

# Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciálně chemicko-biologické obory

Obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Věra Kolářová

Organizace cytoskeletu senescentní buňky

Cytoskeletal organisation of senescent cell

## Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Zdeněk Hodný, CSc.

Praha 2013

**Poděkování:**

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli MUDr. Zdeňkovi Hodnému, CSc. za cenné připomínky a trpělivost při konzultacích. Také bych velmi ráda poděkovala všem kamarádům, kteří byli velmi ochotní, vstřícní a byli mi oporou při tvorbě této práce.

**Prohlášení:**

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

V Praze 16.5.2013

Podpis:

**Abstrakt:** Tato bakalářská práce pojednává o buněčné senescenci a změnami v organizaci cytoskeletu. Porovnává rozdíl mezi buňkou v senescenci a buňkami normálních proliferativních linií. Cytoskelet buňky je velmi dynamická struktura a má dopad na buněčnou funkci v tkáních. Bylo pozorováno, že buněčná dysfunkce a změny cytoskeletu souvisí se senescentním fenotypem. Tato práce shromažďuje známé informace o cytoskeletu v senescentních buňkách a naznačuje možný postup budoucího výzkumu.

**Klíčová slova:**

buněčná senescence, protinádorová bariéra, migrace buněk, cytoskelet, mikrotubuly, nádorová onemocnění

**Abstract:** This bachelor thesis discusses the phenomenon of cellular senescence in the context of cytoskeleton organization. Differences in the organization of cytoskeleton between normal proliferative cells and senescent cells are being compared. Cellular cytoskeleton is a very dynamic structure and influences the function of the cell within a tissue. This thesis gathers current evidence about senescence and cytoskeleton and indicates possible directions for future research.

**Keywords:**

cellular senescence, antitumour barrier, cell migration, cytoskeleton, microtubules, cancer

# Obsah

<b>1 Úvod</b>	<b>5</b>
<b>2 Senescence, aneb buněčné stárnutí</b>	<b>6</b>
2.1 Markery senescence . . . . .	9
2.2 Typy senescence . . . . .	12
2.2.1 Replikační senescence . . . . .	12
2.2.2 Předčasná (indukovaná) senescence . . . . .	13
2.3 Významné buněčné procesy spojené se senescencí . . . . .	14
<b>3 Cytoskelet a jeho změny v buněčné senescenci</b>	<b>15</b>
3.1 Změny v mikrotubulární struktuře spjaté se senescencí . . . . .	16
3.1.1 Postranlační změny tubulinu . . . . .	17
3.1.2 Role stabilizačních proteinů . . . . .	18
3.1.3 Funkce $\gamma$ -tubulinu v buňce . . . . .	19
3.2 Aktin . . . . .	19
3.2.1 Akumulace aktinu v jádře. . . . .	21
3.2.2 Reorganizace aktinu asociována s RhoA . . . . .	21
3.2.3 Fokální adheze . . . . .	22
3.3 Intermediální filamenta . . . . .	23
3.4 Organizace cytoskeletárních proteinů v senescentní buňce . . . . .	25
<b>4 Závěr</b>	<b>26</b>
<b>5 Seznam zkratk</b>	<b>27</b>
<b>Použitá literatura</b>	<b>28</b>

# 1 Úvod

Buněčný cytoskelet je velmi intenzivně studovaným tématem buněčné biologie. Jeho organizace a dynamika je komplexním problémem, který ovlivňuje celou řadu dějů v jednotlivých buňkách a v důsledku i chování celého mnohobuněčného organismu.

Správná organizace cytoskeletu je důležitá pro udržení požadovaného tvaru a chování buňky. Definovat správnost je však velmi obtížné. Každý buněčný typ má svá specifika a funkce cytoskeletárních proteinů se proto mohou drobně lišit. Principy stavby a struktury cytoskeletárních proteinů jsou však u všech známých organismů velmi konzervativní.

S narůstajícím věkem organismu klesá schopnost buněčné adheze, migrace a proliferace (Arnesen & Lawson, 2006). Navyšování počtu senescentních buněk ve stárnoucí tkáni může mít vliv na dysfunkci tkáně a podporovat vznik nádorového bujení.

Při buněčné senescenci mění lidské fibroblasty (LDF) svoji morfologii z vřetenovitého tvaru na rozšířený, zploštělý a nepravidelný tvar (Chen et al., 2000). Buňky vazivové tkáně (fibroblasty) ztrácejí schopnost migrace a polarizovatelnost. *In vitro* můžeme pozorovat markantní změnu roztažení a zvětšení prostoru, který daná buňka zaujímá na podložce. Senescentní fenotyp je pozorován i u dalších buněčných typů, kde může docházet k variabilním odchylkám v jejich morfologii v důsledku jejich specializace.

Pro budoucí vývoj nových specificky cílených léčiv mohou být velmi významné nově získané poznatky studia změn cytoskeletárních a s nimi souvisejících proteinů a jejich signalizačních drah.

Průchod buňky buněčným cyklem je regulován řadou signalizačních proteinů, které kontrolují připravenost buňky k dělení a ve specifických situacích jsou schopny oddálit či zastavit proces proliferace. Buňka pak má možnost opravy poškození DNA. Buněčný cyklus se dělí do čtyř hlavních fází. Ve fázi G1 dochází k růstu buňky, při syntetické fázi (S) dochází k replikaci DNA, po které následuje G2 fáze růstu a příprava na mitotickou fázi samotného buněčného dělení. Hlavními regulátory průchodu buněčným cyklem jsou cykliny a cyklin dependentní kinázy.

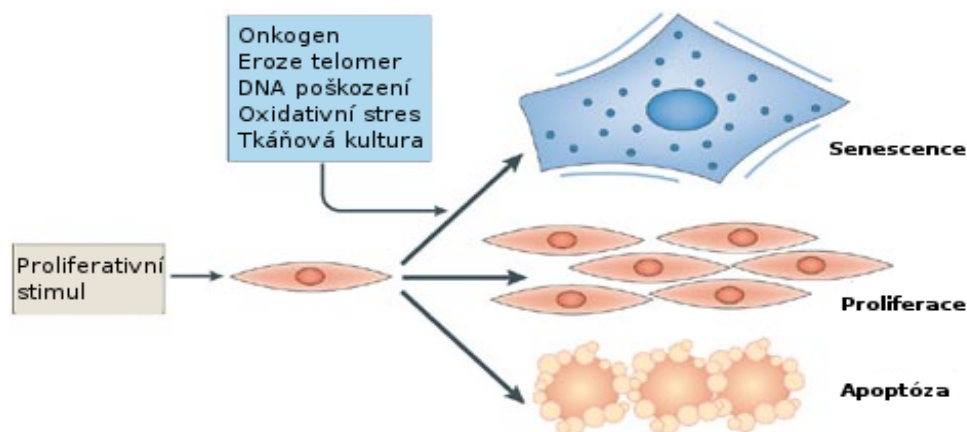
Počátek buněčného dělení je označován událostí při G1/S tranzice, kdy komplex CDK2-cyklin E hyperfosforyluje protein retinoblastomu (pRb), což vede k iniciaci transkripční aktivity E2F díky disociaci E2 promotor vazebného faktoru (E2F) z pRb. E2F iniciuje

transkripci řady genů potřebných pro postup buněčným cyklem. Mutace proteinů E2F, pRb byla spojena s nezávislostí průchodu, přes důležité kontrolní body buněčného cyklu a neomezené proliferace, na růstových faktorech u různých maligních typů nádorového bujení (Trimarchi & Lees, 2002).

## 2 Senescence, aneb buněčné stárnutí

Pojem senescence vychází z latinského *senex*, znamenající starý muž, či vysoký věk (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Proces stárnutí *per se* je přirozený jev vyskytující se od nepaměti. V obecném pojetí se jedná o opotřebování a nahromadění strukturálních i funkčních defektů v čase vedoucí k nesprávnému či nedokonalému fungování životních procesů. Procesem stárnutí se zabývá obor biogerontologie.

Buněčná senescence je molekulárně-biologický program aktivovaný jako reakce na vzniklá poškození DNA. Jedná se o poměrně stabilní formu zastavení buněčného cyklu, kdy je blokována proliferace poškozené buňky. Senescentní stav je popisován jako jedna z bariér vzniku a vývoje nádorových onemocnění. Buňka je schopna podle závažnosti poškození DNA opravit vzniklé léze a pokračovat v proliferaci, nebo reaguje signální drahou vedoucí k programované buněčné smrti (apoptóze), nebo zastavuje svůj postup v buněčném cyklu a vstupuje do stavu tzv. senescence (Coppé et al., 2011; Gil & Peters, 2006), jak je znázorněno na obrázku 1.



Obrázek 1: Senescence jako jedna z možných odpovědí na buněčný stres. Podle (Gil & Peters, 2006)

Všechny živé organismy s obnovitelnými tkáněmi jsou vystaveny riziku vzniku hyperproliferativních chorob, mezi které se řadí také rakovina. Mezi významné tumor supresorové mechanismy potlačující vznik nádoru jsou zahrnovány právě apoptóza a senescence. Základní rozdíl v efektu těchto dvou obranných mechanismů je, že senescence potlačuje růst a proliferaci buňky a programovaná buněčná smrt (apoptóza) takto poškozené buňky velmi rychle eliminuje (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Není přesně jasné, co ovlivňuje rozhodnutí, zda dojde k zastavení v buněčném cyklu nebo k programované buněčné smrti.

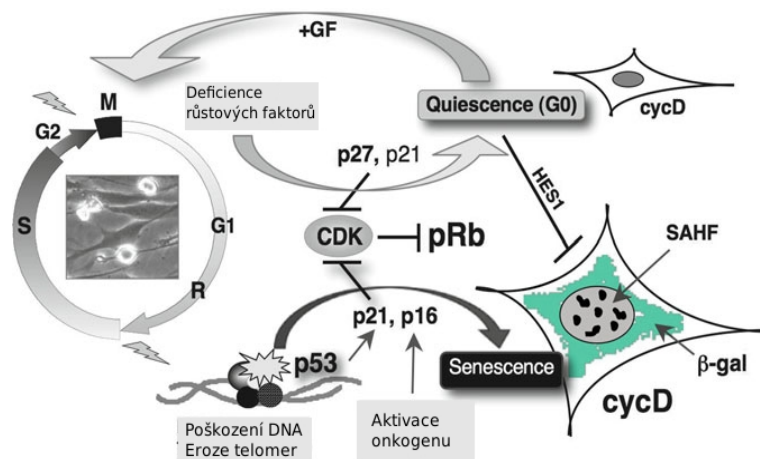
Rozhodnutí zda buňka vstoupí do senescence nebo apoptózy je regulováno rozdílnými signálními drahami. Není známý přechod mezi těmito dvěma stavy volně v organismu. V důsledku manipulace s pro- a anti-apoptotickými proteiny (kaspáza 3 a p21) bylo pozorováno navození apoptózy nebo senescence a to v závislosti na míře koncentrace aplikovaného doxorubicinu (Rebbaa et al., 2003).

