

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**INDUKCE BUNĚČNÉ SENESENCE**  
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Autor práce:** Ivana Bumanová

**Vedoucí práce:** Mgr. Jiří Handl

**Konzultant:** Mgr. Jan Čapek

**2019**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**INDUCTION OF CELLULAR SENESCENCE**  
BACHELOR THESIS

**Author:** Ivana Bumanová

**Supervisor:** Mgr. Jiří Handl

**Consultant:** Mgr. Jan Čapek

**2019**

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Ivana Bumanová**  
Osobní číslo: **C16225**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Indukce buněčné senescence**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši o buněčné senescenci, induktorech buněčné senescence, aktivačních cestách a dále se věnujte morfologickému popisu buněk, které proces senescence podstupují.
2. V hlavní části práce zpracujte a charakterizujte přehled induktorů buněčné senescence. Popište mechanismus aktivace buněčné senescence včetně popisu aktivačních drah. Dále definujte role proteinů p53, p21, p16 a dalších ve vztahu k aktivaci buněčné senescence. V závěru práce shrňte, jaké jsou typické morfologické znaky senescentních buněk.
3. Jako zdroj informací pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce využijte odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech. Informace přehledně zpracujte podle pokynů a doporučení školitele.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jiří Handl**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Jan Čapek**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

**Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 28. 6. 2019

.....

Bumanová Ivana

Ráda bych poděkovala svému konzultantovi Mgr. Janu Čapkovi za jeho velmi vstřícný přístup a věnovaný čas. Za užitečné rady, připomínky a celkové vedení při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, především své mamince, za podporu během studia.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce je věnována buněčné senescenci se zaměřením na způsoby její indukce. Nejprve je obecně popsán proces buněčné senescence, historie jejího výzkumu a její vztah s buněčným cyklem, který je regulován dráhami proteinů p16, p21, p53 a pRb. Dále jsou popsány dva typy buněčné senescence, replikativní a předčasná. V hlavní části je podrobně vysvětlen mechanismus indukce buněčné senescence a induktory, které ji spouštějí. Mezi ně řadíme epigenetické modifikátory, oxidativní stres, micro-RNA, telomery a onkogeny. U každého induktoru je popsán jeho vznik, proces, jakým působí na buňky a jeho role ve vzniku buněčné senescence. Předposlední kapitola se týká detekce buněčné senescence *in vitro* i *in vivo*, která je zde popsána pomocí tří různých metod. V závěru práce není zapomenuto ani na možné důsledky, které buněčná senescence přináší, a to v rámci běžného stárnutí, onemocnění souvisejícího s věkem a u terapeutických zákroků.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Senescence, buněčná smrt, stárnutí, buněčný cyklus

## **ANNOTATION**

This Bachelor's work deals with a cellular senescence focusing on the ways of its induction. First, it generally describes the process of cellular senescence, the history of its research and its relation with the cell cycle, which is regulated by the p16, p21, p53 and pRb protein pathways. Next are described two types of cellular senescence, replicative and premature. The main part explains in detail the mechanism of induction of cellular senescence and inducers that trigger it. They include epigenetic modifiers, oxidative stress, micro-RNA, telomeres and oncogenes. Each inductor is described by its origin, the process by which it acts on cells and its role in the formation of cellular senescence. The penultimate chapter is about the detection of cellular senescence *in vitro* and *in vivo*, which is described by three different methods. In the end, it is also not forgotten about the possible consequences of cellular senescence in the context of normal aging, age-related diseases and therapeutic interventions.

## **KEY WORDS**

Senescence, cell death, aging, cell cycle



# OBSAH

Úvod.....	13
1 Buněčná Senescence .....	14
1.1 Historie .....	15
1.2 Buněčný cyklus .....	16
1.2.1 Regulace buněčného cyklu .....	17
2 Typy senescence .....	18
2.1 Replikativní senescence .....	18
2.2 Předčasná senescence .....	18
3 Indukce senescence .....	19
3.1 Mechanismus indukce senescence .....	21
3.2 Faktory indukující proces senescence.....	22
3.2.1 Epigenetické modifikátory .....	22
3.2.2 Oxidativní stres .....	25
3.2.3 Micro-RNA .....	28
3.2.4 Telomery .....	29
3.2.5 Onkogeny.....	31
4 Detekce senescence.....	34
4.1 Detekce pomocí SA-β-GAL .....	34
4.2 Imunofluorescenční detekce proteinů obohacená o SAHF.....	35
4.3 Analýza SASP .....	37
5 Důsledky senescence .....	38
5.1 Senescence u běžného stárnutí .....	40
5.2 Senescence u onemocnění souvisejícím s věkem .....	41
5.3 Senescence u terapeutických zákroků .....	42
Závěr.....	44
Použitá literatura .....	45

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma buněčného cyklu.....	16
Obrázek 2: Schéma regulace buněčné senescence pomocí sirtuinů.....	19
Obrázek 3: Dráhy proteinů p53, p21, p16 a pRb v roli buněčné senescence .....	20
Obrázek 4: Schéma molekulárních drah u vynechání mitózy .....	22
Obrázek 5: Schéma epigenetických modifikátorů u buněčné senescence.....	23
Obrázek 6: Exogenní a endogenní zdroje ROS .....	26
Obrázek 7: Zkracování telomer v procesu buněčné senescence.....	30
Obrázek 8: Schéma mechanismu vedoucí k onkogenem vyvolané senescenci ...	33
Obrázek 9: SA-β-gal barvení lidských WI-38 fibroblastů .....	35
Obrázek 10: Fluorescenční barvení SAHF v senescentních buňkách .....	36
Obrázek 11: Kvantifikace faktorů SASP vysokoobsahovou analýzou s barvením pomocí DAPI a TXRED .....	38
Obrázek 12: Senescence u stárnutí, onemocnění souvisejícím s věkem a terapeutických zákrocích .....	39
Obrázek 13: Senescentní buňky ve funkci ovládání a zesilování diabetu mellitu 2. typu.....	42

## SEZNAM ZKRATEK

3'UTR mRNA	3'netranslatovaná oblast mRNA
ADP	adenosindifosfát
APC/C	anafázu podporující komplex/cyklozom
CDK	cyklin-dependentní kinázy
CpG	cytosin-fosfát-guanin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCR2	Decoy receptor
DEC1	diferenciovaný embryonální chondrocyt
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNMT1	DNA (cytosin-5)-methyltransferáza 1
DDR	reakce na poškození DNA
FADH <sub>2</sub>	flavinadenindinukleotid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
HP-1	heterochromatinový protein 1
hTERC	gen pro lidskou telomerázu
hTERT	enzymatická telomerázová transkriptázová katalytická podjednotka
IL-1, -6, -8	interleukiny
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NK	Natural killer
NOX	NADPH oxidázy
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
MEF	faktor zvětšující myocyty
mRNA	mediátorová RNA
mi-RNA	micro-RNA
O <sub>2</sub> <sup>·</sup>	superoxid
·OH	hydroxylový radikál
OH <sup>-</sup>	hydroxylový anion
ONOO <sup>-</sup>	peroxynitrit
PAI1	inhibitor plazminogenového aktivátoru

qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
pRb	retinoblastomový protein
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní druhy kyslíku
SA-β-GAL	se senescencí související β galaktosidáza
SAHF	heterochromatinová ohniska spojená se senescencí
SAHH	S-adenosylhomocystein hydroláza
SASP	sekreční fenotyp související se senescencí
Si-RNA	small interfering RNA
SIRT	tichý informační regulační protein
SOD	superoxid dismutáza
T <sub>h</sub> lymfocyty	pomocné T lymfocyty
TRF	faktor uvolňující thyrotropin

## ÚVOD

Buněčná senescence je poměrně nové téma, se začátky výzkumů ve druhé polovině 20. století. Týká se inhibice buněčného cyklu, která je v tomto ohledu nevratným procesem, u něhož nejsou dosud známy žádné fyziologické stimuly, které by dokázaly senescentní buňky navrátit do jeho běhu. Od ostatních buněk se liší nemožností replikace, i přesto, že uvnitř jsou zcela metabolicky aktivní.

Senescence je tedy tzv. stárnutí buněk, které hraje důležitou roli v omezení šíření poškozených buněk nebo buněk s defekty. Je stanovena a udržována dvěma hlavními dráhami proteinů p53-p21 a p16-pRB. V aktivně se dělících buňkách mohou být odezvy senescence indukovány předčasně vlivem endogenních a exogenních stimulů, které souvisí s proliferačním stresem a/nebo jsou schopny vyvolat poškození DNA.

Cílem této bakalářské práce je rozebrat proces buněčné senescence. Stěžejní část práce je věnovaná mechanismu její indukce a faktorům, které ji indukují. Zároveň je i cílem přiblížení této problematiky a důsledků, které vlivem buněčné senescence nastávají.

# 1 BUNĚČNÁ SENESCENCE

Buněčná senescence, neboli buněčné stárnutí, je nezvratná zástava buněčného cyklu. Dochází k ní v důsledku vlivu různých stimulů, do kterých řadíme poškození DNA (deoxyribonukleová kyselina), zkracování telomer a jejich dysfunkce, onkogenní stres, a další. V rámci zachování homeostázi dochází k inhibici buněčného cyklu, zamezuje se replikaci starých nebo poškozených buněk a neoplastické transformace. Kromě zástavy buněčného cyklu senescentní buňky prodělávají mnoho jiných fenotypových změn, jako je metabolické přeprogramování, přeuspořádání chromatinu, nebo autofágová modulace (Herranz et al., 2018; Muñoz-Espín et al., 2014; Wang et al., 2018). Dále senescentní buňky produkují a sekretují složitou kombinaci faktorů, které se společně označují jako senescenčně-asociační sekreční fenotyp. Ten zprostředkovává většinu jejich neautonomních efektů. Vzhledem k tomu, že ovlivňují sekreční fenotyp několika fyziologických a patologických procesů, včetně rakoviny a s věkem souvisejících onemocnění (např. Alzheimerova choroba, diabetes mellitus 2. typu, rakovina), se v současné době prozkoumávají pro-senescentní a anti-senescentní terapie (Herranz et al., 2018).

Senescentní buňky mají pleiotropní účinek na vývoj, stárnutí a regeneraci tkání, hojení ran a potlačení nádorů. Jejich odstranění ze stárnoucích tkání nebo preneoplastických lézí může zpomalit tkáňovou dysfunkci a vést ke zhoršení zdravotního stavu. Avšak důležitou překážkou v oblasti stárnutí je identifikace univerzálního biomarkeru, který usnadňuje detekci a kvantifikaci typů senescentních buněk *in vitro* a *in vivo*. Senescentní buňky se hromadí ve stárnoucí a kůži, kde přispívají k patologickým stavům a změnám kůže (Wang et al., 2018).

Na rozdíl od apoptózy (programované buněčné smrti) zůstávají senescentní buňky životaschopné a metabolicky aktivní (Rodier et al., 2011). Přestože mohou být rozpoznány T<sub>h</sub> lymfocyty (pomocné T lymfocyty) zachyceny makrofágy a NK buňkami imunitního systému, jejich počet se zvyšuje spolu s přirozeným stárnutím tkání (Hoenicke et al., 2012; Kang et al., 2011). Není však zřejmé, kde je hranice mezi vstupem do senescence a apoptózou. Bylo však prokázáno, že buňky v S-fázi podléhají procesu apoptózy pokud jsou vystaveny subletálními koncentracemi peroxidu vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Naopak u buněk ve fázích G1 a G2/M dochází k zástavě buněčného cyklu. Kromě toho hraje důležitou roli i stres. Zatímco nízká dávka oxidativního stresoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> může indukovat senescenci v diploidním lidském fibroblastu,

vyšší dávky způsobují apoptózu. To podporuje hypotézu, že senescence a apoptóza jsou dva paralelní procesy, způsobeny různým poškozením buněk. Tyto dvě cesty se mohou protínat na jednom nebo více zatím nedefinovaných místech (Bladier et al., 1997; Chen et al., 2000).

## 1.1 Historie

V roce 1908 se Alexis Carrel zajímal o růst buněk v kulturách. V roce 1912 přišel s kulturou z buněk fibroblastů z kuřecích srdcí, která poté rostla v jeho laboratoři po 34 let. Tato práce vedla k obecnému přijetí myšlenky, že buňky obratlovců se mohou neomezeně dělit (Witkowski, 1985).

Na buněčné úrovni bylo stárnutí poprvé popsáno Leonardem Hayflickem a Paulem Moorheadem v roce 1961 (Hayflick et al., 1961). Ti prokázali, že somatické buňky savců mají omezený počet buněčného dělení, po kterém vstoupí do nezvratného zástavu růstu nazývaného buněčná senescence. Molekulární základ, na němž stojí Hayflickovo pozorování vyšlo až o desetiletí později. Na počátku sedmdesátých let Watson a Olovnikov navrhli, že během semi-konzervativní DNA replikace lineárních chromozomů, by odstranění koncového RNA (ribonukleová kyselina) primeru, který je zapotřebí k zahájení syntézy zpoždujícího se řetězce, mělo za následek vytvoření mezery, která již nemůže být naplněna konvenční DNA polymerázou. Důsledkem tohoto „problému konce replikace“ dochází ke zkrácení chromozomálních terminálních sekvencí, nazývaných telomery, během každého replikačního cyklu (Blackburn et al., 1984; Olovnikov, 1973; Allsop et al., 1992).

Buněčná senescence byla původně definována jako stabilní výstup z buněčného cyklu, který byl způsoben konečnou proliferační kapacitou kultivovaných lidských fibroblastů (Hayflick et al., 1961). V současné době se stárnutí buněk považuje za stresovou reakci, která může být vyvolána širokou škálou vnitřních i vnějších faktorů.

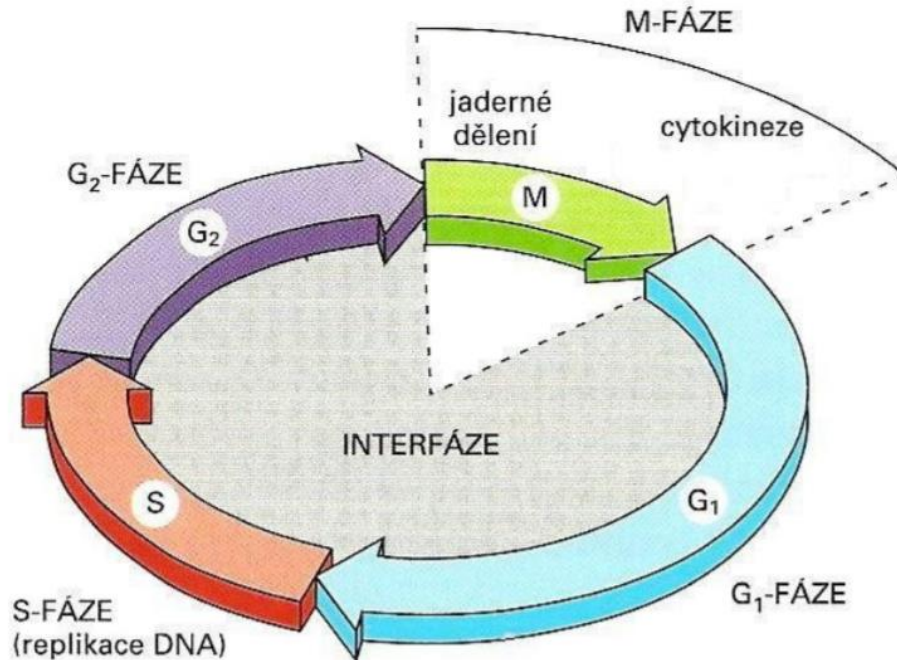
V červenci roku 2013 se uskutečnila v Cambridge mezinárodní konference „Buněčná senescence v oblasti rakoviny a stárnutí“, která definovala buněčnou senescenci. Stárnutí buněk je stabilní zastavení jejich dělení, které je iniciované řadou molekulárních spouštěčů, včetně aktivovaných onkogenů a nadbytečného dělení buněk. Navíc senescentní buňky produkují směs zánětlivých a tkáňových regulátorů, které ovlivňují chování sousedních buněk, včetně těch imunitních.

