

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Ján Valášek

Možná úloha proteinu DAXX v zástavě buněčného cyklu a buněčné senescenci

A potential role of DAXX in cell cycle arrest and cellular senescence

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Hana Hanzlíková, Ph.D.

Praha, 2014

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 dne 14. 8. 2014

.....
Ján Valášek

Rád bych poděkoval své školitelce Mgr. Haně Hanzlíkové, Ph.D. za trpělivost, odborné vedení a cenné rady, které mi velice pomohly v průběhu vypracování této diplomové práce. Chtěl bych také poděkovat vedoucímu laboratoře MUDr. Zdeňku Hodnému, CSc. za kreativní podněty a pomoc při korekci. Dále pak Mgr. Janu Bražinovi z laboratoře Buněčné signalizace a apoptózy za přípravu transdukovaných buněk nutných pro mé experimenty. Děkuji i všem členům laboratoře Genomové integrity za vstřícný a ochotný přístup při poskytování rad a pomoci v průběhu dvou let, které jsem s nimi strávil.

V neposlední řadě děkuji své přítelkyni Silvii Hrubé, své rodině a přátelům za pomoc a podporu během celé doby mého studia.

Abstrakt

Death domain-associated protein 6 (DAXX) je multifunkčním proteinem, který se účastní rozličných buněčných procesů. Funguje jako regulátor transkripce, histonový chaperon nebo regulátor apoptózy, ve které je jeho úloha dosti kontroverzní. Účastní se také regulace odpovědi buňky na poškození DNA (DDR). Vytváří a stabilizuje komplex s Mdm2, který negativně reguluje stabilitu významného nádorového supresoru p53. Ten je součástí signalizačního uzlu v DDR. Pokud není poškození DNA pro buňku letální a současně neumožňuje pokračovat v proliferaci, dochází ke stavu nevratné zástavy buněčného cyklu, tzv. buněčné senescenci. Za fyziologických podmínek může navození senescence zabraňovat rozvoji tumorigeneze. Proto má popis mechanismů, které se podílejí na navození senescence, potenciální klinický význam.

Cílem mé diplomové práce bylo stanovit změnu množství proteinu DAXX v senescentních buňkách a charakterizovat způsob jeho regulace. V nádorových buňkách MCF-7 a primárních BJ fibroblastech jsem pozoroval snížení hladiny proteinu DAXX a regulaci jeho množství na proteinové úrovni. Otestoval jsem hypotézy, podle kterých navýšení jeho množství před poškozením DNA zabrání vstupu buňky do senescence, nebo zvýšení jeho exprese v senescenci způsobí obnovu buněčné proliferace. Obě hypotézy byly zamítnuty. Bylo by třeba provést další experimenty, aby se stanovilo, jestli změna exprese proteinu DAXX má vliv na obnovu buněčného cyklu v senescentních buňkách.

Nicméně, kvůli výzkumným zájmům naší laboratoře jsem obdobně analyzoval hladinu fosfatázy Wip1, která funguje v negativní zpětné vazbě při DDR. Stanovil jsem, že stejně jako u proteinu DAXX dochází ke snížení její hladiny v senescentních buňkách. Současně je regulována na proteinové i transkripční úrovni. Určení funkčního významu úbytku fosfatázy Wip1 by mohlo přispět k rozšíření poznatků o negativní regulaci DDR v senescenci.

Klíčová slova: DAXX, DDR, Mdm2, p21, p53, PML, senescence, Wip1

Abstract

Death domain-associated protein 6 (DAXX) is a multifunctional protein involved in diverse cellular processes. It acts as a histone chaperone or regulator of transcription and apoptosis, in which is its role quite controversial. DAXX also participates in regulation of cell DNA damage response (DDR). DAXX co-creates and stabilizes complex with Mdm2, which negatively regulates the stability of p53, an important tumor suppressor, which is a part of signalling node in the DDR. If DNA damage is not lethal for the cell and enables it to proliferate, the irreversible state of cell cycle called cellular senescence takes place. Under physiological conditions, induction of senescence can prevent the development of tumorigenesis. Therefore, the description of mechanisms involved in the induction of senescence has potential clinical significance.

In my thesis, I aimed to determine changes in the level of DAXX protein in senescent cells and to characterize the manner of its regulation. In tumor cells MCF-7 and primary BJ fibroblasts, I observed decrease in DAXX protein level and its regulation. I tested the hypothesis according to which an increase in DAXX level before DNA damage can prevent induction of cellular senescence, or increase in its expression during senescence can cause recovery of cell proliferation. Both hypotheses were rejected. It would be desirable to perform further experiments to determine if the change in expression of DAXX has an influence on the recovery of the cell cycle in senescence cells.

However, due to the research interests of our laboratory, I similarly analyzed the level of Wip1 phosphatase that acts in a negative feedback in the DDR. I established that as well as DAXX, its level is decreased in senescence cells. It is regulated on transcriptional and protein level simultaneously. Determining the functional significance of the loss of phosphatase Wip1 might contribute to the expansion of knowledge about the negative regulation of senescence in DDR.

Keywords: DAXX, DDR, Mdm2, p21, p53, PML, senescence, Wip1

Obsah

1. Úvod	13
2. Literární rešerše	14
2.1. Odpověď buňky na poškození DNA	14
2.2. Buněčná senescence	18
2.2.1. Protein promyelocytární leukémie – PML	21
2.2.2. Význam buněčné senescence	23
2.3. Protein DAXX (<i>Death domain-associated protein 6</i>)	24
2.3.1. Struktura proteinu DAXX	24
2.3.2. Lokalizace proteinu DAXX	26
2.3.3. Apoptóza a DAXX	27
2.3.4. DAXX jako transkripční regulátor	28
2.3.5. DAXX jako chaperon	29
2.3.6. DAXX a odpověď na poškození DNA	31
2.3.7. Buněčný cyklus a rakovina	33
3. Materiál a metody	35
3.1. Materiál	35
3.1.1. Použité chemikálie	35
3.1.2. Primery	36
3.1.3. Protilátky	37
3.1.4. Lidské buněčné linie a kultury	37
3.2. Metody	38
3.2.1. Kultivace tkáňových linií a kultur	38
3.2.1.1. Rozmrazení buněk	38
3.2.1.2. Kultivace buněk	38
3.2.1.3. Ošetření buněk	39
3.2.2. Sběr buněk na Western blot a měření koncentrace proteinů	39
3.2.3. SDS – PAGE (Polyakrylamidová gelová elektroforéza)	39
3.2.4. Western blot	40
3.2.5. Barvení SA- β -galaktosidázy	40
3.2.6. Nepřímá imunofluorescence	41
3.2.7. Přímá imunofluorescence a měření na průtokovém cytometru	41
3.2.8. Izolace RNA a kvantitativní Real-time RT-PCR	42

3.2.9. Lentivirová transdukce buněk RPE-1	43
4. Cíle diplomové práce	44
5. Výsledky	45
5.1. Snížení hladiny proteinu DAXX během rozvoje buněčné senescence	45
5.2. Stanovení způsobu regulace množství proteinu DAXX v senescentních buňkách	52
5.2.1. Pokles hladiny proteinu DAXX vykazuje pomalou kinetiku	52
5.2.2. Hladina mRNA DAXX se během senescence nemění	53
5.2.3. Množství proteinu DAXX je regulováno jeho degradací v proteazomu	54
5.3. Nadměrná exprese proteinu DAXX v senescentních buňkách RPE-1 nemá vliv na obnovení buněčné proliferace	55
5.4. Nadprodukce proteinu DAXX v proliferačně aktivních RPE-1 buňkách nemá vliv na navození buněčné senescence	57
5.5. Snížení hladiny proteinu fosfatázy Wip1 během rozvoje buněčné senescence	60
6. Diskuze	63
7. Souhrn	68
8. Seznam použité literatury	69

Seznam zkratek

53BP1	Vazebný protein 1 nádorového supresoru p53 (Tumor suppressor p53-binding protein 1)
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie (Acute lymphoblastic leukemia)
APC/C	Anafázi podporující komplex (Anaphase promoting complex)
APS	Peroxodisíran amonný (Ammonium persulfate)
ARF	Alternativní čtecí rámec (Alternate reading frame)
ASF1A	Histonový chaperon (Anti-silencing function 1A)
ASK1	Kináza regulující apoptotické signály (Apoptosis signal-regulating kinase 1)
ATM	Ataxia telangiectasia mutated kinase
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
ATRA	Kyselina retinová (All-Trans-Retinoic Acid)
ATRIP	ATR interagující protein (ATR-interacting protein)
ATRX	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked protein
BJ	Primární fibroblasty lidské předkožky
BRCA1	Breast cancer 1
BrdU	5-brom-2'-deoxyuridin
BSA	Hovězí sérový albumin (Bovine serum albumine)
CBP	CREB vázající protein (CREB-binding protein)
Cdc2	Cyklin dependentní kináza 1 (Cell division cycle protein 2 homolog)
Cdc20	Cell-division cycle protein 20
CDC25C	Cell division cycle 25C
Cdh1	Cdc20 homologue-1
CDK	Cyklin dependentní kináza (Cycline dependent kinase)
cDNA	komplementární DNA (complementary DNA)

CDT	Cytoletální distenzní toxin (Cytotoxic distending toxin)
CENP-A	Centromerický protein A (Centromere protein A)
CHFR	Checkpoint with forkhead and ring finger domains
Chk1	Checkpoint kinase 1
Chk2	Checkpoint kinase 2
CPT	Kamptotecin (Camptothecin)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DAXX	Death domain-associated protein 6
ddH ₂ O	Dvkrát destilovaná voda
DDR	Odpověď na poškození DNA (DNA damage response)
DHB	DAXX helix bundle
DMAP1	DNMT1 asociovaný protein (DNMT1-associated protein)
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMT-1	DNA methyltransferáza 1 (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1)
Dox	Doxycyklin
Doxo	Doxorubicin
DTT	Dithiotreitol
E2F	Rodina transkripčních faktorů
ECM	Extracelulární matrix
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridin
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
Fas	Receptor Fas
FBS	Fetální hovězí sérum (Fetal bovine serum)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
Gy	Gray
H1, 2, 3, 4	Histon 1, 2, 3, 4

H2AX	Varianta histonu H2A
H3.3	Varianta histonu H3
H3K4Me2	Dimethylovaný histon H3 na lysinu 4
HAUSP	S herpesvirem asociovaná ubiquitin specifická proteáza (Herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease)
HDAC I	Histon deacetyláza I (Histone deacetylase I)
HDAC II	Histon deacetyláza II (Histone deacetylase II)
HdCDT	Haemophilus ducreyi cytoletální distenzní toxin
HIPK2	S homodoménou interagující protein kináza 2 (Homeodomain-interacting protein kinase 2)
hTERT RPE-1	Immortalizované buňky sítnicového epitelu s aktivní telomerázou
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IR	Ionizující záření (Ionizing radiation)
JNK	c-Jun N-terminální kináza (c-Jun N-terminal kinase)
MCF-7	Buňky adenokarcinomu mléčné žlázy
MDC1	Protein 1 zprostředkující kontrolní bod poškození DNA (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1)
Mdm2	Mouse double minute 2 homolog
MEFs	Myší embryonální fibroblasty (Mouse embryonic fibroblasts)
MG132	Inhibitor proteazomu 26S
MRC-5	Plicní primární fibroblasty
MRN	Komplex Mre11, Rad50 a Nbs1
NF-κB	Jaderný faktor-κB (Nuclear factor-κB)
PD	Populační zdvojení (Population doubling)
PIKK	Fosfatidylinositol 3-kinázám příbuzné kinázy (Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases)
PML	Protein promyelocytární leukémie (Promyelocytic leukemia protein)

PML/RAR α	Fúzní onkoprotein PML a receptoru α kyseliny retinové (retinoic acid receptor α)
PML-NB	Jaderné tělísko PML (PML nuclear body)
Rb	Retinoblastomový protein (Retinoblastoma protein)
ROS	Reaktivní sloučeniny kyslíku (Reactive oxygen species)
RPA	Replikační protein A (Replication protein A)
RSSF1A	Homolog A proteinu 1 obsahující doménu asociující s Ras proteinem (Ras association domain-containing protein 1 holomogue A)
RSSF1C	Homolog C proteinu 1 obsahující doménu asociující s Ras proteinem (Ras association domain-containing protein 1 holomogue C)
SAHF	Se senescencí asociovaná heterochromatinová ložiska (senescence-associated heterochromatin foci)
SASP	Se senescencí asociovaný sekretorický fenotyp (senescence-associated secretory phenotype)
SA- β -gal	Se senescencí asociovaná β -galaktosidáza (senescence-associated - β -galactosidase)
SDS	Dodecylsírán sodný (Sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS - Polyakrylamidová gelová elektroforéza
SIM	SUMO-1 interagující motiv (SUMO-1 interacting motif)
SUMO-1	Malý ubiquitinu příbuzný modifikátor (Small ubiquitin-related modifier 1)
TCF4	Transkripční faktor 4 (Transcription factor 4)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transformující růstový faktor β (Transforming growth factor β)
TNF α	Faktor nádoroé nekrózy α (Tumor necrosis factor α)
TopBP1	DNA topoizomeráza II vazebný protein 1 (DNA topoisomerase 2-binding protein 1)
UV	Ultrafialové záření (Ultraviolet)

VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor (Vascular endothelial growth factor)
VP16	Etoposid
Wip1	Fosfatáza 1 indukovaná divokým typem p53 (Wild-type p53-induced phosphatase 1)
Wnt	Wingless/Int-1
γ H2AX	Fosforylovaná forma histonu H2AX

1. Úvod

DAXX (Death domain-associated protein 6) je multifunkčním proteinem, který se uplatňuje v různých buněčných procesech jako je regulace transkripce, apoptóza a odpověď buňky na poškození DNA. Jeho hlavní úloha pravděpodobně spočívá ve funkci histonového chaperonu pro histon H3.3, jenž je inkorporován do chromatinu nezávisle na replikaci. DAXX v jádře interaguje nádorovým supresorem PML nutným pro rozvoj buněčné senescence.

