

## FOSFORYLOVANÝ HISTON H2AX – NOVÝ INDIKÁTOR POŠKOZENÍ DNA

MARTINA ŘEZÁČOVÁ<sup>a</sup>, RADIM HAVELEK<sup>a</sup>,  
EMILIE LUKÁŠOVÁ<sup>b</sup> a JIŘINA VÁVROVÁ<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Ústav lékařské biochemie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové, <sup>b</sup> Biofyzikální ústav Akademie Věd České republiky, Královopolská 135, 612 65 Brno, <sup>c</sup> Katedra radiobiologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové  
RezacovaM@lfhk.cuni.cz, vavrova@pmfshk.cz,  
lukasova@jbp.cz, HavelekR@lfhk.cuni.cz

Došlo 27.4.10, přijato 8.6.10.

Klíčová slova: poškození DNA, dvouřetězcové zlomy, histon H2AX, fosforylace, průtoková cytometrie

### Obsah

1. Úvod
2. Organizace buněčného jádra
3. Histon H2A
4. Struktura a role histonu H2AX
5. Molekulární mechanismy vedoucí k fosforylaci histonu H2AX
6. Význam detekce fosforylovaného histonu H2AX ( $\gamma$ H2AX)
7. Možnosti detekce a kvantifikace fosforylovaného histonu H2AX ( $\gamma$ H2AX)
8. Závěr

### 1. Úvod

DNA eukaryotických buněk je neustále vystavena působení endogenních a exogenních látek, které ji poškozují. Z celé škály možných poškození DNA jsou nejzávažnější dvouřetězcové zlomy DNA (DSB), které vznikají jak po vystavení exogenním noxám (ionizující záření, UV záření, chemické mutageny), tak při chybách endogenních (poruchy v replikaci, kyslíkové radikály). DSB reprezentují velký zásah do integrity genomu, a jsou pro buňku potenciálně smrtícím poškozením. Přestože buňka sama nepochybně přítomnost a umístění DSB rozpozná, z hlediska výzkumníka studujícího tyto procesy jde o metodicky stále nesnadnou záležitost.

V průběhu posledních dvaceti let bylo k hodnocení rozsahu akutního poškození DNA v jednotlivých buňkách možné využít tzv. kometovou analýzu, neboli gelovou elektroforézu jednotlivých buněk. Principem metody je

imobilizace buněk v agarosovém gelu, expozice lyzačnímu roztoku a rozvinutí poškozených vláken v elektrickém poli, což po detekci vhodným fluorochromem vytváří charakteristický obraz připomínající kometu. Délka ohonu a podíl DNA v něm korelují s mírou poškození DNA. Za využití rozdílných podmínek bylo vyvinuto několik variant této metody, které umožňují částečně rozlišit mezi DSB a jednořetězcovými zlomy<sup>1–3</sup>.

Přetrvávající poškození DNA studuje chromosomová analýza. Na detekci chromosomálních aberací T lymfocytů v periferní krvi po stimulaci fytohemaglutininem (PHA) je založena zpětná diagnostika dávky záření u ozářených při radiačních nehodách. Ozáření lymfocytů vede k zlomům DNA a vzniku chromosomových a chromatidových aberací. K nejčastějším aberacím patří dicentrické a prstencové chromosomy. Jejich hodnocení je součástí metody užívané ke stanovení obdržené dávky záření, která patří ke zlatému standardu biologické dozimetrie již mnoho let<sup>4</sup>. Protože chromosomy jsou nejlépe pozorovatelné při vlastní mitóze, kdy je chromosomální DNA velmi kondenzována a chromosomy jsou po obarvení dobře viditelné, je metoda založena na stimulaci lymfocytů z periferní krve PHA, kdy se lymfocyty uvedou do mitózy a mikroskopicky je pak možno sledovat počet aberací v jednotlivých jádrech buněk. Metoda má však svoje limity, odečet je možný až po 48h stimulaci PHA a vyhodnocení je časově náročné.

V současnosti je možné dvojité zlomy DNA detegovat pomocí fosforylace histonu H2AX na serinu 139 ( $\gamma$ H2AX). Metoda je relativně nová, fosforylace H2AX byla poprvé objevena v roce 1998 Rogakou a spol.<sup>5</sup>, kteří pomocí dvouřetězcové elektroforézy pozorovali fosforylaci histonu H2AX na serinu 139 v minutách po ozáření buněk lidské buněčné linie SF268, s maximem za 30–60 minut po ozáření<sup>6</sup>. Tento přehledný článek shrnuje dosavadní znalosti o významu a funkci  $\gamma$ H2AX a o možnostech jeho detekce a kvantifikace.