Buněčná senescence je důležitým mechanismem v potlačení nádorů, současně pravděpodobně přispívá k stárnutí tkání a organismu (Campisi, 2013).

## 1.2 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je proces začínající vznikem buňky až po její rozdělení na dvě buňky dceřiné. Jedná se o koordinovaný sled procesů, jehož výsledkem je replikace genetického materiálu spolu s dalšími buněčnými složkami do dvou dceřiných buněk. Buněčný cyklus můžeme obecně rozdělit do dvou částí, kterými jsou interfáze a mitotická fáze.

V interfázi probíhá růst buňky, jejích organel a buněčné stěny. Celkem se skládá ze tří fází, G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub>. V G<sub>1</sub> fázi dochází k růstu a určení funkce buněčných organel, syntéze nukleotidů a enzymů potřebných pro replikaci DNA. V S fázi dochází v buňce k replikaci DNA. V G<sub>2</sub> fázi pokračuje buňka v růstu, dochází k tvorbě mitotického aparátu a přípravě na mitotickou fázi neboli M fázi (Slabý, 2015). M fáze je poměrně kratší ve srovnání s interfází. Dochází k zastavení růstu a k samotnému dělení buňky, ke karyokinezi (jaderné dělení), kterou můžeme dále rozdělit na profázi, metafázi, anafázi a telofázi, a cytokinezi (cytoplazmatické dělení) (obrázek 1).



Obrázek 1: Schéma buněčného cyklu (převzato a upraveno z Alberts et al., 1998).



### 1.2.1 Regulace buněčného cyklu

Buněčný cyklus obsahuje několik kontrolních bodů. Pokud se před kontrolním bodem buněčného cyklu vyskytne nějaký defekt, který zneschopňuje správné dělení buňky, mechanismus kontrolního bodu zabrání vstupu buňky do další fáze cyklu. První kontrolní bod se nachází na konci G1 fáze. Tento bod rozhoduje, zda se buňka bude dělit, bude dělení oddáleno, nebo se cyklus zastaví a přejde do klidové G0 fáze. Výjimkou jsou např. jaterní buňky, které jsou schopny se z G0 fáze dostat do G1 fáze a začít se opět dělit. Druhý kontrolní bod je v G2 fázi, který kontroluje buňku před vstupem do M fáze. Třetí bod se nachází v anafázi a kontroluje, zda jsou chromozomy správně navázány na dělicí vřeténko, aby mohlo dojít k jejich rozchodu k pólům buňky.

Regulace buněčného cyklu je dále zajištěna proteiny, které reagují na vnější i vnitřní prostředí buňky a zajišťují její přežití. Mezi dva nejdůležitější proteiny řadíme cykliny a cyklin-dependentní kinázy (CDK). Cykliny obsahují regulační podjednotky a jsou aktivátory CDK, která naproti tomu obsahuje podjednotky katalytické. Funkcí aktivované CDK je fosforylace příslušného proteinu a jeho aktivace či inaktivace, která rozhoduje o vstupu do další části buněčného cyklu (Slabý, 2015; Uhlmann et al., 2011).

Jeden z nejvýznamnějších proteinů pro transkripci genů je retinoblastomový protein (pRb), sloužící pro syntézu DNA a pokračování buněčného cyklu z G1 fáze do S fáze. Slouží zde jako inhibitor a zabraňuje tak nekontrolovatelnému množení buněk. Principem je jeho navázání na transkripční faktor E2F, který se díky tomu stane neaktivním. Jeho další aktivace je možná až po fosforylaci proteinu pRb pomocí CDK (konkrétně komplexem cyklinu D a CDK4/6), kde se z něj uvolní a translokuje do buněčného jádra, ve kterém spouští transkripci (Slabý, 2015). V buněčném jádře dále reguluje replikaci a následnou opravu DNA, průběh mitózy a apoptózy. U přechodu z S fáze do M fáze se namísto cyklinu D podílí cyklin B, který tvoří komplex s CDK1 kontrolující genetický materiál a stav buňky pro mitózu (Ubersax et al., 2003).

Dalším důležitým proteinem je transkripční faktor p53, který je kódován genem TP53. Jeho úkolem je působit inhibičně proti vzniku nádorů (Vousden et al., 2002). Protein p53 je aktivován pomocí inhibitorů CDK. Po aktivaci sám aktivuje transkripční gen p21. Protein p21 je schopen zastavit buněčný cyklus a způsobit apoptózu buňky, kterou pomocí vzniklých bariér chrání před vznikem tumoru. Pokud buňka tento faktor

postrádá, dochází k replikaci poškozené DNA a tím k rozšíření tumoru do dalších buněk (Vougelstein et al., 2000).

## **2 TYPY SENESCENCE**

Buněčnou senescenci můžeme rozdělit na dva typy, replikativní senescenci a předčasnou senescenci.

### **2.1 Replikativní senescence**

Replikativní senescence je proces, do kterého se viabilní somatické buňky dostávají po zástavě buněčného cyklu v G1 fázi, který je nevratný a buňky v něm mohou setrvat i několik let. Zároveň je spojen s výraznými změnami genové exprese a funkce (Effros, 2007). V dalších studiích bylo zjištěno, že replikativní senescence je způsobena nestabilitou telomer. Telomera je komplex telomerní DNA a vázajících faktorů (např. TRF, faktor vázající thyrotropin), které vážou opakující se telomerové sekvence. Replikativní senescence je stav způsobený neustálým zkracováním telomer v průběhu buněčného cyklu, když počet dělení dosáhne tzv. Hayflickova limitu, což je v průměru 50-60 dělení. Vznikají tedy plně životaschopné buňky s nemožností se dále dělit. První studie probíhaly na lidských plicních fibroblastech, kdežto další pak i na jiných typech buněk, jako např. v buňkách epitelu či hepatocytu (de Lange, 2004; Slabý, 2015).

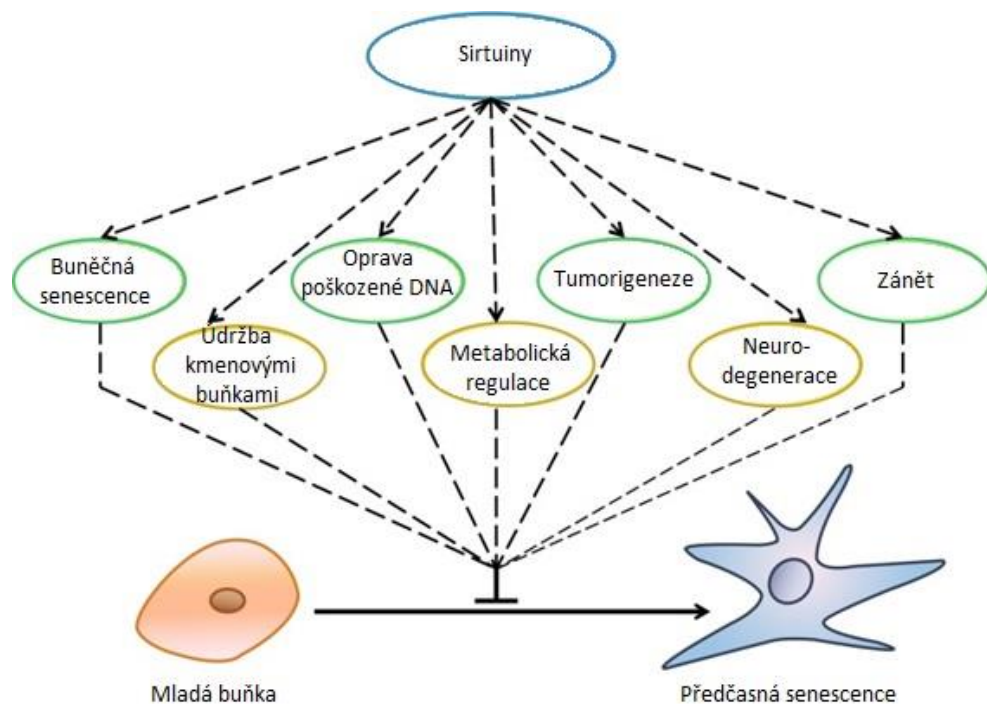
Mezi nejčastější induktory replikativní senescence řadíme perzistentní viry a nádorové antigeny (Chou et al., 2013).

### **2.2 Předčasná senescence**

Senescence nemusí být způsobena pouze zkracováním telomer, jako je tomu u replikativní senescence, ale může být následkem jiných vlivů. Mezi ně řadíme onkogeny, stres, nebo poškození genetického materiálu (Suzuki et al., 2008).

Předčasná senescence se dostala do popředí zájmu hlavně kvůli vzrůstajícímu počtu osob s chorobou předčasného stárnutí, přičemž značná část syndromů pochází z mutací konkrétních genů. Např. syndromy vycházející z laminopatie (genetické poruchy vycházející z mutací genů, které kódují laminy a interagující proteiny), které pochází z mutace genu LMNA nebo ZMPSTE24 (Schreiber et al., 2013). Řadíme sem i mutace nebo delece genů, které se podílejí na znovuobnovení poškozené DNA nebo remodelování chromatinu. V tomto ohledu podporují sirtuiny nebo tiché informační regulační proteiny (SIRT) protistárnoucí procesy ve spektru

biologických procesů, jako je metabolická regulace, udržení genomu, suprese nádorů nebo zánětů (obrázek 2). Sirtuiny jsou evolučně zachovalé NAD<sup>+</sup> (nikotinamidadenindinukleotid) dependentní deacylasy a ADP-ribosyltransferasy (adenosindifosfát-ribosyltransferáza). U savců bylo identifikováno sedm typů sirtuinových proteinů se zachovalými centrálními katalytickými jádry ohraničenými různými aminovými a karboxylovými zbytky, které dávají sirtuinům jejich individualitu z hlediska struktury, buněčné lokalizace a fungování (Ghosh et al., 2014; Choi et al., 2014; Saunders et al., 2007).

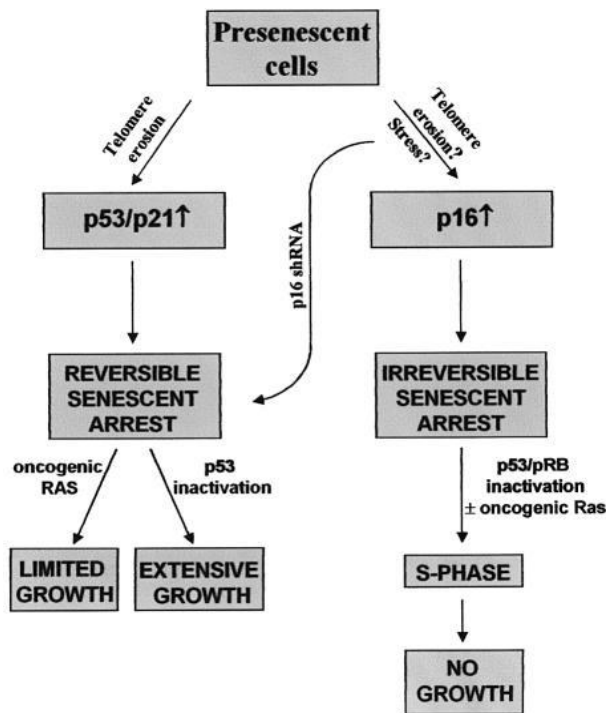


Obrázek 2: Schéma regulace buněčné senescence pomocí sirtuinů (převzato a upraveno z Ghosh S. et al., 2015).

### 3 INDUKCE SENESCENCE

Omezený proliferativní potenciál živočišných buněk je obecně chápán jako důsledek zkracování telomer. Progressivní zkracování telomer nakonec odhaluje neuzavřené dvojité prasknutí DNA, které spouští perzistentní aktivaci DDR (reakce na poškození DNA). Na neuzavřené dvojité prasknutí DNA na konci telomer se připojuje zmutovaná ataxia telangiectasia (syndrom Louis-Barové; vzácný neurodegenerativní syndrom postihující např. i kůži a oči), která dále fosforyluje a aktivuje gen p53. Poškození DNA v genomu, které je indukované řadou genotoxických stresorů (např. ionizující záření, ultrafialové záření, oxidační činidla),

také aktivuje DDR a následně reguluje protein p53. Aktivovaný protein p53 transkripčně indukuje pleiotropní faktory, jako je protein p21 a řada dalších. Tyto pleiotropní faktory pak společně regulují proces senescence (obrázek 3) (Rufini et al., 2013; Shay et al., 2005).



Obrázek 3: Dráhy proteinů p53, p21, p16 a pRb v roli buněčné senescence (převzato z Beausejour C. M., 2003); zkratky: pRb – retinoblastomový protein.

Kanonické poškození DNA, aktivace onkogenu nebo DNA replikativní stres vyvolaný nadměrnou expresí cyklinů (např. CDK2) také způsobují indukci senescence. Exprese onkogenně mutovaného proteinu Ras (Rasv12) v primárních fibroblastech má za následek trvalé zastavení buněčného cyklu závislé na proteinech p53 a p16. Aktivace onkogenu vede k produkci reaktivních forem kyslíku nebo hyperaktivaci DNA replikace, což vede k DDR a aktivaci proteinu p53. Inaktivace pRb zprostředkovaná proteinem p16 také trvale zastavuje buněčný cyklus, ale je nepravděpodobné, že je regulována odpovědí na kanonické poškození DNA. Spíše je stimulován jinými stresovými mechanismy včetně p38-MAPK (mitogenem aktivovaná protein kináza) dráhy. Naproti tomu je protein p16 výrazně potlačován geny skupiny Polycomb (např. Bmi-1). Jejich nedostatek vede k předčasné senescenci, a naopak nadměrná exprese vyvolává immortalizaci buněk. Dráha p16-pRb může fungovat ve většině forem senescence buď samostatně, nebo v kombinaci s dráhou

p53-p21 v závislosti na stresoru nebo typu buňky (Johmura et al., 2016; Wong et al., 2009).

