

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



Změny vybraných proteinů v reakci na genotoxický stres

Jana Čmielová

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program Lékařská chemie a biochemie

Hradec Králové

2012

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Lékařská chemie a biochemie na Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Jana Čmielová
Ústav lékařské biochemie

Školitel: doc. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D
Ústav lékařské biochemie

Oponenti: jména se všemi tituly včetně uvedení pracoviště

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Lékařská chemie a biochemie xx.xx.xxx v Zasedací místnosti děkanátu LF (1. patro), Šimkova 870, Hradec Králové.

Tato práce vznikla za podpory grantů:
MSM 0021620820
GAČR 304/09/1568

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

.....
Jméno, příjmení, tituly

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská chemie a biochemie

Obsah:

1	SOUHRN	4
2	SUMMARY	4
3	ÚVOD DO PROBLEMATIKY	5
3.1	ATM KINASA A PROTEIN P53	5
3.2	APOPTÓZA	7
3.3	SENESCENCE.....	7
3.4	KMENOVÉ BUŇKY	8
4	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	10
5	MATERIÁL A METODIKY	11
5.1	IZOLACE A KULTIVACE BUNĚK.....	11
5.2	OZAŘOVÁNÍ	11
5.3	OVLIVNĚNÍ BUNĚK INHIBITOREM ATM KINASY	11
5.4	ANALÝZA BUNĚČNÉHO CYKLU	12
5.5	DETEKCE APOPTÓZY	12
5.6	ELEKTROFORÉZA A WESTERN BLOTTING.....	12
5.7	ELISA	12
5.8	IMUNOHISTOCHEMIE.....	12
5.9	DETEKCE H2AX.....	13
6	VÝSLEDKY	14
6.1	REAKCE MESENCHYMÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK ZUBNÍ PULPY NA IONIZUJÍCÍ ZÁŘENÍ.....	14
6.1.1	<i>Detekce fosforylace histonu H2AX</i>	14
6.1.2	<i>Analýza buněčného cyklu</i>	16
6.1.3	<i>Změny v expresi proteinů</i>	16
6.1.4	<i>Proliferace, viabilita a indukce apoptózy u KBZP po ozáření</i>	18
6.1.5	<i>Ionizující záření indukuje zástavu buněčného cyklu u KBZP</i>	19
6.1.6	<i>Protein p53 je u KBZP po ozáření aktivován</i>	19
6.1.7	<i>Ionizující záření indukuje senescenci u KBZP</i>	20
7	SHRNUTÍ NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ	21
7.1	WI-38	21
7.2	MESENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY KOSTNÍ DŘENĚ	21
7.3	MESENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY ZUBNÍ PULPY A PERIODONTÁLNÍHO LIGAMENTA.....	21
8	DISKUSE	23
9	ZÁVĚR	28
10	POUŽITÁ LITERATURA	29
11	PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ	32

1 Souhrn

Mesenchymální kmenové buňky kostní dřeně, zubní pulpy a periodontálního ligamenta jsou buňky s vysokým proliferačním potenciálem a schopností sebeobnovy srovnatelnou s jinými kmenovými buňkami. Vzhledem ke schopnosti diferencovat do různých buněčných typů a poměrně snadné dostupnosti představují slibný nástroj pro využití v buněčné terapii. Na druhou stranu ovšem tyto buňky dlouhodobě přetrvávají v organismu a při poškození jejich genetické výbavy hrozí kumulace buněk s mutovaným genomem. Proto je nutné tyto buňky charakterizovat v podmínkách působení genotoxického stresu. Jedním ze stresorů poškozujících DNA, je ionizující záření, které v buňkách navozuje zástavu buněčného cyklu spojenou s reparací poškození nebo indukcí apoptózy.

Cílem práce je sledovat vliv ionizujícího záření na mesenchymální kmenové buňky kostní dřeně, zubní pulpy a periodontálního ligamenta a odpověď těchto buněk na ionizující záření po inhibici ATM kinasy, která je u somatických buněk považována za klíčovou molekulu signalizující poškození DNA, zejména dvouvláknové zlomy.

Studovali jsme molekulární mechanismy indukce apoptózy a reakce na poškození DNA vyvolané ionizujícím zářením u mesenchymálních kmenových buněk izolovaných z kostní dřeně, zubní pulpy a periodontálního ligamenta. Hlavním výsledkem naší práce je zjištění, že tyto buňky po ozáření neumírají apoptózou, a to ani po vysokých dávkách, ale pouze ztrácejí svou schopnost proliferovat a vstupují do předčasné senescence.

2 Summary

Human mesenchymal stem cells from the bone marrow, the dental pulp and the periodontal ligament are known for their high proliferation potential and the ability of self-renewal comparable to the other stem cells. They represent a promising field in the therapy due to their ability to differentiate into many cell types. On the other hand, these cells persist in the organism for a long time and a damage in their genetic material would result in mutation of cell genome. The characterization of these cells under genotoxic stress is therefore important. Ionizing radiation is one of the powerful DNA-damaging stressors causing cell cycle arrest associated with reparation or apoptosis.