### 2. Organizace buněčného jádra

DNA eukaryotického jádra je kondenzována do vysoce organizovaného chromatinu. Genom každé lidské buňky obsahuje řádově  $6 \cdot 10^9$  párů bazí (bp), což odpovídá délce vlákna dvoušroubovice DNA více než 2 metry. DNA je v buňkách (které mají průměr většinou menší než 0,01 mm) integrována pomocí vazby histonů do kondenzovaného chromatinu. Základní strukturální jednotkou chromatinu je kulovitá částice – nukleosom – o průměru 10 nm. Obsahuje 146 párů bazí, které vytváří 1,75 levotočivých nadšroubovicových závitů DNA kolem proteinového jádra<sup>7,8</sup>. Jádro má strukturu oktameru, skládá se vždy ze dvou stejných molekul čtyř různých typů jaderných bílkovin – his-

tonů H2A, H2B, H3 a H4. V konečném důsledku jsou pak 2 m DNA v lidské buňce stočeny do 90 nm chromatinových vláken o průměru 30 nm (cit.<sup>9</sup>).

Schopnost buňky reagovat na změny ve vnějším a vnitřním prostředí je dána souhrou genetického a epigenetického aparátu. Genetický aparát tvoří sekvence nukleotidů v DNA – DNA kód. Epigenetický aparát je tvořen histonovým kódem, tj. souborem kovalentních modifikací na histonových koncích, a methylací DNA. Epigenetický aparát řídí strukturu chromatinu bez změny sekvence DNA a tím ovlivňuje expresi genů<sup>10</sup>, zejména těch, které hrají důležitou roli při transkripci, replikaci a reparaci DNA<sup>11</sup>.

K prevenci akumulace genotoxického poškození a odvrácení celulární dysfunkce mají buňky vyvinut celý komplex odpovědí, které se po vytvoření DSB okamžitě aktivují.

### 3. Histon H2A

Histon H2AX je jednou z variant histonů rodiny H2A. Lidský genom obsahuje 10 genů, které kódují peptidy klasifikované jako H2A1, šest z nich má identickou sekvenci, zbývající čtyři se liší aminokyselinami maximálně ve 3–4 pozicích. Tyto peptidy jsou nerozlišitelné gelovou elektroforézou v přítomnosti Tritonu X-100. Další z genů rodiny H2A kóduje peptid, ve kterém je leucin v pozici 51 zaměněn methioninem, což vede ke změně elektroforetické mobility, tato varianta je označována jako H2A2. Varianty H2A1 a H2A2 tvoří většinu savčího H2A a nebyly zjištěny žádné odlišnosti v jejich funkci. Označují se rovněž jako majoritní varianty.

Existuje pět dalších lidských genů H2A, označovaných jako varianty minoritní, které kódují peptidy sekvence výrazně odlišné od variant H2A1 a 2. Přestože jejich výskyt je podstatně méně častý, je čím dál zřejmější, že hrají velmi významnou úlohu v chromatinovém metabolismu. Dvě tyto minoritní varianty – H2AX a H2AZ byly objeveny v osmdesátých letech, další dvě – makro-H2A1 a makro-H2A2 v devadesátých letech a poslední – H2A-Bbd nedávno<sup>9</sup>.

### 4. Struktura a role H2AX

Varianta H2AX je vysoce konzervativní peptid, od *S. cerevisiae* až po člověka. H2AX představuje 2–25 % z celkového množství histonu H2A, množství záleží na typu organismu a typu buněk, např. v normálních lidských fibroblastech je to cca 10 %. Podobně jako další histonové proteiny obsahuje H2AX centrální globulární doménu a dva volné boční konce *N*-terminální a *C*-terminální, které představují místo pro posttranslační modifikace, jako je acetylace, fosforylace, biotinylace, methylace a ubikvitinace. H2AX na rozdíl od ostatních H2A histonů má na 4. pozici od *C*-konce serin (označuje se jako omega-4), u člověka je to 136. aminokyselina v řetězci. Čtyři *C*-koncevé aminokyseliny představují velice konzervativní

motiv, u všech druhů jde o sekvenci serin-glutamin-kyselá aminokyselina-hydrofobní aminokyselina<sup>9</sup>. Po vzniku DSB dochází k rychlé fosforylaci omega-4-serinových reziduí a tvorbě tzv.  $\gamma$ H2AX.