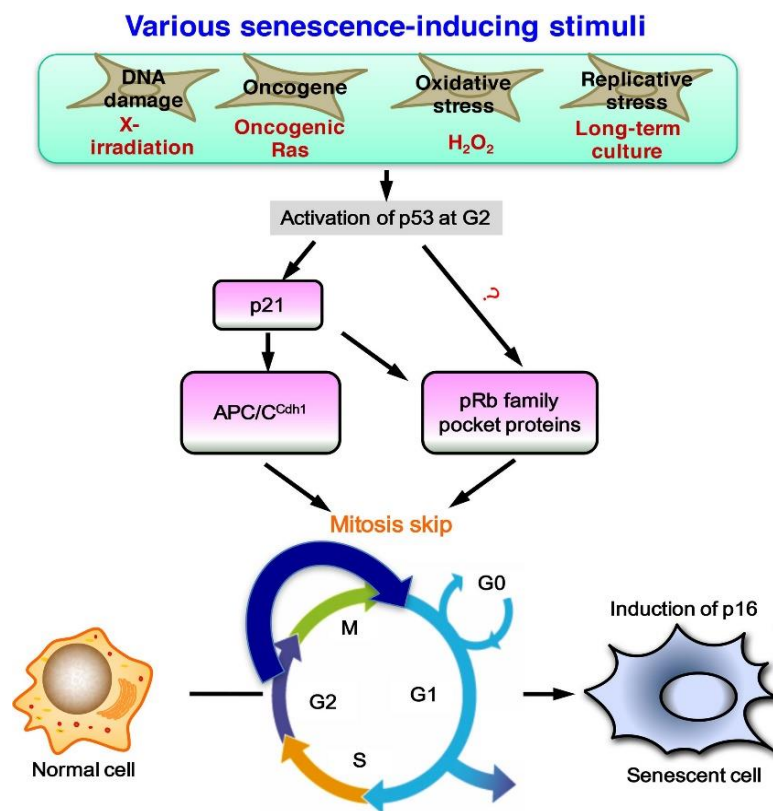
Mezi indukci senescence nezávislou na proteinech p53 a p16 řadíme např. proliferaci vyvolanou proteinem Raf-1 v lidských epiteliálních buňkách prsu, která je nezávislá na přítomnosti funkčního proteinu p16 nebo na inaktivaci proteinů p53 a pRb (Olsen et al., 2002).

### 3.1 Mechanismus indukce senescence

Buněčná senescence může být indukována různými podněty (obrázek 4). Všechny stimuly indukující buněčnou senescenci nakonec aktivují reakci, která způsobí poškození DNA. Poté dojde k aktivaci obou drah kontrolních bodů kinázy p53 a p38-MAPK. Aktivovaný protein p53 transkripčně reguluje protein p21, který inhibuje cyklin-dependentní kinázu 2 (CDK2). Kináza CDK2 zprostředkovává inaktivaci proteinu pRb, která pak brání vstupu buněk do S fáze buněčného cyklu. Dráha p38-MAPK zvýšeně reguluje protein p16, který brání CDK4 nebo CDK6 v inaktivaci proteinu pRb. Ačkoliv proteiny p53 i pRb jsou nezbytné pro indukci senescence, jejich pouhá aktivace je pro ni nedostatečná. Specifické mechanismy a fáze, ve které senescentní buňky opouštějí buněčný cyklus, jsou zatím nejasné (Adams, 2009; Johmura et al., 2016; Kuilman et al., 2010).

Aby bylo možné určit, ve které fázi senescentní buňky vystupují z buněčného cyklu, je potřeba použít fluorescenční zobrazovací analýzu založenou na indikátorech (např. FUCCI indikátory) a ubikvitinaci (označení proteinů, které jsou určeny k odbourání). Většina lidských diploidních buněk vlivem několika stimulů, které indukují senescenci, poukazují na degradaci indikátoru S/G2 fáze (FUCCI mAG1 indikátor) a akumulaci indikátoru G1 fáze (FUCCI mKO2 indikátor) bez vstupu do mitózy (Johmura et al., 2014). Buňky vlivem různých stimulů indukující senescenci přeskakují v rámci buněčného cyklu mitózu a vykazují tetraploidii v G1 fázi před vstupem do trvalého stavu zastavení proliferace. Obdobně funguje i inhibice CDK1 a CDK2 pomocí proteinu p21 v G2 fázi. Předčasně se aktivuje anafázu podporující komplex/cyklozom ((APC/C)<sup>Cdh1</sup>), jehož účelem je degradace různých substrátů APC/C. Degradace těchto substrátů vede k dlouhodobému zastavení růstu v G2 fázi jako následek poškození DNA (Johmura et al., 2016; Wiebusch et al., 2010).

Ztráta mitotických proteinů, které jsou potřebné pro postup z G2 fáze do mitózy je hlavní příčinou, proč buňky přeskakují mitózu. Tato ztráta mitotických regulátorů, jakožto i přeskakování mitózy je závislá na funkčním proteinu p53. I pouhá přechodná exprese p53 v G2-fázi stačí na přeskočení mitózy s následnou indukcí senescence. Dále p53 potlačuje transkripci mitotických regulátorů pomocí inaktivace pRb rodiny kapesních proteinů (pRb, p107 a p130). Aktivace p53 v G2 fázi je tedy kritickým faktorem indukce senescence pomocí předčasné aktivace (APC/C)<sup>Cdh1</sup> a inaktivace pRb rodiny tzv. „pocket proteinů“ (Baus, 2003; Johmura et al., 2016; Wiebusch et al., 2010).



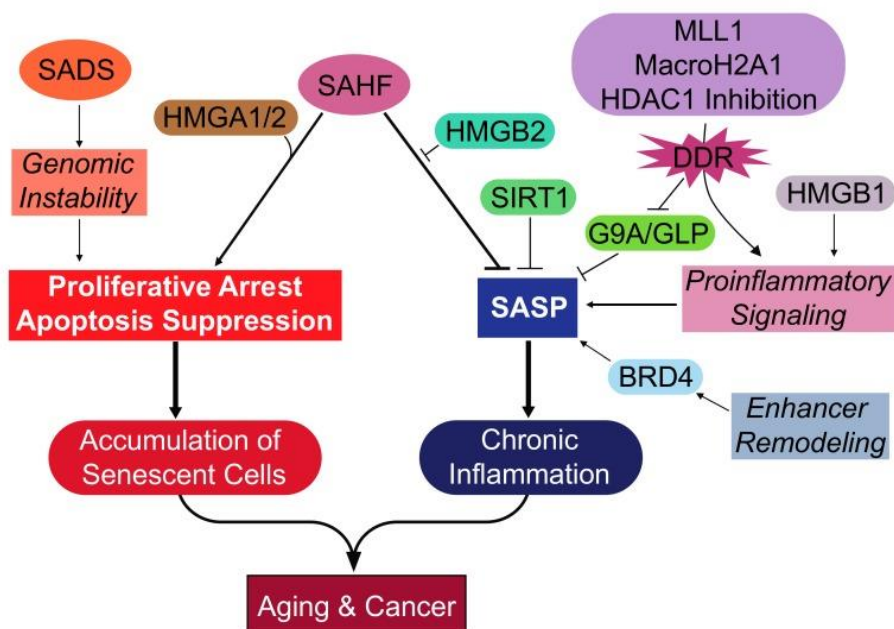
Obrázek 4: Schéma molekulárních drah u přeskočení mitózy (převzato z Johmura Y. et al., 2016); zkratky: APC/C – anafázi podporující komplex; DNA – deoxyribonukleová kyselina; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peroxid vodíku; pRb – retinoblastomový protein.

## 3.2 Faktory indukující proces senescence

### 3.2.1 Epigenetické modifikátory

Epigenetické změny se v buňkách vyskytují jako dynamická vlastnost, která aktivuje nebo inaktivuje řadu genů (obrázek 5). Mezi tyto změny řadíme metylaci DNA, deacetylaci, ubikvitinaci a fosforylaci. Methylace DNA hraje významnou roli v buněčné senescenci (Laird, 2005; Leonart et al., 2009).

Hladina methylace v genomu se postupně snižuje během replikativní senescence a dochází ke globální hypomethylaci. To je spojeno se snížením exprese methylového enzymu DNMT1 (DNA (cytosine-5)-methyltransferáza 1). Senescence je doprovázena změnami v methylaci DNA v tumor supresorových genech a stochastickými methylačními změnami genomu. Nejdůležitějším tumor supresorovým genem je gen pro protein p16. Methylace promotoru proteinu p16 způsobuje inhibici, následnou ztrátu proteinu a přispívá i k imortalizaci lidských epiteliálních buněk (např. v prsní žláze). Náhodná methylace, která souvisí se senescencí se vyskytuje v důsledku selhání aktivity methyltransferázy a/nebo vystavení faktorům prostředí a zdraví jedince (Ushijima et al., 2005).



Obrázek 5: Schéma epigenetických modifikátorů u buněčné senescence (převzato z Crowe E. P. et al., 2014); zkratky: BRD4 – brodomain obsahující protein 4; DDR – reakce na poškození DNA; G9A/GLP – komplex histon lysin dimethyltransferázy; HDAC1 – histon diacetyláza 1; HMGA1/2 – vysoce mobilní skupina proteinů charakterizovaná proteinem vázajícím DNA; HMGB1 – vysoce mobilní protein 1; HMGB2 – vysoce mobilní protein 2; MacroH2A1 – histon macroH2A1; MLL1 – protein smíšené linie leukemie 1; SADS – náhlý syndrom arytmičké smrti; SAHF – heterochromatinová ohniska spojená se senescencí; SASP – sekreční fenotyp související se senescencí; SIRT1 – tichý informační regulační protein 1.

Svou roli zde hraje i methylační enzym S-adenosylhomocystein hydroláza (SAHH). Inaktivace SAHH přemostňuje replikativní senescenci, indukuje imortalizaci buněk a tím ovlivňuje dráhy p53 a pRb. Navíc SAHH byl v lidských nádorových buňkách na úrovni mRNA (mediátorová RNA) a proteinů změněn. To poukazuje na to, že by tento enzym mohl patřit do skupiny supresorových genů u nádorů.

Fakt, že SAHF je schopen modulovat senescenci posiluje význam methylačních enzymů u immortalizace a vývoji rakoviny (Leal et al., 2008; Lleonart et al., 2009).

Analýza methylace DNA v genomech T-buněk (CD4<sup>+</sup>) získaných z novorozence a stoletého jedince odhalila globální ztrátu methylace DNA, která souvisí s věkem s diferenciatně methylovanými místy v promotoru (10 %), exonických (10 %), intronických (45 %) a intergenických (35 %) oblastech (Heyn et al., 2012). Když Hein et al. (2012) srovnávali globální methylační hladiny v genomech novorozenců a stoletých jedinců vůči 26letým jedincům, zjistili, že hladina globální methylace DNA je u 26letých jedinců ve středních hodnotách. Navrhli tedy model, který popisuje, že buňky postupně hromadí změny methylace DNA v průběhu věku (Sidler et al., 2017).

Během prvních kroků vedoucích k senescenci má významnou roli akumulace domén heterochromatinových ohnisek. Tyto heterochromatinová ohniska spojená se senescencí (SAHF) se shodují s cílovými promotory E2F. Pro vznik SAHF jsou důležité proteiny p53 i pRb. Senescence v reakci na aktivaci onkogenu také zahrnuje tvorbu SAHF. Z důvodu absence telomerázy se telomery a subtelomerní místa staly deheterochromatizovanými. Na základě této skutečnosti přišli Zhang a Adams (2007) s modelem, který navrhoval, že během senescence jsou heterochromatické znaky redistribuované z míst konstitutivního heterochromatinu, jako jsou např. telomery nebo pericentromery, do míst fakultativního heterochromatinu, jako je SAHF (Lleonart et al., 2009; Zhang et al., 2007).

Hypomethylace se primárně vyskytovala u promotorů chudých na CpG (cytosin-fosfát-guanin) nebo u tkánově specifických promotorů. Je častější v oblastech genomů obohacených polykombovými proteiny nebo permisivními modifikacemi histonu. Naopak hypermethylace DNA se primárně vyskytovala v sekvencích bohatých na CpG. Když byly porovnány znaky genové exprese a methylace DNA u WI38 buněk v průběhu jejich života, byla pozorována stejnou tendenci hypomethylace DNA s některými místy genomů, které jsou hypermethylované. Avšak zřídka odpovídaly diferenciatní genové expresi. Zatímco methylační stav hypermethylovaných míst byl v různých tkáních poměrně robustní, hypomethylační místa vykazovala větší tkáňovou specifitu. Hypomethylovaná místa se běžněji nalézají na CpG krajích než ty hypermethylované, které se ve velké míře vyskytují v polykombových genech. Hypermethylace je více místně specifická ve srovnání s hypomethylací (Lleonart et al., 2009; Sidler et al., 2017).

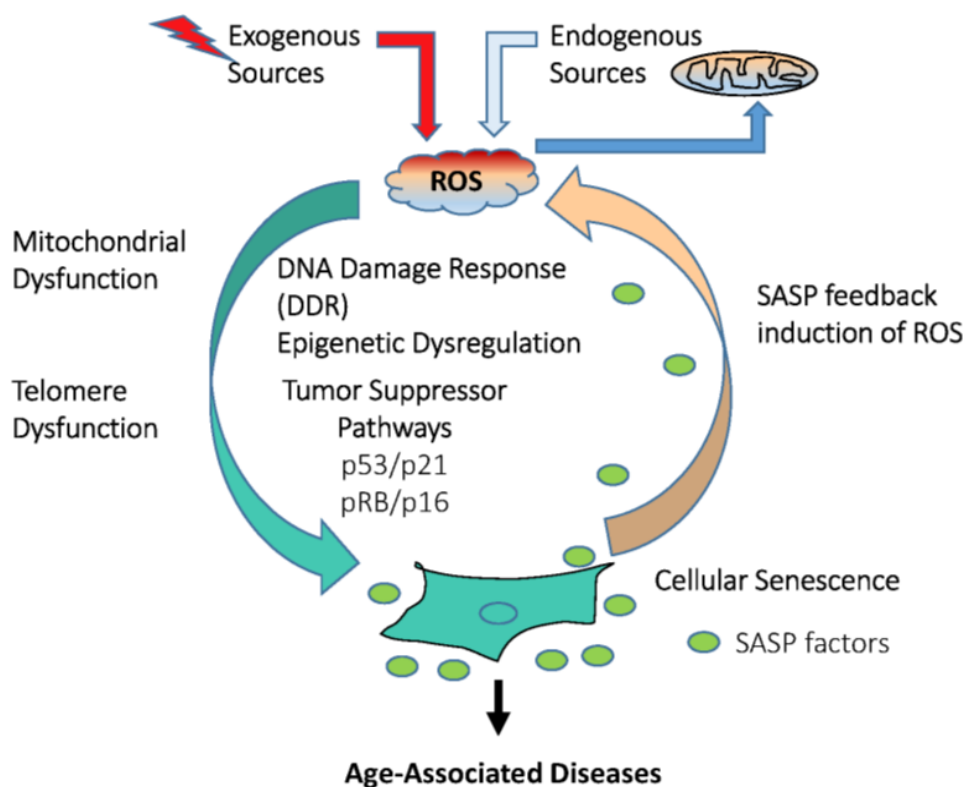


Posun k hypomethylaci konstitutivního heterochromatinu a hypermethylace promotorů v genech podporující buněčný cyklus mohou vyvolat zvýšenou nestabilitu genomu a vést k trvalému zastavení buněčného cyklu. Kromě toho může diferenciální methylace CpG promotorů také přispět ke změnám v profilech genové exprese v průběhu senescence (Lleonart et al., 2009).