The aim of our work is to study the effect of ionizing radiation on mesenchymal stem cells from the bone marrow, the dental pulp and the periodontal ligament and the response of these cells to ionizing radiation after ATM kinase inhibition. ATM kinase is thought to be a key molecule reflecting DNA damage, especially double strand breaks.

We evaluated molecular mechanisms of the apoptosis induction and the reaction to DNA damage caused by ionizing radiation in mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, dental pulp and periodontal ligament. The main result of our work is that after the irradiation these cells do not die by apoptosis, even after high doses, but only lose their proliferating ability and enter premature senescence.

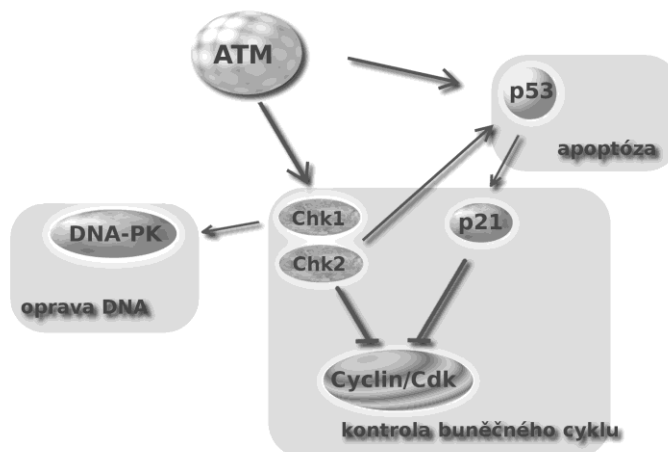
3 Úvod do problematiky

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

3.1 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 vedoucí 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 nejzávažnější poškození a velký zásah do integrity genomu představují dvojité zlomy DNA (Khana and 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 2003, Momčilović 2009), což způsobí disociaci dimeru ATM a jeho aktivaci (Bakkenist and 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

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 2004), ale fosforylovaná může být i Chk1 na serinech 317 a 345. Hlavním mechanismem kontroly buněčného cyklu je regulace aktivity Cdc25 fosfatas právě pomocí kontrolních kinas Chk1 a Chk2 (Reinhardt and 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 and 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 kinasy 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 2010).

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} (Soložobova et al. 2009). Protein p21^{Cip1/Waf1} byl identifikován jako první ze skupiny cyklin-kinasových inhibitorů. Efektivně inhibuje cyklin-dependentní kinasy 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 and Tyner, 1999). 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 and Stark, 2001).

3.2 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, redukci velikosti jádra a ke štěpení internukleosomové DNA. Poté nastává svaštění 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).

3.3 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 zabránuje 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 zabránuje předčasnou 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 předčasně 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 svaloviny 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 and 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.

3.4 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, 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. 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. Buňky s podobnou biologickou charakteristikou jako mesenchymální kmenové 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 krvetvorbu (LT-HSC), které odpovídají na ozáření především indukci senescence, a dále buňky rychle obnovující krvetvorbu (ST-HSC) a buňky progenitorové, které odpovídají na ozáření především indukcí 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 krvetvorbu. Byla také prokázána akumulace γ H2AX ložisek u LT-HSC izolovaných od starých myší (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.

4 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?

5 Materiál a metodiky

5.1 Izolace a kultivace buněk

Byly izolovány 4 linie KB zubní pulpy z extrahovaných třetích molárů získaných od 4 zdravých dárců (3 ženy, 1 muž). Průměrný věk dárců byl 19 let (12-23). Všichni podepsali informovaný souhlas podle požadavků Etické komise lékařské fakulty v Hradci Králové. 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 minut. Následovala centrifugace (600g, 5 minut). (Soukup et al. 2006).

Linie buněk byly kultivovány v atmosféře s 5% CO₂ a teplotě 37 °C v médiu s nízkým obsahem fetálního telecího séra tvořeného MEM (Gibco), 2% FTS (PAA, USA), 10ng/ml EGF (PeproTech, USA), 10ng/ml PDGF (PeproTech), L-askorbová kyselina (Sigma, USA), 2% glutamin (Gibco), penicilin/streptomycin (Gibco), gentamycin (Gibco) a dexametason (Sigma). 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) 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).

5.2 Ozařování

K ozařování buněk byl použit ⁶⁰Co 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% CO₂ 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.

5.3 Ovlivnění buněk inhibítorem ATM kinasy

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

5.4 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 $0,2 \text{ mol/l Na}_2\text{HPO}_4$ + 8 ml $0,1 \text{ mol/l}$ kyselina citrónová, pH 7,8) a obarveny propidium jodidem ve Vindelově roztoku po dobu 60 minut při 37°C . Obsah DNA byl změřen pomocí průtokového cytometru Cytomics FC500 (Beckman Coulter) 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, USA) a CXP (Beckman Coulter).

5.5 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); data byla analyzována použitím software WinMDI 2.9. Pro každou skupinu bylo použito 1×10^6 buněk.

