

# Univerzita Karlova

## Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Ondřej Novotný**

Senescentní buňky a jejich eliminace imunitním systémem  
Senescent cells and their elimination by the immune system

## **Bakalářská práce**

Vedoucí práce: RNDr. Milan Reiniš, CSc.

Praha, 2020

## **Abstrakt**

Buněčná senescence je typ zástavy buněčného cyklu, při které dochází ke specifické změně spektra exprimovaných genů, změně tvaru, velikosti a dalších vlastností buňky. Senescentní buňky sekretují specifický soubor látek, kterými ovlivňují okolní tkáň, imunitní systém i sebe samotné. To vše díky indukci signálních drah, vlastním jednotlivým typům senescence. Senescentní buňky se v těle hromadí jak během patologických stavů, tak během přirozeného procesu stárnutí a obnovy tkání, a to s různou intenzitou v závislosti na typu tkáně i druhu organismu. Důsledek jejich přítomnosti v organismu je často ambivalentní – jsou například účinným mechanismem obrany proti nádorovému bujení, zároveň ale dokážou být jeho příčinou. Pozitivní efekt má většinou i včasná eliminace senescentních buněk – tu má *in vivo* na starosti imunitní systém. Studie mapující přirozenou míru akumulace a eliminace senescentních buněk v jednotlivých orgánech, spolu s novými imunoterapeutickými postupy eliminace, jsou důležitým nástrojem pro vývoj nových přístupů k léčbě širokého spektra lidských chorob a potenciálně i k prodloužení lidského života.

## **Abstract**

Cell senescence is a type of cell cycle arrest in which the spectrum of the expressed genes changes specifically, also a change in the shape, size and other properties of a cell occurs. Senescent cells secrete a specific set of substances that affect the surrounding tissue, immune system and themselves. All this due to the induction of signalling pathways, inherent to individual types of senescence. The senescent cells accumulate in the body both during pathological conditions and during the natural process of aging and tissue renewal, with varying intensity depending on the type of tissue and organism. The consequence of their presence in the body is often ambivalent – for example, they are an effective mechanism of defence against tumour growth, but at the same time they can be its cause. The positive elimination of senescent cells usually has a positive effect – the immune system is responsible for this *in vivo*. Studies mapping the natural rate of accumulation and elimination of senescent cells in individual organs, together with new immunotherapeutic elimination procedures, are an important tool for developing new approaches to treating a wide range of human diseases and potentially to prolong human life.

## **Klíčová slova**

senescence, vznik nádorů, poškození DNA, stres, imunitní systém, stárnutí

## **Keywords**

senescence, tumorigenesis, DNA damage, stress, immune system, ageing

## **Poděkování**

*„Děkuji vedoucímu své práce, RNDr. Milanu Reinišovi, CSc., za odborné rady a bezbřehou shovívavost. Chci poděkovat i své rodině, jmenovitě své mamince, za podporu a za to, že i přes všechny komplikace ve mě věřila. Nakonec bych rád poděkoval své přítelkyni za oporu, inspiraci a neskutečnou trpělivost během celého mého studia!*

*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 Praze, 4.ledna 2020

Jméno: Ondřej Novotný

Podpis:

# Obsah

1	Úvod .....	1
2	Buněčná senescence .....	2
2.1	Objev, definice .....	2
2.2	Přirozená a indukovaná senescence.....	2
2.3	Signální dráhy indukující a udržující senescenci .....	5
2.4	Morfologie a markery senescentních buněk.....	7
2.5	SASP .....	8
2.6	Význam senescence.....	10
2.6.1	Nádory .....	10
2.6.2	Stárnutí a choroby s ním spojené.....	11
2.6.3	Obnova tkání, hojení ran, udržení homeostázy .....	12
3	Senescence vs. imunitní systém .....	13
3.1	Eliminace senescentních buněk imunitním systémem .....	13
3.2	Vliv senescentních buněk na imunitní systém.....	14
3.3	Indukce senescence imunitním systémem.....	15
4	Akumulace a eliminace senescentních buněk ve vybraných orgánech .....	15
4.1	Játra .....	15
4.2	Kůže.....	16
4.3	Děloha .....	17
4.4	Mozek.....	18
4.5	Prostata.....	18
4.6	Slezina .....	19
5	Imunoterapeutická eliminace senescentních buněk.....	19
6	Závěr.....	20
7	Literatura .....	22

## Seznam zkratek

ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity protilátkou zprostředkovaná buněčná cytotoxicita
ANT	adenine nucleotide translocase adenin nukleotid translokáza
apod.	a podobně
ATM	ataxia telangiectasia-mutated ataxia teleangiektázia-mutovaná
CAR	chimeric antigen receptor chimerní antigenní receptor
cca	circa přibližně
CCN	cysteine-rich protein 61 / connective tissue growth factor / nephroblastoma overexpressed (akronym)
CD	cluster of differentiation diferenční skupina
CDC	cell division cycle cyklus buněčného dělení
CDK	cyclin-dependent kinase cyklin-dependentní kináza
CDKI	cyclin-dependent kinase inhibitor inhibitor cyklin-dependentní kinázy
DCR	decoy receptor matoucí / falešný receptor
DDR	deoxyribonucleic acid damage response reakce na poškození deoxyribonukleové kyseliny
DPP	dipeptidyl peptidase dipeptidylpeptidáza
dsDNA	double-stranded deoxyribonucleic acid dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracellular matrix extracelulární matrix
ERK	extracellular signal-regulated kinases kináza regulující extracelulární signál
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor granulocytární a makrofágové kolonie stimulující faktor
GR	granulocyte receptor granulocytární receptor
GRO	growth-related oncogene růstový onkogen
HDM	human double minute homolog lidský "double minute" homolog
HIV	human immunodeficiency virus virus lidské imunitní nedostatečnosti
HLA	human leucocyte antigen lidský leukocytární antigen

CHK	checkpoint kinase kináza kontrolního bodu
ICAM	intercellular adhesion molecule mezibuněčná adhezni molekula
IFN	interferon interferon
IGFBP	insulin-like growth factor-binding protein vazebný protein inzulinu podobného růstového faktoru
IL	Interleukin interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
JAK	Janus kinase Janus kináza
kol.	kolektiv
LFA	leukocyte function-associated antigen antigen asociovaný s funkcí leukocytů
MAPK	mitogen-activated protein kinase mitogenem aktivovaná proteinkináza
MCP	monocyte chemoattractant protein monocytární chemoatrakční protein
MDM	mouse double minute homolog myší "double minute" homolog
MEK	MAPK and ERK kinase kináza MAPK a ERK
MHC	major histocompatibility complex hlavní histokompatibilní komplex
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A polypeptidová MHC-I příbuzná sekvence a
miRNA	micro ribonucleic acid mikro ribonukleová kyselina
MMP	matrix metalloproteinase matrixové metaloproteázy
NF-κB	nuclear factor kappa B jaderný faktor kappa B
NKG	natural killer group
NOX	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidáza
odd.	oddíl
OIS	oncogene-induced senescence onkogenem indukovaná senescence
PAI	plasminogen activator inhibitor inhibitor aktivátoru plazminogenu
PDGF	platelet derived growth factor destičkový růstový faktor
popř.	popřípadě

pRB	retinoblastoma protein retinoblastomový protein
PTEN	phosphatase and tensin homolog homolog fosfatázy a tensinu
RAE	retinoic acid early inducible
ROS	reactive oxygen species reaktivní kyslíkové radikály
RS	replicative senescence replikativní senescence
SAHF	senescence associated heterochromatic foci oblasti heterochromatinu spojené se senescencí
SASP	senescence associated secretory phenotype sekreční fenotyp spojený se senescencí
SIPS	stress-induced premature senescence stresem indukovaná předčasná senescence
SMAD	"small body size"/"mothers against decapentaplegic" (akronym zkratk názvů příbuzných genů u jiných organismů)
ssDNA	single-stranded DNA jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
STAT	signal transducer and activator of transcription přenašeč signálu a aktivátor transkripce
TCR	T-cell receptor T-buněčný receptor
TGF	transforming growth factor transformační růstový faktor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases tkáňový inhibitor metaloproteáz
TNF	tumor necrosis factor faktor nádorové nekrózy
TNFR	tumor necrosis factor receptor receptor faktoru nádorové nekrózy
t-PA	tissue plasminogen aktivátor tkáňový aktivátor plasminogenu
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand TNF příbuzný apoptózu indukující ligand
TRF	telomeric repeat-binding factor telomerický vazebný faktor
tzv.	takzvaná / takzvanou / takzvané / takzvaných / takzvaného
ULBP	UL16 binding protein UL16 vazebný protein
VCAM	vascular cell adhesion molecule adhezní molekula cévní buňky
VEGF	vascular endothelium growth factor cévní endotelový růstový faktor
vs.	proti

# 1 Úvod

V druhé polovině minulého století byla objevena buněčná senescence. Jev, který stojí v pozadí závažných chorob, neblahých důsledků stárání, ale i schopnosti organismu přežít a vyvíjet se.

Senescence uvádí buňky do stavu, ve kterém přichází o schopnost proliferace a často nejsou schopny plnit své původní funkce. Na druhou stranu buňky získávají řadu nových schopností, většinou vlivem změny ve spektru sekretovaných látek. Vliv těchto látek na okolí je značně různorodý a samozřejmě stoupá se zvyšujícím se podílem senescentních buněk v tkáních. Za určitých okolností je tak vedle samotné indukce senescence, důležitá i následná včasná eliminace senescentních buněk. K té dochází jak přirozenou cestou prostřednictvím imunitního systému, tak uměle pomocí léčiv (tzv. senolytika) a nově i cílenou imunoterapií.

Senescence je indukována v reakci na podmínky, které by mohly mít potencionálně škodlivé důsledky pro organismus, ať už jde o vnější stresové faktory, nestabilitu genomu či hrozbu nádorového bujení. Právě s obranou před nádory je spojena i nejrozšířenější teorie o významu senescence. Opačnou stranou těžé mince je indukce senescence za nepatologických okolností, jakožto jevu nezbytného pro udržení tkáňové homeostázy. Mnohem více o senescentních buňkách, jejich významu a interakcích se dozvíte v následujícím textu.

## **Cíl bakalářské práce**

Seznámit čtenáře se senescencí jako takovou, představit imunitní systém jako efektivní nástroj eliminace senescentních buněk a poukázat na potenciál cílené imunoterapeutické eliminace při zlepšování kvality a délky lidského života.

## **Struktura bakalářské práce**

V práci jsou nejprve uvedeny obecné charakteristiky senescence a senescentních buněk, jejich vlastnosti, význam, funkce v organismu. Druhá část popisuje konkrétní příklady výskytu senescentních buněk a jejich interakce s imunitním systémem v jednotlivých orgánech a možnosti imunoterapeutické eliminace *in vivo*. Použité zdroje se zabývají pouze senescencí buněk orgánů postnatálních stádií mnohobuněčných živočichů (myš, mlok, ryba, člověk). Senescence u jiných organismů (kvasinky, rostliny apod.), senescence v rámci embryonálního vývoje a senescence imunitních buněk nejsou předmětem zájmu práce.

## 2 Buněčná senescence

### 2.1 Objev, definice

Buněčná senescence byla objevena v roce 1961 při experimentech s kulturou lidských fibroblastů. Ukázalo se, že diploidní buňky je možné kultivovat pouze po omezený počet dělení (v roce 1974 F. M. Burnet v knize *Intrinsic mutagenesis* nazval tento jev „Hayflickův efekt“), běžně 50-80, v závislosti na druhu organismu a typu tkáně. Potom se proliferační schopnost ztrácí a buňky dále přežívají ve fázi G1 buněčného cyklu. Tento fakt není ovlivněn výživou, způsobem skladování, přítomností virů ani nedostatkem růstových faktorů.<sup>1,2</sup> Jsou známy okolnosti, jako zvýšený oxidační stres za hyperoxie, za kterých vznikají i senescentní buňky polyploidní, což naznačuje zástavu v pozdějších fázích buněčného cyklu.<sup>3</sup>

Senescence je typ terminální diferenciaci, při kterém buňka sice přichází o schopnost dělení, ale zachovává si, ač v pozměněné podobě, metabolickou aktivitu. Buňka navíc prochází řadou trvalých morfologických a funkčních změn, což senescenci odlišuje od pouhé zástavy proliferace (anglicky *quiescence*) za suboptimálních kultivačních podmínek.<sup>3</sup> Takový stav, se vyznačuje zástavou proliferace v G0 fázi v případě, kdy se buňkám nedostává potřebných růstových faktorů, nebo jsou inhibovány kontaktem s okolními buňkami. Tyto buňky využívají podobné signální dráhy, včetně p53, p21<sup>Cip1</sup> a pRB, jako buňky senescentní, ale jejich stav je možné zvrátit právě dodáním růstových faktorů.<sup>1,4</sup>

### 2.2 Přirozená a indukovaná senescence

Senescenci nastávající po určitém limitním počtu dělení označujeme jako přirozenou, replikativní (*Obrázek 1*). Vzniká jako důsledek nedostatečné aktivity telomerázy v somatických buňkách, kde, díky mechanismu replikace, dochází ke zkracování telomer. Toto zkracování je přímo úměrné počtu absolvovaných dělení a dosáhne-li hraniční míry, kdy je ohrožena stabilita genomu, je přerušen buněčný cyklus.<sup>1,5</sup> Tuto skutečnost předpověděl již v roce 1971 (anglická verze článku 1973) Olovnikov a nazval ji teorií marginotomie. Předpokládal, že v oblasti telomer se nachází esenciální geny, po jejichž ztrátě není buňka schopna dalšího cyklu.<sup>6</sup> Odvozenější teorie pak předpokládá, že telomery jsou udržovány ve formě heterochromatinu, který pro svou existenci potřebuje nadlimitní počet bází. V případě, že se telomery zkrátí pod tuto hranici, dochází k heterochromatinizaci přilehlých regulačních oblastí za vzniku SAHF. Kratší telomery mají také menší schopnost interakce s vazebnými proteiny a jaderným obalem, čímž je celá konstrukce destabilizována.<sup>7</sup> Za nepřímý důkaz vlivu zkrácení telomer na senescenci lze považovat fakt, že jedním se základních znaků immortalizovaných buněk je právě reaktivace telomerázy.<sup>8</sup>

Novější studie uvádějí, že pro spuštění senescence je důležitá spíše stabilita konců telomer. Při RS ztrácí telomera část 3' koncové ssDNA G bohaté sekvence nezávisle na délce telomer. Absence této části brání formování tzv. T-smyčky, konec chromozomu se tak chová jako dsDNA zlom a spouští se DDR.<sup>9</sup> Stablní struktura těchto konců je v proliferujících buňkách udržována omezenou aktivitou

telomerázy. Pokud se rovnováha posune ve směru destrukce, například inhibicí telomerázy, je spuštěna senescence.<sup>10</sup> Tuto teorii podporuje i zjištění, že telomerní vazebný protein TRF2 brání ochranou ssDNA konců ustavení senescence i přes to, že zároveň výrazně urychluje zkracování telomer.<sup>11</sup> Podlimitně krátké telomery pak nejsou dále schopny navázat dostatečný počet TRF2 a v takovém případě se projevuje i závislost RS na délce telomer.<sup>12</sup> Telomeráza může tlumit účinky prosenescentní signalizace a podpořit proliferaci i přes výskyt markerů poškození telomer.<sup>13</sup> Jakmile je ale RS kompletní, nemůže být již aktivitou telomerázy zvrácena.<sup>14</sup>

Později byly senescentní znaky pozorovány i u buněk, které nedosáhly Hayflickova limitu. Byla objevena tzv. stresem indukovaná předčasná senescence. Jejím původcem je buněčný stres, způsobený například ROS, expresí onkogenů, epigenetickými změnami, či některými cytokiny (*Obrázek 2*).

