392, mdm2 proteinu a jeho fosforylace na serinu 166 a proteinu p21 byly hodnoceny použitím elektroforézy spojené s western blottingem. Pro kontrolu nanášky bylo stanoveno množství β-aktinu.

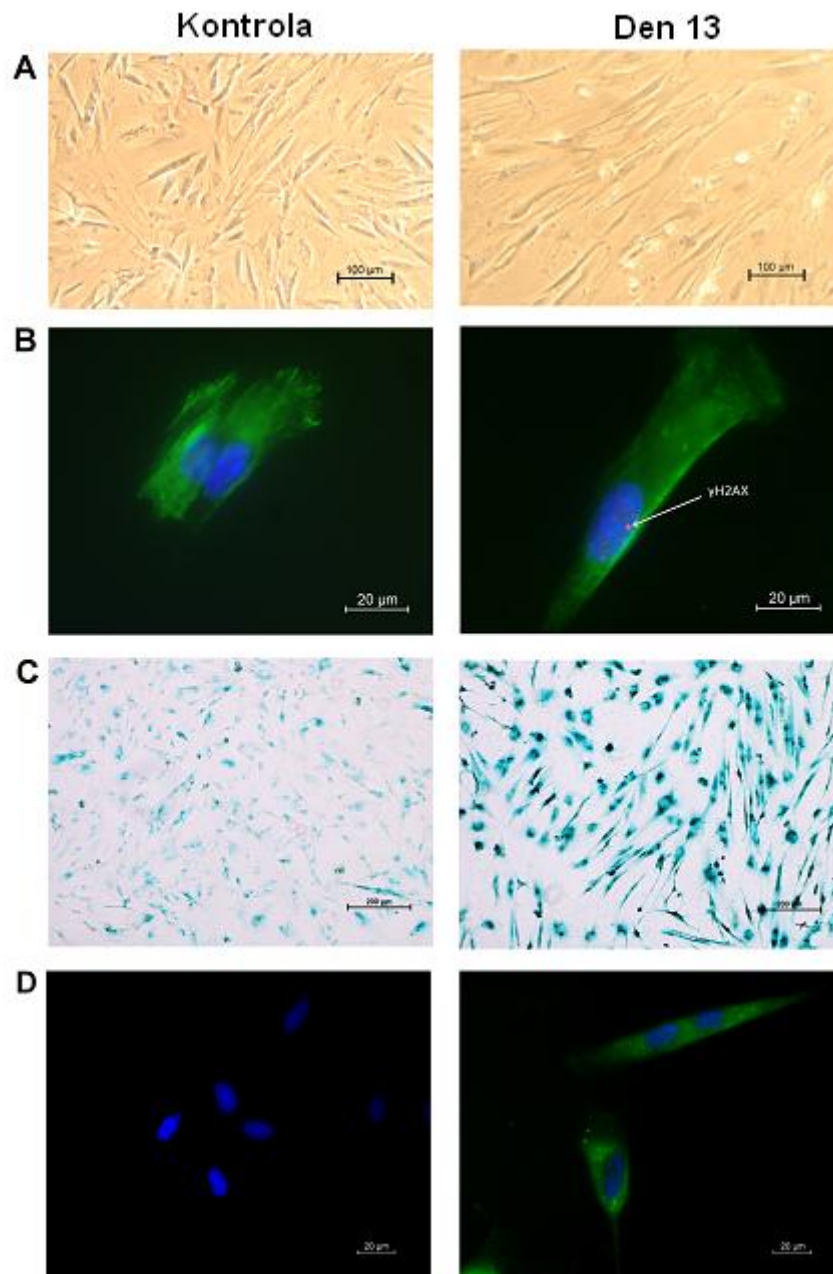
B: Závislost množství proteinu p21 u WI-38 na dávkách 2 – 20 Gy byla stanovena po 3 dnech metodou ELISA.

4.1.5 Změny v expresi proteinu p21 a indukce senescence

Ionizující záření způsobuje zvýšení exprese proteinu p21. Jeho množství bylo zvýšeno 1 a 3 dny po ozáření a poté kleslo na kontrolní hladiny (Obr. 7A). Metodou ELISA jsme prokázali zvýšené množství proteinu p21 v závislosti na dávce (Obr. 7B).

V buňkách ozářených 20 Gy se v jádrech buněk objevila ložiska tvořené histonem γH2AX odpovídající na poškození DNA, která jsou spojena s předčasnou senescencí (Obr. 8B). Pomocí fluorescenční mikroskopie obarvením buněk protilátkou proti proteinu p16 jsme po 13 dnech pozorovali zvýšenou expresi proteinu p16, který je rovněž spojován s buněčnou senescencí (Obr. 8D).

Zvýšenou aktivitu SA-β-galaktosidasy jsme detekovali už po prvním dni po ozáření dávkou 20 Gy; její aktivita výrazně rostla až do 13. dne (Obr. 8C).



Obr. 8: Vliv ionizujícího záření na morfologii buněk a indukci senescence u buněk WI-38 ozářených dávkou 20 Gy.

A: Změny v morfologii buněk WI-38 po ozáření dávkou 20 Gy po 13 dnech.

B: Morfologické změny a změny v jádrech byly stanoveny 13 dní po ozáření dávkou 20 Gy. DAPI + γ H2AX (červená) + vimentin (zelená) barvení.

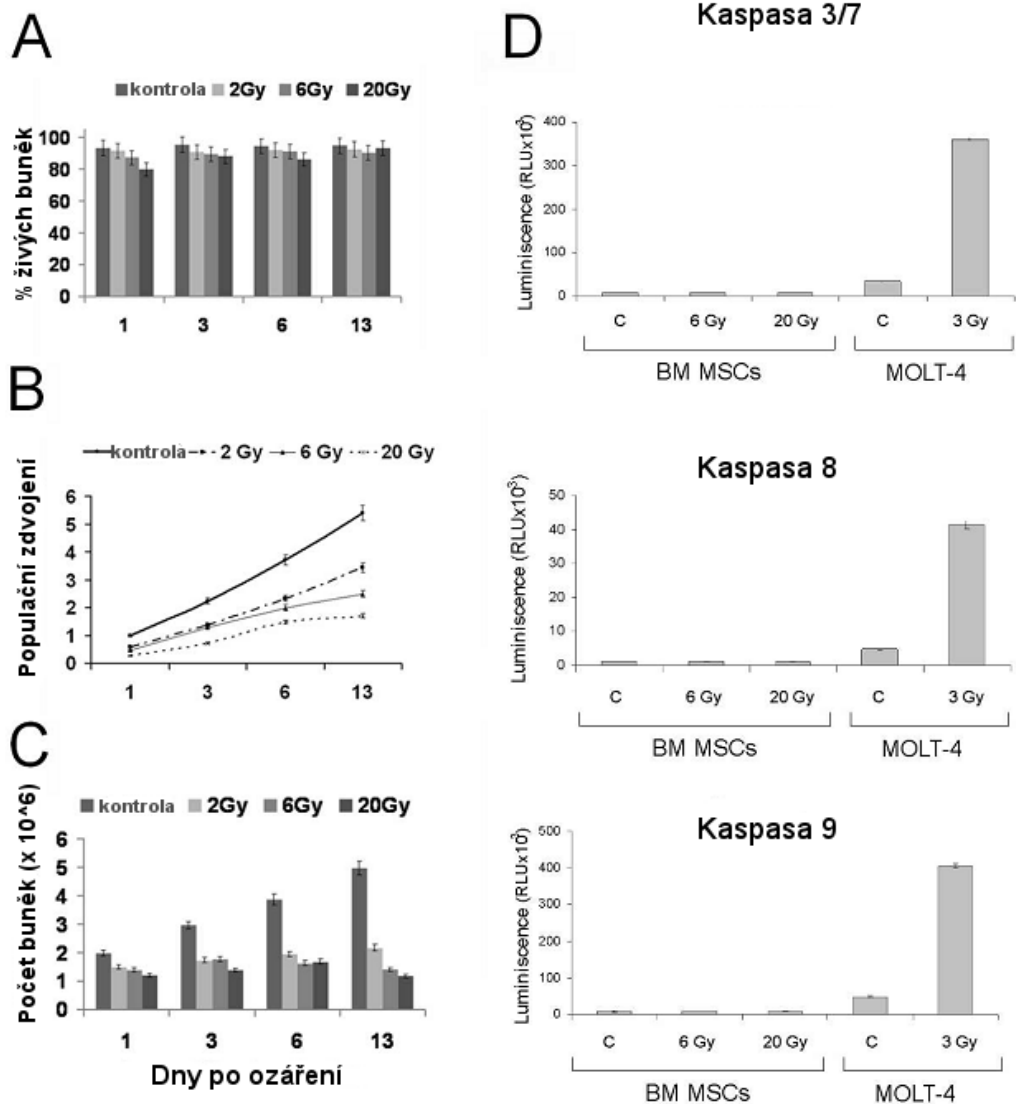
C: Buňky byly ozářeny dávkou 20 Gy v komůrkách a histochemicky byla stanovena aktivita SA- β -galaktosidasy po 13 dnech.

D: Změny v expresi proteinu p16 byly stanoveny po 13 dnech po ozáření dávkou 20 Gy. DAPI + p16 (zelená) barvení.

4.2 Reakce mesenchymálních kmenových buněk kostní dřeně na ionizující záření

4.2.1 Viabilita, proliferace, indukce apoptózy a aktivace kaspas

Ionizující záření o dávce 20 Gy nemá signifikantní vliv na viabilitu buněk po celou dobu experimentu (Obr. 9A), na druhou stranu výrazně inhibuje proliferační schopnost buněk (Obr. 9B, C). Pozorovali jsme také vliv ionizujícího záření o dávce 6 a 20 Gy na aktivaci kaspas 3/7, 8 a 9 po 1 a 3 dnech. Nebyly pozorovány žádné signifikantní změny v aktivaci kaspas ($p > 0,05$) (Obr. 9D). Jako pozitivní kontrola byla použita leukemická buněčná linie MOLT-4 ozářena dávkou 3 Gy.



Obr. 9: Vliv ionizujícího záření na viabilitu, proliferaci a indukci apoptózy u MKB kostní dřeně.

A: Procento živých buněk stanoveno pomocí Vi-Cell použitím barvení trypanovou modří během 13 dní po ozáření. Hodnoty představují průměr ze 3 nezávislých měření.

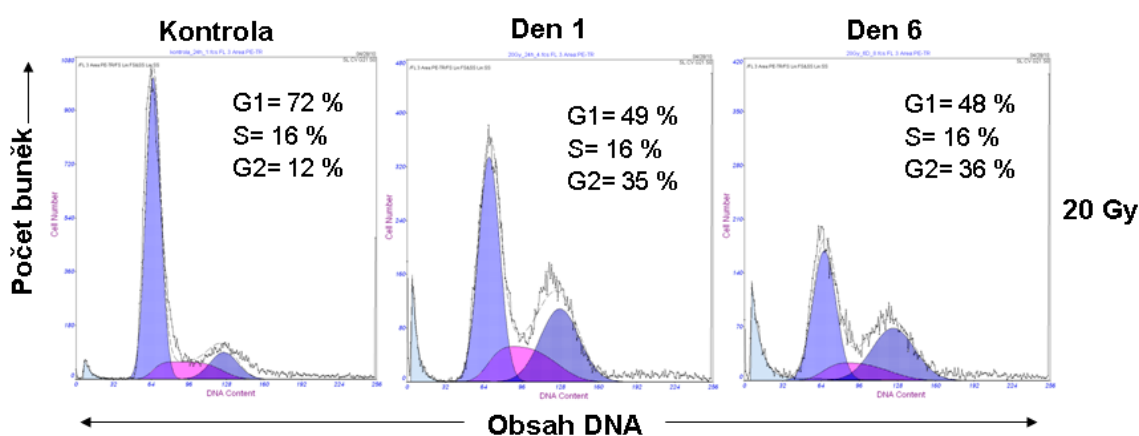
B: Závislost populačního zdvojení na dávce IR po dobu 13 dní po ozáření. Hodnoty představují průměr ze 3 nezávislých měření.

C: Dynamika buněčné proliferace, celkový počet buněk po dobu 13 dní po ozáření. Hodnoty představují průměr ze 3 nezávislých měření.

D: Aktivita kaspas 24 hodin po ozáření. MOLT-4 ozářené dávkou 3 Gy byly použity jako pozitivní kontrola. Hodnoty představují průměr ze 4 nezávislých měření.

4.2.2 Ionizující záření způsobuje zástavu buněčného cyklu u MKB kostní dřeně

Rozdělení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu odpovídající obsahu DNA bylo analyzováno po ozáření a srovnáno s kontrolní skupinou. Ionizující záření o dávce 2 a 6 Gy způsobilo u MKB kostní dřeně pokles počtu buněk v S fázi buněčného cyklu (u obou dávek 11 %, kontrola 16 %) během prvního dne. Zároveň během prvního dne došlo po dávkách 6 a 20 Gy k akumulaci buněk v G2/M fázi (36 % a 35 %, kontrola 12 %). Za 6 dní po ozáření dávkou 6 Gy byl pozorován pokles počtu buněk v bloku buněčného cyklu (Obr. 10).

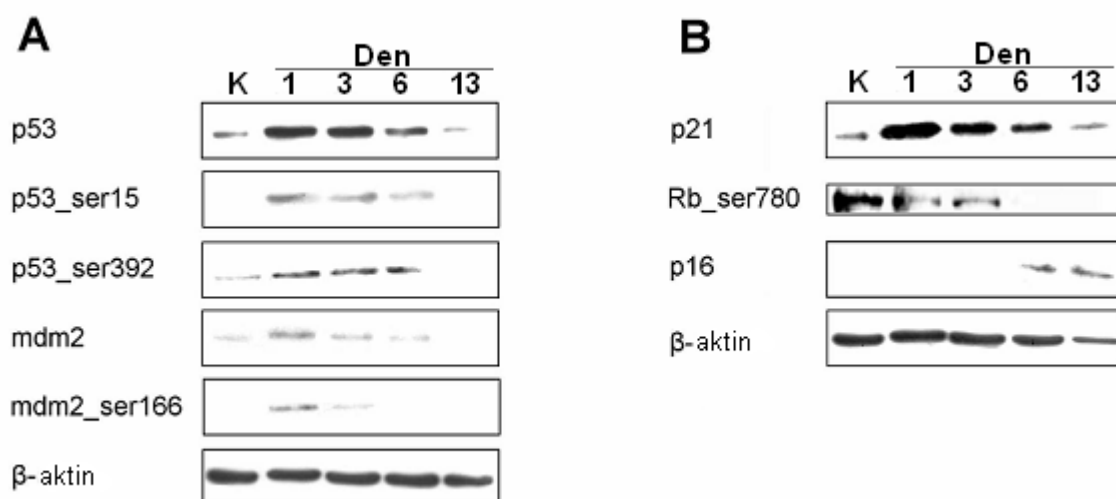


Obr. 10: Zástava buněčného cyklu.