5.6 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). Na gel bylo nanášeno stejné množství proteinů ($20 \mu\text{g}$). Proteiny byly přeneseny na PVDF membránu (Bio-Rad Laboratories, CZE), membrána byla blokována v TBS s 5% mlékem (non-fat dry milk, Bio-Rad) 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; p53_S15-Calbiochem-Merck; mdm2_S166, ATM, ATM_S1981, Chk1, Chk1_S345, Chk2, Chk2_T58, DNA-PKcs - Cell Signaling Technology) při 4°C po dobu 24 hodin. Pak byla provedena inkubace s polyklonální anti-myší nebo anti-králičí sekundární protilátkou (DakoCytomation). Pro detekci byl použit chemiluminiscenční detekční kit (Roche, CZE). Pro kontrolu nanášky vzorků byla každá membrána znovu inkubována pro stanovení β -aktinu.

5.7 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).

5.8 Imunohistochemie

Pro stanovení aktivity β -galaktosidasy byl použit Senescence beta-galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology) podle pokynů výrobce. Pro detekci vimentinu a γH2AX 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; γH2AX - Cell Signaling Technology; p16 – Sigma) 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), 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.

5.9 Detekce γ H2AX

Pro detekci γ H2AX byla optimalizována metoda, kterou publikoval Huang a 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 hod. 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 analyzér CyAn DakoCytomation (Beckman Coulter). Data byla zpracována pomocí software Summit 4.3v (Beckman Coulter).

6 Výsledky

6.1 Reakce mesenchymálních kmenových buněk zubní pulpy 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.

6.1.1 Detekce fosforylace histonu H2AX

Průtoková cytometrie

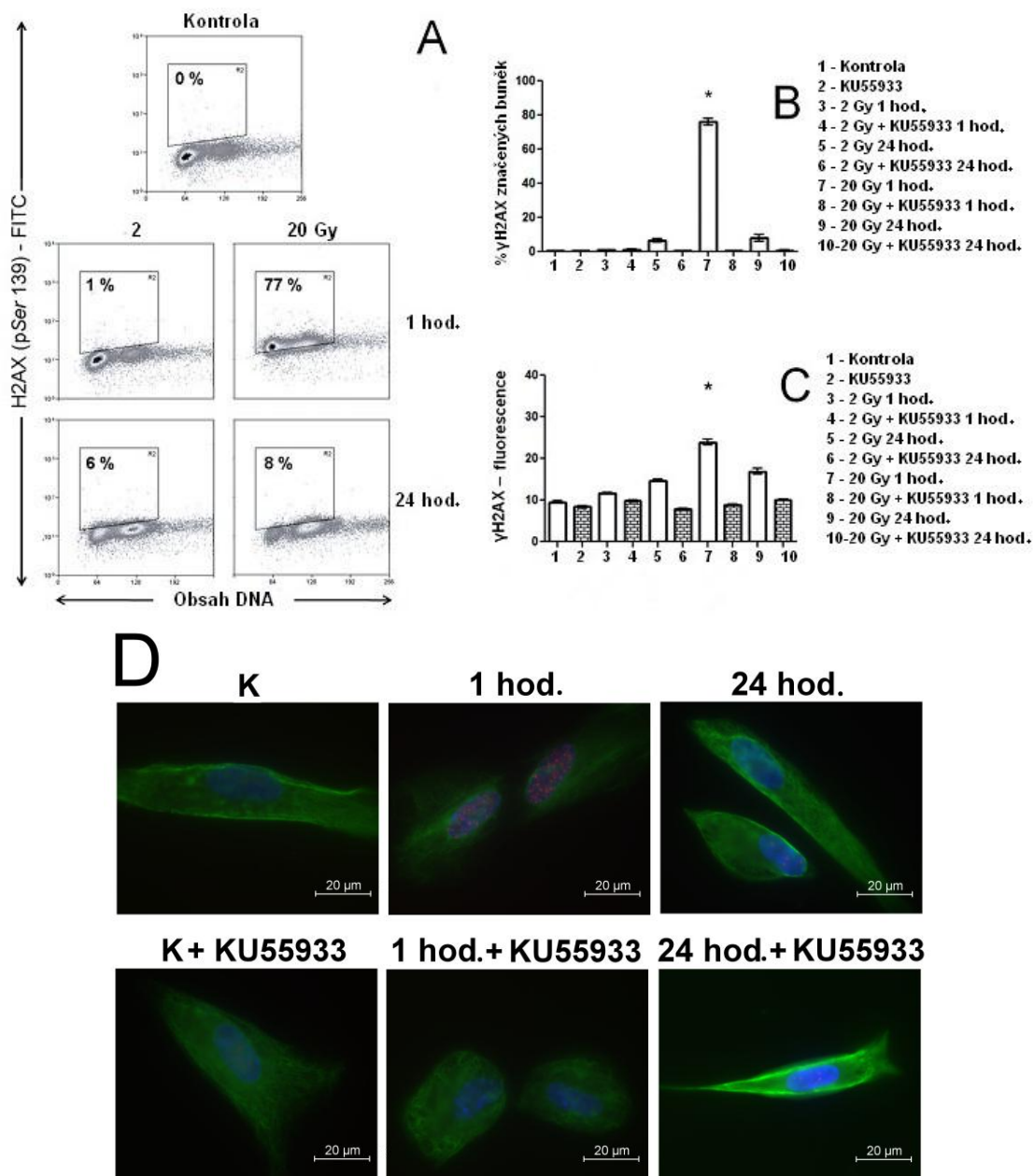
Obr. 2 znázorňuje odpověď KBZP na ionizující záření fosforylací histonu H2AX na serinu 139. Je zřejmé, že se za 1 hodinu po ozáření (20 Gy) objevuje signifikantní množství γ H2AX pozitivních buněk. Během 24 hodin klesla intenzita γ H2AX ze 77 % na 8 % (Obr. 2A).