Buněčná senescence je popisována jako stav permanentní zástavy buněčného cyklu. K jejímu navození dochází při poškození DNA, jehož rozsah nezpůsobí indukci buněčné smrti, ale současně neumožní buňce dále proliferovat. Prostřednictvím signalizace Odpověď na poškození DNA (*z angl. DNA Damage Response, DDR*) odpovídá buňka na stimuly, jako je poškození telomerové DNA po určitém počtu buněčných dělení, aktivace onkogenu, bakteriální intoxikace, expozice různým chemikáliím, ionizující a ultrafialové záření. Tyto události aktivují signální dráhy Rb/p16 a p53/p21, které způsobí zástavu buněčného cyklu, změnu struktury chromatinu a nárůst počtu jaderných tělísek PML.

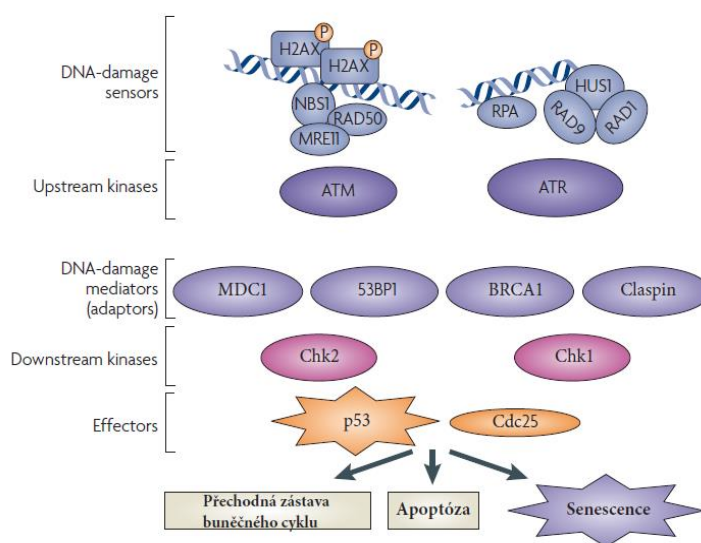
Navození senescence je způsob, jak může buňka předejít nádorové transformaci. Popis mechanismů, které k tomu přispívají, mohou mít terapeutický význam. Bylo popsáno, že DAXX reguluje stabilitu nádorového supresoru p53 prostřednictvím interakce s Mdm2 E3-ubiquitin ligázou a HAUSP deubiquitinázou. DAXX tento komplex stabilizuje a po akutním poškození DNA je DAXX fosforylován kinázou ATM, která signalizuje poškození DNA. Nicméně jen několik prací popisuje jeho vliv na signalizaci p53/p21 a stabilizaci Mdm2 v senescentních buňkách. Bylo by zajímavé zjistit, zdali v senescentních buňkách z různého buněčného typu plní DAXX stejnou úlohu v p53/p21 signalizaci.

Negativní regulace signalizace DDR je zprostředkována fosfatázou Wip1, která je jedním z cílových genů p53 a současně reguluje aktivitu p53. Množství Wip1 určuje, jak dlouho bude trvat zástava buněčného cyklu a jak citlivá bude signalizace DRR. Charakterizace její úlohy a regulace v buněčné senescenci, stejně jako u proteinu DAXX, je důležitá pro popis dynamiky mechanismů, které jsou závislé na p53.

2. Literární rešerše

2.1. Odpověď buňky na poškození DNA

Stabilita genomu má zásadní význam pro přežití buňky a správné přenesení genetické informace při jejím dělení. V evoluci se proto vyvinuly kontrolní body poškození DNA, díky kterým může buňka reagovat adekvátním způsobem na intenzitu a rozsah poškození. Tato reakce je zprostředkována souborem signálních drah, souhrnně označovaných jako odpověď na poškození DNA (z angl. DNA Damage Response, DDR). Této signalizace se účastní velké množství proteinů a lze je rozdělit podle jejich funkce na senzory, přenašece signálu a efektory. Na rozsahu poškození a průběhu opravy DNA závisí budoucí osud buňky. Obvykle dojde k přechodné zástavě buněčného cyklu, během které je poškozená DNA opravena, opětovnému návratu a pokračování buněčného cyklu. Pokud je poškození závažnější, dochází k trvalé zástavě buněčného cyklu (tzv. buněčné senescenci) nebo k buněčné smrti, obvykle apoptózou (Obr. 1) (Zhou and Elledge, 2000).



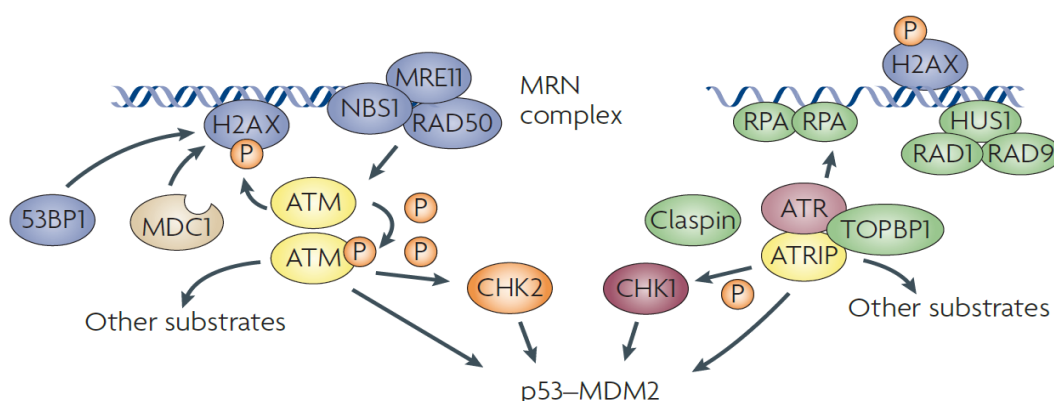
Obr. 1 Schematické zobrazení DDR. Replikační stres, ionizující záření nebo UV záření vyvolají poškození DNA, které je rozeznáváno senzory poškození DNA, komplexem MRN (MRE11 – NBS1 – RAD50). Senzory aktivují hlavní kinázy ATM (Ataxia telangiectasia mutated), ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related), které fosforylují histony H2AX a vytvářejí tak platformu pro zesílení signalizace poškození. MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1) a 53BP1 (Tumor suppressor p53-binding protein 1) fungují jako adaptory a pomáhají aktivovat kinázy Chk1 a Chk2 (Checkpoint kinase 1/2), jež jsou společně s kinázami ATR a ATM zodpovědné za fosforylaci velkého množství efektorových proteinů včetně Cdc25 (Cell division cycle 25) a p53 (Tumor protein p53, TP53), použito z (Campisi and di Fagagna, 2007).

V buňkách vystavených genotoxickému stresu jsou hlavními přenašeci signálu kinázy příbuzné fosfatidylinositol 3 – kinázám (PIKK). Do této rodiny serin/threoninových kináz patří kináza ATM (Ataxia telangiectasia mutated) a ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related). I když se každá preferenčně účastní jedné ze dvou hlavních signalizačních větví (viz níže a Obr. 2), jsou obě kinázy do jisté míry vzájemně zastupitelné (Yang et al., 2003).

Pokud u buněk dojde ke dvouřetězcovému zlomu molekuly DNA, což je nejzávažnější forma poškození, je spuštěna signalizace závisící převážně na kináze ATM. Na volné konce DNA se navážou proteiny MRE11 (Meiotic recombination 11), RAD50 (DNA repair protein RAD50) a NBS1 (Nibrin). Společně vytvářejí komplex MRN, který je nezbytný k aktivaci kinázy ATM (D'Amours and Jackson, 2002; Jackson, 2002; Uziel et al., 2003). Ta se za normálních podmínek vyskytuje v buňkách jako neaktivní dimer. Po poškození DNA, např. ionizujícím zářením, dochází k její autofosforylaci na serinu 1981, disociaci dimeru a aktivaci monomerní formy (Bakkenist and Kastan, 2003). Aktivovaná kináza ATM dokáže fosforylovat přibližně 800 substrátů (Matsuoka et al., 2007). Některými z nich jsou transkripční faktor p53, fosfatáza CDC25C (Cell division cycle 25 homolog C), kináza Chk2 (Checkpoint kinase 2), nebo multifunkční protein DAXX (Death-associated protein 6) (Tang et al., 2013). Důležitým cílem kinázy ATM v DDR signalizaci je serin 139 histonu H2AX, takto fosforylovaný histon se nazývá γ H2AX (Burma et al., 2001). Na něj se váže adaptorový protein MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1) (Stucki et al., 2005). Komplex γ H2AX - MDC1 je důležitý pro tvorbu ložisek MRN, 53BP1 (Tumor protein p53, TP53) a BRCA1 (Breast cancer 1) v místech poškození DNA, které aktivují kaskádu DDR (Stewart et al., 2003). Např. komplex MRN podporuje aktivaci ATM (Lee and Paull, 2005). Histon H2AX není pro samotný organismus nepostradatelný. Pokusy na myších ukázaly, že jedinci s deletovanou alelou genu H2AX (H2AX^{-/-}) jsou životaschopní, ale jejich vývoj byl opožděný. Současně byly pozorovány problémy s opravou DNA, chromozomální nestabilita a narušení tvorby ložisek BRCA1, 53BP1 a MRN indukovaných ionizujícím zářením (Celeste et al., 2002). Dalším důležitým substrátem ATM je Mdm2 (Mouse double minute 2), což je enzym E3 ubiquitin ligáza, který reguluje hladinu p53 (Kubbutat et al., 1997).

Kináza ATR se účastní druhé větve v signalizaci DDR spuštěné jednořetězcovými zlomy DNA. Při zástavě replikačních vidlic váže jednořetězcová DNA protein RPA (Replikační protein A) a ATR fosforyluje histon H2AX (Ward and Chen, 2001; Wold, 1997). ATR tvoří komplex s proteinem ATRIP (ATR-interacting protein), který rozeznává jednořetězcovou DNA

s navázaným proteinem RPA (Cortez et al., 2001; Zou and Elledge, 2003). Komplex ATR-ATRIP je ovlivňován proteiny TopBP1 (DNA topoisomerase2-binding protein 1) a proteinem Claspin, které pozitivně stimulují jeho kinázovou aktivitu (Kumagai et al., 2004; Kumagai et al., 2006). K navázání TopBP1 ke komplexu ATR-ATRIP je důležitý proteinový komplex 9-1-1 složený z proteinů RAD9-HUS1-RAD1 (Lee et al., 2007). Bylo ukázáno, že ATR je esenciální kináza pro vývoj organismu, jelikož homozygoti $ATR^{-/-}$ vykazují embryonální letalitu a heterozygoti $ATR^{+/-}$ mají zvýšený výskyt tvorby nádorů (Brown and Baltimore, 2000).

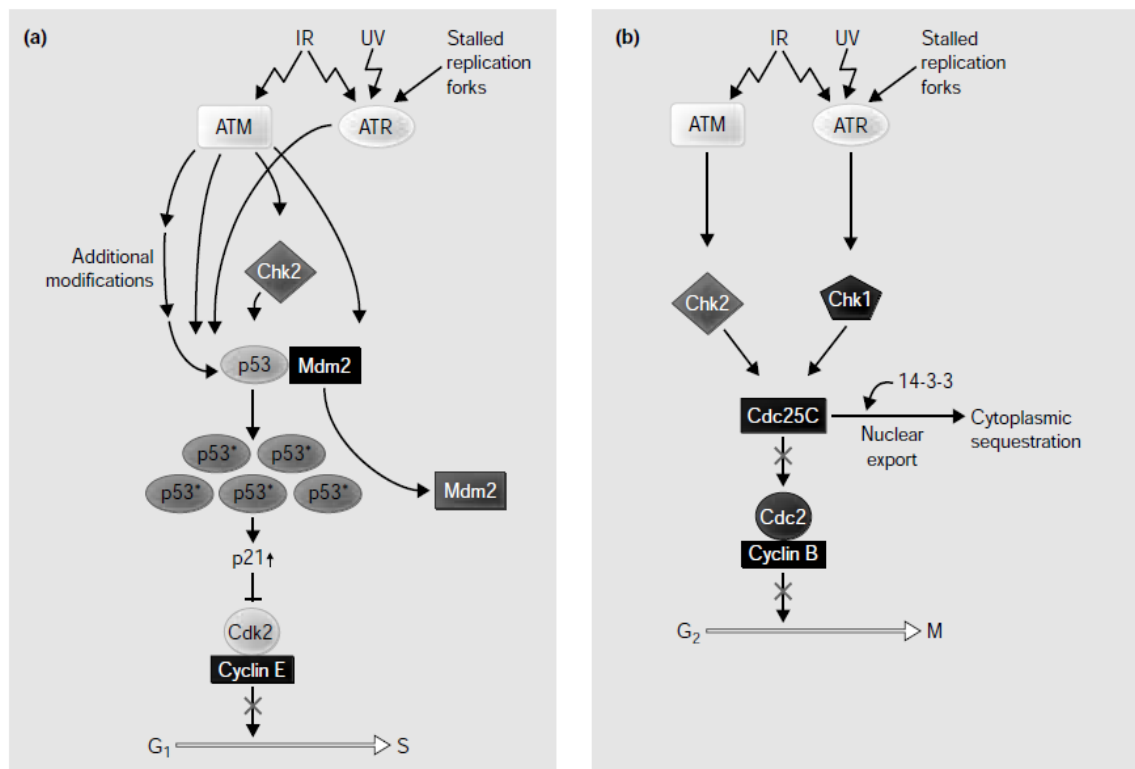


Obr. 2 Dvouřetězcový zlom DNA je rozeznán komplexem MRN, který aktivuje kinázu ATM. Ta fosforyluje histon H2AX, čímž dojde k navázání adaptorových proteinů MDC1 a 53BP1. Aktivovaná ATM fosforyluje kinázu Chk2. **Jednořetězcová DNA** je rozeznána proteinem RPA, na který se váže komplex ATR-ATRIP. Tvorba tohoto komplexu je stimulována proteiny TopBP1 (této interakci napomáhá komplex 9-1-1) a Claspinem. ATR fosforyluje kinázu Chk1, použito z (Meek, 2009).