Zatím není zcela objasněno, jakým mechanismem se buňka brání apoptóze. Předpokládá se, že svou roli hraje změna exprese proteinů inhibujících či podporujících apoptotickou buněčnou smrt. Možná je i preferenční změna aktivace genů pomocí transkripčního proteinu p53, který vede k zastavení proliferace (Jackson & Pereira-Smith, 2006). Tento významný tumor-supresorový protein má význam jak v programu apoptózy, tak i v senescenci (Lehmann et al., 2007).

Všechny komplexní mnohobuněčné organismy včetně člověka jsou tvořeny buňkami schopnými se dělit, tedy proliferovat a označujeme je jako mitotické. Buňky se ztrátou této schopnosti, často v důsledku úplné buněčné diferenciaci, označujeme jako post-mitotické. Při nedostatku zdrojů mohou mitotické buňky přecházet z G1 fáze do stavu quiescence, neboli G0 fáze buněčného cyklu. Toto zastavení růstu je v porovnání se senescentním zastavením v G1/S, nebo G2/M fázi reverzibilní (Dulic, 2013; Wagner et al., 2001).

Při setkání s potenciálními onkogenními faktory mohou mitotické buňky nevratně setrvávat v buněčném cyklu, stávají se rezistentními k signálům vedoucím k programované buněčné smrti a dochází k alternativní expresi celé řady genů (Jackson & Pereira-Smith, 2006).

Buněčná senescence je nejvíce prozkoumána a popsána u lidských fibroblastů s omezeným počtem dělení. V literatuře jsou lidské fibroblasty označovány jako normální buňky, či normální lidské buňky oproti nádorovým, tzv. „nesmrtelným“ buňkám (Jackson & Pereira-Smith, 2006; Di Leonardo et al., 1994).



Obrázek 2: Porovnání senescentního zastavení v buněčném cyklu s quiescencí (G0 fází). Podle (Dulic, 2013)

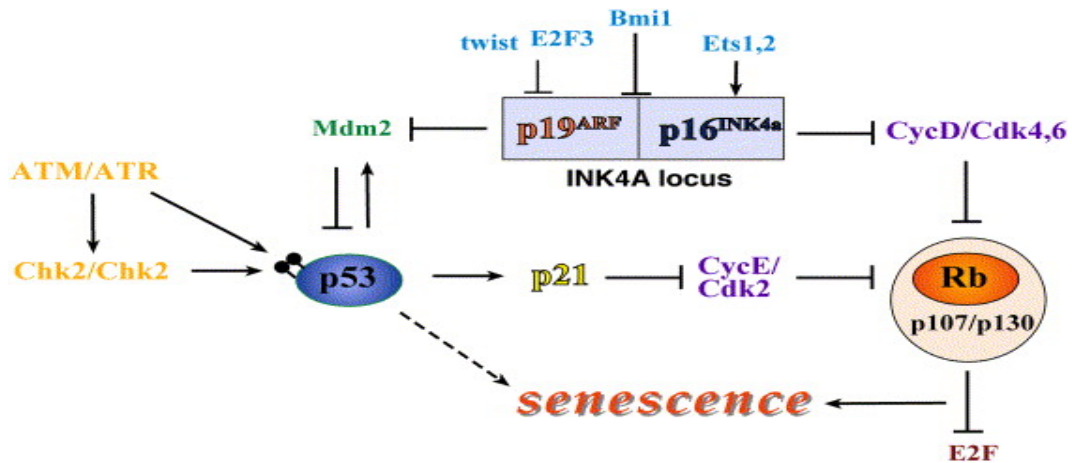
Leonard Hayflick a Paul Moorhead ve své práci z roku 1961 pozorovali, že lidské diploidní fibroblasty (LDF) derivované z embryonální tkáně mají omezený počet dělení (Hayflick & Moorhead, 1961). Z výsledků svých pozorování stanovili limit počtu populačního zdvojení na  $50 \pm 10$ , po kterém LDF vykazují odlišný fenotyp oproti buňkám primární kultury (Hayflick, 1965). Fenomén limitovaného populačního zdvojení, neboli zastavení v buněčném cyklu je dnes známý jako Hayflickův limit, fáze III, nebo také jako replikativní senescence. Jeho hodnota se liší v závislosti na druhu organismu i buněčném typu.

U lidských diploidních fibroblastů (LDF) přivedených do senescence se tumor-supresorový protein p53 váže na promotor kódující gen pro signální molekulu „zastavení růstu“ p21Waf1/Cip1 a GADD45, ale ne geny regulující apoptózu NFRSF10b, TNFRSF6 a PUMA (Jackson & Pereira-Smith, 2006).

Na obrázku 3 je schématické vyobrazení jednotlivých signalizačních proteinů odpovědných za vznik senescentní buněčné odpovědi na poškození. Senescentní buňky vykazují výrazné změny v expresi genů kódujících inhibitory buněčného cyklu. Mezi první popsané inhibitory buněčného cyklu indukující senescenci patří inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDKI) p21waf1/cip1 a p16INK4a (Beauséjour et al., 2003).

Tyto inhibitory se vyskytují v drahách potlačujících vznik nádoru. Jsou regulovány transkripčními faktory p53 a pRb, které jsou důležitými prvky tvořícími a udržujícími zástavu buněčného cyklu. (Jackson & Pereira-Smith, 2006) Změny v expresi genů neovlivňují pouze průchod buněčným cyklem, ale také okolí buňky, ve kterém se nachází. Senescentní





Obrázek 3: Signální dráhy indukující vznik senescentního fenotypu (Ben-Porath & Weinberg, 2005).

buňky mají zvýšenou hladinu exprese genů kódujících proteiny, které následně sekretují a vytváří si kolem sebe specifické „mikroprostředí“. Vytvářejí tak sekreční fenotyp asociovaný se senescencí (SASP).

## 2.1 Markery senescence

Experimenty na buněčných kulturách identifikovaly několik ukazatelů určujících, zda je buňka senescentní. Pomocí několika znaků mohou být senescentní buňky identifikovány v kultuře a *in vivo*. Avšak ne každá senescentní buňka exprimuje všechny známé znaky, a proto se k determinaci využívá kombinace několika znaků. Mezi základní charakteristiky asociované s buněčnou senescencí se řadí neschopnost postupu v buněčném cyklu (růstová zástava), trvalá signalizace poškození DNA (DDR), změna morfologie buňky, zvýšená produkce a aktivita SA- $\beta$ gal, zvýšená exprese cyklin dependentních inhibitorů (CDKI) či sekrece řady cytokinů, růstových faktorů a proteáz označována zkráceně jako SASP (sekreční fenotyp asociovaný se senescencí). Žádný z těchto znaků není jednoznačně určující pouze pro fenotyp senescence (Beauséjour et al., 2003; Campisi & d'Adda di Fagnana, 2007).

### Zastavení buněčného cyklu

Jedním z prvních viditelných znaků bývá až dvojnásobné rozšíření a zvětšení objemu buňky oproti kontrolním buňkám (Hayflick, 1965). Hlavním z typických znaků senescentní buňky je neschopnost exprese genů potřebných k proliferaci (také v promitogenním prostředí). Senescentní buňky zastavují buněčný cyklus obvykle aktivací kontrolních bodů buněčného cyklu G1/S či G2/M, kdy zůstávají nadále metabolicky aktivní, avšak rezis-

tentní signálům spouštějícím apoptotickou smrt (Di Leonardo et al., 1994; Mao et al., 2012). Fáze buněčného cyklu, kde dochází k zástavě se různí podle typu induktoru, typu buněk a jejich genetické výbavy. Převážně se uvádí zastavení buněčného cyklu jako stav v podstatě nevratný. Ukazuje se však, že existují mechanismy schopné tento stav zvrátit (Beauséjour et al., 2003).

Akumulace stárnoucích, senescentních buněk v tkáních je spojována s projevy stárnutí organismu. Dochází k nedostatečným opravám a regeneraci tkání. Nádorové buňky mohou v kultuře proliferovat bez omezení a po aplikaci chemoterapie dochází k jejich usmrcení. Je pozorována tendence některých buněk obejít vliv záření a vstupovat do stavu senescence (zastavit se v G1/S či G2/M fázi buněčného cyklu) (Mao et al., 2012; Campisi, 2011).

### **SA- $\beta$ gal**

Dalším využívaným ukazatelem senescentního stavu je zvýšená produkce a následná aktivita  $\beta$  galaktozidázy asociované se senescencí (SA- $\beta$ gal). K detekci SA- $\beta$ gal dochází při pH 6, které je u nesenescentních buněk suboptimální pro aktivitu  $\beta$  galaktozidázy (Kurz et al., 2000). Nárůst SA- $\beta$ gal se využívá k cytochemické detekci senescentních buněk v kultuře. Výrazná aktivita SA- $\beta$ gal nebyla pozorována u terminálně diferencovaných buněk, buněk zastavených v G0 a nádorových buněk. Kolorimetrická detekce buněk vychází z reakce tohoto enzymu s chromogenním substrátem X-gal<sup>1</sup> při pH 6, kdy dochází k indukci genu lacZ, což vede k hydrolýze substrátu X-gal a vzniku modrého zbarvení (Dimri et al., 1995).

### **Permanentní poškození DNA**

Faktorem vyvolávajícím senescentní buněčnou odpověď je genotoxický stres, který vede k neopravitelnému poškození DNA, např. poruše telomer (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Všechny stresory tvořící dvojlátkové zlomy molekuly DNA (DSB) mohou indukovat senescentní fenotyp, genetické zvýšení aktivity komponent účastnící se kontroly průběhu buněčného cyklu, zvýšenou expresi onkogenů a vznik dalších stresorů. Dvovlátkové zlomy v DNA jsou u somatických buněk doprovázeny řadou spřažených proteinů. V jaderných lézích se nachází fosforylovaný histon H2AX a dochází ke kolokalizaci s DNA opravnými a kontrolními proteiny, jako třeba 53BP1, MCD1, NBS1, PML (Ben-Porath & Weinberg, 2005; d'Adda di Fagagna et al., 2003).