Vliv ionizujícího záření na rozmístění MKB kostní dřeně v jednotlivých fázích buněčného cyklu byl stanoven pomocí průtokové cytometrie stanovením obsahu DNA v buňkách. Byly vybrány výsledky jednoho ze 3 nezávislých měření.

4.2.3 Ionizující záření způsobuje aktivace proteinu p53 a indukuje jeho fosforylaci u MKB kostní dřeně

Změny v expresi proteinů u MKB kostní dřeně po ozáření dávkou 20 Gy byly stanoveny v intervalu 13 dní elektroforézou spojenou s western blottingem. Byl pozorován nárůst v množství proteinu p53 s maximem 1 den po ozáření. Po 13 dnech bylo množství p53 srovnatelné s kontrolní hodnotou. První den po ozáření došlo také k fosforylaci proteinu p53 na serinech 15 a 392; fosforylace přetrvávaly do 6. dne. Exprese negativního regulátoru proteinu p53 – proteinu mdm2 – měla stejnou tendenci, jako u p53. Množství mdm2 se zvýšilo ve stejnou dobu, kdy došlo k fosforylaci tohoto proteinu na serinu 166 (Obr. 11A).



Obr. 11: Indukce a aktivace proteinů u MKB kostní dřeně ozářených dávkou 20 Gy.

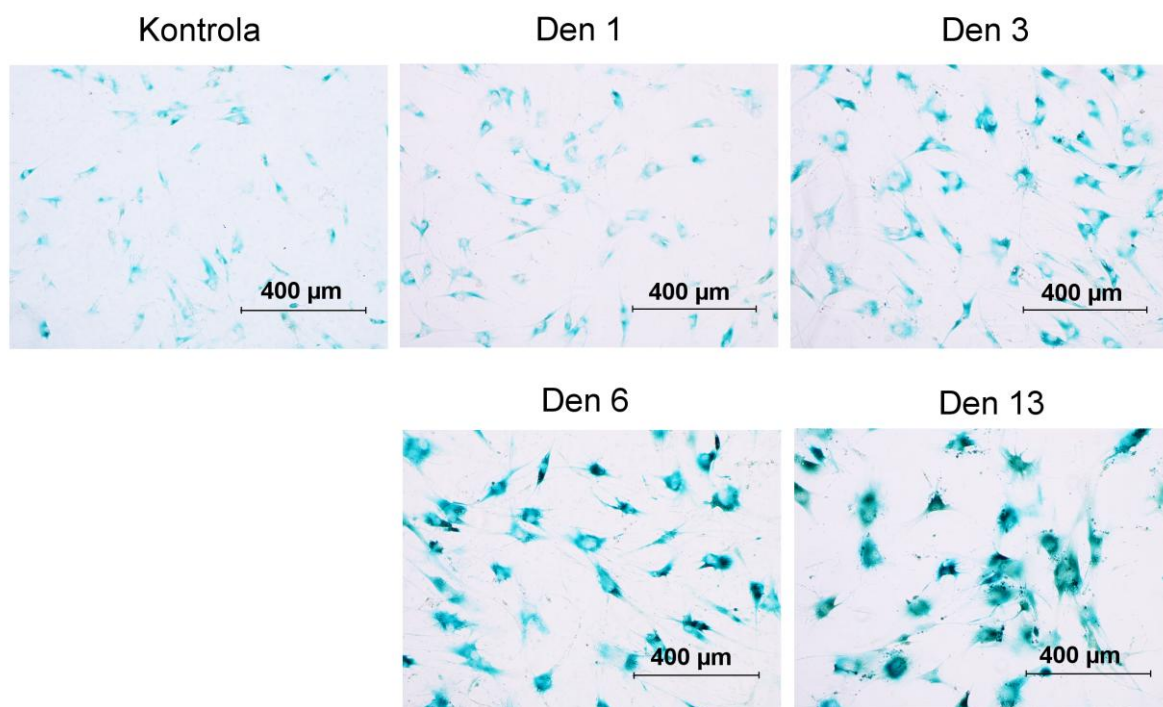
A: Pomocí elektroforézy a western blottingu byly hodnoceny změny v expresi proteinu p53 a jeho fosforylovaných forem na serinech 15 a 392, proteinu mdm2 a jeho fosforylované formy na serinu 166. Pro kontrolu nanášky bylo stanoveno množství β-aktinu.

B: Změny v expresi p21Cip1/Waf1, fosforylovaného Rb na serinu 780 a proteinu p16INK4a stanoveny pomocí elektroforézy a western blottingu v intervalu 13 dní.

4.2.4 Změny v množství proteinu p21Cip1/Waf1, p16INK4a a indukce senescence

Ionizující záření indukuje expresi proteinu p21Cip1/Waf1. Množství proteinu dosahuje maxima 1 den po ozáření (Obr. 11B). V momentě, kdy začíná ubývat množství proteinu p21, objevuje se protein p16 (6. den, maximum 13. den). Nárůst množství proteinu p16 je doprovázen poklesem fosforylovaného Rb na serinu 780 (Obr. 11B).

Protein p16 souvisí se vstupem buněk do senescence stejně jako zvýšená aktivita SA- β -galaktosidasy. Použitím mikroskopické detekce byl pozorován mírný nárůst aktivity SA- β -galaktosidasy už 3 dny po ozáření dávkou 20 Gy s dalším zvýšením po 6 a 13 dnech. Paralelně byly zaznamenány změny v morfologii buněk. Buňky se z protáhlého tvaru stávaly postupem času stále více zploštělé a zvětšovaly se (Obr. 12).



Obr. 12: Indukce senescence u MKB kostní dřeně ozářených dávkou 20 Gy.

Po ozáření buněk byla histochemicky detekována aktivita SA- β -galaktosidasy v průběhu 13 dní.

4.3 Reakce mesenchymálních kmenových buněk zubní pulpy a periodontálního ligamenta na ionizující záření

Pro přehlednost se v kap. 6.1.1 – 6.1.3 zaměříme na reakci kmenových buněk v časných intervalech tj. 1 a 24 hodin po ozáření. V kap. 6.1.4 – 6.1.7 pak budou popsány pozdní reakce do 13. dne po ozáření.

4.3.1 Detekce fosforylace histonu H2AX

Průtoková cytometrie

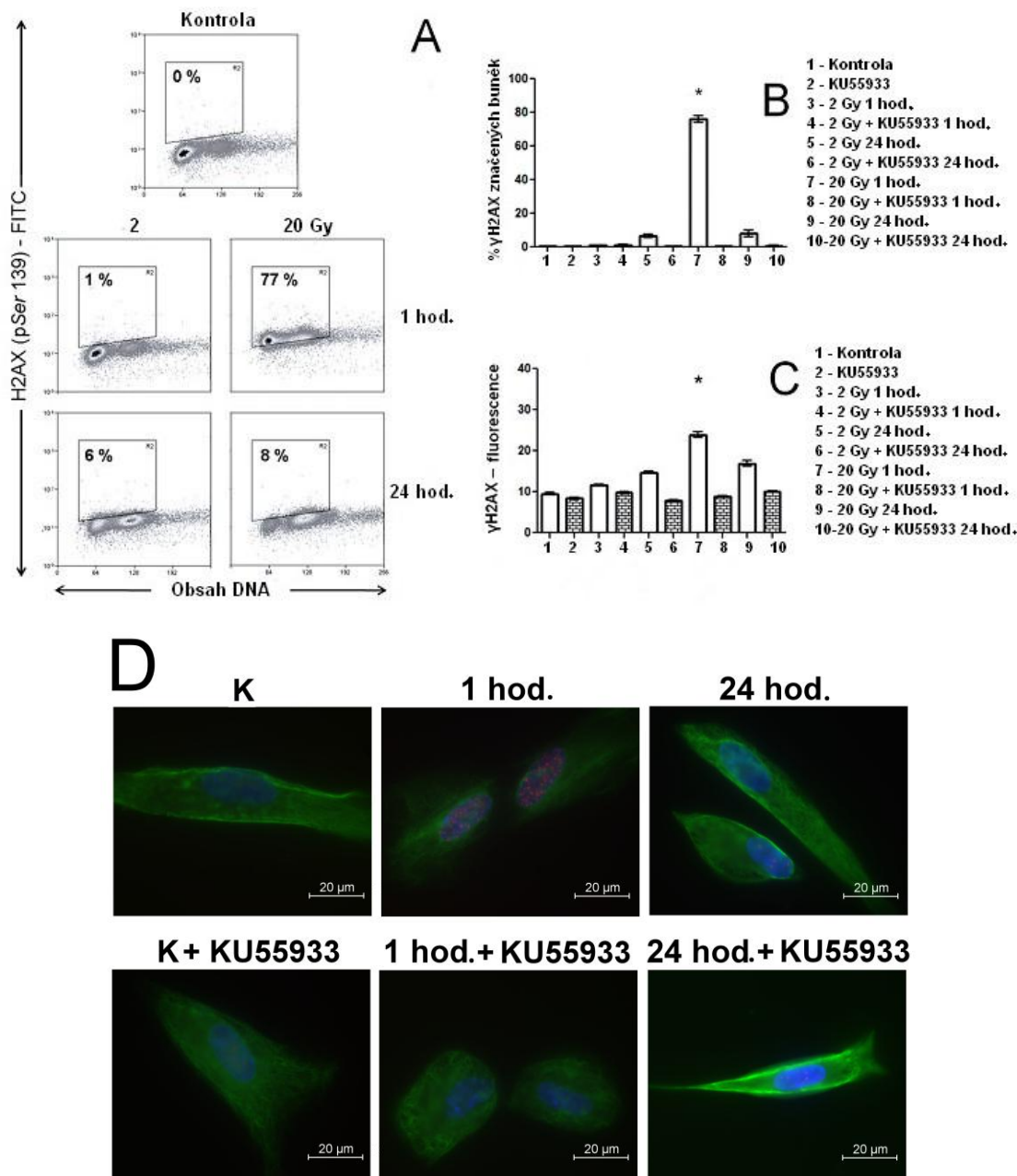
Obr. 3.1 znázorňuje odpověď KBZP na ionizující záření fosforylací histonu H2AX na serinu 139. Je zřejmé, že se za 1 hodinu po ozáření (20 Gy) objevuje signifikantní množství γ H2AX pozitivních buněk. Během 24 hodin klesla intenzita γ H2AX ze 77 % na 8 % (Obr. 13A). Velmi podobný trend jsme pozorovali u KBPL, kde maximum intenzity γ H2AX bylo rovněž v 1 hodinu po ozáření dávkou 20 Gy (85 %) s poklesem na 4 % za 24 hodin (Obr.14A).

Pro stanovení vlivu inhibice ATM kinasy na fosforylaci histonu H2AX byly buňky ovlivněny specifickým inhibitorem ATM kinasy o koncentraci 10 μ M 1 hodinu před ozáření. Bylo zjištěno, že KU55933 inhibuje fosforylaci γ H2AX jak u KBZP, tak u KBPL za 1 i 24 hodin po ozáření (Obr. 13B, 13C, 14B, 14C).

Imunocytochemie

Ozáření buněk KBZP a KBPL dávkou 20 Gy vede k masivní fragmentaci DNA a tvorbě dvojitých zlomů. Obr. 13D a 14D znázorňují tvorbu mikroskopicky rozeznatelných γ H2AX ložisek v jádrech buněk po ozáření. Po ozáření dávkou 20 Gy byl po 1 hodině pozorován signifikantní nárůst počtu γ H2AX ložisek u obou buněčných linií. Většina dvojitých zlomů byla za 24 hodin opravena a po 1 dni bylo pozorováno pouze malé množství γ H2AX ložisek. Z morfologického hlediska nebyla pozorována jak fragmentace jádra, tak ani tvorba apoptotických tělísek.

Po inhibici ATM se vyskytlo pouze malé množství γ H2AX ložisek 1 hodinu a 24 hodin po ozáření (Obr. 13D, 14D).



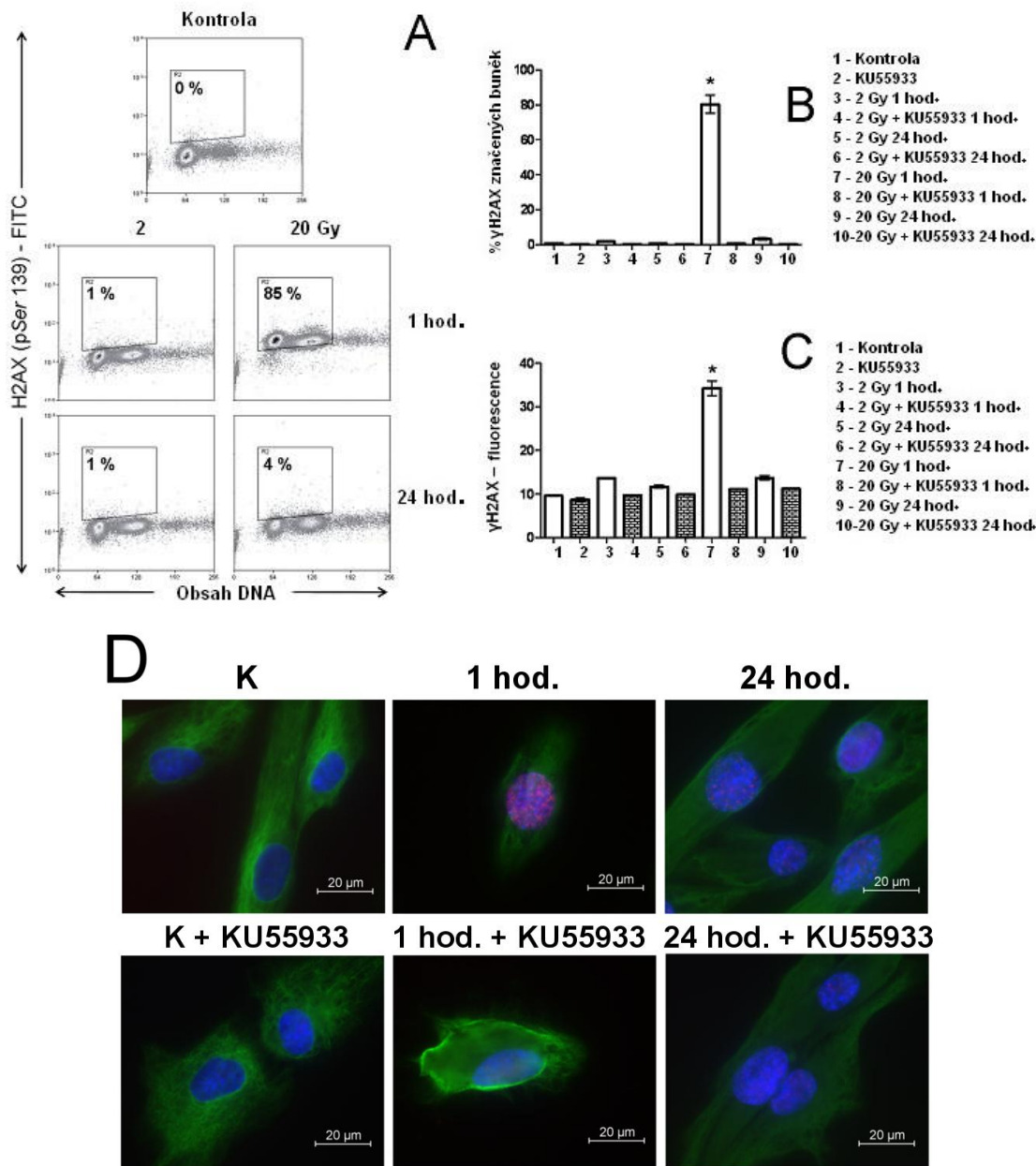
Obr. 13: Expres γ H2AX u KBZP 1 a 24 hodin po ozáření.