Proliferující buňka musí projít určitými fázemi buněčného cyklu, kdy dojde ke zdvojení genetické informace a následně k rozdělení buňky. Průchod jednotlivými fázemi je řízen cykliny a cyklin-dependentními kinázami (CDK). Pokud je v průběhu buněčného cyklu poškozena integrita DNA, dojde ke spuštění kontrolního bodu a k zástavě buněčného cyklu. Mechanismus zastavení buněčného cyklu závisí na jeho aktuální fázi (Obr. 3) (Malumbres and Barbacid, 2009). Je-li DNA poškozená v G1 fázi buněčného cyklu, buňka aktivuje G1/S kontrolní bod. Jeho hlavní dráhou je signální kaskáda ATM – p53, ale účastní se jí i ATR. Obě mohou fosforylovat transkripční faktor p53 na vícero místech a tak ho stabilizovat. Navíc ATM fosforyluje kinázu, která také fosforyluje p53 na serinu 20 (Chehab et al., 2000; Matsuoka et al., 2000; Tibbetts et al., 1999). Stabilizovaný p53 aktivuje expresi mnoha genů.

Jedním z nich je gen pro inhibitor cdk $p21^{waf1}$ (dále jen $p21$), jehož zvýšená exprese např. u buněk vystavených poškození DNA vede k zástavě buněčného cyklu v G1 fázi (Dulic et al., 1994; Harper et al., 1995; Waldman et al., 1995).

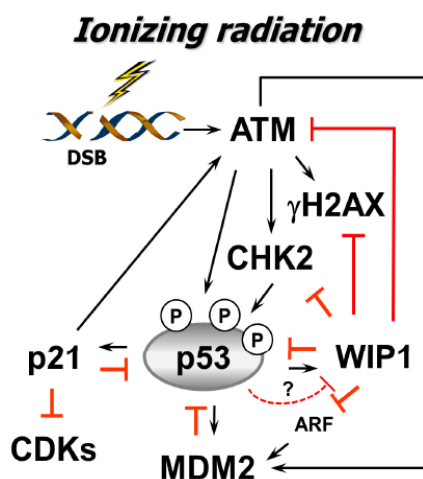
Zástava replikačních vidlic nebo poškození DNA způsobené chemikáliemi, ionizujícím (IR) nebo ultrafialovým zářením (UV) v G2 fázi buněčného cyklu způsobí aktivaci G2/M kontrolního bodu. Tohoto procesu se účastní hlavní signalizační dráha ATR – Chk1 – CDC25C, ale také i ATM – Chk2. Aktivovaná ATR fosforyluje kinázu Chk1 a fosfatázu Cdc25C. Na fosforylovanou fosfatázu Cdc25C se váže fosfoserinvazebný protein 14-3-3. Komplex Cdc25C – 14-3-3 je translokován do cytoplazmy a tak nemůže dojít k aktivační defosforylaci komplexu Cdc2-cyklin B a následnému průchodu mitózou (Dalal et al., 1999; Liu et al., 2000; Muslin et al., 1996; Peng et al., 1997; Zhao and Piwnica-Worms, 2001).



Current Opinion in Genetics & Development

Obr. 3 Kontrolní body buněčného cyklu G1/S a G2/M. (a) Dráha ATM/ATR–Chk2–p53. Poškození DNA vyvolává aktivaci kináz ATM, ATR a Chk2. Tyto kinázy stabilizují a aktivují transkripční faktor p53 a ATM navíc inhibuje E3 ubiquitin ligázu Mdm2 destabilizující p53. Zvyšuje se exprese p21, který inhibuje komplex Cdk2/cyklin E, následkem čehož dojde k zástavě buněčného cyklu v G1 fázi. **(b) Dráha ATM/ATR– Chk1/Chk2–Cdc25C.** ATR nebo ATM aktivují kinázy Chk1 a Chk2. Ty dále fosforylují fosfatázu Cdc25C, na kterou se váže vazebný protein 14-3-3. Cdc25C je translokována do cytoplazmy. Tím je blokována aktivační defosforylace kinázy Cdc2 a zamezen vstupu do mitózy. Použito z (Shiloh, 2001).

Je důležité, aby po odpovědi na poškození DNA došlo k vypnutí signalizace DDR. Jedním z proteinů účastnících se této regulace je serin-threoninová fosfatáza Wip1, též nazývaná PPM1D, která patří do rodiny fosfatáz 2C (Obr. 4). Po opravě poškozené DNA defosforyluje histon γ H2AX a monomerní ATM na serinu 1981 a tím je deaktivuje (Macurek et al., 2010; Shreeram et al., 2006). V G2/M kontrolním bodě ovlivňuje aktivitu p53 a Chk1/2 jejich defosforylací na místech, které jsou cílem kináz ATM/ATR (Lu et al., 2005; Oliva-Trastoy et al., 2007). Stabilitu p53 reguluje i skrze defosforylací Mdm2, kdy je Mdm2 stabilizována a zvyšuje se afinita k p53. Ten je ubiquitinylován a následně degradován (Lu et al., 2007). Po poškození DNA dochází k expresi cílových genů p53, mezi které patří i fosfatáza Wip1, čímž je ustanovena negativní zpětná vazba (Fiscella et al., 1997).



Obr. 4 Schématické zobrazení funkce fosfatázy Wip1. Po poškození DNA je signalizací DDR spustěna fosforylační kaskáda a jejím výsledkem je exprese cílových genů transkripčního faktoru p53. Jedním z nich je fosfatáza Wip1, která defosforylací deaktivuje kinázy ATM/Chk2 a signalizaci zprostředkovanou histonem HA2X. Dále reguluje stabilitu transkripčního faktoru p53 jeho defosforylací (serin 15, 20, 33 a 46) a stabilizací jeho negativního regulátoru E3 - ubiquitin ligázy Mdm2. Použito z(Mirzayans et al., 2013).

2.2 Buněčná senescence

V roce 1961 byly provedeny pokusy na lidských diploidních embryonálních fibroblastech, kdy bylo poprvé ukázáno, že nenádorové buňky mohou projít pouze určitým počtem buněčných dělení a poté dochází k nevratné zástavě buněčného cyklu. Definovaný počet dělení byl nazván *Hayflickův limit* podle autora studie Leonarda Hayflicka, který na ni

spolupracoval s Paulem Morheadem. Stav této nevratné zástavy buněčného cyklu je nazýván buněčná senescence (Hayflick *and* Moorhead, 1961).

Příčinou zástavy buněčného cyklu v replikační senescenci je signalizace spuštěná poškozenými telomerami (di Fagagna et al., 2003). Ty se v podstatě podobají dvouřetězcovým zlomům a dochází k aktivaci DDR přes komplex γ H2AX – MDC1 a k tvorbě ložisek 53BP1 a MRN. Hlavní signalizace je přes signální dráhu ATM – Chk2 – p53 – p21 a zástavu buněčného cyklu v G1 fázi. Mají-li buňky deletovány obě alely kinázy ATM, pak je aktivována signalizace ATR – Chk1 a dochází k zástavě v G2 fázi buněčného cyklu (di Fagagna et al., 2003; Gire et al., 2004; Herbig et al., 2004; Takai et al., 2003). K buněčné senescenci může docházet i předčasně za přispění mnoha vnějších i vnitřních stimulů, tzv. stresem indukovaná předčasná senescence (SIPS).

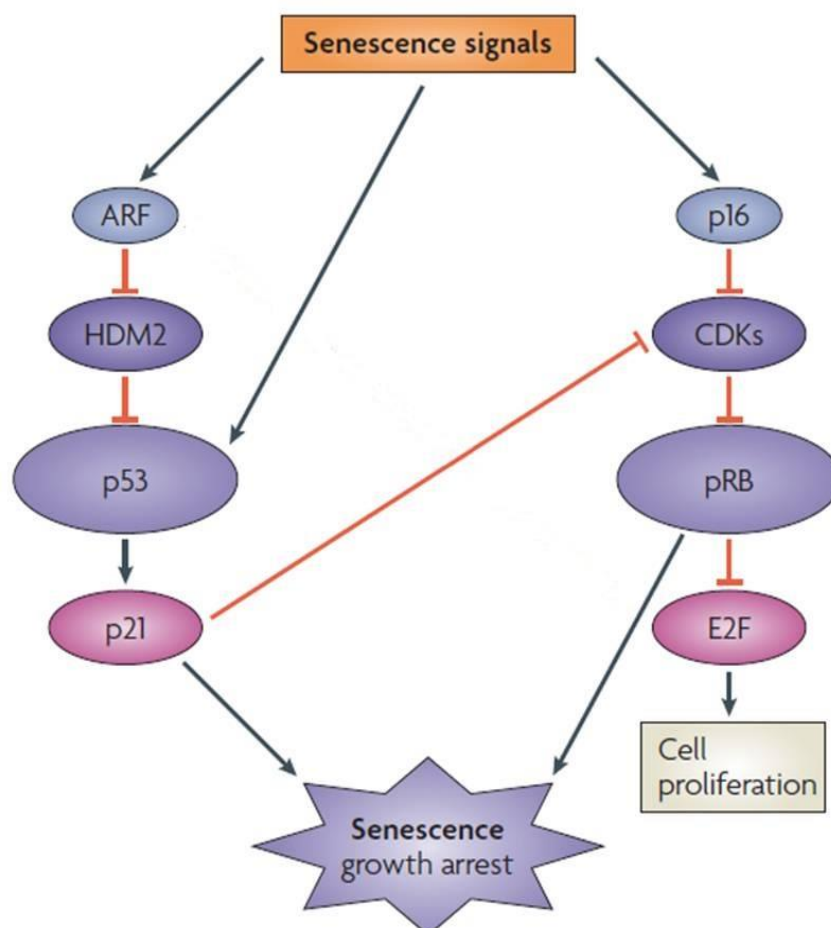
Jedním z těchto stimulů může být aktivace buněčného onkogenu. Bylo ukázáno, že onkogenní protein Ras způsobuje fenotyp podobný replikační senescenci. Aktivovaný onkogen stimuluje buněčnou proliferaci, kdy hyper-replikace spustí DDR (Di Micco et al., 2006). Ras dále zvyšuje množství reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které poškozují DNA a opět aktivují DDR (Lee et al., 1999). Dochází k stabilizaci p53 a indukci exprese inhibitorů cyklin dependentních kináz p21 a p16^{INK4a} (dále jen p16). Buňka se zastaví v G1 fázi buněčného cyklu (Serrano et al., 1997) a vyvine fenotyp charakteristický pro senescenci.

Podobný účinek mají i různá léčiva jako bleomycin a aktinomycin D (cytostatická antibiotika), chemoterapeutika nebo nukleotidová analoga způsobující při určitých koncentracích perzistující aktivaci odpovědi na poškození DNA. Fenotyp normálních i immortalizovaných buněk vystavených těmto látkám vykazuje znaky senescence (Michishita et al., 1999; Robles and Adami, 1998).

Bylo popsáno, že řada bakteriálních toxinů vykazuje genotoxické účinky. Jako jeden z příkladů je možné uvést cytoletální distenzní toxiny (CDT), např. toxin produkovaný gram-negativní bakterií *Haemophilus ducreyi* (HdCDT). Ošetření tímto toxinem vyvolává u normálních i nádorových buněk perzistující léze DNA obsahující 53BP1/ γ H2AX proteiny a znaky senescence včetně pozitivního barvení na SA- β -galaktosidázu, sekreci cytokinů IL-6 a IL-8 a chromozomální aberace (Blazkova et al., 2010)

Trvalá zástava buněčného cyklu v G1 fázi je pravděpodobně dvoustupňový proces (Obr. 5). V první fázi je signalizací DDR aktivovaná stabilizovaný p53, který indukuje expresi

p21 inhibujícího komplex Cdk4/6 – cyklin D1. Inhibované Cdk nemohou fosforylovat protein Rb (Retinoblastoma protein), který tak zůstává v inhibičním komplexu s transkripčními faktory E2F. Ty jsou zodpovědné za stimulaci exprese genů potřebných pro průchod buněčným cyklem. Po určité době nastává druhá fáze navození senescence, kdy klesá p21 a dochází k indukci exprese p16, který rovněž inhibuje komplex Cdk4/6 – cyklin D1. Hladina p16 zůstává trvalé zvýšená a je také jedním ze znaků buněčné senescence použitelným *in vivo* (Baker et al., 2011). V pozdní fázi nastává exprese ARF (Alternate-reading-frame) proteinu, který zastává funkci negativního inhibitoru Mdm2 a tím podporuje stabilizaci p53 (Evangelou et al., 2013). Dále ARF funguje jako negativní regulátor biogeneze ribozomů, čímž inhibuje růst nádorové buňky (Alcorta et al., 1996; Apicelli et al., 2008; Campisi and di Fagagna, 2007; Stein et al., 1999).