DSB, stejně jako poškození telomer, indukuje specifickou odpověď na poškození DNA (DDR, z anglického DNA damage response). Tato odpověď je charakterizována aktivací kináz ATM a ATR, které jsou povolány k místu poškození a vedou k fosforylaci řady pro-

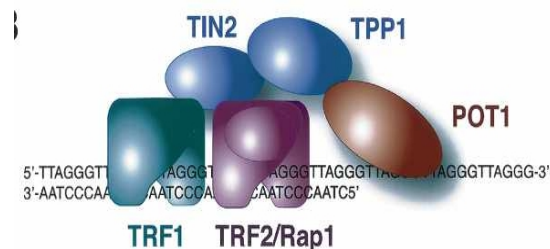
---

<sup>1</sup>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside

teinů včetně Ser-139 na histonu H2AX ( $\gamma$ H2AX) sousedícím s místem zlomu. Fosforylace histonu H2AX usnadňuje akumulaci opravných faktorů zahrnující 53BP1, MDC1/NFBD1 a NBS1 a řadu dalších (Ben-Porath & Weinberg, 2005). Také podporuje aktivaci kináz Chk1 a Chk2 díky fosforylaci, které přenáší signál u lidských, ale ne u myších fibroblastů, k p53/p21 a p16 (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Fokusy  $\gamma$ H2AX jsou využívány, jako potencionálním biomarker senescentních buněk, v živočišných tkáních (Wang et al., 2009).

Kontroly poškození DNA se stávají aktivními v raném stadiu lidské tumorigeneze a vedou k blokaci buněčného cyklu nebo apoptóze, čímž omezují postup nádoru (Bartkova et al., 2005).

K rozeznání DBS od skutečného konce lineárního chromosomu buňka využívá telomerních struktur. Tyto struktury zabraňují degradaci nebo fúzi chromosomů, jsou důležité pro zachování integrity a stability eukaryotického genomu a zajišťují rozeznání konce od vzniklých dvojláknových zlomů DNA. Telomerní struktura zahrnuje proteiny o velikosti 10 až 12 kDa, vázající se na dvojitřetězcové konzervativní sekvence TTAAGGG s přesahem na 3' vlákně až několik set nukleotidů. Přesahová sekvence na 3' vlákně je odpovědná za vznik koncové T-smyčky (Griffith et al., 1999). Komplex proteinů vázaných na opakující se telomerní strukturu obsahuje faktory, například TRF1, TRF2, POT1. Ty jsou důležité pro udržení struktury a funkce telomer. Na obrázku 4 je zobrazeno uspořádání ochranného proteinového komplexu na koncové sekvenci lineárního chromozomu.



Obrázek 4: Umístění proteinů na konci lineárního chromosomu. Podle (de Lange, 2005)

Poškození telomer se řadí mezi první popsané mechanismy vysvětlující buněčné stárnutí. Později se objevila nová zjištění rozvíjející poznatky o pozorovaném jevu senescence. Nefunkčnost telomer spouští senescenci skrz dráhu p53, která je důležitá pro vytvoření a udržení blokace růstu. Funkční enzym telomeráza nedokáže zvrátit již senescentně zastavený postup v buněčném cyklu. Ten je popsán inaktivací p53 přes p16INK4a, který potlačuje odpověď na onkogenní p21Ras protein (Beauséjour et al., 2003). Senescentní fenotyp je kontrolován transkripčním faktorem E2F1 v závislosti na p53 (Dimri & Itahana, 2000).

## Změněná exprese

Senescentní buňky mají výrazně zvýšenou hladinu exprese různých proteinů. Například vybrané cyklin-dependentní protein kinázové inhibitory (CDKI), které jsou součástí tumor-supresorových drah. Ty jsou ovládány transkripčními regulátory p53 a pRb (Beauséjour et al., 2003).

## SASP

Typický fenotyp asociovaný se senescencí sekretovaných produktů buňky (SASP) s možnou autokrinní a parakrinní aktivitou zahrnuje řadu prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , $\dots$ ), růstových faktorů (IGF, TGF- $\beta$ ), komponent extracelulární matrix a proteáz, které začne buňka produkovat v řádu několika dní od stimulace k zastavení růstu. TGF- $\beta$  jsou důležité cytokiny regulující embryonální buněčnou diferenciaci, organogenezi a apoptózu. Inhibují proliferaci epiteliálních buněk a působí jako imunosupresivní faktory. Jsou zapojeny do epiteliálně-mezenchymální transdiferenciaci (spojeny s přeměnou epiteliální buňky na mesenchymální), která je charakterizována rozsáhlými změnami v expresi adhezivních molekul a změny cytoskeletu převážně na cytokeratinová intermediální filamenta složené převážně z vimentinu (Derynck et al., 2001)\*.

## 2.2 Typy senescence

Buněčnou senescenci lze v zásadě rozdělit podle vzniku poškození DNA, které je jejím hlavním iniciátorem a může být navozeno mnoha způsoby. V lidských buňkách dochází denně více jak k půl milionu různých forem poškození DNA a vzniku mutací v genetické informaci, z nichž většina je opravena pomocí buněčných reparačních mechanismů. Některá obtížně opravitelná poškození však vedou k trvalé signalizaci (DDR) a následným reakcím vedoucím k expresi genů iniciujících vznik senescentního fenotypu (Rodier et al., 2011). Poškození DNA může být způsobeno přirozenými faktory způsobujícími nestabilitu genomu, či navozeno radiačním zářením nebo léčivy (Di Leonardo et al., 1994).

### 2.2.1 Replikační senescence

Mezi známé charakteristiky buněk, vstupujících do replikativní senescence patří snížená rychlost růstu, větší, plošší tvar buňky a těsné vazby u buněk *in vitro*.

Většina eukaryotických buněk není schopná se dělit donekonečna, jak vyjadřuje Hayflickův limit. Po dosažení konečného počtu dělení je buněčný růst (proliferace) zastaven<sup>2</sup> a buňka

---

<sup>2</sup>Buňka obsahuje množství DNA ekvivalentní G1 fázi buněčného cyklu

nemůže být stimulována ke vstupu do S fáze žádným ze známých fyziologických mitogenů. Replikační senescenci způsobuje částečné potlačení několika genů pozitivně ovlivňujících regulaci růstu, jejichž exprese se ukázala být důležitá pro postup v G1 fázi a syntéze DNA. U fibroblastů tyto geny zahrnují protoonkogen c-fos, geny ID1 a ID2 a komponenty transkripčního faktoru E2F - E2F1 a E2F2. Transkripční faktory (E2F1, c-fos, Id), jejichž aktivita je důležitá pro buněčnou proliferaci, jsou u senescentních buněk potlačeny. Represe aktivity E2F1 zabraňuje expresi genů potřebných k iniciaci syntézy DNA. K potlačení aktivity E2F1 dochází pravděpodobně přes zvýšenou expresi p21, která inhibuje cyklin dependentní kinázy (CDK). CDK jsou odpovědné za fosforylaci retinoblastomového proteinu pRb. Nefosforylovaný pRb zpětně potlačuje E2F1 (Campisi, 1997).

Transkripční faktor E2F1 indukuje přepis genu pro nádorový supresor ARF, jehož produkty vznikají alternativním překladem čtecího rámce lokusu INK4 (p19ARF u myši, p14ARF u člověka). Protein p14ARF způsobuje stabilizaci p53 a následně narůstá i hladina p21 (Gil & Peters, 2006).

Mezi hlavní dva inhibitory CDK se řadí protein p16, označovaný také jako p16INK4a, nebo CDKN2a ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org), 2013a) a protein p21, známý také pod názvy p21Cip1, CDKN1a, Waf1, nebo SDI1 ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org), 2013b). Proteiny p21 a p16 udržují pRb v hyperfosforylovaném a aktivním stavu. Mechanismus působení však není stejný.

### **2.2.2 Předčasná (indukovaná) senescence**

Buňka může vstoupit do senescence i po navozeném poškození DNA induktory z prostředí. Podle způsobu vzniku poškození hovoříme o onkogeně indukované senescenci, indukované radiací či vyvolané oxidativním stresem. Předčasná senescence může být způsobena genotoxickými léčivými (Novakova et al., 2010). Jedná se o chemoterapeutická léčiva odvozená od alkaloidů rostlin, jako je například vincristin (Groth-Pedersen et al., 2007). Indukovaná senescence může být dále způsobena vystavením radiálnímu záření či jiným faktorům vyvolávajícím výrazné poškození DNA. Avšak buňka nereaguje vždy zastavením buněčného cyklu a projevem senescentního fenotypu. Například HeLa buňky po vystavení vincristinu podléhají apoptóze, kdežto MDF-7 buňky vykazují senescentní morfologii (Groth-Pedersen et al., 2007).

Rovněž je známo, že předčasná senescence je odpovědí na konstitutivní MEK (komponentu MAPK) mitogenní signalizaci, aktivující p53 a p16 jako tumor-supresory (Lin et al., 1998).

## 2.3 Významné buněčné procesy spojené se senescencí

Senescence se může účastnit několika zdánlivě neslučitelných biologických procesů, jako potlačení nádoru, podpora růstu nádoru, oprava tkání a stárnutí. Zastavení buněčné proliferace funguje jako přirozená bariéra vzniku nádoru. Na druhou stranu chemoterapie využívaná k léčbě generuje přežití buňky ve stavu senescence, kde i přes popisovanou ireverzibilitu může dojít k regeneraci nádorové tkáně. Senescentní buňka vykazuje sekreční fenotyp zahrnující řadu prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-8), růstových faktorů, jako je pro-apoptotický protein IGFBP-7 (vazebný protein inzulin podobního faktoru) a PAI-1 (inhibitor plazmidogenového aktivátoru) (Campisi, 2011).

Navýšení počtu senescentních buněk v tkáni je spojováno s chorobami, které se častěji vyskytují u starších osob, jako jsou arteroskleróza a osteoporóza (Bennett et al., 1998; Kassem et al., 1997). Také při Alzheimerově chorobě může být akumulace p16INK4a pozitivních senescentních astrocytů spojována s narůstajícím věkem a rizikem vývoje sporadického typu onemocnění (Bhat et al., 2012).

### 3 Cytoskelet a jeho změny v buněčné senescenci

Tvar buňky a její vnitřní opora, funkční polarita, zajištění buněčného pohybu (tzv. motility) a životní cyklus eukaryotické buňky je kontrolován komplexní prostorovou sítí proteinových vláken, která souborně označujeme jako buněčnou kostru či cytoskelet.

Cytoskelet buňky je složen ze tří základních typů vláken, neboli filament, která jsou organizována a regulována v závislosti na signálech z okolí a potřebách buňky. Cytoskeletární systém je evolučně poměrně konzervativní a skládá se z vláken mikrotubulárních, mikrofilamentárních, známých také jako aktinová vlákna, a ze středních (intermediálních) filament. Díky nim je buňka schopna pohybu, změny tvaru, separace chromosomů, dělení, transportu organel, kompartmentů a materiálu v transportních váčcích. Cytoskelet tedy není rigidní a neměnný proteinový komplex, spíše naopak. Jedná se o dynamickou strukturu, jejíž komponenty jsou schopny reorganizace v řádech minut a zároveň jsou schopny tvořit relativně stabilní struktury až na několik hodin.