U lidských fibroblastů v hyperoxickém prostředí se zvyšuje hladina ROS a následně i úbytek v oblasti telomer v každé generaci na cca 500 bází, místo cca 90 bází při normoxii.<sup>3</sup> Sám problém opožděujícího se řetězce má v takových případech na zkracování telomer až druhotný efekt. Zdá se proto, že některé *in vitro* pozorované RS mohou být ve skutečnosti SIPS, indukované atmosférickou hladinou kyslíku, která je přibližně 7× vyšší než hladina v tkáních *in vivo*.<sup>15</sup> Citlivost buněk na hladinu kyslíku vykazuje jasný mezidruhový rozdíl. Buňky myších embryonálních fibroblastů při 20% hladině kyslíku aktivují senescenci výrazně častěji než buňky lidské. V hyperoxických podmínkách *in vitro* tak většina myších buněk podléhá SIPS dříve, než nastane RS.<sup>16</sup>

Senescenci indukuje i exprese onkogenů. GTPáza Ras zvyšuje expresi regulátoru replikace CDC6. To má za následek zmnožení replikačních počátků, následované DDR závislou senescencí.<sup>17</sup> Zároveň dochází k zvýšené produkci ROS, kvůli poškození mitochondrií, což dále posiluje prosenescentní signál.<sup>18</sup> U tohoto typu indukce, na rozdíl od RS, není ani aktivní telomeráza z podstaty schopna senescenci zabránit.<sup>19</sup>

Jednotlivé indukční dráhy (viz odd. 2.3) nemusí buňka absolvovat od samého počátku. Dobrým příkladem je onkogenní růstově stimulační transkripční faktor E2F1, jeden z finálních efektorů signálních drah. Ten je při senescenci reprimován, ale při zvýšené expresi může i on sám senescenci indukovat.<sup>20</sup>

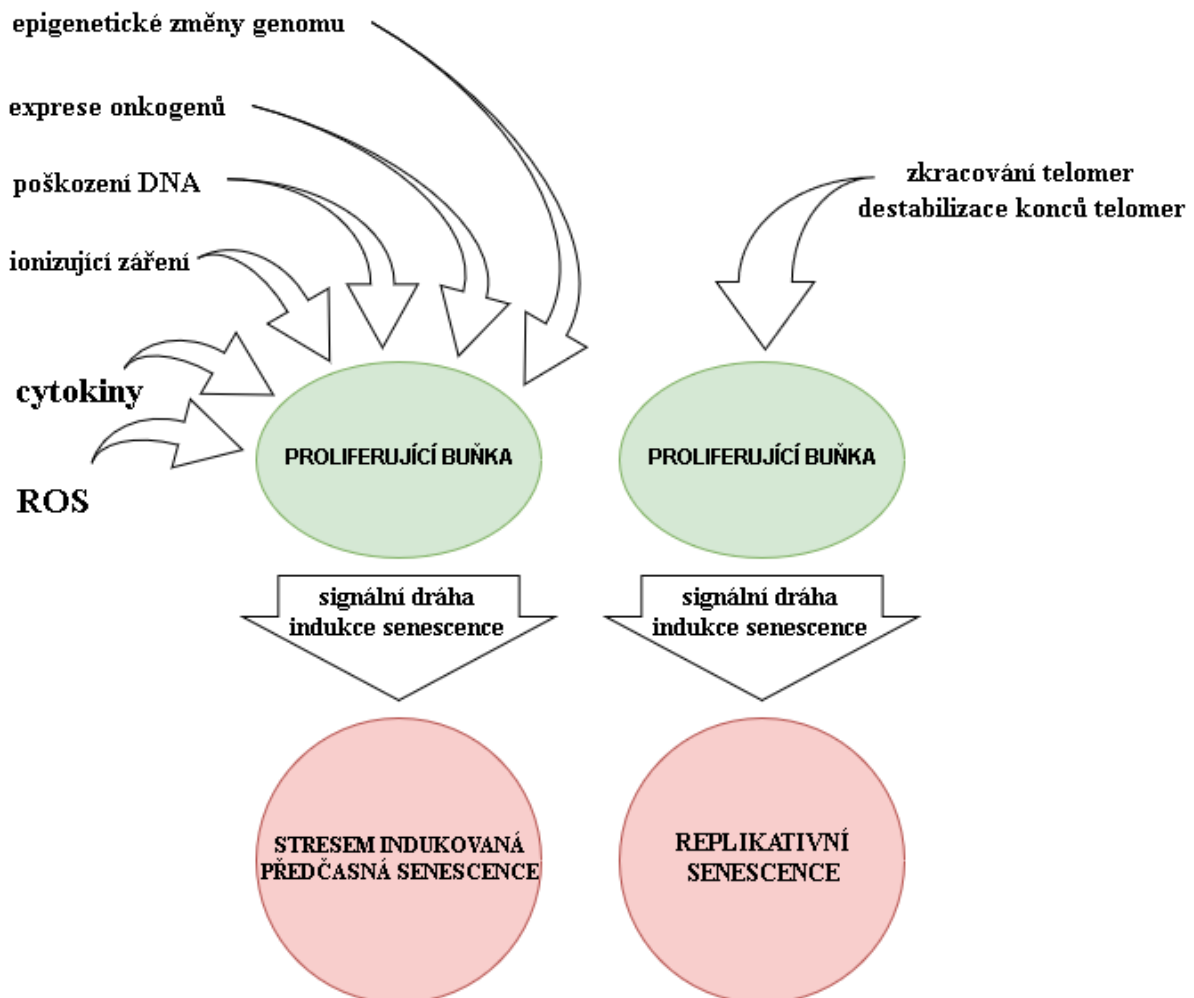
Díky aktivaci stejných signálních drah, jsou Ras a E2F1 OIS podobné RS. Odlišná je OIS indukovaná serin/treonin kinázou Raf (popř. deregulací stejné Ras/Raf/MEK/ERK MAPK kaskády zvýšenou expresí MEK<sup>21</sup>). Postižené buňky zůstávají překvapivě ve fázi G2/M a postrádají klasickou senescentní zploštělou morfolologii.<sup>22</sup>

Při indukci senescence mohou hrát roli i epigenetické změny genomu. *In vitro* inhibice buněčné DNA (cytosin-5) metyltransferázy vede k senescenci hypometylací a následnou dekondenzací chromatinu. Klesající aktivita metyltransferázy pozorovaná během pasážování může pak *in vivo* hrát roli i jako „počítadlo dělení“ v případě RS.<sup>23</sup> K dekondenzaci a senescenci vede rovněž zvýšená acetylace histonů vlivem inhibice histon deacetyláz butyrátem.<sup>24</sup> SIPS může být navozena i zařazením chybných nukleotidů, popř. ssDNA a dsDNA zlomy způsobenými následnou excizní opravou.<sup>25</sup> Další,

na telomerách nezávislou indukci, je vystavení buněk subletálními dávkami ionizujícího záření.<sup>26</sup> Takový způsob vede k o několik týdnů zpožděné expresi p16<sup>INK4a</sup> a senescenci.<sup>27</sup>

Cytokiny hrají roli jak v indukci senescence imunitním systémem (viz odd. 3.2), tak v indukci pomocí tzv. „bystander efektu“.<sup>28,29</sup> Médium „mateřských“ senescentních buněk, u kterých byla senescence indukována různými způsoby, je samo o sobě schopné indukovat senescenci. „Mateřské“ senescentní buňky sekretují do média cytokiny IL-1 $\beta$ , který přes expresi NF- $\kappa$ B<sup>30</sup> indukuje SASP<sup>31</sup>, a TGF- $\beta$ , zvyšující hladinu ROS v cílových buňkách expresí Nox4<sup>32</sup>, a tím parakrinně indukují DDR závislou *bystander* senescenci. Důležité je zjištění, že oba hlavní cytokiny jsou sekretovány také *bystander* senescentní buňkou – efekt se tak může šířit v dalších úrovních indukce.<sup>29</sup>

V medicínské praxi se SIPS využívá v boji proti nádorovým onemocněním, je totiž principem účinnosti mnohých protinádorových chemoterapeutik.<sup>33–35</sup>



Obrázek 1: Hlavní induktory stresem indukované předčasné senescence a replikativní senescence; vlastní zpracování

## 2.3 Signální dráhy indukující a udržující senescenci

Jak je vidět na předchozích příkladech, iniciační podněty ke spuštění programu senescence mohou být různorodé, někdy dokonce dochází k jejich interakci.<sup>36</sup> Vlivy všech se však sbíhají v průběhu dvou signálních drah, které jsou charakterizované ústředními proteiny ATM/p53/p21 (popř. p19/p53/p21 a p14/p53/p21 u člověka) a p16/pRB (*Obrázek 2: Ústřední signální dráhy indukce senescence*).

Dráha proteinu p53 má na svědomí indukci senescence založenou na poškození DNA, často dsDNA zlomy (především RS a ROS). Spouští se DDR<sup>17</sup> a pokud nejsou poškození včas opravena, následuje signální kaskáda vedoucí k senescenci. V úvodu dráhy stojí serin/treonin kináza ATM, detekující zlomy DNA. Cílem ATM je jak histon  $\gamma$ H2AX<sup>37</sup> a buněčný cyklus regulující kináza CHK2 fosforylující p53, tak stabilizace p53 přímou fosforylací.<sup>38</sup> ATM, fosforylovaný  $\gamma$ H2AX a další proteiny DDR formují „DNA damage foci“, mikroskopicky pozorovatelný marker DNA poškození.<sup>39</sup>

P53 je v reakci na poškození DNA možné stabilizovat i na DDR nezávislou cestou. P19<sup>Arf</sup> (p14<sup>Arf</sup> u člověka), alternativní produkt lokusu *Arf/Ink4a*, inhibuje ubiquitin ligázu MDM2 (HDM2 u člověka), která označuje p53 k likvidaci v proteazomu.<sup>40</sup>

Fosforylovaný a ubiquitinem neznačený p53 dál slouží jako transkripční faktor pro p21<sup>Cip1</sup>, obecného CDKI. Ten v případě senescence inhibuje komplex E/CDK2 u dráhy ATM/p53/p21 a D/CDK4,6 u dráhy p16/pRB (viz dále).<sup>41</sup> E/CDK2 v proliferujících buňkách fosforyluje regulační DNA vazebný protein pRB, tím ho inaktivuje a pRB dále nepůsobí jako inhibiční transkripční faktor. V případě inhibice E/CDK2 se pRB vyskytuje v aktivní, hypofosforylované formě. Vyvazuje tak regulátor buněčného cyklu transkripční faktor E2F1, regulující mimo jiné expresi DNA polymerázy  $\alpha$ , a brání tím přechodu z G1 do S fáze.<sup>42</sup> E2F1 zasahuje do regulace na více místech a s protichůdným účinkem. Jeho zvýšená hladina paradoxně pozitivně reguluje p14<sup>Arf</sup> a tím spouští senescenci<sup>20</sup> a naopak, jako transkripční faktor cyklinu E inhibuje vlastní inhibitor pRB.<sup>42</sup> Působení E2F1 je tak ovlivněno pozitivní i negativní zpětnovazebnou smyčkou.

Druhá hlavní signální dráha je na DDR nezávislá. Po signalizaci MAPK kaskádou a příslušnými transkripčními faktory<sup>43</sup> využívá CDKI p16<sup>Ink4a</sup>, alternativní produkt lokusu *Arf/Ink4a* (exprese obou alternativních genů je během cyklu reprimována pomocí onkogenního BMI-1, konkurenta aktivační MAPK signalizace<sup>44</sup>). Ten inhibuje komplex D/CDK4,6<sup>45</sup> a propojuje tak obě signální dráhy v místě aktivace pRB hypofosforylací. pRB je oběma komplexy cyklin/CDK fosforylován na odlišných místech a pro jeho kompletní inaktivaci je zapotřebí spolupráce obou. Při vyšších hladinách p21<sup>Cip1</sup> je navíc D/CDK4,6 inhibován i jeho aktivitou<sup>26</sup>, což ukazuje na provázání obou drah na více místech v jejich průběhu.