Obr. 5 Schéma signalizace navozující senescenci. Zobrazení signálních drah p53/p21 a p16/Rb, které různým mechanismem navozují senescenci. V první fázi se uplatňuje signalizace p53/p21 a v pozdějších fázích signální dráha Rb/p16 (Campisi and di Fagagna, 2007).

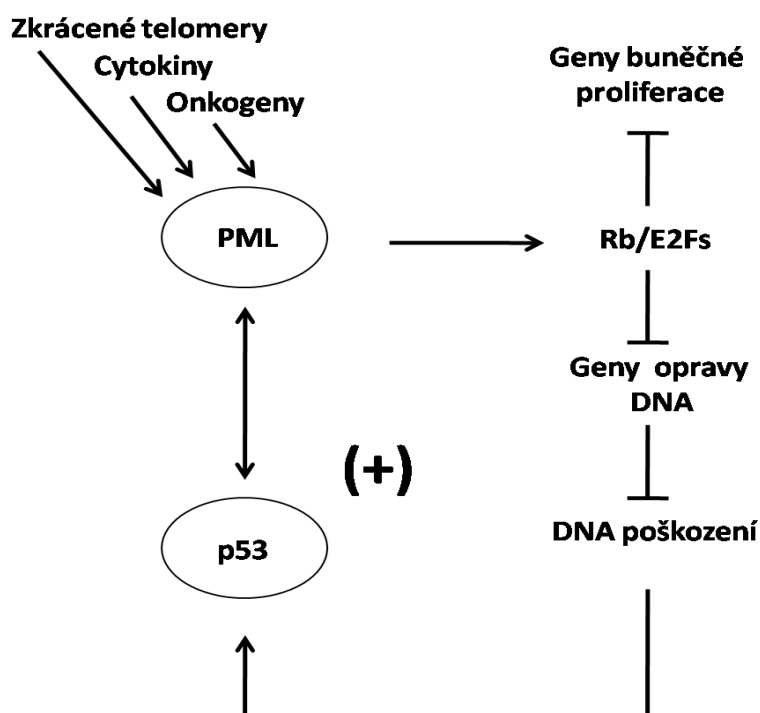
Senescentní buňky jsou většinou zvětšené a mají zploštělý tvar (Bayreuther et al., 1988). Exprimují zvýšenou hladinu lysosomální β -galaktosidázy (senescence-associated - β -galaktosidase, SA- β -gal). Aktivita SA- β -gal se používá k identifikaci senescentních buněk *in vitro* i *in vivo*. Detekuje se při pH 6 (Dimri et al., 1995; Lee et al., 2006). U senescentních buněk se mohou vyskytovat se senescencí asociovaná heterochromatinová ložiska (senescence-associated heterochromatin foci, SAHF). Jsou to chromatinové struktury tvořené fakultativním heterochromatinem. Jejich tvorby se účastní dráha p16/Rb (Kosar et al., 2011). Lze je detekovat barvením DAPI, jelikož SAHF se barví silněji než okolní chromatin. Počet SAHF je mezi 30 až 50 a je v nich lokalizován Rb protein. Ten se váže spolu s E2F transkripčními faktory vytváří inhibiční komplex na promotorech genů účastnících se přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu (Narita et al., 2003). SAHF nepatří mezi univerzální znaky senescence, jejich tvorba je závislá na zvýšení hladiny inhibitoru p16. Ta je v různých buněčných typech a po různých stimulech způsobujících senescenci rozdílná. Např. u senescence indukované onkogenem Ras dochází k jejich tvorbě u dvou buněčných linií fibroblastů - BJ a MRC-5. Ovšem u replikační, bakteriálními toxiny a chemicky indukované senescence dochází k jejich tvorbě pouze u buněk MRC-5 s vysokou hladinou p16 a nikoli u buněk BJ, které mají nízkou hladinu (Kosar et al., 2011). Často je u senescentních buněk zvýšená hladina p16 proteinu (Alcorta et al., 1996).

2.1.1. Protein promyelocytární leukémie – PML

Protein PML byl nalezen v souvislosti s akutní promyelocytární leukémií, která je způsobená expresí fúzního genu PML/RAR α (alfa receptor kyseliny retinové) v důsledku translokace t(15,17) (Kakizuka et al., 1991). PML je pravděpodobně nádorový supresor, jeho exprese je snížena u mnoha různých typů lidských zhoubných nádorů (Gurrieri et al., 2004). Funkci nádorového supresoru podporuje řada experimentálních nálezů. Např. u lidských fibroblastů IMR90 s aktivovaným onkogenním Ras došlo k nárůstu exprese PML, zvýšení počtu a velikosti jaderných tělísek PML a následné předčasné senescenci (Ferbeyre et al., 2000). Mechanismus jejího navození může být částečně způsoben skutečností, že PML zvyšuje acetylaci p53 na lysinu 382 a tím i jeho stabilizaci v buňkách s aktivním onkogenním Ras (Pearson et al., 2000). Regulace PML-p53 nejspíše probíhá v pozitivní zpětné vazbě,

jelikož gen *pml* je pravděpodobně jedním z cílů p53 a při poškození DNA je skutečně zvyšována jeho exprese (de Stanchina et al., 2004).

Je popsáno 7 základních izoform PML proteinu (I – VII), které se liší na C – konci. S výjimkou cytoplazmatické izoformy VII jsou všechny lokalizovány v jádře (Jensen et al., 2001). Z hlediska senescence je významná isoforma IV, která při nadprodukci v lidských fibroblastech a v myších embryonálních fibroblastech (MEFs) PML^{+/+} dokáže navodit senescentní fenotyp (Bischof et al., 2002). Kromě stabilizace p53 je PML součástí dalších drah regulujících zástavu buněčného cyklu. Například u onkogenní senescence byl nádorový supresor Rb a transkripční faktor E2F lokalizován prostřednictvím PML do jaderných tělísek PML (PML-NB). PML může indukovat senescenci pravděpodobně také inhibicí cílových genů, neboť při navrácení E2F nebo inhibici Rb došlo ke znovuzahájení buněčného dělení (Obr. 6) (Vernier et al., 2011).



Obr. 6 Model úlohy PML v buněčné senescenci. Vnitřní a vnější podněty způsobující senescenci zvyšují expresi PML, který inhibuje expresi cílových genů E2F a zastavuje buněčný růst. Dále pozitivně ovlivňuje aktivitu transkripčního faktoru p53 a tak současně stimuluje svou vlastní expresi. Dochází tak k pozitivní zpětné vazbě a zesílení signalizační dráhy PML/Rb/E2F. Podle (de Stanchina et al., 2004; Vernier et al., 2011).

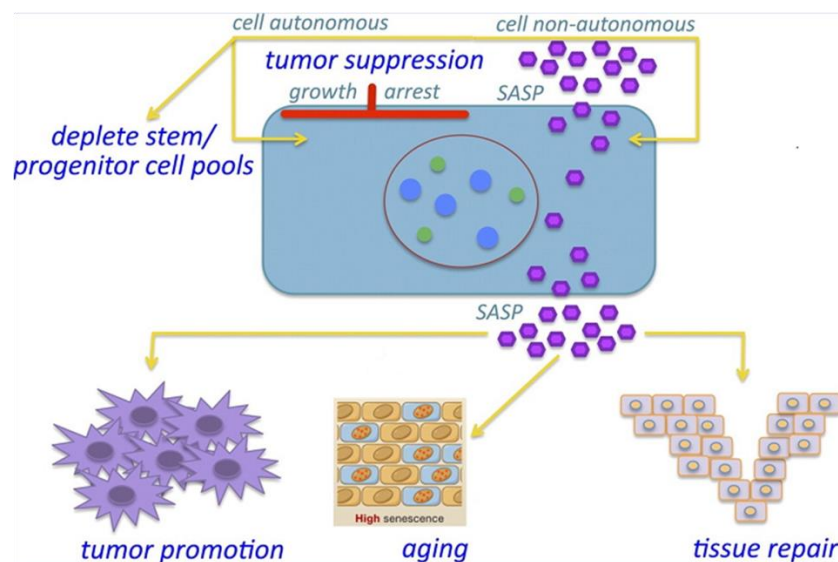
2.1.2. Význam buněčné senescence

Buněčná senescence se účastní čtyř různých buněčných procesů: stárnutí, hojení tkáně, suprese nádorů a podpora růstu nádorů (Obr. 7) (Rodier and Campisi, 2011).

Byl prokázán její vztah ke stárnutí organismu. Při pokusech na myších snadprodukovanou zkrácenou formou p53 (p44) nedocházelo ke vzniku nádorů, ale ke zkrácení délky života a akumulaci senescentních buněk v tkáních (Maier et al., 2004). To naznačuje, že navození senescence může mít protinádorovou funkci. Zmíněnou hypotézu potvrzuje experiment, kdy virem transformované lidské fibrosblasty nerozvinuly rakovinu, ale vstoupily do senescence (Obrien et al., 1986). Stejný výsledek byl pozorován u myši s umlčenou expresí p53, které rozvinuly nádory jater. Po následné reaktivaci p53 došlo k navození senescence (Xue et al., 2007). Nedávná studie na myších buňkách prokázala, že odstranění senescentních buněk z tkáně vede k potlačení příznaků progerie – nemoc, která způsobuje předčasný stařecký vzhled a rozvoj nemocí spojených se stářím (Baker et al., 2013).

Senescence má i význam v reparačních procesech a během embryonálního vývoje organismu (Munoz-Espin and Serrano, 2014). Při chemickém poškození jater vyvolaným chloridem uchličitým (CCl₄) docházelo u myši k proliferaci jaterních hvězdicových buněk. Tyto buňky produkovaly složky extracelulární matrix (ECM) a po stádiu proliferace přešly do senescence. Vykazovaly sekreci řady faktorů (tzv. senescence-associated secretory phenotype – SASP) včetně matrix metaloproteáz, které rozrušovaly ECM a pomáhaly zmenšit fibrotickou jizvu (Krizhanovsky et al., 2008).

Paradoxně, senescentní buňky mohou přispívat svým sekrečním fenotypem k rozvoji rakoviny. Senescentní buňky sekretují do okolí velké množství prozánětlivých faktorů včetně cytokinů IL-6, IL-8 a TNF α , které mohou stimulovat invazivitu u nádorových buněk (Coppe et al., 2008). Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), rovněž sekretovaný senescentními buňkami, podporuje vaskularizaci nádoru (Coppe et al., 2006).



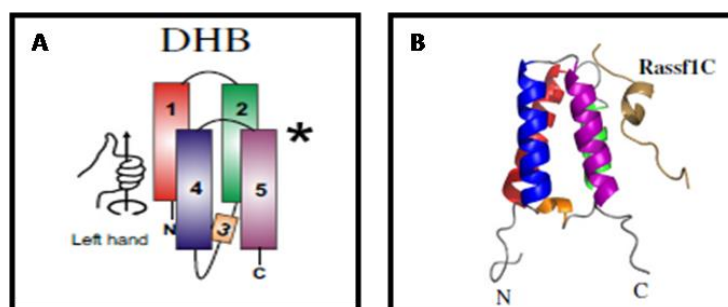
Obr. 7 Biologické funkce buněčné senescence. Navození senescence brání tumorigenezi nebo snížení množství proliferujících buněk. SASP přispívá k různým fyziologickým procesům. Může docházet k rozvoji nádorů, usnadnění hojení ran a nejspíše se podílí i na stárnutí. Použito z (Rodier and Campisi, 2011).

2.2. Protein DAXX (*Death domain-associated protein 6*)

Protein DAXX (*Death domain-associated protein 6*) byl poprvé popsán v roce 1997 jako adaptorový cytoplazmatický protein, který se váže na apoptotický receptor Fas (také nazýván CDC95 nebo APO-1) (Yang *et al.*, 1997). Je multifunkčním proteinem účastnícím se v regulaci apoptózy, transkripce, stability p53 a funguje jako histonový chaperon.