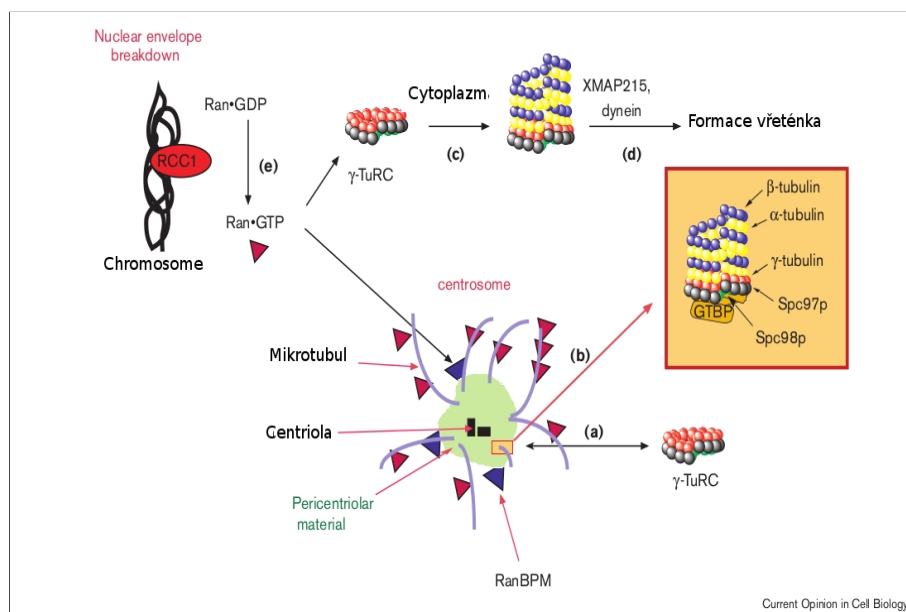
Cytoskeletární vlákna se liší složením proteinových podjednotek, strukturou a následně i fyzikálními vlastnostmi. Vlákna s největším průměrem 24 nm se nazývají mikrotubuly, které slouží jako opora a kostra buňky, umožňující intracelulární transport a také buněčný pohyb. Ten je zajištěn přenosem buněčného materiálu pomocí molekulárních motorů pohybujících se po mikrotubulech a celkovou dynamikou cytoskeletu, polymerací a následným rozpadem mikrotubulů či mikrofilament. Organizace cytoskeletárního systému se u každého buněčného typu liší v závislosti na funkci a poslání buněk (Frisan et al., 2003).

Buněčná senescence je doprovázena rozsáhlými změnami v množství zastoupených cytoskeletárních proteinů. Japonská skupina pod vedením Koji Nishio pozorovala postupné změny zastoupení cytoskeletárních proteinů v mladých, presenescentních a senescentních lidských fibroblastech kůže (TIG101), fetálních plic (TIG3 a WI138-VA13) a fibrosarkomu (HT-1080). Jejich výsledky ukazují pokles přítomnosti aktinu,  $\beta$ -tubulinu a výrazný nárůst vimentinu. Avšak ne všechny cytoskeletární proteiny mění hladinu svého zastoupení v senescentní buňce. Výsledky ukazují, že kináza fokální adheze (FAK), vinculin a fosfoinositol-3 kináza (p85 PI3) tomuto trendu nepodléhají (Nishio & Inoue, 2005). Vystává otázka, čím mohou být tyto změny způsobeny a zda se vyskytují v závislosti na buněčném typu. Jako odpověď se nabízí změna hladiny genové exprese, možná exprese jiných isoform či postranlační modifikace lokalizovaná v místě epitopu použité vizualizační protilátky. Další otázkou čekající na zodpovězení může být variabilita a umístění eventuelních postranlačních modifikací u jednotlivých typů filament.

### 3.1 Změny v mikrotubulární struktuře spjaté se senescencí

Mikrotubuly představují dynamická cytoskeletární filamenta hrající hned několik zásadních rolí v buněčných funkcích, jako jsou například lokalizace organel, podpora udržení struktury, segregace chromosomů a vnitrobuněčný vesikulární transport. Buňky nacházející se ve stavu senescence, které se výrazně zplošťují, netvoří dělicí vřeténko. Byl pozorován úbytek transkripce genů spojených s tvorbou a rozpadem mikrotubulů a tvorbou dělicího vřeténka (Han et al., 2010). Ačkoli je popsáno mnoho o změnách funkce a modifikacích tubulinových proteinů, stále nejsou jasné mechanismy vedoucí k morfologickým projevům u senescentních buněk.

Mikrotubulární struktury jsou tvořeny převážně z podjednotek tubulinu s nejvíce zastoupeným  $\alpha$  a  $\beta$ -tubulinem. Tubulinové podjednotky polymerují svými konci směrovaně<sup>3</sup>. Mírný konec, na kterém dochází k pomalejšímu růstu, je dočasně připojen k centrosomu a rychlejší růst probíhá na volném plus konci za účasti GTP. Opakující se jednotky  $\alpha$  a  $\beta$  formují protofilamenta. Mikrotubulus je tvořen obvykle 13 protofilamenty řazenými laterálně (Evans et al., 1985). Uvnitř buňky jsou mikrotubuly ukotveny v mikrotubulárních organizačních centrech (MTOC) a centrosomech, se kterými je asociován minoritní  $\gamma$  tubulin (Stearns et al., 1991). Uspořádání tubulinu na centrosomu je znázorněno na obrázku 5.



Obrázek 5: Dráhy vedoucí k složení mitotického dělicího vřeténka. Podle (Schiebel, 2000).

<sup>3</sup>v anglické literatuře uváděno jako „head to tail“

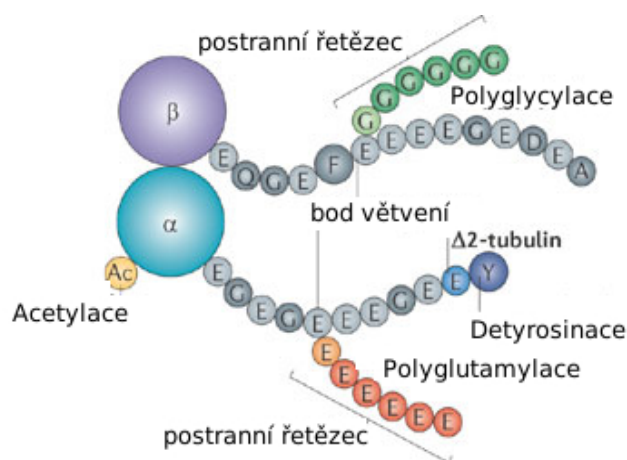


### 3.1.1 Postranslační změny tubulinu

Tubuliny jsou evolučně vysoce konzervativní struktury, vyskytující se bez výrazných změn mezi všemi žijícími organismy. Počty jednotlivých isoform se mohou lišit v závislosti na typu organismu. Příkladem může být počet genů tubulinu u člověka, který se pohybuje okolo deseti v porovnání s jednodušším organismem, jako například *Tetrahymena thermophila* (Gaertig, 2000), který kóduje jen jednu izoformu  $\alpha$  a dvě izoformy  $\beta$ -tubulinu.

Změny vlastností mikrotubulů se odehrávají převážně na poli postranslačních modifikací tubulinových podjednotek a mění se v průběhu buněčného cyklu. Lze předpokládat, že buňka nacházející se ve stavu senescence bude mít postranslačně modifikovaný tubulin, avšak toto tvrzení není zatím potvrzeno ani vyvráceno.

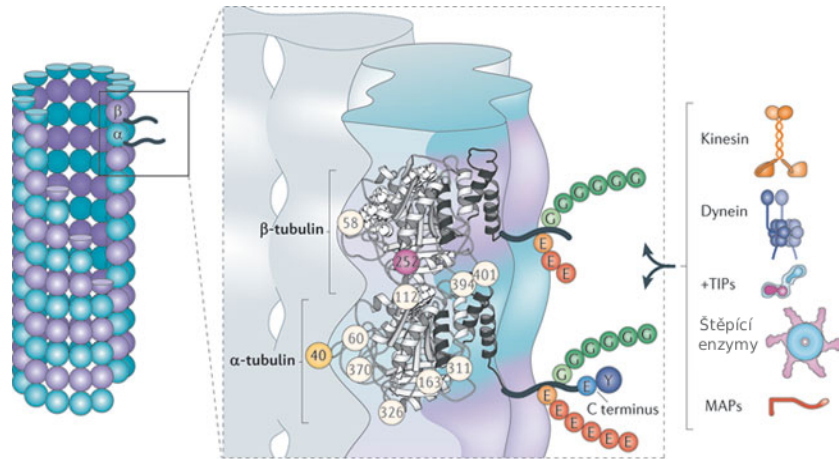
Mezi hlavní postranslační modifikace tubulinu patří acetylace, polyglutamylace, polyglycyllace, detyrosinace,  $\Delta 2$ , fosforylace a ubikvitinace. Vyobrazení těchto modifikací je patrné na obrázku 6. Sumoylace a metylace nebyly u tubulinu pozorovány (Verhey & Gaertig, 2007).



Obrázek 6: Schématické znázornění modifikací vyskytujících se na  $\alpha$ -tubulinu a  $\beta$ -tubulinu. C-koncové domény jednotlivých aminokyselinových zbytků obou tubulinových podjednotek jsou reprezentovány aminokyselinovými sekvencemi korespondujícími s myšším  $\alpha 1A$ -tubulinem (od zbytku 441 až ke konci) a  $\beta 2B$ -tubulinem (432 až ke konci). Postranní řetězce  $\alpha$  i  $\beta$ -tubulinu mohou být modifikovány polyglutamylací tak i polyglycyllací. Převzato z (Janke & Chloë Bulinski, 2012).

Modifikační enzymy preferenčně působí na podjednotky tubulinu zapojené v mikrotubulech. Oproti tomu je popsáno, že fosforylace  $\beta$ -tubulinu cyklin-dependentní kinázou 1 (Cdk1) na

serinu 172 zabraňuje zapojení podjednotky a nachází se volně ve frakci (Fourest-Lieuvain & Peris, 2006). BRCA1 společně se svým vazebným partnerem BARD1 ubikvitinuje lysiny 48 a 344  $\gamma$  tubulinu *in vitro* a tím reguluje počet centrosomů u savčích buněčných linií (Starita & Machida, 2004).



Obrázek 7: Lokalizace a možné funkce tubulinových postranlačních modifikací v rámci mikrotubulu. Převzato z (Janke & Chloë Bulinski, 2012).