Pro stanovení vlivu inhibice ATM kinasy na fosforylací histonu H2AX byly buňky ovlivněny specifickým inhibítozem ATM kinasy o koncentraci 10 μ M 1 hodinu před ozářením. Bylo zjištěno, že KU55933 inhibuje u KBZP fosforylací γ H2AX za 1 i 24 hodin po ozáření (Obr. 2B, 2C).

Imunocytochemie

Ozáření buněk KBZP dávkou 20 Gy vede k masivní fragmentaci DNA a tvorbě dvojitých zlomů. Obr. 2D znázorňuje 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. 2D).



Obr. 2: 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.

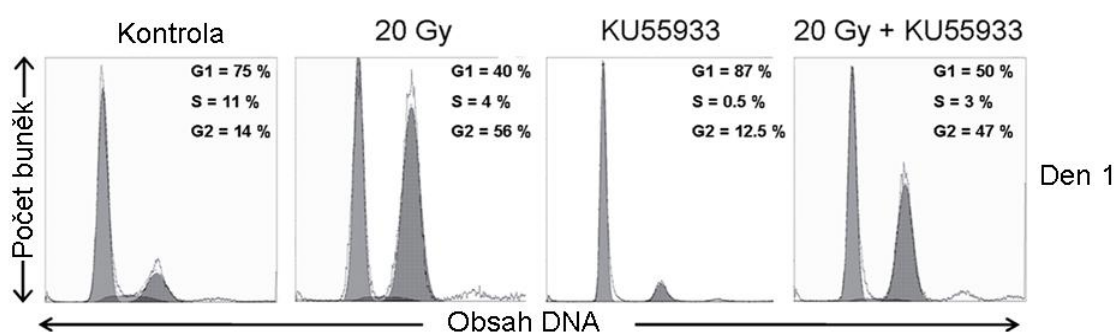
B: Procenta γ H2AX pozitivních buněk, měřeno průtokovou cytometrií. Průměr ze 3 nezávislých měření.

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.

Ke stanovení vlivu inhibice ATM kinasy a ozáření na buněčný cyklus KBZP byla použita průtoková cytometrie. Buňky byly ovlivněny inhibitorem KU55933 1 hodinu před ozáření, 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).

U KBZP se po inhibici ATM a ozáření vyskytovalo v G2/M fázi 47 % 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. 3).



Obr. 3: Rozmístění buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu po ozáření dávkou 20 Gy a ovlivnění inhibitorem ATM kinasy KU55933.