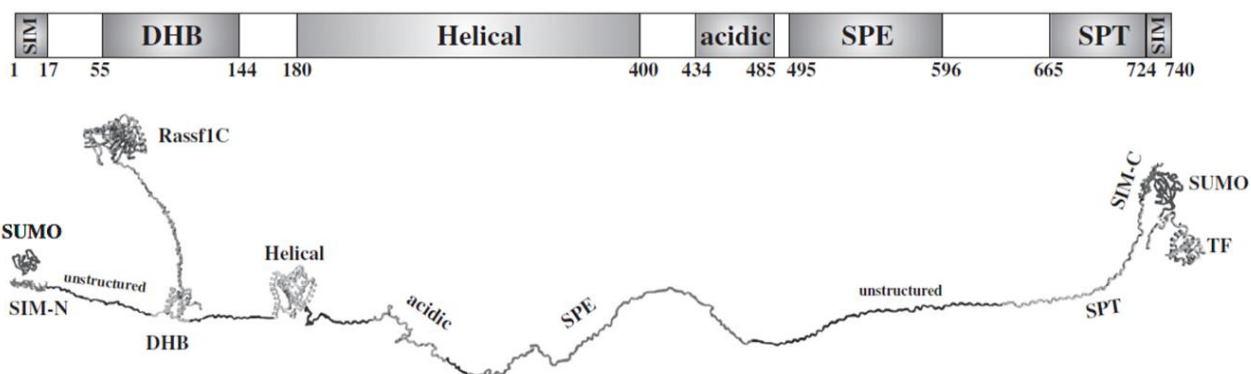
2.2.1. Struktura proteinu DAXX

Teprve v roce 2010 byla provedena strukturální charakteristika proteinu DAXX v komplexu s proteinem RASSF1C (Ras association domain-containing protein 1 holomogue C) pomocí spektroskopie nukleární magnetické resonance (NMR spektroskopie). Část C - terminálního konce je vnitřně neorganizovaná. Oproti tomu N - konec vykazuje vyšší strukturální uspořádání. Obsahuje doménu DHB (DAXX helix bundle), která je tvořena čtyřmi levotočivými helixy (H1, H2, H4, H5) a jejichž uspořádání je ovlivňováno H3 helixem. DHB doména slouží k interakci proteinu DAXX s některými z jeho partnerů (Obr. 8) (Escobar-Cabrera *et al.*, 2010).



Obr. 8 (A) Schématické zobrazení levotočivé *DAXX helix bundle* (DHB) domény s popisem příslušných helixů. **(B)** Stuhlý model interakce DHB domény s RASSF1C. Použito z (Escobar-Cabrera et al., 2010).

DAXX interaguje skrze svou DHB doménu s RASSF1C (Obr. 9). Znalost těchto molekulárních interakcí a celkové struktury proteinu DAXX je velice významná, jelikož rozbor peptidových sekvencí ukázal, že p53³⁹⁻⁵⁷ a Mdm2²⁹⁶⁻³¹³ se váží na DAXX podobným způsobem jako RASSF1C. Peptidová sekvence p53³⁹⁻⁵⁷ se nachází v transkripční doméně p53. Tato doména je vnitřně neuspořádaná a je zodpovědná za interakce s Mdm2, p300/CBP (CREB-binding protein) a mnoha dalšími. Současně je regulována protein-proteinovými interakcemi nebo fosforylací. Na C- a N-koncové části se nachází SIM (SUMO interagující motiv), který nekovalentně interaguje s proteinem SUMO. SUMO může být kovalentně připojený k transkripčnímu faktoru (TF) nebo jinému typu proteinu a takto s proteinem DAXX interagovat (Escobar-Cabrera et al., 2010).



Obr. 9. Strukturní organizace proteinu DAXX a interakce s RASSF1C. Za DHB doménou se nachází další helikální úsek. C-koncovou neuspořádanou oblast tvoří dvě oblasti, kdy jedna je bohatá na zbytky serinu, prolinu, kyseliny glutamové (SPE) a druhá na aminokyseliny serin, prolin a threonin (SPT). Součástí je i "kyselá" (acid) oblast, která z 80 % obsahuje kyselinu glutamovou a asparagovou. Na N - a C - koncové části proteinu je zobrazen SIM (SUMO interacting motif). Použito z (Escobar-Cabrera et al., 2010).

2.2.2. Lokalizace proteinu DAXX

Kontroverzním tématem byla buněčná lokalizace proteinu DAXX (Tab. 1). Už při jeho objevení se soudilo, že je cytoplazmatickým proteinem (Yang et al., 1997). Bylo také popsáno, že některé apoptotické signály řídí jeho translokaci mezi jádrem a cytoplazmou v různých směrech. U lidských buněk adenokarcinomu prostaty DU-145, které trpěly nedostatkem glukózy, byl DAXX translokován z jádra do cytoplazmy (Song and Lee, 2003). Naproti tomu vystavení lidských makrofágů THP-1 oxidované formě lipoproteinu o nízké hustotě (oxLDL) indukoval translokaci z cytoplazmy do jádra (Su et al., 2007). Lindsay *et al.* prověřili pomocí buněčné frakcionace a imunofluorescence vnitrobuněčnou lokalizaci proteinu DAXX u buněk neuroblastomu SH-SY5Y a buněk DU-145 po ošetření peroxidem vodíku (H₂O₂). DAXX při všech podmínkách zůstával lokalizován v jádře. Tyto výsledky naznačují, že DAXX je přednostně jaderný protein a po buněčném stresu není translokován z jádra (Lindsay et al., 2009). Místem jeho lokalizace v jádře jsou PML-NBs, jejichž hlavní komponentou je PML. DAXX se váže prostřednictvím SIM na svém C konci na PML, který je posttranslačně modifikovaný připojením SUMO-1 (Small ubiquitin-related modifier 1) (Ishov et al., 1999).

Tabulka 1 Paradoxní charakter vnitrobuněčné translokace proteinu DAXX za stresových podmínek

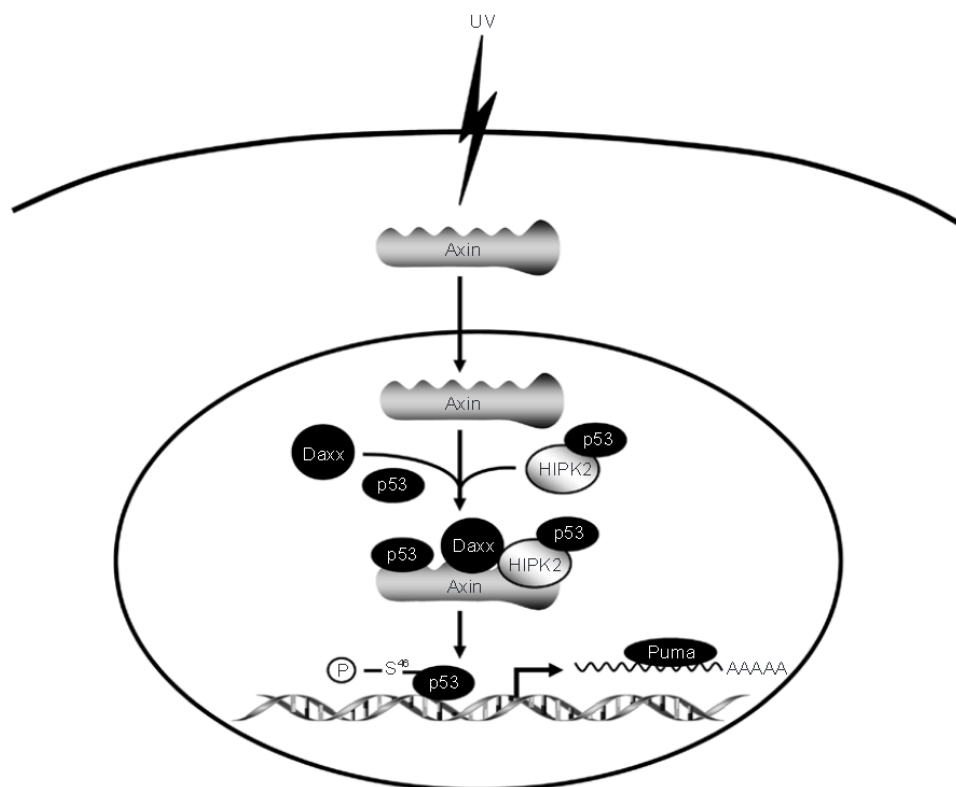
Translokace proteinu DAXX	Buněčný stres	Buněčná linie	Podmínky ošetření	Reference
Do cytoplazmy	Oxidační stres, beta-amyloid Oxidační stres, MPP ⁺ MPP ⁺	SH-SY5Y	1 mM H ₂ O ₂ , 20 min; 10 μM beta-amyloid, 2-5 h	10
Do cytoplazmy	MPP ⁺ MPP ⁺	SH-SY5Y	1 mM H ₂ O ₂ , 1 h; 3	8
Do cytoplazmy	Oxidační stres, UV	SH-SY5Y	mM, 12 h	19
Zůstává v jádře		BJ fibroblasts	25-50 μM H ₂ O ₂ , 1-3 h; 80 J/m ² 3-12 h	11
Do cytoplazmy	Oxidative Stress, Nedostatek glukózy	DU-145	500 μM H ₂ O ₂ ,	13
Do cytoplazmy	FAS, zVAD-fmk	293	100 ng/mL anti-Fas, 12 h; 50 μM zVAD-fmk, 1 h prior to anti-Fas 0.3	7
Zůstává v jádře	FAS	HT1080	μg/mL anti-Fas, 12 h	3
Z jádra do cytoplazmy	ox-LDL	THP1-macrophage Murine	100 mg/L ox-LDL, 48 h	12
Zůstává v jádře	Con-A, Retinová kyselina	splenoocytes, NB4	24-72 h Con A; 10 μM r kyselina retinová	20

Tab. 1 Tabulka zobrazuje přehled translokace proteinu DAXX po různých typech buněčného stresu. (FAS – stimulace Fas receptoru; oxLDL – oxidovaný lipoprotein o nízké hustotě; zVAD-fmk – inhibitor kaspáz; UV – ultrafialové záření; Con-A – konkavalin A; MPP⁺ - 1-methyl-4-phenylpyridinium). Použito z (Lindsay et al., 2009).

2.2.3. Apoptóza a DAXX

Protein DAXX je Fas-vazebný protein, který zesiluje Fas-receptorem zprostředkovanou apoptózu a stimuluje aktivaci kinázy JNK (Jun N-terminal kinase) (Yang et al., 1997). Tato signalizace je nezávislá na adaptorovém proteinu FADD (Fas-associated protein with death domain), který se účastní vnější dráhy apoptózy aktivací prokaspázy 8 (Yang et al., 1997). Později bylo ukázáno, že DAXX aktivuje kinázu ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1) zodpovědnou za aktivaci JNK (Chang et al., 1998). Delší aktivace JNK kinázy (1-6 hodin) pomocí TNF (Tumor necrosis factor) stimuluje proapoptické účinky signalizace JNK (Ventura et al., 2006). Proapoptotickou funkci popsala studie, kde DAXX asociuje i s cytoplazmatickou doménou TGF- β (Transforming growth factor β) receptoru a propojuje signalizaci TGF- β s kinázou JNK, která spouští apoptózu (Perlman et al., 2001). Bylo popsáno, že DAXX interaguje s proteinem Axin, který se v signalizaci Wnt (Wingless/Int-1) účastní regulace hladiny β -kateninu. U buněk ozářených UV zářením došlo k zesílení této interakce a navázání p53 a Ser/Thr kinázy HIPK2 (Homeodomain interacting protein kinase 2). V komplexu Axin/DAXX/HIPK2/p53 je stimulována aktivita p53. Dochází k selektivní expresi cílových genů p53, např. PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) (Obr. 10) (Li et al., 2007).

Funkce proteinu DAXX v apoptóze je ovšem kontroverzní. Skupina studií popisuje jeho antiapoptotickou funkci. V buňkách s umlčenou expresí proteinu DAXX pomocí siRNA (small interfering RNA) docházelo k aktivaci apoptózy spuštěné Fas-receptorem, uvolnění cytochromu c, aktivaci signalizační dráhy JNK a kaspáz (Chen and Chen, 2003). In vivo byla tato skutečnost potvrzena na myších s delecí obou alel genu *daxx* (*daxx*^{-/-}), kdy docházelo k apoptóze 7. den a k embryonální letalitě 9. den (Michaelson et al., 1999). Vzhledem k rozdílným výsledkům studií zůstává úloha proteinu DAXX v apoptóze stále nejasná. Je možné, že jeho funkce je specifická v různém vyvojovém stádiu organismu, tkáni nebo v závislosti na buněčném typu.



Obr. 10 Zobrazení aktivace p53 v komplexu Axin/DAXX/HIPK2/p53. Axin je po UV-ozáření translokován do jádra, kde vytváří komplex s proteinem DAXX a dvěma subpopulacemi p53 (jedna se váže přímo na Axin a druhá asociuje prostřednictvím kinázy HIPK2). Po vytvoření komplexu je HIPK2 aktivována a fosforyluje p53 na serinu 46. Interakce DAXX-Axin stimuluje aktivitu HIPK2 k p53. Poté dochází k selektivní expresi cílových genů, jako je PUMA. Použito z (Lin and Li, 2007).

2.2.4. DAXX jako transkripční regulátor

Jednou z dalších funkcí multifunkčního proteinu DAXX je aktivace i represe transkripce. Pokud DAXX není lokalizován v PML-NBs, interaguje s HDAC I (Histon-deacetyláza I) a snižuje bazální transkripci genů (Ishov et al., 1999; Li et al., 2000). Dalším proteinem, se kterým DAXX vytváří transkripčně represní komplex, je HDAC II (Histon-deacetyláza II) a protein Dek, který asociuje s chromatinem a dokáže měnit topologii DNA *in vitro* (Muromoto et al., 2004). DAXX s HDAC II jsou schopni umlčet transkripční aktivitu CBP, který je modifikovaný SUMO-1 proteinem (Kuo et al., 2005). Sám DAXX může být modifikovaný připojením SUMO-1, ale tato modifikace neovlivňuje jeho lokalizaci do PML-NB (Jang et al., 2002). DAXX vytváří také transkripčně represní komplex s DNMT-1 (DNA methyltransferáza 1), se kterou interaguje přes DMAP1 (DNMT1-associated protein)

(Muromoto et al., 2004). V asociaci s DNMT1 se navazuje do cílových promotorů transkripčního faktoru RelB, který je součástí signalizační dráhy NF- κ B (Nuclear factor- κ B). Dochází k metylaci promotorů a k epigenetické represi transkripce cílových genů RelB (Puto and Reed, 2008). V řadě studií je DAXX popisován jako transkripční represor. V signalizaci Wnt však naopak zastává funkci transkripčního koaktivátoru, který se váže na TCF4 (Transcription factor 4) a pozitivně stimuluje transkripci cílových genů komplexu β -katenin/TCF4 (Huang and Shih, 2009).