Po navození senescence je potřeba tento stav aktivně udržet. Jedním z mechanismů je zpětnovazebná smyčka membránového receptoru CXCR2 a jeho ligandu CXCL8 (IL-8), zvyšující hladinu ROS, které dále poškozují DNA a přispívají k aktivaci kináz ATM a ATR. Smyčka tak přes DDR vrací signál na počátek indukční dráhy.<sup>46</sup>

Využití signálních drah se u různých způsobů indukce senescence, druhů organismů i typů tkání liší. Například indukce hyperacetylací probíhá přes pRB<sup>24</sup> s přímým ovlivněním exprese p21<sup>Cip1</sup> bez účasti p53.<sup>47</sup> Vysoká hladina E2F1 pak indukuje senescenci přes p14/p53 dráhu.<sup>20</sup> Hypometylace DNA<sup>23</sup>, poškození radiací<sup>26</sup> i ROS a OIS signalizují přes DDR a p53/p21 dráhu, podobně jako RS<sup>48</sup>. Oproti tomu Raf indukce probíhá přes dráhu p16/pRB.<sup>22</sup>

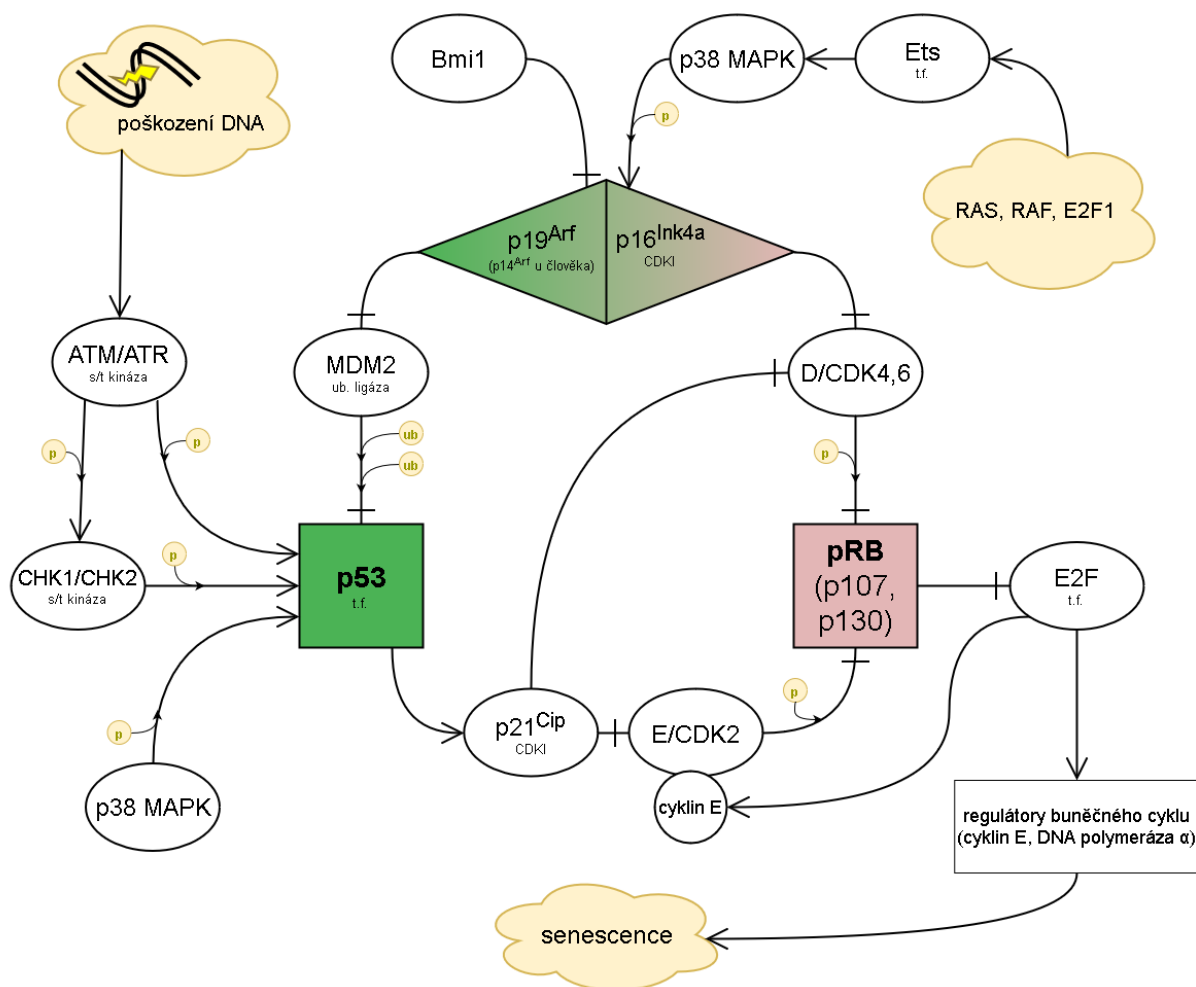
Mezidruhové rozdíly pak lze pozorovat na příkladu myši a člověka. Při indukci ROS postupuje u myši signál přes ATM/p53/p21 dráhu. Ta je u nich dráhou majoritní, postup přes p16/pRB často chybí<sup>16</sup> (některé studie však potvrzují součinnost obou drah<sup>49</sup>). Zatímco u lidských fibroblastů stačí libovolná z obou drah – signalizují nezávisle.<sup>50</sup> Poškození telomer je pak u člověka signalizovatelné opět jak p53, tak alternativně p16/pRB dráhou. U myši je i v tomto případě dráha p53 nezbytná.<sup>12</sup>

Rozdílné dráhy se pravděpodobně uplatňují i v rámci jednoho druhu indukce, ve stejném druhu tkáně a za stejných podmínek. U OIS melanocytů v rámci név, byly při *in vitro* experimentu u všech buněk detekovány senescentní markery, ale jen u 70% z nich zároveň zvýšená hladina p16<sup>Ink4a</sup>.<sup>51</sup>

Některé kroky signální kaskády lze navíc přemostit a funkci jednotlivých elementů může nahradit jiný protein. Úlohu pRB mohou zastoupit jak p107, tak p130, členové stejné proteinové rodiny.<sup>38</sup> Roli CDKI může hrát jak p21<sup>Cip1</sup>, tak p27<sup>Kip1</sup>, opět člen stejné proteinové rodiny.<sup>34</sup> Při poškození DNA UV zářením, výskytu ssDNA apod. je pak známa alternativní signalizace kinázou ATR. Pokud není přítomen ATM, přebírá ATR jeho signální funkci a buňka prodělá zástavu proliferace až v G2 fázi.<sup>52</sup>

Z často až protichůdných výsledků některých experimentů se zdá, že signalizace senescence je velmi citlivá na konkrétní podmínky a kontext signálu. Dost možná jsou výsledky ovlivněny i samotným provedením experimentu a nevědomými zásahy do průběhu signalizace. Zdánlivá nejednotnost za obdobných podmínek může být také důsledek toho, že nastolení senescence je důsledkem spíše součtu různorodých dílčích stimulů než definitivní signalizace určitou konkrétní molekulou. Záleží na tom, který stimul nakonec překročí prahovou hodnotu a indukční dráhu určí.

Na rozdíl od původních názorů, které byly i jednou z definic senescence, je za určitých okolností tento stav vratný. Inaktivace pRB<sup>53</sup> a p53 u senescentních lidských fibroblastů jsou dostačující k návratu senescentních buněk do buněčného cyklu a k původní morfologii.<sup>54</sup> Při RS lze pozorovat snížení hladiny p21<sup>Cip1</sup> k normálu a následné zvýšení hladiny p16<sup>Ink4a</sup>.<sup>45</sup> U buněk, které zvýšení p16<sup>Ink4a</sup> nevykazovaly, se inaktivací p53 podařilo v různé míře potlačit senescentní fenotyp a vrátit je do buněčného cyklu. P16<sup>Ink4a</sup> tak slouží jako pojistný signál senescence<sup>14</sup> a inhibitor karcinogeneze v případě mutace p53 u pre-maligních buněk.<sup>55</sup>



Obrázek 2: Ústřední signální dráhy indukce senescence; vlastní zpracování  
(t.f. – transkripční faktor; p - fosfátová skupina; ub – ubiquitin; s/t – serin/threonin)

## 2.4 Morfologie a markery senescentních buněk

Senescentní buňky se vyznačují obdobně pozměněnou morfologií, neohledě na typ původní buňky. Tato změna není pouze pasivní reakcí, ale je důsledkem změny exprese příslušných proteinů. Klíčovou roli v signalizaci zde hraje rodina pRB proteinů<sup>56</sup> a jejich interakce s chromatin modulačními faktory a příslušnými jadernými tyrosin kinázami.<sup>57,58</sup>

Ukázkovým příkladem změny morfologie jsou senescentní lidské fibroblasty. Díky hromadění produktů exprese a zastavenému cyklu dochází ke zvětšování buňky.<sup>59</sup> Zvýšená polymerizace podjednotek cytoskeletárních struktur a náhodné rozmístění vinkulinu a paxillinu, proteinů fokální adheze běžně soustředěných na koncích fibroblastů, způsobují přechod z typického vřetenovitého tvaru na nepravidelný plochý tvar.<sup>57,60</sup> Přímou změnu exprese podjednotek lze pozorovat u cytoskeletárního cytokeratinu v epitelech. U nich dochází rovněž ke snížení exprese proteinů adheze, a to povrchového  $\beta$ -kateninu a E-katherinu. Další znaky, snížená exprese kladinu-1 (složka těsných spojů) a zvýšená exprese vimentinu (složka intermediálních filament), jsou navíc projevem změny typu tkáně –

– epiteliálně mezenchymálního přechodu.<sup>61</sup> Za změny morfologie senescentních buněk, díky remodelaci extracelulární matrix, jsou pak zodpovědné i některé sekretované proteiny – MMP-1, stromelysin-1 a PAI-1 (viz odd. 2.5).

Senescentní buňky prochází i změnami v rámci buněčných organel. Dochází k polyploidizaci (až polynukleaci)<sup>62</sup>, zvětšení jádra<sup>63</sup> i endoplasmatického retikula<sup>64</sup> a změnám organizace Golgiho aparátu<sup>65</sup>. Metabolicky velmi důležité jsou změny organizace a velikosti u mitochondrií, které provází zvýšená produkce ROS.<sup>18</sup>

Senescentní buňky byly dlouhou dobu pozorovány pouze v *in vitro* podmínkách a nebylo tak jasné, zda senescence není pouze artefakt kultivace. Dnes již známe několik diagnostických markerů pro jejich identifikaci *in vivo*. Jedním z hlavních je  $\beta$ -galaktozidázová aktivita při pH=6, tzv. SA- $\beta$ -gal.<sup>66</sup> Stojí za ní běžná lyzozomální  $\beta$ -D-galaktozidáza, která je díky zvýšené exprese detekovatelná i při nadoptimálním pH. Detekce je však ovlivnitelná i podmínkami kultivace, a proto může identifikace senescentních buněk pouze na základě SA- $\beta$ -gal vést k falešným výsledkům.<sup>67</sup>

Dalším používaným markerem je zvýšený obsah lyzozomálního lipofuscinu.<sup>68</sup> Jde o oxidované nedegradovatelné metabolické produkty s autofluorescenční aktivitou, jejichž obsah v průběhu života buňky kontinuálně roste. Na rozdíl od SA-beta-gal, není detekce podmíněna enzymatickou aktivitou sondy, což rozšiřuje použitelnost i na fixované buňky.<sup>69</sup> Pro identifikaci senescentních buněk se v praxi používá i detekci součástí DDF<sup>70</sup>, popř. přímo proteinů signální dráhy<sup>71</sup>.

Společným znakem senescentních buněk, nehledě na typ senescence, je také úbytek jaderného laminu B1. Ten je způsobem destabilizací jeho mRNA sekrece kolagbez přímé závislosti na známých prosenescentních signálních drahách. Jde o časný marker nastupující kolem 2 dnů po indukci senescence, dříve než SASP a SA- $\beta$ -Gal.<sup>72</sup> Snížena je i exprese některých *heat shock* proteinů, čímž roste zastoupení nesprávně složených proteinů v buňce.<sup>73</sup>

## 2.5 SASP

Senescence pro buňky neznamena pouze zástavu cyklu a statické morfologické změny. Buňky aktivně mění metabolismus a spouští sekreci celé řady specifických látek, popř. upravují sekreci stávajících. Výsledný sekretom je souhrnně nazýván SASP. Zastoupení látek SASP je závislé jak na buněčném typu, tak způsobu indukce senescence.<sup>28</sup> Vedle stabilně zastoupených typů cytokinů, růstových faktorů a povrchových receptorů, je např. IL-1 $\alpha$  typický pro fibroblasty, růstový faktor HGF pro epitel<sup>61</sup> a VEGF je sekretován pouze buňkami při indukci senescence p16/RB dráhou<sup>74</sup>. SASP má jak autokrinní, tak parakrinní efekt na indukci a posílení senescence, zprostředkovává zánětlivé odpovědi a reorganizaci extracelulární matrix.<sup>61</sup> Některé složky jsou zodpovědné za zprostředkování imunitního dohledu (viz odd. 3.1), ovlivnění proliferace a diferenciací okolních buněk, popř. mění strukturu okolní tkáně a můžou tak být příčinnou nádorové transformace.<sup>75-77</sup> U stávajících nádorových buněk pak dokáží vyvolat senescenci<sup>28,78</sup> a apoptózu<sup>79</sup>, popř. podpořit růst nádoru zvýšenou vaskularizací.<sup>74</sup>

Část signalizace indukce SASP mají na svědomí ATM a CHK2, složky DDR. Jsou dostačující pro sekreci některých složek (IL-6 a IL-8<sup>38</sup>) v časných fázích, ne pro aktivaci kompletního SASP. Intenzita jejich sekrece je negativně ovlivněna pomocí p53, který ji několikanásobně zeslabuje a oddaluje. P53 tak pravděpodobně brzdí vývoj SASP u nesenescentních buněk v případě, kdy je poškození DNA opravitelné a dává tak buňce na opravu čas.<sup>61</sup> Důležitosti DDR signálu nahrává i absence SASP při indukci pomocí p21<sup>Cip1</sup>, popř. p16<sup>Ink4a</sup>.<sup>80</sup>

Spuštění kompletního SASP zprostředkovává fosforylovaná MAPK p38. Ta, spolu s ATM, fosforylaci aktivuje NF-κB, transkripční faktor genů SASP.<sup>31</sup> Hladina fosforylované p38MAPK se zvedá postupně v rámci několika dnů, což odpovídá postupnému zrání SASP.<sup>81</sup> Aktivací pozitivních zpětných smyček je SASP postupně posilován<sup>46</sup> a plně vyvinut je po 4-7 dnech od indukce.<sup>61</sup> V konečné fázi existují regulační mechanismy, které pomocí miRNA naopak brání nekonečnému posilování SASP a umožňují dlouhodobou persistenci senescentních buněk v organismu.<sup>82</sup>

SASP je ovlivněn i díky zmíněné degradaci jaderného laminu B1.<sup>72</sup> DNA senescentních buněk se pak dostává do cytosolu a zde přes cyklické GMP-AMP syntázu ovlivňuje produkci zánětlivých složek SASP, především IL-6.<sup>83</sup> Vliv na SASP má i přítomnost nádorových buněk, které mohou potlačit jeho protinádorové účinky.<sup>78</sup>

Důležitou součástí SASP jsou cytokiny a jejich receptory. V časné fázi jsou sekretovány IL-1α a IL-1β sloužící jako autokrinní regulátor exprese IL-6 a IL-8 a transkripčního faktoru NF-κB.<sup>30</sup> Jednou z časných složek je i cytokin TGF-β, schopný parakrinní indukce senescence.<sup>29</sup> Snižování hladiny aktivního TGF-β během senescence následně vede k zvýšené expresi MMP a degradaci ECM.<sup>84</sup> Cytokiny IL-6 (IFN-β2) a IL-8 (CXCL8) parakrinně podporují invazivitu buněk do bazální membrány, což je jeden z projevů maligních nádorů.<sup>61</sup> IL-6 navíc parakrinně navozuje expresi HLA-E a brání tak eliminaci imunitním systémem (viz odd. 3.1)<sup>85</sup> IL-8 dále podporuje karcinogenezi indukcí angiogeneze, rovněž ale působí jako chemoatraktant neutrofilních granulocytů.<sup>46</sup>