Na obrázku 7 je vidět schéma umístění modifikovatelných konců tubulinových podjednotek. Koncová část tubulinu s terminálním karboxylem je vystavena na okraji mikrotubulu a tudíž modifikovaný tubulin může být rozpoznáván MAP (proteiny asociovanými s mikrotubuly), molekulárními motory, stabilizačními a štěpícími enzymy. Aktivita proteinů rozeznávající plus konce +TIP je regulována tyrozinací na  $\alpha$ -tubulinu 168 (Honappa et al., 2006). K acetylaci dochází na vnitřní straně mikrotubulu, což zpomaluje inkorporaci dalších podjednotek do mikrotubulu, neutralizací pozitivního náboje lysinu 252 (Chu et al., 2011).

### 3.1.2 Role stabilizačních proteinů

Stabilizační agens se váží na mikrotubuly a ruší jejich dynamické vlastnosti (Chao et al., 2011). Polymerace, stabilita a organizace mikrotubulu je regulována stabilizačními proteiny jako jsou Tau, MAP1, MAP2. Tau je lokalizován převážně v neuronálních axonech, kde je odpovědný za stabilní avšak stále dynamický stav mikrotubulů důležitý pro správný růst a efektivní axonální transport (Gendron & Petrucelli, 2009).

Kromě proteinů, které jsou odpovědné za snížení dynamiky mikrotubulu, jsou popsány také příklady kdy dochází k rozštěpení mikrotubulu. Funkce kataninu (McNally & Vale, 1993) a spastinu (Evans et al., 2005) je potenciálně regulována polyglutamylacemi (Lacroix et al., 2010).

Defekty stabilizačních proteinů jsou spojeny s řadou onemocnění. Hyperfosforylace Tau proteinu je spojována se vznikem filamentárních shluků a patologickými projevy jako je například Alzheimerova choroba. Vnitřní zlomy mikrotubulů a nesprávné štěpení mikrotubulu vede k lidským onemocněním s axonální degenerací (Evans et al., 2005). Například defekt v genu SPAST kódujícím spastin vede k dědičné spastické paraplegii (Abrahamsen et al., 2013).

V literatuře se uvádí řada látek ovlivňujících stabilizační proteiny a figurujících v pozici možného praktického využití. Jako příklad může sloužit discodermin, který potlačuje dynamickou nestabilitu mikrotubulu a blokuje buňky v mitóze. Po aplikaci zvýšené koncentrace discoderminu, buňky vykazují senescentní fenotyp podobně, jako po použití doxorubicinu (Klein et al., 2005). Tato indukce urychlené senescence se uvádí jako možný mechanismus, jak buňky odvozené z linie rakoviny plic (A549) získávají rezistenci k discodermolidu (Chao et al., 2011). Discodermolid je látka izolována z mořské houby *Discodermia dissoluta*. Zprostředkovává stabilizaci mikrotubulu potlačením jeho dynamické nestability a navyšuje koncentraci buněk v metafázně-anafázní tranzici (Klein et al., 2005).

### 3.1.3 Funkce $\gamma$ -tubulinu v buňce

Výskyt  $\gamma$ -tubulinu je lokalizován v MTOC, na pólech dělicího vřeténka a v centrosomech. Byla ukázána také jeho lokalizace v jádře (Lesca et al., 2005) a uvažuje se nad jeho možnou funkcí v jadérku (Hořejší et al., 2012).

Protein  $\gamma$ -tubulin je všudypřítomně exprimovaný a reguluje interfázní nukleaci  $\alpha\beta$ -tubulinu, duplikaci centrosomu (Starita & Machida, 2004) a formaci dělicího vřeténka (Muller & Fogeron, 2006). Vyskytuje se v cytosolu, centrosomech (Stearns et al., 1991) a jádře, kde je asociován s Rad51 při rekombinačních opravách (Lesca et al., 2005). Je aktivně translokován do jádra u buněk U2OS a NIH3T3, kde moduluje transkripční aktivitu E2F a postup v buněčném cyklu (Höög et al., 2011). Mechanismus jaderné lokalizace  $\gamma$ -tubulinu ani jeho funkce v jádře senescentní buňky není dosud objasněn.

Byla prokázána asociace  $\gamma$ -tubulinu s plazmatickou membránou (Hořejší et al., 2012), kde se může účastnit necentrosomické mikrotubulární nukleace.

## 3.2 Aktin

Funkce aktinového cytoskeletu je vytvořit a udržet buněčnou morfologii a polaritu. Má roli v endocytóze, intracelulárním transportu, pohyblivosti, smrtitelnosti a buněčném dělení. Hraje zásadní roli ve zprostředkování buněčné odpovědi, jak na vnitřní, tak vnější signály.

Hlavním znakem aktinu je schopnost vázat a hydrolyzovat ATP. Dynamický obrat aktinových filament je způsoben přechodem z ATP-aktinu na ADP-aktin, který je doprovázen konformační změnou. Mikrofilamenta mají dva odlišné konce. Plus konec, na kterém dochází k rychlejší polymeraci a narůstání vlákna za přítomnosti ATP, a minus konec, na kterém je převaha aktinu s navázaným ADP a pomalejší růst vlákna. Dynamika aktinu je proto úzce spojena s poměrem ATP/ADP v buňce. Pro udržení buněčné homeostázy je důležité, jak se buňka zvládá vypořádat s měnící se dostupností ATP. Aktinové monomery G-aktinu tvoří trimerní jádro nukleace, na jehož konce se připojují jednotlivé monomery a tvoří tak vlákno F-aktinu. Na jednotlivé monomery G-aktinu je navázána molekula ATP, která dodává energii k polymeraci a stabilizuje vznikající vlákno na plus konci. Konec s ADP-D-aktinem snadněji depolymeruje a je celkově méně stabilní.

Sestavování a rozpad aktinových filament, jako i jejich organizace ve funkčně vyšší síti, je regulováno nadbytkem regulačních (aktin-vazebných) proteinů, kterými jsou například profilin, cofilin, gelsolin, dematin.

Regulace dynamiky aktinu je ve skutečnosti jemný a kontrolovaný děj zahrnující celou řadu proteinů. Účastní se jej Arp2/3 kontrolující větvení aktinových filament, cofilin depolymerizující aktinová filamenta a Rho GTPázy jako je Rac a cdc42 (reguluje formaci lamelopodií a filopodií) a RhoA (reguluje formaci stresových vláken).

Profilin je malý aktin-vazebný protein schopný vazby na G-aktin s navázaným ADP a vyměňuje jej za ATP. Cofilin je také malý protein ovšem s vazbou na F-aktinové vlákno, které aktivuje výměnou ADP za ATP. Cofilin byl původně popsán u prasečího mozku jako vazebný protein aktinových filament a inhibitor interakcí s myosinem a tropomyosinem. Je také známý jako aktin depolymerizační faktor (ADF/cofilin) a regulátor dynamiky aktinu (Moon & Drubin, 1995; Theriot, 1997) či XAC (*Xenopus* aktin depolymerizační faktor) zodpovědný za obrat aktinových filament v ocasech *Listeria monocytogenes* monocytogenních listerií (Rosenblatt et al., 1997). Cofilin obsahuje sekvenci -KKRKK-, která funguje jako jaderný lokalizační signál v odpovědi na stres (Iida et al., 1992). Funkce cofilinu je negativně regulována fosforylací kinázou LIM na Ser-3 (Moriyama et al., 1996), jejíž aktivita je zvyšována inzulinem či aktivní formou proteinu Rac (Yang et al., 1998). Defosforylace serinového zbytku aktivuje cofilin a translokuje jej do cytoplazmatické membrány (Suzuki et al., 1995), z čehož je možné usuzovat, že jaderná akumulace aktinu v senescentních fibroblastů LDF může být nedostatečnou defosforylací proteinů (zahrnující cofilin) (Lim et al., 2000).

### 3.2.1 Akumulace aktinu v jádře.

Aktinové izoformy ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) zahrnují signalizační sekvence pro jaderný export (NES) bohaté na leucin. Tyto sekvence jsou zodpovědné za export monomerního aktinu z jádra do cytoplazmy. Jejich narušení odhalilo vyšší expresi aktinových vláken uvnitř jádra u SWISS 3T3 a krysích 3Y1 fibroblastů. Navíc byl zjištěn snížený proliferační potenciál buněk obsahujících aktin s mutovanou signální sekvencí NES (Wada et al., 1998). Toto poznání koreluje s pozorováním akumulace aktinu u senescentních LDF buněk a předčasně senescentních buněk s mutovanou GTPázou H-Ras (Lim et al., 2000), která je zapojena do regulace buněčného dělení a odpovědi na růstové stimulační faktory.

### 3.2.2 Reorganizace aktinu asociována s RhoA

Proteiny rodiny Rho jsou regulátory signálních drah regulujících organizaci aktinového cytoskeletu a jsou členy super-rodiny Ras. Rodina Rho malých GTPáz zahrnuje RhoA, RhoB, RhoC, RhoG a Rac1/CDC42 (Zohn et al., 1998).

Rac1 slouží jako regulátor buněčné senescence skrze modulaci reaktivních kyslíkových molekul (ROS), stability genomu a aktivity p53 (Debidida et al., 2006).

Vyvolané poškození DNA je asociováno s aktin-regulačním proteinem RhoA a s fosforylací mitogen aktivované protein kinázy (MAPK) p38 a odpověď na indukci RhoA aktivace se liší podle buněčného typu (Frisan et al., 2003).

Tyrosin kináza fosforyluje kinázu fokální adheze přes signalizaci RhoA. Byl popsán lidský protein FEN1, regulující opravy DNA a endocytózu, jako interakční partner RhoA. Ten reguluje fosforylací p38 (MAPK), RhoA aktivaci a reorganizaci aktinu po poškození DNA (Guerra et al., 2011). Vizualizace aktinového cytoskeletu u myších primárních embryonálních fibroblastů deficientních na dematin ukázala časově závislé změny formace stresových vláken, buněčné motility (spontální pohyb), buněčné adheze a tvorby membránových výčnělků. Aktivita RhoA je tedy závislá na přítomnosti demantinu (Mohseni & Chishti, 2008).

Ke studiu změn aktinového cytoskeletu, vyskytujících se při buněčné senescenci navozené H-ras mutantními proteiny a také změny malých G-proteinů spřažené se senescencí, byly použity lidské diploidní fibroblasty (LDF) a různé stabilní linie mutantů H-ras, navozené infekcí LDF retroviru. Na těchto liniích byl zkoumán efekt dvojité mutace H-Ras na rychlost růstu, expresi senescenčních markerů, pErk1/2 exprese a lokalizace aktinu, Rac1, RhoA. Předčasná senescence indukovaná dvojitou mutací H-ras se ukázala být úzce spojena se změnami intracelulárních translokací signálních molekul a také s dysregulací MEK dráhy (Lim et al., 2000).

Po vyvolání poškození DNA cytotoxinem CDT (cytotoxin letálně rozšiřující buňku) (Gelfanova et al., 1999) byl pozorován vznik stresových vláken (Cortes-Bratti et al., 1999).