A: KBZP byly preinkubovány s KU55933 1 hodinu a pak ozářeny dávkou 2 a 20 Gy. Expres γ H2AX byla měřena průtokovou cytometrií společně s množstvím DNA.

B: Procenta γ H2AX pozitivních buněk, měřeno průtokovou cytometrií. Průměr ze 3 nezávislých měření.

C: Intenzita fluorescence odpovídá množství fosforylovaného H2AX. Průměr ze 3 nezávislých měření.

D: Mikroskopická detekce γ H2AX (červená) a morfologie buněk (zelená=vimentin, modrá=DAPI) po IR dávkou 20 Gy a ovlivnění KU55933.



Obr. 14: Expres γ H2AX u KBPL 1 a 24 hodin po ozáření.

A: KBPL byly preinkubovány s KU55933 1 hodinu a pak ozářeny dávkou 2 a 20 Gy. Expres γ H2AX byla měřena průtokovou cytometrií společně s množstvím DNA.

B: Procenta γ H2AX pozitivních buněk, měřeno průtokovou cytometrií. Průměr ze 3 nezávislých měření.

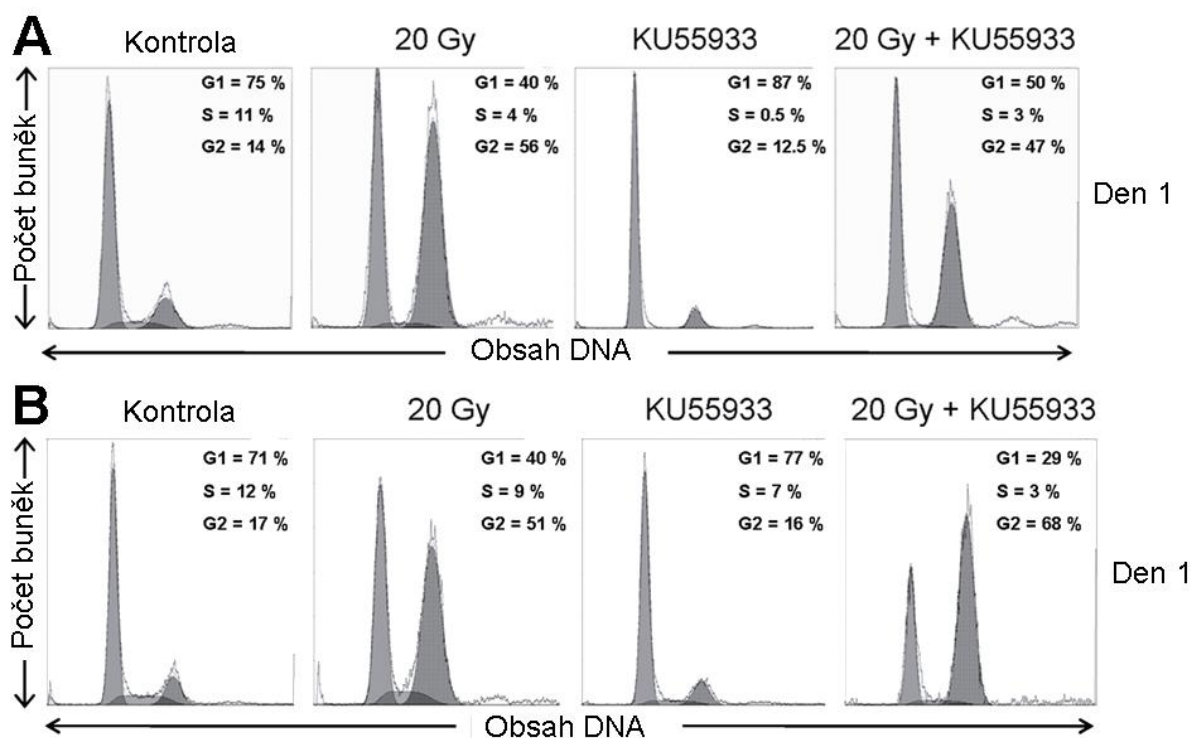
C: Intenzita fluorescence odpovídá množství fosforylovaného H2AX. Průměr ze 3 nezávislých měření.

D: Mikroskopická detekce γ H2AX (červená) a morfologie buněk (zelená=vimentin, modrá=DAPI) po IR dávkou 20 Gy a ovlivnění KU55933.

Ke stanovení vlivu inhibice ATM kinasy a ozařování na buněčný cyklus KBZP a KBPL byla použita průtoková cytometrie. Buňky byly ovlivněny inhibitorem KU55933

1 hodinu před ozářením, ozářeny dávkou 20 Gy a změřeny po 1 a 3 dnech. Buňky postrádající ATM vykazují výraznou akumulaci v G2 fázi po ozáření (Xu et al. 2002). V odpovědi na IR KBPL ovlivněné inhibitorem KU55933 vykazovaly zvýšené množství buněk v G2/M fázi (68 % 1. den, 65 % 3. den) a snížený počet buněk v G1 (29 % 1. den, 32 % 3. den). Buňky bez ATM inhibice se vyskytovaly v G2/M z 51 % 1. den, resp. 49 % 3. den. Samotná inhibice ATM kinasy inhibitorem KU55933 bez ozáření neměla žádný vliv na rozmístění buněk v buněčném cyklu (Obr. 15A).

U KBZP se po inhibici ATM a ozářením vyskytovalo v G2/M fázi 47 % buněk 1. den, resp. 44 % 3. den. Větší procento buněk se vyskytovalo v G1 fázi – 50 % 1. den, 53 % 3. den. U ozářených buněk bez ATM inhibice bylo v G2/M fázi 56 % 1. den, 54 % 3. den; G1: 40 % - 1. den, 42 % 3. den. Samotné ovlivnění KU55933 bez ozáření mělo slabý inhibiční efekt na S fázi po 24 hodinách (kontrola 11 %, buňky s KU55933 0,5 %) (Obr. 15B).



Obr. 15: Rozmístění buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu po ozáření dávkou 20 Gy a ovlivnění inhibitorem ATM kinasy KU55933.

A: KBZP byly ozářeny nebo ovlivněny 10 $\mu\text{mol/L}$ KU55933 1 hodinu před ozářením a ozářeny. Po 1 dni byla provedena analýza buněčného průtokovou cytometrií. Uvedené výsledky jsou průměrem ze 3 nezávislých měření.

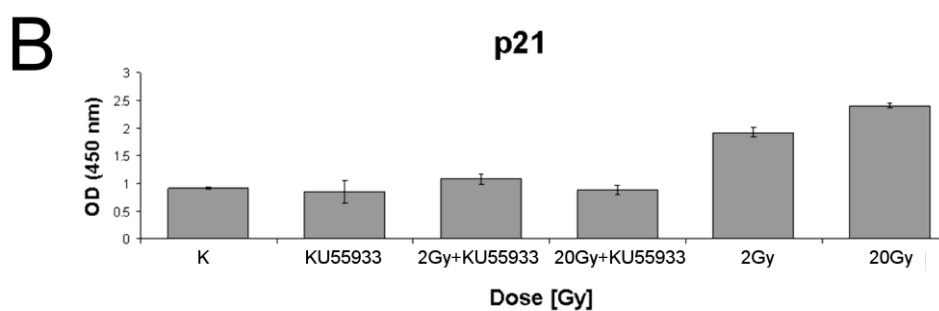
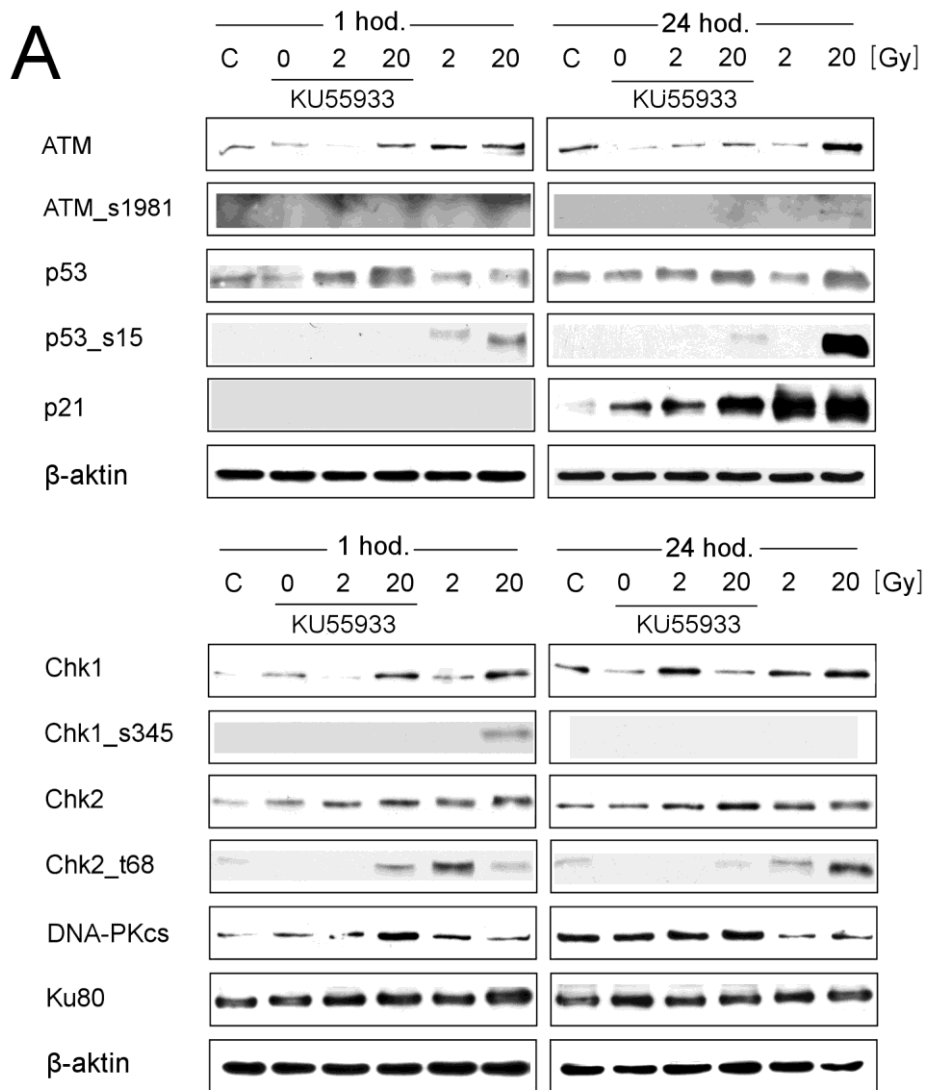
B: KBPL byly ozářeny nebo ovlivněny 10 $\mu\text{mol/L}$ KU55933 1 hodinu před ozářením a ozářeny. Po 1 dni byla provedena analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií. Uvedené výsledky jsou průměrem ze 3 nezávislých měření.

4.3.3 Změny v expresi proteinů

Pro hodnocení proteinové exprese byla použita SDS-PAGE elektroforéza. Buňky byly ozářeny dávkami 2 a 20 Gy. Byl sledován vliv inhibitoru ATM kinasy KU55933 na expresi proteinů. Reakce byla stejná jak u KBZP, tak u KBPL. Pozorovali jsme změny v množství a fosforylaci ATM kinasy. IR způsobuje upregulaci ATM kinasy a její fosforylaci na serinu 1981 jednu hodinu po ozáření dávkami 2 a 20 Gy a množství je zvýšeno po 24 hodinách po dávce 20 Gy. Po inkubaci buněk s inhibitorem KU55933 nebyla pozorována žádná exprese ATM kinasy (Obr.16A, 17A).

Ionizující záření způsobuje signifikantní upregulaci proteinu p53. Množství tohoto proteinu je zvýšeno jak 1, tak 24 hodin po IR, ať už s použitím KU55933 nebo bez něj. Změny proteinu p53 jsou doprovázeny jeho fosforylací na serinu 15, jehož množství je zvýšeno po celou dobu experimentu po ozáření dávkou 20 Gy, ale pouze u neinhibovaných buněk. Protein p21 není exprimován 1 hodinu po ozáření dávkami 2 a 20 Gy. Jeho exprese je zvýšena až 24 hodin po ozáření, ať už u buněk s inhibicí ATM kinasy nebo bez ní – u neinhibovaných buněk je však množství vyšší (Obr.16A, 17A). Výsledky byly potvrzeny metodou ELISA (Obr.16B, 17B).