Sekretovaný růstový faktor IGFBP (IGFBP4 a IGFBP7 u mezenchymálních kmenových buněk<sup>73</sup>, IGFBP3 u rakoviny prsu<sup>86</sup> a u endotelu<sup>87</sup>) je schopen parakrinní indukce senescence. V extracelulárním prostoru přitom PAI-1 pomáhá zachovat IGFBP inhibicí t-PA, který jinak IGFBP degraduje a indukci brání.<sup>86</sup> Opačným, prokarcinogenním, účinkem se projevuje růstový faktor VEGF, díky svému angiogennímu efektu.<sup>74</sup> PDGF je pak specifickou složkou SASP uplatňující se při obnově tkáně, která vede k diferenciaci myofibroblastů z fibroblastů.<sup>88</sup>

V rámci SASP jsou běžně sekretovány i látky, které ovlivňují remodelaci okolní ECM. PAI-1 inhibuje plazminogen aktivátor, který konvertuje plazminogen na plazmin. Serinová proteáza plazmin pak rozvolňuje ECM degradací fibrinu. PAI-1 je ve zvýšené míře detekován u metastáz, při hojení ran a angiogenezi, kde těmto změnám brání.<sup>89</sup> Některé práce označují PAI-1 jako marker, který se vyskytuje pouze u RS.<sup>29</sup> Přímý rozklad složek ECM mají za úkol sekretované metaloproteázy. Ty, mimo jiné, zvyšují propustnost cév a obsah vody a růstových faktorů ve tkáních. Tím podporují vznik otoků,

poškození tkáně a následně i růst nádorů. Spolu se zvýšenou produkcí MMP je zároveň potlačena sekrece jejich inhibitorů TIMP, čímž je efekt ještě posílen.<sup>90</sup>

## 2.6 Význam senescence

Význam senescence vystihuje tzv. antagonistická pleiotropní hypotéza.<sup>75</sup> Ta popisuje senescenci jako efektivní protinádorové opatření, které pomáhá organismu v produktivním věku přežít. Organismus je schopen po určitou dobu života senescentní buňky akumulovat, částečně eliminovat a odolávat jejich dílčím negativním vlivům. Svou daň si tato výhoda vybírá ve věku pozdějším. Díky postupně se zvyšující koncentraci senescentních buněk a dlouhodobému efektu SASP, dochází postupně k porušení integrity tkáně, degeneraci a paradoxně i karcinogenezi v pozdějším věku. Takovou hypotézu podporuje i výzkum S.D. Tynera a kol., kde mutace p53 vedla k nižší karcinogenezi, ale zrychlenému stárnutí.<sup>91</sup>

Indukce senescence za přispění fúzogenních proteinů nahrává další teorii o významu senescence, a to antivirové obraně. V případě infekce virem kódujícím fúzogenní proteiny (např. *Measles morbillivirus*), brání senescence jeho šíření.<sup>92</sup> V souladu s teorií je i fakt, že IFN- $\beta$ , cytokin účastnící se antivirové imunitní odpovědi, aktivuje p53 signální dráhu senescence<sup>93</sup>, i schopnost některých virových proteinů (SV40 velký T antigen<sup>94</sup>; HPV E6 protein<sup>95</sup>; HPV E7 protein<sup>96</sup>; HVB X protein<sup>97</sup>) zabránit spuštění senescence vyvázáním signálních molekul.

Ať už je původní význam senescence jakýkoliv, můžeme její aktuální spektrum účinků rozdělit na dvě základní skupiny. Jsou to vlivy negativní, které často provází dlouhodobou persistenci senescentních buněk (viz odd. 2.6.1 a 2.6.2) a vlivy pozitivní, které jsou často spojeny s přechodným výskytem senescentních buněk a jejich následnou eliminací (viz odd. 2.6.1 a 2.6.3).

### 2.6.1 Nádory

Role senescence v nádorové transformaci má svou světlou i temnou stranu. Známý jsou případy, jako OIS melanocytů v rámci melanocytických név<sup>98</sup>, OIS hepatocytů<sup>55</sup> a lymfocytů<sup>99</sup>, kde indukce senescence, a její parakrinní indukce pomocí SASP<sup>61</sup>, úspěšně brání vzniku nádorů.

Pokud však nejsou senescentní buňky následně eliminovány, dochází v určitých případech k vývoji chronického zánětu vlivem SASP. Některé jeho složky, podporující invazivitu nádorových buněk<sup>38</sup> a angiogenezi<sup>46,74</sup> a upravující ECM<sup>90</sup>, naopak rozvoji nádoru napomáhají. U preneoplastických lézí jsou známy případy, kdy senescentní fibroblasty podpořily vznik maligní transformace přímo.<sup>75</sup> Dokonce i sám imunitní systém může v takových případech hrát aktivní roli při supresi parakrinní prosenescentní signalizace a rozvoji nádoru (viz odd. 3.2).<sup>100</sup>

Negativní dopad má samozřejmě i případ, kdy je poškozením jejich signálních drah zamezeno indukci senescence<sup>55</sup>, popř. dojde k přerušení senescence v jejím průběhu a k návratu do buněčného cyklu<sup>49,53</sup>. I takové situace mohou u pre-maligních buněk vést k nádorovému bujení.<sup>55</sup> Naopak, dodatečnou signalizací lze indukovat senescenci u již existujících nádorů a tím je eliminovat.<sup>58,101</sup>

## 2.6.2 Stárnutí a choroby s ním spojené

Na věku závislá akumulace senescentních buněk byla pozorována jak u hlodavčích modelů (slezina<sup>70,102</sup>, ledviny<sup>103</sup>, plíce, játra, pokožka, střevní epitel<sup>70</sup>), tak u člověka (v kůži<sup>66,104</sup>, mozku<sup>105</sup>) a dalších primátů<sup>106</sup>. Příčinou může být rezistence senescentních buněk vůči některým signálům spouštějícím apoptózu<sup>107</sup>, nefunkční imunitní dohled<sup>85,108</sup>, i hromadění poškození DNA během života<sup>109</sup>. V tělech stárnoucích jedinců se pak senescentní buňky podílí na věkem podmíněných chorobách, změně struktury tkáně, její dezintegraci<sup>66</sup>, i postupné supresi imunitního systému (viz odd. 3.2)

Senescence přispívá ke vzniku neurodegenerativních chorob. Akumulace SIPS astrocytů vykazuje klasickou závislost na věku jedince. Sekretovaný TGF- $\beta$  podporuje ukládání amyloidu a mikrovaskulární degeneraci.<sup>110</sup> Spolu se zánětlivými procesy, podporovanými sekretovaným IL-6, a neschopností senescentních astrocytů zastávat podpůrné funkce neuronům, vedou tyto děje k poškození neuronů a synaptických drah, podstatě Alzheimerovy i Parkinsonovy choroby.<sup>105,111</sup> Postupně navíc stoupá i klidová úroveň sekrece zánětlivých cytokinů SIPS astrocyty. Při poškození nervového systému tak starší jedinci nejsou schopni reagovat dalším zvyšováním sekrece<sup>112</sup>, čímž dochází k potlačení akutních zánětlivých odpovědí a schopnosti regenerace. Regeneraci a neurogenezi komplikuje i fakt, že senescenci s věkem podléhají přímo neuronální progenitorové buňky.<sup>113</sup>

Sekrece kolagenáz (MMP-8, MMP-13) senescentními chondrocyty je příčinou destrukce ECM v rámci lézí kloubní chrupavky při rozvoji osteoartrózy. U chondrocytů lze v takovém případě pozorovat na věku závislé zkracování telomer, na rozdíl od astrocytů u nich tak pravděpodobně dochází k RS.<sup>114</sup> Obdobné okolnosti stojí i za degenerací meziobratlových disků. I zde dochází k degradaci ECM pod vlivem kolagenázy MMP-13.<sup>115</sup>

U cév dochází během života ke snížení schopnosti vasodilatace<sup>116</sup> a zvýšenému výskytu senescence endotelu u hydrodynamicky více namáhaných míst<sup>117</sup>. Společně se senescencí buněk cévního hladkého svalstva a zánětlivými procesy vlivem SASP<sup>118</sup> tak senescence přispívá k rozvoji aterosklerózy a nepřímo i k ischemickým chorobám srdečním, cévním mozkovým příhodám, popř. vzniku aneurysmat<sup>119</sup>. To potvrzuje i nejnovější studie Xue a kol.<sup>120</sup>, kde se podařilo zabránit formaci aterosklerotických plaků protisenescentním účinkem etanolu. Stabilizace trombinu zvýšenou sekrecí PAI-1 senescentní buňky přispívají i k vyššímu riziku cévní trombózy.<sup>121</sup>

Překvapivé jsou závěry studie Victorelli a kol., podle kterých dochází ke stárnutí kůže vlivem senescentních melanocytů. Ty jsou nejdříve jedinými senescentními buňkami v kůži a později samy parakrině indukují senescenci ostatních kožních buněk.<sup>122</sup> Zdá se tak, že stárnutí kůže může být v počátcích způsobeno OIS.<sup>51</sup> V neposlední řadě přispívají senescentní buňky rozvoji diabetes mellitus typu 2.  $\beta$  buňky Langerhansových ostrůvků při něm podléhají senescenci v důsledku zvýšené sekreторické zátěže pankreatu.<sup>102,123</sup>

Některé studie připisují senescentním buňkám dokonce přímou zodpovědnost za stárnutí organismu jako takové. V případě jejich eliminace lze u myši předejít projevům stáří, jako jsou úbytek tukové tkáně, degenerace vnitřních orgánů<sup>124</sup> a páteře, atrofie svalů, popř. šedý zákal<sup>125</sup>. U starších

jedinců dochází dokonce ke zmírnění, či úplnému vymizení stávajících projevů (kromě šedého zákalu).<sup>125</sup> Alternativně je vliv na stárnutí studován na jedincích postižených progerií. U Wernerova syndromu lze u některých buněk pozorovat nástup RS po menším počtu buněčných cyklů<sup>126</sup>, včetně sekrece složek SASP, jako je prokolagen, fibronectin, PAI-1, IGFBP-3<sup>127</sup> a detekce SA-β-gal<sup>67</sup>. V souladu s těmito zjištěními, způsobuje absence některých složek SASP<sup>128</sup>, popř. eliminace celých senescentních buněk<sup>129</sup>, prodloužení života progeroidních jedinců.

Se stárnutím je z podstaty spjato zkracování a destabilizace telomer a RS. Buňky myši mají však telomery tak dlouhé, že během relativně krátkého života nedochází k jejich podlimitnímu zkrácení. Takový organismus pak podléhá stárnutí pod vlivem hromadění SIPS buněk.<sup>16,70,103</sup> U některých savčích tkání<sup>130</sup> (i mimo terminálně diferencované buňky), dokonce i celých organismů<sup>131</sup>, však ke zvyšujícímu se hromadění senescentních buněk nedochází. To může být způsobeno jak sníženou mírou její indukce, tak zvýšenou efektivitou eliminace senescentních buněk imunitním systémem (viz odd. 3.1).

### 2.6.3 Obnova tkání, hojení ran, udržení homeostázy

Přítomnost senescentních buněk je nezbytná v případě obnovy tkání.<sup>124</sup> Dlouhodobý vliv senescentních buněk však přispívá k chronické povaze zranění, což i v tomto případě ukazuje na důležitost jejich včasné eliminace.<sup>132</sup> Při poranění kůže se za pár dnů pouze přechodně objevují senescentní fibroblasty a endotel. Ty přispívají k rychlejšímu stažení tkáně diferenciací myofibroblastů, k eliminaci fibrózy a nekrózy i rozvoji granulozní tkáně prostřednictvím složek SASP.<sup>88</sup>

Senescentní buňky mohou dokonce reprogramovat okolní diferencované buňky v buňky kmenové, schopné náhrady široké škály buněk poškozených<sup>133,134</sup> a angiogeneze<sup>74</sup>. V případě OIS buněk známe i případ autonomní exprese kmenových markerů přímo senescentní buňkou.<sup>134</sup> Naopak, negativně samozřejmě působí senescence kmenových buněk stávajících.<sup>113,135</sup>

Nejednoznačná je funkce senescence u tkáňové fibrózy. V případě senescence myších jaterních Itóových buněk<sup>136</sup> existuje souvislost s účinnou prevencí vzniku fibrózy. Naopak, senescence hepatocytů<sup>137</sup> je jedním z jejích průvodních jevů. Obdobně u plic, brání fibróze senescence fibroblastů<sup>138</sup>, zatímco senescence progenitorových buněk a buněk podílejících se přímo na funkci plic, rozvoji fibrózy přispívá<sup>139,140</sup>. Senescence kožních<sup>141</sup> a srdečních fibroblastů, jakožto následek ischemických stavů<sup>142</sup>, má rovněž protifibrotický efekt. Zdá se tak, že v případě fibrózy určí senescence konkrétního buněčného typu, zda je důsledkem poškození funkce a struktury tkáně kompenzové rozvojem fibrózy, nebo zda senescence postihne strůjce fibrotických změn a následná sekrece MMP<sup>143</sup> v rámci SASP pomůže k eliminaci fibrózy stávající. Na rozvoj fibrózy má opět zásadní vliv i následná eliminace senescentních buněk, jak potvrzuje studie na imunosuprimovaných jedincích.<sup>144</sup>

I při obnově tkání se u některých organismů projevuje jasná závislost na věku jedince. U myši i člověka jsou svalové kmenové buňky udržovány ve stavu quiescence aktivní reprimací senescence. Při poranění vstupují zpět do cyklu a stojí za regenerací svalu. U starších jedinců dochází k derepresi p16<sup>INK4a</sup>, indukci senescence a omezení regenerační schopnosti i obnovy populace kmenových buněk.<sup>145</sup>

Podobná situace nastává u bércových vředů. Buňky podléhají ROS SIPS, běžné u otevřených poranění, ale nejsou stárnoucím imunitním systémem eliminovány. Následkem toho vzniká chronický zánět, který komplikuje hojení.<sup>132</sup> Ke zhoršení regeneračních schopností s věkem (ani při opakovaných amputacích<sup>146</sup>) nedochází u organismů, kde se senescentní buňky časem nehromadí.<sup>131,147</sup>

## 3 Senescence vs. imunitní systém

### 3.1 Eliminace senescentních buněk imunitním systémem

Senescentní buňky, a s nimi spojené zánětlivé prostředí, jsou obecně spojeny s intenzivní akumulací imunitních buněk.<sup>55</sup> Hlavním vykonavatelem imunitním systémem zprostředkované eliminace senescentních buněk jsou pak NK buňky (jaterní fibróza<sup>136</sup> a karcinom<sup>148</sup>, myelom<sup>149</sup>). Ty jsou zapojeny díky adhezním molekulám CD58<sup>136</sup>, systému LFA-1/ICAM-1<sup>31,101</sup>, a díky inhibičním/aktivačním transmembránovým lektinovým receptorům NKG2<sup>148</sup>. Ligandem pro dominantní<sup>150</sup> inhibiční NKG2A (i aktivační NKG2C) je nestandardní MHC-I molekula HLA-E. Jeho exprese je regulována cytokinem IL-6 a p38 signální dráhou.<sup>85</sup> Ligandem aktivačního NKG2D je pak lidský MICA/B (RAE-1 u myši) a ULBP2.<sup>136,151</sup> Expresi těchto ligandů zajišťuje naopak na DDR závislá dráha.<sup>152</sup> Právě rostoucí zastoupení inhibičního ligandu HLA-E je pak jednou z příčin na věku závislé snižující se schopnosti eliminace senescentních buněk.<sup>85</sup>

Zvýšená exprese zmiňovaných ligandů je vlastní i nesenescenčním nádorovým buňkám. Přidaná hodnota senescence jako takové spočívá spíše ve zvýšené atrakci NK buněk sekrecí CCL2 (MCP-1) a jejich aktivaci.<sup>148</sup> P53 tak přispívá k eliminaci senescentních buněk, aniž by zvyšoval expresi ligandů receptorů NK buněk. To může být příčinnou persistence aktivních nesenescenčních nádorů – ligandy exprimují, ale díky mutacím p53 neatrahují NK buňky.