### 3.2.3 Fokální adheze

Fokální adheze (FA) je rozsáhlý makromolekulární proteinový komplex tvořící spoj mezi extracelulární matrix a aktinovým cytoskeletem buňky. Aktin a proteiny FA dohromady tvoří buněčnou konstrukci (Gumbiner, 1996) a jsou lokalizovány v blízkosti plazmatické membrány.

Aktinová filamenta se spojují do svazků a tvoří myšičvoří stresová vlákna, které vedou příčně skrz buňku, udržují ji ve spojení se substrátem skrz FA a jsou hlavními složkami cytoskeletární sítě (Hotulainen & Lappalainen, 2006).

FA plní mechanickou a senzitivní funkci zahrnující reverzibilní ukotvení aktinového cytoskeletu k extracelulární matrix při migraci a zjišťování intracelulárního a extracelulárního napětí (Wehrle-Haller & Imhof, 2002).

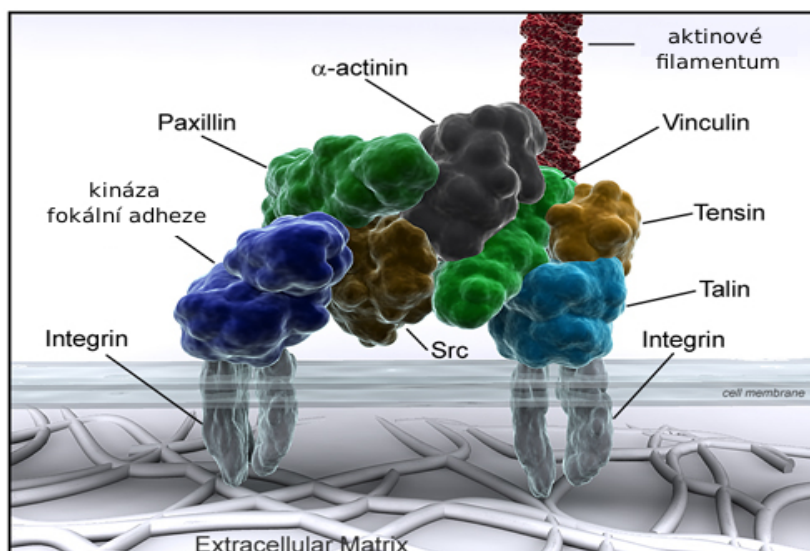
Přenos signálu mezi buňkou a extracelulární matrix je zprostředkován receptorovými proteiny, jako jsou například integriny, schopné vazby proteinů extracelulární matrix (kolagen, fibronektin, laminin, apod.), díky aktivaci molekul tyrosin-kináz asociovaných s integrinovými receptory (SRC, FAK).

Variabilní charakteristické znaky a signální dráhy MAPK a RalGDS se objevující u senescentních buněk a naznačují spojitost s organizací aktinového cytoskeletu, fokálními adhezemi mezi buňkami, extracelulární matrix a s tím spojenou signální transdukcí (Lim et al., 2000).

FA je tvořena kinázou fokální adheze (FAK) a proteiny jako jsou paxillin, vinculin, c-Src, talin. Na obrázku 8 je znázorněno uspořádání hlavních proteinů vyskytujících se v komplexu fokální adheze.

Paxillin a Hic-5 jsou proteiny z III skupiny LIM doménové proteinové rodiny a vyskytují se v jádře a FA, kde spojují integrinem zprostředkovanou signalizaci. Hic-5 se váže na FAK přes N-koncovou doménu a je připojen k fokální adhezi přes C-koncovou doménu LIM. Hic-5 se vyskytuje u senescentních lidských fibroblastů a jeho overexprese vyvolává u normálních buněk senescentní fenotyp (Fujita et al., 1998).

Je popsána změna lokalizace FAK, paxillinu a talinu v průběhu stárnutí u myšič fibroblastů, avšak tyto fibroblasty se nenacházejí ve stavu senescence (Arnesen & Lawson, 2006).



Obrázek 8: Schéma fokální adheze. Převzato z (www.reading.ac.uk)

Ačkoliv není mnoho známo o specifické roli paxillinu a Hic-5 v regulaci signalizace fokální adheze a genové exprese v mozku, byla zde popsána jejich negenomická role. Např. paxillin je rychle fosforylován v přítomnosti fibrilárního  $\beta$  amyloidu a kolokalizuje s hyperfosforylovaným Tau v kultuře neuronových buněk. Tato měnící se subcelulární distribuce zvyšuje turnover (obrat) fokální adheze a mění buněčnou mobilitu a plasticitu asociovanou se ztrátou synaptické integrity (Grace & Busciglio, 2003). Změněná subcelulární distribuce Hic-5, paxillinu a fosforylovaných izoform paxillinu byla pozorována také u mozku s Alzheimerovou chorobou (Caltagarone et al., 2010). Studie *in vitro* spojují paxillin s buněčnou smrtí indukovanou  $\beta$  amyloidem.

Mezi proteiny buněčného lešení (scaffold proteiny) zapojené do regulace cytoskeletární architektury patří také AKAP12, který kontroluje buněčnou migraci, proliferaci a cytokinezi. Buňky deficientní na AKAP12 mají zahuštěná a polarizovaná F-aktinová stresová vlákna a nárůst počtu transverzních FA. AKAP12 je zapojen do FAK zprostředkované signalizace a indukuje integrin nezávislé fosforylace tyrosinu na FAK v suspenzních kulturách (Akakura & Gelman, 2012).

### 3.3 Intermediální filamenta

Střední filamenta označována také jako intermediální (IF) jsou rozmanitou skupinou cytoskeletárních proteinů se specifickou expresí závislou na typu tkáně. IF se sestavují do 8 až 10 nm filament, která tvoří rozsáhlou síť nejen v cytoplazmě, kde zajišťují mechan-

ickou pevnost. Oproti tomu například laminy specificky formující mřížovou strukturu na vnitřní straně jaderné membrány. Mimo laminových monomerních podjednotek mezi intermediální filamenta řadíme také keratiny (specifické pro epiteliální buňky), vimentin (u buněk mezenchymálního původu), desmin u svalových buněk a neurofilamenta vyskytující se u neuronů, jak je patrné z tabulky 1.

Typ	Proteiny	velikost [kDa]	Místo exprese
I	kyselé keratiny	40-60	epiteliální buňky
II	neutrální/basické keratiny	50-70	epiteliální buňky
III	vimentin	54	fibroblasty, leukocyty a další.
	desmin	53	svalové buňky
	fibrilární kyselé proteiny	51	gliové buňky
	periferin	57	periferní neurony
IV	neurofilamenta	60 - 200	neurony
V	jaderné laminy	60-75	jaderná lamina všech buněčných typů
VI	nestin	200	kmenové buňky centrálního nervového systému

Tabulka 1: Přehled typů proteinů zastoupených v intermediálních filamentech

U senescentních buněk dochází k výraznému zvýšení exprese vimentinu (Nishio et al., 2001; Nishio & Inoue, 2005), který tvoří husté svazky filament orientované paralelně s osou buněčného těla. Oproti tomu u mladých nebo aktivně rostoucích buněk fibroblastů se vyskytují ve formě krátkých a tenkých filament nebo nepravidelných sítí. Senescentní lidské fibroblasty manifestují široké svazky vimentinových filament s nízkou lokomoční (pohybovou) aktivitou, čemuž odpovídá zvětšení plochy buňky a oploštění jejího tvaru (Wang, 1985). Množství vimentinu narůstá u senescentních fibroblastů až do jedné čtvrtiny hmotnosti buňky. Tento nárůst je charakteristický pro morfologii senescentní buňky (Nishio et al., 2001).

Vimentin je cíleně modifikován glykací<sup>4</sup> na lysinových zbytcích. Modifikace vimentinu je založena na vnitřních strukturních vlastnostech této molekuly a ne na poločase životnosti či intracelulární lokalizaci. Je též doprovázena ztrátou kontraktilní funkce. Modifikace vimentinu určuje redistribuci CML-vimentinu do perinukleárních agregátů, které se označují jako agresomy. Ukázalo se, že akumulace modifikovaného vimentinu se objevuje u fibroblastů kůže in vivo získaných od starších dárců (Kueper et al., 2007).

<sup>4</sup>Neenzymatické připojení cukernatých zbytků. Dříve označováno jako neenzymatická glykosylace.



Senescentní buňky vykazují nadprodukcí tumor supresorového proteinu p53, který se účastní při blokaci buněčného cyklu v G1 fázi (Kulju & Lehman, 1995). Ačkoliv senescentní buňky nadprodukují tento signální protein k programované buněčné smrti, jsou schopny dále přežívat. Nabízí se několik variant jak se senescentní buňka vyhýbá apoptóze. Může modifikovat p53 na latentní formu, nebo měnit jeho buněčnou lokalizaci a tím se vyhnout apoptóze závislé na signalizaci proteinem p53 (Nishio & Inoue, 2005). Některé teplotně senzitivní mutanty p53 se v určitých nádorových buňkách uchycují k intermediálním vimentinovým filamentům (Klotzsche et al., 1998).

### 3.4 Organizace cytoskeletárních proteinů v senescentní buňce

Studie naznačují zapojení cytoskeletárních proteinů do morfologických změn spojených s indukovanou senescencí (Guerra et al., 2011; Litwiniec et al., 2010; Carlsson et al., 2003; Chen et al., 2000; Wang, 1985). Například aplikace etoposidu neindukuje pouze změny ve tvaru a velikosti buňky, ale také heterogenitu formy a cytoplazmatickou organizaci vimentinových intermediálních filament (Litwiniec et al., 2013). Buňky přivedené do senescence vystavením doxorubicinu nevykazují výrazné změny oproti neošetřeným lidským buňkám adenokarcinomu plic linie A549 z čehož lze usuzovat na vyšší stabilitu G-aktinu oproti vimentinu (Litwiniec et al., 2010).

U senescentní buňky dochází k potlačení transkripce řady genů, z nichž mnohé jsou zapojeny do buněčné proliferace. Řada jiných genů je oproti tomu exprimována. Například geny pro kolagen I typu, fibronektin, IGFBP-3 (Murano et al., 1991).

Senescentní buňky vytvářejí dlouhé a husté vimentinové sítě, jejich aktinová vlákna jsou dlouhá a tenká. Oproti mladým buňkám mají množství fokálních kontaktních míst (Nishio & Inoue, 2005).