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

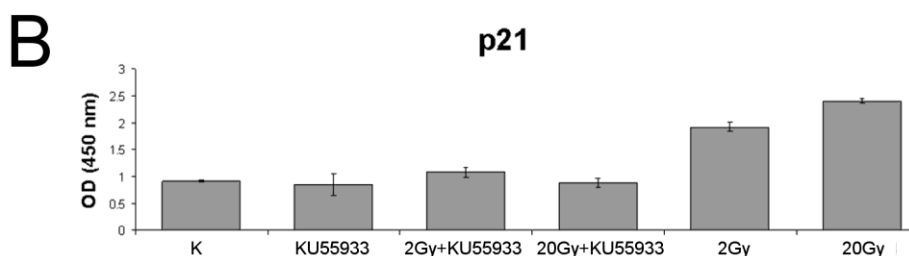
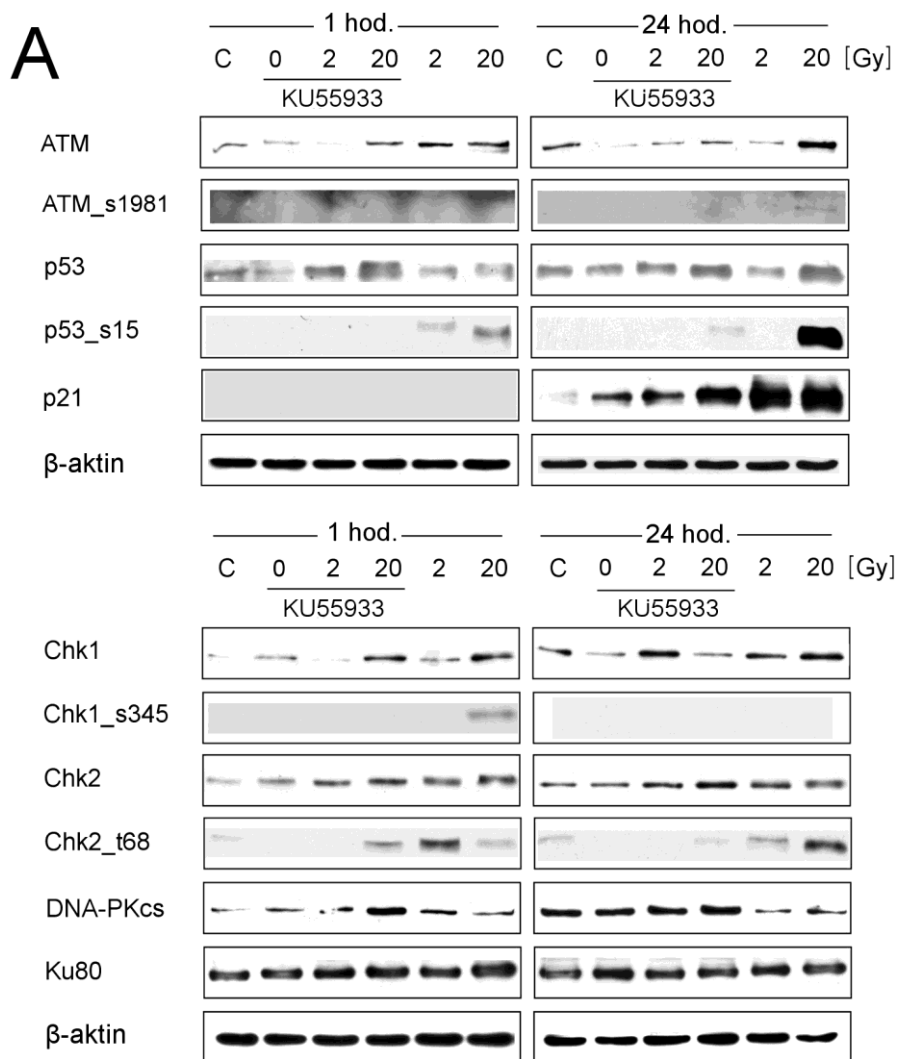
6.1.3 Změny v expresi proteinů

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. 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. 4A).

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. 4A). Výsledky byly potvrzeny metodou ELISA (Obr. 4B).

Dalšími proteiny odpovídajícími na poškození DNA jsou checkpoint kinasy Chk1 a Chk2. Množství Chk1 je lehce zvýšeno po ozáření jak s použitím nebo bez použití KU55933, ale fosforylovaná forma na serinu 345 se objevuje pouze bez inhibice ATM kinasy po 1 hodině po IR

dávku 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. 4A).



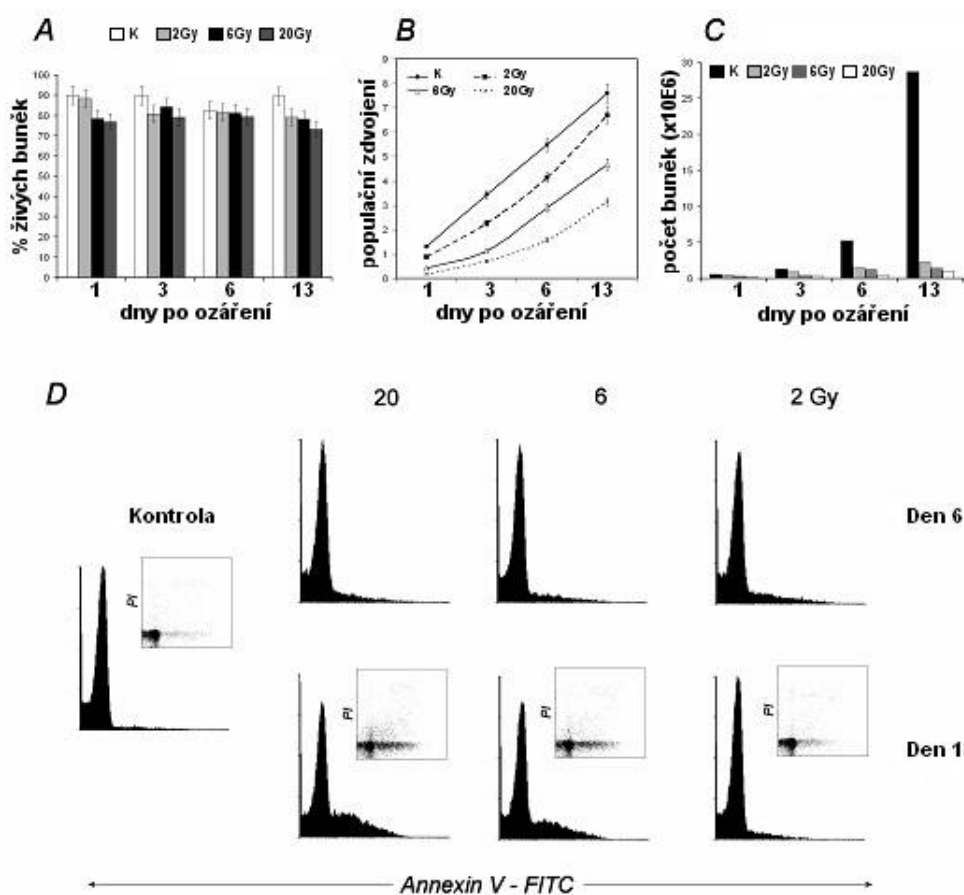
Obr. 4: Indukce a aktivace proteinů u KBZP po ozáření.