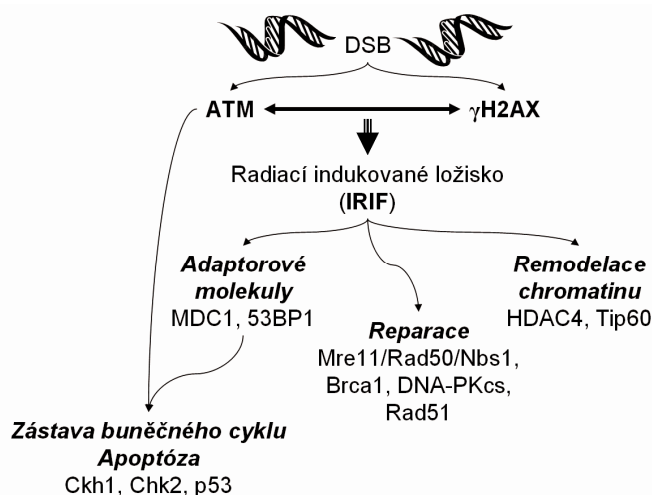
### 5. Molekulární mechanismy vedoucí k fosforylaci histonu H2AX

V odpovědi na DSB jsou aktivovány molekulárně biologické cesty, jejichž výsledkem je rozpoznání poškození DNA a snaha o jeho reparaci. Jestliže nemůže být poškození reparováno, je navozena buněčná smrt buď formou apoptózy, anebo po průchodu buněčným cyklem dochází k tzv. mitotické katastrofě. Další možností je trvalá zástava buněčného cyklu a vznik senescentních buněk. Všechny tyto pochody napomáhají k udržení buněčné stability.

Fosforylace H2AX je jedním z prvních dějů aktivovaných po vzniku DSB. Po ozáření dávkou 1 Gy záření gama vzniká v buňce cca 40 DSB a okolo 1 % H2AX je fosforylováno. Každý DSB vyvolá fosforylaci přibližně 2000 molekul H2AX, což odpovídá zhruba 0,03 % chromatinu<sup>5,6</sup>. Klíčovými kinasami pro fosforylaci H2AX jsou tři kinyasy z rodiny PI-3 kinas: ataxia telangiectasia proteinkinasa (ATM), AT a Rad related proteinkinasa (ATR) a DNA-dependentní proteinkinasa (DNA-PK). V reakci na DSB způsobené ionizujícím zářením dochází k aktivaci autofosforylaci ATM kinyasy<sup>12</sup>, tato kinasa pak fosforyluje H2AX a hromadí se v místě DSB (cit.<sup>13</sup>). K aktivaci ATR dochází především pod vlivem UV záření<sup>14</sup>. DNA-PK je zodpovědná za fosforylaci H2AX v průběhu apoptózy, zatímco ATM kinasa se na tomto procesu nepodílí<sup>15</sup>. Fosforylace H2AX se šíří po chromatinu obklopujícím DSB do vzdálenosti stovek kbp. V místě dvouřetězcových zlomů pak dochází k akumulaci mnoha proteinů a vzniku tzv. záření indukovaných ložisek. Vedle ATM nebo ATR kinas a  $\gamma$ H2AX je zde lokalizováno mnoho dalších proteinů: 53BP1, MDC1, BRCA1, MRE11, Rad50, Nbs1, Tip 60, HDAC4 (cit.<sup>16</sup>). Funkce těchto proteinů jsou různé. Proteiny Mre11, Rad50 a Nbs1 vytvářejí funkční komplex, který působí jako senzor pro vyhledávání DSB a stabilizuje volné konce DNA. Histonacetyltransferasa Tip 60 a histondeacetylasa HDAC4 modulují acetylaci chromatinu a ovlivňují rozvolnění terciální struktury DNA. Proteiny 53BP1 a MDC1 působí jako adaptorové molekuly a zprostředkovávají interakce ostatních proteinů s poškozeným místem (obr. 1). Tato ložiska vznikají pod vlivem exogenních (např. záření) i endogenních stresorů<sup>17</sup>.