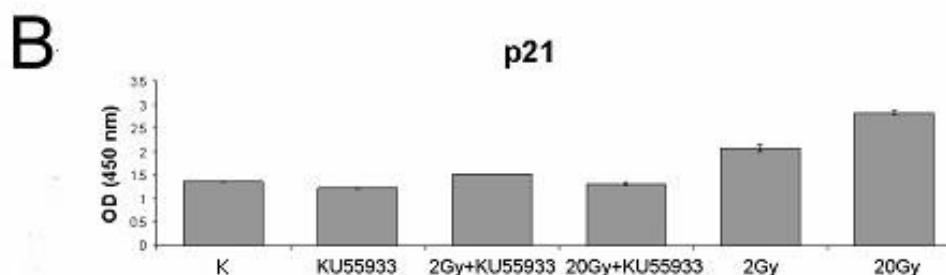
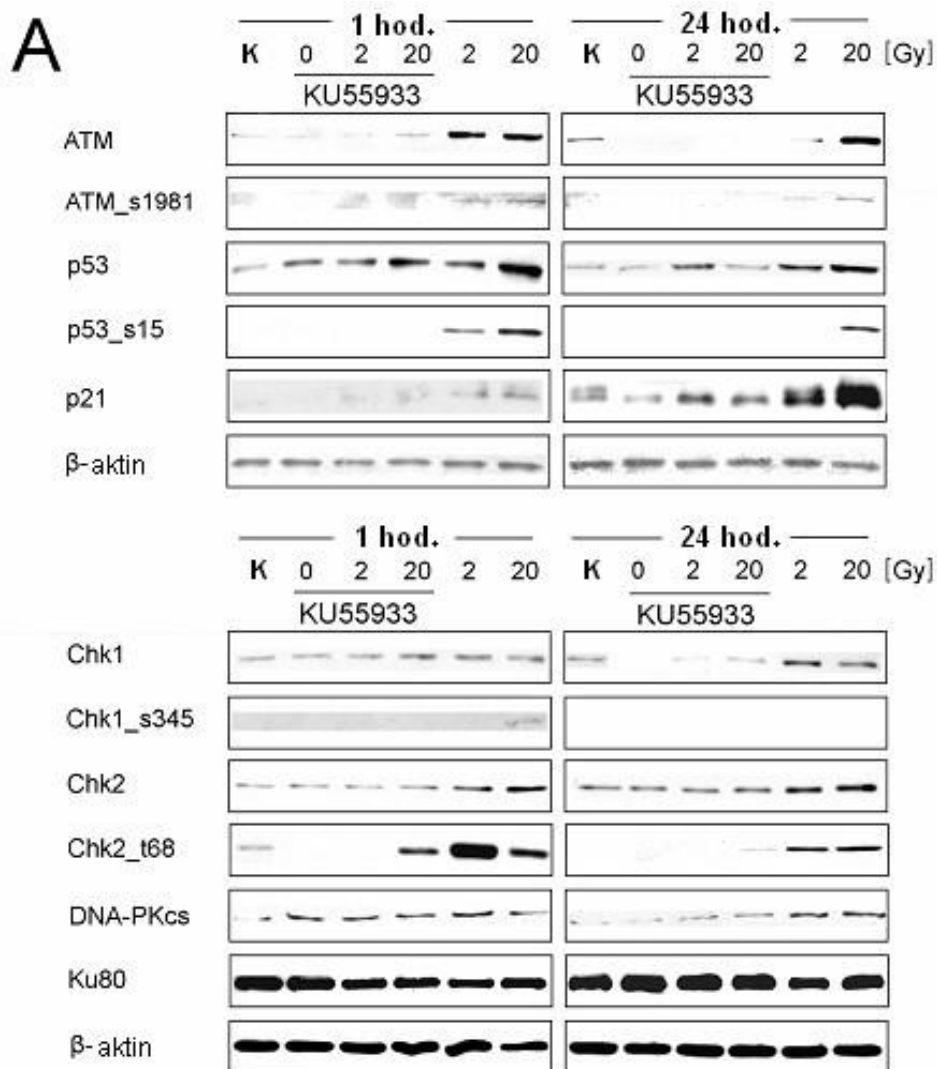
Dalšími proteiny odpovídajícími na poškození DNA jsou checkpoint kinasy Chk1 a Chk2. Množství Chk1 je lehce zvýšeno po ozáření jak s použitím tak bez použití KU55933, ale fosforylovaná forma na serinu 345 se objevuje pouze bez inhibice ATM kinasy po 1 hodině po IR dávkou 20 Gy. Chk2 vykazuje stejnou tendenci jako Chk1, ale její fosforylace na threoninu 68 je výrazně zvýšena po ozáření, s dávkou 2 Gy více po 1 hodině, s dávkou 20 Gy více po 24 hodinách. Nepozorovali jsme žádné signifikantní změny v množství DNA-PKcs ani její podjednotky Ku80. Pro kontrolu nanášky bylo na všech membránách stanoveno množství β -aktinu (Obr.16A, 17A).



Obr. 16: Indukce a aktivace proteinů u KBZP po ozáření.

A: Buňky byly ozářeny dávkami 2 a 20 Gy. Použitím elektroforézy a western blotu byly stanoveny změny ATM kinasy, proteinu p53, p21, Chk1 a Chk2, DNA-PKcs a Ku80. Pro zjištění vlivu inhibitoru ATM kinasy KU55933 byly buňky s tímto inhibitorem inkubovány 1 hodinu před ozáření. Pro kontrolu nanášky bylo na všech membránách stanoveno množství β-aktinu.

B: Změny proteinu p21 24 hodin po ozáření dávkami 2 a 20 Gy a inhibici ATM kinasy inhibitorem KU55933 u KBZP.



Obr. 17: Indukce a aktivace proteinů u KBPL po ozáření.

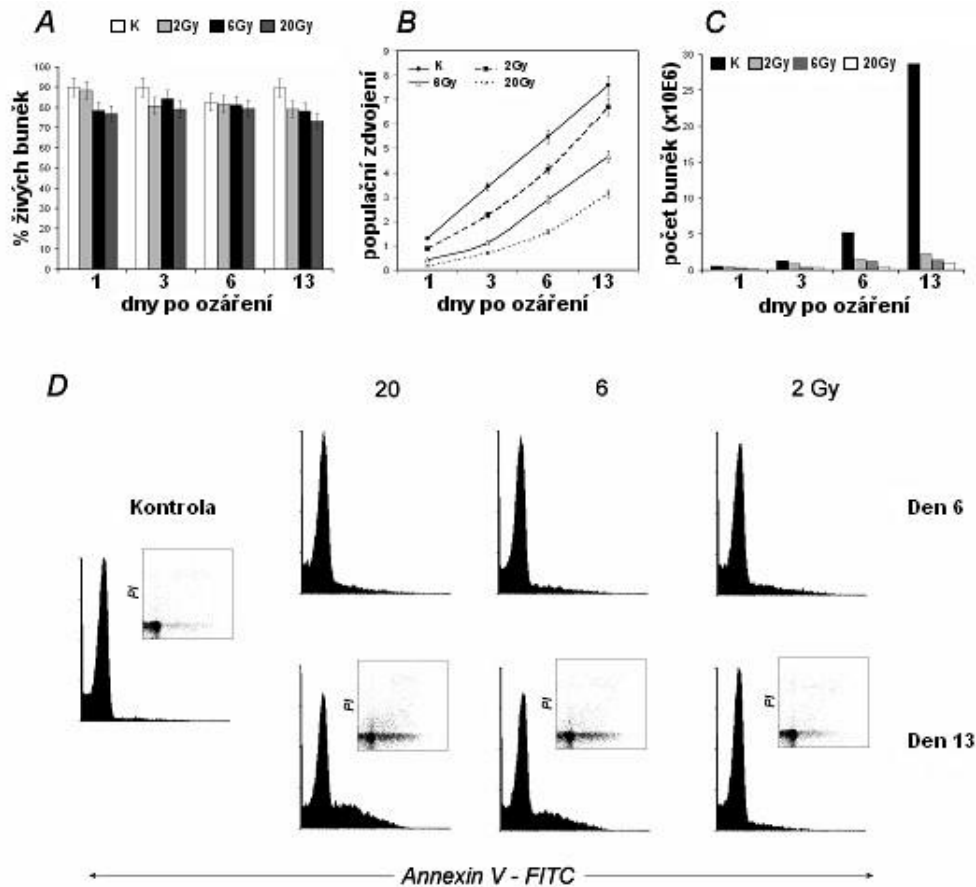
A: Buňky byly ozářeny dávkami 2 a 20 Gy. Použitím elektroforézy a western blotu byly stanoveny změny ATM kinasy, proteinu p53, p21, Chk1 a Chk2, DNA-PKcs a Ku80. Pro zjištění vlivu inhibitoru ATM kinasy KU55933 byly buňky s tímto inhibitorem inkubovány 1 hodinu před ozářením. Pro kontrolu nanášky bylo na všech membránách stanoveno množství β -aktinu.

B: Změny proteinu p21 24 hodin po ozáření dávkami 2 a 20 Gy a inhibici ATM kinasy inhibitorem KU55933 u KBPL.

4.3.4 Proliferace, viabilita a indukce apoptózy u KBZP a KBPL po ozáření

Ozáření KBZP dávkami do 20 Gy nemá žádný efekt na viabilitu buněk během celé doby experimentu; přežívá okolo 80-90 % buněk jak v kontrolních, tak ozářených skupinách (Obr.18A). Na druhou stranu IR signifikantně inhibuje proliferaci buněk (Obr.18C). Buňky ozářené dávkou 2 Gy začaly za 2 týdny znovu lineárně zvyšovat svůj počet. Byl také ovlivněn čas, ve kterém dochází ke zdvojení počtu buněk – se zvyšující se dávkou se prodlužuje doba, za kterou dochází ke zdvojení počtu buněk (kontrola 27 h, dávka 20 Gy 128 hodin).

Indukce apoptózy se vyskytuje v pozdějších časových intervalech a je pouze slabá. Procento apoptotických buněk po 13 dnech se zvyšuje v závislosti na dávce ozáření (5 % po 2 Gy, 17 % po 6 Gy a 20 % po 20 Gy). U kontrolních buněk se po 13 dnech nachází 3 % apoptotických buněk (Obr.18D). Pomocí průtokové cytometrie byla také hodnocena aktivita kaspasy 3 – během 13 dní nedošlo u buněk k aktivaci této kaspasy.



Obr. 18: Vliv ozáření KBZP dávkami 2, 6 a 20 Gy na viabilitu, proliferaci a indukci apoptózy po dobu 13 dní po ozáření.

A: Procento živých buněk stanoveno pomocí Vi-Cell použitím barvení trypanovou modří.

B: Analýza populačního zdvojení ozářených KBZP.

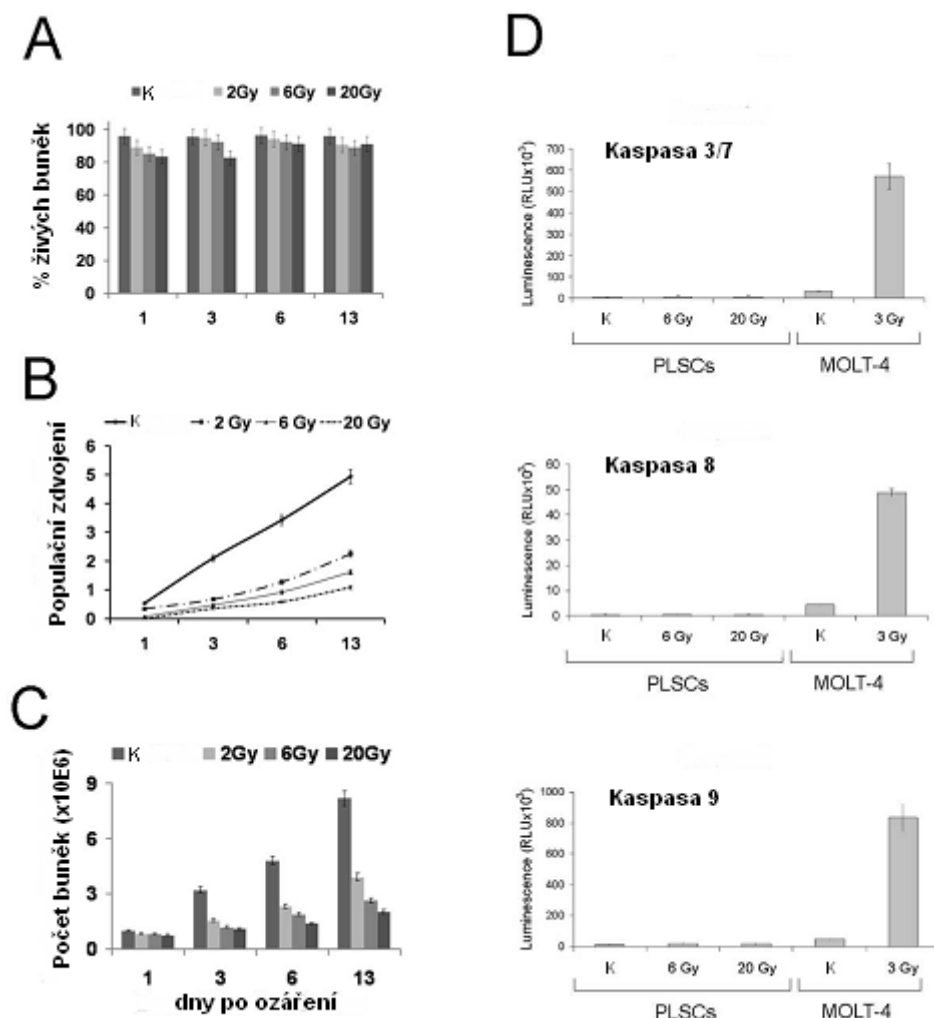
C: Dynamika proliferace buněk.

D: Indukce apoptózy pomocí barvení Annexinem V a propidium jodidem. Výsledky 1 ze 3 nezávislých experimentů.

Ozáření KBZP o dávkách do 20 Gy nemá signifikantní efekt na viabilitu buněk během celé doby experimentu; okolo 80-90 % jak v kontrolních, tak ozářených skupinách (Obr. 19A). Ozáření však výrazně inhibuje proliferaci buněk. Buňky ozářené dávkou 2 Gy začaly za 2 týdny znovu lineárně zvyšovat svůj počet. Byl také ovlivněn čas, ve kterém dochází ke zdvojení počtu buněk – se zvyšující se dávkou se prodlužuje doba, za kterou dochází ke zdvojení počtu buněk (kontrola 28 h, dávka

20 Gy 202 hodin) (Obr. 19B). Docházelo tedy k výrazné redukci proliferační schopnosti (Obr. 19C).

Stanovovali jsme také vliv ozáření KBPL dávkami 6 a 20 Gy na aktivaci kaspasy 3/7, 8 a 9 po 1 a 3 dnech po ozáření. Nebyly pozorovány žádné signifikantní změny v aktivitě těchto kaspas ($p < 0,05$) (Obr. 19D). Jako pozitivní kontrolu jsme použili leukemickou buněčnou linii MOLT-4 po ozáření dávkou 3 Gy.



Obr. 19: Vliv ozáření KBPL na viabilitu, proliferaci a indukci apoptózy.

A: Procento živých buněk bylo stanoveno pomocí Vi-Cell použitím barvení trypanovou modří.

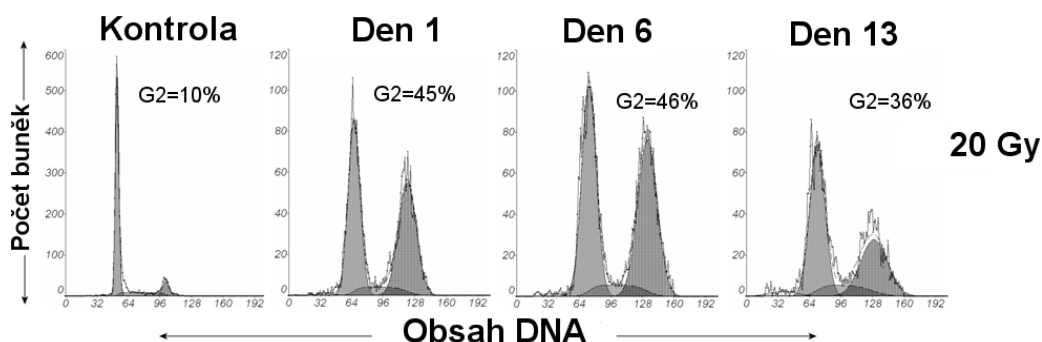
B: Analýza populačního zdvojení ozářených KBZP.