Sama eliminace NK buňkami probíhá indukci apoptózy.<sup>85</sup> Ta je spuštěna cestou exocytózy granulí s perforinem a granzymem (více o mechanismu působení viz souhrnný článek<sup>153</sup>), nikoliv cestou receptorů smrti. Tomu odpovídá i zvýšení exprese Dcr2 u senescentních buněk, který jako kompetitivní inhibitor receptorů smrti brání aktivaci pomocí Fas a TRAIL.<sup>154</sup> Efektivita perforinem zprostředkované eliminace se s rostoucím věkem snižuje a je tak další možnou příčinnou stárnutí organismu ve vztahu k senescenci.<sup>108</sup>

Role makrofágu v eliminaci senescentních buněk není tak jednoznačná, jako je tomu u NK buněk. IFN- $\gamma$  a IL-6, sekretované p53 exprimující senescentní buňkou, a oxidovaný membránový vimentin, vedou k M1 odpovědi makrofágů a eliminaci senescentních buněk.<sup>155,156</sup> Pokud je exprese p53 potlačena, sekretují senescentní buňky IL-4, který spouští odpověď M2. Takové makrofágy naopak podporují regeneraci, angiogenezi a tím přežití jak senescentních, tak aktivních nádorových buněk.<sup>155</sup> Nezbytná účast makrofágů je popsána u organismů s rozvinutou obnovou tkáně (dánio pruhované<sup>157</sup>, mlok<sup>158</sup>). Odstranění funkčních makrofágů u nich vede k zásadním poruchám regenerace.

Senescentní buňky sekretují v rámci SASP i cytokiny, které atrahují složky adaptivního imunitního systému. Účast CD4+ Th1 lymfocytů na eliminaci je popsána například u hepatocytů. Ty jsou lymfocyty rozpoznávány přes MHCII a sama eliminace je následně zprostředkovaně provedena makrofágy.<sup>55</sup>

### 3.2 Vliv senescentních buněk na imunitní systém

Senescentní buňky způsobují imunosupresi indukci a atrakcí tzv. myeloidních supresorových buněk a regulačních T-lymfocytů. Hematopoetické kmenové buňky kostní dřeně dávají vzniku nezralým myeloidním buňkám, ze kterých za normálních okolností diferencuje spektrum buněk imunitních. Pod vlivem SASP cytokinů, jako GM-CSF<sup>61</sup> a IL-18<sup>159</sup>, je však tato diferenciace pozastavena a z monocytických a granulocytických prekurzorů diferencují CD11b+Ly6G-Ly6C+ (Ly6G+Ly6C+ nesupresorová podskupina) buňky supresorové<sup>160</sup>. Ty jsou následně u člověka i myši atrahovány do místa zánětu systémem CCL2/CCR2<sup>161</sup>, popř. CXCL8(IL-8)/CXCR2<sup>162</sup>. Jednotlivé signální ligandy jsou produkovány jak samotnými buňkami senescentními<sup>61,148</sup>, tak nádorovými<sup>161</sup> i zúčastněnými makrofágy<sup>163</sup>.

Účast myeloidních supresorových buněk na imunosupresi spočívá v ovlivnění funkce efektorových imunitních buněk. Senescentní cytokin IL-1 $\beta$ <sup>30</sup> spouští u supresorových buněk sekreci IL-6 a TNF- $\alpha$ <sup>164</sup>. IL-6 pak inhibuje vývoj Th1 odpovědi u tumor specifických pomocných CD4+ T-lymfocytů, snižuje u nich produkci IFN- $\gamma$  a brání tak následné aktivaci cytotoxických CD8+ T-lymfocytů.<sup>165</sup> TNF- $\alpha$  navíc aktivně brání v konečné diferenciaci supresorových buněk v zralé myeloidní buňky<sup>166</sup>. Dochází také ke zvýšené produkci NO (monocytové supresorové buňky<sup>167</sup>) a ROS (granulocytové supresorové buňky<sup>167</sup>), vlivem exprese iNOS<sup>168</sup>, respektive zvýšením aktivity NOX2<sup>169</sup>. NO pak nitrací tyrosinu u TCR/CD8 receptorového komplexu narušuje schopnost T-lymfocytů vázat MHC, což vede k jejich neschopnosti rozpoznat antigen.<sup>170</sup>

Dalším mechanismem suprese je sekrece aminokyseliny degradujících enzymů. Argináza 1 způsobuje lokální nedostatek L-argininu, což brání proliferaci, produkci cytokinů a dalším metabolickým pochodům T-lymfocytů.<sup>171</sup> Indolamín-pyrrol-2,3-dioxygenáza pak vede k nedostatku tryptofanu<sup>172</sup>, který může vést až k apoptóze T-lymfocytů<sup>173</sup>.

Supresorové buňky ovlivňují i nativní složky imunitního systému. IL-1 $\beta$  indukuje vznik Ly6C-podskupiny supresorových buněk, které inhibují aktivitu NK buněk represí exprese aktivačního receptoru NKG2D<sup>174</sup>. U makrofágů pak supresorové buňky snižují sekreci IL-12, což má za následek aktivaci M2 odpovědi a potlačení zánětlivé reakce.<sup>175</sup>

V poslední řadě ovlivňují supresorové buňky i přímo buňky nádorové. Svou schopností plnit funkci endotelu a sekrecí MMP-9 podporují angiogenezi v rámci nádoru<sup>176</sup>, čímž ještě umocňují negativní dopady vlastní imunosuprese na organismus.

Svou roli při imunosupresi mají i regulační T-lymfocyty. Ty jsou atrahovány systémem CCL2/CCR4<sup>161</sup> a sekrecí TGF- $\beta$  regulují vývoj myeloidních supresorových buněk.<sup>177</sup>

### 3.3 Indukce senescence imunitním systémem

Opačnou stranou vztahu senescence a imunitního systému je schopnost imunitních buněk parakrinně indukovat senescenci sekrecí cytokinů. CD4<sup>+</sup> Th1 lymfocyty mohou pomocí IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ , za účasti transkripčního faktoru STAT1, respektive receptoru TNFR1, indukovat senescenci přes p16/pRB dráhu.<sup>178</sup> Signální kaskádou JAK/STAT a TGF- $\beta$ /SMAD, indukují oba cytokiny zvýšením exprese NOX1 a NOX4. Ty zvyšují hladinu ROS, mimo jiné díky represi antioxidantního ANT2, čímž jsou schopny indukce senescence i DDR a p53 závislou drahou.<sup>32</sup>

Efekt obou cytokinů byl pozorován *in vitro/in vivo* u širokého spektra nádorů<sup>178</sup>, jedná se tak pravděpodobně o rozšířený, nikoliv však universální způsob zástavy nádorového bujení. Některé typy buněk jsou totiž k tomuto typu indukce netečné a nevykazují žádné, popř. pouze částečné a reverzibilní, znaky senescence.<sup>28</sup> Důvodem je pravděpodobně zvýšená klidová aktivita signální dráhy u takových buněk, při které nejsou schopny dosáhnout dalšího zvýšení, které by senescenci spustilo.<sup>32</sup> Vedle rozdílné reakce různých typů buněk, je znám i rozdíl mezidruhový. Myší nádorové buňky indukují senescenci při signalizaci IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  zároveň, zatímco lidským buňkám dostačuje i jen přechodný signál IFN- $\gamma$ .<sup>32</sup>

Dalším cytokinem s indukčním efektem je TGF- $\beta$ . Ten brání přímo fosforylační deaktivaci pRB, bez ovlivnění předchozích proteinů, a spouští tak senescenci.<sup>179</sup>

Prekurzory imunitních buněk působí v některých případech naopak proti indukci senescence. Infiltrované CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> supresorové myeloidní buňky (viz odd. 3.2) u senescentního PTEN tumoru prostaty brání parakrinnímu navození senescence u aktivních nádorových buněk sekrecí antagonistů IL receptorů.<sup>100</sup>

## 4 Akumulace a eliminace senescentních buněk ve vybraných orgánech

### 4.1 Játra

Játra jsou jeden z prvních orgánů, u kterých začal výzkum imunitního dohledu nad senescentními buňkami. SIPS Itóových buněk je studována v souvislosti s potlačením fibrózy, jakožto následku poškození jaterní tkáně viry, alkoholem apod. Při poškození se Itóovy buňky aktivují, sekretují složky ECM a způsobují vazivové jizvení jaterní tkáně. (pro více informací viz souhrnný článek<sup>180</sup>). Po indukci senescence vykazují Itóovy buňky SA- $\beta$ -gal aktivitu a sníženou sekreci kolagenu typu I, III i IV a fibronektinu - látek zodpovědných za fibrotizaci. Zvýšena je naopak sekrece fibrolitických metaloproteáz MMP1, 3, 10 a 12, exprese markerů p53 závislé a p16/pRB signální dráhy i exprese ligandů receptorů NK buněk (MICA, ULBP2, CD58). Mimo NK buněk, kterými jsou senescentní Itóovy buňky následně eliminovány, byla v okolí zaznamenána i akumulace makrofágů a neutrofilních granulocytů. Jejich účast na eliminaci však není v tomto případě prokázána.<sup>136</sup> V případě persistence senescentních Itóových buněk a vzniku chronického zánětu, dochází ke vzniku nezvratné jaterní

cirhózy, kterou provází senescence samotných hepatocytů. Ty jsou v důsledku intenzivní proliferace dovedeny do stavu RS, čemuž kromě senescentních markerů nasvědčují i zkrácené telomery.<sup>137</sup>

OIS u Nras exprimujících hepatocytů brání vzniku hepatocelulárního karcinomu. Senescentní hepatocyty vykazují zvýšenou hladinu p16Ink4a a p21Cip1, markerů obou hlavních signálních drah senescence. Indukce a následná eliminace senescentních buněk je v tomto případě velmi efektivní. Po 12 dnech od indukce senescence je eliminováno 94 %, po 60 dnech 100 % původních Nras exprimujících hepatocytů. V místě vyvolaného zánětu se soustřeďují jak složky nativní (neutrofilní granulocyty, monocyty, NK buňky, makrofágy a dendritické buňky), tak adaptivní imunity (CD4+ i CD8+ T-lymfocyty). Nezbytná je signalizace přes hepatocytární MHCII a navazující Th1 odpověď CD4+ T-lymfocytů, jak vyplývá z akumulace senescentních hepatocytů u jedinců s HIV, či po výkonu transplantace. Samotnou eliminaci hepatocytů nakonec provádí makrofágy a nově imigrující monocyty (nejsou využity přítomné Kupfferovy buňky). Výzkum T.W. Kanga a kol. je příkladem situace, kdy se eliminace neúčastní NK buňky, ač jsou v místě zánětu akumulovány v hojném počtu.<sup>55</sup>

K rozdílnému závěru dochází W. Xue a kol. v experimentu s reaktivací p53 u nádorových hepatocytů. Ten sice potvrzuje efektivitu eliminace senescentních hepatocytů (během 12 dnů po obnovení exprese p53 zaznamenali indukci senescence a eliminaci většiny nádorových buněk), ale za strůjce eliminace označuje, vedle makrofágů, i NK buňky.<sup>101</sup> Což dokládá záznamem zvýšené sekrece IL-15, který u NK buněk zvyšuje expresi receptorů<sup>181</sup>, a exprese adhezních a kostimulačních molekul ICAM-1 (CD54) a VCAM-1 (CD106).<sup>101</sup>

Jejich studie zároveň podhaluje mechanismus remodelace a obnovy tkáně při regresi nádoru. S časovým odstupem lze pozorovat, jak se imunitní buňky nejdříve akumulují kolem senescentního nádoru, postupně se infiltrují až prostupují celý jeho objem. Regresi nádoru provází destrukce erytrocytů, krvácení, zánět nádorových cév a reorganizace lokálního řečiště vlivem SASP. Senescentní buňky a jejich eliminace tak mají komplexní efekt na nádor a okolní tkáň a zabezpečují ustavení původní nepatologické homeostázy.<sup>101</sup>

Zajímavé závěry přináší studie C. Wang a kol.<sup>182</sup>, kde byl na myší model použit reálný způsob poškození jater u člověka - na rozdíl od Kanga a kol.<sup>55</sup> Ta propojuje karcinogenezi se senescencí a podhaluje mechanismus, jakým buňka „rozhoduje“ o indukci konkrétního z obou dějů. K indukci SIPS hepatocytů je potřeba dosáhnout jisté prahové subletální intenzity akutního stresu, zatímco chronický stres o podlimitní intenzitě vede k rozvoji hepatocelulárního karcinomu. K indukci SIPS vedlo i navození akutního stresu v buňkách, u kterých byla předtím spouštěna karcinogeneze stresem chronickým. I tomto případě se na následné eliminaci senescentních buněk podílí CD4+ Th1 lymfocyty, CD68 makrofágy a CD57 NK buňky.<sup>182</sup>

## 4.2 Kůže

Senescentní kožní fibroblasty jsou studovány především v souvislosti s regenerací. Matricelulární protein CCN1, exprimovaný v místech poranění kůže, indukuje u fibroblastů senescenci přes p53 dráhu.