### 6. Význam detekce fosforylovaného histonu H2AX ( $\gamma$ H2AX)

Fosforylaci H2AX je možné využít jako indikátor přítomnosti DSB v DNA. Počet ložisek a tedy i míra fosforylace odpovídají počtu DSB. Je-li analýza provedena ve



Obr. 1. Ložiska vznikající v místě dvouřetězcových zlomů DNA; ATM – ataxia teleangiectasia mutovaná kinasa,  $\gamma$ H2AX – histon H2AX fosforylovaný na C-terminálním serinu, Chk1 – checkpoint protein kinasa 1, Chk2 – checkpoint protein kinasa 2, p53 – tumorový protein p53, MDC1 – mediátor checkpointu poškození DNA 1, 53BP1 – tumorový protein p53 vázající protein 1, Mre11 – protein meiotické rekombinace 11, Rad50 – RAD50 homolog (*S. cerevisiae*), Nbs1 – nibrin, Brca1 – protein rakoviny prsu 1, Rad51 – RAD51 homolog (*S. cerevisiae*), Tip60 – histonacetyltransferasa Tip 60, HDAC4 – histondeacetylaza 4

vhodném časovém intervalu, lze detekci  $\gamma$ H2AX využít například jako biosimetrický indikátor – tedy ke zpětnému odhadu obdržené dávky ionizujícího záření. Redox a spol.<sup>18</sup> prokázali 30 min po *in vitro* ozáření lidské krve dávkami 0,2–5 Gy dávkově závislý vzestup  $\gamma$ H2AX. Podobných výsledků dosáhli také po ozáření kůže. Za 4 h byl již patrný pokles  $\gamma$ H2AX. Ve vlastních experimentech jsme prokázali, že 1 h po *in vivo* ozáření potkanů dochází k dávkově závislému vzestupu  $\gamma$ H2AX v lymfocytech izolovaných z periferní krve těchto potkanů<sup>19</sup>.

K fosforylaci H2AX dochází i při vzniku endogenních DSB v rámci průběhu apoptózy. Jedním z hlavních znaků apoptózy je fragmentace DNA, ke štěpení dochází v internukleosomálních sekvencích. DSB vznikající v průběhu apoptického procesu vedou k masivní fosforylaci H2AX. Fosforylace H2AX je spíše časným znakem apoptózy, objevuje se ve stejném čase, kdy je aktivována kaspasa 3. Hlavní kinasou zprostředkovávající vznik  $\gamma$ H2AX v rámci tohoto děje je DNA-PK (cit.<sup>15</sup>).

Ukazuje se také, že z dlouhodobého hlediska přispívá oxidační stres ke stárnutí organismu. Chronická expozice organismu oxidačnímu stresu (ionizující a UV záření, chemikálie, kovy) vede k nedostatečné reparaci poškození DNA a k akumulaci tohoto poškození. Poškozená místa se manifestují jako permanentně přítomná ložiska  $\gamma$ H2AX. Ložiska mohou být telomerická i netelomerická. V těchto ložiscích jsou přítomny i reparační proteiny, avšak efektivní reparace neproběhne. Tato tzv. endogenní ložiska jsou výsledkem oxidačního stresu a přetrvávající poškození vede k destabilizaci genomu. Nereparované léze vedou k vzniku mutací a chromosomálními abnormalitám. U myši, které jsou deficitní v množství reparačních proteinů

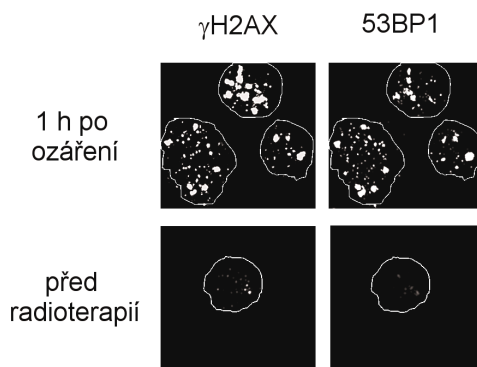
dochází k urychlenému stárnutí<sup>20</sup>. Z hlediska endogenního poškození dochází s časem k jeho akumulaci, zvyšuje se počet DSB DNA lezí a také množství  $\gamma$ H2AX.