C: Dynamika proliferace buněk.

D: Aktivita kaspas 24 hodin po ozáření. Měření luminiscenčního signálu. Jako pozitivní kontrola použity buňky linie MOLT-4 ozářené dávkou 3 Gy. Výsledky ze 4 nezávislých experimentů.

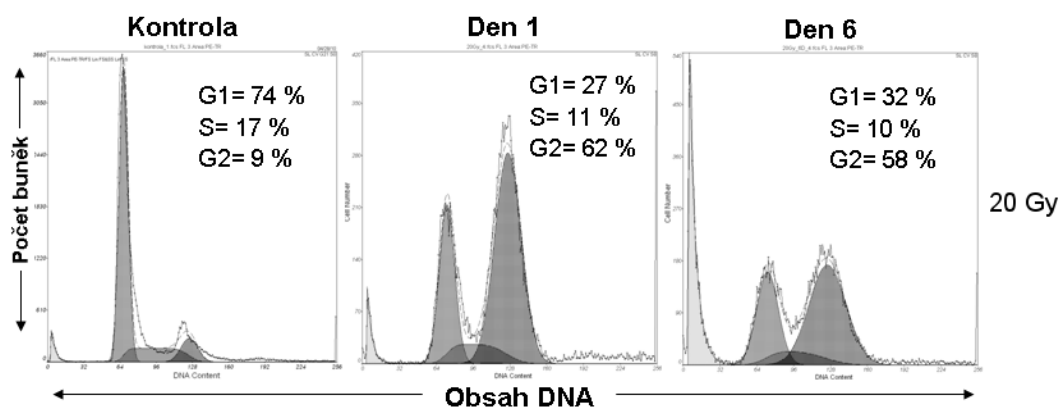
4.3.5 Ionizující záření indukuje zástavu buněčného cyklu u KBZP a KBPL

Rozdělení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu odpovídající obsahu DNA bylo analyzováno po ozáření a srovnáno s kontrolní skupinou. Ionizující záření o dávce 2 Gy způsobilo u KBZP pokles počtu buněk v S fázi buněčného cyklu (12 %, kontrola 3 %) během prvního dne po ozáření a situace se nezměnila až do 13. dne. Zároveň během prvního dne došlo po dávkách 6 a 20 Gy jak u KBZP tak u KBPL k akumulaci buněk v G2/M fázi (41 % a 45 %, kontrola 10 % u KBZP, resp. 46 % a 62 %, kontrola 9 % u KBPL). Tato zástava přetrvávala až do 13. dne po ozáření (Obr. 20, 21).



Obr. 20: Zástava buněčného cyklu u KBZP.

Vliv ionizujícího záření na rozmístění KBZP v jednotlivých fázích buněčného cyklu byl stanoven průtokovou cytometrií stanovením obsahu DNA v buňkách. Byly vybrány výsledky jednoho ze 3 nezávislých měření.



Obr. 21: Zástava buněčného cyklu u KBPL.

Vliv ionizujícího záření na rozmístění KBPL v jednotlivých fázích buněčného cyklu byl stanoven pomocí průtokové cytometrie stanovením obsahu DNA v buňkách. Byly vybrány výsledky jednoho ze 3 nezávislých měření.

4.3.6 Protein p53 je u KBZP a KBPL po ozáření aktivován

Pomocí elektroforézy a western blotu jsme studovali změny v expresi proteinů u KBZP a KBPL po ozáření dávkou 20 Gy. Pozorovali jsme změny v množství proteinu p53 a jeho fosforylovaných forem v intervalu 13 dní. IR způsobuje signifikantní upregulaci proteinu p53; už po 1 dni po ozáření dávkou 20 Gy je množství proteinu p53 výrazně zvýšeno a dosahuje maxima. V porovnání s prvním dnem je po 3 dnech exprese snížena a po 13 dnech klesá na kontrolní hodnoty (Obr. 22A, 23A).

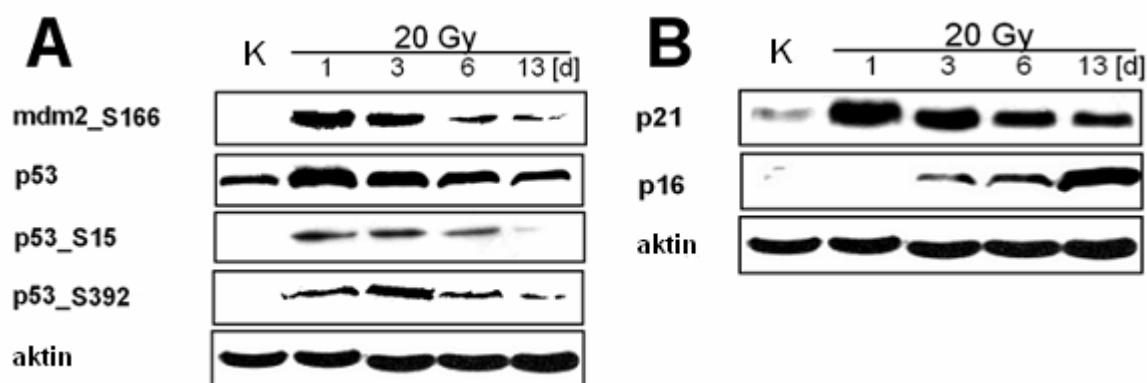
Změny proteinu p53 jsou doprovázeny jeho fosforylací na serinu 15 se stejnou tendencí. Maximální fosforylace na serinu 15 se objevuje 1 den po ozáření dávkou 20 Gy a s časem klesá; 13 dní po ozáření je množství p53_ser15 nedetekovatelné. Fosforylace na serinu 392 má pomalejší nástup, objevuje se také po 1 dni po ozáření, ale dosahuje svého maxima až 3. den, pak se snižuje. Po 13 dnech, kdy je množství celkového p53 sníženo na kontrolní hladiny, je fosforylace na serinu 392 téměř nezaznamatelná. Ve stejnou dobu, kdy dochází ke zvýšení proteinu p53, zvyšuje se také množství jeho negativního regulátoru proteinu mdm2 díky fosforylaci na serinu 166 a má stejnou tendenci jako protein p53. Maximální množství se objevuje po 1 dni, po 13 dnech výrazně klesá (Obr. 22A, 23A).

4.3.7 Ionizující záření indukuje senescenci u KBZP a KBPL

Protein p21 není za normálních okolností u KBZP a KBPL exprimován. Po ozáření se exprese genu CDKN1A dosahuje maxima po 1 dni a poté klesá s časem – po 13 dnech je na kontrolních hladinách (Obr. 22B, 23B).

Jakmile dochází ke snížení exprese proteinu p21, nastává zvýšení proteinu p16, který je spojován s buněčnou senescencí. Tento inhibitor kinas CDK4 se poprvé objevuje 1 den po ozáření, jeho množství se zvyšuje a dosahuje maxima 13 dní po ozáření. Pokles množství proteinu p21 je tedy následováno vzestupem množství proteinu p16 (Obr. 22B, 23B).

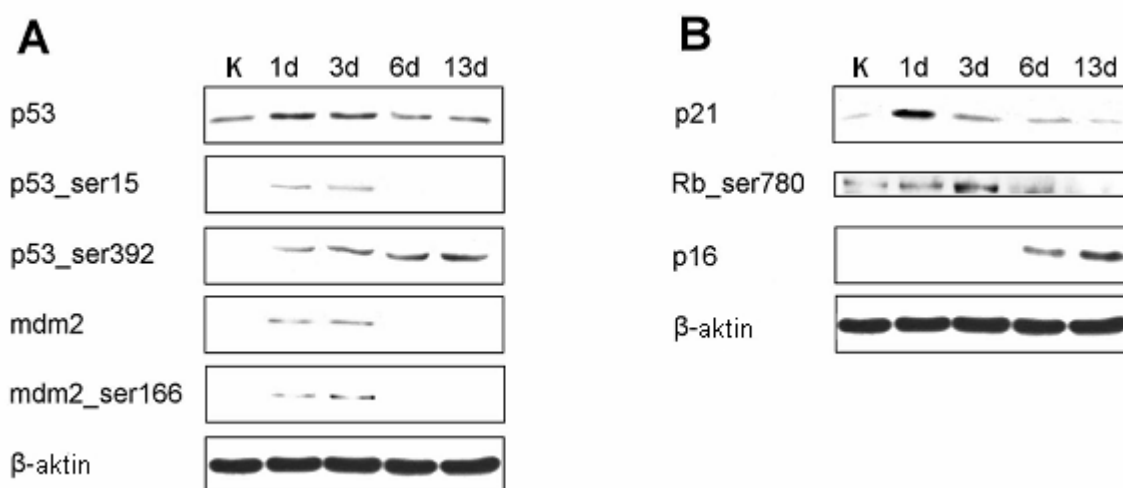
Tomuto závěru odpovídá i zvýšená aktivita β -galaktosidasy, která je patrná 3 dny po ozáření a její aktivita s časem roste (Obr. 24, 25).



Obr. 22: Indukce a aktivace proteinů u KBZP ozářených dávkou 20 Gy.

A: Pomocí elektroforézy a western blottingu byly hodnoceny změny v expresi proteinu p53 a jeho fosforylovaných forem na serinech 15 a 392, fosforylované formy proteinu mdm2 na serinu 166. Pro kontrolu nanášky bylo stanoveno množství β -aktinu.

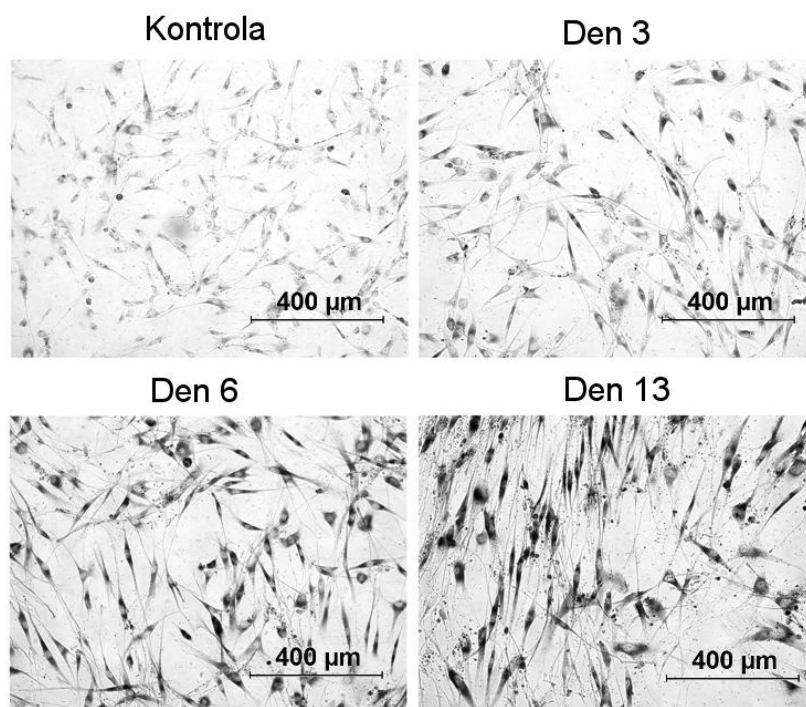
B: Změny v expresi p21Cip1/Waf1 a proteinu p16INK4a stanoveny pomocí elektroforézy a western blottingu v intervalu 13 dní.



Obr. 23: Indukce a aktivace proteinů u KBPL ozářených dávkou 20 Gy.

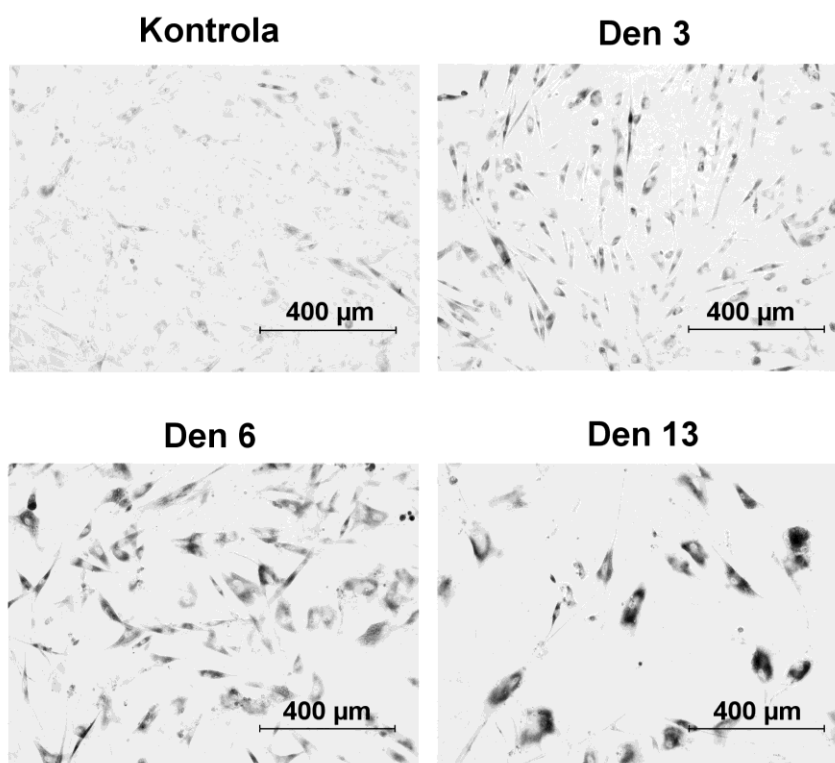
A: Pomocí elektroforézy a western blottingu byly hodnoceny změny v expresi proteinu p53 a jeho fosforylovaných forem na serinech 15 a 392, proteinu mdm2 a jeho fosforylované formy na serinu 166. Pro kontrolu nanášky bylo stanoveno množství β -aktinu.

B: Změny v expresi p21Cip1/Waf1, fosforylovaného Rb na serinu 780 a proteinu p16INK4a stanoveny pomocí elektroforézy a western blottingu v intervalu 13 dní.



Obr. 24: Indukce senescence u KBZP ozářených dávkou 20 Gy.

Buňky byly ozářeny dávkou 20 Gy v komůrkách a histochemicky byla stanovena aktivita SA β -galaktosidasy po 13 dnech.