Zastavení sekrece složek ECM a spuštění SASP, obsahujícího mimo jiné ECM degradující metaloproteázy MMP1 a MMP3, pak předchází fibrotizaci hojící se tkáni.<sup>141</sup> Nezávisle na kontextu a druhu senescence, exprimují kožní fibroblasty aktivační MICA/B i inhibiční HLA-E ligandy receptorů NK a CD8+ buněk. Úroveň exprese HLA-E ale roste s věkem, je indukována i parakrinně u sousedních nesenescenčních buněk sekrecí IL-6<sup>85</sup> a jeho inhibiční aktivita je nadřazena aktivitě aktivačních ligandů<sup>150</sup>. Všechny tyto skutečnosti přispívají k omezení eliminace a persistenci senescenčních fibroblastů v kůži.

V rámci kůže jsou, jakožto původci zhoubných onemocnění, předmětem intenzivního zájmu také melanocyty. Ve stavu OIS, často vyvolaném mutací v BRAF<sup>51</sup>, přetrvávají v získaných melanocytických névách po desítky let i přesto, že jsou zde obklopeny imunitními buňkami (NK buňky, CD8+ T buňky). Tato koexistence je umožněna právě, již zmíněnou, zvýšenou expresí inhibičního ligandu HLA-E.<sup>85</sup> Opačným způsobem, tedy pro eliminaci, působí schopnost některých senescenčních melanocytů aktivovat složky adaptivního imunitního systému. Melanocyty v OIS, které nejsou součástí név, zvyšují autokrinně pomocí IL-1 $\beta$  expresi MHCII a migrují do lymfatických uzlin svádějících lymfu z oblasti kůže. Zde, podobně jako profesionální antigen prezentující buňky, aktivují CD4+ T-lymfocyty a jsou eliminovány. Exprese MHCII u volných OIS melanocytů je v rámci kůže unikátním jevem – OIS melanocyty v névách, RS melanocyty ani jiné kožní buňky, jako keratinocyty a fibroblasty, tuto schopnost nemají.<sup>183</sup> Osud senescenčních melanocytů v těle tak není jednoznačný, záleží přinejmenším na jejich lokalizaci.

### 4.3 Děloha

Senescenční buňky jsou nezbytné i pro správnou funkci dělohy v průběhu reprodukčního věku. Po proběhlé ovulaci dochází u člověka k zastavení cyklu u endometriálních stromálních fibroblastů pod vlivem transkripčního faktoru FOXO1 a jejich diferenciaci v buňky deciduální. U části těchto buněk pak FOXO1 autokrinně i parakrinně indukuje senescenci přes IL-8 a CXCR2 interakci<sup>46</sup>, za exprese hlavních senescenčních markerů (SA- $\beta$ gal, p21<sup>Cip1</sup>)<sup>184</sup>. Následnou eliminaci mají na starost CD56+bright děložní NK buňky. Ty jsou atrahovány sekrecí IL-15 nesenescenčními deciduálními buňkami a následně eliminují senescenční populaci přes NKG2D signalizační cestou exocytózy. Indukovaná senescence a následná eliminace tak pomáhá fyziologickým změnám dělohy v průběhu menstruačního cyklu a v případě oplodnění připravuje vhodné prostředí pro uhníždění embrya. Eliminace senescenčních buněk na povrchu dělohy totiž pravděpodobně ulehčuje prorůstání trofoblastu stěnou dělohy.<sup>185</sup>

Při uhníždění embrya vzniká v rámci placenty syncytiotrofoblast. Jde o syncytium zajišťující kontakt a výživu přes endometrium, jehož vznik je indukován expresí fúzogenních proteinů – syncytinů. Vzhledem k mnohoadernosti syncytia je u něj klasické dělení v podstatě nemožné a indukce senescence je tak nezbytným krokem v jeho vývoji. Na poporodním vzorku placenty byla pozorována jak exprese fúzogenního ERVWE1 (endogenní retrovirus obsahující gen pro syncytin), tak zvýšené hladiny markerů

na DDR závislé senescence. U *in vitro* modelu fibroblastů byla po expresi fúzogenu navíc zaznamenána sekrece složek SASP, včetně NK buňky atrahujících interleukinů a MICA a ULBP2, ligandů aktivačních receptorů NK buněk.<sup>92</sup>

V případě atrakce NK buněk trofoblastem však není cílem jejich vlastní eliminace. Embryonální trofoblast sekretuje HLA-G (nestandartní MHC), který přes receptor CD158d indukuje senescenci u invadujících NK buněk. Ta je signalizována DNA-PK, součástí DDR odpovědi a vykazuje obecné senescentní markery, včetně změny morfologie a odolnosti vůči apoptóze. Následný SASP pak ovlivňuje průběh těhotenství zvýšenou propustností okolních cév i tvorbou cév nových.<sup>186</sup>

S postupem těhotenství podléhají senescenci i zárodečné obaly plodu (amnion, chorion). U myšího modelu bylo zaznamenáno zkracování telomer a zvyšující se výskyt senescentních markerů přímo úměrně délce probíhajícího těhotenství. Oslabení a porušení zárodečných obalů, které je důsledkem přítomnosti senescentních buněk, je jedním z iniciátorů porodu. V tomto případě není následná eliminace senescentních buněk potřebná, neboť fyziologickou funkci plní samotný akt senescence a s ním spojená změna struktury tkáně.<sup>184</sup>

#### 4.4 Mozek

Astrocyty jsou nejpočetnějším typem buněk centrální nervové soustavy. Díky vyšší citlivosti na hyperoxie prodělávají astrocyty většinou ROS indukovanou SIPS senescenci při zvýšení p53, p21<sup>Cip1</sup> i p16<sup>INK4a</sup>.<sup>187</sup> RS naopak typicky podléhají mikroglie.<sup>188</sup>

Centrální nervový systém a jeho hematoencefalická bariéra značně omezují možnosti eliminace senescentních buněk. Studie Barry E. Flanaryho a Wolfganga J. Streita odhaluje mechanismus, jakým je v mozku aktivně udržována proliferační schopnost. U astrocytů i mikroglíí dochází k cyklickému, respektive indukovanému zvýšení aktivity telomerázy. To efektivně napomáhá prodloužení proliferační fáze v životě obou typů buněk a k omezení degenerativních změn mozku.<sup>188</sup> V opačném případě, při selhání zmíněných mechanismů a indukcii na telomerách nezávislé SIPS, dochází mimo jiné k rozvoji neurodegenerativních chorob (viz odd. 2.6.2).

#### 4.5 Prostata

V rámci prostaty je senescence studována především v souvislosti s nádory. Androgen deprivace terapie vede k indukcii senescence u nádorových buněk prostaty, které potřebují androgeny pro svou proliferaci. Senescentní nádorové buňky pak nadále v prostatě perzistují, k jejich eliminaci tak zřejmě nedochází.<sup>189</sup> U senescentních PTEN nádorů prostaty u myší dochází navíc k infiltraci supresorových myeloidních CD11b+Gr-1+ buněk, což vede k inhibici indukce senescence u ostatních nádorových buněk (viz odd. 3.2.).<sup>100</sup> Androgen deprivace terapie je málo efektivní u více rozvinutého nádoru.<sup>190</sup> Ten, spolu se SASP senescentní subpopulace nádorových buněk, pravděpodobně vytváří mikroprostředí, které podporuje růst nádoru i v nepřítomnosti androgenů. Sekretovaný IL-1 $\alpha$  může navíc stát za rozvojem dalších patologií, jako je benigní hyperplazie prostaty.<sup>191</sup>

## 4.6 Slezina

Aktuální studie L. Palacia a kol. popisuje indukci senescentních markerů v buňkách sleziny po vystavení subletální dávce ionizujícího záření u myši. Místní CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty vykazují snížený proliferační potenciál, který je pravděpodobně důsledkem parakrinní signalizace senescentních buněk sleziny, nikoliv ozářením samotným. Markery senescence jsou patrné i u makrofágů, exprimují p16<sup>INK4a</sup>, indukují SASP, naopak snižují expresi jaderného laminu B1. Standardní fenotyp obou imunitních buněk lze obnovit represí exprese p16<sup>INK4a</sup>. I tak je ovšem nutná přítomnost ostatních buněk sleziny, samotné imunitní buňky k obnově proliferace nedospějí.<sup>192</sup> Jedná se pravděpodobně o podobný efekt jako v případě *bystander* senescence (viz odd.2.2), kdy senescentní buňky parakrinně ovlivňují proliferaci buněk okolních. V lékařské praxi by tak bylo možné obnovit funkci T-lymfocytů v případě ozáření eliminací senescentních buněk sleziny.

Mechanismus snížené proliferace T-lymfocytů není v tomto případě s jistotou znám. Jednou z možností je zaznamenaná snížená exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86.<sup>192</sup>

## 5 Imunoterapeutická eliminace senescentních buněk

Zásadním problémem účinnosti imunoterapie proti senescentním buňkám, stejně jako v jiných případech, je identifikace vhodných specifických cílových antigenů. Takovým antigenem by mohla být povrchová dipeptidylpeptidáza 4 (CD26). Kyoung Mi Kim a kol. ve svém experimentu uvádí, že je exprimována u RS fibroblastů, nikoliv však u proliferujících. Metodou ADCC (*Obrázek 3*) s vhodnou anti-DPP4 protilátkou navíc provedli selektivní eliminaci senescentních buněk *in vitro*.<sup>193</sup>

Další povědomí o vhodných cílových antigenech vychází většinou z experimentů s nádorovými buňkami, které sdílí některé cílové molekuly s buňkami senescentními. Jedním z takových případů jsou MICA a ULBP, ligandy NKG2D aktivačního receptoru NK buněk.<sup>136,151</sup>

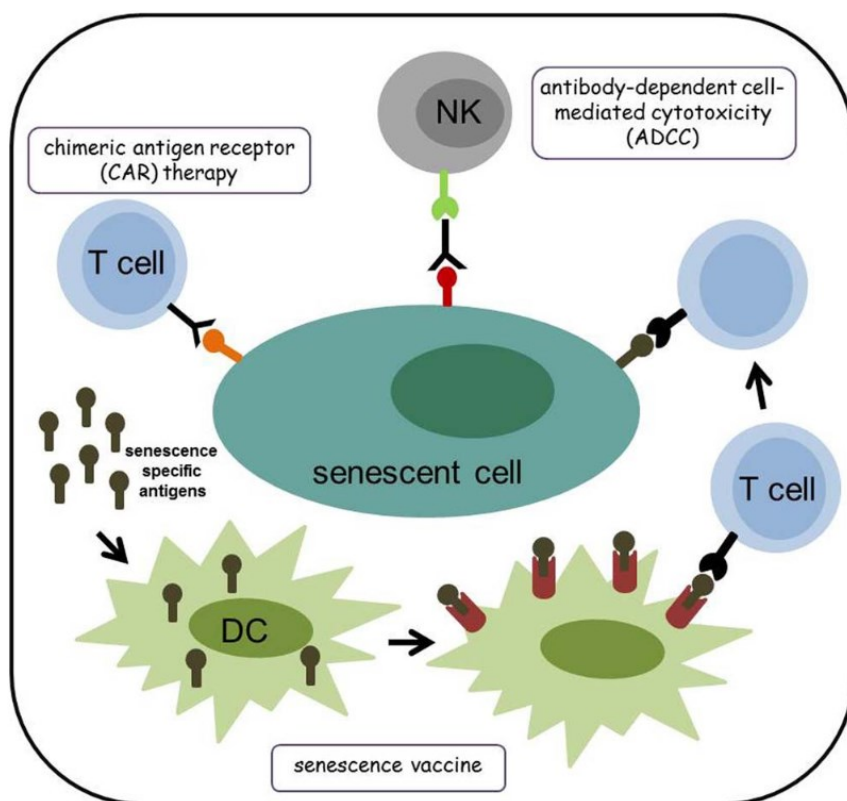
Využití neutralizačních schopností protilátek se nabízí například u ligandů receptoru NKG2A.<sup>194</sup> Zabránění aktivace tohoto dominantního<sup>150</sup> inhibičního receptoru může vést k intenzivnější degranulaci NK buněk<sup>85</sup> a tím efektivnější eliminaci buněk senescentních.<sup>154</sup>

Anam Qudrat a kol. naopak zkoumají využití adaptivní složky imunitní odpovědi. Pomocí T-lymfocytů s chimerním receptorem (*Obrázek 3*) pro IL-6, součást SASP, dokázali také úspěšně cílit na senescentní buňky.<sup>195</sup>

Efektivním doplňkem k imunoterapeutické eliminaci samotných senescentních buněk, může být eliminace následků jejich působení. Pomocí  $\beta$ -glukanu lze indukovat diferenciaci monocytických myeloidních supresorových buněk ve zralé monocyty a obnovit tak imunitní dohled.<sup>196</sup>

Alternativním přístupem by mohla být indukce změny zastoupení složek SASP. Některé složky SASP mají negativní efekt na imunitní systém, a brání tak přirozené eliminaci senescentních buněk. Reprogramování SASP z imunosupresivního na imunostimulační (např. redukcí: CXCL2, GM-CSF,

IL-10 a podporou: CCL2, CXCL10) by vedlo k posílení přirozených eliminačních schopností imunitního systému.<sup>197</sup>



Obrázek 3: Imunoterapeutické metody použitelné při eliminaci senescentních buněk; převzato<sup>198</sup>

(senescence specific antigens – antigeny specifické pro senescentní buňky; senescence vaccine – vakcína proti senescentním buňkám; senescent cell – senescentní buňka; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) – protilátkou zprostředkovaná buněčná cytotoxicita; chimeric antigen receptor (CAR) therapy – terapie pomocí chimerního antigenního receptoru; DC – dendritické buňky; T cell – T-lymfocyty; NK – NK buňky)

## 6 Závěr

Organismy s rozvinutou obnovou tkání jsou vystaveny riziku vzniku nádorového bujení. V evoluci se vyvinuly dva hlavní mechanismy, jak tomu předejít – senescence a apoptóza. Senescence je typ terminální diferenciaci, při které buňka dále přežívá, přichází o schopnost proliferace, prodělává morfologické změny a zachovává si specificky pozměněnou metabolickou aktivitu. Zastavením proliferace se sice předejde množení buněk s poškozeným, potencionálně nebezpečným, genomem, na rozdíl od apoptózy se však zachová signalizační a částečně i strukturální potenciál buněk. Senescence je indukována dvěma hlavními signálními drahami – na DDR závislá dráha proteinů p53/p21 a na DDR nezávislá dráha p16/pRB. Každá s nich samostatně, popř. zároveň, je spuštěna při odpovídajícím podnětu. Jedním z projevů senescence je SASP. Tento soubor sekretovaných cytokinů, růstových

faktorů a enzymů autokrinně i parakrinně ovlivňuje cílové buňky a tkáně a je strůjcem pozitivního i negativního vlivu senescentních buněk.

Senescentní buňky jsou běžnou součástí těl organismů. Jejich zastoupení a úloha v jednotlivých tkáních se liší. V zásadě však platí, že v krátkodobém časovém horizontu, jsou pro organismus prospěšné. Plní nezbytnou funkci v při hojení ran a jsou prostředníkem v boji s nádory.