Pozměněná exprese vimentinu a  $\alpha$ -tropomyosinu byla pozorována i u telomerázou immortalizovaných buněčných kultur BMEC (agresivní endoteliální buňky derivované z maligního angiosarkomu pocházející z linie buněk kostní dřeně). Tyto buňky bez exprimovaného p16INK4a mají sklon k dramatickým změnám cytoskeletárních proteinů, které se vyznačují silnějšími aktinovými vlákny a menší membránovou fluiditou. Potlačení exprese p16INK4a vedou k defektům buněčné motility, morfogenezi a organizaci cytoskeletu. Tyto defekty částečně reflektují změny vyskytující se při vývoji malignit odvozených od endoteliálních buněk (Kan et al., 2012).

## 4 Závěr

Buňka je schopna aktivně reagovat na buněčný stres. Organizace cytoskeletárních proteinů je dobře popsána u různých buněčných typů proliferujících buněk. Změny cytoskeletu vyskytující se u buněk ve stavu senescence jsou předmětem zájmu posledních několika let.

Ukázalo se, že dochází ke změnám u všech třech typů cytoskeletárních struktur. Jejich mechanismus a význam zatím není zcela objasněn, ale je předmětem současného výzkumu.

V budoucnosti by bylo přínosné pokusit se objasnit dynamiku změn uspořádání mikrotubulárních struktur v časovém horizontu od mladých buněk přes pre-senescentní až po senescentní buňky.

Také není jasné, z jakého důvodu dochází ke snížení obsahu  $\beta$ -tubulinu v senescentní buňce a zda je tento trend opravdu přítomný u všech buněčných linií. Současné výsledky ukazují na změnu, ale zatím se nepodařilo prokázat, zda dochází ke snížení detekovaného tubulinu z důvodu exprese jiné izoformy, či zda je tento jev odrazem postranlačních modifikací na koncích tubulinu. Dosud byly popsány modifikace pouze u normálních buněk, a to převážně na C-konci.

Výzkum specifit a změn cytoskeletu senescentních buněk je zdrojem zajímavých poznatků u nichž je potenciál praktické aplikace, například ve smyslu cílené léčby manipulací s cytoskeletárním systémem senescentní buňky a jejího okolí.

## 5 Seznam zkratek

ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	Serine/threonine protein-kinase ATR
CDKIs	cyklin-dependent protein kinase inhibitors
CDKN2A	cyklin-dependent kinase inhibitor p16INK4a
CHK2	serine/threonine protein kinase
DDR	DNA damage response
DNA-SCARF/TIF	DNA segment with alteration reinforcing foci
DNA-SCARS	DNA segments with chromatin alteration reinforcing senescence
DSB	double strand breaks
EMT	epithelial-to-mesenchymal trans-differentiation
HPKO	dematin headpiece knockout
IGF	insulin grow factor
IGFBP	insulin grow factor binding protein
IL-6	interleukin 6
LDF	HDF - human diploid fibroblast
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
MTOC	microtubule-organizing center
pRb	retinoblastoma-associated protein <sup>5</sup>
PTM	post-translational modification
ROS	reactive oxygen species
SA- $\beta$ gal	senescence-associated $\beta$ -galactosidase
SAHF	senescence-associated heterochromatin foci
SAPK	stress-activated protein kinase family
SASP	senescence-associated secretory phenotype
TGF- $\beta$	transforming growth factors $\beta$
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor
ROS	reactive oxygen species
foci - léze, poškození	

---

<sup>5</sup><http://www.uniprot.org/uniprot/P13405>

## Použitá literatura

- Abrahamsen, G., Fan, Y., Matigian, N., Wali, G., Bellette, B., Sutharsan, R., Raju, J., Wood, S. a., Veivers, D., Sue, C. M., & Mackay-Sim, A. (2013). A patient-derived stem cell model of hereditary spastic paraplegia with SPAST mutations. *Disease models & mechanisms*, 502, 489–502.
- Akakura, S. & Gelman, I. H. (2012). Pivotal Role of AKAP12 in the Regulation of Cellular Adhesion Dynamics: Control of Cytoskeletal Architecture, Cell Migration, and Mitogenic Signaling. *Journal of signal transduction*, 2012, 529179.
- Arnesen, S. M. & Lawson, M. a. (2006). Age-related changes in focal adhesions lead to altered cell behavior in tendon fibroblasts. *Mechanisms of ageing and development*, 127(9), 726–32.
- Bartkova, J., Horejsí, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J. M., Lukas, C., Ø rntoft, T., Lukas, J., & Bartek, J. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 434(7035), 864–70.
- Beauséjour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P., & Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO journal*, 22(16), 4212–22.
- Ben-Porath, I. & Weinberg, R. a. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(5), 961–76.
- Bennett, M. R., Macdonald, K., Chan, S.-W., Boyle, J. J., & Weissberg, P. L. (1998). Cooperative Interactions Between RB and p53 Regulate Cell Proliferation, Cell Senescence, and Apoptosis in Human Vascular Smooth Muscle Cells From Atherosclerotic Plaques. *Circulation Research*, 82(6), 704–712.
- Bhat, R., Crowe, E. P., Bitto, A., Moh, M., Katsetos, C. D., Garcia, F. U., Johnson, F. B., Trojanowski, J. Q., Sell, C., & Torres, C. (2012). Astrocyte senescence as a component of Alzheimer’s disease. *PloS one*, 7(9), e45069.
- Caltagarone, J., Hamilton, R. L., Murdoch, G., Jing, Z., DeFranco, D. B., & Bowser, R. (2010). Paxillin and hydrogen peroxide-inducible clone 5 expression and distribution in control and Alzheimer disease hippocampi. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 69(4), 356–71.

- Campisi, J. (1997). The biology of replicative senescence. *European Journal of Cancer*, 33.
- Campisi, J. (2011). Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Current opinion in genetics & development*, 21(1), 107–112.
- Campisi, J. & d’Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), 729–40.
- Carlsson, S. I., Bertilaccio, M. T., Ballabio, E., & a.M. Maier, J. (2003). Endothelial stress by gravitational unloading: effects on cell growth and cytoskeletal organization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1642(3), 173–179.
- Chao, S. K., Lin, J., Brouwer-Visser, J., Smith 3rd, A. B., Horwitz, S. B., & McDaid, H. M. (2011). Resistance to discodermolide, a microtubule-stabilizing agent and senescence inducer, is 4E-BP1-dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(1), 391–396.
- Chen, Q. M., Tu, V. C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O., & Dilley, T. (2000). Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *Journal of cell science*, 113 (Pt 2), 4087–97.
- Chu, C.-W., Hou, F., Zhang, J., Phu, L., Loktev, A. V., Kirkpatrick, D. S., Jackson, P. K., Zhao, Y., & Zou, H. (2011). A novel acetylation of  $\beta$ -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Molecular biology of the cell*, 22(4), 448–56.
- Coppé, J.-P., Rodier, F., Patil, C. K., Freund, A., Desprez, P.-Y., & Campisi, J. (2011). Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *The Journal of biological chemistry*, 286(42), 36396–403.
- Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Lagergård, T., & Thelestam, M. (1999). The cytotoxic distending toxin from the chancroid bacterium *Haemophilus ducreyi* induces cell-cycle arrest in the G2 phase. *The Journal of clinical investigation*, 103(1), 107–15.
- d’Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P., & Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963), 194–8.
- de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development*, 19(18), 2100–10.

- Debidda, M., Williams, D. a., & Zheng, Y. (2006). Rac1 GTPase regulates cell genomic stability and senescence. *The Journal of biological chemistry*, *281*(50), 38519–28.
- Derynck, R., Akhurst, R. J., & Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genetics*, *29*(2), 117–129.
- Di Leonardo, a., Linke, S. P., Clarkin, K., & Wahl, G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & Development*, *8*(21), 2540–2551.
- Dimri, G. & Itahana, K. (2000). Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14ARF tumor suppressor. *Molecular and cellular . . .*, *20*(1), 273–285.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(20), 9363–7.
- Dulic, V. (2013). Cell Senescence. *965*.
- Evans, K. J., Gomes, E. R., Reisenweber, S. M., Gundersen, G. G., & Luring, B. P. (2005). Linking axonal degeneration to microtubule remodeling by Spastin-mediated microtubule severing. *The Journal of cell biology*, *168*(4), 599–606.
- Evans, L., Mitchison, T., & Kirschner, M. (1985). Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *The Journal of cell biology*, (19).
- Fourest-Lieuvin, A. & Peris, L. (2006). Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Molecular biology of . . .*, *17*(March), 1041–1050.
- Frisan, T., Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Stenerlow, B., & Thelestam, M. (2003). The Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cellular Microbiology*, *5*(10), 695–707.
- Fujita, H., Kamiguchi, K., Cho, D., Shibanuma, M., Morimoto, C., & Tachibana, K. (1998). Interaction of Hic-5, A senescence-related protein, with focal adhesion kinase. *The Journal of biological chemistry*, *273*(41), 26516–21.
- Gaertig, J. (2000). Molecular mechanisms of microtubular organelle assembly in Tetrahymena. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *47*(3), 185–190.

- Gelfanova, V., Hansen, E., & Spinola, S. (1999). Cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* induces apoptotic death of Jurkat T cells. *Infection and immunity*, *67*(12), 6394–6402.
- Gendron, T. F. & Petrucelli, L. (2009). The role of tau in neurodegeneration. *Molecular neurodegeneration*, *4*, 13.
- Gil, J. & Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *7*(9), 667–77.
- Grace, E. a. & Busciglio, J. (2003). Aberrant activation of focal adhesion proteins mediates fibrillar amyloid beta-induced neuronal dystrophy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *23*(2), 493–502.
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., Lange, T. D., Comprehensive, L., & Hill, C. (1999). Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *97*, 503–514.
- Groth-Pedersen, L., Ostefeld, M. S., Hoyer-Hansen, M., Nylandsted, J., & Jaattela, M. (2007). Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. *Cancer Res*, *67*(5), 2217–2225.
- Guerra, L., Guidi, R., Slot, I., Callegari, S., Sompallae, R., Pickett, C. L., Å ström, S., Eisele, F., Wolf, D., Sjögren, C., Masucci, M. G., & Frisan, T. (2011). Bacterial genotoxin triggers FEN1-dependent RhoA activation, cytoskeleton remodeling and cell survival. *Journal of cell science*, *124*(Pt 16), 2735–42.
- Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, *84*(3), 345–57.
- Han, N.-k., Byun, H.-o., Kim, S.-s., Ahn, E.-k., Chu, I.-s., Leem, S.-h., Lee, C.-k., Lee, J.-s., & Sciences, M. (2010). Time-dependently expressed markers and the characterization for premature senescence induced by ionizing radiation in MCF7. *Oncology Reports*, *24*(2), 395–403.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, *636*, 614–636.
- Hayflick, L. & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, *25*, 585–621.