Obr. 25: Indukce senescence u KBPL ozářených dávkou 20 Gy.

Buňky byly ozářeny dávkou 20 Gy v komůrkách a histochemicky byla stanovena aktivita SA β -galaktosidasy po 13 dnech.

5 SHRnutí NEJDůLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ

5.1 WI-38

- IR způsobuje změny ve viabilitě a proliferaci buněk – dávka 2 Gy inhibovala proliferační schopnost buněk pouze po dobu 3 dní, buňky přežívaly a po 3 dnech začaly znovu proliferovat, dávky 6 a 20 Gy způsobily pokles v počtu živých buněk jak po 6 (84 % po 6 Gy, 76 % po 20 Gy), tak po 13 dnech (66 % po 6 Gy, 56 % po 20 Gy)
- po 6 dnech IR mírně indukuje apoptózu (10,8 % po 2 Gy, 14,4 % po 6 Gy a 10,3 % po 20 Gy; kontrola 7,6 %)
- po 6 dnech je mírně zvýšena aktivita kaspas 3/7, 8 a 9 po ozáření dávkami 6 a 20 Gy
- ozáření dávkami 6 a 20 Gy způsobuje zástavu v G2 fázi buněčného cyklu už od prvního dne, počet buněk v G2 bloku klesá v čase (40 % resp. 42 % 1. den, 30 % resp. 36 % 3. den, 11 % resp. 28 % 6. den; kontrola 19 %)
- IR způsobuje upregulaci proteinu p53 s maximální expresí za 4 hodiny po IR, pokles za 1 den, zvýšení 3. den a dále pokles v čase; po 4 hodinách také fosforylace p53 na serinu 15 a 392
- IR způsobuje zvýšenou expresi proteinu p21 po 1 a 3 dnech
- v buňkách ozářených 20 Gy se v jádrech objevují ložiska tvořené histonem γ H2AX odpovídající na poškození DNA
- IR způsobuje zvýšenou expresi proteinu p16 po 13 dnech
- IR způsobuje zvýšenou aktivitu SA- β -galaktosidasy už po prvním dni po ozáření dávkou 20 Gy a její aktivita výrazně roste až do dne 13

5.2 Mesenchymální kmenové buňky kostní dřevě

- IR o dávce 20 Gy nemá signifikantní vliv na viabilitu buněk
- IR o dávce 6 ani 20 Gy nemá signifikantní vliv na aktivaci kaspas 3/7, 8 a 9
- po ozáření buněk 6 a 20 Gy dochází během prvního dne k akumulaci buněk v G2/M fázi (36 % a 35 %, kontrola 12 %)

- 1 den po ozáření dochází k nárůstu množství proteinu p53 a jeho fosforylacím na serinech 15 a 392, které přetrvávají až do 6. dne
- IR indukuje expresi proteinu p21 s maximem po 1 dni
- v momentě, kdy začíná ubývat množství proteinu p21, objevuje se protein p16 (6. den, maximum 13. den)
- ozářením buněk dávkou 20 Gy vzrůstá aktivita SA- β -galaktosidasy už 3 dny po ozáření s dalším zvýšením po 6 a 13 dnech, dochází ke změnám v morfologii buněk

5.3 Mesenchymální kmenové buňky zubní pulpy a periodontálního ligamenta

- IR o dávce 20 Gy nemá signifikantní vliv na viabilitu buněk
- IR o dávce 6 ani 20 Gy nemá signifikantní vliv na aktivaci kaspas 3/7, 8 a 9
- ozáření buněk dávkou 20 Gy vede k masivní fragmentaci DNA a tvorbě dvojitých zlomů, po 1 hodině po ozáření dochází k signifikantnímu nárůstu počtu γ H2AX ložisek a k fosforylaci tohoto histonu (77 % u KBZP, 85 % u KBPL); většina dvojitých zlomů je za 24 hodin opravena (8 % u KBZP, 4 % u KBPL)
- KU55933 inhibuje fosforylaci γ H2AX jak u KBZP, tak u KBPL
- během prvního dne dochází po dávkách 6 a 20 Gy jak u KBZP tak u KBPL k akumulaci buněk v G2/M fázi (41 % a 45 % u KBZP, 46 % a 62 % u KBPL) a tato zástava přetrvává až do 13. dne po ozáření; u buněk ovlivněných inhibitorem ATM kinasy dochází ke G2 bloku také (47 % a 44 % u KBZP, 68 % a 65 % u KBPL)
- IR způsobuje signifikantní upregulaci ATM kinasy a její fosforylaci na serinu 1981
- IR způsobuje signifikantní upregulaci proteinu p53, změny jsou doprovázeny fosforylací na serinu 15 a 392
- po ozáření dávkami 2 a 20 Gy dochází ke změnám v množství kontrolních kinas Chk1 a Chk2 a jejich fosforylovaných forem – Chk1 na serinu 345, Chk2 na threoninu 68
- po inhibici ATM kinasy nedochází jak k fosforylaci proteinu p53, tak ani k fosforylacím kinas Chk1 a Chk2

- po ozáření dochází ke zvýšení exprese proteinu p21 už po 4 hodinách, s maximem po 1 dni
- jakmile dochází ke snížení exprese proteinu p21, nastává zvýšení proteinu p16
- ozářením buněk dávkou 20 Gy vzrůstá aktivita SA- β -galaktosidasy už 3 dny po ozáření s dalším zvýšením po 6 a 13 dnech, dochází ke změnám v morfologii buněk

6 Diskuse

Buněčná odpověď na poškození způsobené ionizujícím zářením závisí na typu buňky a na schopnosti toto poškození opravit. U lidských kožních fibroblastů ozářených dávkou 6 Gy je indukce apoptózy minimální, ale v jádře přetrvávají ložiska spojená s poškozením DNA po dobu 48 hodin, buňka je v zástavě buněčného cyklu, přednostně v G1 fázi a ztrácí schopnost proliferovat (Toussaint et al. 2000; Tsuboi et al. 2007). V jiném případě, u leukemické linie MOLT-4, buňky po 48 hodinách po ozáření umírají apoptózou, ale 80 % buněk, které přežívají, opravují poškození DNA a neobsahují ložiska spojená s DNA poškozením (Řezáčová et al. 2008).

Tkáňová homeostáza závisí na rovnováze mezi proliferací buněk, senescencí a buněčnou smrtí. Jedna z nejdůležitějších cest odpovědi eukaryotických buněk na dvojité zlomy DNA způsobené ionizujícím zářením je fosforylace ATM kinasy a fosforylace a upregulace proteinu p53. Poškození způsobené ionizujícím zářením zastavuje buněčný cyklus v G1/S nebo G2/M fázi. Tím je buňkám umožněna oprava poškození DNA, hlavně jejich dvojitých zlomů, které mohou být letální. Pokud je oprava neúspěšná, buňky jsou odstraněny většinou cestou apoptózy. U některých buněk dochází k trvalé zástavě buněčného cyklu, tyto buňky ztrácejí proliferací potenciál – tento stav je znám jako předčasná senescence.

Protein p53 je klíčovým tumor supresorovým proteinem, který se účastní obou zmíněných procesů – indukce apoptózy a stresem indukované předčasné senescence. Rozhodnutí, který z těchto procesů vyhraje v odpovědi na stres je multifaktoriální proces. Závisí to jak na typu buněk, proliferací aktivitě, stavu proteinu p53, tak také na schopnosti upregulovat Cdk inhibitor p16.

U některých typů buněk, jako jsou fibroblasty, poškození DNA (indukováno např. ionizujícím zářením) vede k předčasné senescenci indukované stresem. Buňky v SIPS vykazují všechny charakteristiky jako buňky vyskytující se v replikativní senescenci; pozitivitu β -galaktosidasy, akumulaci proteinu p21^{Cip1/Waf1} a hypofosforylaci pRb. SIPS je pravděpodobně indukována zástavou buněčného cyklu cestou závislou na proteinu p53 (Toussaint et al., 2000). Tato cesta se zdá být aktivována prostřednictvím ATM kinasy, fosforylací H2AX, tvorby γ H2AX ložisek a ztráty telomerické DNA (von Zglinicki, 2002).

Lidské embryonální diploidní fibroblasty jsou často používanou buněčnou linií pro studium buněčné senescence (např. Lawless et al. 2010 pracoval s buněčnou linií MRC-5, Raffetto et al. 2001 použil WI-38). WI-38 v časných pasážích odpovídají na subcytotoxické dávky UVB záření (Straface et al. 2007) a také na busulfan – alkylační látku poškozující DNA (Probin et al. 2006), spuštěním stresem-indukované předčasné senescence.

Linie WI-38 jsou buňky embryonálních plicních fibroblastů a jejich odpověď na ozáření se od kožních fibroblastů značně liší. Buňky WI-38 vykazovaly po ozáření sníženou viabilitu a slabou indukci apoptózy, ale více než polovina buněk přežila ozáření dávkou 20 Gy. Analýzou buněčného cyklu jsme zjistili signifikantní množství buněk v G2 bloku buněčného cyklu (téměř 40 % 1. den a 30 % 3. den). Naše výsledky jsou v souladu s prací Filiona a sp., který zjistil, že lidské embryonální kmenové buňky postrádají restriční bod v G1 fázi. Tyto výsledky jsou zcela rozdílné od odpovědí pozorovaných u běžných somatických buněk (Filion et al. 2009).

Analýza indukce apoptózy prokázala, že v buňkách nedocházelo ke spuštění apoptózy až do 6. dne, kdy byl pozorován slabý nárůst buněk vstupujících do apoptózy (10 % po 2 Gy, 14.5 % po 6 Gy a 10 % po 20 Gy). Tyto výsledky jsou v souladu se slabým zvýšením aktivity kaspas 3/7, 8 a 9 šestý den po ozáření. V našich předchozích studiích (Řezáčová et al. 2008) jsme popsali, že typickou odpovědí proliferujících somatických buněk na masivní poškození DNA způsobené vysokými dávkami ionizujícího záření je indukce apoptózy. Na základě těchto výsledků jsme leukemickou buněčnou linií MOLT-4 použili jako pozitivní kontrolu, kde všechny buňky po ozáření dávkou 3 Gy umíraly apoptózou do 24 hodin po ozáření. Ve srovnání s touto leukemickou linií, nárůst v aktivitě kaspas u linie WI-38 nebyl tak výrazný (aktivita kaspas u MOLT-4 je ve srovnání s WI-38 přibližně 10 krát vyšší).

Ukázali jsme, že protein p53 je u WI-38 v odpovědi na ionizující záření rychle aktivován a fosforylován na serinech 15 a 392. První odpovědí buněk na ionizující záření je autofosforylace ATM kinasy, která pak fosforyluje protein p53 právě v místě, kde je vázán na mdm2, nejčastěji na serinu 15. Tím je snížena afinita proteinu p53 k mdm2 a p53 není degradován. Fosforylace na serinu 392 zvyšuje asociační konstantu pro tvorbu tetrameru a podporuje interakci se specifickou sekvencí DNA (Canman et al. 1998).

Jedním z cílů proteinu p53 je gen kódující protein p21^{Cip1/Waf1} – CDKN1A. Tento protein patří do rodiny Cdk2 a Cdk4 inhibitorů a způsobuje zástavu buněčného cyklu. Zjistili jsme, že zvýšení proteinu p53 následuje zvýšení proteinu p21^{Cip1/Waf1}, což je typickou odpovědí buněk na genotoxický stress (Ju et al. 2007).

Co se děje s buňkami WI-38, které přežily ozáření? V naší práci jsme zaznamenali zvýšenou expresi proteinu p16^{INK4a} u buněk 13 dní po ozáření dávkou 20 Gy. Tumor supresorový protein p16^{INK4a} je klíčovým proteinem pro navození senescence (Suzuki and Boothman 2008). Ionizujícím zářením navozená senescence souvisí s expresí p16^{INK4a} a po poškození DNA chrání tento protein buňky před vstupem do apoptózy (Mirzayans *et al.* 2009). Protein p16^{INK4a} inhibuje aktivitu Cdk4 a Cdk6 kinas a způsobuje hypofosforylaci proteinu Rb. Pokud je Rb protein v hypofosforylovaném stavu, je plně aktivní a může blokovat průběh buněčného cyklu interakcí s E2F (Delston a Harbour 2006).

Jedním z dalších známých znaků senescence je přítomnost SA-ložisek souvisejících s poškozením DNA. Tato ložiska obsahují proteiny, které jsou spojovány s rozpoznáním a opravou DNA, jako je fosforylovaný histon H2AX - γ H2AX (Campisi *et al.* 2007) v jádře. Imunofluorescenčním barvením γ H2AX jsme zaznamenali tato ložiska v jádrech WI-38 buněk 13 dní po ozáření dávkou 20 Gy. Dalším důležitým znakem senescence je zvýšená aktivita β -galaktosidasy (Eriksson a Stigbrand 2010). Detekovali jsme zvýšenou aktivitu tohoto enzymu od prvního dne po ozáření s maximem po 13 dnech. Existuje více studií s podobnými výsledky. Suzuki et al. 2008 pozorovali zvýšenou aktivitu SA- β -galaktosidasy 3 dny po ozáření dávkou 4 Gy u lidských diploidních buněk. Ozáření dávkou 2,5 – 15 Gy způsobilo zvýšení aktivity SA- β -galaktosidasy po 10 dnech také u mesenchymálních kmenových buněk (Serakinci et al. 2007). Z našich výsledků lze shrnout, že buňky WI-38 po ozáření dávkou 20 Gy vstupují do stresem indukované předčasné senescence.

Naše studie poukazuje na dva různé typy odpovědí embryonálních diploidních fibroblastů WI-38 na ionizující záření. V buňkách je aktivován protein p53, je zvýšená exprese proteinu p21^{Cip1/Waf1} a buňky jsou v zástavě buněčného cyklu v G2 fázi. Některé buňky umírají apoptózou, ale přežívající buňky mají zvýšený protein p16, vyskytují se SA-ložiska odpovídající na DNA poškození a je

zvýšená aktivita SA- β -galaktosidasy, což indikuje stresem indukovanou předčasnou senescence.

Mesenchymální kmenové buňky zubní pulpy a periodontálního ligamenta jsou dnes slibným zdrojem kmenových buněk pro svoji snadnou dostupnost. Tyto buňky jsou získávány s vysokou efektivitou, mají velkou schopnost diferencovat se do různých buněčných linií a jejich interakce s biomateriály z nich činí ideální zdroj pro rekonstrukci tkání (Aquino et al. 2008, Estrela et al. 2011, Gay et al. 2007).