Senescentní buňka je dobrý sluha, ale zlý pán. Problém nastává při jejich dlouhodobém vlivu, kdy sekretované látky podporují rozvoj chronického zánětu, s věkem spojených chorob a paradoxně i karcinogenezi. Zvyšování počtu senescentních buněk v těle je dokonce spojováno se stárnutím organismu jako takovým. Samy senescentní buňky dokážou prostřednictvím SASP aktivně šířit senescenci díky tzv. *bystander* efektu, a dokonce inhibovat imunitní systém diferenciací tzv. myeloidních supresorových buněk.

Optimální persistenci senescentních buněk v organismu má na starosti imunitní dohled. Buňky imunitního systému schopnost senescentní buňky rozpoznat a eliminovat, popř. mohou senescenci samy indukovat. Studium senescentních buněk otevírá okno poznání v některých zásadních oblastech zdraví a může pomoci zavést revoluční léčebné metody u široké škály onemocnění, jako je Alzheimerova a Parkinsonova choroba, fibróza a cirhóza jater, kloubní a kostní degenerativní změny a rakovina. V neposlední řadě má eliminace senescentních buněk potencionální vliv na prodloužení délky života organismu.

Synchronizace indukce senescence a následná eliminace senescentních buněk v konkrétních tkáních, hraje jednu z klíčových rolí v životě organismu. Nově vyvíjené imunoterapeutické metody se mohou stát moderním způsobem, jak senescentní buňky eliminovat cíleně, efektivně a včas. Ač jsou zdroje informací na toto téma zatím často pouze na teoretické úrovni, již nyní se jeví jako potencionálně efektivní způsob eliminace senescentních buněk a určitě si zaslouží být středem zájmu budoucích výzkumů.

Stejně jako medikamentózní léčba, se ani imunoterapeutické metody pravděpodobně neobejdou bez rizik v případě nesprávného dávkování a indikace. Senescentní buňky se účastní nejen patologických, ale i fyziologických procesů a nevhodná eliminace by tak mohla vést k poruchám homeostázy a regenerace. S rostoucím věkem senescentní buňky navíc tvoří vyšší procento tělesné hmoty. V extrémním případě by tak příliš intenzivní eliminace mohla vést až k dezintegraci tkáně a smrti.

## 7 Literatura

1. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621 (1961).
2. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **37**, 614–636 (1965).
3. von Zglinicki, T., Saretzki, G., Döcke, W. & Lotze, C. Mild Hyperoxia Shortens Telomeres and Inhibits Proliferation of Fibroblasts: A Model for Senescence? *Exp. Cell Res.* **220**, 186–193 (1995).
4. Itahana, K. *et al.* A role for p53 in maintaining and establishing the quiescence growth arrest in human cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 18206–18214 (2002).
5. Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458–460 (1990).
6. Olovnikov, A. M. 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**, 181–190 (1973).
7. Wright, W. E. & Shay, J. W. Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends Genet.* **8**, 193–197 (1992).
8. Chiu, C. P. & Harley, C. B. Replicative senescence and cell immortality: The role of telomeres and telomerase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **214**, 99–106 (1997).
9. Stewart, S. A. *et al.* Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nat. Genet.* **33**, 492–496 (2003).
10. Masutomi, K. *et al.* Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* **114**, 241–253 (2003).
11. Karlseder, J., Smogorzewska, A. & De Lange, T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science (80-. )*. **295**, 2446–2449 (2002).
12. Smogorzewska, A. & De Lange, T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J.* **21**, 4338–4348 (2002).
13. Beliveau, A. *et al.* p53-Dependent integration of telomere and growth factor deprivation signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4431–4436 (2007).
14. Beauséjour, C. M. *et al.* Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* **22**, 4212–4222 (2003).
15. von Zglinicki, T., Pilger, R. & Sitte, N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 64–74 (2000).
16. Parrinello, S. *et al.* Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **5**, 741–747 (2003).
17. Di Micco, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638–642 (2006).
18. Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschênes-Simard, X. & Ferbeyre, G. Mitochondrial Dysfunction Contributes to Oncogene-Induced Senescence †. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4495–4507 (2009).
19. Wei, S., Wei, W. & Sedivy, J. M. Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. *Cancer Res.* **59**, 1539–1543 (1999).
20. Dimri, G. P., Itahana, K., Acosta, M. & Campisi, J. Regulation of a Senescence Checkpoint Response by the E2F1 Transcription Factor and p14ARF Tumor Suppressor. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 273–285 (2000).
21. Lin, A. W. *et al.* Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* **12**, 3008–3019 (1998).
22. Zhu, J., Woods, D., McMahon, M. & Bishop, J. M. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* **12**, 2997–3007 (1998).
23. Young, J. I. & Smith, J. R. DNA Methyltransferase Inhibition in Normal Human Fibroblasts Induces a p21-dependent Cell Cycle Withdrawal. *J. Biol. Chem.* **276**, 19610–19616 (2001).

24. Ogryzko, V. V, Hirai, T. H., Russanova, V. R., Barbie, D. A. & Howard, B. H. Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5210–5218 (1996).
25. Rai, P. *et al.* Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 169–174 (2009).
26. Brugarolas, J. *et al.* Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after  $\gamma$ -irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1002–1007 (1999).
27. Le, O. N. L. *et al.* Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status. *Aging Cell* **9**, 398–409 (2010).
28. Sapega, O. *et al.* Distinct phenotypes and ‘bystander’ effects of senescent tumour cells induced by docetaxel or immunomodulatory cytokines. *Int. J. Oncol.* **53**, 1997–2009 (2018).
29. Hubackova, S., Krejcikova, K., Bartek, J. & Hodny, Z. IL1-and TGF $\beta$ -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**, 932–951 (2012).
30. Kuilman, T. *et al.* Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* **133**, 1019–1031 (2008).
31. Chien, Y. *et al.* Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- $\kappa$ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.* **25**, 2125–2136 (2011).
32. Hubackova, S. *et al.* IFN $\gamma$  induces oxidative stress, DNA damage and tumor cell senescence via TGF $\beta$ /SMAD signaling-dependent induction of Nox4 and suppression of ANT2. *Oncogene* **35**, 1236–1249 (2016).
33. Chang, B. D. *et al.* A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res.* **59**, 3761–3767 (1999).
34. Liang, Y. C., Lin-Shiau, S. Y., Chen, C. F. & Lin, J. K. Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of human breast carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J. Cell. Biochem.* **75**, 1–12 (1999).
35. Schmitt, C. A. *et al.* A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* **109**, 335–346 (2002).
36. Lee, A. C. *et al.* Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **274**, 7936–7940 (1999).
37. Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. & Chen, D. J. ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. *J. Biol. Chem.* **276**, 42462–42467 (2001).
38. Rodier, F. *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* **11**, 973–979 (2009).
39. D’Adda Di Fagagna, F. *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194–198 (2003).
40. Tao, W. & Levine, A. J. P19ARF stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6937–6941 (1999).
41. Xiong, Y. *et al.* p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701–704 (1993).
42. DeGregori, J., Kowalik, T. & Nevins, J. R. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4215–4224 (1995).
43. Ohtani, N. *et al.* Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* **409**, 1067–1070 (2001).
44. Jacobs, J. L., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R. A. & Van Lohuizen, M. The oncogene and Polycombgroup gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* **397**, 164–168 (1999).
45. Alcorta, D. A. *et al.* Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13742–13747 (1996).
46. Acosta, J. C. *et al.* Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell* **133**, 1006–1018 (2008).

47. Archer, S. Y., Meng, S., Shei, A. & Hodin, R. A. p21WAF1 is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6791–6796 (1998).
48. Mallette, F. A., Gaumont-Leclerc, M. F. & Ferbeyre, G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev.* **21**, 43–48 (2007).
49. Dirac, A. M. G. & Bernards, R. Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *J. Biol. Chem.* **278**, 11731–11734 (2003).
50. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell* **88**, 593–602 (1997).
51. Michaloglou, C. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720–724 (2005).
52. Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P. C., Chen, D. J. & Sedivy, J. M. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Mol. Cell* **14**, 501–513 (2004).
53. Sage, J., Miller, A. L., Pérez-Mancera, P. A., Wysocki, J. M. & Jacks, T. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* **424**, 223–228 (2003).
54. Gire, V. & Wynford-Thomas, D. Reinitiation of DNA Synthesis and Cell Division in Senescent Human Fibroblasts by Microinjection of Anti-p53 Antibodies. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1611–1621 (1998).
55. Kang, T. W. *et al.* Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**, 547–551 (2011).
56. Iwasa, H., Han, J. & Ishikawa, F. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes to Cells* **8**, 131–144 (2003).
57. Chen, Q. M. *et al.* Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J. Cell Sci.* **113**, 4087–4097 (2000).
58. Xu, H. J. *et al.* Reexpression of the retinoblastoma protein in tumor cells induces senescence and telomerase inhibition. *Oncogene* **15**, 2589–2596 (1997).
59. Greenberg, S. B., Grove, G. L. & Cristofalo, V. J. Cell size in aging monolayer cultures. *In Vitro* **13**, 297–300 (1977).
60. Wang, E. & Gundersen, D. Increased organization of cytoskeleton accompanying the aging of human fibroblasts in vitro. *Exp. Cell Res.* **154**, 191–202 (1984).
61. Coppé, J. P. *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* **6**, (2008).
62. Matsumura, T. Multinucleation and polyploidization of aging human cells in culture. *Adv. Exp. Med. Biol.* **129**, 31–38 (1980).
63. Mitsui, Y. & Schneider, E. L. Increased nuclear sizes in senescent human diploid fibroblast cultures. *Exp. Cell Res.* **100**, 147–152 (1976).
64. Druelle, C. *et al.* *ATF6a regulates morphological changes associated with senescence in human fibroblasts.* **7**,
65. Cho, J.-H., Saini, D. K., Ajith Karunarathne, W. K., Kalyanaraman, V. & Gautam, N. Alteration of Golgi Structure in Senescent Cells and its Regulation by a G protein  $\gamma$  subunit. (2010). doi:10.1016/j.cellsig.2011.01.001
66. Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9363–9367 (1995).
67. Lee, B. Y. *et al.* Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187–195 (2006).
68. Bertolo, A., Baur, M., Guerrero, J., Pötzel, T. & Stoyanov, J. Autofluorescence is a Reliable in vitro Marker of Cellular Senescence in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Sci. Rep.* **9**, 2074 (2019).
69. Georgakopoulou, E. A. *et al.* Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging (Albany, NY)*. **5**, 37–50 (2013).

70. Wang, C. *et al.* DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* **8**, 311–323 (2009).
71. Krishnamurthy, J. *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* **114**, 1299–1307 (2004).
72. Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M. & Campisi, J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol. Biol. Cell* **23**, 2066–2075 (2012).
73. Severino, V. *et al.* Insulin-like growth factor binding proteins 4 and 7 released by senescent cells promote premature senescence in mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis.* **4**, (2013).
74. Coppe, J. P., Kauser, K., Campisi, J. & Beauséjour, C. M. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem.* **281**, 29568–29574 (2006).
75. Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y. & Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12072–12077 (2001).
76. Parrinello, S., Coppe, J. P., Krtolica, A. & Campisi, J. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: Senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci.* **118**, 485–496 (2005).
77. Bavik, C. *et al.* The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res.* **66**, 794–802 (2006).
78. Özcan, S. *et al.* Myeloma cells can corrupt senescent mesenchymal stromal cells and impair their anti-tumor activity. *Oncotarget* **6**, 39482–39492 (2015).
79. Vjetrovic, J., Shankaranarayanan, P., Mendoza-Parra, M. A. & Gronemeyer, H. Senescence-secreted factors activate Myc and sensitize pretransformed cells to TRAIL-induced apoptosis. *Aging Cell* **13**, 487–496 (2014).
80. Coppé, J. P. *et al.* Tumor suppressor and aging biomarker p16 INK4a induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J. Biol. Chem.* **286**, 36396–36403 (2011).
81. Freund, A., Patil, C. K. & Campisi, J. P38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* **30**, 1536–1548 (2011).
82. Bhaumik, D. *et al.* MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging (Albany, NY)*. **1**, 402–411 (2009).
83. Glück, S. *et al.* Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat. Cell Biol.* **19**, 1061–1070 (2017).
84. Zeng, G., McCue, H. M., Mastrangelo, L. & Millis, A. J. T. Endogenous TGF- $\beta$  activity is modified during cellular aging: Effects on metalloproteinase and TIMP-1 expression. *Exp. Cell Res.* **228**, 271–276 (1996).
85. Pereira, B. I. *et al.* Senescent cells evade immune clearance via HLA-E-mediated NK and CD8+ T cell inhibition. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
86. Elzi, D. J. *et al.* Plasminogen activator inhibitor 1 - Insulin-like growth factor binding protein 3 cascade regulates stress-induced senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 12052–12057 (2012).
87. Kim, K. S. *et al.* Regulation of replicative senescence by insulin-like growth factor-binding protein 3 in human umbilical vein endothelial cells. *Aging Cell* **6**, 535–545 (2007).
88. Demaria, M. *et al.* An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell* **31**, 722–733 (2014).
89. Kortlever, R. M., Higgins, P. J. & Bernards, R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat. Cell Biol.* **8**, 878–884 (2006).
90. Liu, D. & Hornsby, P. J. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res.* **67**, 3117–3126 (2007).
91. Tyner, S. D. *et al.* P53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* **415**, 45–53 (2002).
92. Chuprin, A. *et al.* Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. *Genes Dev.* **27**, 2356–2366 (2013).

