

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Michal Zima

Změny oxidační fosforylace během rozvoje buněčné senescence
Changes in oxidative phosphorylation during development of cellular senescence

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: MUDr. Zdeněk Hodný, CSc.

Praha, 2014

Poděkování:

Touto cestou bych chtěl velmi poděkovat svému školiteli, MUDr. Zdeňkovi Hodnému, CSc., za jeho bezmeznou trpělivost a ochotu, která mě provázela po celou dobu práce. Bylo mi velkou ctí psát bakalářskou práci ve spolupráci s ním.

Zároveň si dovoluji poděkovat svým rodičům, kteří mě po celou dobu mého dosavadního života podporovali a stáli při mně. Nebýt mých rodičů, nebyl bych tam, kde právě jsem a patrně bych ani nic nedokázal. Děkuji.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Záborné Lhotě, 1. 8. 2014

Podpis

Abstrakt

Buněčná senescence představuje trvalé zastavení buněčného cyklu a je chápána jako aktivní odpověď buňky na nejrůznější vnitřní i vnější formy stresu, mezi které řadíme zejména poškození a ztrátu ochranných telomerických sekvencí, aktivaci některých onkogenů, poškození DNA a také účinky určitých cytokinů. Tato práce popisuje mechanismy, kterými buňky mohou dosáhnout senescentního fenotypu, a dává je do souvislosti se změnami oxidační fosforylace. Jsou také zmíněny vlastnosti senescentních buněk a důsledky jejich působení na své okolí. Zvláštní pozornost je věnována vzniku a působení reaktivních forem kyslíku, NADPH oxidázám a vlivu signálních drah STAT3 a TGF- β na indukci buněčné senescence a na respirační řetězec.

Klíčová slova:

buněčná senescence, volné radikály kyslíku, cytokiny, mitochondrie, oxidačně fosforylační řetězec, NADPH oxidázy, signální transduktor a aktivátor transkripce 3 (STAT3), TGF- β , odpověď na poškození DNA

Abstract

Cellular senescence represents a state of permanent cell cycle arrest. It is considered to be an active response of the cell to various extrinsic and intrinsic types of stress, which are damaged and/or uncapped telomeres, activation of certain oncogenes, DNA damage and effects of several cytokines. This thesis describes current mechanisms which may result in establishment of senescence phenotype, putting those facts in association with changes in oxidative phosphorylation. In thesis are also mentioned features of senescence cells and their impact on the neighborhood. Special attention is focused on the role of reactive oxygen species in promotion of cellular senescence, mechanisms of their elevation, the role of NADPH oxidases and the inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation complexes by activity of cytokine signaling pathways STAT3 and TGFbeta.

Key words:

cellular senescence, reactive oxygen species, cytokines, mitochondria, oxidative phosphorylation chain, NADPH oxidases, Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3), TGF- β , DNA damage response (DDR)

Obsah

1. Úvod	5
2. Elektronový transport a oxidační fosforylace	6
3. Buněčná senescence	7
3.1 Charakteristika senescentních buněk	7
3.2 Signální dráhy vedoucí k rozvoji buněčné senescence	9
3.2.1 Odpověď na poškození DNA	9
3.2.2 Dráha p53	10
3.2.3 Dráha p16 ^{INK4a} -pRB	11
4. Typy buněčné senescence	12
4.1 Replikační senescence	12
4.2 Předčasná senescence	12
4.2.1 Stresem indukovaná předčasná senescence	13
4.2.2 Onkogenní senescence	13
4.2.3 Sekundární senescence („bystander“ senescence)	14
5. Vliv reaktivních forem kyslíku na rozvoj buněčné senescence	15
5.1 Reaktivní formy kyslíku	15
5.2 ROS u konkrétních typů buněčné senescence	16
5.3 NADPH oxidázy	17
6. Spojení STAT3 a ETC	20
6.1 STAT3	20
6.2 STAT3 a jeho vliv na komplexy ETC	20
6.3 Role STAT3 při buněčné senescenci	21
7. Úloha TGF-beta v buněčné senescence	22
7.1 TGF-β	22
7.2 Indukce senescence TGF-β	22
8. Závěr	24
Seznam použité literatury	25

1. Úvod

Buněčná senescence, trvalé zastavení buněčného cyklu proliferujících buněk, byla poprvé popsána před více než padesáti lety jako proces limitující proliferaci lidských embryonálních fibroblastů v kultuře (Hayflick & Moorhead, 1961). Po určitém počtu populačních zdvojení totiž proliferující buňky ztrácí schopnost dále se dělit. Tento práh nazýváme Hayflickův limit (Hayflick, 1965). Nejedná se pouze o fenomén pozorovatelný *in vitro*. Senescentní buňky, nadále metabolicky aktivní a dlouhodobě životaschopné, lze nalézt též *in vivo*.

Dnes chápeme senescenci jako jednu z aktivních odpovědí na stres a poškození, se kterým se musí buňka průběžně vyrovnávat a které může být endogenního i exogenního původu. K rozvoji senescence pak dochází v případě nemožnosti opravit vzniklá poškození, včetně poškození DNA představované nejčastěji dvouvláknové zlomy DNA, jež jsou vážným nebezpečím pro zachování stability genomu. Díky navození senescentního stavu tak může buňka zamezit mj. případnému rozvoji rakoviny. Z podstaty věci je buněčná senescence dlouhodobě spojována také se stárnutím *per se* (Campisi, 2005).

Ve své práci se pokusím shrnout známá fakta a pohledy na buněčnou senescenci ve spojitosti se změnami oxidační fosforylace a oxidačním stresem.

2. Elektronový transport a oxidační fosforylace

Mitochondrie jsou intracelulární orgány zodpovědné za celou řadu esenciálních funkcí (apoptóza, udržování stálé hladiny vápníku, buněčná signalizace). Neméně zásadní je jejich role coby výrobce hlavní energetické sloučeniny, adenosin-trifosfátu (ATP), procesem oxidační fosforylace.

Oxidační fosforylací označujeme integrovaný mechanismus stávající se z transportního řetězce elektronů (z angl. ETC – *Electron Transport Chain*), tedy několika specifických proteinových komplexů na vnitřní membráně mitochondrie (Navarro & Boveris, 2007), jejichž prostřednictvím je volná energie elektronů transformována z redukovaných redoxních přenašečů NADH a FADH₂ až na molekulární kyslík za vzniku vody. Díky tomu dochází k fosforylaci ADP v komplexu V, ATP syntáze. Je též známo, že přenášení elektronů mitochondriálním respiračním řetězcem vede k tvorbě radikálů a reaktivních forem kyslíku.

Komplex I (NADH dehydrogenáza) a komplex II (sukcinát dehydrogenáza) přijmou elektrony z redukovaných redoxních přenašečů a po gradientu redoxního potenciálu je přenesou na ubiquinon (koenzym Q) za vzniku ubiquinolu. V komplexu III dojde k přenosu elektronů z ubiquinolu na cytochrom c, který je dále přenesen na komplex IV (cytochrom c oxidáza), kde dochází k redukci finálního akceptoru těchto elektronů, kyslíku, na vodu. Funkcí řetězce je využít energii uvolněnou transportem elektronu k přepumpování vodíkových protonů (H⁺) z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru. Tím vzniká tzv. proton-motivní síla (Mitchell & Moyle, 1965), která má za následek vtok H⁺ zpět do matrix skrze komplex V, což vede k samotné fosforylaci, tedy k syntéze ATP. Tento proces nazýváme oxidační fosforylace (Walker *et al.*, 1995).

3. Buněčná senescence

Proliferující buňky mohou v případě neopravitelného poškození přejít do stavu tzv. buněčné senescence. Jedná se v podstatě o permanentní zastavení buněčného cyklu, nicméně buňka zůstává dlouhodobě životaschopná. Ačkoliv byla senescence podle Hayflicka (1965) na základě omezeného proliferačního limitu testovaných buněk (lidské fibroblasty) původně chápána coby aspekt stárnutí na buněčné úrovni, dnes je senescence s ohledem na nové informace brána také jako jedna z možností, jak se může buňka vypořádat s nejrůznějšími formami stresu. Je známa též účast buněčné senescence při hojení ran a vývoji organismu (viz Muñoz-Espín & Serrano, 2014).

5.1. Charakteristika senescentních buněk

Senescentní buňky lze detekovat na základě nejrůznějších charakteristik. Senescence se totiž projevuje na většině úrovní organizace buňky - od modifikované buněčné exprese až po rapidní změny v morfologii buněk. Typickým charakteristickým morfologickým rysem je roztažení a zploštění buněčného těla a jádra (Bayreuther *et al.*, 1988), buňky často obsahují větší počet jader i jadérek, mají více lysosomů, Golgiho aparátu a cytoplazmatických filament (Shay & Wright, 2000). Charakteristické je rovněž zvýšení aktivity β -galaktosidázy, které je jedním z projevů celkově změněné transkripce v senescentních buňkách (Dimri *et al.*, 1995). Jde o enzym rozkládajícího laktózu na dílčí monosacharidy, glukózu a galaktózu, který je přítomen v lysosomech a jeho pH optimum se nachází v prostředí při pH 4 (Lee *et al.*, 2004). Během rozvoje senescence dochází k expanzi lysosomů, kdy lze změřit aktivitu enzymu i při suboptimálním pH 6 (Kurz *et al.*, 2000; Lee *et al.* 2006). Role tohoto enzymu v rozvoji buněčné senescence, pokud nějaká je a nejedná se pouze o následek, dosud není známa.

V důsledku rozsáhlých změn genové exprese dochází k aktivaci mnoha inhibitorů buněčného cyklu. Jedná se o inhibitory cyklin-dependentních kináz z rodiny INK a KIP. p16^{INK4a} (Hara *et al.*, 1996) a p21^{waf1/cip1} (Shelton *et al.*, 1999) hrají zásadní roli v signálních drahách zodpovědných za rozvoj buněčné senescence. Tyto dráhy a jejich mechanismy související s poškozením DNA a oxidačním stresem budou podrobněji popsány dále. Oproti zvýšené exprese různých inhibitorů buněčného cyklu je exprese proteinů důležitých pro buněčnou proliferaci výrazně potlačena. Zapříčiňuje to mj. akumulování hypofosforylované formy pRB, retinoblastomového proteinu patřící mezi tzv. pocket-proteiny, který inaktivuje transkripční faktor buněčné proliferace E2F, což má za následek skutečnost, že buňka se nemůže dále dělit a proliferovat (Hiebert *et al.*, 1992; Narita *et al.*, 2003).

Ne všechny modifikace genové exprese se týkají regulace buněčného cyklu, respektive proliferace. Projevují se též sekrecí nejrůznějších cytokinů (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11; Coppe *et al.*, 2008), růstových faktorů (vaskulární endoteliální růstový faktor - VEGF; Coppe *et al.*, 2006) a proteáz (MMP3; Parrinello *et al.*, 2005) u některých senescentních buněk. Tento jev nazýváme sekrečním fenotypem asociovaným se senescencí (SASP - z angl. *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) (Coppe *et al.* 2008; Rodier *et al.* 2009).