KBZP mají schopnost tvořit dentin a přidruženou tkáň zubní pulpy *in vivo*. Buňky podobné stromálním buňkám byly získány z transplantovaných primárních KBZP a retransplantovány do imunokompromitovaných myší, aby tvořily tkáň podobnou dentinu a aby byla prokázána jejich schopnost sebeobnovy. Bylo také zjištěno, že KBZP jsou schopny diferencovat se do adipocytů a neurálních buněk. KBZP jsou tedy buňky se stejnými vlastnostmi, jako je schopnost sebeobnovy a schopnost diferencovat se do široké škály buněčných linií, které nalézáme u kmenových buněk (Gronthos et al. 2002).

Aktivace a fosforylace proteinu p53 v hematopoetických buňkách (jako jsou periferní krevní lymfocyty nebo leukemické buněčné linie) vede během 24 hodin k apoptóze. Apoptóza je také navozena po ozáření hematopoetických kmenových buněk (Meng et al. 2003, Vávrová et al. 2002). Mesenchymální kmenové buňky ale reagují jinak. Z doposud známých studií vyplývá poměrně vysoká rezistence MKB ke spuštění apoptózy v odpovědi na ionizující záření (Chen et al. 2006, Schönmeyr et al. 2007). Také v naší práci jsme nepozorovali zvýšení aktivity kaspas ani fragmentaci DNA. Namísto toho jsme zaznamenali permanentní zástavu buněčného cyklu a známky stresem indukované předčasné senescence.

V naší práci jsme zjistili, že u MKB izolovaných z kostní dřeně, zubní pulpy i periodontálního ligamenta v reakci na IR je rychle upregulován protein p53, zvýšené množství tohoto proteinu jsme zachytili už od prvního dne po ozáření, stejně jako jeho fosforylace na serinech 15 a 392. Poškození DNA, které je způsobeno IR, vyvolává u MKB nárůst v množství proteinu p53, následovaný nárůstem množství proteinu p21^{Cip1/Waf1}. Zvýšení množství proteinu p21^{Cip1/Waf1} pozorujeme už od prvního dne po ozáření, dosahuje maxima 3 dny po ozáření a přetrvává až do šestého dne. Tato aktivace kaskády p53-p21 však nezpůsobuje zástavu buněčného cyklu v G1/S, ale v G2 fázi a objevuje se už od 1. dne po

ozáření. Upregulace proteinu p21^{Cip1/Waf1} byla slabší u KBPL ve srovnání s MKB kostní dřeně. Transkripční aktivace genu CDKN1A po poškození DNA je obvykle spojena s regulací přechodů G0/G1 a G1/S buněčného cyklu (Harper et al. 1993). Zjistili jsme, že MKB všech našich studovaných linií se v G0/G1 nekumulují, ale jsou přednostně zastavovány v G2 fázi buněčného cyklu v odpovědi na IR. Množství buněk zablokovaných v G2 fázi a také doba trvání této zástavy bylo závislé na dávce. Tyto výsledky se shodují s publikovanými výsledky Schönmeyra a sp., kteří studovali MKB z kostní dřeně. Popsali, že ozáření dávkou 7 a 12 Gy způsobuje signifikantní zástavu v G2 fázi, která přetrvává nejméně po dobu 3 dnů po ozáření dávkou 7 Gy a po dobu 7 dnů po ozáření dávkou 12 Gy (Schönmeyr et al. 2007). Stejná zástava byla pozorována u ozářených lidských embryonálních kmenových buněk (Filion et al. 2009). Naopak výsledky Chena a sp. ukazují, že ozáření MKB kostní dřeně dávkou 9 Gy po 36 hodinách indukuje jak G1, tak G2 zástavu buněčného cyklu (Chen et al. 2006). Role proteinu p21^{Cip1/Waf1} v indukci zástavy v G2 fázi spočívá v jejím navození, ale udržení zástavy v senescentních buňkách je zprostředkováno působením proteinu p16 (Shay and Roninson 2004).

Typickou odpovědí proliferujících somatických buněk na masivní poškození DNA ionizujícím zářením je indukce apoptózy. U MKB však nebyl pozorován žádný pokles ve viabilitě buněk ani indukce apoptózy po ozáření až do dávky 20 Gy. Proliferační schopnost buněk však byla snížena po ozáření buněk dávkou 20 Gy a zástava buněčného cyklu se zdá být trvalá. Namísto apoptózy jsme však zaznamenali známky stresem indukované předčasné senescence, jako je zvýšení regulátoru buněčného cyklu proteinu p16 a zvýšení aktivity β -galaktosidasy, které se začíná objevovat od 3. dne po ozáření. Tato data jsou v souladu s výsledky práce Serakinci et al. 2007, který také popsal senescenci jako hlavní odpověď mesenchymálních kmenových buněk kostní dřeně na poškození DNA.

Zjistili jsme zvýšenou expresi proteinu p16, 6 a 13 dní po ozáření. Zvýšení tohoto proteinu následuje po nárůstu exprese proteinu p21^{Cip1/Waf1} u všech linií MKB. Zvýšení cyklin-dependentních kinasových inhibitorů mělo za následek detekovatelnou hypofosforylaci retinoblastomového proteinu (pRb) 13 dní po ozáření. Protein Rb je klíčovým regulátorem vstupu savčích buněk do buněčného cyklu. Hypofosforylovaný pRb umožňuje přechod z G1 fáze do S fáze z důvodu proliferace buněk (Guo et al. 2005). Expozice buněk gama záření inhibuje

fosforylaci pRb na místě specifickém pro cyklin-dependentní kinasu 2 v závislosti na proteinu p21^{Cip1/Waf1} (Brugarolas et al. 1999).

Zdá se být jednoznačné, že vysoké dávky IR (20 Gy) indukují buněčnou smrt pouze u malého procenta populace MKB. Ozářené MKB z kostní dřeně ztrácejí schopnost proliferovat (Chen et al. 2006, Schönmeyr et al. 2007), stejně jako KBZP a KBPL, jak bylo zjištěno v naší studii. Naše práce ukazuje, že navzdory ztrátě schopnosti buněk proliferovat, buňky neumírají. U přežívajících buněk přetrvávají zbytky poškozené DNA po ozáření dávkami 6 a 20 Gy a aktivují se mechanismy vedoucí ke stresem-indukované předčasné senescenci (SIPS). Dosavadní výsledky studií týkající se detekování indukce senescence u ozářených MKB jsou sporné. Schönmeyr et al. (2008) popisuje nárůst aktivity SA- β -galaktosidasy u MKB z kostní dřeně po 3 a 7 dnech po IR dávkami 7 a 12 Gy. Naopak Chen et al. (2006) nepozorovali nárůst SA- β -galaktosidasy u MKB z kostní dřeně ozářených dávkou 9 Gy 5 dní po IR. V naší práci jsme zaznamenali aktivaci SA- β -galaktosidasy u všech linií MKB po ozáření dávkou 20 Gy 3-13 dní po IR. Podobné výsledky byly popsány u jiných buněčných linií. Mesenchymální buňky epitelu – lidské buňky karcinomu plic (Suzuki et al. 2001), lidské buňky karcinomu prsu (Jones et al. 2005) a embryonální fibroblasty (Suzuki et al. 2006) reagují na ozáření indukcí SIPS. U těchto buněk dochází k aktivaci typických kaskád (ATM – p53 – p21), které odpovídají na poškození, upregulaci proteinu p16, změnám v proteinové expresi, morfologickým i funkčním změnám buněk. Je všeobecně známo, že senescentní buňky mají nevratně zastaveno buněčné dělení, ale jsou stále schopny zastávat mnohé další funkce (Ben-Porath and Weinberg 2005, Toussaint et al. 2000).

U žádné z našich studovaných buněčných linií jsme nepozorovali změny v aktivitě kaspas nebo pokles viability buněk po ozáření, což bylo potvrzeno barvením buněk trypanovou modří. Na druhou stranu byly nalezeny znaky SIPS: prodloužená upregulace proteinu p53, zvýšení regulátoru buněčného cyklu proteinu p16, zvýšená aktivita SA- β -galaktosidasy a morfologické změny – ozářené buňky se protahují, zplošťují a cytoplasma se stává granulární s četnými inkluzemi. Ačkoli buňky zůstávají “živé”, přetrvávají v bloku buněčného cyklu. Stejná reakce na ozáření byla pozorována u všech tří buněčných linií MKB. Senescence ozářených MKB kostní dřeně byla popsána a publikována Schönmeylem a sp. Po 3 a 7 dnech po ozáření pozorovali dávkovou závislost

aktivace senescence. Indukce senescence byla statisticky signifikantní po ozáření dávkou 12 Gy (Schönmeyr et al. 2007).

Dalším krokem naší práce bylo zjistit, co se děje v buňkách po ozáření v krátkém časovém intervalu a jak je reakce na IR ovlivněna inhibicí ATM kinasy specifickým inhibitorem KU55933.

Citlivým markerem dvojitých zlomů DNA vznikajících po ozáření je rychlá fosforylace histonu H2AX na serinu 139 (Sak et Stuschke 2010, Kao et al. 2006). Zjistili jsme, že velké procento buněk KBZP a KBPL vykazuje zvýšené množství γ H2AX fluorescenční intenzity po 1 hodině po ozáření dávkou 20 Gy (77 % u KBZP, 85 % u KBPL). Po 24 hodinách byla intenzita výrazně snížena, zůstalo pouze 8 % pozitivních KBZP a 4 % KBPL. Tato tendence nebyla pozorována u buněk ovlivněných inhibitorem KU55933. Naše výsledky ukazují, že KU55933 brání fosforylaci histonu H2AX na serinu 139. Výsledky z průtokové cytometrie byly potvrzeny imunocytochemií, kde jediný nárůst γ H2AX ložisek byl pozorován 1 hodinu po ozáření dávkou 20 Gy u buněk neovlivněných inhibitorem KU55933.

V odpovědi na dvojitě zlomy DNA jsou zapojeny tři druhy kinas – DNA-PK, ATM a ATR. Bylo zjištěno, že hlavní kinasou ovlivňující histon H2AX po ozáření je ATM kinasa, ne DNA-PK (Burma et al. 2001). Stiff a sp. popsali, že DNA-PK hraje redundantní roli po ATM kinase ve fosforylaci H2AX po ozáření (Stiff et al. 2004). Dokázali jsme, že ATM kinasa je aktivována 1 hodinu po ozáření a její aktivace se nemění ani za 24 hodin. ATM kinasa byla fosforylována na serinu 1981 po 1 a 24 hodinách, zatímco jsme nepozorovali žádnou aktivaci u buněk ovlivněných inhibitorem KU55933. Aktivace ATM po poškození DNA způsobuje fosforylaci dalších efektorů jako je Chk2 – fosforylace na threoninu 68 a p53 – fosforylace na serinu 15 (Momčilovič et al. 2009, Hickson et al. 2004). Žádný z těchto proteinů není aktivován u A-T buněčných linií (Stiff et al. 2004). Naše výsledky se s těmito tvrzeními shodují. Protein p53 je aktivován v odpovědi na IR, jeho množství se zvyšuje 1 i 24 hodin po ozáření dávkou 20 Gy ať už po ovlivnění inhibitorem KU55933 nebo bez něj. Na druhou stranu ale jeho fosforylaci na serinu 15 jsme pozorovali pouze u ozářených buněk bez inkubace s KU55933.

Fosforylace Chk2 kinasy na threoninu 68 byla nejvyšší 1 hodinu po ozáření dávkou

2 Gy a 24 hodin po ozáření dávkou 20 Gy. Celkové množství Chk2 bylo slabě zvýšeno po ozáření. Pouze mírný vzestup množství fosforylovaného Chk2 na threoninu 68 jsme pozorovali u buněk po inkubaci s KU55933 po ozáření 20 Gy a to po 1 hodině. Zatímco ATM-Chk2 cesta odpovídá primárně na ionizující záření, cesta ATR-Chk1 je indukována především jednoduchými zlomy DNA (Reinhardt and Yaffe 2009). Zaznamenali jsme nárůst exprese Chk1 a mírný nárůst fosforylace na serinu 345 1 hodinu po ozáření dávkou 20 Gy v buňkách neovlivněných KU55933. Může to být způsobeno DNA poškozením nebo také zástavou replikace DNA (Uto et al. 2004).

7 Závěr

Naše práce ukazuje na rozdíly mezi odpovědí lidských embryonálních diploidních fibroblastů, dospělých mesenchymálních kmenových buněk izolovaných z kostní dřeně, zubní pulpy a periodontálního ligamenta a somatických buněk na poškození DNA. Typickou odpovědí proliferujících somatických buněk na masivní poškození DNA způsobené vysokými dávkami ionizujícího záření je indukce apoptózy.

Embryonální diploidní fibroblasty linie WI-38 reagují na IR dvěma různými způsoby. V buňkách je aktivován protein p53, zvyšuje se množství proteinu p21^{Cip1/Waf1} a buňky jsou zastaveny v G2 fázi buněčného cyklu. Některé buňky umírají apoptózou, ale u přežívajících buněk se zvyšuje množství proteinu p16, tvoří se ložiska, odpovídající na poškození DNA a vzrůstá aktivita SA- β -galaktosidasy, což ukazuje na vstup buněk do stresem indukované předčasné senescence.

Mesenchymální kmenové buňky však reagují úplně jinak než somatické proliferující buňky. Zjistili jsme, že tyto kmenové buňky v odpovědi na IR postrádají G1 kontrolní bod a jsou většinou zastaveny v G2 fázi buněčného cyklu. Většina buněk ať z kostní dřeně, zubní pulpy nebo periodontálního ligamenta aktivovala protein p53 a p21^{Cip1/Waf1}. Apoptóza byla ale indukována pouze u nepatrného počtu buněk. U většiny buněk byla navozena předčasná senescence. Senescentní buňky přežívají, ale mají zastavený buněčný cyklus (většinou v G2 fázi) a dochází k aktivaci kaskád odpovídajících na poškození DNA (jako je ATM-p53-p21), upregulaci p16, zvýšení aktivity SA- β -galaktosidasy a typickým morfologickým změnám.

V časných intervalech po ozáření byl v buňkách fosforylován histon H2AX, který slouží jako marker přítomnosti dvojitých zlomů DNA. U většiny buněk bylo poškození DNA opraveno. Byly také aktivovány a fosforylovány kontrolní kinasy Chk1 a Chk2. Po inhibici ATM kinasy byla fosforylace Chk1 a Chk2 zablokována. Na rozdíl od neinhibovaných buněk nebyl fosforylován ani histon H2AX, ani protein p53.

8 Použitá literatura

AQUINO, R., PAPCCIO, G., LAINO, G., GRAZIANO, A. Dental pulp stem cells: A promising tool for bone regeneration. *Stem Cells Reviews*, 2008, vol. 4, s. 21 – 26.

ASADA, M., YAMADA, T., ICHIJO, H., DELIA, D., MIYAZONO, K., FUKUMURO, K., MIZUTANI, S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO Journal*, 1999, vol. 18, no. 5, s. 1223–1234.