Vznik  $\gamma$ H2AX jakožto časného signálu reakce na poškození DNA má význam i ve vzniku nádorových onemocnění. Bylo zjištěno<sup>21–23</sup>, že u řady nádorů (karcinomů, osteosarkomů, melanomů) je zvýšené množství  $\gamma$ H2AX. Bartkova a spol.<sup>21</sup> zjistili, že u nádorů močového měchýře během vývoje nádoru jsou exprimovány markery ukazující na aktivaci buněčné odpovědi na DSB. Tyto změny zahrnují fosforylaci ATM kinasy a CHK2 kinasy, fosforylaci H2AX a p53. Ložiska byla nalezena i v premaligních stádiích nádorů, v některých buněčných liniích a nádorech různého původu<sup>24</sup>. Nakamura a spol.<sup>24</sup> prokázali, že většina DSB DNA v nádorech je spojena s poškozením telomer. Zkrácení telomer a následně jejich špatná funkce je spojena s mnoha lidskými chorobami zahrnujícími stárnutí a vznik nádorů.

## 7. Možnosti detekce a kvantifikace fosforylovaného histonu H2AX ( $\gamma$ H2AX)

Metodiky využívané pro detekci a kvantifikaci  $\gamma$ H2AX vychází z imunodetekce fosfospecifickou primární protilátkou. Existují v podstatě tři možnosti jak stanovit  $\gamma$ H2AX v buňce: 1) imunocytochemicky s mikroskopickou vizualizací, 2) pomocí SDS-PAGE s „western blot“ analýzou a imunodetekcí a nebo 3) průtokovou cytometrií.

Z těchto metod „western blot“ analýza pracuje s buněčnými lyzáty, neumožňuje tedy hodnocení jednotlivých buněk a poskytuje pouze semikvantitativní ukazatele.



Obr. 2. Ložiska  $\gamma$ H2AX a 53BP1 u lidských lymfocytů izolovaných z krve pacientky prodávající radioterapii 1 h po ozáření 11. frakcí o dávce 2 Gy; buňky byly fixovány 4% čerstvě připraveným paraformaldehydem 10 min při pokojové teplotě (RT), promyty v PBS, permeabilizovány 0,2 % Triton X-100/PBS a promyty v PBS. Před inkubací s primární protilátkou (přes noc při 4 °C) byly buňky blokovány 7 % inaktivovaného FCS + 2 % BSA v PBS po dobu 30 min při RT. Pro detekci  $\gamma$ H2AX byly použity myši monoklonální protilátka anti-phospho-H2A.X (Upstate) a polyklonální králičí protilátka anti-53BP1 (Cell Signaling). Jako sekundární protilátky byly použity oslí anti-myši-FITC-konjugovaná protilátka a anti-králičí-Cy3-konjugovaná protilátka od Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Protilátky byly aplikovány na jednotlivá sklička (po jejich pre-inkubaci s 5,5 % oslího séra v PBS po 30 min při RT) a inkubovány 1 h ve tmě a následně promyty v PBS. Jádra byla značena pomocí TOPRO-3 (Molecular Probes, Eugene, OR) v čerstvě připraveném citrátovém pufru. Fotografie byly získány konfokálním cytometrem s vysokým rozlišením pomocí automatizovaného fluorescenčního mikroskopu Leica DM RXA s CSU-10 a konfokální jednotkou (Yokogawa, Japan) a CoolSnap HQ kamerou (Photometrix, Melbourne, Rakousko). Pro každé jádro bylo zaznamenáno 40 řezů po 0,3  $\mu$ m. Expoziční čas a dynamika pásma kamery v červeném, zeleném a modrém kanále byly pro všechny fotografie srovnávané počítačovou analýzou obrazu nastaveny na stejné hodnoty