### 3.2.2 Oxidativní stres

Reaktivní formy kyslíku (ROS) mohou způsobit vážné poškození buněk. Kumulativní oxidační poškození způsobuje nebo urychluje senescenci, zatímco immortalizované buňky jsou rezistentní vůči senescenčnímu účinku oxidačního poškození. Snížení koncentrace kyslíku v prostředí buněk z 20 % na 1–5 % je zdrojem oxidativního stresu, kdy buňky zvyšují replikační životnost mezi 20–50 % (Chen et al., 1995; Lleonart et al., 2009). Pokud jsou redoxní regulační účinky oxidantů v rovnováze, ROS hrají důležitou roli v signálních transdukčních kaskádách zvyšujících nebo inhibujících buněčnou osudu (jako je proliferace nebo diferenciace). Když se dosáhne oxidačního stavu a prodlouží se, může dojít ke vzniku senescence, kde důležitými mediátory progresu buněčné senescence jsou právě ROS. K indukci buněčné senescence může dojít exogenním navýšením  $H_2O_2$ . Endogenní ROS, jako je superoxid  $O_2^{\cdot-}$  a vysoce reaktivní hydroxylový radikál  $\cdot OH$ , mohou v procesu senescence přispívat k udržení nezvratné zástavy růstu (Höhn et al., 2017; Sien, 2015).

Organismus, jeho tkáně, buňky a makromolekuly se dostávají do styku s ROS uvnitř buněk nebo v jejich prostředí. Podle toho rozlišujeme zdroje ROS na endogenní a exogenní (obrázek 6). Do exogenních zdrojů řadíme ultrafialové záření, ionizující záření a umělé zdroje jako jsou chemoterapeutika, environmentální toxiny, a další znečišťující látky. Mohou vyvolat různé mutace DNA a navýšit množství ROS v mitochondriích a cytosolu. Vystavení exogenním zdrojům, které iniciují produkci ROS, je převládající u kožních buněk, které jsou neustále v kontaktu s vnějším prostředím. Záření může reagovat s kyslíkem a vytvořit  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ , nebo  $OH^-$  (hydroxylový anion), které jsou schopny narušit strukturní integritu DNA prostřednictvím rozpadu vazeb mezi dusíkatými bázemi a fosfodiesterovými vazbami. Některé xenobiotika interferují s mitochondriální bioenergetikou a podporují tím produkci  $O_2^{\cdot-}$  (Pole et al., 2016; Valko et al., 2006).



Obrázek 6: Exogenní a endogenní zdroje ROS (převzato z Pole A. et al., 2016); zkratky: DNA – deoxyribonukleáza; DDR – reakce na poškození DNA; pRb – retinoblastomový protein; ROS – reaktivní formy kyslíku; SASP – sekreční fenotyp související se senescencí.

Většina ROS je produkována endogenně v buněčných kompartmentech různými enzymy. Např. v endoplazmatickém retikulu je tvorba ROS způsobená únikovým přenosem elektronů z NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfát) na cytochrom P450. NADPH oxidázy (NOX) jsou skupinou enzymů s oxidázovou aktivitou, které jsou důležité při produkci volných radikálů souvisejících se senescencí. Tyto vysoce reaktivní molekuly ROS mají schopnost narušovat fungování buňky v rámci indukce buněčné smrti či buněčné senescence. Hrají klíčovou roli ve věkově podmíněné endotelové dysfunkci a jsou také zapojeny do přenosu mechanických signálů stresu prostřednictvím změny redoxní rovnováhy, procesu zvaným redoxní biologie. Na rozdíl od vysoké hladiny ROS, která má za následek poškození makromolekul, se redoxní biologie týká modulace hladin ROS, které aktivují signální cesty k zahájení biologických procesů, jako je proliferace, zánět a stárnutí. V závislosti na koncentraci ROS a subcelulární lokalizaci může být buněčná odezva buď poškození vyvolané oxidativním stresem nebo redoxní signalizace. Například zvýšení hladiny mitochondriálního  $O_2\cdot$  prodlužuje životnost, zatímco cytosolické ROS životnost zkracují. Dále jsou ROS nezbytné pro aktivaci

autofagie a inhibici produkce ROS antioxidační léčbou, která vede k buněčné smrti. ROS jsou tedy signální molekuly, které jsou schopny vyvolat buď příznivé nebo škodlivé účinky v závislosti na intracelulárních a environmentálních faktorech (Bu et al., 2017; Krause, 2007; Pole et al., 2016; Schieber et al., 2014).

Většina intracelulárního ROS je produkována mitochondriemi, které jsou jejich nejvýznamnějším zdrojem, přes mitochondriální elektronový transportní řetězec. Elektronové nosiče NADH (nikotinamidadenindinukleotid) a FADH<sub>2</sub> (flavinadenindinukleotid) přivádějí elektrony do komplexu I (NADH dehydrogenáza) a komplexu II (sukcinátdehydrogenáza) a nakonec se přenesou do komplexu III (komplex cytochromu bc<sub>1</sub>) a IV (cytochrom c oxidáza). Po komplexu IV jsou elektrony zachyceny molekulárním kyslíkem a následně jsou potřebné pro tvorbu vody. Avšak pokud se jedná o dysfunkční mitochondrii, mohou mít elektrony tendenci předčasně unikat v komplexu I a III, což vede k tvorbě oxidantů jako je O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Při produkci v mitochondriích má tato radikálová molekula schopnost narušit mitochondriální integritu a způsobit nezvratné poškození a mutace molekul DNA a proteinů, které vedou k vytvoření smyčky pozitivní zpětné vazby. Smyčku pozitivní zpětné vazby mohou také podporovat dráhy proteinů p53/p21 a p16/pRb. Jakmile je zastaven buněčný růst, začnou se exprimovat SASP (sekreční fenotyp související se senescencí) faktory. Faktory SASP mohou zpomalovat zpětnou vazbu a podporovat tvorbu ROS, tím i poškození mitochondrií a jaderné DNA. Tato poškození se předávají buňkami dál do dalších cyklů senescentní indukce. Zlomek populace senescentních buněk by mohl být odstraněn imunitní funkcí, většina buněk přežije a metabolicky aktivně vytvoří více SASP faktorů. To nakonec vede k degeneraci a dysfunkci tkání. Stejně tak mohou ROS indukovat dysfunkci telomer (Barja, 2014; Brand et al., 2004; Höhn et al., 2017; Pole et al., 2016).

Oxidační stres způsobený kyslíkem, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a terc-butylhydroperoxidem indukuje předčasnou senescenci. Tato činidla a další stresory včetně aktivovaných onkogenů (jako je H-Ras<sup>V12</sup>) indukují tvorbu ROS. Senescence jimi indukovaná probíhá přes mitochondriální i ne-mitochondriální dráhy, které se sbíhají v dráhy proteinů p53, pRb, p16 a p21. ROS způsobuje senescenci spojenou se zastavením buněčného cyklu spuštěním dráhy DDR pro stabilizaci p53 a transaktivaci exprese genu p21. V případě přetrvávajícího poškození DNA je p16 aktivován cestou p38-MAPK a jaderný lamin B1 je inhibován, což způsobuje remodelaci chromatinu spojenou s tvorbou vysoce kondenzovaných oblastí chromatinu SAHF. Spolu s perzistentní DDR jako pozitivní

zpětnou smyčkou je úzce spojen právě jak SAHF, tak i SASP a společně posilují senescenci. Dále má zvýšená aktivace proteinu p16 a následné zvýšení hydrofosforylovaného stavu proteinu pRb za následek epigenetickou dysregulaci proteinů skupiny polycomb, hlavně BMI1. Protein BMI1 epigeneticky potlačuje lokus *p16<sup>INK4a</sup>* prostřednictvím polycombových represivních komplexů PRC-zprostředkovaných modifikací histonů. Účastní se opravy DNA a je schopen inhibovat ROS. Dále se může lokalizovat v mitochondrii, kde reguluje mitochondriální funkce. Snížená produkce proteinu BMI1 během senescence může tedy přispět k její indukci zprostředkovanou pomocí ROS (Bu et al., 2017; Colavitti et al., 2005; Pole et al., 2016; Young et al., 2013).

Pokud je prostřednictvím ektopické exprese glykolytického enzymu zvýšena glykolýza, immortalizuje primární MEF (faktor zvětšující myocyty), které tím chrání před oxidačním poškozením. Vyskytuje se u většiny rakovinných buněk a tkání a je běžně označovaná jako Warburgův efekt. Inhibice glykolýzy tedy může představovat alternativní terapii pro léčbu rakoviny. Inhibice fosfoglycerát mutázy v primárních MEF indukuje předčasnou senescenci (Evans et al., 2005).

### **3.2.3 Micro-RNA**

Micro-RNA (miRNA) řadíme do třídy neprotein kódujících genů, které hrají důležitou roli v post-transkripční regulaci genové exprese. Zralé miRNA jsou dvouvláknové RNA molekuly o 19 až 22 nukleotidech, které jsou produktem několika kroků PolIII-transkribovaných primárních RNA transkriptů. Posledním krokem v miRNA dráze je připojení jednoho ze zralých RNA řetězců do RNA indukovaného potlačujícího komplexu (RISC), který se následně váže na mRNA s určitým stupněm komplementarity, často v 3'UTR mRNA (3'netranslatovaná oblast mRNA). V závislosti na stupni komplementarity mezi dvěma sekvencemi se miRNA podílejí na sekvencně specifické degradaci mRNA nebo na inhibici translace proteinů pomocí sterické zábrany (Lafferty-Whyte et al., 2009; Leonart et al., 2009).

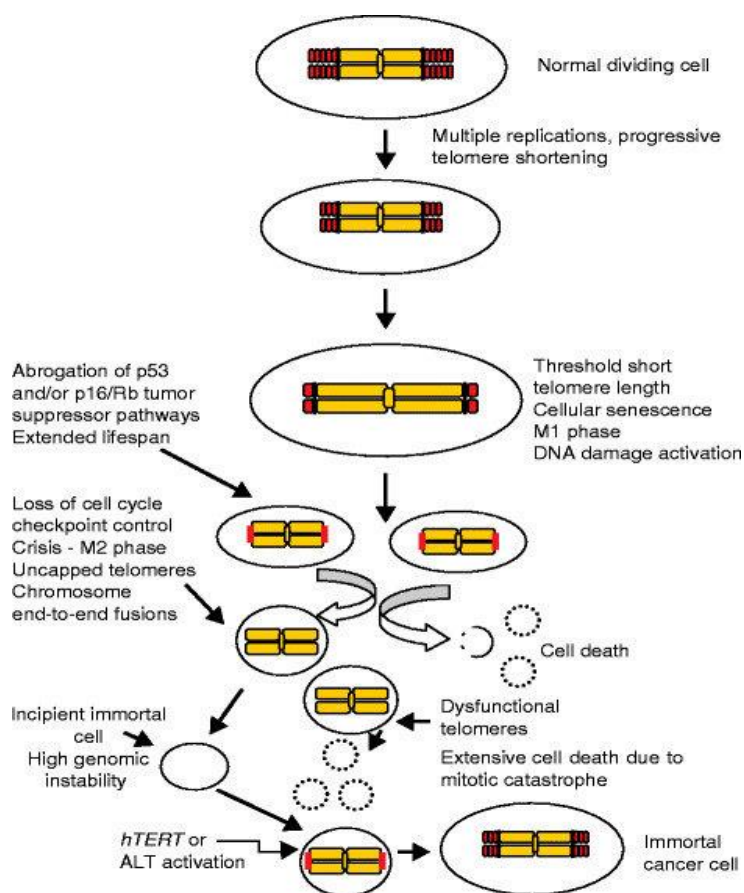
Jedna miRNA může řídit expresi mnoha jiných genů. Z celkové genové exprese je 20–30 % regulováno právě pomocí miRNA. Schopnost miRNA regulovat různé cílové geny umožňuje indukovat změny v mnoha dráhách a procesech, jako je vývoj, apoptóza, proliferace, diferenciaci a senescence. Např. prekursor miR-34 miRNA jsou přímé cíle proteinu p53, který indukuje zmíněnou apoptózu, zastavení buněčného cyklu a buněčnou senescenci. Databáze mirBase sekvencí je hlavním úložištěm

pro sekvenci miRNA a cílové informace a obsahuje 695 sekvencí lidských miRNA, z nichž každá má potenciál regulovat v průměru 1000 genových cílů. Tento velký počet potencionálních cílů napříč různými biologickými dráhami dávají miRNA moc potencionálně indukovat fenotypy komplexních buněk, jako je buněčná senescence (He et al., 2004; Lafferty-Whyte et al., 2009; Lleonart et al., 2009).

Charakteristickou vlastností miRNA, konkrétně miR-372 a miR-373, je schopnost obcházet senescenci indukovanou onkogeny. Tyto miRNA řadíme do onkogenů, které se podílejí na vývoji lidských testikulárních zárodečných buňkách nádorů. Jsou schopny snižovat funkci dráhy proteinu p53 a naopak podporují nádorový růst v přítomnosti volného („divokého“) typu proteinu p53. Pokud se miR-34 dostane do lidského diploidního fibroblastu, dochází k indukci buněčné senescence. Snížená regulace miR-138 je spojena s nadměrnou expresí telomerázy a maligního chování u lidských anaplastických buněčných linií karcinomu štítné žlázy (He et al., 2007; Lleonart et al., 2009).

### **3.2.4 Telomery**

Lidské telomery se skládají z tandemových opakujících se částí hexametrické sekvence TTAGGG. Velikost telomer se pohybuje od 15 kb při narození až po <5 kb u starších jedinců. Nižší počet jednotek je dán neustálým zkracováním telomer během buněčných dělení. Délka telomerické DNA se postupně snižuje v primárních buňkách při jejich replikaci (obrázek 7). Konce telomer jsou chráněny a regulovány pomocí proteinů vázajících se na telomery a tvoří speciální strukturu zvanou T-loop. Enzym, který je schopen prodlužovat konce telomer, se nazývá telomeráza. Jedná se o komplexní buněčný ribonukleoproteinový enzym, který je složený z řady různých podjednotek zodpovědných za přidání telomerových repetitív k 3' koncům chromozomů. Obsahuje dvě hlavní složky, enzymatickou telomerázovou transkriptázovou katalytickou podjednotku hTERT a RNA složku hTERC (gen pro lidskou telomerázu). Telomeráza využívá svou integrální složku RNA jako templát, aby mohla syntetizovat telomerovou DNA přímo na konce chromozomů. Primární viabilní lidské buňky stabilně exprimují transfektovanou telomerázu se mohou dělit do nekonečna, což poskytuje přímý důkaz, že zkracování telomer má kauzální vliv na buněčnou senescenci. Enzym je normálně exprimován ve velmi malém počtu primárních buněk, jako např. embryonální kmenové buňky (Blasco, 2005; Lleonart et al., 2009).