SASP má pleiotropní efekty, které však dosud nejsou detailně popsány s ohledem na komplexitu a proměnlivost složení senescentního sekretomu. Sekretované cytokiny poukazují na možnost komunikace s buňkami imunitního systému, které tak mohou být upozorňovány na přítomnost poškozených buněk (Soriani *et al.*, 2009). Proteázy, které jsou součástí sekretomu, zamezují akumulaci fibronektinu a kolagenu v poškozených tkáních. Senescence tak zřejmě hraje roli při regeneraci těchto tkání (Shivshankar *et al.*, 2012; Jun & Lau 2010). Na druhou stranu může docházet k tvorbě lokálních chronických zánětlivých ložisek (Davalos *et al.*, 2010) zejména u starších organismů, jejichž imunitní systém pravděpodobně již nepracuje tak efektivně i vzhledem k odstraňování senescentních buněk. V konečném důsledku může dojít paradoxně i k malignizaci (Krtolica *et al.*, 2001). Bylo také dokázáno, že pravděpodobně díky SASP se objevují případy narušování okolní tkáně a změn její morfologie. Konkrétně lze uvést indukci migrace a proliferace okolních buněk senescentními buňkami hladkého svalstva plicní artérie, což přispívá k lokálním hypertrofiím, zeslabením artérií a rozvoji pulmonální hypertenze (Noureddine *et al.*, 2011).

Buněčná senescence přispívá přinejmenším ke čtyřem (pato)fyziologickým procesům - k potlačování nádorového bujení, hojení poškozených tkání, stárnutí a rozvoji rakoviny. Tento paradox, kdy dva aspekty lze považovat za přínosné (převažují v mládí) a dva naopak za škodlivé (převažují v pokročilejším věku), lze podle některých hypotéz vysvětlit pomocí evoluční teorie antagonistické pleiotropie (Campisi, 2003; Rauser *et al.*, 2006). Co je pro organismus prospěšné v mládí, co ho evolučně zvýhodňuje, to mu posléze ve stáří může škodit. A vskutku, při hromadění senescentních buněk v organismu s rostoucím věkem (Campisi, 2005), dochází k degenerativnímu poškození okolních buněk a tkání, chronickým zánětlivým ložiskům a také rozvoji nádorových onemocnění. Na druhou stranu spolu se stárnutím organismu stárne i imunitní systém, který je pravděpodobně zodpovědný za aktivní odstraňování senescentních buněk. Jelikož se efektivita tohoto procesu s rostoucím věkem může snižovat, může pak docházet k relativně zrychlené akumulaci senescentních buněk, k sekundární senescenci a tím k rozvoji se stárnutím asociovaných nemocí.

5.2. Signální dráhy vedoucí k rozvoji buněčné senescence

Jakmile poškození DNA přeroste určitou mez, buňka podstoupí buď apoptózu, nebo senescenci. V případě senescence pak dojde na základě perzistentní aktivity dráhy odpovědi na poškození DNA k zapojení některé ze signalizačních drah, např. p53/p21 nebo p16^{INK4a}-pRB. Aktivace určité větve záleží na druhu stimulu a také na buněčném typu, nicméně mechanismus a důvod upřednostnění jedné dráhy nad druhou dosud nebyl zcela objasněn.

3.2.1. Odpověď na poškození DNA

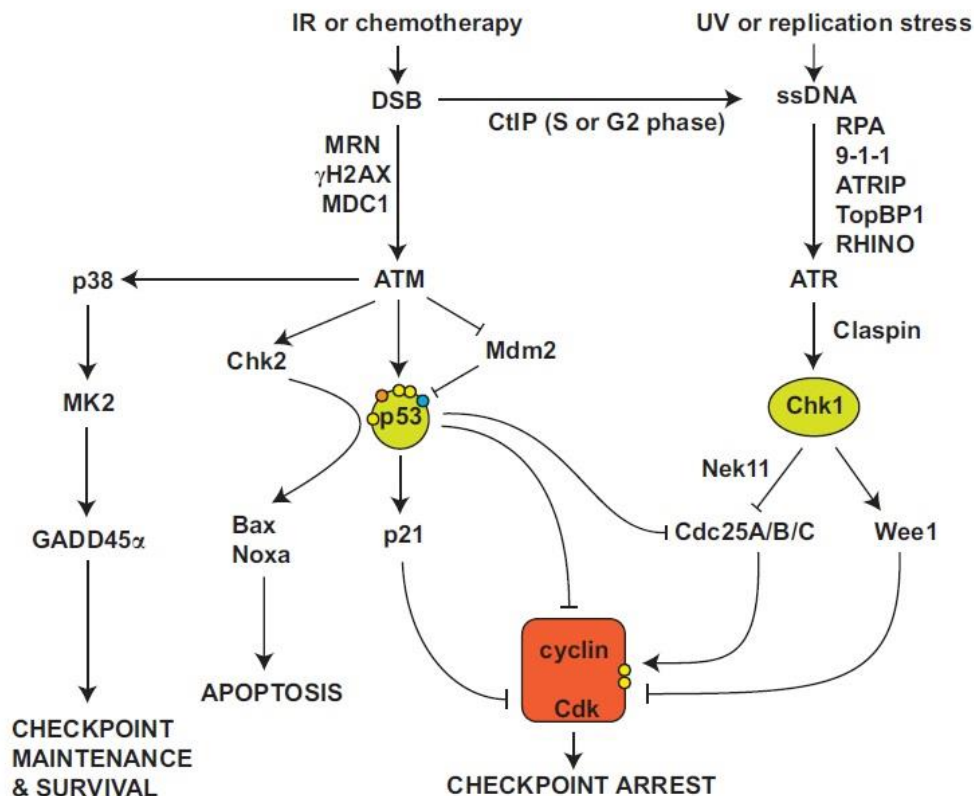
Odpověď na poškození DNA (z angl. DDR – *DNA Damage Response*) je signální dráha představující zásadní aspekt v zájmu udržení integrity genomu. Jde o jeden z mechanismů eukaryotických buněk jak se vyrovnat genotoxickému stresu.

K aktivaci DDR dochází na základě detekce poškození DNA. Signální dráhu lze rozdělit na dvě větve. První větev, ATM-Chk2, je aktivována dvouvláknovými zlomy DNA (z angl. DSBs - *Double Strand Breakes*). Druhou větev, ATR-Chk1, pak spouští detekování jednovláknové DNA (ssDNA) a jednovláknových zlomů (z angl. SSBs - *Single Strand Breakes*).

Na základě přítomnosti DSBs, kterou detekuje komplex MRN, se spouští první cesta DDR. Dochází k aktivaci ATM, jež tvoří homodimery, které se navzájem fosforylují (Bakkenist & Kastan, 2003). Po následné disociaci na monomery ATM fosforyluje histon H2AX. K fosforylaci dochází na serinu 139 a tyto isoformy jsou označovány jako γ H2AX. Protein MDC1 se váže na histony γ H2AX, což má za následek zvýšení koncentrace komplexu MRN v důsledku interakce mezi proteiny MDC1 a NBS1 (NBS1 totiž tvoří část komplexu MRN; Grenon *et al.*, 2001) (Melander *et al.*, 2008). Tento nárůst MRN implikuje další aktivaci kináz ATM a tvoří tak pozitivní zpětnou vazbu. Jakmile dosáhne hladina ATM určitého stupně, dojde k aktivaci kinázy Chk2.

Při vzniku ssDNA, např. při poruše běžného průběhu replikace DNA, dochází k vazbě proteinů RPA na vlákno DNA. S RPA následně interaguje komplex ATRIP-ATR, čímž se kináza dostává do místa poškození (Cortez *et al.*, 2001). Samotnou aktivaci ATR zajišťuje komplex 9-1-1 a také fosforylovaný adaptorový protein claspin, který posléze společně s ATR aktivuje kinázu Chk1 (Kumagai *et al.*, 2000).

Na základě fosforylování proteinů kinázami Chk1 a Chk2 se spouští oprava DNA, transkripce, programovaná buněčná smrt či zastavení buněčného cyklu (viz obrázek č. 1), popřípadě navození buněčné senescence, jak je popsáno níže.



Obrázek č. 1 Větvě DDR signální dráhy a její důsledky.

Mechanismy jsou popsány v textu. Zásadní proteiny (p53 a Chk1) jsou zde znázorněny zeleně. Protein p53 je dále stabilizován mnoha postranlačnými modifikacemi (označeno tečkami) právě díky činnosti ATM, ATR, Chk1 a Chk2. Převzato z „Medema & Macůrek, 2012 Oncogene“

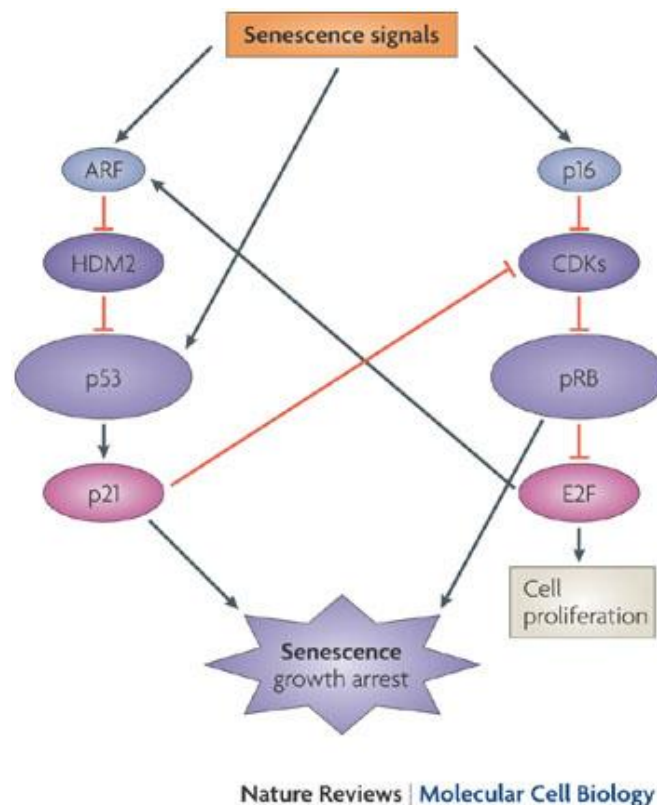
3.2.2. Dráha p53

Transkripční faktor p53 patří mezi hlavní mediátory pro-senescentních signálů v důsledku aktivace onkogenů, dysfunkce telomer, poškození DNA či zvýšené hladiny ROS. V senescentních buňkách vykazuje zvýšenou aktivitu i hladinu (Atadja *et al.*, 1995; Vaziri *et al.*, 1997). Je negativně regulován E3 ubiquitin-ligázou Hdm2 (u myši Mdm2), která indukuje jeho degradaci (Kubbutat *et al.*, 1997). Při zvýšení aktivity p53 dochází i ke zvýšení exprese Hdm2, který následně p53 utlumuje. Jde tedy o negativní zpětnou vazbu (Lahav *et al.*, 2004).

Na základě signálů DDR dochází prostřednictvím činnosti kináz Chk1 a Chk2, které inhibují Hdm2, k aktivaci p53. Obdobně je Hdm2 potlačován i proteinem P14^{ARF} (u myši p19^{ARF}; Chang *et al.*, 2007), a to v případě onkogenní signalizace (další z pro-senescentních signálů).

Aktivovaný p53 následně spouští transkripci inhibitoru cyklin-dependentních kináz p21 (Brown *et al.*, 1997), což vede k akumulaci hypofosforylovaného pRb, který tím pádem

inhibuje transkripční faktor E2F. To se projeví pozastavením nebo úplným zastavením buněčného cyklu, tedy buněčnou senescencí.