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

BEN-PORATH, I., WEINBERG, R.A. The signals and pathways activating cellular senescence. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005, vol. 37, no. 5, s. 961-976.

BRUGAROLAS, J., MOBERG, K., BOYD, S.D. Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after γ -radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, vol. 96, no. 3, s. 1002-1007.

BURMA, S., KURIMASA, A., XIE, G., TAYA, Y., ARAKI, R., ABE, M., CRISSMAN, H.A., OUYANG, H., LI, G.C., CHEN, D.J. DNA-dependent protein kinase-independent activation of p53 in response to DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, vol. 274, no. 24, s. 17139-43.

CAMPISI, J., D'ADDA, D.I., FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, vol. 8, no. 9, s. 729-40.

CANMAN, C.E., LIM, D.S., CIMPRICH, K.A., TAYA, Y., TAMAI, K., SAKAGUCHI, K., APPELLA, E., KASTAN, M., SILICIANO, J.D. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 1998, vol. 281, no. 5383, s. 1677 – 9.

CAZZALINI, O., SCOVASSI, A.I., SAVIO, M., STIVALA, L.A., PROSPERI, E. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutation Research*, 2010, vol. 704, no. 1-3, s. 12–20.

CMIELOVA, J., HAVELEK, R., JIROUTOVA, A., KOHLEROVA, R., SEIFRTOVA, M., MUTHNA, D., VAVROVA, J., REZACOVA, M. 2011. DNA damage caused by ionizing radiation in embryonic diploid fibroblasts WI-38 induces both apoptosis and senescence. *Physiological Research*, 2011, vol. 60, no. 4, s. 667 - 77.

COLEMAN, M.L., DENSHAM, R.M., CROFT, D.R., OLSON, M.F. Stability of p21Waf1/ Cip1 CDK inhibitor protein is responsive to RhoA-mediated regulation of the actin cytoskeleton. *Oncogene*, 2006, vol. 25, no. 19, s. 2708–2716.

COLLADO, M., BLASCO, M.A., SERRANO, M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, 2007, vol. 130, no. 2, s. 223 – 233.

COQUERET, O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: A function for each cell compartment? *Trends in Cell Biology*, 2003, vol. 13, no. 2, s. 65–70.

DELSTON, R.B., HARBOUR, J.W. Rb at the interface between cell cycle and apoptotic decisions. *Current Molecular Medicine*, 2006, vol. 6, no. 7, s. 713-8.

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.

ERIKSSON, D., STIGBRAND, T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumor Biology*, 2010, vol. 31, no. 4, s. 363-372.

ESTRELA, C., ALENCAR, A.H., KITTEN, G.T., VENCIO, E.F., GAVA, E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Brazilian Dental Journal*, 2011, vol. 22, no. 2, s. 91-8.

FILION, T.M., QIAO, M., GHULE, P.N., MANDEVILLE, M., VAN 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 Cell Physiology*, 2009, vol. 220, no. 3, s. 586 - 92.

FRIESNER, J.D., LIU, B., CULLIGAN, K., BRITT, A.B. Ionizing radiation-dependent gamma-H2AX focus formation requires ataxia telangiectasia mutated and ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, vol. 16, no. 5, s. 2566-76.

GARNER, E., RAJ, K. Protective mechanisms of p53-p21-pRb proteins against DNA damage-induced cell death. *Cell Cycle*, 2008, vol. 7, no. 3, s. 277–282.

GARTEL, A.L., TYNER, A.L. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/ CIP1)) gene. *Experimental Cell Research*, 1999, vol. 246, no. 2, s. 280 – 9.

GAY, I.C., CHEN, S., MACDOUGALL, M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 2007, vol. 10, no. 3, s. 149-160.

GRONTHOS, S., MANKANI, M., BRAHIM, J., ROBEY, P.G., SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 2000, vol. 97, no. 25, s. 13625-30.

GRONTHOS, S., ZANNETTINO, A.C., HAY, S.J., SHI, S., GRAVES, S.E., KORTESIDIS, A., SIMMONS, P.J. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of Cell Science*, 2003, vol. 116, no. 9, s. 1827-35.

GUO, J., SHENG, G., WARNER, B.W. Epidermal growth factor-induced rapid retinoblastoma phosphorylation at Ser780 and Ser795 is mediated by ERK1/2 in small

intestine epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no. 43, s. 35992-35998.

HARPER, J.W., ADAMI, G.R., WEI, N., KEYOMARSI, K., ELLEDGE, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 1993, vol. 75, no. 4, s. 805-816.

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. 9152-9.

HUANG, X., DARZYNKIEWICZ, Z. Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage. *Methods of Molecular Biology*, 2006, vol. 314, s. 73-80.

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*, 2006, vol. 66, no. 1, s. 244 – 53.

CHILD, E.S., MANN, D.J. The intricacies of p21 phosphorylation: Protein/ protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle*, 2006, vol. 5, no. 12, s. 1313– 1319.

JONES, K.R., ELMORE, L.W., JACKSON-COOK, C., DEMASTERS, G., POVIRK, L.F., HOLT, S.E., GEWIRTZ, D.A. p53-Dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells. *International Journal of Radiation Biology*, 2005, vol. 81, no. 6, s. 445-458.

JU, Z., CHOUDHURY, A.R., RUDOLPH, K.L. A dual role of p21 in stem cell aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, vol. 1100, s. 333 – 344.

KAO, J., MILANO, M.T., JAVAHERI, A., GAROFALO, M.C., CHMURA, S.J., WEICHSELBAUM, R.R., KRON, S.J. gamma-H2AX as a therapeutic target for improving the efficacy of radiation therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 2006, vol. 6, no. 3, s. 197-205.

KASSEM, M., KRISTIENSEN, M., ABDALLAH, B.M. Mesenchymal stem cells: Cell biology and potential use in therapy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2004, vol. 95, no. 5, s. 209-214.

KHANA, K., JACKSON, SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature genetics*, 2001, vol. 27, no. 3, s. 247–253.

LAWLESS, C., WANG, C., JURK, D., MERZ, A., ZGLINICKI, T., PASSOS, J.F. Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Experimental Gerontology*, 2010, vol. 45, no. 10, s. 772 - 8.

LEE, J.Y., KIM, H.S., KIM, J.Y., SOHN, J. Nuclear translocation of p21(WAF1/CIP1) protein prior to its cytosolic degradation by UV enhances DNA repair and survival. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, vol. 390, no. 4, s. 1361–1366.

LI, R., HANNON, G.J., BEACH, D., STILLMAN, B.. Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. *Current Biology*, 1996, vol. 6, no. 2, s. 189–199.

Li, H., Xie, B., Rahmeh, A., Zhou, Y., Lee, M.Y.W.T. Direct interaction of p21 with p50, the small subunit of human DNA polymerase delta. *Cell Cycle*, 2006, vol. 5, no. 4, s. 428–436.

LJUNGMAN, M. Dial 9-1-1 for p53: Mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia*, 2000, vol. 2, no. 3, s. 208 – 225.

MENG, A., WANG, Y., ZANT, G.V., ET, A.L. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. *Cancer Research*, 2003, vol. 63, no. 17, s. 5414-5419.

MIRZAYANS, R., ANDRAIS, B., SCOTT, A., PATERSON, M.C., MURRAY, D. Single-cell analysis of p16^{INK4a} and p21^{WAF1} expression suggests distinct mechanisms of senescence in normal human and Li-Fraumeni Syndrome fibroblasts. *Journal of Cell Physiology*, 2010, vol. 223, no. 1, s. 57 - 67.

MOMČILOVIĆ, O., CHOI, S., VARUM, S., BAKKENIST, C., SCHATTEN, G., NAVARA, C. Ionizing radiation induces Ataxia Telangiectasia mutated-dependent checkpoint signaling and G2 but not G1 cell cycle arrest in pluripotent human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2009, vol. 27, no. 8, s. 1822-1835.

MUTHNA, D., SOUKUP, T., VAVROVA, 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 - 62.

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. 629-43.

POEHLMANN, A., ROESSNER, A. Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. *Pathology Research and Practice*, 2010, vol. 206, no. 9, s. 591-601.

PRIVES, C., GOTTIFREDI, V. The p21 and PCNA partnership: A new twist for an old plot. *Cell Cycle*, 2008, vol. 7, no. 24, s. 3840–3846.

PROBIN, V., WANG, Y., BAI, A., ZHOU, D. Busulfan selectively induces cellular senescence but not apoptosis in WI38 fibroblasts via a p53-independent but extracellular signal-regulated kinase-p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2006, vol. 319, no. 2, s. 551-60.

PROBIN, V., WANG, Y., ZHOU, D. Busulfan-induced senescence is dependent on ROS production upstream of the MAPK pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, vol. 42, no. 12, s. 1858-1865.

RAFFETTO, J.D., LEVERKUS, M., PARK, H.Y., MENZOIAN, J.O. Synopsis on cellular senescence and apoptosis. *Journal of Vascular Surgery*, 2001, vol. 34, no. 1, s. 173 – 177.

REINHARDT, H.C., YAFFE, M.B. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Current Opinion in Cell Biology*, 2009, vol. 21, no. 2, s. 245-55.

RONINSON, I.B. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Letters*, 2002, vol. 179, no. 1, s. 1-14.

ROSSI, DJ., BRYDER, D., SEITA, J., NUSSENZWEIG, A., HOEIJMAKERS, J., WEISSMAN, I. L. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*, 2007, vol. 447, no. 7145, s. 725–729.

REZACOVA, M., VAVROVA, J., VOKURKOVA, D. Ionizing radiation sensitizes leukemic MOLT-4 cells trail-induced apoptosis. *Acta Medica*, 2008, vol. 51, no. 2, s. 101 – 105.

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

SAK, A., STUSCHKE, M. Use of γ H2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy. *Seminars in Radiation Oncology*, 2010, vol. 20, no. 4, s. 223-31.

SATYANARAYANA, A., HILTON, M.B., KALDIS, P. p21 Inhibits Cdk1 in the absence of Cdk2 to maintain the G1/S phase DNA damage checkpoint. *Molecular Biology of Cell*, 2008, vol. 19, no. 1, s. 65–77.

SERAKINCI, N., CHRISTENSEN, R., GRAAKJAER, J. Ectopically hTERT expressing adult human mesenchymal stem cells are less radiosensitive than their telomerase negative counterpart. *Experimental Cell Research*, 2007, vol. 313, no. 5, s. 1056-1067.

SHAY, J.W., WRIGHT, W.E. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, 2004, vol. 26, no. 5, s. 867 – 874.

SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Reviews Cancer*, 2003, vol. 3, no. 3, s. 155-68.

SCHÖNMEYR, B.H., WONG, A.K., SOARES, M., FERNANDEZ, J., CLAVIN, N., MEHRARA, 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*, 2008, vol. 122, no. 1, s. 64-76.

SOHN, D., ESSMANN, F., SCHULZE-OSTHOFF, K., JANICKE, R.U. p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. *Cancer Research*, 2006, vol. 66, no. 23, s. 11254–11262.

SOLOZOBOVA, V., ROLLETSCHEK, A., BLATTNER, C. NuclearQ6 accumulation and activation of p53 in embryonic stem cells after DNA damage. *BMC Cell Biology*, 2009, vol. 10, s. 46.

SOUKUP, T., MOKRY, J., KARBANOVA, J., PYTLIK, R., SUCHOMEL, P., KUCEROVA, L. Mesenchymal stem cells isolated from the human bone marrow: cultivation, phenotypic analysis and changes in proliferation kinetics. *Acta Medica*, 2006, vol. 49, no. 1, s. 27-33.

STIFF, T., O'DRISCOLL, M., RIEF, N., IWABUCHI, K., LÖBRICH, M., JEGGO, P.A. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Research*, 2004, vol. 64, no. 7, s. 2390-6.

STRAFACCE, E., VONA, R., ASCIONE, B., MATARRESE, P., STRUDTHOFF, T., FRANCONI, F., MALORNI, W. Single exposure of human fibroblasts (WI-38) to a sub-cytotoxic dose of UVB induces premature senescence. *FEBS Letters*, 2007, vol. 581, no. 22, s. 4342 – 4348.

SUZUKI, M., BOOTHMAN, D.A. Stress-induced premature senescence (SIPS). *Journal of Radiation Research*, 2008, vol. 49, no. 2, s. 105 – 112.

SUZUKI, K., MORI, I., NAKAYAMA, Y., MIYAKODA, M., KODAMA, S., WATANABE, M. Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiation Research*, 2001, vol. 155, no. 1, s. 248-253.

TAYLOR, W.R., STARK, G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 2001, vol. 20, no. 15, s. 1803 – 1815.

TICHÝ, A., ZÁSKODOVÁ, D., REZÁCOVÁ, M., VÁVROVÁ, J., VOKURKOVÁ, D., PEJCHAL, J., VILASOVÁ, Z., CERMAN, J., OSTERREICHER, J. Gamma-radiation-induced ATM-dependent signalling in human T-lymphocyte leukemic cells, MOLT-4. *Acta Biochimica Polonica*, 2007, vol. 54, no. 2, s. 281-7.

TOCCI, A., FORTE, L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematology Journal*, 2003, vol. 4, no. 2, s. 92 – 96.

TOUSSAINT, O., MEDRANO, E.E., VON ZGLINICKI T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental Gerontology*, 2000, vol. 35, no. 8, s. 927-45.

TSUBOI, K., MORITAKE, T., TSUCHIDA, Y., TOKUUYE, K., MATSUMURA, A., ANDO, K. Cell cycle checkpoint and apoptosis induction in glioblastoma cells and fibroblasts irradiated with carbon beam. *Journal of Radiation Research (Tokyo)*, 2007, vol. 48, no. 4, s. 317-25.

ULDRIJAN, S., KOTALA, V., VOJTĚŠEK, B. Regulace stability a aktivity nádorového supresoru p53. *Chemické Listy*, 2002, vol. 96, s. 145–149.

UTO, K., INOUE, D., SHIMUTA, K., NAKAJO, N., SAGATA, N. Chk1, but not Chk2, inhibits Cdc25 phosphatases by a novel common mechanism. *EMBO Journal*, 2004, vol. 23, no. 16, s. 3386-96.

VÁVROVÁ, J., VOKURKOVÁ, D., MAREKOVÁ, M. Antiapoptotic cytokine IL-3 + SCF + FLT3L influence on proliferation of gamma-irradiated AC133+/CD34+ progenitor cells. *Folia Biologica (Prague)*, 2002, vol. 48, no. 2, s. 51-57.

VON ZGLINICKI, T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences*, 2002, vol. 27, no. 7, s. 339-344.

WU, J., LU L.Y., YU X. The role of BRCA1 in DNA damage response. *Protein cell*. 2010. vol. 1, no. 2, s. 117-123.

ZHANG J., POWELL S. N. The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair. *Molecular cancer research*. 2005. vol. 3, no. 10, s. 531-539.