Obrázek 7: Zkracování telomer v procesu buněčné senescence (převzato z Jafri M. A. et al., 2016); zkratky: DNA – deoxyribonukleová kyselina; hTERT – enzymatická telomerázová transkriptázová katalytická podjednotka; ALT – alaninaminotransferáza; pRB – retinoblastomový protein.

Některé virové onkoproteiny jsou schopné modulovat expresi telomerázy a inhibici telomerových limitů v růstu lidských rakovinných buněk. Telomeráza je také přítomna v dospělých samčích zárodečných buňkách, ale ve většině somatických buněk je nedetekovatelná s výjimkou proliferativních buněk obnovovacích tkání. Několik lidských onemocnění, jako je dyskeratóza, vrozená nebo aplastická anémie, je způsobena mutacemi v genech, které kódují složky telomerázových nebo na telomeru se vázajících proteinů. Tyto mutace způsobují nízkou aktivitu telomerázy, zrychlující zkracování telomer a sníženou proliferační kapacitu hematopoetických progenitorů (Blasco, 2005; Leonart et al., 2009).

Aktivita telomerázy je detekována přibližně u 90 % všech maligních nádorů, a proto může být vhodným cílem pro protinádorová léčiva. Typ si-RNA (small interfering RNA) proti telomeráze nebo nadměrná exprese dominantně negativního mutantu telomerázy ruší telomerní aktivitu a následkem je vstup buněk do krizové situace. Existuje několik klinických studií, mezi které řadíme imunoterapii

(vakcína proti telomeráze), inhibiční sloučeniny proti aktivitě telomerázy (antagonista telomerázového templátu) a modulace telomerázové struktury (telomestatinu). Výsledkem inhibice telomerázy je zpomalení růstu nádorových buněk a snížení možnosti indukované apoptózy. Nádorový supresor p53 rozpoznává dysfunkční telomery jako poškozenou DNA, načež vyvolává senescenční odpověď zvýšením exprese proteinu inhibujícího buněčný cyklus (p21<sup>Cip1</sup>) (Lleonart et al., 2009).

V několika případech senescence nezávislé na telomerách může být iniciační proces spuštěn obvyklým mechanismem. Např. buněčné poškození způsobené stresem (oxidačním, pomocí onkogenů) je rozpoznáno buněčnými senzory pro kontrolu poškození DNA a vede k aktivaci odpovědí kontrolního bodu buněčného cyklu, včetně ataxie telangiectázie zmutované ATM-Chk2 kinázy, ATR/Chk1 signalizace a odvádění opravených míst DNA. Nádorové buňky z karcinomu prsu a plic často vykazují konstitutivní aktivaci signalizace poškození DNA, včetně aktivovaných forem kontrolních kináz ATM a Chk2, fosforylovaného histonu H2AX a p53 a ložiskovou tvorbu proteinů jako je 53BP1. Tímto způsobem je fosforylovaný protein p53 chráněn před destrukcí. Jediné přerušení DNA vyskytující se kdekoli v genomu je dostatečné pro indukci měřitelného zvýšení hladin proteinu p53. Buněčné účinky proteinu p53 jsou zprostředkovány jeho schopností transaktivovat specifické geny, včetně např. p21<sup>Cip1</sup>, nebo jeho schopností indukovat sníženou regulaci specifických proteinů, jako je CDK4 nebo cyklin E. Po aktivaci signalizace u poškození DNA může následovat změna chromatinu. Vytvoří se heterochromatinová ložiska související se senescencí. Tyto ložiska se akumulují během onkogenem indukované senescence a stabilně potlačují expresi E2F cílových genů rekrutováním proteinu pRb a heterochromatinových proteinů (Adams, 2007; Lleonart et al., 2009).

### **3.2.5 Onkogeny**

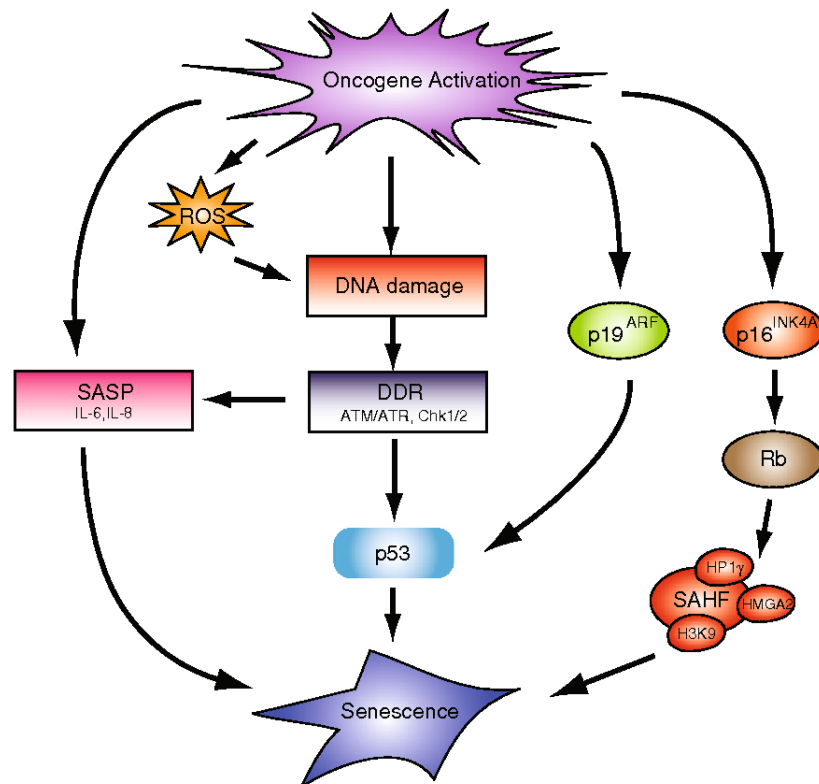
Onkogeny jsou geny způsobující rakovinné bujení. Nejlepším příkladem onkogenem vyvolané senescence je reakce fibroblastů na expresi aktivované alely u H-Ras. Proteiny Ras jsou důležité pro transdukci mitogenních signálů v buňce. Jsou mutovány na konstitutivně aktivní formy u přibližně 20 % lidských druhů rakovin. Tyto aktivované alely přispívají k transformaci lidského karcinomu zvýšením proliferace, invazí nádorů a desenzibilací buněk k apoptóze. Buňky s intaktními dráhami proteinů p53 a pRb vstupují do senescence jako odpověď na Ras.

Expresí virových onkoproteinů (např. lidský papilomavir E6 nebo E7), které tyto dráhy narušují, blokují senescenci a spolupůsobí s Ras na transformaci buněk (Downward, 2003; Lleonart et al., 2009).

Senescence vyvolaná stresem nebo onkogeny může být částečně obcházena inaktivací nádorových supresorů, včetně dráhy proteinů p53 a pRb, což implikuje zapojení několika tumor supresorových genů do těchto senescenčních procesů. V rakovinných buňkách či tkáních mohou být supresorové tumorové geny inaktivovány buď delecí jedné nebo obou alel, metylací promotoru, nebo mutací v místě sestřihu. Alternativně mohou mutace v supresorových genech poskytnout dominantní negativní protein, který interferuje s proteinem „divokého“ typu produkovaným jinou alelou (jak je tomu v případě zmutovaného proteinu p53). Tyto genetické změny vedou k úplné absenci nebo částečné redukci tumor supresorového proteinu, což dává selektivní výhodu v klonální selekci u progresu nádoru (Lleonart et al., 2009).

Lokus ARF/INK4a (alternativní čtecí rámec) kóduje dva odlišné tumorové supresory, ARF (konkrétně p14<sup>ARF</sup>) a p16<sup>INK4A</sup>. Tyto supresory regulují dráhy proteinů pRb a p53 u procesu senescence a suprese nádoru (obrázek 8). Supresor p16<sup>INK4A</sup> váže a inhibuje cyklin-dependentní kinázy CDK4 a CDK6. Tyto kinázy mají onkogenní charakter, fosforylují retinoblastomovou rodinu nádorových supresorů pRb, p107 a p130, které jsou negativními regulátory buněčného cyklu. Supresor ARF je antagonistou enzymu Mdm2, který reguluje stabilitu proteinu p53 svou aktivitou ubikvitin ligázy degradující p53. Dále supresor ARF sekvenuje onkoprotein hmdm2 přes jeho translokaci do jádra a konečným důsledkem je aktivace a stabilizace proteinu p53. Všechny tyto supresorové geny, které vyvolávají senescenci, mohou být také cíli protirakovinných léčiv. Několik ARF transkripčních represorů bylo identifikováno v senescenčním bypassovém obrazu, včetně TBX2 a Zbtb7. Inaktivace lokusu ARF/INK4a úplnou delecí nebo metylací aberantního promotoru je v případě genu p53 velmi běžná a je přítomna přibližně u 30 % všech známých typů malignit (Lleonart et al., 2009; Spurgers et al., 2006).





Obrázek 8: Schéma mechanismu vedoucí k onkogenem vyvolané senescenci (převzato z Reddy J. P. et al., 2011); zkratky: ATM/ATR – kinázy ATM a ATR; DDR – reakce na poškození DNA; H3K9 – histon H3K9; HMG A2 – vysoce mobilní skupina proteinů charakterizovaná proteinem vázajícím DNA; HP1 $\gamma$  – heterochromatin gama 1; Chk1/2 – kináza kontrolního bodu; IL-6 – interleukin 6; IL-8 – interleukin 8; Rb – retinoblastom; SAHF – heterochromatinová ohniska spojená se senescencí; SASP – sekreční fenotyp související se senescencí.

Během replikativní senescence dochází k akumulaci nádorových supresorů (p53, ARF, INK4) nebo jejich cílů jako je p21<sup>Cip1</sup>. Ektopická exprese těchto tumorových supresorů může vyvolat senescenční fenotyp v primárních nebo immortalizovaných buňkách (Adams, 2007; Lleonart et al., 2009).

Význam senescence indukované onkogeny může být i v kontextu pluripotence. Pro generování pluripotentních kmenových buněk jsou zapotřebí alespoň dva onkoproteiny, c-MYC a KLF4. Proteiny ARF/INK4a a p53 omezují tvorbu pluripotentních kmenových buněk. Buněčná senescence působí tedy inhibičně přeměnou primárních buněk na pluripotentní kmenové buňky. Alternativně může zvýšená rychlost proliferace spojená se ztrátou proteinu p53 vést ke zrychlené tvorbě pluripotentních kmenových buněk. Buněčná senescence tedy inhibuje tvorbu nádoru nejen indukci přetrvávajícího zastavení buněčného cyklu, ale i omezením tvorby rakovinných kmenových buněk (Hanna et al., 2009; Kuilman et al., 2010).

## 4 DETEKCE SENESCENCE

Proces senescence je spojen s výskytem několika markerů, díky kterým jsou běžně používány za účelem identifikace senescentních buněk *in vitro* a *in vivo*. Zahrnují ztrátu proliferace, morfologické změny, zvýšenou aktivaci SA- $\beta$ -GAL (se senescencí související  $\beta$  galaktosidáza), produkci SAHF, zvýšení hladin markerů DDR a inhibitorů buněčného cyklu p16, p15, p21 a p53. Jako senescentní biomarkery byly také použity DEC1 (diferencovaný embryonální chondrocyt), DCR2 (Decoy receptor) a PAI1 (inhibitor plazminogenového aktivátoru). Kromě toho, řada faktorů souvisejících se zánětem je spojena i s procesem senescence. Avšak různé senescentní léze mohou být charakterizovány různými biomarkery (Collado et al., 2010; Kuilman et al., 2010).

Žádný z těchto markerů nemůže izolovaně poukazovat na senescentní buňky, ať už *in vitro* nebo *in vivo*. Aby se daly vyšetřit markery používané *in vitro*, musí být vyšetřeny i markery používané *in vivo*. Např. v důsledku nedostatku vhodných protilátek zůstává nejasné, zda protein buněčného cyklu p15<sup>INK4B</sup>, který je spojen se senescencí, může být použit pro specifickou identifikaci senescentních buněk *in vivo*. Markery kódované zánětlivým transkriptorem (zejména interleukiny IL-6, IL-8 a CXCR2) identifikují senescentní buňky v lidských nádorech a do jisté míry mohou být použity i v různých tkáních a genetických kontextech. Pro identifikaci senescentních buněk je potřeba vysoký počet a citlivost markerů, zejména *in vivo*. V ideálním případě je potřeba odhalit biomarkery, které jsou kauzálně zapojeny do tohoto typu proliferativní zástavy. Kromě proliferačního markeru, jako je např. antigen Ki-67 nebo thymidin podobný bromodeoxyridinu, by se měly použít alespoň dva další markery senescence. Např. p16<sup>INK4A</sup> často koreluje se senescencí jak *in vitro*, tak i *in vivo*, a jako takový je běžným, ale ne univerzálním, markerem senescence. Také tkáňové úseky pro imunoznačení by měly být analyzovány pomocí více markerů senescence. V ideálním případě se to provádí na po sobě navazujících úsecích, nebo ještě lépe na jednotlivých úsecích dvojitém barvením (pokud je to možné). Pouze pečlivé a multiparametrové analýzy umožní vhodnou detekci předpokládaných senescentních lézí (Kuilman et al., 2010).

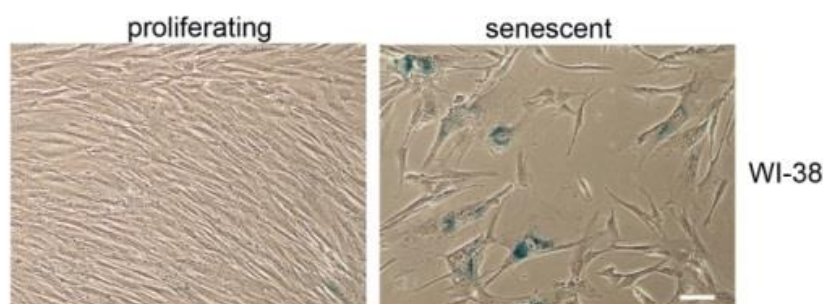
### 4.1 Detekce pomocí SA- $\beta$ -GAL

Za nejznámější marker je považován SA- $\beta$ -GAL (obrázek 9), přesto by neměl být považován za jedinečný marker pro senescentní buňky. Použití SA- $\beta$ -GAL

v nepřítomnosti dalších markerů senescence může nevhodně klasifikovat buňky jako senescentní, proto se používá na detekci senescence pouze ve spojení s jinými markery (Crowe et al., 2014; Kuilman et al., 2010).