Obrázek č. 2 Senescence je kontrolována drahami p53/p21 nebo p16^{INK4a}-pRB.
Převzato z Judith Campisi & Fabrizio d'Adda di Fagagna, 2007

3.2.3. Dráha p16^{INK4a}-pRB

Pro-senescentními signály indukovaná vyšší exprese p16^{INK4a} vede k inhibici cyklin-dependentních kináz, tudíž nedojde k fosforylaci a inaktivaci pRB, který tak zůstává přítomen ve své aktivní hypofosforylované formě (Serrano *et al.*, 1997) a tvoří s proteinem E2F komplex. E2F ovlivňuje např. geny pro cyklin E a A, Cdk1 či Cdc25, tedy geny nezbytné ke zdárnému průběhu buněčného cyklu, k buněčné proliferaci. V případě aktivního pRB jsou tyto geny tudíž umlčeny, buňka přestává proliferovat a může dojít k rozvoji senescence (Campisi, J. & F. d'Adda di Fagagna, 2007). Senescence navozená touto signální drahou je podle všeho ireverzibilní, na rozdíl od případu, kdy k ní dojde přes kaskádu p53 (Beauséjour *et al.*, 2003). Dochází totiž ke stálé represi genů ovlivňovaných transkripčním faktorem E2F formováním tzv. heterochromatinových fokusů asociovaných se senescencí (z angl. SAHF - *senescence-associated heterochromatin foci*; Narita *et al.*, 2003).

4. Typy buněčné senescence

4.1. Replikační senescence

Jelikož replikace DNA DNA polymerázou je jednosměrná (ve směru 5' → 3') a vyžaduje pro zahájení syntézy DNA primer, není DNA polymeráza schopna replikovat DNA v celé délce. Z tohoto důvodu se předpokládá, že dochází ke ztrátám krátkých úseků DNA na koncích chromosomů při každém buněčném dělení (tzv. „*end replication problem*“ Olovnikov, 1971; Watson, 1972; Olovnikov, 1973). Tandemové repetice chránící konce chromosomů před vzájemným fúzováním zvané telomery (Blackburn & Gall, 1978) jsou syntetizovány enzymem telomerázou. Jedná se o reverzní transkriptázu skládající se z RNA, která je templátem pro syntézu telomerických sekvencí, a katalytickou podjednotkou polymerázy TERT provádějící vlastní syntézu (Greider & Blackburn, 1987; Greider & Blackburn, 1989). V buňkách, jež tento enzym exprimují, prakticky nedochází k úbytku telomerických sekvencí (Bodnar *et al.*, 1998). Enzym je aktivní při raném vývoji, ale s postupem času jeho množství i aktivita značně klesá (Collins & Mitchell, 2002). Kriticky krátké a nefunkční telomery spouští DDR. Proteiny, které jsou součástí telomer, inhibují opravu poškození v oblasti těchto sekvencí (d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003; Carneiro *et al.*, 2010; Fumagalli *et al.*, 2012), čímž dochází k trvalé aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu, k jeho zástavě a k rozvoji senescence (Olovnikov, 1996). Konečný stav kultury nazýváme replikační senescence, kdy v populaci senescentních buněk převažuje poškození telomer. Zda se na dysfunkci telomer během replikační senescence podílí i jejich postupné zkracování, není v současnosti jednoznačně prokázáno. Oxidační stres a jiné genotoxiny urychlují rovněž poškození telomerické DNA a tím i nástup replikační senescence (von Zglinicki *et al.*, 1995; Forsyth *et al.*, 2003).

4.2. Předčasná senescence

Senescence lze dosáhnout celou škálou stresových stimulů. Hovoříme tak o předčasné senescenci nebo stresem indukované předčasné senescenci (SIPS - z angl. *Stress-Induced Premature Senescence*). Podle typu stimulu rozlišujeme např. senescenci aktivovanou onkogeny, senescenci vyvolanou genotoxickými látkami (*drug-induced senescence*), reaktivními formami kyslíku či bakteriální toxiny (Blažková *et al.*, 2009). Tyto stimuly vedou k poškození DNA či jinému mechanismu aktivace zástavy buněčného cyklu. Předčasnou ji

nazýváme proto, že je možno ji vyvolat před vyčerpáním replikačního potenciálu, Hayflickova limitu.

Senescence je často vyvolána neopravitelnými lézemi DNA. Otázka, proč určitý typ lézí DNA není opraven a vede k rozvoji buněčné senescence, není zcela objasněna. Nejčastější léze DNA, které vedou k předčasné senescenci, jsou dvouvláknové zlomy (Robles & Adami 1998; Sedelnikova et al. 2004).

4.2.1. Stresem indukovaná předčasná senescence

Buněčné kultury se musí oproti buňkám *in vivo* vyrovnávat s umělým prostředím. Jde zejména o vysokou koncentrací kyslíku (*in vivo* 3 – 7% O₂; *in vitro* obvykle 21% O₂), tedy oxidační stres. Dalšími faktory pak jsou abnormální hladiny živin, růstových faktorů, nepřítomnost sousedních buněk a extracelulární matrix. Tyto změny se pak mohou projevit v rozvoji tzv. stresem indukované senescence (SIPS; Sherr & DePinho 2000; Toussaint *et al.*, 2000). Mechanismus je obdobný jako u rozvoje replikační senescence, a sice díky perzistentní aktivitě DDR.

SIPS přímo nezávisí na stavu telomer a může se rozvinout jak u normálních, tak i u rakovinných buněk, které exprimují telomerázu. Jako příklad lze mj. uvést myší zárodečně fibroblasty (MEF – z angl. *Murine Embryomastic Fibroblasts*), které se za normoxie dostanou do senescence i přesto, že exprimují telomerázu (Prowse & Greider, 1995) a mají nepoškozené telomery (Kipling & Cooke, 1990). Nástup stresem indukované senescence lze zpomalit úpravou podmínek v kultuře (Loo *et al.*, 1987), např. kultivací za fyziologických koncentrací O₂ (Parrinello *et al.*, 2003), nebo v přítomnosti antioxidantů.

4.2.2. Onkogenní senescence

Prvním popsáním typem onkogenní senescence je senescence vyvolaná konstitutivně aktivní mutantou onkogenu H-Ras^{V12}, která způsobuje hyperaktivaci signální dráhy MAPK (Serrano *et al.*, 1997). Tato hyperaktivace vede u normálních buněk k oxidačnímu a replikačnímu stresu, poškození DNA, následné aktivaci signálních drah spjatých s poškozením DNA, zástavě buněčného cyklu a nakonec k rozvoji buněčné senescence. Tento proces je pravděpodobně jedním z důležitých mechanismů, kterým se buňky brání nádorové transformaci.

Rozvoj H-Ras-onkogenní senescence lze potlačit funkční inaktivací p16^{INK4a} či inhibicí nádorových supresorů p53, jeho upstream regulátoru p14^{ARF}, a p21. V případě

snížení exprese těchto proteinů došlo k maligní transformaci (Serrano *et al.*, 1997), což potvrzuje klíčovou roli zmíněných proteinů v rozvoji senescence jako protinádorové bariéry.

4.2.3. Sekundární senescence („bystander“ senescence)

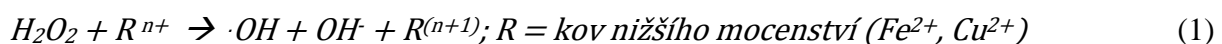
Po dlouhotrvajícím vystavení kultur buněk různým cytokinům jako TNF- α (Babbar & Casero, 2006), IL-6 (Kojima *et al.*, 2012) či TGF- β (Reimann *et al.*, 2010) dochází ke zvýšené produkci reaktivních forem kyslíku (ROS – z angl. *Reactive Oxygen Species*) a poškození DNA, které se může projevit i rozvojem senescence. Buňky, u kterých byla takto indukována senescence, mohou produkovat výše zmíněné cytokiny a způsobovat tak senescenci okolních buněk parakrinní cestou. Tento fenomén se nazývá „bystander senescence“ (Hodny *et al.*, 2010) a byl již několikrát zdokumentován (Di X *et al.*, 2008; Hubackova *et al.*, 2012; a řada dalších prací).

Jedním ze známých molekulárních mechanismů rozvoje sekundární senescence je sekrece IL-1 β a TGF- β primární senescentní buňkou. To následně způsobuje produkci ROS NADPH oxidázou Nox4 v sousedních buňkách, což vyvolá poškození DNA s aktivací permanentní DDR (Kodama *et al.*, 2013). Z normální okolní buňky se tak stává sekundární senescentní buňka. Obdobným mechanismem je vyvolána senescence i u rakovinných beta-buněk pankreatu prostřednictvím cytokinů IFN- γ a TNF- α produkovaných imunitními buňkami - pomocnými T1 lymfocyty (Braumüller *et al.*, 2013).

5. Vliv reaktivních forem kyslíku na rozvoj buněčné senescence

5.1. Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou vysoce reaktivní chemické molekuly obsahující kyslík, prvek nezbytný k přežití aerobních organismů. Zároveň však kyslík představuje i život ohrožující faktor kvůli svým toxickým vlastnostem, které představují jeho redukované formy (Gerschman *et al.*, 1954), zejména pak superoxid O_2^- (superoxidová teorie; McCord *et al.*, 1971). Superoxid můžeme označit za tzv. primární ROS, prekursor dalších, sekundárních, jakými jsou např. peroxid vodíku vznikající dismutací superoxidu, která je výrazně katalyzována enzymem superoxidodismutázou (SOD; McCord & Fridovich, 1969; Bannister *et al.*, 1987). Vzniklý H_2O_2 je odbouráván katalázou či peroxidázami, ze kterých je nejdůležitější glutathionperoxidáza (GSH; Michiels *et al.*, 1994). V přítomnosti kovu nižšího mocenství (Fe^{2+} ; Cu^{2+}) je však možné z peroxidu vodíku např. tzv. Fentonovou reakcí (viz rovnice 1; Fenton, 1894) vytvořit hydroxylový radikál, vůbec nejnebezpečnější radikál pro biologické systémy s *in vivo* poločasem rozpadu kolem 10^{-9} sekundy (Pastor *et al.*, 2000). Nebezpečnost ROS spočívá v reakcích s elektrony jiných molekul, čímž dochází ke vzniku dalších radikálů a spouští se tak řetězová reakce. Všechny třídy biologických molekul jsou citlivé k oxidačnímu poškození způsobeným volnými radikály. Nejzávažnější jsou následky reakcí s DNA (bodové mutace), membránovými lipidy (poškození biologických membrán) a oxidace proteinů.



Mimo různých původců z prostředí jsou ROS také vedlejším produktem normálního buněčného metabolismu. Za fyziologických podmínek je patrně nejzásadnějším producentem ROS v buňce transportní řetězec elektronů (Turrens, 2003). ROS tak představují potenciální zdroj oxidačního poškození nejen mitochondrie, ale i celé buňky. Tato jejich schopnost stála za vznikem radikálové hypotézy stárnutí, kterou postuloval Denham Harman v padesátých letech minulého století. Hypotéza vnímá s časem rostoucí akumulaci poškození v důsledku působení volných radikálů jako zásadní pro proces stárnutí (Harman, 1956). Je podporována i faktem, že starší buňky produkují více ROS nežli mladší (Hagen *et al.*, 1997). Jelikož jsou mitochondrie jedním z největších generátorů ROS v buňce, z podstaty věci došlo k rozšíření radikálové teorie na mitochondriální teorii stárnutí, která říká, že oxidační poškození

mitochondrie se projevuje kumulativním efektem, kdy v důsledku poškození ze strany ROS dochází k jejich ještě větší produkci, což vede rozsáhlejšímu poškození celé buňky včetně defektu mitochondrií (Harman, 1972; Miquel *et al.*, 1980; Sohal & Dubey, 1994).

Podstatnou roli v produkci ROS nepředstavují pouze mitochondrie, ale také NADPH oxidázy. Předpokládá se, že oba majoritní zdroje ROS v buňkách, tj. ETC v mitochondriích a enzymatická aktivita NADPH oxidáz, přispívají k rozvoji buněčné senescence, stavu, ve kterém jsou obecně zvýšeny hladiny kyslíkových radikálů (Takahashi *et al.*, 2006).