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.

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. 5A). Na druhou stranu IR signifikantně inhibuje proliferaci buněk (Obr. 5C). 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. 5D). Pomocí průtokové cytometrie byla také hodnocena aktivita kaspasy 3 – během 13 dní nedošlo u buněk k aktivaci této kaspasy.



Obr. 5: 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.

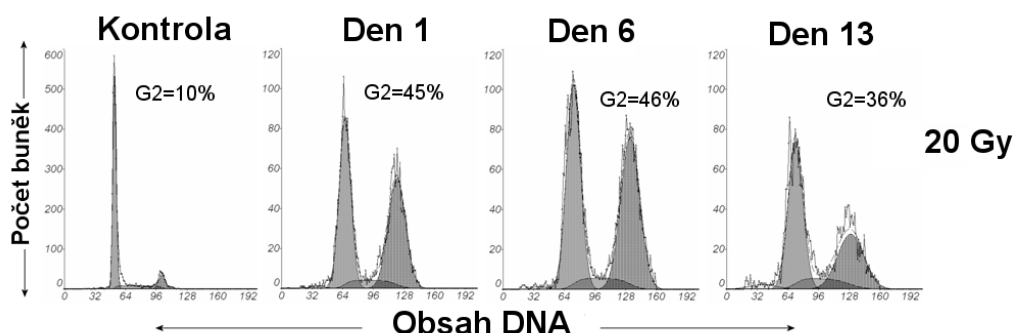
C: Dynamika proliferace buněk.

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

6.1.5

Ionizující záření indukuje zástavu buněčného cyklu u KBZP

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 u KBZP po dávkách 6 a 20 Gy k akumulaci buněk v G2/M fázi (41 % a 45 %, kontrola 10 %). Tato zástava přetrvala až do 13. dne po ozáření (Obr. 6).



Obr. 6: Zástava buněčného cyklu u KBZP.

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

6.1.6

Protein p53 je u KBZP po ozáření aktivován

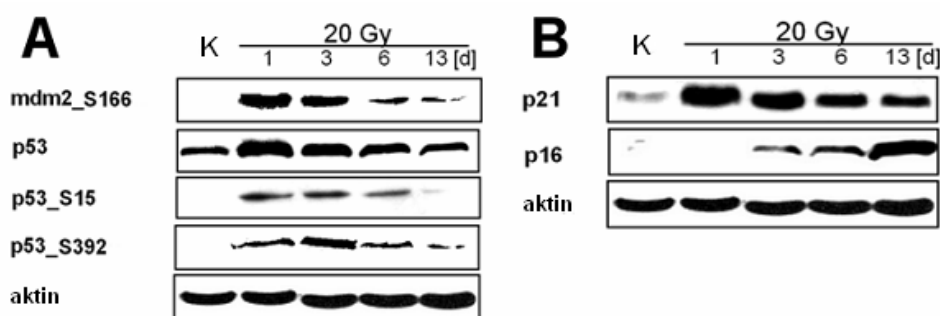
Pomocí elektroforézy a western blotu jsme studovali změny v expresi proteinů u KBZP po ozáření dávkou 20 Gy. Pozorovali jsme změny v množství proteinu p53 a jeho fosforylovaných forem v intervalu 13 dní. IR způsobuje signifikantní upregulaci proteinu p53; už po 1 dni po ozáření dávkou 20 Gy je množství 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. 7A).

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 nezaznamenanatelná. 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. 7A).

Protein p21 není u KBZP za normálních okolností 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. 7B).

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. 7B).

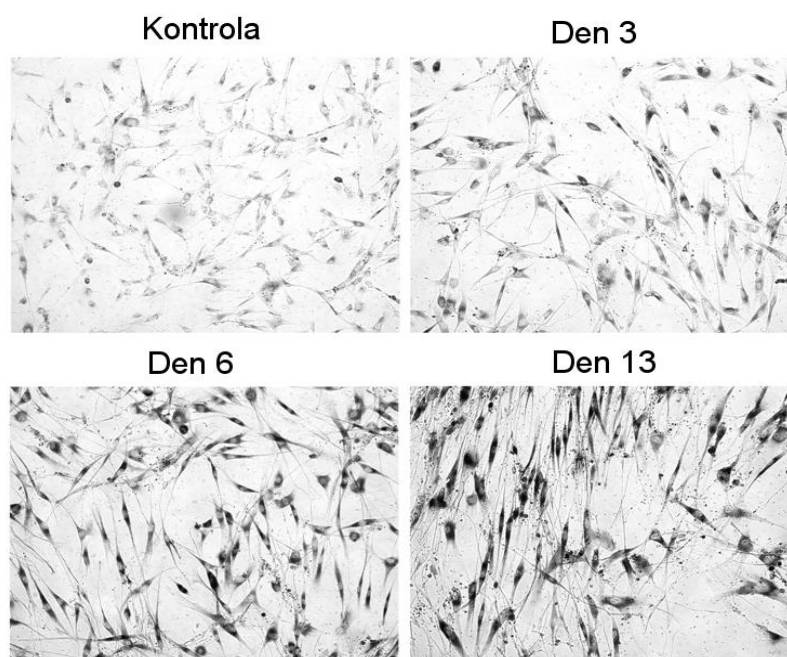
Tomuto závěru odpovídá i zvýšená aktivita β -galaktosidasy, která je patrná 3 dny po ozáření a její aktivita s časem roste (Obr. 8).