Test se používá jako počáteční screening pro senescentní buňky, ale je důležité dbát na správnou interpretaci výsledků a provádění testu. Kromě senescentních buněk mohou být také pozitivní na SA- $\beta$ -GAL i jiné buňky jako sérum-starved buňky v tkáňové kultuře, nebo prolifерující dysplastický epitel v gastrointestinálním traktu. Aktivita SA- $\beta$ -GAL indikuje zvýšený obsah lyzozomů, aktivitu charakteristickou pro senescentní buňky, ale ne nezbytnou pro vývoj fenotypu senescence. Falešně pozitivní výsledky mohou vzniknout, když se aktivita SA- $\beta$ -GAL měří v konfluentních buňkách. Test by neměl být používán ve tkáních, které byly dlouhodobě zmrazené nebo dané do formalínu, v důsledku zničení aktivity enzymu  $\beta$ -galaktosidázy. Pokud se ale test provádí za vhodných podmínek, může se použít k identifikaci senescentních buněk v různých typech buněk a tkání (Crowe et al., 2014; Debacq-Chainiaux et al., 2009; Kuilman et al., 2010).

Po štěpení exogenně aplikovaného substrátu X-gal se buňky, které vykazují aktivitu SA- $\beta$ -GAL, změní na modrou barvu a lze je snadno kvantifikovat pomocí světelného mikroskopu. Kromě toho může být barvení SA- $\beta$ -GAL zkombinováno s indexy buněčné proliferace (např. BrdU/EdU značení), aby se prokázalo více charakteristických znaků senescence ve stejné buňce (Crowe et al., 2014).



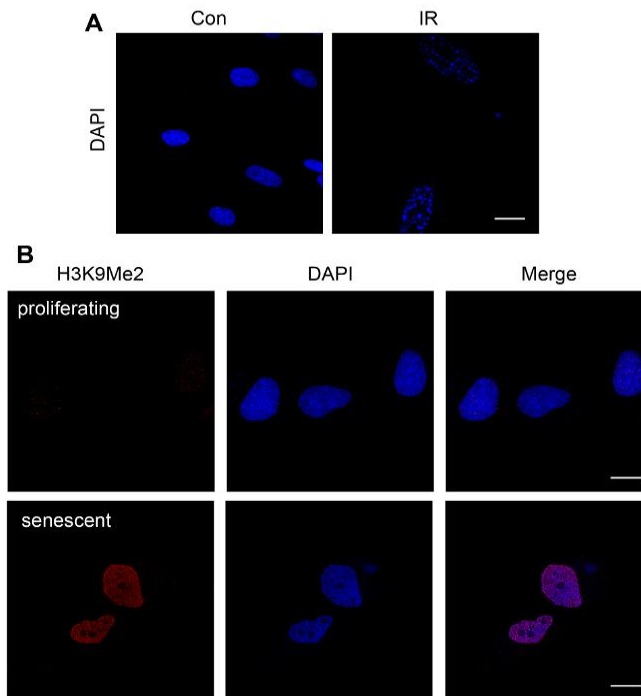
Obrázek 9: SA- $\beta$ -gal barvení lidských WI-38 fibroblastů (převzato a upraveno z Noren Hooten N. et al., 2017).

## 4.2 Imunofluorescenční detekce proteinů obohacená o SAHF

Senescenční buňky procházejí významnými změnami ve struktuře chromatinu, kde nejzřetelnějším příkladem je tvorba SAHF. Jsou popsány jako jaderná ložiska, která mohou být snadno vizualizována fluorescenčním barvením DNA (např. DAPI neboli 4',6-diamidino-2-phenylindole) (obrázek 10). Navíc jsou obohaceny o známé

markery heterochromatinu včetně heterochromatinového proteinu 1 (HP-1), histonovou variantu macroH2A a metylaci histonu H3 na lysinu 9. Tyto oblasti fakultativního heterochromatinu přispívají k „umličování“ genů podporující proliferaci, zatímco u senescence vyvolané onkogeny SAHF omezuje stabilizaci DDR, aby se zabránilo apoptóze. Tvorba heterochromatinu může souviset s přestavbou chromatinu pozorovanou v maligních buňkách, které obcházejí senescenční zastavení. Tvorba SAHF vyžaduje lokalizaci histonového chaperonu HIRA na jaderná tělesa promyelocytárního leukemického proteinu a závisí na intaktní dráze proteinů p16/pRb (Crowe et al., 2014; Di Micco et al., 2011).

V reverzibilně zastavených buňkách se SAHF nevyskytuje. Jeho přítomnost je velice závislá na typu buňky a stimulech, které indukují senescenci a následně na expresi proteinu p16. Ačkoli diskrétní skupiny jako SAHF jsou obtížně identifikovatelné ve tkáních, hladiny komponentů SAHF (jako je makroH2A a HP-1) jsou ve tkáních zvýšeny a tím pádem i lépe identifikovatelné. Zda takové obohacení proteinů asociovaných s SAHF představuje opověď na detekci senescence, musí být stanoveny i jiné biomarkery senescence (Crowe et al., 2014; Cruickshanks et al., 2013).



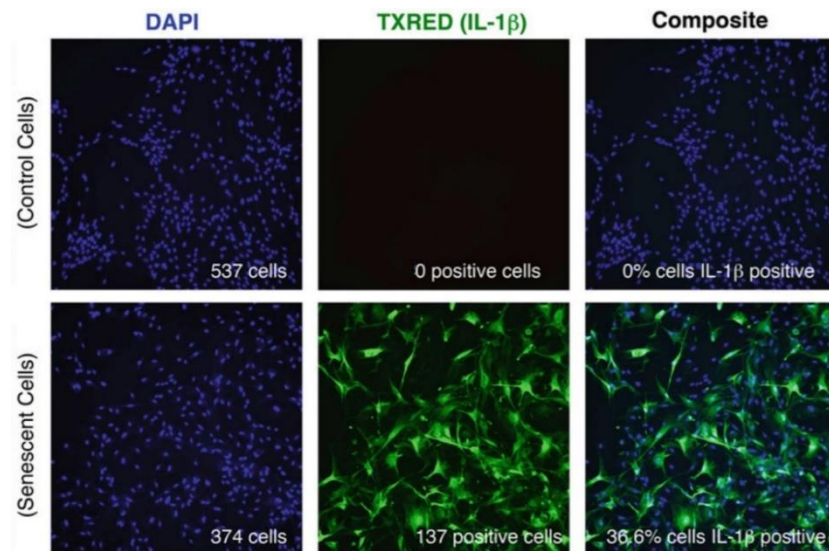
Obrázek 10: Fluorescenční barvení SAHF v senescentních buňkách (převzato z Noren Hooten N. et al., 2017); (A) proliferující buňky WI-38 neošetřené nebo vystavené ionizujícímu záření; (B) buňky pěstované v přítomnosti dexamethasonu (proliferating) nebo v FBS s uhlíkovým uhlím, aby se indukovala senescence (senescent), a dále obarvené DAPI nebo H3K9Me2; zkratky: IR – ionizující záření; Con – buňky bez ošetření.

### 4.3 Analýza SASP

Kromě buněčných změn ve funkci, senescentní buňky narušují jejich mikroprostředí změnou struktury sekrece SASP. SASP zahrnuje řadu protizánětlivých cytokinů, včetně IL-6 a IL-8. Vyvíjí se jako důsledek změny genové exprese a sestává z prostředí protizánětlivých cytokinů, chemokinů, proteáz a růstových faktorů. Produkce těchto mediátorů není akutní přechodnou reakcí na poškození vyvolané senescencí, ale spíše zpožděnou a perzistentní odpovědí řízenou signalizací DDR a proteinu p38. SASP má několik funkcí. Zda jsou tyto funkce prospěšné či škodlivé pro mikroprostředí tkáně často závisí na kontextu. Mezi jeho funkce řadíme zastavení růstu buňky autonomními i neautonomními mechanismy buňky a vysílání signálů buňkám imunitního systému (pro usnadnění clearance nebo oprava ran). Nicméně, SASP může také narušit tkáňovou homeostázu vytvořením protizánětlivého nádoru podporujícího mikroprostředí, nebo změnou výchlipky kmenových buněk. *In vitro* připomíná SASP nízko úroňový chronický zánět, který charakterizuje jak degenerativní patologické stavy související s věkem, tak i rakoviny (Crowe et al., 2014; Freund et al., 2010).

Ne všechny stimuly, které vyvolávají senescenci, vedou k SASP. Existující variace mezi SASP různých typů buněk a stimuly indukující senescenci. Proto je důležité zkoumat několik potenciálních faktorů SASP a zvážit experimentální kontext. Tento typ přístupu je usnadněn protilátkovým uspořádáním pro více zánětlivých faktorů, které mohou být následně validovány pomocí individuálních imunisorbentních souborů vázaných na enzymy, nebo na úrovni mRNA za použití qRT-PCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce) testů (Crowe et al., 2014).

Detekce SASP (obrázek 11) vyžaduje shromažďování kondiciovaného média z kultur s proliferativním potenciálem a senescentními kulturami. Pokud se hodnotí změny v nedělicích se kulturách, nemusí toto rozlišení platit, ale vyžaduje se komparátor (Crowe et al., 2014).

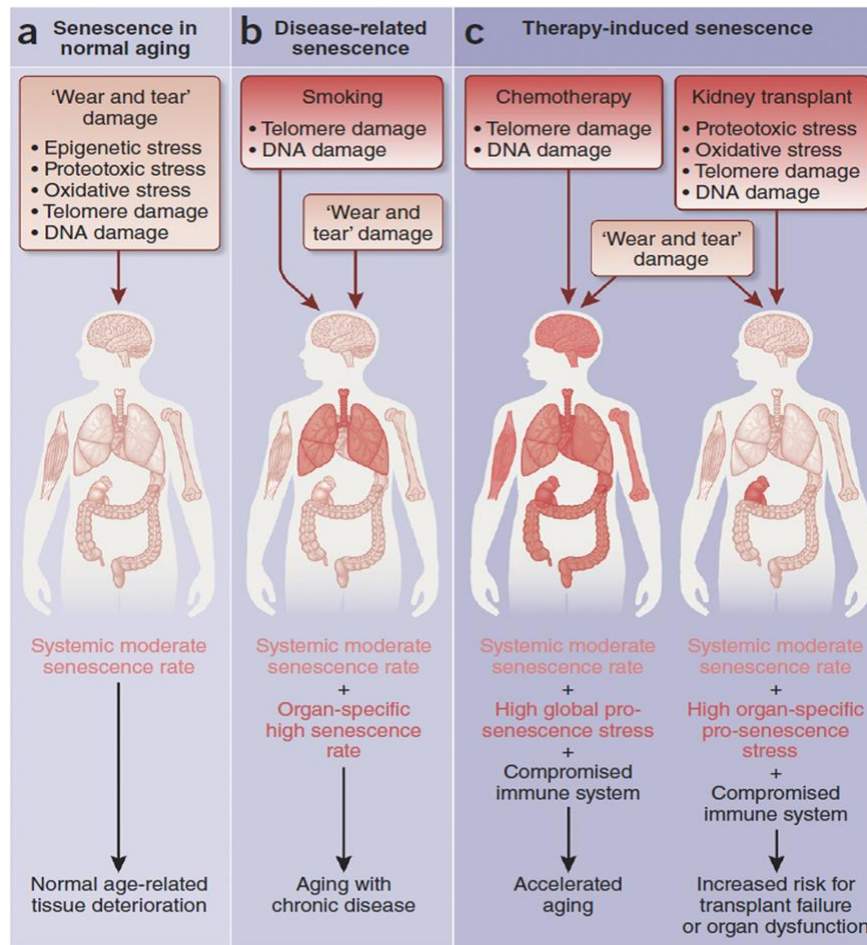


Obrázek 11: Kvantifikace faktorů SASP vysokoobsahovou analýzou s barvením pomocí DAPI a TXRED (převzato a upraveno z Hari P. et al., 2017); zkratky: IL-1 $\beta$  – interleukin 1 $\beta$ .

## 5 DŮSLEDKY SENESCENCE

Perzistentní senescentní buňky se u dospělých jedinců vznikají v rámci alespoň tří kontextů, které souvisejí s lidským zdravím. Jedná se o normální stárnutí, onemocnění související s věkem a terapeutické zákroky (obrázek 12). Při normálním „zdravém“ stárnutí se tkáňová dysfunkce objevuje u všech jedinců, zatímco specifická onemocnění související s věkem pouze u některých. U stárnoucích jedinců způsobují procesy potřebné pro tkáňovou homeostázu nevyhnutelně její poškození a vedou k senescenci. Tyto chronické senescentní buňky mohou přetrvávat v důsledku defektů ve stárnoucím imunitním systému, nebo proto, že izolované senescentní buňky postrádají dostatečnou signalizaci pro přilákání rezidentních imunitních buněk. Podobně i akutní senescentní buňky z hojení ran, suprese nádorů, nebo jiných neznámých programovaných procesů mohou být neúplně zlikvidovány stárnoucím imunitním systémem a přetrvávají. V důsledku přetrvávajících senescentních buněk vznikajících z více mechanismů by stárnoucí tkáň mohla být méně funkční a současně více náchylná k dalšímu zhoršení, pokud by byla vystavena dalším stresorům (Childs et al., 2016).





Obrázek 12: Senescence u stárnutí, onemocnění souvisejícím s věkem a terapeutických zákrocích (převzato z Childs B. G. et al., 2016).

Pokud by další stresory napadly zranitelnou senescentní tkáň bohatou na buňky, jako je inzulin rezistentní stárnoucí tuk konfrontovaný s dietou s vysokým obsahem tuku, může vzniknout onemocnění na pozadí přetrvávajících buněk. Stres způsobující onemocnění může být neobvyklý, jako látky poškozující DNA v cigaretovém kouři, nebo déle působící stres jako je eroze telomer po regeneraci plicního epitelu poškozeného kouřem. Na rozdíl od normálního stárnutí, senescence indukovaná onemocněním může být omezena na jeden nebo i několik orgánů. Protože spouštěče senescence související s onemocněním jsou pravděpodobně prodloužené nebo intenzivnější, rychlost akumulace senescentních buněk je pravděpodobně mnohem vyšší než v normálním stádiu stárnutí. Podobně senescence vyvolaná terapií je odpovědí na silný exogenní stres. Senescence vyvolaná terapií může být záměrným cílem nebo vedlejším účinkem léčebných postupů, nebo obojího, jako je tomu u cytotoxické chemoterapie poškozující

DNA a u ozařování pro léčbu rakoviny, kde aktivace programu senescence v nádorových buňkách je cílem a zárukou senescence jako vedlejšího účinku (Childs et al., 2016; Walters et al., 2014).

## 5.1 Senescence u běžného stárnutí

Senescentní buňky se akumulují ve starých tkáních. Ačkoli poškození indukující senescenci může být náhodné, některé typy buněk jsou vůči němu náchylnější než jiné. Např. progenitorové buňky v tukové tkáni procházejí senescencí s předvídatelnou kinetikou. Fibroadipózní progenitory ve svalech upadají do předčasné senescence, což je dáno jejich citlivostí na tento typ stresu (Childs et al., 2016).