Ačkoliv výše popsané vlastnosti ROS evokují spíše negativní dopady jejich působení, nelze opomíjet i jejich podstatnou roli v buněčné signalizaci. ROS totiž reagují se specifickými atomy v proteinech, čímž dochází ke kovalentním modifikacím těchto proteinů. Tímto způsobem ROS ovlivňují mnoho redoxně-sensitivních signálních cest, jako je např. transdukce signálu z receptorů růstových faktorů (Rhee *et al.*, 2003; Finkel, 2003). ROS signalizace je patrně také důležitá v oblasti buněčné proliferace (Clément & Pervaiz, 1999), buněčné senescenci (Lundberg *et al.*, 2000), buněčné smrti (Burdon 1987; Burdon 1995) a v procesu stárnutí a asociovaným onemocněním, i když konkrétní role v této oblasti nebyla doposud objasněna.

5.2.ROS u konkrétních typů buněčné senescence

Obecnou charakteristikou senescentních buněk je zvýšení intracelulární hladiny ROS, což indukuje oxidační poškození DNA a proteinů (Passos *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 1995; Sitte *et al.*, 2000). Důvody a mechanismy tohoto fenoménu se však v závislosti na konkrétním druhu senescence liší.

Bylo prokázáno, že replikační potenciál buněk *in vitro* přímo souvisí s koncentrací kyslíku v prostředí, ve kterém jsou kultivovány. Poškození telomer považované za hlavní příčinu replikační senescence (Wright & Shay, 2001; Bodnar *et al.*, 1998), koreluje s mírou oxidačního poškození DNA (Richter & Von Zglinicki, 2007). Důkazem jsou experimenty, kdy docházelo k rozvoji senescence v důsledku vystavení lidských buněk působení peroxidu vodíku. Vysoké koncentraci exogenního H₂O₂ vedou k buněčné smrti, kdežto hladiny na subletální úrovni vedou k senescenci (Bladier *et al.*, 1997; Chen & Ames, 1994; Chen *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999). Po přidání antioxidantů či po zvýšení exprese intracelulárních radikálových detoxifikačních enzymů (např. SOD) docházelo k signifikantnímu snížení poškození DNA a také ke zpomalení či zamezení přechodu buněk do senescentního stádia (Chen *et al.*, 1995; Serra *et al.*, 2003), což spojitost ROS a senescence evidentně potvrzuje. Konkrétní případy vyvolání replikační senescence v důsledku zvýšení hladiny ROS byly

dokumentovány u myších zárodečných fibroblastů. MEF v prostředí o 20% O₂ vykazovaly až třikrát více celkově poškozené DNA, z toho dvakrát více chromosomálních zlomů, než tomu bylo v 3% O₂. I přes fakt, že MEF konstitutivně exprimují telomerázu (mají dlouhé telomery, ale i přes to podstupují méně populačních zdvojení než jejich lidské analogy; Wright & Shay, 2000), přecházely tyto buňky do senescence (Parrinello *et al.*, 2003). Zde je jasně patrné, že délka telomer není zásadním faktorem pro rozvoj senescence. Krucální je poškození DNA včetně telomerických oblastí.

Kauzalitu mezi onkogenní senescencí a zvýšenou hladinou ROS je spojována zejména se zvýšením exprese konstitutivně aktivní mutanty onkogenu H-Ras^{V12} vedoucí k Ras-indukované senescenci (Serrano *et al.*, 1997; Sundaresen *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999). Obdobně jako výše lze nástup senescence potlačit snížením koncentrace kyslíku nebo podáním antioxidantů. V 1% prostředí O₂ je totiž Ras neschopen signalizovat zvýšení hladiny p21 a aktivovat tak přechod do senescence. Při normoxii (20% O₂) v přítomnosti lapačů, lze rozvoj senescence zvrátit vychytáváním H₂O₂ (např. N-acetyl cysteinem). Konvertor superoxidu (např. SOD) je však v takovém prostředí neúčinný a senescenci nezabrání (Lee *et al.*, 1999). Recentní studie naznačují, že Ras-indukované generování ROS je alespoň částečně zajištěno působením NADPH oxidáz (viz níže), nicméně přesný mechanismus dosud nebyl objasněn (Kodama, R. *et al.*, 2013).

5.3.NADPH oxidázy

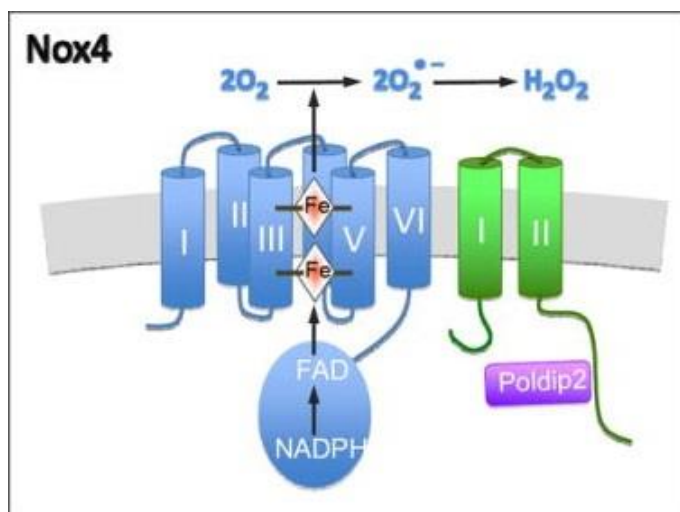
NADPH oxidázy (Nox) jsou transmembránové enzymy katalyzující reakci, při níž NADPH₂ reaguje s kyslíkem za vzniku NADP⁺ a superoxidového radikálu. Tyto proteiny tvoří celou enzymatickou rodinu NOX/DUOX, která obsahuje pět, respektive sedm genů pro NADPH oxidázy, a sice *Nox1 – Nox5*, respektive *Duox1* a *Duox2* (Bedard & Krause, 2007). Jejich katalytické domény jsou homologní s NADPH oxidázou fagocytů (*Nox2* - historicky první objevená NADPH oxidáza; Lambeth *et al.*, 2007) a nalezneme je prakticky ve všech buňkách (Lassegue *et al.*, 2003), kde hrají důležitou roli v signalizaci zánětu, imunitní odpovědi či apoptóze (Lambeth *et al.*, 2007). V případě jejich deregulace, zejména tedy zvýšení produkce ROS, dochází k mnoha zdravotním problémům a onemocněním souvisejícím i se stárnutím jako je např. hypertenze, arterioskleróza a degenerativní nemoci mozku (Alzheimerova či Parkinsonova nemoc; Altenhöfer *et al.*, 2012). Navíc deregulované *Nox1* a *Nox2* mohou způsobovat genomovou nestabilitu, kdy se jejich zvýšená exprese, respektive aktivace, projeví na zvýšení oxidačního poškození DNA a množství mutací (Chiera *et al.*, 2008). Na základě aktivity *Nox1* a *Nox4* dochází mj. k rozvoji buněčné senescence,

např. k jejímu navození polyfenolem u vaskulárních endoteliálních buněk (Schilder *et al.*, 2009). ROS generované těmito enzymy tudíž hrají určitou roli při indukci senescence.

Na aktivitě Nox1 a Nox4 pravděpodobně závisí i senescence indukovaná onkogenním Ras (Kodama *et al.*, 2013). Uměle zvýšená exprese H-Ras^{V12} v lidských thyrocytech výrazně zvýšila i expresi mRNA Nox4, což vedlo ke zvýšené produkci peroxidu vodíku (Weyemi *et al.*, 2012; Weyemi & Dupuy, 2012). Zdá se, že H-Ras přes signální dráhu MEK-ERK zvyšuje množství a aktivitu Nox1 a Nox4 (a také jejich kofaktor p22^{phox} – viz níže), což se projeví zvýšenou produkcí ROS, poškozením DNA nebo aktivací p38MAPK. Následovat pak může aktivování obou drah DDR a senescence (Kodama *et al.*, 2013). V případě inaktivace Nox1 a Nox4 v buňkách exprimujících H-Ras^{V12} dochází k signifikantně menší fosforylaci histonů H2AX, než je tomu v případě přítomnosti aktivních enzymů Nox. Tento fakt poukazuje na pravděpodobnou přímou spojitost mezi expresí H-Ras^{V12} a zvýšenou produkcí ROS právě prostřednictvím Nox1 a Nox4. Mechanismus regulace ale zatím znám není (Kodama *et al.*, 2013).

Dle posledních studií je z hlediska senescence lidských buněk velmi významná Nox4. Obdobně jako jiné enzymy Nox je i Nox4 heteroproteinový komplex (viz obrázek č. 3). Skládá se ze šesti transmembránových domén (mezi dvěma z nich jsou ukotveny dva hemy) a cytosolické C-terminální dehydrogenázové domény, ve které je vazebné místo pro FAD a NADPH₂ (Nisimoto *et al.*, 2010). Aktivace nastává ve chvíli přenesení elektronu z NADPH₂ na FAD. Elektron je pak přenášen skrz membránu přes hemová železa až na molekulární kyslík, který se redukuje na superoxidový anion. Oproti ostatním oxidázám vyžaduje Nox4 pouze navázání regulačního proteinu p22^{phox}, nikoliv dalších cytosolických regulačních podjednotek jako je tomu u Nox1 – Nox3 (Krause, 2004). Dále se Nox4 liší vyšším poměrem produkce peroxidu vodíku k superoxidu (Martyn *et al.*, 2006). Mechanismus této skutečnosti není dosud objasněn, nicméně může jít o přímou produkci H₂O₂ prostřednictvím Nox4 nebo katalýzu superoxidodismutázou. Fyziologicky Nox4 souvisí s kontrolou buněčného přežívání, proliferace nejrůznějších rakovinných buněčných typů (Nisimoto *et al.*, 2010) i diferenciací (Li *et al.*, 2006). Pravděpodobně též reguluje bazální hladinu produkce ROS (Clempus *et al.*, 2007) a při patofyziologických podmínkách zřejmě přispívá právě ke vzniku senescence nebo zahájení programované buněčné smrti (Lassegue *et al.*, 2012). Umlčení genu pro Nox4 prostřednictvím shRNA totiž snižuje oxidační poškození DNA a oddaluje nástup senescence jak v lidských endoteliálních buňkách (Lener *et al.*, 2009), tak v thyrocytech exprimujících H-Ras^{V12} (Weyemi *et al.*, 2012). Nox4 disponuje mitochondriálním lokalizačním signálem

(Ago *et al.*, 2010) a nalezneme ji tudíž i v mitochondriích, kde o její aktivitě svědčí vyšší produkce ROS.



Obrázek č. 3 Nox4 tvoří komplex s p22^{phox} (zelený), na jehož C-terminální doménu se může vázat Poldip2 a zvyšovat tak aktivitu enzymu.