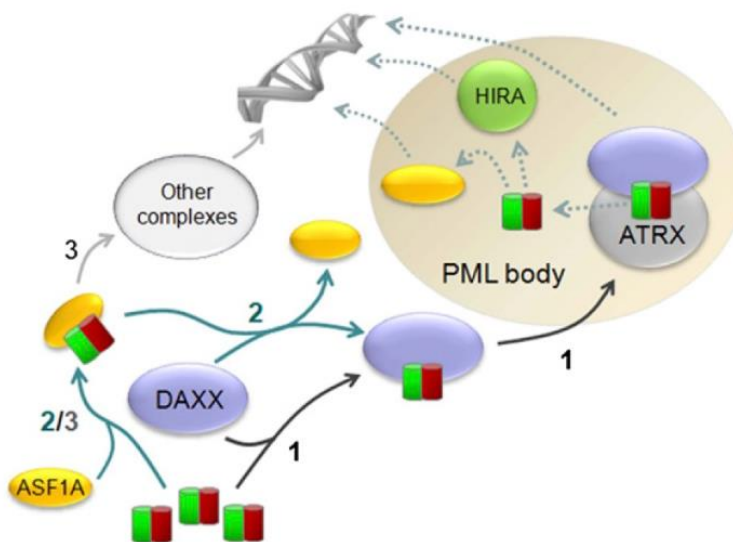
2.2.5. DAXX jako chaperon

Relativně nedávno byla popsána nová funkce proteinu DAXX v remodelaci chromatinu. Chromatin je tvořen bazickými histony, kolem kterých je obtočená molekula DNA. Čtyři základní typy histonů H2A, H2B, H3 a H4 společně vytváří oktamery. Pro oblast centromer je specifická varianta histonu CENP-A (Centromeric protein A), který nahrazuje variantu H3. Histon H3 se vyskytuje ve třech formách. Formy H3.1 a H3.2 jsou inkorporovány do chromatinu závisle na S-fázi. Varianta H3.3 se od kanonické varianty H3.1 odlišuje pouze v pěti aminokyselinách a může být do chromatinu inkorporována závisle i nezávisle na buněčném cyklu (Biterge and Schneider, 2014).

DAXX zaujímá asi 40% povrchu dimeru H3.3-H4 a ke specifickým interakcím dochází přes aminokyselinové zbytky alaninu 87 a glycinu 90 histonu H3.3 a zbytku kyseliny glutamové (Biterge and Schneider, 2014; Elsaesser et al., 2012; Liu et al., 2012). DAXX společně s ATRX (α -thalassemia X-linked mental retardation protein) tvoří chaperonový komplex specifický pro histon H3.3. Komplex ATRX-DAXX ukládá H3.3/H4 dimery do oblastí pericentromerického heterochromatinu, což usnadňuje transkripci z těchto oblastí. Dalším místem, kam komplex ATRX-DAXX vkládá histon H3.3, je chromatin telomer (Drane et al., 2010; Lewis et al., 2010). Mechanismus, jakým vkládá H3.3 do chromatinu je závislý na PML-NB. DAXX váže preferenčně dimery H3.3-H4 spíše než tetramery a směřuje jejich lokalizaci do PML-NB. Toto směřování volných dimerů je usnadňováno proteinem ASF1A (Anti-silencing function 1 A) a je nezávislé na ATRX. Po přesunutí do PML-NB se H3.3 váže na komplex ATRX-DAXX, který je následně zakomponován do chromatinu. V PML-NB také interaguje nezávisle na replikaci H3.3 s HIRA (Histone regulator A) nebo chaperony ASF1A

(Obr. 11) (Delbarre et al., 2013; Huang and Shih, 2009). Mechanismus depozice H3.3, závislý na DAXX/PML byl popsán i u senescentních buněk. Nabohacení H3.3 nebylo pozorované s SAHF, ale inkorporace byla směřována do oblasti aktivního chromatinu (Corpet et al., 2014).

Při fyziologickém stresu, např. tepelnému šoku, dochází k nabohacení proteinu DAXX v oblastech centromerického a pericentromerického chromatinu bez změny vlivu na inkorporaci H3.3. Po zotavení z teplotního šoku u buněk se sníženou hladinou proteinu DAXX dochází ke změně epigenetické informace. Navýší se množství dimethylovaného histonu H3 na lysinu 4 (H3K4Me2) mechanismem závislým na proteinu DAXX (Morozov et al., 2012). Funkce histonového chaperonu může být potenciálně významná v buněčné transformaci. Bylo popsáno, že u buněk bez funkčního Rb proteinu je nadprodukován CENP-A. Dochází k chromozomální nestabilitě, jejíž důsledkem je vznik aneuploidie (Amato et al., 2009). Nadprodukováný CENP-A tvoří netypický heterotetramer H3.3–H4 : CENP-A–H4, který je inkorporován mimo centromery, v místech s aktivní výměnou histonů. Tento proces je uskutečňován prostřednictvím interakce H3.3 s proteinem DAXX, na němž je závislý (Lacoste et al., 2014).



Obr. 11 Model transportu (H3.3–H4) dimeru do jaderných tělísek PML (PML-NB) před inkorporací do chromatinu. V dráze (1) DAXX transportuje dimer H3.3-H4 do PML-NB. Tento proces je ulehčován proteinem ASF1 (dráha 2). H3.3-H4 navázaný na ASF1 může být inkorporován do chromatinu pomocí komplexů obsahujících přídavný chaperon pro H3.3 (dráha 3). DAXX, ATRX, HIRA a ASF1 jsou lokalizovány v části PML-NB a provděpodobně jsou schopny navázat dimer H3.3-H4 dříve než inkorporují do chromatinu. Použito z (Delbarre et al., 2013).

2.2.6. DAXX a odpověď na poškození DNA

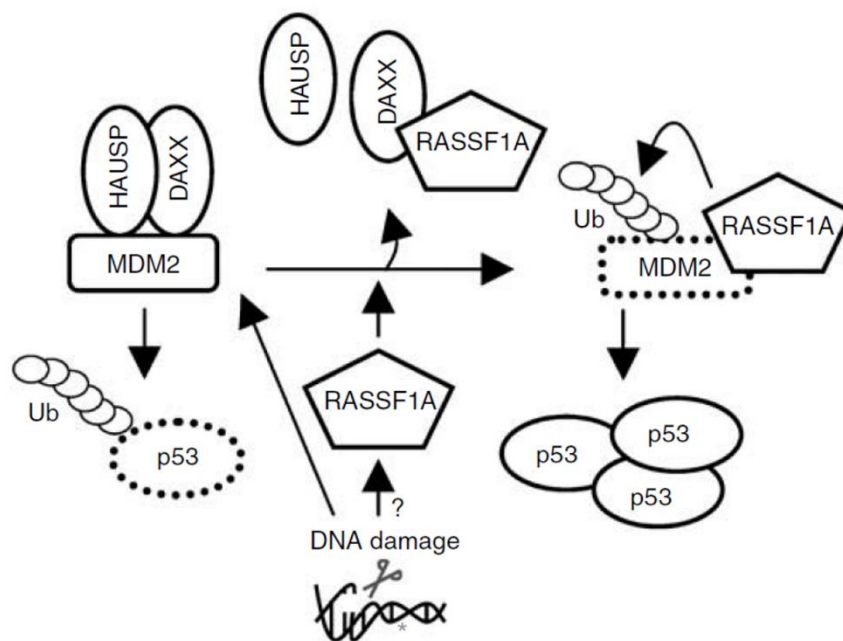
DAXX zastává další významnou funkci v odpovědi buňky na poškození DNA, kde je jedním z hlavních uzlů signalizace přes transkripční faktor p53. Tento protein je významným nádorovým supresorem. Jeho delece neovlivňuje embryonální vývoj, ale v brzkém věku dochází ke vzniku různých typů nádorů (Donehower et al., 1992).

p53 může být modifikován různými posttranslačními modifikacemi. Stabilizovaný je díky acetylaci na svém C - konci a je zprostředkována acetyltransferázou p300. Tato acetylace pozitivně ovlivňuje schopnost vazby p53 na DNA (Gu and Roeder, 1997).

Další způsob, jakým je p53 modifikován, je methylace, která je schopná ovlivnit jeho stabilitu pozitivně nebo negativně. Methylace může způsobit silné snížení transkripce cílových genů, nebo stabilizovat p53. Záleží, který konkrétní lysin je methylován (Chuikov et al., 2004; Shi et al., 2007).

p53 má za normálních podmínek krátký poločas. Po poškození DNA se jeho stabilita zvyšuje, což ovlivňuje jeho funkci jako transkripčního faktoru. Mechanismus této regulace je řízen přes Mdm2. Ta přenáší ubiquitin na p53, jenž je následně degradován v 26S proteazomu. V normálních buňkách Mdm2 vytváří komplex s deubiquitinázou HAUSP (*Herpes virus associated ubiquitin specific protease*; také název USP7; dále v textu HAUSP), která zprostředkovává odštěpení ubiquitinu z cílového proteinu. HAUSP zvyšuje stabilitu p53 i Mdm2, která ubiquitinyluje i sama sebe (Kubbutat et al., 1997; Li et al., 2002; Maki et al., 1996). Jak bylo uvedeno výše, po poškození DNA dojde k aktivaci transkripce cílových genů p53. Jedním z nich je i Mdm2, což vytváří zpětnou vazbu regulující množství p53 a odpověď buňky na poškození DNA (Wu et al., 1993).

Bylo popsáno, že DAXX ovlivňuje stabilitu Mdm2 prostřednictvím tvorby komplexu Mdm2-DAXX-HAUSP a současně stimuluje E3 ubiquitin ligázovou aktivitu Mdm2 vůči p53. Po poškození DNA dochází k rozpadu tohoto komplexu a zvýší se stabilita a aktivita p53. Současně dojde k poklesu hladiny Mdm2 (Obr. 12) (Tang et al., 2006). Za rozpad komplexu je zodpovědná kináza ATM, která po poškození DNA fosforyluje DAXX na serinu 564 (Tang et al., 2013).



Obr. 12 Schématické zobrazení úlohy proteinu DAXX v regulaci Mdm2 a stability p53. V nestresovaných buňkách je Mdm2 stabilizovaný v komplexu s HAUSP a DAXX, což vede k rychlé ubiquitinylaci a degradaci p53. Po poškození DNA se RASSF1A naváže na komplex Mdm2-DAXX-HAUSP a současně je DAXX fosforylovaný kinázou ATM na serinu 564. Dojde k rozpadu toho komplexu a RASSF1A stimuluje autoubiquitynlaci Mdm2 a jeho degradaci. To umožňuje zvýšení hladiny a aktivaci p53 (Song et al., 2008; Tang et al., 2013; Tang et al., 2006). Použito z (Song et al., 2008).

DAXX se účastní odpovědi na poškození DNA i prostřednictvím interakcí s nádorovým supresorem RASSF1, který se v buňce vyskytuje ve dvou hlavních izoformách RASSF1A a RASSF1C (Dammann et al., 2000).

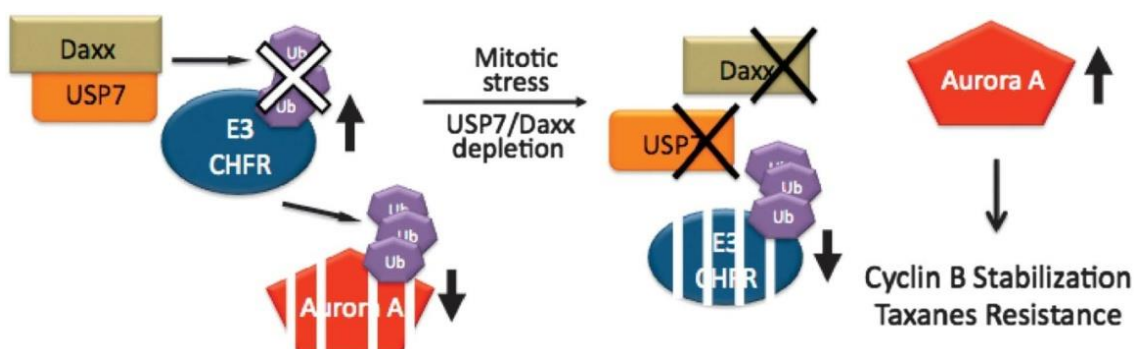
Komplex Mdm2-DAXX-HAUSP je dále regulován nádorovým supresorem RASSF1A, který se po poškození DNA váže na DAXX a Mdm2, napomáhá k rozpadu komplexu a stimuluje samoubiquitynlaci Mdm2 (Song et al., 2008). Bylo popsáno, že u akutní lymfoblastické leukémie (ALL) dochází k metylaci promotoru RASSF1 mechanismem závislým na proteinu DAXX. Do promotoru genu *rassf1A* se naváže p53, který atrahuje DAXX a DNMT1 zodpovědnou za metylaci DNA. Úroveň methylace promotoru pozitivně koreluje s množstvím hladiny proteinu DAXX, což má přímý vliv na mechanismus regulace Mdm2 zmíněný dříve (Zhang et al., 2013).