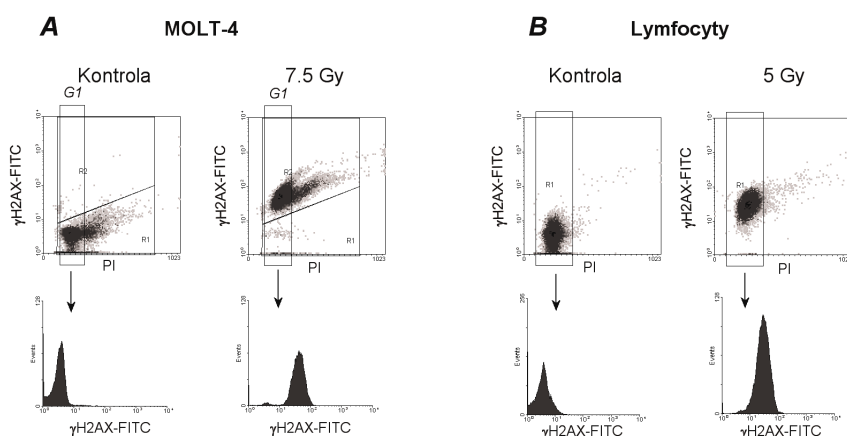
Imunocytochemické značení a následná detekce v konfokálním mikroskopu umožňuje sledovat vznik ložisek a společnou kolokalizaci  $\gamma$ H2AX s dalšími proteiny a jejich subcelulární lokalizaci. Výsledky je možné kvantifikovat určením počtu ložisek v jednotlivých jádrech, nebo měřením integrální optické denzity pomocí software pro analýzu obrazu. Výhodou metody je možnost sledování kolokalizací a zároveň možnost vizualizace chromatinu, avšak kvantifikace je časově náročná a subjektivní, a při větším poškození, kdy ložiska splývají do větších útvarů, nepřesná. Na obr. 2 jsou vidět ložiska  $\gamma$ H2AX a 53BP1 detekovaná v lymfocytech z periferní krve pacientky po ozáření v rámci radioterapie děložního karcinomu.

Jako nejvýhodnější metoda pro kvantifikaci  $\gamma$ H2AX se jeví průtoková cytometrie. Tato metoda je nejrychlejší, kvantifikace je objektivní a je vhodná pro rutinní stanovení. Protože množství histonů, a tedy i H2AX, v jádře stoupá spolu se syntézou DNA v průběhu S fáze buněčného cyklu, je výhodné doplnit detekci  $\gamma$ H2AX sledováním obsahu DNA v buňkách. To umožní následně kvantifikovat fosforylaci H2AX pouze u buněk v G0/G1 fázi, což analýzu zpřesňuje<sup>25,26</sup>. Jak DNA, tak  $\gamma$ H2AX jsou intracelulární a vyžadují permeabilizaci buněčné membrány a fixaci, zvolená činidla přitom nesmí způsobit defosforylaci H2AX. Osvědčila se nám modifikovaná metoda dle Huanga a Darzynkiewicz<sup>26</sup>. Buňky byly fixovány s ledově chladným 1% formaldehydem (bez methanolu), promyty a suspendovány v ledově chladném 70% ethanolu. Následně byly značeny primární protilátkou proti fosfory-

lované formě H2AX konjugovanou s fluorescein isothiocyanátem (anti-phospho histone H2A.X (Ser139)-FITC). Po dalším promytí byly buňky barveny propidium jodidem pro označení DNA a analyzovány na průtokovém cytometru. U buněk v G0/G1 fázi je pak vyhodnocen medián fluorescence odpovídající  $\gamma$ H2AX (obr. 3).

## 8. Závěr

Dvojitě zlomy DNA vznikají po poškození savčích buněk genotoxickými látkami (ionizující a UV záření, těžké kovy, chemikálie). K jejich rozpoznání a reparaci aktivuje organismus velmi rychle, řádově v minutách, molekulární mechanismy spojené s fosforylací a aktivací PI3 kinas, fosforylací histonu H2AX ( $\gamma$ H2AX) a akumulací reparačních proteinů (53BP1, MRE11, NBS1, Rad50, 53BP1) v místě DSB. Po jednorázovém poškození buňky dochází buď k reparaci nebo smrti buňky. Po opakovaném malém poškození dochází k akumulaci DSB v buňce a tato je zdrojem genomové nestability. Nádorové buňky obsahují větší počet DSB než buňky normálních tkání. Pomocí  $\gamma$ H2AX je možno detegovat expozici noxám poškozujícím DNA, akumulaci poškození DNA v průběhu stárnutí, i prekarcinogenní stavy. Vhodnou metodou pro vizualizaci ložisek je imunocytochemické značení a následná detekce v konfokálním mikroskopu, vhodnou metodou pro kvantifikaci  $\gamma$ H2AX je simultánní značení  $\gamma$ H2AX a DNA s detekcí v průtokovém cytometru.