Chronický senescenční stav v přirozeném procesu stárnutí je komplexnější a indukován nějakou kombinací tlumení telomer, oxidačním poškozením DNA, stresem a dalšími pomalu se hromadícími formami makromolekulárního poškození. Ve tkáňové dysfunkci řízené senescencí jsou dva klíčové mechanismy, zhoršení u procesů udržování tkání v důsledku SASP a odstranění reparativních kmenových a progenitorových buněk z proliferačního fondu senescence. Tyto dva mechanismy potřebují přítomnost faktorů SASP, jakou jsou cytokiny IL-6 a TNF $\alpha$ , ve stárnoucích tkáních. Funkce kmenových buněk může být ovlivněna jak autonomními buňkami, tak i parakrinními funkcemi senescentních buněk. Buněčně autonomní účinky senescence jsou nejvýznamnější u kmenových buněk, kde trvalé zastavení růstu přispívá k celkovému poklesu potenciálu regenerace tkání. Ačkoliv lze očekávat, že tkáň s rychlým obratem (jako je gastrointestinální trakt nebo hematopoetický kompartment) jsou náchylné ke stárnutí, není tomu tak, protože jsou to stresy nesouvisející s replikací, které způsobují chronické stárnutí. Rychle se dělící buňky mohou být spíše náchylnější k apoptóze než k senescenci v odezvě na stres, o čemž svědčí spermatogoniální a kryptové kmenové buňky, které podléhají apoptóze v reakci na zkracování telomer (Childs et al., 2016; Geiger et al., 2013).

Optimální funkce kmenových buněk závisí na jejich vysoce specializovaném mikroprostředí a místě, které může škodlivě ovlivnit SASP (např. metaloproteinázy v SASP mohou zničit polarizovanou extracelulární matici). SASP mohou také ovlivňovat funkce parenchymálních buněk a složení tkáně bez ovlivnění kmenových buněk. Strukturální změny způsobené sekrecí matrixových metaloproteináz by mohly



poškodit okolní extracelulární matrici, což by mohlo vést k účinkům, jako je ztráta kožní nebo plicní elasticity. Endokrinně vnímavé intracelulární signální kaskády jsou také citlivé na faktory SASP. Senescentní buňky mohou přímo ovlivňovat osu růstového hormonu a inzulín podobnému růstovému faktoru 1 prostřednictvím TNF $\alpha$  (tumor nekrotizující faktor), IL-1, nebo IL-6, jejichž vylučování způsobuje rezistenci signalizace právě tohoto faktoru. Periferní rezistence tohoto faktoru ve svalech může vést ke znakům stárnutí, jako je sarkopenie a snížená srdeční funkce. Komponenty SASP mohou také vést ke sterilnímu zánětu, který je doprovázen infiltrací makrofágů a lymfocytů, apoptózou a fibrózou (Freund et al., 2010; Childs et al., 2016; Liu et al., 2007).

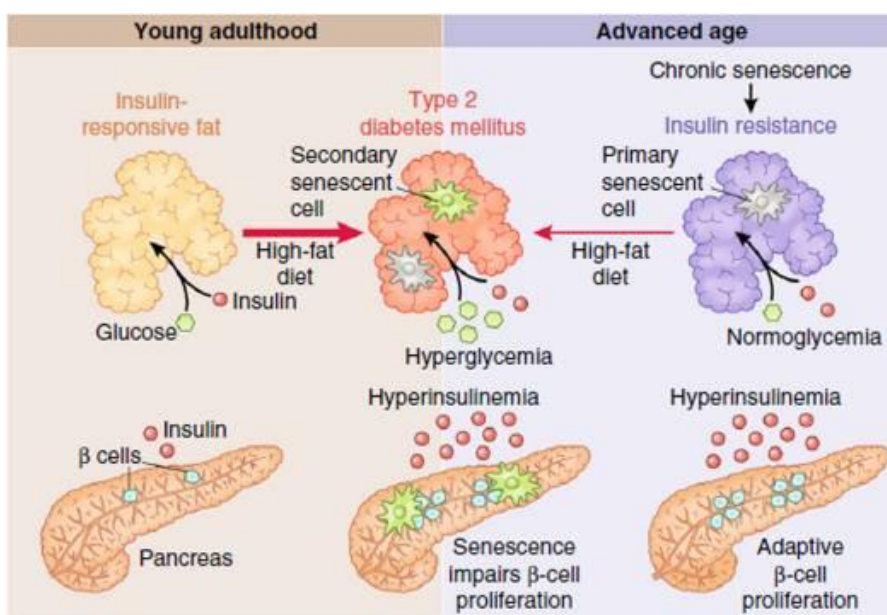
Postupem času se tyto účinky rozvíjejí do klasických fenotypů souvisejících s věkem se sníženou tkáňovou funkcí a odolností vůči stresu. Když je tedy tkáň, která byla ovlivněna buněčnou senescencí, napadána dalšími faktory, je více pravděpodobné, že se stane patologickou (Childs et al., 2016).

## **5.2 Senescence u onemocnění souvisejícím s věkem**

V některých případech může být za patologii zodpovědná ztráta buněk kompetentních pro proliferaci, jako je to např. u katarakty, diabetická pankreázy a osteoartritidy. V jiných případech může zánět z SASP hrát kauzální roli u nemocích, jako je ateroskleróza a rakovina. Dále remodelace extracelulární matrix zprostředkovaná SASP může být klíčem k progresi nebo inhibici onemocnění, jelikož senescentní buňky řídí plicní fibrózu, ale omezují fibrózu jater. V mladém a středním věku se onemocnění může objevit, když genetické a exogenní stresory přemohou přirozenou funkci udržení zdravé tkáně. Např. opakovaná zranění kloubů mohou způsobit osteoartritidu u mladých dospělých, pokud poškození matrice chrupavky převyšuje schopnost této tkáně se reparovat. V tomto případě krátká doba trvání, ale intenzivní stres, se kterými se setkáváme při zrcadlení nemoci, se objevují během normálního opotřebení, které může způsobit produkci senescentních buněk ve stáří. Artritické klouby způsobené jak zraněním, tak i jako s věkem souvisejícím onemocnění, obsahují senescentní chondrocyty (Childs et al., 2016; Loeser, 2009).

Onemocnění související s věkem se vyskytují u tkáně, která má již poškozenou funkčnost vlivem procesu stárnutí. A to včetně tkání, ve kterých probíhá akumulace senescentních buněk. Tyto senescentní buňky se označují jako primární, neboť jsou výsledkem běžných procesů opotřebení a roztržení tkáně v důsledku jejího udržování.

Senescence snižuje rezistenci tkáně vůči stresům způsobujícím onemocnění prostřednictvím zástavy progenitorových buněk, jakož i dysfunkcí kmenových a parenchymálních buněk přes SASP. Jak se nemoc iniciuje a postupuje, je v místech patologie vytvořena další vlna senescentních buněk. Zde se jedná o sekundární senescentní buňky, které stejně jako ty primární, mohou zesilovat progresi onemocnění. S primárními i sekundárními senescentními buňkami se setkáváme běžně u stárnoucího tuku, který dává příčinu diabetu mellitu 2. typu (obrázek 13), a stárnutí cév způsobující aterosklerózu (Childs et al., 2016).



Obrázek 13: Senescentní buňky ve funkci ovládnutí a zesilování diabetu mellitu 2. typu (převzato z Childs B. G. et al., 2016).

### 5.3 Senescence u terapeutických zákroků

Senescence jako terapeutického cíle může být dosaženo buď použitím systémového pro-senescentního stresu (např. ionizační radiace nebo DNA ničící chemoterapie), nebo selektivním obnovením defektních cest stresové odezvy. V terapii rakoviny se systémová léčba zaměřuje na rakovinné buňky, protože jejich trvalé zapojení do buněčného cyklu je činí náchylnějšími k poranění než nedělící se buňky. Kromě toho se rakovinné buňky snaží vyrovnat s dalším stresem v důsledku vyššího bazálního poškození. Tato napětí probíhají aktivací DDR nebo nerozvinuté proteinové odpovědi. Jedním z příkladů, ve kterých je senescence základní složkou terapie, je léčba oxidem arsenitým a kyselinou retinovou, která léčí akutní promyelocytární leukémii blokováním onkogenního fúzního proteinu a aktivací pro-senescentní

signalizace proteinu p53. Tumory také těžší z terapií indukujících senescenci, přičemž inaktivace klíčových onkogenů nebo obnovení tumor supresivní signalizace umožňuje rakovinovým buňkám reagovat normálně na vnitřní poškození. Tento mechanismus nastává, když je korigována např. nadměrná exprese onkogenického transkripčního faktoru c-Myc. Pokud však takové terapie generují trvalé senescentní buňky, které by mohly poškodit nebo ohrozit okolní tkáň prostřednictvím SASP, může to způsobit dlouhodobé vedlejší účinky léčby rakoviny. Kombinace pro-senescenční terapie se zákrokem, který odhalí senescentní buňky, může být příznivá pro krátkodobé (akutní, okamžité) i dlouhodobé výsledky u pacientů s nádorovým onemocněním. Léky blokující dráhy pro přežití senescentních buněk, jako jsou inhibitory autofagie, jsou používány pro odstranění těchto přetrvávajících buněk (Dörr et al., 2013; Childs et al., 2016; Sabin et al., 2011).

Další příklad senescence vyvolané terapií se vyskytuje u pediatrické léčby rakoviny krve zahrnující transplantaci kostní dřeně. V tomto procesu je imunitní systém pacienta odstraněn ionizujícím zářením nebo chemoterapií, která jako nežádoucí vedlejší účinek vytváří prostředí bohaté na senescentní buňky. Toto prostředí může narušit štěpení a funkčnost hematopoetického systému zdravého dárce, ale také může urychlit zhoršení tkáně na systémové úrovni. V souladu s tím, přeživší dětského karcinomu, kteří prošli takovou léčbou, vykazují známky předčasného stárnutí včetně ztráty kognitivních funkcí, srdečního selhání a předčasným zvýšením proteinu p16 v kůži (Cmielova et al., 2012; Childs et al., 2016).

Transplantace orgánů je pozoruhodným příkladem vzniku nežádoucí senescence vyvolané terapií. Např. transplantované ledviny jsou vystaveny ischemicko-reperfuznímu poškození, typu oxidačního poškození, stejně jako replikativnímu stresu, což vyvolává nevyhnutelné tubulární poškození následované engraftmentem (vštěpením). Oba tyto stresy představují riziko vzniku renální tubulární senescence. Eliminace senescence řízené proteinem p16 výrazně zlepšuje úspěšnost vštěpení, stejně tak i věk dárců a hladina proteinu p16 v ledvině. Vyšší senescentní buněčná zátěž by mohla vytvořit prozánětlivé prostředí ve starší ledvině a podporovat odmítnutí orgánu imunitním systémem. Dalším požadavkem transplantace orgánů je imunosuprese příjemce. Avšak to by mohlo vést ke vzniku senescenčních buněk vlivem terapie a zůstávaly by v transplantovaném orgánu a snižovaly jeho funkci prostřednictvím účinků SASP (Braun et al., 2013; Childs et al., 2016; Chkhotua et al., 2002).

## ZÁVĚR

Buněčná senescence je velmi složitý a komplexní proces, který je ovlivněn řadou faktorů. Dochází k ní ve všech somatických buňkách organismu. Její studium je především důležité pro prevenci proliferace nádorových a jinak poškozených buněk. Dále aby se zabránilo s věkem souvisejících onemocnění a degenerací, zachovalo se zdraví jedinců a prodloužil jejich život.

Buňky se na základě zkracování telomer přestávají dělit, podstupují výrazné fenotypové změny a dochází k zástavě buněčného cyklu. Akumulují se u nich dysfunkční mitochondrie a vykazují zvýšené hladiny reaktivních forem kyslíku, což pak dává vzniku oxidativnímu stresu a indukci senescence. Mezi další faktory pak řadíme epigenetické modifikátory, onkogeny, nebo miRNA. Každý z nich nějakým způsobem ovlivňuje dráhy proteinů p16, p21, p53 a pRb.

Pro detekci senescence je využívána řada metod, ale mezi nejběžnější řadíme metodu založenou na aktivitě SA- $\beta$ -GAL a dále různé imunofluorescenční metody. Metody detekce se však stále zdokonalují a vyvíjejí.

Buněčná senescence může mít pozitivní i negativní důsledky. Vyvinula se jako mechanismus k zabránění maligní transformace poškozených buněk, avšak nástup senescence může přispět i k mnoha patologickým stavům spojeným s věkem, včetně rakoviny, degenerace tkání a zánětlivých onemocnění.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Adams P. D.: Healing and Hurting: Molecular Mechanisms, Functions, and Pathologies of Cellular Senescence. *Molecular Cell*. 2009, vol. 36, issue 1, ISSN 10972765, p. 1-14.
- [2] Adams P. D.: Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging. *Gene*. 2007, vol. 397, issue 1-2, ISSN 03781119, p. 84-93.
- [3] Alberts B.; Bray D.; Johnson A.; Lewis J.; et al.: Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky. 2. vydání. Ústí nad Labem: Espero Publishing. 1998, ISBN 80-902906-2-0, p. 571.
- [4] Allsopp R. C.; Vaziri H.; Patterson C.; Goldstein S.; et al.: Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992, vol. 89, issue 21, ISSN 0027-8424, p. 10114-10118.
- [5] Barja G.: The Mitochondrial Free Radical Theory of Aging. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Amsterdam: Elsevier. 2014, vol. 127, ISBN 9780123946256, p. 1-27.
- [6] Baus F.: Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts. *The EMBO Journal*. 2003, vol. 22, issue 15, ISSN 1460-2075, p. 3992-4002.
- [7] Beausejour C. M.: Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO Journal*. 2003, vol. 22, issue 16, ISSN 1460-2075, p. 4212-4222.
- [8] Blackburn E. H.; Challoner P. B.: Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei*. *Cell*. 1984, vol. 36, issue 2, ISSN 00928674, p. 447-457.
- [9] Bladier C.; Wolvetang E. J.; Hutchinson P.; de Haan J. B.; Kola I.: Response of a primary human fibroblast cell line to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: senescence-like growth arrest or apoptosis? *Cell Growth Differ*. 1997, vol. 8, issue 5, ISSN 0012-1592, p. 589–598.