Převzato z „Laussage *et al.*, 2012“

Nedávná studie Koziela *et al.* zabývající se důsledky působení Nox4 poukazuje na zvýšenou produkci peroxidu vodíku v mitochondriích a následný rozvoj senescence. Toto zvýšené množství H₂O₂ se společně s vyšší aktivitou Nox4 zdá být klíčovým regulátorem inhibice komplexu I ETC. U lidských endoteliálních buněk je tato inhibice doprovázena potlačením exprese podjednotek tohoto komplexu. Aktivita proteinu Nox4 navíc koreluje se snížením bazální a maximální respirační kapacity. Přítomnost Nox4 v mitochondriích a produkce peroxidu vodíku pravděpodobně představuje zásadní faktor souvislosti rozvoje buněčné senescence a mitochondriální dysfunkce u endoteliálních buněk (Koziel *et al.*, 2013). Buňky s knock-down genu pro Nox4 signifikantně zpomalují rozvoj senescentního fenotypu a zvyšují proliferační kapacitu buňky (Lener *et al.*, 2009). Při absenci Nox4 pak dochází k rozpojování mitochondriálních sítí, ke změnám morfologie mitochondrií, snížené detekci mitochondriálního peroxidu vodíku a stabilizaci mitochondriálního membránového potenciálu (Koziel *et al.*, 2013). Souvislost senescence s parciální dysfunkcí ETC v důsledku zvýšené hladiny ROS z Nox4 je zcela jistě významným objevem vyžadující intenzivnější výzkum.

Je známo, že ROS produkované v buňkách při zánětech vedou ke stárnutí tkání a k rozvoji se stářím asociovaných poškození. Za produkci ROS jsou z velké části zodpovědné právě NADPH oxidázy. Dlouhotrvající aktivita Nox4 v buňkách vede k akumulaci DNA poškození, tudíž k rozvoji senescence (Kodama *et al.*, 2013).

6. Spojení STAT3 a ETC

6.1. STAT3

STAT3 patří do rodiny transkripčních faktorů STAT (z angl. *Signal Transducer and Activation of Transcription*). Původně byl identifikovaný jako IL-6-indukovaný aktivátor genů akutní fáze (Wegenka *et al.*, 1993). Později došlo k objevení jeho dalších funkcí, mezi které se řadí role při buněčné proliferaci, diferenciaci, protizánětlivé odpovědi (Levy & Lee, 2002; Matsukawa *et al.*, 2003), při opravě DNA (Barry *et al.*, 2010) a při rozvoji nádorových onemocnění (Bromberg *et al.*, 1999). Zásadní je též působení STAT3 v mitochondriích, kde nefiguruje coby transkripční faktor, ale má jinou funkci (viz níže; Wegrzyn *et al.*, 2009). Bylo zjištěno také to, že STAT3 je nepostradatelný pro přežití savčích embryí (Takeda *et al.*, 1997).

STAT3 je aktivován celou řadou růstových faktorů a cytokinů (např. EGF; Zhong *et al.*, 1994; INF α/β , IL-10, IL-12 a další; Levy & Lee *et al.*, 2002). Jelikož cytokinový receptor nemá vlastní enzymatickou aktivitu, po navázání ligandu s ním asociují kinázy JAK. Dochází k jejich transfosforylaci, čímž se vytvoří místo pro navázání STAT3, jehož SH2 doména je následně kinázou JAK fosforylována na tyrozinu 705 (Y705; zásadní pro jeho transkripční aktivitu). STAT3 dimerizuje na základě reciproké interakce jeho SH2 domény a fosfotyrozinu. Takto aktivovaný STAT3 se transportuje do jádra a po vazbě na specifické vazebné elementy DNA indukuje expresi velkého počtu cílových genů (Schindler *et al.*, 2007).

6.2. STAT3 a jeho vliv na komplexy ETC

STAT3 neplní pouze funkci transkripčního faktoru. Jak bylo již několikrát prokázáno, je stabilně přítomen v mitochondriích (Gough *et al.*, 2009; Wegrzyn *et al.*, 2009; Boengler *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2010), kde je jeho DNA vazebná doména pravděpodobně redundantní, jelikož není fosforylován na Y705 (Szczepanek *et al.*, 2011). STAT3 je v mitochondriích nutný ke správnému fungování komplexů I a II ETC. V případě jeho úplné absence dochází k hluboké inhibici obou zmiňovaných komplexů (Wegrzyn *et al.*, 2009) společně se snížením produkce ATP, snížením mitochondriálního membránového potenciálu (klíčový indikátor integrity mitochondriální membrány; Chen, 1988) a zvýšením produkce ROS (Sarafian *et al.*, 2010). Naopak zvýšená exprese STAT3 vede k částečné blokádě obou komplexů, nicméně bez zvýšení hladiny ROS (Szczepanek *et al.*, 2011). Množství STAT3

v mitochondriích musí očividně oscilovat kolem určité hodnoty, protože nedostatek i přebytek má za následek problematické stavy.

Mitochondriální STAT3 tak ovlivňuje ETC netranskripčním mechanismem (Wegrzyn *et al.*, 2009). Podle některých studií STAT3 cíleně vyhledává proteinové kinázy (Boengler *et al.*, 2010), což by mohl být důvod, proč se váže na komplexy I a II. Komplexy ETC jsou totiž možná schopny autofosforylace některých svých podjednotek (Phillips *et al.*, 2010). Přesný mechanismus interakce STAT3 s komplexy ETC však zatím není popsán.

6.3. Role STAT3 při buněčné senescenci

STAT3 se zdá mít v souvislosti s Hif-1 α zásadní roli v buněčném metabolismu (Demaria *et al.*, 2010), zejména pak při tzv. Warburgově efektu, situaci kdy dochází k vyššímu zapojení glykolýzy a snížení oxidační fosforylace dokonce i při vysokých koncentracích kyslíku (Warburg, 1956). Toho je dosaženo: i) vyvoláním transkripce Hif-1 α , což má za následek zvýšenou expresi genů souvisejících s glykolýzou; ii) nebo snížením respirační aktivity mitochondrií, čehož je dosaženo inhibicí exprese proteinů ETC v jádře díky STAT3 (Demaria *et al.*, 2010). Jelikož je však STAT3 přímo součástí oxidační fosforylace (Gough *et al.*, 2009), není vyloučena i inhibice mitochondriální respirační aktivity v souvislosti s metabolickým přechodem na aerobní glykolýzu i netranskripční cestou (viz výše). Nicméně je prokázáno, že mnoho nádorů vyžaduje transkripční aktivitu STAT3 pro zdárný průběh transformace, vlastní přežívání a růst (Chiarle *et al.*, 2005). STAT3 je proto zajímavý cíl pro budoucí léčbu rakoviny.

Inhibice oxidační fosforylace vede k prokazatelnému snížení hladiny ROS a v případě konstitutivně aktivní mutanty *Stat3^{CC}* u MEF dochází k rezistenci buněk vůči apoptóze a také buněčné senescenci (Demaria *et al.*, 2010). Na druhou stranu v případě sekundární senescence byly zjištěny zvýšené hladiny aktivovaných forem STAT1, STAT3 a STAT5 u všech primárních senescentních buněk, přičemž u sekundárních senescentních buněk byly naměřeny vyšší koncentrace pouze STAT3 (Novakova *et al.*, 2010; Hubackova *et al.*, 2010).

Transkripčně aktivovaný STAT3 je schopen zvýšit proliferační potenciál buňky a dokonce navodit rezistenci k buněčné senescenci (Demaria *et al.*, 2010). I jeho transkripčně neaktivovaná forma přítomná v mitochondriích je zodpovědná za produkci ROS např. při ischemiích (Szczepanek *et al.*, 2011) a také za inhibici komplexů ETC (Gough *et al.*, 2009; Wegrzyn *et al.*, 2009). Z těchto poznatků lze usoudit, že STAT3 bude buněčné senescenci spíše bránit, i když poslední údaje poukazují na jeho podstatnou roli v SASP a sekundární senescenci (Hubackova *et al.*, 2012). Další výzkum v tomto ohledu je více než žádoucí.

7. Úloha TGF-beta v senescenci

7.1 TGF- β

TGF- β (z angl. *Transforming Growth Factor Beta*) tvoří celou cytokinovou rodinu, do které řadíme přes 30 proteinů včetně všech isoform TGF- β , aktivinů/inhibinů, BMPs (z angl. *Bone Morphogenetic Proteins*) apod. Tyto proteiny zastávají fundamentální roli v biologických procesech, jakými jsou buněčný růst a vývoj, homeostáze, proliferace, apoptóza či regulace imunitního systému (Massague, 1998; Massague, 2000). Signální dráhy TGF- β jsou evolučně konzervované a nalezneme je jak u obratlovců, tak u bezobratlých. Zároveň jsou tyto dráhy spjaty s mnohými vývojovými defekty a patologickými stavy, např. rakovinou či degenerativními a autoimunitními onemocněními. Navíc je TGF- β dlouhodobě spojován také s rozvojem buněčné senescence (např. u lidských fibroblastů; Kordon *et al.*, 1995).

7.2 Indukce senescence TGF- β

Je známo, že stresové cytokiny, mezi které se TGF- β také řadí, aktivují DDR a mohou vést k ROS-dependentní indukci DSBs, což se může projevit až buněčnou senescencí (Burdak-Rothkamm *et al.*, 2008). Té lze také dosáhnout dlouhodobým vystavením buněk různým působkům, TGF- β nevyjímaje. Spouští se produkce ROS, dochází k poškození DNA a následně i k zastavení buněčného cyklu. TGF- β má pak zásadní roli v případě sekundární senescence, kde je zodpovědný za kauzální spojení produkce ROS a zvýšení množství histonů γ H2AX v sekundárních senescentních buňkách. Parentální senescentní buňky totiž sekretují velké množství isoformy TGF- β 1, která velmi pravděpodobně nepřímo spouští v sekundárních buňkách DDR. Navíc inhibice TGF- β 1 vedla ke snížení množství γ H2AX i ROS (Hubackova *et al.*, 2012). Mechanismus navození sekundární senescence touto cestou není zcela znám, nicméně zásadní roli při něm hrají NADPH oxidázy, konkrétně Nox4. Sekretovaný TGF- β 1 je schopen v okolních buňkách indukovat expresi Nox4 (Thannickal & Fanburg, 1995; Hu *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2010). Generování ROS díky Nox4 vede k perzistentní DDR. Důkazem spojitosti může být situace, kdy dojde k inhibici receptoru pro TGF- β a v návaznosti na to se hladiny mRNA Nox4 sníží (Hubackova *et al.*, 2012).

TGF- β má v indukci buněčné senescence i další úlohu. Při inaktivaci signálních drah p53 a p16^{INK4a} např. v souvislosti s rozvojem rakoviny je možné dosáhnout buněčné senescence po působení TGF- β , což zapříčiňuje aktivaci dráhy p21^{Cip1} a p15^{INK4b} a tudíž

zastavení buněčného cyklu. Zásadní je zde opět role Nox4 a ROS, které se zdají být nutné pro dosažení senescentního fenotypu (Senturk *et al.*, 2010).

TGF- β má také vliv na mitochondriální metabolismus i na integritu mitochondriálních sítí (Wang *et al.*, 2012). Jejich fúzování je spojeno s TGF- β -indukovanou senescencí u plicních epitelálních buněk norků (Yoon *et al.*, 2005). Zvýšená aktivita TGF- β je navíc spjata s dysfunkcí mitochondrií, zvýšení mitochondriální hladiny ROS a případnou apoptózou či senescencí. Je pravděpodobné, že dochází k inhibici mitochondriální respirace a syntézy ATP. Při působení TGF- β 1 byl totiž zjištěn pokles mitochondriálního membránového potenciálu, zvýšení produkce ROS, ale zejména inhibice komplexu IV ETC (Yoon *et al.*, 2005). Zvýšená produkce ROS tak může být způsobena taktéž parciální inhibicí ETC. Ve své studii Yoon *et al.* ještě uvádí, že TGF- β 1 v závislosti na množství primárně nezpůsobuje programovanou buněčnou smrt, ale senescenci (Yoon *et al.*, 2005). Je známo, že vystavení buňky nižším dávkám TGF- β může způsobit zástavu buněčného cyklu, zatímco vyšší dávky indukují apoptózu (Herrera *et al.*, 2001).