Obr. 3. Stanovení  $\gamma$ H2AX společně s buněčným cyklem (dle obsahu DNA) pomocí průtokového cytometru 1 h po ozáření buněk *in vitro*; buňky byly promyty v PBS, fixovány formaldehydem, promyty PBS a přeneseny do ledového ethanolu. Po odstranění ethanolu byly buňky inkubovány v roztoku PBS, BSA a Tritonu X. Po této permeabilizaci plazmatické membrány byly buňky inkubovány s monoklonální myší protilátkou anti- $\gamma$ H2AX-FITC (Millipore) přes noc při 4 °C, promyty v roztoku PBS, BSA a Tritonu X a následně byla DNA značena PI v přítomnosti RNasy. Intenzita zelené (FITC) a červené (PI) fluorescence byla měřena na flow cytometru CellLabQuanta vybaveném 488 nm excitacním laserem (Beckman Coulter). Intenzita fosforylace H2A.X se hodnotí pouze v gate buněk v  $G_0/G_1$  fázi buněčného cyklu. A: proliferující buňky MOLT-4 (T-lymfocytární leukémie), B: periferní lymfocyty izolované z heparinizované krve zdravých dárců krve centrifugací na Histopaque-1077 (Sigma) podle instrukcí výrobce. Z obrázku je patrné, že většina lymfocytů izolovaných z periferní krve je v klidové  $G_0/G_1$  fázi

Tato práce byla podpořena prostředky z grantu OVUOFVZ200806.

#### Použité zkratky

DSB	dvouřetězcové zlomy DNA
PHA	fytohemaglutin
$\gamma$ H2AX	H2AX fosforylovaný na C-terminálním serinu (u člověka serin 136)
kbp	kilopáry bází
FITC	fluorescein isothiokyanát
PI	propidium jodid
FCS	fetální telecí sérum
BSA	hovězí sérový albumin
PBS	fosfátový pufr
RT	pokořová teplota

#### LITERATURA

- Dvořák M., Matějovicová M.: Chem Listy 102, 977 (2008).
- Gajendiran N., Tanaka K., Kamada N.: Mutat Res. 452, 179 (2000).
- Mayer C., Popanda O., Zelezny O., von Brevern M.C., Bach A., Bartsch H., Schmezer P.: DNA Repair. 1, 237 (2002).
- International Atomic Energy Agency: Biological dosimetry: Chromosomal aberration analysis for dose assessment. Technical report No.260. Vienna Austria, International Atomic Energy Agency (1986).
- Rogakou P. E., Pilch D. R., Orr A. H., Ivanova V. S., Bonner W. M.: J. Biol. Chem. 273, 5858 (1998).
- Rogakou P. E., Boon C., Redon C., Bonner W. M.: Cell Biol. 146, 905 (1999).
- Marks P. A., Richon V. M., Rifkind R. A.: J. Natl. Cancer Inst. 92, 1210 (2000).
- Kouzarides T.: Cell 128, 693 (2007).
- Redon C., Pilch D., Rogakou E., Sedelnikova O., Newrock K., Bonner W.: Curr. Opin. Genet. Dev. 12, 162 (2002).
- Smith L. T., Otterson G. A., Plass C.: Trends Genet. 23, 449 (2007).
- Turner B. M.: Bioessays 22, 836 (2000).
- Bakkenist C. J., Kastan M. B.: Nature 421, 486 (2003).
- Bekker-Jensen S., Lukas C., Kitagawa R., Melander F., Kastan M. B., Bartek J., Lukas J.: J. Cell Biol. 173, 195 (2006).
- Zhou B. B., Elledge S. J.: Nature 408, 433 (2000).
- Mukherjee B., Kessinger C., Kobayashi J., Chen B. P., Chen D. J., Chatterjee A., Burma S.: DNA Repair (Amst). 5, 575 (2006).
- Kinner A., Wu W., Staudt C., Iliakis G.: Nucleic Acids Res. 36, 5678 (2008).
- Sedelnikova O. A., Redon C. E., Dickey J. S., Nakamura A. J., Georgakilas A. G., Bonner W. M.: Mutat Res., v tisku (2010).
- Redon C. E., Dickey J. S., Bonner W. M., Sedelnikova O. A.: Adv. Space Res. 43, 1171 (2009).
- Havelek R., Řezáčová M., Šimková Z., Zárubnická L., Bláha V., Vávrová J.: Acta Veterinaria, v tisku (2010).