2.2.7. Buněčný cyklus a rakovina

Správný průchod mitózou má vliv na budoucí osud dceřiných buněk. Pochopení mechanismů, které se zde uplatňují, může být užitečné k určení cílů pro protinádorovou léčbu, případně pro identifikaci prediktivního znaku pro určitý typ léčby.

U lidských prostatických nádorových linií bylo popsáno, že se DAXX váže na Cdc20 (Cell-division cycle protein 20), Cdh1 (Cdc20 homologue-1) a funguje jako inhibitor E3-ubiquitin ligázy APC/C (Anaphase-Promoting Complex). APC/C je zodpovědný za správný průběh mitózy a řídí degradaci např. cyklinu B1. V nádorech prostaty je hladina proteinu DAXX zvýšená a při jeho nadprodukcí v normálních prostatických buňkách dochází k chybné segregaci chromozomů (Kwan et al., 2013).

Nízká hladina proteinu DAXX má u buněk rakoviny prsu opačný efekt. Buňky s deletovanou alelou pro gen *daxx* nebo s jeho umlčenou expresí pomocí shRNA (short hairpin RNA) vykazovaly vyšší rezistenci k léčbě Taxolem (paclitaxelem). Taxol je cytostatikum, které brání depolymeraci mikrotubulů, prodlužuje mitotický kontrolní bod a spouští apoptózu (Lindsay et al., 2007). Za mechanismem této rezistence stojí interakce mezi proteinem DAXX a HAUSP. V mitóze spolu DAXX a HAUSP vytvářejí komplex a HAUSP stabilizuje E3-ubiquitin ligázu CHFR (Checkpoint with forkhead and Ring-finger). Při nízké hladině komplexu DAXX-HAUSP dojde ke stabilizaci kinázy Aurora A a cyklinu B (Obr. 13) (Giovinazzi et al., 2013).



Obr. 13 Model regulace mitózy a rezistence na taxany komplexem DAXX-HAUSP. DAXX váže HAUSP a stimuluje jeho aktivitu pro odštěpení ubiquitinů z E3-ubiquitin ligázy CHFR. Stabilizace CHFR zvyšuje ubiquitinylaci a degradaci Aurory A. Deregulace hladiny proteinu DAXX nebo USP7 snižuje stabilitu CHFR, zvyšuje stabilitu kinázy Aurora A a dochází k častější multipolární mitóze. Stabilizuje se cyklin B a buňky jsou blokovány v mitóze a rezistentní k léčbě taxany (Giovinazzi et al., 2013).

U lidských nádorových buněk povrchového epitelu vaječníku je oproti zdravé tkáni zvýšená hladina proteinu DAXX. Jeho nadprodukce u nádorových buněk stimuluje proliferaci, zvyšuje rezistenci, podporuje buněčnou migraci a tvorbu kolonií. U nenádorových buněk dochází k nádorové transformaci. U myších buněk povrchového epitelu vaječníku nedošlo delecí alely pro gen *daxx* k ovlivnění průchodu buněčným cyklem. V těchto buňkách došlo k akumulaci proteinů p21, p53 a zvýšení exprese proapoptotických proteinů NOXA a PUMA (Pan et al., 2013a; Pan et al., 2013b). Tato fakta naznačují, že DAXX v buňkách povrchového epitelu vaječníku může zastávat úlohu buněčného onkogenu (Rodier and Campisi, 2011).

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Použité chemikálie

Zdroj	Zdroj	Kat. Číslo
10 x TG pufr (192mM glycin, 25 mMTris, pH 8.3)	BioRad	161-0771
10 xTGS pufr (192mM glycin, 25 mMTris, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.3)	BioRad	161-0772
Acrylamid / Bis 30%	Serva	1068701
APS (peroxodisíran amonný, 98%)	Sigma	A3678-25G
Azid sodný	Koch-Light Laboratories Ltd.	91789
BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridin, 99%)	Sigma	B5002
Bromfenolová modř	Lachema	
BSA (hověží sérový albumin)	Sigma	A9647_50G
Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit	Invitrogen	C10340
DAPI; 4',6-diamidin-2-fenylindol	Sigma	D9542-5MG
Dithiothreitol (DTT)	Sigma	43817
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Oddělení přípravy médií ÚMG	
Doxorubicin, = Adriamycin® hydrochloride	Sigma	D1515
Doxycyklin, 98%	Sigma	D-9891
Dvkrát destilovaná H ₂ O	Oddělení přípravy médií ÚMG	
EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová, 99%)	Sigma	E5134-50G
Edu (5-Ethynyl-2'-deoxyuridin)	Invitrogen	
Ethanol 96%	Penta	
Etoposid (VP16)	Sigma	E1383
Fetální hovězí sérum (FBS)	Gibco/Life Technologies	10270
Fosfátový pufr (PBS = Phosphate buffered saline)	Gibco/Invitrogen	20012
Glutaraldehyd stupeň I, ultra pro elek. mikroskopii 25%	Sigma	G5882
Glycerol (99%)	Sigma	G-5516-1L
Inhibitor RNáz		
Injekční voda	B. Braun Melsungen AG	87/024/98-C
K ₃ Fe(CN ₆)		
K ₄ Fe(CN ₆) x H ₂ O		
Kamptotecin (CPT)	Sigma	C9911
Medicínální film	Afga	
Methanol	Penta	

MG132	Sigma-Aldrich	C2211
NaCl (Chlorid sodný, 99%)	Erba Lachema s.r.o., ČR Fluka, St. Gallen, Switzerland	
Nonidet P40		
Odtučňené sušené mléko		
OptiMEM	Gibco/Invitrogen	51985
Paraformaldehyd 4% (m/v) pH 7.2	Vitrum	
Penicillin-Streptomycin roztok 100x	Sigma	P0781- 100ML
Ponceau S	Fluka	
Proteinový marker na SDS-PAGE # 26616	Fermentas	
Puromycin z <i>Streptomyces alboniger</i> , 98%	Sigma	P7255
RNeasy Mini Kit (50)	QIAGEN	74104
SDS (dodecylsulfát sodný)	Serva	20765
TaqMan reverse transcription reagent		
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin)	Fluka	87689
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Serva	37186
Triton X-100 (polyethylen glycol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-fenyl ether)	Fluka	93426
Trypsin/EDTA	PAA	L11-004
Tween20	Serva	37470
Vectashield	Vecta Laboratories	H-1000 B4252-
X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl beta-D-galactopyranoside, 98%)	Sigma	100MG M3148-
β-mercaptoethanol	Sigma	25ML

3.1.2. Primery

Primery (fw + rev)

GAPDH	(CACCACACTGAATCTCCCCT ; CCCCTCTTCAAGGGGTCTAC)
DAXX	(TCCCTCTGCATCCCTTCTC ; CTTCTGGATCGCATTGTGTG)
p21	(TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA ; GCGTTTTGGAGTGGTAGAAATC)

3.1.3. Protilátky

Primární protilátky

Název	Původ	Zdroj	Katalogové číslo	Ředění
Daxx	M/mono	dr. Andera UMG	-	1000x
Daxx (M-112)	K/poly	Santa Cruz	sc-7152	200x
GAPDH	M/mono	GeneTEX / from EXBIO	GTX30666	8000x
Mdm2	M/mono	Calbiochem / Merck	OP145	400x
p16	K/poly	Santa Cruz	sc-759	1000x
p21	M/mono	Santa Cruz	sc-56335	1000x
p53	M/mono	Santa Cruz	sc-126	1000x
p53 P-Ser15	K/poly	Cell Signaling	#9284	1000x
PML	M/mono	Santa Cruz	sc-966	300x
Wip1	M/mono	Santa Cruz	sc-376257	1000x
γH2AX P-Ser139	M/mono	Millipore / from Scintila	05-636	1000x

Sekundární protilátky

Název	Původ	Zdroj	Katalogové číslo	Ředění
Anti - rabbit	Goat	Bio-Rad	170-6515	10 000x
Anti - mouse	Goat	Bio-Rad	170-6516	10 000x
Alexa 555	Donkey	Invitrogen	A311570	1000x
Alexa 488	Donkey	Invitrogen	A21206	1000x

3.1.4. Lidské buněčné linie a kultury

- **BJ** buňky jsou fibroblasty z předkožky s neaktivní telomerázou, nastává replikační senescence. Karyotyp je přibližně do 62. populačního zdvojení diploidní, ale v 82. populačním zdvojení je již abnormální.

-
- **hTERT RPE-1** (human Telomerase Reverse Transcriptase) jsou imortalizované buňky sítnicového epitelu s aktivní telomerázou. Karyotyp je diploidní a obsahuje dva chromozomy X. Dále v textu pouze RPE-1
 - **MCF-7** buněčná nádorová linie odvozená z buněk adenokarcinomu prsní mléčné žlázy. Mají nulovou alelu pro gen *p16*.

3.2. Metody

3.2.1. Kultivace tkáňových linií a kultur

3.2.1.1. Rozmražení buněk

Buňky jsem vyjmul z tekutého dusíku a na suchém ledu přenesl do vodní lázně (37°C), ve které se zamrazovací zkumavka ohřála. Rozpuštěnou a ohřátou buněčnou suspenzi jsem přenesl do 15 ml falkony a přidal k ní 4 ml ohřátého média. Buňky se centrifugovaly při 300 g/3 min. Supernatant s DMSO jsem odstranil a buňky resuspendoval v 5 ml ohřátého média. Poté jsem je nasadil na 25 cm² kultivační láhev.

3.2.1.2. Kultivace buněk

MCF-7, BJ a RPE-1 buňky jsem kultivoval vD-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium). Do média jsem přidal 10% fetální hovězí sérum (FBS), antibiotika Penicillin (100 U/ml) a Streptomycin (100 ng/ml). Buňky byly kultivovány při 37°C v 5% atmosféře CO₂. Do média transdukovaných RPE-1 buněk byl přidáván Puromycin (4 µg/ml) a Blasticidin (5 µ/ml).

3.2.1.3. Ošetření buněk

Buňky jsem nasadil na kultivační misku o průměru 6 cm s čerstvým médiem. Následný den jsem je ošetřil příslušnou chemikálií nebo inhibitorem.

- Etoposid (VP16): 5 μ M, 48 hodin, MCF-7 buňky
10 μ M, 48 hodin, BJ buňky
- Doxorubicin (Doxo): 0.75 μ M, 2 hodiny, MCF-7 buňky
0.75 μ M, 4 hodiny, BJ buňky
- Kamptotecin (CPT): 0.25 μ M, 48 hodin, MCF-7 buňky
0.5 μ M, 48 hodin, BJ buňky
- BrdU: 100 μ M, výměna každých 48 hodin po dobu ošetřování buněk,
MCF-7/BJ buňky

Buňkám bylo každé 2 dny přidáváno čerstvé médium po dobu trvání experimentu.

3.2.2. Sběr buněk na Western blot a měření koncentrace proteinů

Buňky kultivované na 6 cm Petriho miskách jsem dvakrát promyl ve 2 ml PBS pufru, který měl pokojovou teplotu. Následně byly lyzovány v 90 – 120 μ l 1x Sample pufru (250 mM Tris-HCl, 40% [v/v] Glycerol, 8% [w/v] SDS, pH 6.8), který byl zahřátý na 95 °C. Lyzáty se poté 3x sonikovaly při 3 mikronech po dobu 15 vteřin se sedmi vteřinovými prodlevami. Dále se stanovila koncentrace proteinů pomocí BCA testu, který byl proveden podle výrobcem dodaného protokolu. Pro měření koncentrace byl použit Microplate photometer Multiskan[®] EX. Lyzáty i standardy byly měřeny ve dvojicích pro zvýšení přesnosti stanovené koncentrace.

3.2.3. SDS – PAGE (Polyakrylamidová gelová elektroforéza)

Vzorky jsem připravil s obsahem 20 až 40 μ g proteinu a na doplnění do určeného objemu jsem použil 1x Sample pufr. Na rozrušení disulfidických můstků byl přidán 10x zředěný 1M DTT (dithiothreitol), který pro zviditelnění vzorků obsahoval bromfenolovou modř. Vzorky se následně zahřály po dobu 3 minut při 95 °C a centrifugovaly se při 6 300 g/1 minutu. Vzorky jsem nanášel na 8% a 14% separační polyakrylamidové gely.

Současně jsem na gel nanesl 4 μ l proteinového markeru. Soupravu na elektroforézu jsem naplnil elektroforetickým pufrům (900 ml ddH₂O, 100 ml 10x TGS pufru). Velikost elektrického proudu na jeden gel byla 25 mA a elektroforéza trvala přibližně 1 hodinu a 30 minut.