Obr. 7: 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. 8: 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.

7 SHRNUÍ NEJDŮLEŽITĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ

7.1 WI-38

- IR způsobuje změny ve viabilitě a proliferaci buněk – dávka 2 Gy inhibovala proliferační schopnost buněk pouze po dobu 3 dní, buňky přežily 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, 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 a proteinu p16 po 13 dnech
- v buňkách ozářených 20 Gy se v jádrech objevují ložiska tvořené histonem γ H2AX odpovídající na poškození DNA
- 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

7.2 Mesenchymální kmenové buňky kostní dřene

- 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)
- ozáření 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

7.3 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 IR 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 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

8 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 spojené 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 proliferační 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, proliferační 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 senescence; 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, fosforylaci 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 použil buněčnou linii 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 odpovědi 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 ložisek asociovaných se senescencí a 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 2008, Estrela 2011, Gay 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. Schonmeyer 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 cytoplazma 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 Schönmeyrem a sp. Po 3 a 7 dnech po ozáření pozorovali dávkovou závislost aktivace senescence. Indukce senescence byla statisticky signifikantní po ozáření dávkou 12 Gy (Schönmeyer 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 and 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 (Momčilović 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).

9 Závěr

Naše práce ukazuje na rozdíly mezi odpovědí lidských embryonálních diploidních fibroblastů, dospělých mesenchymálních kmenových buněk izolovaných z kostní dřevě, 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 dřevě, 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.

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. COLLADO, M., BLASCO, M.A., SERRANO, M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, 2007, vol. 130, no. 2, s. 223 – 233.
10. 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.
11. ERIKSSON, D., STIGBRAND, T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumor Biology*, 2010, vol. 31, no. 4, s. 363-372.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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
23. CHEN, MF., 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.

24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. KASSEM, M., KRISTIANSEN, 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.
28. KHANA, K., JACKSON, SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature genetics*, 2001, vol. 27, no. 3, s. 247–253.
29. 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.
30. LJUNGMAN, M. Dial 9-1-1 for p53: Mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia*, 2000, vol. 2, no. 3, s. 208 – 225.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. RONINSON, I.B. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sd1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Letters*, 2002, vol. 179, no. 1, s. 1-14.
41. 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.
42. 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.
43. ŘEŽÁČOVÁ, M., VÁVROVÁ, J. Molekulární mechanismy účinku ionizujícího záření. *Nucleus HK*, 2011, ISBN 978-80-87009-82-6.
44. 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.
45. 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.
46. SHAY, J.W., WRIGHT, W.E. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, 2004, vol. 26, no. 5, s. 867 – 874.
47. SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Reviews Cancer*, 2003, vol. 3, no. 3, s. 155-68.

48. 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.
49. SOLOZOBOVA, V., ROLLETSCHKEK, A., BLATTNER, C. NuclearQ6 accumulation and activation of p53 in embryonic stem cells after DNA damage. *BMC Cell Biology*, 2009, vol. 10, s. 46.
50. 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.
51. 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.
52. STRAFACE, 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.
53. SUZUKI, M., BOOTHMAN, D.A. Stress-induced premature senescence (SIPS). *Journal of Radiation Research*, 2008, vol. 49, no. 2, s. 105 – 112.
54. 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.
55. TAYLOR, W.R., STARK, G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 2001, vol. 20, no. 15, s. 1803 – 1815.
56. 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.
57. TOCCI, A., FORTE, L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematology Journal*, 2003, vol. 4, no. 2, s. 92 – 96.
58. 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.
59. 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.
60. ULDRIJAN, S., KOTALA, V., VOJTĚŠEK, B. Regulace stability a aktivity nádorového supresoru p53. *Chemické Listy*, 2002, vol. 96, s. 145–149.
61. 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.
62. 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.
63. VON ZGLINICKI, T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences*, 2002, vol. 27, no. 7, s. 339-344.