20. Finkel T., Serrano M., Blasco M. A.: *Nature* 448, 767 (2007).
21. Bartkova J., Horejsí Z., Koed K., Krämer A., Tort F., Zieger K., Guldborg P., Sehested M., Nesland J. M., Lukas C., Ørntoft T., Lukas J., Bartek J.: *Nature* 434, 864 (2005).
22. Gorgoulis V. G., Vassiliou L. V., Karakaidos P., Zacharatos P., Kotsinas A., Liloglou T., Venere M., Dittullio R. A. Jr., Kastrinakis N. G., Levy B., Kletsas D., Yoneta A., Herlyn M., Kittas C., Halazonetis T. D.: *Nature* 434, 907 (2005).
23. Sedelnikova O. A., Bonner W. M.: *Cell Cycle* 5, 2909 (2006).
24. Nakamura A. J., Redon C. E., Bonner W. M., Sedelnikova O. A.: *Aging (Albany NY)* 1, 212 (2009).
25. Huang X., Halicka H. D., Traganos F., Tanaka T., Kurose A., Darzynkiewicz Z.: *Cell Prolif.* 38, 223 (2005).
26. Huang X., Tanaka T., Kurose A., Traganos F., Darzynkiewicz Z.: *Int. J. Oncol.* 29, 495 (2006).

**M. Řezáčová<sup>a</sup>, R. Havelek<sup>a</sup>, E. Lukášová<sup>b</sup>, and J. Vávrová<sup>c</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Charles University, Hradec Králové,* <sup>b</sup>*Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno,* <sup>c</sup>*Department of Radiobiology, Faculty of Military Medical Service, University of Defence, Hradec Králové*): **Phosphorylation of Histone H2AX – A Novel Indicator of DNA Damage**

H2AX is a variant of histone H2A found in nuclei of eukaryotic cells. In 1998 it was found that after formation of double-strand breaks of DNA (DSB) due to ionizing radiation, H2AX is phosphorylated on serine 139 in the conserved COOH-terminal region. This phosphorylated form is termed  $\gamma$ H2AX. Further studies revealed that  $\gamma$ H2AX formation is an early event in DSB recognition and, subsequently, many proteins engaged in DNA repair, cell cycle regulation, chromatin remodeling and apoptosis are recruited to the DSB site. The  $\gamma$ H2AX presence is limited to the sites around DSB and the phosphorylation is proportional to the DNA damage extent. Methods such as Western blotting, flow cytometry and immunocytochemistry are used to detect  $\gamma$ H2AX. Detection of  $\gamma$ H2AX foci is useful to visualize localized DSB. Quantification of  $\gamma$ H2AX is useful for monitoring DNA damage. Further,  $\gamma$ H2AX is a potential molecular marker in aging and cancer. The present review covers current knowledge of the role of  $\gamma$ H2AX and of methods for its detection and quantification.

Fakulta chemická Vysokého učení technického v Brně  
pořádá při příležitosti oslav 100 let od založení Fakulty chemické  
ve dnech 14.9.-16.9.2011

### 5. ročník konference Chemistry and Life

Odborný program konference zahrnuje všechny oblasti chemie. Hlavními sekcemi konference jsou chemie potravin a biotechnologie, chemie a technologie ochrany životního prostředí, fyzikální a spotřební chemie a chemie a vlastnosti materiálů.

Organizační výbor: P. Diviš (předseda), R. Herrmannová, I. Pipková, M. Weiter, L. Poláček, H. Alexová, J. Brada

Vědecký výbor: J. Havlica (předseda), L. Berglund, J. Čáslavský, M. Chaplin, J. Jančář, J. Kubová, A.J. Leader, L. Omelka, J. Omelková, T. Rustad, P. Šimko, P. Šimon, M. Pekař, M. Veselý

Korespondenční adresa:

5th meeting on Chemistry and Life

Fakulta chemická VUT v Brně, Purkyňova 118, Brno 612 00

email: chl2011@fch.vutbr.cz, [http://www.fch.vutbr.cz/chl\\_2011.html](http://www.fch.vutbr.cz/chl_2011.html)

telefon : 541 149 301, fax: 541 211 697