8. Závěr

Ačkoliv bylo v poznání mechanismů buněčné senescence od jejího objevení až do dnešních dnů dosaženo obrovského pokroku, stále zbývá detailně popsat a porozumět řadě procesů, které tento fenomén provází. Rozsáhlé změny buněčné morfologie, exprese i metabolismu související s rozvojem senescence se týkají i bioenergetické stránky, tedy oxidační fosforylace.

Mitochondrie představují důležitý spoj mezi fyziologickými dysfunkcemi spojenými se stárnutím a oxidačním poškozením (Kowald, 2001; Jacobs, 2003). S rostoucím věkem dochází ke zvýšené produkci ROS a snižuje se aktivita komplexů I, III a IV ETC. Komplex II zůstává stářím prakticky neovlivněn (van Remmen & Richardson, 2001). Při rozvoji senescence podobně jako při stárnutí se projevují problémy oxidačního spřažení mitochondrií (Greco *et al.*, 2003; Hutter *et al.*, 2004). Jsou patrné defekty oxidační fosforylace, kdy ani velká hladina intracelulárního AMP v senescentních buňkách nevede k plnému využití potenciálu syntézy ATP (Hutter *et al.*, 2004). Tyto problémy mohou být zapříčiněny oxidačním poškozením mitochondrií v důsledku zvýšené produkce ROS (Stadlmann *et al.*, 2002).

Právě působení ROS se zdá být klíčové v souvislosti s rozvojem buněčné senescence obecně. Ať už dochází k indukci senescence stresovými cytokiny (TGF- β), aktivním onkogenem (H-Ras^{V12}) nebo přímo hyperoxií či vysokou koncentrací H₂O₂, vždy to nakonec vede ke zvýšení intracelulární hladiny ROS, poškození DNA a perzistentní DDR. Defekt respiračního řetězce se pak může projevit inhibicí komplexu I v důsledku aktivity Nox4 (Koziel *et al.*, 2013) či dysfunkcí komplexu IV na základě vystavení působení TGF- β (Yoon *et al.*, 2005), který mimoto aktivuje i Nox4. Tyto problémy týkající se oxidační fosforylace mohou vést k dalšímu generování ROS právě díky poškozeným komplexům ETC. Samotná inhibice mitochondriálních komplexů je spojena také se sníženou expresí jejich podjednotek. Obdobně je tomu v případě inhibice ze strany STAT3, který omezí expresi podjednotek komplexů ETC přímo v jádře. Navíc může aktivitu komplexů narušovat i přímo v důsledku své přítomnosti v mitochondriích.

Bioenergetika senescentních buněk je zcela jistě velmi důležitou oblastí při studiu buněčné senescence. Pokračující důkladný výzkum na tomto poli může přinést zásadní mezníky v chápání fenoménu buněčné senescence a napomoci tak v léčbě rakoviny či předcházení stárnutí, dvěma procesům, se kterými je senescence spojována.

Seznam použité literatury

- AGO, T., KURODA, J., PAIN, J., FU, C., LI, H. & SADOSHIMA, J. 2010. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res*, 106, 1253-64.
- ALTENHOFER, S., KLEIKERS, P. W., RADERMACHER, K. A., SCHEURER, P., ROBERMANS, J. J., SCHIFFERS, P., HO, H., WINGLER, K. & SCHMIDT, H. H. 2012. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci*, 69, 2327-43.
- ATADJA, P., WONG, H., GARKAVTSEV, I., VEILLETTE, C. & RIABOWOL, K. 1995. Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8348-52.
- BABBAR, N. & CASERO, R. A., JR. 2006. Tumor necrosis factor-alpha increases reactive oxygen species by inducing spermine oxidase in human lung epithelial cells: a potential mechanism for inflammation-induced carcinogenesis. *Cancer Res*, 66, 11125-30.
- BAKKENIST, C. J. & KASTAN, M. B. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421, 499-506.
- BANNISTER, J. V., BANNISTER, W. H. & ROTILIO, G. 1987. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem*, 22, 111-80.
- BARRY, S. P., TOWNSEND, P. A., KNIGHT, R. A., SCARABELLI, T. M., LATCHMAN, D. S. & STEPHANOU, A. 2010. STAT3 modulates the DNA damage response pathway. *Int J Exp Pathol*, 91, 506-14.
- BARTKOVA, J., HOREJSI, Z., KOED, K., KRAMER, A., TORT, F., ZIEGER, K., GULDBERG, P., SEHESTED, M., NESLAND, J. M., LUKAS, C., ORNTOFT, T., LUKAS, J. & BARTEK, J. 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 434, 864-70.
- BAYREUTHER, K., RODEMANN, H. P., FRAN CZ, P. I. & MAIER, K. 1988. Differentiation of fibroblast stem cells. *J Cell Sci Suppl*, 10, 115-30.
- BEAUSEJOUR, C. M., KRTOLICA, A., GALIMI, F., NARITA, M., LOWE, S. W., YASWEN, P. & CAMPISI, J. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo j*, 22, 4212-22.
- BEDARD, K. & KRAUSE, K. H. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87, 245-313.
- BEDARD, K., LARDY, B. & KRAUSE, K. H. 2007. NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. *Biochimie*, 89, 1107-12.
- BLACKBURN, E. H. & GALL, J. G. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol*, 120, 33-53.
- BLADIER, C., WOLVETANG, E. J., HUTCHINSON, P., DE HAAN, J. B. & KOLA, I. 1997. Response of a primary human fibroblast cell line to H₂O₂: senescence-like growth arrest or apoptosis? *Cell Growth Differ*, 8, 589-98.
- BLAZKOVA, H., KREJCIKOVA, K., MOUDRY, P., FRISAN, T., HODNY, Z. & BARTEK, J. 2010. Bacterial intoxication evokes cellular senescence with persistent DNA damage and cytokine signalling. *J Cell Mol Med*, 14, 357-67.
- BODNAR, A. G., OUELLETTE, M., FROLKIS, M., HOLT, S. E., CHIU, C. P., MORIN, G. B., HARLEY, C. B., SHAY, J. W., LICHTSTEINER, S. & WRIGHT, W. E. 1998.

- Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279, 349-52.
- BOENGLER, K., HILFIKER-KLEINER, D., HEUSCH, G. & SCHULZ, R. 2010. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol*, 105, 771-85.
- BRAUMULLER, H., WIEDER, T., BRENNER, E., ASSMANN, S., HAHN, M., ALKHALED, M., SCHILBACH, K., ESSMANN, F., KNEILLING, M., GRIESSINGER, C., RANTA, F., ULLRICH, S., MOCIKAT, R., BRAUNGART, K., MEHRA, T., FEHRENBACHER, B., BERDEL, J., NIESSNER, H., MEIER, F., VAN DEN BROEK, M., HARING, H. U., HANDGRETINGER, R., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., FEND, F., PESIC, M., BAUER, J., ZENDER, L., SCHALLER, M., SCHULZE-OSTHOFF, K. & ROCKEN, M. 2013. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, 494, 361-5.
- BROMBERG, J. F. & DARNELL, J. E., JR. 1999. Potential roles of Stat1 and Stat3 in cellular transformation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 64, 425-8.
- BROMBERG, J. F., WRZESZCZYNSKA, M. H., DEVGAN, G., ZHAO, Y., PESTELL, R. G., ALBANESE, C. & DARNELL, J. E., JR. 1999. Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98, 295-303.
- BROWN, J. P., WEI, W. & SEDIVY, J. M. 1997. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*, 277, 831-4.
- BURDAK-ROTHKAMM, S., ROTHKAMM, K. & PRISE, K. M. 2008. ATM acts downstream of ATR in the DNA damage response signaling of bystander cells. *Cancer Res*, 68, 7059-65.
- BURDON, R. H. 1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med*, 18, 775-94.
- BURDON, R. H., GILL, V. M. & RICE-EVANS, C. 1987. Oxidative stress and heat shock protein induction in human cells. *Free Radic Res Commun*, 3, 129-39.
- CAMPISI, J. 2003. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp Gerontol*, 38, 5-11.
- CAMPISI, J. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, 120, 513-22.
- CAMPISI, J. & D'ADDA DI FAGAGNA, F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 729-40.
- CARNEIRO, T., KHAIR, L., REIS, C. C., BORGES, V., MOSER, B. A., NAKAMURA, T. M. & FERREIRA, M. G. 2010. Telomeres avoid end detection by severing the checkpoint signal transduction pathway. *Nature*, 467, 228-32.
- CLEMENT, M. V. & PERVAIZ, S. 1999. Reactive oxygen intermediates regulate cellular response to apoptotic stimuli: an hypothesis. *Free Radic Res*, 30, 247-52.
- CLEMPUS, R. E., SORESCU, D., DIKALOVA, A. E., POUNKOVA, L., JO, P., SORESCU, G. P., SCHMIDT, H. H., LASSEGUE, B. & GRIENGLING, K. K. 2007. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 42-8.
- COLLINS, K. & MITCHELL, J. R. 2002. Telomerase in the human organism. *Oncogene*, 21, 564-79.
- COPPE, J. P., KAUSER, K., CAMPISI, J. & BEAUSEJOUR, C. M. 2006. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem*, 281, 29568-74.
- COPPE, J. P., PATIL, C. K., RODIER, F., SUN, Y., MUNOZ, D. P., GOLDSTEIN, J., NELSON, P. S., DESPREZ, P. Y. & CAMPISI, J. 2008. Senescence-associated

- secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, 6, 2853-68.
- CORTEZ, D., GUNTUKU, S., QIN, J. & ELLEDGE, S. J. 2001. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*, 294, 1713-6.
- D'ADDA DI FAGAGNA, F., REAPER, P. M., CLAY-FARRACE, L., FIEGLER, H., CARR, P., VON ZGLINICKI, T., SARETZKI, G., CARTER, N. P. & JACKSON, S. P. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426, 194-8.
- DAVALOS, A. R., COPPE, J. P., CAMPISI, J. & DESPREZ, P. Y. 2010. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*, 29, 273-83.
- DEMARIA, M., GIORGI, C., LEBIEDZINSKA, M., ESPOSITO, G., D'ANGELI, L., BARTOLI, A., GOUGH, D. J., TURKSON, J., LEVY, D. E., WATSON, C. J., WIECKOWSKI, M. R., PROVERO, P., PINTON, P. & POLI, V. 2010. A STAT3-mediated metabolic switch is involved in tumour transformation and STAT3 addiction. *Aging (Albany NY)*, 2, 823-42.
- DI, X., BRIGHT, A. T., BELLOTT, R., GASKINS, E., ROBERT, J., HOLT, S., GEWIRTZ, D. & ELMORE, L. 2008. A chemotherapy-associated senescence bystander effect in breast cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 7, 864-72.
- DIMRI, G. P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., MEDRANO, E. E., LINSKENS, M., RUBELJ, I., PEREIRA-SMITH, O. & ET AL. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9363-7.
- FINKEL, T. 2003. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 247-54.
- FORSYTH, N. R., EVANS, A. P., SHAY, J. W. & WRIGHT, W. E. 2003. Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase. *Aging Cell*, 2, 235-43.
- FUMAGALLI, M., ROSSIELLO, F., CLERICI, M., BAROZZI, S., CITTARO, D., KAPLUNOV, J. M., BUCCI, G., DOBREVA, M., MATTI, V., BEAUSEJOUR, C. M., HERBIG, U., LONGHESE, M. P. & D'ADDA DI FAGAGNA, F. 2012. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol*, 14, 355-65.
- GERSCHMAN, R., GILBERT, D., NYE, S. W., DWYER, P. & FENN, W. O. 2001. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. 1954. *Nutrition*, 17, 162.
- GOUGH, D. J., CORLETT, A., SCHLESSINGER, K., WEGRZYN, J., LARNER, A. C. & LEVY, D. E. 2009. Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science*, 324, 1713-6.
- GRECO, M., VILLANI, G., MAZZUCHELLI, F., BRESOLIN, N., PAPA, S. & ATTARDI, G. 2003. Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts. *Faseb j*, 17, 1706-8.
- GREIDER, C. W. & BLACKBURN, E. H. 1987. The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*, 51, 887-98.
- GREIDER, C. W. & BLACKBURN, E. H. 1989. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 337, 331-7.
- GRENON, M., GILBERT, C. & LOWNDES, N. F. 2001. Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat Cell Biol*, 3, 844-7.
- HAGEN, T. M., YOWE, D. L., BARTHOLOMEW, J. C., WEHR, C. M., DO, K. L., PARK, J. Y. & AMES, B. N. 1997. Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats:

- membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3064-9.
- HARA, E., SMITH, R., PARRY, D., TAHARA, H., STONE, S. & PETERS, G. 1996. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol*, 16, 859-67.
- HARMAN, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11, 298-300.
- HARMAN, D. 1972. Free radical theory of aging: dietary implications. *Am J Clin Nutr*, 25, 839-43.
- HAYFLICK, L. 1965. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res*, 37, 614-36.
- HAYFLICK, L. & MOORHEAD, P. S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25, 585-621.
- HERRERA, B., FERNANDEZ, M., RONCERO, C., VENTURA, J. J., PORRAS, A., VALLADARES, A., BENITO, M. & FABREGAT, I. 2001. Activation of p38MAPK by TGF-beta in fetal rat hepatocytes requires radical oxygen production, but is dispensable for cell death. *FEBS Lett*, 499, 225-9.
- HIEBERT, S. W., CHELLAPPAN, S. P., HOROWITZ, J. M. & NEVINS, J. R. 1992. The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev*, 6, 177-85.
- HODNY, Z., HUBACKOVA, S. & BARTEK, J. 2010. Cytokines shape chemotherapy-induced and 'bystander' senescence. *Aging (Albany NY)*, 2, 375-6.
- HU, T., RAMACHANDRARAO, S. P., SIVA, S., VALANCIUS, C., ZHU, Y., MAHADEV, K., TOH, I., GOLDSTEIN, B. J., WOOLKALIS, M. & SHARMA, K. 2005. Reactive oxygen species production via NADPH oxidase mediates TGF-beta-induced cytoskeletal alterations in endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289, F816-25.
- HUBACKOVA, S., KREJCIKOVA, K., BARTEK, J. & HODNY, Z. 2012. IL1- and TGFbeta-Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'bystander senescence'. *Aging (Albany NY)*, 4, 932-51.
- HUBACKOVA, S., NOVAKOVA, Z., KREJCIKOVA, K., KOSAR, M., DOBROVOLNA, J., DUSKOVA, P., HANZLIKOVA, H., VANCUROVA, M., BARATH, P., BARTEK, J. & HODNY, Z. 2010. Regulation of the PML tumor suppressor in drug-induced senescence of human normal and cancer cells by JAK/STAT-mediated signaling. *Cell Cycle*, 9, 3085-99.
- HUTTER, E., RENNER, K., PFISTER, G., STOCKL, P., JANSEN-DURR, P. & GNAIGER, E. 2004. Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem J*, 380, 919-28.
- CHANG, D. L., QIU, W., YING, H., ZHANG, Y., CHEN, C. Y. & XIAO, Z. X. 2007. ARF promotes accumulation of retinoblastoma protein through inhibition of MDM2. *Oncogene*, 26, 4627-34.
- CHEN, L. B. 1988. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu Rev Cell Biol*, 4, 155-81.
- CHEN, Q. & AMES, B. N. 1994. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 4130-4.
- CHEN, Q., FISCHER, A., REAGAN, J. D., YAN, L. J. & AMES, B. N. 1995a. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4337-41.

- CHEN, W. Z., XUE, Z. C. & LI, R. S. 1995b. [Clinical study of effect of zhengda zhenhua 851-R oral liquor on delayed aging process]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 15, 468-71.
- CHEN, Y. C., LIN-SHIAU, S. Y. & LIN, J. K. 1998. Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J Cell Physiol*, 177, 324-33.
- CHIARLE, R., SIMMONS, W. J., CAI, H., DHALL, G., ZAMO, A., RAZ, R., KARRAS, J. G., LEVY, D. E. & INGHIRAMI, G. 2005. Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat Med*, 11, 623-9.
- CHIERA, F., MECCIA, E., DEGAN, P., AQUILINA, G., PIETRAFORTE, D., MINETTI, M., LAMBETH, D. & BIGNAMI, M. 2008. Overexpression of human NOX1 complex induces genome instability in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, 44, 332-42.
- JACOBS, H. T. 2003. The mitochondrial theory of aging: dead or alive? *Aging Cell*, 2, 11-7.
- JUN, J. I. & LAU, L. F. 2010. Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *Aging (Albany NY)*, 2, 627-31.
- KIPLING, D. & COOKE, H. J. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature*, 347, 400-2.
- KODAMA, R., KATO, M., FURUTA, S., UENO, S., ZHANG, Y., MATSUNO, K., YABE-NISHIMURA, C., TANAKA, E. & KAMATA, T. 2013. ROS-generating oxidases Nox1 and Nox4 contribute to oncogenic Ras-induced premature senescence. *Genes Cells*, 18, 32-41.
- KORDON, E. C., MCKNIGHT, R. A., JHAPPAN, C., HENNIGHAUSEN, L., MERLINO, G. & SMITH, G. H. 1995. Ectopic TGF beta 1 expression in the secretory mammary epithelium induces early senescence of the epithelial stem cell population. *Dev Biol*, 168, 47-61.
- KOWALD, A. 2001. The mitochondrial theory of aging. *Biol Signals Recept*, 10, 162-75.
- KOZIEL, R., PIRCHER, H., KRATOCHWIL, M., LENER, B., HERMANN, M., DENCHER, N. A. & JANSEN-DURR, P. 2013. Mitochondrial respiratory chain complex I is inactivated by NADPH oxidase Nox4. *Biochem J*, 452, 231-9.
- KRAUSE, K. H. 2004. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis*, 57, S28-9.
- KRTOLICA, A., PARRINELLO, S., LOCKETT, S., DESPREZ, P. Y. & CAMPISI, J. 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 12072-7.
- KUBBUTAT, M. H., JONES, S. N. & VOUSDEN, K. H. 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387, 299-303.
- KUMAGAI, A. & DUNPHY, W. G. 2000. Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell*, 6, 839-49.
- KURZ, D. J., DECARY, S., HONG, Y. & ERUSALIMSKY, J. D. 2000. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, 113 (Pt 20), 3613-22.
- LAHAV, G., ROSENFELD, N., SIGAL, A., GEVA-ZATORSKY, N., LEVINE, A. J., ELOWITZ, M. B. & ALON, U. 2004. Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nat Genet*, 36, 147-50.
- LASSEGUE, B. & CLEMPUS, R. E. 2003. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285, R277-97.
- LASSEGUE, B., SAN MARTIN, A. & GRIENDLING, K. K. 2012. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res*, 110, 1364-90.

- LEE, A. C., FENSTER, B. E., ITO, H., TAKEDA, K., BAE, N. S., HIRAI, T., YU, Z. X., FERRANS, V. J., HOWARD, B. H. & FINKEL, T. 1999. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 274, 7936-40.
- LEE, B. Y., HAN, J. A., IM, J. S., MORRONE, A., JOHUNG, K., GOODWIN, E. C., KLEIJER, W. J., DIMAIO, D. & HWANG, E. S. 2006. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5, 187-95.
- LEE, C. K., RAZ, R., GIMENO, R., GERTNER, R., WISTINGHAUSEN, B., TAKESHITA, K., DEPINHO, R. A. & LEVY, D. E. 2002. STAT3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. *Immunity*, 17, 63-72.
- LEE, Y. J., KIM, C. S. & OH, D. K. 2004. Lactulose production by beta-galactosidase in permeabilized cells of *Kluyveromyces lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64, 787-93.
- LENER, B., KOZIEL, R., PIRCHER, H., HUTTER, E., GREUSSING, R., HERNDLER-BRANDSTETTER, D., HERMANN, M., UNTERLUGGAUER, H. & JANSEN-DURR, P. 2009. The NADPH oxidase Nox4 restricts the replicative lifespan of human endothelial cells. *Biochem J*, 423, 363-74.
- LEVY, D. E. & LEE, C. K. 2002. What does Stat3 do? *J Clin Invest*, 109, 1143-8.
- LI, J., STOUFFS, M., SERRANDER, L., BANFI, B., BETTIOL, E., CHARNAY, Y., STEGER, K., KRAUSE, K. H. & JACONI, M. E. 2006. The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Mol Biol Cell*, 17, 3978-88.
- LOO, D. T., FUQUAY, J. I., RAWSON, C. L. & BARNES, D. W. 1987. Extended culture of mouse embryo cells without senescence: inhibition by serum. *Science*, 236, 200-2.
- LUNDBERG, A. S., HAHN, W. C., GUPTA, P. & WEINBERG, R. A. 2000. Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 705-9.
- MARTYN, K. D., FREDERICK, L. M., VON LOEHNEISEN, K., DINAUER, M. C. & KNAUS, U. G. 2006. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal*, 18, 69-82.
- MASSAGUE, J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67, 753-91.
- MASSAGUE, J. 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 169-78.
- MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. 1969a. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244, 6049-55.
- MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. 1969b. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem*, 244, 6056-63.
- MCCORD, J. M., KEELE, B. B., JR. & FRIDOVICH, I. 1971. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68, 1024-7.
- MEDEMA, R. H. & MACUREK, L. 2012. Checkpoint control and cancer. *Oncogene*, 31, 2601-13.
- MELANDER, F., BEKKER-JENSEN, S., FALCK, J., BARTEK, J., MAILAND, N. & LUKAS, J. 2008. Phosphorylation of SDT repeats in the MDC1 N terminus triggers retention of NBS1 at the DNA damage-modified chromatin. *J Cell Biol*, 181, 213-26.
- MICHIELS, C., RAES, M., TOUSSAINT, O. & REMACLE, J. 1994. Importance of S-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 17, 235-48.
- MIQUEL, J., ECONOMOS, A. C., FLEMING, J. & JOHNSON, J. E., JR. 1980. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol*, 15, 575-91.