Původní vědecké publikace s impakt faktorem:

CMIELOVA, J., HAVELEK, R., JIROUTOVA, A., KOHLEROVA, R., SEIFRTOVA, M., MUTHNA, D., VAVROVA, J., REZACOVA, M. Dna damage caused by ionizing radiation in embryonic diploid fibroblasts WI-38 induces both apoptois and senescence. *Physiological Research*, 2011, vol. 60, no. 4, s. 667-77. (IF: 1,646)

CMIELOVA, J., REZACOVA, M. Protein and its function based on subcellular localization. *Journal of cellular biochemistry*, 2011, vol. 112, no. 12, s. 3502-3506. (IF: 3,122)

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. 1855–1862. (IF: 4,146)

SEIFRTOVA, M., HAVELEK, R., CHMELAROVA, M., CMIELOVA, J., MUTHNA, D., STOKLASOVA, A., ZEMANKOVA, S., REZACOVA, M. The effect of AMT and ERK1/2 inhibition on mitoxantrone-induced cell death of leukaemic cells. *Folia Biologica*, 2011, vol. 57, s. 74 – 81. (IF: 0,729)

Publikace bez impakt faktoru a statě ve sbornících:

ĆMIELOVÁ, J., MUTHNÁ, D., VÁVROVÁ, J., ŘEZÁČOVÁ, M. Genotoxický stres a poškození DNA u kmenových buněk. *Postgraduální medicína*, 2010, vol. 12, no. 1, s. 26-29.

CMIELOVA, J., MUTHNA, D., HAVELEK, R., SOUKUP, T., JIROUTOVA, A., VAVROVA, J., MOKRY, J. Response of human dental pulp stem cells and periodontal ligament stem cells to ionizing radiation. The 7th International Medical Postgraduate Conference, Abstract book, 2010, s. 37-39.

Původní vědecké publikace v recenzním řízení:

CMIELOVA, J., HAVELEK, R., SOUKUP, T., JIROUTOVA, A., VISEK, B., SUCHANEK, J., VAVROVA, J., MOKRY, J., MUTHNA, D., BRUCKOVA, L., FILIP, S., ENGLISH, D., REZACOVA, M. Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments. *International Journal of Radiation Biology*, v recenzním řízení. (IF: 1,861)

SEIFRTOVA, M., HAVELEK, R., CMIELOVA, J., JIROUTOVA, A., SOUKUP, T., BRUCKOVA, L., MOKRA, J., REZACOVA, M. The response of human mesenchymal dentil pulp stem cells to cisplatin treatment. *International Endodontic Journal*, 2011, v tisku. (IF: 2,383)

Přednášky na odborných setkáních:

Fakultní konference studentů DS 2. ročníku, 24. 5. 2010, Hradec Králové – ústní sdělení s názvem ZMĚNY PROTEINŮ V REAKCI NA GENOTOXICKÝ STRES U KMENOVÝCH BUNĚK.

6th Postgraduate Medical Students Conference, 25. 10. 2010, Hradec Králové – ústní sdělení s názvem RESPONSE OF DENTAL PULP STEM CELLS AND PERIODONTAL LIGAMENT STEM CELLS TO IONIZING RADIATION.

7th International medical postgraduate conference, 18. – 20. 11. 2010, Hradec Králové – ústní sdělení s názvem RESPONSE OF DENTAL PULP STEM CELLS AND PERIODONTAL LIGAMENT STEM CELLS TO IONIZING RADIATION.

13. vědecko-pedagogická konference učitelů biochemických oborů lékařských fakult v ČR a SR, 15. - 16. 9. 2011 Hradec Králové - ústní sdělení s názvem PŘEDČASNÁ SENESCENCE INDUKOVANÁ IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM U KMENOVÝCH BUNĚK ZUBNÍ PULPY A PERIODONTÁLNÍHO LIGAMENTA.

Postery:

34th FEBS Congress, Prague, 4. – 9. 7. 2009 – poster s názvem Comparison of effect of vanadocene dichloride and classic cytostatic drug cisplatin in MOLT-4 leukemia cell line. Cmielova, J., Krejčířikova, P., Muthna, D., Šiman, P., Havelek, R., Vinklárek, J., Rezacova, M.

7th Annual Meeting ISSCR, Barcelona 8. – 11. 7. 2009 – poster s názvem Irradiation of human stem cells of dental pulp provokes decrease in cell proliferation, arrest in G2 phase of cell cycle and senescence. Cmielova, J., Muthna, D., Soukup, T., Visek, B., Vavrova, J., Mokry, J., Bruckova, L., Rezacova, M.

VI. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Olomouc, 1. - 3. 12. 2010 – poster s názvem Porovnání účinků vanadocen dichloridu a cisplatinu u buněk MOLT-4 – změny v expresi p53 a indukci apoptózy. Čmielová, J., Seifrtová, M., Krejčířiková, P., Muthná, D., Šiman, P., Havelek, R., Vinklárek, J., Řezáčová, M.

Inflammation 2010, Luxemburg, 27. – 30. 1. 2010 – poster s názvem Reaction to DNA damage caused by ionizing radiation in embryonic fibroblasts WI-38. Čmielová, J., Seifrtová, Havelek, R., M., Muthná, D., Vávrová, J., Řezáčová, M.

36th FEBS Congress, Torino, 25. – 30. 6. 2011 – poster s názvem Short shrift with DNA damage caused by irradiation in dental pulp and periodontal ligament stem cells. Cmielova, J., Havelek, R., Kohlerová, R., Bruckova, L., Soukup, T., Vavrova, J., Mokry, J., Rezacova, M.