- Honnappa, S., Okhrimenko, O., Jaussi, R., Jawhari, H., Jelesarov, I., Winkler, F. K., & Steinmetz, M. O. (2006). Key interaction modes of dynamic +TIP networks. *Molecular cell*, *23*(5), 663–71.
- Höög, G., Zarrizi, R., von Stedingk, K., Jonsson, K., & Alvarado-Kristensson, M. (2011). Nuclear localization of  $\gamma$ -tubulin affects E2F transcriptional activity and S-phase progression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *25*(11), 3815–27.
- Hotulainen, P. & Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *The Journal of cell biology*, *173*(3), 383–94.
- Hořejší, B., Vinopal, S., Sládková, V., Dráberová, E., Sulimenko, V., Sulimenko, T., Vosecká, V., Philimonenko, A., Hozák, P., Katsetos, C. D., & Dráber, P. (2012). Nuclear  $\gamma$ -tubulin associates with nucleoli and interacts with tumor suppressor protein C53. *Journal of cellular physiology*, *227*(1), 367–82.
- Iida, K., Matsumoto, S., & Yahara, I. (1992). The KKRKK sequence is involved in heat shock-induced nuclear translocation of the 18-kDa actin-binding protein, cofilin. *Cell structure and function*, *17*(1), 39–46.
- Jackson, J. G. & Pereira-Smith, O. M. (2006). p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts. *Cancer research*, *66*(17), 8356–60.
- Janke, C. & Chloë Bulinski, J. (2012). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(4), 276.
- Kan, C.-Y., Wen, V. W., Pasquier, E., Jankowski, K., Chang, M., Richards, L. a., Kavaliris, M., & MacKenzie, K. L. (2012). Endothelial cell dysfunction and cytoskeletal changes associated with repression of p16(INK4a) during immortalization. *Oncogene*, *31*(46), 4815–27.
- Kassem, M., Ankersen, L., & Eriksen, E. (1997). Demonstration of cellular aging and senescence in serially passaged long-term cultures of human trabecular osteoblasts. *Osteoporosis . . .*, 514–524.
- Klein, L. E., Freeze, B. S., Smith 3rd, A. B., & Horwitz, S. B. (2005). The microtubule stabilizing agent discodermolide is a potent inducer of accelerated cell senescence. *Cell Cycle*, *4*(3), 501–507.



- Klotzsche, O., Etzrodt, D., Hohenberg, H., Bohn, W., & Deppert, W. (1998). Cytoplasmic retention of mutant *tsp53* is dependent on an intermediate filament protein (vimentin) scaffold. *Oncogene*, *16*(26), 3423–34.
- Kueper, T., Grune, T., Prahl, S., Lenz, H., Welge, V., Biernoth, T., Vogt, Y., Muhr, G.-M., Gaemlich, A., Jung, T., Boemke, G., Elsässer, H.-P., Wittern, K.-P., Wenck, H., Stäb, F., & Blatt, T. (2007). Vimentin is the specific target in skin glycation. Structural prerequisites, functional consequences, and role in skin aging. *The Journal of biological chemistry*, *282*(32), 23427–36.
- Kulju, K. & Lehman, J. (1995). Increased p53 protein associated with aging in human diploid fibroblasts. *Experimental cell research*.
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of cell science*, *113* ( Pt 2, 3613–22.
- Lacroix, B., Dijk, J. V., & Gold, N. (2010). Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *The Journal of cell . . .*, *189*(6), 945–954.
- Lehmann, B. D., McCubrey, J. A., Jefferson, H. S., Paine, M. S., Chappell, W. H., & Terrian, D. M. (2007). A dominant role for p53-dependent cellular senescence in radiosensitization of human prostate cancer cells. *Cell Cycle*, *6*(5), 595–605.
- Lesca, C., Germanier, M., Raynaud-Messina, B., Pichereaux, C., Etievant, C., Emond, S., Burlet-Schiltz, O., Monsarrat, B., Wright, M., & Defais, M. (2005). DNA damage induce gamma-tubulin-RAD51 nuclear complexes in mammalian cells. *Oncogene*, *24*(33), 5165–72.
- Lim, I. K., Won Hong, K., Kwak, I. H., Yoon, G., & Park, S. C. (2000). Cytoplasmic retention of p-Erk1/2 and nuclear accumulation of actin proteins during cellular senescence in human diploid fibroblasts. *Mechanisms of ageing and development*, *119*(3), 113–30.
- Lin, a. W., Barradas, M., Stone, J. C., van Aelst, L., Serrano, M., & Lowe, S. W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes & development*, *12*(19), 3008–19.
- Litwiniec, A., Gackowska, L., Helmin-Basa, A., Ury, A., & Grzanka, A. (2013). Low-dose etoposide-treatment induces endoreplication and cell death accompanied by cytoskeletal alterations in A549 cells. Does the response involve senescence? The possible role of vimentin. *Cancer cell international*, *13*(1), 9.

- Litwiniec, A., Grzanka, A., Helmin-Basa, A., Gackowska, L., & Grzanka, D. (2010). Features of senescence and cell death induced by doxorubicin in A549 cells: organization and level of selected cytoskeletal proteins. *Journal of cancer research and clinical oncology*, *136*(5), 717–36.
- Mao, Z., Ke, Z., Gorbunova, V., & Seluanov, A. (2012). Replicatively senescent cells are arrested in G1 and G2 phases. *Aging*, *4*(6), 431–5.
- McNally, F. J. & Vale, R. D. (1993). Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell*, *75*(3), 419–29.
- Mohseni, M. & Chishti, A. H. (2008). The headpiece domain of dematin regulates cell shape, motility, and wound healing by modulating RhoA activation. *Molecular and cellular biology*, *28*(15), 4712–8.
- Moon, A. & Drubin, D. (1995). The ADF/cofilin proteins: stimulus-responsive modulators of actin dynamics. *Molecular biology of the cell*, *6*(November), 1423–1431.
- Moriyama, K., Iida, K., & Yahara, I. (1996). Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, *1*(1), 73–86.
- Muller, H. & Fogeron, M. (2006). A Centrosome-Independent Role for  $\gamma$ -TuRC Proteins in the Spindle Assembly Checkpoint. *Science ...*, (October).
- Murano, S., Thweatt, R., Reis, R. J. S., Jones, R. A., Moerman, E. J., & Goldstein, S. (1991). Diverse gene sequences are overexpressed in werner syndrome fibroblasts undergoing premature replicative senescence. *Molecular and cellular biology*, *11*(8), 3905–3914.
- Nishio, K. & Inoue, A. (2005). Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts. *Histochemistry and Cell Biology*, *123*(3), 263–273.
- Nishio, K., Inoue, a., Qiao, S., Kondo, H., & Mimura, a. (2001). Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. *Histochemistry and cell biology*, *116*(4), 321–7.
- Novakova, Z., Hubackova, S., Kosar, M., Janderova-Rossmeislova, L., Dobrovolna, J., Vasicova, P., Vancurova, M., Horejsi, Z., Hozak, P., Bartek, J., & Hodny, Z. (2010). Cytokine expression and signaling in drug-induced cellular senescence. *Oncogene*, *29*(2), 273–84.

- Rebbaa, A., Zheng, X., Chou, P. M., & Mirkin, B. L. (2003). Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene*, *22*(18), 2805–2811.
- Rodier, F., Muñoz, D. P., Teachenor, R., Chu, V., Le, O., Bhaumik, D., Coppé, J.-P., Campeau, E., Beauséjour, C. M., Kim, S.-H., Davalos, A. R., & Campisi, J. (2011). DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *Journal of cell science*, *124*(Pt 1), 68–81.
- Rosenblatt, J., Agnew, B. J., Abe, H., Bamburg, J. R., & Mitchison, T. J. (1997). Actin Depolymerizing Factor/Cofilin (XAC) Is Responsible for the Turnover of Actin Filaments in. *136*(6), 1323–1332.
- Schiebel, E. (2000). Gamma-Tubulin Complexes: Binding To the Centrosome, Regulation and Microtubule Nucleation. *Current opinion in cell biology*, *12*(1), 113–8.
- Starita, L. & Machida, Y. (2004). BRCA1-dependent ubiquitination of  $\gamma$ -tubulin regulates centrosome number. *Molecular and cellular biology and cellular biology*, *24*(19), 8457–8466.
- Stearns, T., Evans, L., Kirschner, M., & Francisco, S. (1991).  $\gamma$ -Tubulin Is a Highly Conserved Component of the Centrosome. *Cell*, *65*, 625–636.
- Suzuki, K., Yamaguchi, T., & Tanaka, T. (1995). Activation induces dephosphorylation of cofilin and its translocation to plasma membranes in neutrophil-like differentiated HL-60 cells. *Journal of Biological . . . .*
- Theriot, J. a. (1997). Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *The Journal of cell biology*, *136*(6), 1165–8.
- Trimarchi, J. M. & Lees, J. a. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *3*(1), 11–20.
- Untergasser, G., Gander, R., Rumpold, H., Heinrich, E., Plas, E., & Berger, P. (2003). TGF-beta cytokines increase senescence-associated beta-galactosidase activity in human prostate basal cells by supporting differentiation processes, but not cellular senescence. *Exp Gerontol*, *38*(10), 1179–1188.
- Verhey, K. J. & Gaertig, J. (2007). The tubulin code. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *6*(17), 2152–60.

- Wada, a., Fukuda, M., Mishima, M., & Nishida, E. (1998). Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *The EMBO journal*, *17*(6), 1635–41.
- Wagner, M., Hampel, B., Bernhard, D., Hala, M., Zwerschke, W., & Jansen-du, P. (2001). Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. *36*, 1327–1347.
- Wang, C., Jurk, D., Maddick, M., Nelson, G., Martin-Ruiz, C., & von Zglinicki, T. (2009). DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging cell*, *8*(3), 311–23.
- Wang, E. (1985). Are cross-bridging structures involved in the bundle formation of intermediate filaments and the decrease in locomotion that accompany cell aging? *The Journal of cell biology*, *100*(5), 1466–73.
- Wehrle-Haller, B. & Imhof, B. (2002). The inner lives of focal adhesions. *Trends in cell biology*, *12*(8), 382–9.
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, a., Kangawa, K., Nishida, E., & Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*, *393*(6687), 809–12.
- Zohn, I. M., Campbell, S. L., Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., & Der, C. J. (1998). Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene*, *17*(11 Reviews), 1415–38.
- \* podle (Untergasser et al., 2003)

## Seznam internetových zdrojů

(www.uniprot.org, 2013a)[online]. 2002,[cit.2013-4-9]. Dostupné z: <www.uniprot.org/uniprot/P42771>

(www.uniprot.org, 2013b)[online]. 2002,[cit.2013-4-9]. Dostupné z: <www.uniprot.org/uniprot/P38936>

(www.reading.ac.uk)Cell migration lab.*Focal adhesion* [online].University of Reading,[cit.2013-5-15]. Dostupné z: <http://www.reading.ac.uk/cellmigration/adhesion.htm>