- [10] Blasco M. A.: Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*. 2005, vol. 6, issue 8, ISSN 1471-0056, p. 611-622.
- [11] Brand M. D.; Affourtit Ch.; Esteves T. C.; Green K.; et al.: Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004, vol. 37, issue 6, ISSN 08915849, p. 755-767.
- [12] Braun H.; Schmidt B. M. W.; Raiss M.; Baisantry A; et al.: Cellular Senescence Limits Regenerative Capacity and Allograft Survival. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013, vol. 23, issue 9, ISSN 1046-6673, p. 1467-1473.
- [13] Bu H.; Wedel S.; Cavinato M.; Jansen-Dürr P.: MicroRNA Regulation of Oxidative Stress-Induced Cellular Senescence. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017, vol. 2017, ISSN 1942-0900, p. 1-12.
- [14] Campisi J.: Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual Review of Physiology*. 2013, vol. 75, issue 1, ISSN 0066-4278, p. 685-705.
- [15] Cmielova J.; Havelek R.; Soukup T.; Jiroutová A.; et al.: Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments. *International Journal of Radiation Biology*. 2012, vol. 88, issue 5, ISSN 0955-3002, p. 393-404.
- [16] Collado M.; Serrano M.: Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Reviews Cancer*. 2010, vol. 10, issue 1, ISSN 1474-175X, p. 51-57.
- [17] Colavitti R.; Finkel T.: Reactive Oxygen Species as Mediators of Cellular Senescence. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life*. 2005, vol. 57, issue 4-5, ISSN 1521-6543, p. 277-281.
- [18] Crowe E. P.; Nacarelli T.; Bitto A.; Lerner Ch.; et al.: Detecting Senescence: Methods and Approaches. *Cell Cycle Control*. New York: Springer New York. 2014, ISBN 978-1-4939-0887-5, p. 425-445.
- [19] Cruickshanks H. A.; Mcbryan T.; Nelson D. M.; Vanderkraats N. D.; et al.: Senescent cells harbour features of the cancer epigenome. *Nature Cell Biology*. 2013, vol. 15, issue 12, ISSN 1465-7392, p. 1495-1506.

- [20] De Lange T.: T-loops and the origin of telomeres. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004, vol. 5, issue 4, ISSN 1471-0072, p. 323-329.
- [21] Debacq-Chainiaux F.; Erusalimsky J. D.; Campisi J.; Toussaint O.: Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*. 2009, vol. 4, issue 12, ISSN 1754-2189, p. 1798-1806.
- [22] Di Micco R.; Sulli G.; Dobrev M.; Liontos M.; et al.: Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nature Cell Biology*. 2011, vol. 13, issue 3, ISSN 1465-7392, p. 292-302.
- [23] Dörr J. R.; Yu Y.; Milanovic M.; Beuster G.: Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature*. 2013, vol. 501, issue 7467, ISSN 0028-0836, p. 421-425.
- [24] Downward J.: Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2003, vol. 3, issue 1, ISSN 1474-175X, p. 11-22.
- [25] Effros, R. B.: Role of T lymphocyte replicative senescence in vaccine efficacy. *Vaccine*. 2007, vol. 25, issue 4, ISSN 0264410X, p. 599-604.
- [26] Evans M. J.; Saghatelian A.; Sorensen E. J.; Cravatt B. F.: Target discovery in small-molecule cell-based screens by in situ proteome reactivity profiling. *Nature Biotechnology*. 2005, vol. 23, issue 10, ISSN 1087-0156, p. 1303-1307.
- [27] Freund A.; Orjalo A. V.; Desprez P.-Y.; Campisi J.: Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends in Molecular Medicine*. 2010, vol. 16, issue 5, ISSN 14714914, p. 238-246.
- [28] Geiger H.; de Haan G.; Florian M. C.: The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nature Reviews Immunology*. 2013, vol. 13, issue 5, ISSN 1474-1733, p. 376-389.
- [29] Ghosh S.; Zhou Z.: Genetics of aging, progeria and lamin disorders. *Current opinion in genetics & development*. 2014, vol. 26, ISSN 0959437X, p. 41-46.

- [30] Hanna J.; Saha K.; Pando B.; Van Zon J.; et al.: Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*. 2009, vol. 462, issue 7273, ISSN 0028-0836, p. 595-601.
- [31] Hari P.; Acosta J. C.: Detecting the Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) by High Content Microscopy Analysis. *Oncogene-Induced Senescence*. New York: Springer New York. 2017, ISBN 978-1-4939-6668-4, p. 99-109.
- [32] Hayflick L.; Moorhead P. S.: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 1961, vol. 25, issue 3, ISSN 00144827, p. 585-621.
- [33] He L.; Hannon G. J.: MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*. 2004, vol. 5, issue 7, ISSN 1471-0056, p. 522-531.
- [34] He L.; He X.; Lim L. P.; De Stanchina E.; et al.: A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007, vol. 447, issue 7148, ISSN 0028-0836, p. 1130-1134.
- [35] Herranz N.; Gil J.: Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation*. 2018, vol. 128, issue 4, ISSN 0021-9738, p. 1238-1246.
- [36] Heyn H.; Li N.; Ferreira H. J.; Moran S.; et al.: Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012, vol. 109, issue 26, ISSN 0027-8424, p. 10522-10527.
- [37] Hoenicke, L.; Zender L.: Immune surveillance of senescent cells--biological significance in cancer- and non-cancer pathologies. *Carcinogenesis*. 2012, vol. 33, issue 6, ISSN 0143-3334, p. 1123-1126.
- [38] Höhn A.; Weber D.; Jung T.; Ott Ch.; et al.: Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biology*. 2017, vol. 11, ISSN 22132317, p. 482-501.
- [39] Chen Q.; Fischer A.; Reagan J. D.; Yan L. J.; Ames B. N.: Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells.



*Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995, vol. 92, issue 10, ISSN 0027-8424, p. 4337-4341.

- [40] Chen Q. M.; Liu J.; Merrett J. B.: Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response of normal human fibroblasts. *Biochemical Journal*. 2000, vol. 347, issue 2, ISSN 0264-6021, p. 543-551.
- [41] Childs B. G.; Durik M.; Baker D. J.; van Deursen J. M.: Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature Medicine*. 2015, vol. 21, issue 12, ISSN 1078-8956, p. 1424-1435.
- [42] Chkhotua A.; Shohat M.; Tobar A.; Magal N.; et al.: Replicative senescence in organ transplantation—mechanisms and significance. *Transplant Immunology*. 2002, vol. 9, issue 2-4, ISSN 09663274, p. 165-171.
- [43] Choi J.-E.; Mostoslavsky R.: Sirtuins, metabolism, and DNA repair. *Current opinion in genetics & development*. 2014, vol. 26, ISSN 0959437X, p. 24-32.
- [44] Chou J. P.; Effros R. B.: T Cell Replicative Senescence in Human Aging. *Current Pharmaceutical Design*, 2013, vol. 19, issue 9, ISSN 13816128, p. 1680-1698.
- [45] Jafri M. A.; Ansari S. A.; Alqahtani M. H.; Shay J. W.: Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Medicine*. 2016, vol. 8, issue 1, ISSN 1756-994X, p. 1-18.
- [46] Johmura Y.; Nakanishi M.: Multiple facets of p53 in senescence induction and maintenance. *Cancer Science*. 2016, vol. 107, issue 11, ISSN 13479032. ISSN 13479032, p. 1550-1555.
- [47] Johmura Y.; Shimada M.; Misaki T.; Naiki-Ito A.; et al.: Necessary and Sufficient Role for a Mitosis Skip in Senescence Induction. *Molecular Cell*. 2014, vol. 55, issue 1, ISSN 10972765, p. 73-84.
- [48] Kang H. T.; Lee K. B.; Kim S. Y.; Choi H. R.; et al.: Autophagy Impairment Induces Premature Senescence in Primary Human Fibroblasts. *PLoS ONE*. 2011, vol. 6, issue 8, ISSN 1932-6203, p. 1-12.

- [49] Krause K.-H.: Aging: A revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. *Experimental Gerontology*. 2007, vol. 42, issue 4, ISSN 05315565, p. 256-262.
- [50] Kuilman T.; Michaloglou C.; Mooi W. J.; Peeper D. S.: The essence of senescence. *Genes & Development*. 2010, vol. 24, issue 22, ISSN 0890-9369, p. 2463-2479.
- [51] Lafferty-whyte K.; Cairney C. J.; Jamieson N. B.; Oien K. A.; Keith W. N.: Pathway analysis of senescence-associated miRNA targets reveals common processes to different senescence induction mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2009, vol. 1792; issue 4, ISSN 09254439, p. 341-352.
- [52] Laird P. W.: Cancer epigenetics. *Human Molecular Genetics*. 2005, vol. 14, issue 1, ISSN 1460-2083, p. 65-76.
- [53] Leal J. F.; Ferrer I.; Blanco-Aparicio C.; Hernández-Losa J.; et al.: S-adenosylhomocysteine hydrolase downregulation contributes to tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2008, vol. 29, issue 11, ISSN 1460-2180, p. 2089-2095.
- [54] Liu D.; Hornsby P. J.: Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion. *Cancer Research*. 2007, vol. 67, issue 7, ISSN 0008-5472, p. 3117-3126.
- [55] Lleonart M. E.; Artero-Castro A.; Kondoh H.: Senescence induction; a possible cancer therapy. *Molecular Cancer*. 2009, vol. 8, issue 1, ISSN 1476-4598, p. 1-10.
- [56] Loeser R. F.: Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2009, vol. 17, issue 8, ISSN 10634584, p. 971-979.
- [57] Muñoz-Espín D.; Serrano M.: Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014, vol. 15, issue 7, ISSN 1471-0072, p. 482-496.

- [58] Noren Hooten N.; Evans M. K.: Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *Journal of Visualized Experiments*. 2017, issue 123. ISSN 1940-087X, p. 1-14.
- [59] Olovnikov A. M.: A theory of marginotomy. *Journal of Theoretical Biology*. 1973, vol. 41, issue 1, ISSN 00225193, p. 181-190.
- [60] Olsen C. L.; Gardie B.; Yaswen P.; Stampfer M. R.: Raf-1-induced growth arrest in human mammary epithelial cells is p16-independent and is overcome in immortal cells during conversion. *Oncogene*. 2002, vol. 21, issue 41, ISSN 0950-9232, p. 6328-6339.
- [61] Pole A.; Dimri M.; Dimri G. P.: Oxidative stress, cellular senescence and ageing. *AIMS Molecular Science*. 2016, vol. 3, issue 3, ISSN 2372-0301, p. 300-324.
- [62] Reddy J. P.; Li Y.: Oncogene-Induced Senescence and its Role in Tumor Suppression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2011, vol. 16, issue 3, ISSN 1083-3021, p. 247-256.
- [63] Regulski M. J.: Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds*. 2017, vol. 29, issue 6, ISSN 1044-7946, p. 168-174.
- [64] Rodier F.; Campisi J.: Four faces of cellular senescence. *The Journal of Cell Biology*. 2011, vol. 192, issue 4, ISSN 0021-9525, p. 547-556.
- [65] Rufini A., Tucci P.; Celardo I.; Melino G.: Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene*. 2013, vol. 32, issue 43, ISSN 0950-9232, p. 5129-5143.
- [66] Sabin R. J.; Anderson R. M.: Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integrity*. 2011, vol. 2, issue 7, ISSN 2041-9414, p. 1-9.
- [67] Saunders L. R.; Verdin E.: Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*. 2007, vol. 26, issue 37, ISSN 0950-9232, p. 5489-5504.
- [68] Sies H.: Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. 2015, vol. 4, ISSN 22132317, p.180-183.

- [69] Shay J. W.; Wright W. E.: Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*. 2005, vol. 26, issue 5, ISSN 1460-2180, p. 867-874.
- [70] Sidler C.; Kovalchuk O.; Kovalchuk I.: Epigenetic Regulation of Cellular Senescence and Aging. *Frontiers in Genetics*. 2017, vol. 8, issue 138, ISSN 1664-8021, p. 1-11.
- [71] Schieber M.; Chandel N. S.: ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*. 2014, vol. 24, issue 10, ISSN 09609822, p. 453-462.
- [72] Schreiber K. H.; Kennedy B. K.: When Lamins Go Bad: Nuclear Structure and Disease. *Cell*. 2013, vol. 152, issue 6, ISSN 00928674, p. 1365-1375.
- [73] Slabý O.; et al.: Molekulární medicína. Praha: Galén. 2015, ISBN 978-80-7492-121-6, p. 22-25.
- [74] Spurgers K. B.; Gold D. L.; Coombes K. R.; Bohnenstiehl N. L.; et al.: Identification of Cell Cycle Regulatory Genes as Principal Targets of p53-mediated Transcriptional Repression. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, vol. 281, issue 35, ISSN 0021-9258, p. 25134-25142.
- [75] Suzuki M.; Boothman D. A.: Stress-induced Premature Senescence (SIPS). *Journal of Radiation Research*. 2008, vol. 49, issue 2, ISSN 0449-3060, p. 105-112.
- [76] Ubersax J. A.; Woodbury E. L.; Quang P. N.; Paraz M.; et al.: Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*. 2003, vol. 425, issue 6960, ISSN 0028-0836, p. 859-864.
- [77] Uhlmann F.; Bouchoux C.; Lopez-Aviles S.: A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011, vol. 366, issue 1584, ISSN 0962-8436, p. 3572-3583.
- [78] Ushijima T.; Okochi-Takada E.: Aberrant methylations in cancer cells: Where do they come from?. *Cancer Science*. 2005, vol. 96, issue 4, ISSN 1347-9032, p. 206-211.

- [79] Valko M.; Rhodes C. J.; Moncol J.; Izakovic M.; et al.: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006, vol. 160, issue 1, ISSN 00092797, p. 1-40.
- [80] Vogelstein B.; Lane D.; Levine A. J.: Surfing the p53 network. *Nature*. 2000, vol. 408, issue 6810, ISSN 0028-0836, p. 307-310.
- [81] Vousden K. H.; Lu X.: Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*. 2002, vol. 2, issue 8, ISSN 1474-175X, p. 594-604.
- [82] Walters M. S.; De B. P.; Salit J.; Buro-Auriemma L. J.; et al.: Smoking accelerates aging of the small airway epithelium. *Respiratory Research*. 2014, vol. 15, issue 1, ISSN 1465-993X, p. 1-13.
- [83] Wang A. S.; Dreesen O.: Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging. *Frontiers in Genetics*. 2018, vol. 9, issue 247, ISSN 1664-8021, p. 1-14.
- [84] Wiebusch L.; Hagemeyer C.: P53- and p21-dependent premature APC/C–Cdh1 activation in G2 is part of the long-term response to genotoxic stress. *Oncogene*. 2010, vol. 29, issue 24, ISSN 0950-9232, p. 3477-3489.
- [85] Witkowski J.: The myth of cell immortality. *Trends in Biochemical Sciences*. 1985, vol. 10, issue 7, ISSN 09680004, p. 258-260.
- [86] Wong E. S. M.; Le Guezennec X.; Demidov O. N.; Marshall N. T.; et al.: P38MAPK Controls Expression of Multiple Cell Cycle Inhibitors and Islet Proliferation with Advancing Age. *Developmental Cell*. 2009, vol. 17, issue 1, ISSN 15345807, p. 142-149.
- [87] Young A. R. J.; Narita M.; Narita M.: Cell Senescence as Both a Dynamic and a Static Phenotype. *Cell Senescence*. Totowa: Humana Press. 2013, vol. 965, ISBN 978-1-62703-238-4, p. 1-13.
- [88] Zhang R.; Adams P. D.: Heterochromatin and its Relationship to Cell Senescence and Cancer Therapy. *Cell Cycle*. 2014, vol. 6, issue 7, ISSN 1538-4101, p. 784-789.