93. Moiseeva, O., Mallette, F. A., Mukhopadhyay, U. K., Moores, A. & Ferbeyre, G. DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged  $\beta$ -interferon stimulation. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1583–1592 (2006).
94. Ludlow, J. W. *et al.* SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* **56**, 57–65 (1989).
95. Lechner, M. S. *et al.* Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J.* **11**, 3045–3052 (1992).
96. Liu, X., Clements, A., Zhao, K. & Marmorstein, R. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J. Biol. Chem.* **281**, 578–586 (2006).
97. Oishi, N. *et al.* Hepatitis B virus X protein overcomes oncogenic RAS-induced senescence in human immortalized cells. *Cancer Sci.* **98**, 1540–1548 (2007).
98. Patton, E. E. *et al.* BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr. Biol.* **15**, 249–254 (2005).
99. Braig, M. *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**, 660–665 (2005).
100. Di Mitri, D. *et al.* Tumour-infiltrating Gr-1 + myeloid cells antagonize senescence in cancer. *Nature* **515**, 134–137 (2014).
101. Xue, W. *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656–660 (2007).
102. Krishnamurthy, J. *et al.* p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* **443**, 453–457 (2006).
103. Melk, A. *et al.* Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney Int.* **63**, 2134–2143 (2003).
104. Waaijer, M. E. C. *et al.* The number of p16INK4a positive cells in human skin reflects biological age. *Aging Cell* **11**, 722–725 (2012).
105. Bhat, R. *et al.* Astrocyte Senescence as a Component of Alzheimer’s Disease. *PLoS One* **7**, (2012).
106. Herbig, U. Cellular Senescence in Aging Primates. *Science (80- )*. **311**, 1257–1257 (2006).
107. Wang, E. Senescent Human Fibroblasts Resist Programmed Cell Death, and Failure to Suppress bell Is Involved. *Cancer Res.* **55**, 2284–2292 (1995).
108. Hazeldine, J., Hampson, P. & Lord, J. M. Reduced release and binding of perforin at the immunological synapse underlies the age-related decline in natural killer cell cytotoxicity. *Aging Cell* **11**, 751–759 (2012).
109. Sedelnikova, O. A. *et al.* Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* **6**, 168–170 (2004).
110. Wyss-Coray, T., Lin, C., Sanan, D. A., Mucke, L. & Masliah, E. Chronic overproduction of transforming growth factor- $\beta$ 1 by astrocytes promotes Alzheimer’s disease-like microvascular degeneration in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* **156**, 139–150 (2000).
111. Mirza, B., Hadberg, H., Thomsen, P. & Moos, T. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson’s disease. *Neuroscience* **95**, 425–432 (1999).
112. Campuzano, O., Castillo-Ruiz, M. M., Acarin, L., Castellano, B. & Gonzalez, B. Increased levels of proinflammatory cytokines in the aged rat brain attenuate injury-induced cytokine response after excitotoxic damage. *J. Neurosci. Res.* **87**, 2484–2497 (2009).
113. Molofsky, A. V. *et al.* Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* **443**, 448–452 (2006).
114. Price, J. S. *et al.* The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* **1**, 57–65 (2002).
115. Le Maitre, C. L., Freemont, A. J. & Hoyland, J. A. Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: A possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res. Ther.* **9**, (2007).
116. Gerhard, M., Roddy, M. A., Creager, S. J. & Creager, M. A. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension* **27**, 849–853 (1996).

117. Minamino, T. *et al.* Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: Role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* **105**, 1541–1544 (2002).
118. Matthews, C. *et al.* Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: Effects of telomerase and oxidative stress. *Circ. Res.* **99**, 156–164 (2006).
119. Liao, S., Curci, J. A., Kelley, B. J., Sicard, G. A. & Thompson, R. W. Accelerated replicative senescence of medial smooth muscle cells derived from abdominal aortic aneurysms compared to the adjacent inferior mesenteric artery. *J. Surg. Res.* **92**, 85–95 (2000).
120. Xue, L. *et al.* Appropriate dose of ethanol exerts anti-senescence and anti-atherosclerosis protective effects by activating ALDH2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **512**, 319–325 (2019).
121. Eren, M., Painter, C. A., Atkinson, J. B., Declerck, P. J. & Vaughan, D. E. Age-dependent spontaneous coronary arterial thrombosis in transgenic mice that express a stable form of human plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation* **106**, 491–496 (2002).
122. Victorelli, S. *et al.* Senescent human melanocytes drive skin ageing via paracrine telomere dysfunction. *EMBO J.* (2019). doi:10.15252/embj.2019101982
123. Sone, H. & Kagawa, Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* **48**, 58–67 (2005).
124. Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184–189 (2016).
125. Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232–236 (2011).
126. Ibrahim, B. *et al.* Absence of premature senescence in Werner’s syndrome keratinocytes. *Exp. Gerontol.* **83**, 139–147 (2016).
127. Murano, S. *et al.* Diverse gene sequences are overexpressed in werner syndrome fibroblasts undergoing premature replicative senescence. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3905–3914 (1991).
128. Eren, M. *et al.* PAI-1-regulated extracellular proteolysis governs senescence and survival in Klotho mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 7090–7095 (2014).
129. Ovadya, Y. *et al.* Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
130. Going, J. J., Stuart, R. C., Downie, M., Fletcher-Monaghan, A. J. & Nicol Keith, W. ‘Senescence-associated’  $\beta$ -galactosidase activity in the upper gastrointestinal tract. *J. Pathol.* **196**, 394–400 (2002).
131. Itou, J., Kawakami, H., Burgoyne, T. & Kawakami, Y. Life-long preservation of the regenerative capacity in the fin and heart in zebrafish. *Biol. Open* **1**, 739–746 (2012).
132. Wall, I. B. *et al.* Fibroblast dysfunction is a key factor in the non-healing of chronic venous leg ulcers. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 2526–2540 (2008).
133. Mosteiro, L. *et al.* Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science (80- )*. **354**, (2016).
134. Ritschka, B. *et al.* The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev.* **31**, 172–183 (2017).
135. Janzen, V. *et al.* Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 INK4a. *Nature* **443**, 421–426 (2006).
136. Krizhanovsky, V. *et al.* Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* **134**, 657–67 (2008).
137. Wiemann, S. U. *et al.* Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J.* **16**, 935–942 (2002).
138. Cui, H. *et al.* MIR-34a inhibits lung fibrosis by inducing lung fibroblast senescence. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **56**, 168–178 (2017).
139. Liu, T. *et al.* Telomerase reverse transcriptase ameliorates lung fibrosis by protecting alveolar epithelial cells against senescence. *J. Biol. Chem.* **294**, 8861–8871 (2019).
140. Minagawa, S. *et al.* Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF- $\beta$ -induced senescence of human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **300**, (2011).
141. Jun, J. Il & Lau, L. F. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat. Cell Biol.* **12**, 676–685 (2010).

142. Zhu, F. *et al.* Senescent cardiac fibroblast is critical for cardiac fibrosis after myocardial infarction. *PLoS One* **8**, e74535 (2013).
143. Pitiyage, G. N. *et al.* Senescent mesenchymal cells accumulate in human fibrosis by a telomere-independent mechanism and ameliorate fibrosis through matrix metalloproteinases. *J. Pathol.* **223**, 604–617 (2011).
144. Berenguer, M. *et al.* HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: Increase in recent years. *J. Hepatol.* **32**, 673–684 (2000).
145. Sousa-Victor, P. *et al.* Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* **506**, 316–321 (2014).
146. Azevedo, A. S., Grotek, B., Jacinto, A., Weidinger, G. & Saúde, L. The Regenerative Capacity of the Zebrafish Caudal Fin Is Not Affected by Repeated Amputations. *PLoS One* **6**, e22820 (2011).
147. Eguchi, G. *et al.* Regenerative capacity in newts is not altered by repeated regeneration and ageing. *Nat. Commun.* **2**, (2011).
148. Iannello, A., Thompson, T. W., Ardolino, M., Lowe, S. W. & Raulet, D. H. p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *J. Exp. Med.* **210**, 2057–2069 (2013).
149. Soriani, A. *et al.* 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**, 3503–3511 (2009).
150. Béziat, V. *et al.* Human NKG2A overrides NKG2C effector functions to prevent autoreactivity of NK cells. *Blood* **117**, 4394–4396 (2011).
151. Sagiv, A. *et al.* NKG2D ligands mediate immunosurveillance of senescent cells. *Aging (Albany, NY)*. **8**, 328–344 (2016).
152. Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E. J. & Raulet, D. H. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* **436**, 1186–1190 (2005).
153. (review) Chowdhury, D. & Lieberman, J. Death by a Thousand Cuts: Granzyme Pathways of Programmed Cell Death. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 389–420 (2008).
154. Sagiv, A. *et al.* Granule exocytosis mediates immune surveillance of senescent cells. *Oncogene* **32**, 1971–1977 (2013).
155. Lujambio, A. *et al.* Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell* **153**, 449–460 (2013).
156. Frescas, D. *et al.* Senescent cells expose and secrete an oxidized form of membrane-bound vimentin as revealed by a natural polyreactive antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E1668–E1677 (2017).
157. Petrie, T. A., Strand, N. S., Tsung-Yang, C., Rabinowitz, J. S. & Moon, R. T. Macrophages modulate adult zebrafish tail fin regeneration. *Dev.* **141**, 2581–2591 (2014).
158. Yun, M. H., Davaapil, H. & Brockes, J. P. Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. *Elife* **4**, (2015).
159. Lim, H. X., Hong, H.-J., Cho, D. & Kim, T. S. IL-18 Enhances Immunosuppressive Responses by Promoting Differentiation into Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J. Immunol.* **193**, 5453–5460 (2014).
160. Morales, J. K., Kmiecik, M., Knutson, K. L., Bear, H. D. & Manjili, M. H. GM-CSF is one of the main breast tumor-derived soluble factors involved in the differentiation of CD11b-Gr1-bone marrow progenitor cells into myeloid-derived suppressor cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **123**, 39–49 (2010).
161. Huang, B. *et al.* CCL2/CCR2 pathway mediates recruitment of myeloid suppressor cells to cancers. *Cancer Lett.* **252**, 86–92 (2007).
162. Alfaro, C. *et al.* Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts human myeloid-derived suppressor cells and elicits extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *Clin. Cancer Res.* **22**, 3924–3936 (2016).
163. Chang, A. L. *et al.* CCL2 produced by the glioma microenvironment is essential for the recruitment of regulatory t cells and myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* **76**, 5671–5682 (2016).
164. Tu, S. *et al.* Overexpression of Interleukin-1 $\beta$  Induces Gastric Inflammation and Cancer and Mobilizes Myeloid-Derived Suppressor Cells in Mice. *Cancer Cell* **14**, 408–419 (2008).

165. Tsukamoto, H., Nishikata, R., Senju, S. & Nishimura, Y. Myeloid-derived suppressor cells attenuate TH1 development through IL-6 production to promote tumor progression. *Cancer Immunol. Res.* **1**, 64–76 (2013).
166. Sade-Feldman, M. *et al.* Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Blocks Differentiation and Enhances Suppressive Activity of Immature Myeloid Cells during Chronic Inflammation. *Immunity* **38**, 541–554 (2013).
167. Youn, J.-I., Nagaraj, S., Collazo, M. & Gabrilovich, D. I. Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice. *J. Immunol.* **181**, 5791–5802 (2008).
168. Redd, P. S. *et al.* SETD1B activates iNOS expression in myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* **77**, 2834–2843 (2017).
169. Corzo, C. A. *et al.* Mechanism Regulating Reactive Oxygen Species in Tumor-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J. Immunol.* **182**, 5693–5701 (2009).
170. Nagaraj, S. *et al.* Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat. Med.* **13**, 828–835 (2007).
171. Zea, A. H. *et al.* Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: A mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* **65**, 3044–3048 (2005).
172. Yu, J. *et al.* Myeloid-Derived Suppressor Cells Suppress Antitumor Immune Responses through IDO Expression and Correlate with Lymph Node Metastasis in Patients with Breast Cancer. *J. Immunol.* **190**, 3783–3797 (2013).
173. Lee, G. K. *et al.* Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* **107**, 452–460 (2002).
174. Elkabets, M. *et al.* IL-1 $\beta$  regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur. J. Immunol.* **40**, 3347–3357 (2010).
175. Sinha, P., Clements, V. K., Bunt, S. K., Albelda, S. M. & Ostrand-Rosenberg, S. Cross-Talk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Macrophages Subverts Tumor Immunity toward a Type 2 Response. *J. Immunol.* **179**, 977–983 (2007).
176. Yang, L. *et al.* Expansion of myeloid immune suppressor Gr<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* **6**, 409–421 (2004).
177. Lee, C. R. *et al.* Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Controlled by Regulatory T Cells via TGF- $\beta$  during Murine Colitis. *Cell Rep.* **17**, 3219–3232 (2016).
178. Braumüller, H. *et al.* T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* **494**, 361–365 (2013).
179. Laiho, M., DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Livingston, D. M. & Massague, J. Growth inhibition by TGF- $\beta$  linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* **62**, 175–185 (1990).
180. (review) Bataller, R. & Brenner, D. A. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 209–218 (2005).
181. Zhang, C., Zhang, J., Niu, J., Zhang, J. & Tian, Z. Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. *Cytokine* **42**, 128–136 (2008).
182. Wang, C. *et al.* The extent of liver injury determines hepatocyte fate toward senescence or cancer article. *Cell Death Dis.* **9**, (2018).
183. van Tuyn, J. *et al.* Oncogene-Expressing Senescent Melanocytes Up-Regulate MHC Class II, a Candidate Melanoma Suppressor Function. *J. Invest. Dermatol.* **137**, 2197–2207 (2017).
184. Bonney, E. A. *et al.* Differential senescence in feto-maternal tissues during mouse pregnancy. *Placenta* **43**, 26–34 (2016).
185. Brighton, P. J. *et al.* Clearance of senescent decidual cells by uterine natural killer cells in cycling human endometrium. *Elife* **6**, (2017).
186. Rajagopalan, S. & Long, E. O. Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 20596–20601 (2012).
187. Bitto, A. *et al.* Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes. *Exp. Cell Res.* **316**, 2961–2968 (2010).
188. Flanary, B. E. & Streit, W. J. Progressive telomere shortening occurs in cultured rat microglia, but not astrocytes. *Glia* **45**, 75–88 (2004).

189. Ewald, J. A. *et al.* Androgen deprivation induces senescence characteristics in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Prostate* **73**, 337–345 (2013).
190. Blute, M. L. *et al.* Persistence of senescent prostate cancer cells following prolonged neoadjuvant androgen deprivation therapy. *PLoS One* **12**, (2017).
191. Vital, P., Castro, P., Tsang, S. & Ittmann, M. The senescence-associated secretory phenotype promotes benign prostatic hyperplasia. *Am. J. Pathol.* **184**, 721–731 (2014).
192. Palacio, L. *et al.* Restored immune cell functions upon clearance of senescence in the irradiated splenic environment. *Aging Cell* **18**, (2019).
193. Kim, K. M. *et al.* Identification of senescent cell surface targetable protein DPP4. *Genes Dev.* **31**, 1529–1534 (2017).
194. Ruggeri, L. *et al.* Effects of anti-NKG2A antibody administration on leukemia and normal hematopoietic cells. *Haematologica* **101**, 626–633 (2016).
195. Qudrat, A., Wong, J. & Truong, K. Engineering mammalian cells to seek senescence-associated secretory phenotypes. *J. Cell Sci.* **130**, 3116–3123 (2017).
196. Tian, J. *et al.*  $\beta$ -Glucan enhances antitumor immune responses by regulating differentiation and function of monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Eur. J. Immunol.* **43**, 1220–1230 (2013).
197. Toso, A. *et al.* Enhancing chemotherapy efficacy in pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. *Cell Rep.* **9**, 75–89 (2014).
198. (review) Burton, D. G. A. & Stolzing, A. Cellular senescence: Immunosurveillance and future immunotherapy. *Ageing Research Reviews* **43**, 17–25 (2018).