- MITCHELL, P. & MOYLE, J. 1965. Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. *Nature*, 208, 1205-6.
- MUNOZ-ESPIN, D. & SERRANO, M. 2014. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 482-96.
- NAVARRO, A. & BOVERIS, A. 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C670-86.
- NISIMOTO, Y., JACKSON, H. M., OGAWA, H., KAWAHARA, T. & LAMBETH, J. D. 2010. Constitutive NADPH-dependent electron transferase activity of the Nox4 dehydrogenase domain. *Biochemistry*, 49, 2433-42.
- NOUREDDINE, H., GARY-BOBO, G., ALIFANO, M., MARCOS, E., SAKER, M., VIENNEY, N., AMSELLEM, V., MAITRE, B., CHAOUAT, A., CHOUAID, C., DUBOIS-RANDE, J. L., DAMOTTE, D. & ADNOT, S. 2011. Pulmonary artery smooth muscle cell senescence is a pathogenic mechanism for pulmonary hypertension in chronic lung disease. *Circ Res*, 109, 543-53.
- NOVAKOVA, Z., HUBACKOVA, S., KOSAR, M., JANDEROVA-ROSSMEISLOVA, L., DOBROVOLNA, J., VASICOVA, P., VANCUROVA, M., HOREJSI, Z., HOZAK, P., BARTEK, J. & HODNY, Z. 2010. Cytokine expression and signaling in drug-induced cellular senescence. *Oncogene*, 29, 273-84.
- OLOVNIKOV, A. M. 1971. [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Akad Nauk SSSR*, 201, 1496-9.
- OLOVNIKOV, A. M. 1973. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol*, 41, 181-90.
- OLOVNIKOV, A. M. 1996. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol*, 31, 443-8.
- PARRINELLO, S., COPPE, J. P., KRTOLICA, A. & CAMPISI, J. 2005. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci*, 118, 485-96.
- PARRINELLO, S., SAMPER, E., KRTOLICA, A., GOLDSTEIN, J., MELOV, S. & CAMPISI, J. 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol*, 5, 741-7.
- PASSOS, J. F., SARETZKI, G. & VON ZGLINICKI, T. 2007. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res*, 35, 7505-13.
- PASTOR, N., WEINSTEIN, H., JAMISON, E. & BRENOWITZ, M. 2000. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol*, 304, 55-68.
- PHILLIPS, D., REILLEY, M. J., APONTE, A. M., WANG, G., BOJA, E., GUCEK, M. & BALABAN, R. S. 2010. Stoichiometry of STAT3 and mitochondrial proteins: Implications for the regulation of oxidative phosphorylation by protein-protein interactions. *J Biol Chem*, 285, 23532-6.
- PROWSE, K. R. & GREIDER, C. W. 1995. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4818-22.
- RAUSER, C. L., TIERNEY, J. J., GUNION, S. M., COVARRUBIAS, G. M., MUELLER, L. D. & ROSE, M. R. 2006. Evolution of late-life fecundity in *Drosophila melanogaster*. *J Evol Biol*, 19, 289-301.
- REIMANN, M., LEE, S., LODDENKEMPER, C., DORR, J. R., TABOR, V., AICHELE, P., STEIN, H., DORKEN, B., JENUWEIN, T. & SCHMITT, C. A. 2010. Tumor stroma-derived TGF-beta limits myc-driven lymphomagenesis via Suv39h1-dependent senescence. *Cancer Cell*, 17, 262-72.

- RHEE, S. G., CHANG, T. S., BAE, Y. S., LEE, S. R. & KANG, S. W. 2003. Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol*, 14, S211-5.
- RICHTER, T. & VON ZGLINICKI, T. 2007. A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp Gerontol*, 42, 1039-42.
- ROBLES, S. J. & ADAMI, G. R. 1998. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*, 16, 1113-23.
- RODIER, F., COPPE, J. P., PATIL, C. K., HOEIJMAKERS, W. A., MUNOZ, D. P., RAZA, S. R., FREUND, A., CAMPEAU, E., DAVALOS, A. R. & CAMPISI, J. 2009. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*, 11, 973-9.
- SARAFIAN, T. A., MONTES, C., IMURA, T., QI, J., COPPOLA, G., GESCHWIND, D. H. & SOFRONIEW, M. V. 2010. Disruption of astrocyte STAT3 signaling decreases mitochondrial function and increases oxidative stress in vitro. *PLoS One*, 5, e9532.
- SEDELNIKOVA, O. A., HORIKAWA, I., ZIMONJIC, D. B., POPESCU, N. C., BONNER, W. M. & BARRETT, J. C. 2004. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, 6, 168-70.
- SERRA, V., VON ZGLINICKI, T., LORENZ, M. & SARETZKI, G. 2003. Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J Biol Chem*, 278, 6824-30.
- SERRANO, M., LIN, A. W., MCCURRACH, M. E., BEACH, D. & LOWE, S. W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88, 593-602.
- SHAY, J. W. & WRIGHT, W. E. 2000. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 72-6.
- SHAY, J. W. & WRIGHT, W. E. 2001. Aging. When do telomeres matter? *Science*, 291, 839-40.
- SHELTON, D. N., CHANG, E., WHITTIER, P. S., CHOI, D. & FUNK, W. D. 1999. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol*, 9, 939-45.
- SHERR, C. J. & DEPINHO, R. A. 2000. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell*, 102, 407-10.
- SHIVSHANKAR, P., BRAMPTON, C., MIYASATO, S., KASPER, M., THANNICKAL, V. J. & LE SAUX, C. J. 2012. Caveolin-1 deficiency protects from pulmonary fibrosis by modulating epithelial cell senescence in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 47, 28-36.
- SCHILDER, Y. D., HEISS, E. H., SCHACHNER, D., ZIEGLER, J., REZNICEK, G., SORESCU, D. & DIRSCH, V. M. 2009. NADPH oxidases 1 and 4 mediate cellular senescence induced by resveratrol in human endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 46, 1598-606.
- SCHINDLER, C., LEVY, D. E. & DECKER, T. 2007. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem*, 282, 20059-63.
- SITTE, N., MERKER, K., VON ZGLINICKI, T., DAVIES, K. J. & GRUNE, T. 2000a. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II--aging of nondividing cells. *Faseb j*, 14, 2503-10.
- SITTE, N., MERKER, K., VON ZGLINICKI, T., GRUNE, T. & DAVIES, K. J. 2000b. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I--effects of proliferative senescence. *Faseb j*, 14, 2495-502.
- SOHAL, R. S. & DUBEY, A. 1994. Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. *Free Radic Biol Med*, 16, 621-6.
- SORIANI, A., ZINGONI, A., CERBONI, C., IANNITTO, M. L., RICCIARDI, M. R., DI GIALLEONARDO, V., CIPPITELLI, M., FIONDA, C., PETRUCCI, M. T.,

- GUARINI, A., FOA, R. & SANTONI, A. 2009. ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood*, 113, 3503-11.
- STADLMANN, S., RIEGER, G., AMBERGER, A., KUZNETSOV, A. V., MARGREITER, R. & GNAIGER, E. 2002. H₂O₂-mediated oxidative stress versus cold ischemia-reperfusion: mitochondrial respiratory defects in cultured human endothelial cells. *Transplantation*, 74, 1800-3.
- SUNDARESAN, M., YU, Z. X., FERRANS, V. J., SULCINER, D. J., GUTKIND, J. S., IRANI, K., GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J. & FINKEL, T. 1996. Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J*, 318 (Pt 2), 379-82.
- SZCZEPANEK, K., CHEN, Q., DERECKA, M., SALLOUM, F. N., ZHANG, Q., SZELAG, M., CICHY, J., KUKREJA, R. C., DULAK, J., LESNEFSKY, E. J. & LARNER, A. C. 2011. Mitochondrial-targeted Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protects against ischemia-induced changes in the electron transport chain and the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 286, 29610-20.
- SZCZEPANEK, K., CHEN, Q., LARNER, A. C. & LESNEFSKY, E. J. 2012. Cytoprotection by the modulation of mitochondrial electron transport chain: the emerging role of mitochondrial STAT3. *Mitochondrion*, 12, 180-9.
- TAKAHASHI, A., OHTANI, N., YAMAKOSHI, K., IIDA, S., TAHARA, H., NAKAYAMA, K., NAKAYAMA, K. I., IDE, T., SAYA, H. & HARA, E. 2006. Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol*, 8, 1291-7.
- TAKEDA, K., NOGUCHI, K., SHI, W., TANAKA, T., MATSUMOTO, M., YOSHIDA, N., KISHIMOTO, T. & AKIRA, S. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3801-4.
- THANNICKAL, V. J. & FANBURG, B. L. 1995. Activation of an H₂O₂-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem*, 270, 30334-8.
- TONG, X., HOU, X., JOURD'HEUIL, D., WEISBROD, R. M. & COHEN, R. A. 2010. Upregulation of Nox4 by TGF{beta}1 oxidizes SERCA and inhibits NO in arterial smooth muscle of the prediabetic Zucker rat. *Circ Res*, 107, 975-83.
- TOUSSAINT, O., DUMONT, P., DIERICK, J. F., PASCAL, T., FRIPPIAT, C., CHAINIAUX, F., MAGALHAES, J. P., ELIERS, F. & REMACLE, J. 2000. Stress-induced premature senescence as alternative toxicological method for testing the long-term effects of molecules under development in the industry. *Biogerontology*, 1, 179-83.
- TURRENS, J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552, 335-44.
- VAN REMMEN, H. & RICHARDSON, A. 2001. Oxidative damage to mitochondria and aging. *Exp Gerontol*, 36, 957-68.
- VAZIRI, H. 1997. Critical telomere shortening regulated by the ataxia-telangiectasia gene acts as a DNA damage signal leading to activation of p53 protein and limited life-span of human diploid fibroblasts. A review. *Biochemistry (Mosc)*, 62, 1306-10.
- VAZIRI, H., WEST, M. D., ALLSOPP, R. C., DAVISON, T. S., WU, Y. S., ARROWSMITH, C. H., POIRIER, G. G. & BENCHIMOL, S. 1997. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *Embo j*, 16, 6018-33.

- VON ZGLINICKI, T., SARETZKI, G., DOCKE, W. & LOTZE, C. 1995. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res*, 220, 186-93.
- WALKER, J. E., COLLINSON, I. R., VAN RAAIJ, M. J. & RUNSWICK, M. J. 1995. Structural analysis of ATP synthase from bovine heart mitochondria. *Methods Enzymol*, 260, 163-90.
- WANG, W., WANG, Y., LONG, J., WANG, J., HAUDEK, S. B., OVERBEEK, P., CHANG, B. H., SCHUMACKER, P. T. & DANESH, F. R. 2012. Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells. *Cell Metab*, 15, 186-200.
- WARBURG, O. 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124, 269-70.
- WATSON, J. D. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*, 239, 197-201.
- WEGENKA, U. M., BUSCHMANN, J., LUTTICKEN, C., HEINRICH, P. C. & HORN, F. 1993. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol*, 13, 276-88.
- WEGRZYN, J., POTLA, R., CHWAE, Y. J., SEPURI, N. B., ZHANG, Q., KOECK, T., DERECKA, M., SZCZEPANEK, K., SZELAG, M., GORNICKA, A., MOH, A., MOGHADDAS, S., CHEN, Q., BOBBILI, S., CICHY, J., DULAK, J., BAKER, D. P., WOLFMAN, A., STUEHR, D., HASSAN, M. O., FU, X. Y., AVADHANI, N., DRAKE, J. I., FAWCETT, P., LESNEFSKY, E. J. & LARNER, A. C. 2009. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science*, 323, 793-7.
- WEYEMI, U. & DUPUY, C. 2012. The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses. *Mutat Res*, 751, 77-81.
- WEYEMI, U., LAGENTE-CHEVALLIER, O., BOUFRAQECH, M., PRENOIS, F., COURTIN, F., CAILLOU, B., TALBOT, M., DARDALHON, M., AL GHUZLAN, A., BIDART, J. M., SCHLUMBERGER, M. & DUPUY, C. 2012. ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene*, 31, 1117-29.
- WRIGHT, W. E. & SHAY, J. W. 2000. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat Med*, 6, 849-51.
- YOON, Y. S., LEE, J. H., HWANG, S. C., CHOI, K. S. & YOON, G. 2005. TGF beta1 induces prolonged mitochondrial ROS generation through decreased complex IV activity with senescent arrest in Mv1Lu cells. *Oncogene*, 24, 1895-903.
- ZHONG, Z., WEN, Z. & DARNELL, J. E., JR. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, 264, 95-8.