3.2.4. Western blot

Byla použita technika "mokrý" Western blot, kdy se "sendvič" skládá v blotovacím pufru (700 ml ddH₂O, 100 ml 10x TG pufru, 200 ml methanolu). Složil jsem jej z umělohmotné kazety, umělé blotovací houby, dvou filtračních papírů na které jsem přenesl gel z proběhlé SDS elektroforézy. Na něj se přiložila nitrocelulósová membrána (AmershamTM Hybond ECL, GE Healthcare Life Sciences), dva filtrační papíry, blotovací houba a kazeta se uzavřela. Všechny složky „sendviče“ byly namočený v blotovacím pufru. Kazeta se vložila do blotovací aparatury. Blotování probíhalo za stálého míchání pufru při proudu 400 mA, po dobu 1 hodiny a 30 minut.

Po dokončení přenosu proteinu jsem membránu barvil 3 minuty Ponceau, která v přítomnosti proteinů obarví membránu červeně. Poté byla Ponceau odmyta PBS-T pufrům (100 ml 10x PBS, 900 ml ddH₂O, 1ml Tween – 20) a následně blokována v 10% odtučněném mléce rozpuštěném v PBS-T. Blokace probíhala po dobu 20 minut. Membrána jsem promyl 3 minuty v PBS-T a nechal inkubovat s primární protilátkou při teplotě 4 °C přes noc. Po inkubaci jsem membránu opláchnul 2x 5min v PBS-T a inkuboval 1 – 2 hodiny v sekundární protilátce rozpuštěné v 10% odtučněném mléce v PBS-T. Po druhé inkubaci jsem opět membránu propláchnul 3x 5 minut v PBS-T. K detekci proteinů jsem použil chemiluminiscenční substrát Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). Filmy jsem vyvolával na přístroji OPTIMAX 2010 (PROTEC).

Ve výsledcích zobrazené Western bloty, které jsou zobrazeny s dělicí čarou, jsou z jednoho gelu. Zobrazil jsem pouze vzorky, které jsou relevantní pro daný experiment.

3.2.5. Barvení SA- β -galaktosidázy

Buňky jsem kultivoval v miskách na 12mm podložním sklíčku, které jsem přenesl do 24 – jamkové destičky a propláchnul 2x 500 μ l PBS. Následně bylo fixováno po dobu

12 minut 0,25% glutaraldehydem rozpuštěným v PBS. Poté jsem jej propláchnul 3x 500 μ l PBS + MgCl₂ (pH 6). Přidal jsem barvicí roztok X-Gal (500 μ l/1 sklíčko) a inkuboval dle potřeby 1 – 8 hodin. Po inkubaci jsem jej propláchnul a namontoval do 2 μ l Mowiolu. Obrázky byly pořízeny na fluorescenčním mikroskopu LEICA DM 6000.

3.2.6. Nepřímá imunofluorescence

Buňky jsem kultivoval na 12 mm podložním sklíčku, které jsem přenesl do 24 – jamkové destičky a propláchnul 2x 500 μ l PBS. Buňky byly fixovány 350 μ l 4% paraformaldehydu po dobu 15 minut. Sklíčko se poté propláchnulo 2x 5 minut v 500 μ l PBS. Pro permeabilizaci buňek jsem přidal 300 μ l 0,2% Tritonu X-100 na dobu 10 minut. Sklíčko se opět propláchnulo v PBS a blokovalo 100 μ l 10% FBS – PBS po 30 minut. Poté se při pokojové teplotě inkubovalo se 100 μ l primární protilátky naředěné v 10% FBS – PBS 60 minut. Sklíčko s buňkami jsem opláchnul v PBS 3x 5 minut a přidal sekundární protilátku naředěnou v 10% FBS – PBS na 60 minut při pokojové teplotě. Po propláchnutí 3x 5 minut v PBS bylo sklíčko inkubováno 2 minuty s 200 μ l DAPI (1 μ g/ml) rozpuštěným v injekční vodě. Poté jsem sklíčko namontoval do 2 μ l Vectashieldu a okraje se zalakoval. Snímání jsem prováděl na fluorescenčním mikroskopu (scan[^]R, OLYMPUS).

Výsledky byly analyzovány v softwaru scan[^]R Analysis. Při určování změny průměrného počtu PML-NBs a změny intenzity signálu proteinu PML/DAXX v buňce jsem nejdříve definoval buněčné jádro pomocí barvení DAPI a jeho cirkularity. Poté jsem v této ploše stanovil změnu počtu PML-NBs a změnu intenzity signálu jednotlivých proteinů. U stanovování změny kolokalizace proteinů PML/DAXX jsem si v jednotlivých fluorescenčních kanálech definoval proteinová ohniska. Při překrytí fluorescenčních kanálů jsem vyhodnotil změnu jejich kolokalizace.

3.2.7. Přímá imunofluorescence a měření na průtokovém cytometru

Buňky byly pěstovány na 6 cm Petriho misce a do média byl na 6 hodin přidán analog thyminu EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridinu). Poté byly opláchnuty s PBS a bylo k nim přidáno 500 μ l roztoku trypsin/EDTA a byly umístěny do inkubátoru do doby, než se uvolnily z povrchu misky. Poté k nim byl přidán 1 ml média a vzniklá buněčná suspenze se přenesla do 1,5 ml zkumavky eppendorf. Suspenze se centrifugovala při 300 g 3 minuty. Supernatant

se odsál a buňky byly resuspendovány v PBS a znovu centrifugovány při 300 g 3 minuty. Poté se resuspendovaly ve 100 µl PBS přidalo se 900 µl 4% paraformaldehydu na fixování. Po 15 minutách fixace se buňky promyly v PBS (centrifugace 300 g 3 minuty, odsát supernatant). Membrána byla permeabilizována přidáním 500 µl 0,25% Tritonu X-100 v PBS po dobu 5-ti minut. Buňky se promyly v 1% BSA-PBS a byla k nim přidána reakční směs:

- 440 µl TRIS – 1 M, pH 8,5
- 50 µl ADD (aditivum) – 1 M askorbát
- 10 µl 100 mM CuSO₄
- 0,5 µl Alexa 647 konjugovaná s azidem
- (100 – 125 µl na vzorek)

Po 30 minutách inkubace jsem buňky promyl v 500 µl 0.5% Tween 20/1% BSA – PBS a nakonec resuspendoval ve 100 – 200 µl PBS. Vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru LSR II (BD Biosciences) a vyhodnocovány v programu FlowJo.

3.2.8. Izolace RNA a kvantitativní Real-time RT-PCR

Buněčnou RNA jsem izoloval pomocí RNeasy Mini Kit (50) (Kat. Číslo 74104, QIAGEN). Postupoval jsem podle přiloženého protokolu. Koncentraci získané RNA, která byla rozpuštěna ve vodě neobsahující RNázy, jsem změřil na přístroji NanoDrop (Thermo Scientific). Izolovanou RNA o koncentraci 100 ng/µl jsem přidal do reakční směsi pro reverzní transkripci. Ta probíhala při programu, který je zobrazen v níže uvedené tabulce. Se vzorky jsem po celou dobu pracoval na ledu.

Reakční směs – reverzní transkripce

Počet reakcí	1	x
10x RT Buffer	2	ul
dH ₂ O	9,2	ul
25x dNTP mix (100 mM)	0,8	ul
10x RT Náhodné primery	2	ul
Inhibitor Rnáz	1	ul
Reverse Transcriptase MultiScribe	1	ul
RNA (100 ng/ul)	4	ul
Celkový objem	20	ul

Program:

Krok 1	25 °C	10 min
Krok 2	37 °C	120 min
Krok 3	85 °C	5min
Krok 4	4 °C	

cDNA získaná reverzní transkripcí byla smíchána se směsí pro kvantitativní PCR. Jako negativní kontrolu jsem použil reakční směs pro kvantitativní PCR bez cDNA. Kvantitativní PCR byla provedena na přístroji 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies) a relativní exprese mRNA byla stanovena metodou $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Reakční směs – kvantitativní PCR		1x
cDNA template		2,5 µl
Master Mix		6,25 µl
primers (2,5µM)	fw + rev	1,5 µl
dH ₂ O		2,25 µl

3.2.9. Lentivirová transdukce buněk RPE-1

Transdukované RPE-1 byly dodány laboratoří Ladislava Anděry (Oddělení buněčné signalizace a apoptózy, ÚMG AV ČR).

Lentivirové vektory byly připraveny v buňkách HEK293. Ty byly transfekovány vybraným plazmidem a Lenti-X HTX Packaging Mix. Po 48 hodinách byly virové partikule sesbírány. Pro transdukci byl použit TetON systém, kde se gen zájmu exprimuje po přidání doxycyklinu. Z tohoto důvodu je používáno kultivační médium neobsahující teracyklin a jeho deriváty. Nejdříve byly buňky transdukovány regulačním plazmidem a selektovány na médiu s blasticidinem (5 µg/µl). Po selekci došlo k druhé transdukci plazmidem obsahujícím gen zájmu. Poté byly buňky selektovány kombinací dvou antibiotik – blasticidinu a puromycinu (4 µg/µl).

4. Cíle diplomové práce

V předchozích pokusech prováděných v naší laboratoři byl pozorován možný vliv proteinu DAXX na navození buněčné senescence. U lidských fibroblastů transfekovaných lentivirálním vektorem obsahujícím shRNA proti genu *daxx* došlo k umlčení jeho exprese. Transfekované buňky zastavily proliferaci a tvarem vykazovaly senescentní fenotyp. Dále v senescentních buňkách indukovaných onkogenem Ras byla pozorována snížená hladina proteinu DAXX.

Cílem mé diplomové práce bylo blíže charakterizovat, jak je protein DAXX regulován a jak jeho množství ovlivňuje buněčnou senescenci.

Specifické cíle:

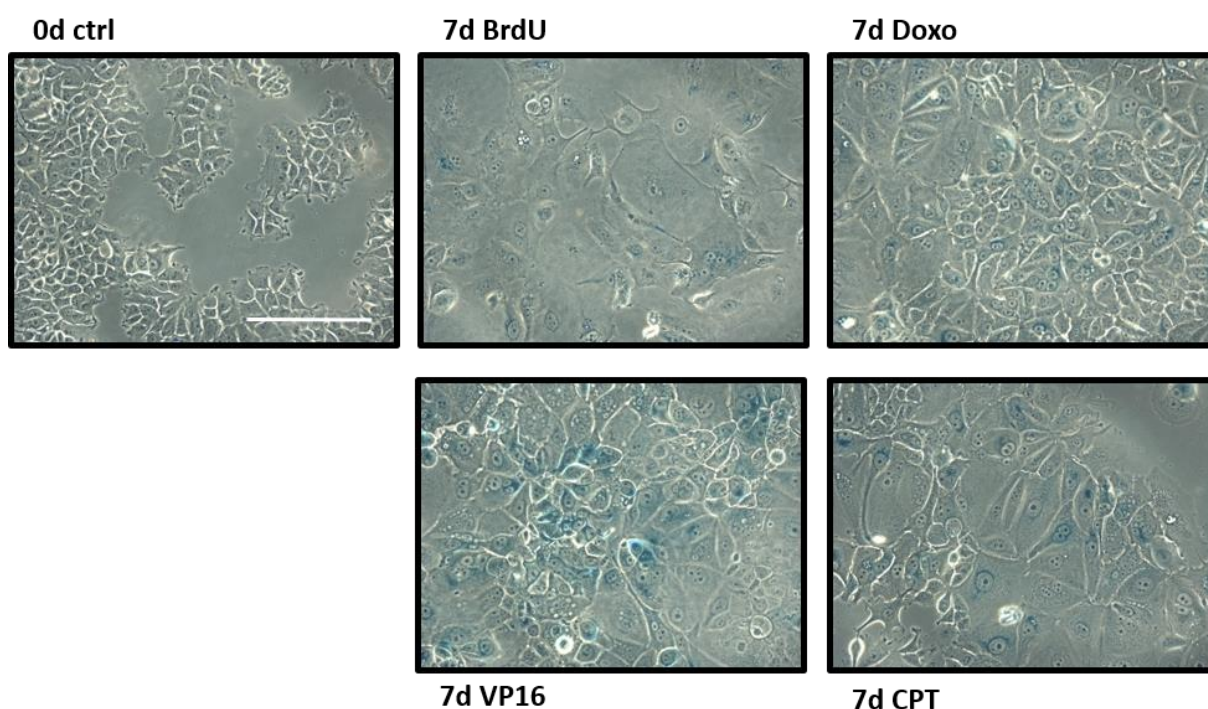
- Navození buněčné senescence a stanovení hladiny proteinu DAXX
- Stanovení způsobu regulace proteinu DAXX v senescentních buňkách
- Popis vlivu zvýšeného množství proteinu DAXX na navození buněčné senescence
- Popis vlivu zvýšení množství proteinu DAXX v senescentních buňkách

5. Výsledky

5.1. Snížení hladiny proteinu DAXX během rozvoje buněčné senescence

Nádorové buňky MCF-7 jsem nasadil na 6 cm Petriho misky, které obsahovaly kulatá krycí sklíčka. Další den jsem do média přidal chemikálie pro indukci buněčné senescence. Tyto chemikálie způsobují jednořetězcové a dvouřetězcové zlomy a aktivují p53/p21 nebo Rb/p16 signální dráhu.

Po sedmi dnech od počátku expozice chemikáliím jsem nejdříve sesbíral krycí sklíčka s buňkami, které jsem fixoval a barvil na detekci aktivity SA- β -galaktosidázy (Obr. 14). Buňky vystavené chemikáliím vykazovaly morfologii podobnou senescentním buňkám a byla v nich detekována SA- β -galaktosidáza (Dimri et al., 1995). Kontrolní buňky se nezbarvily.

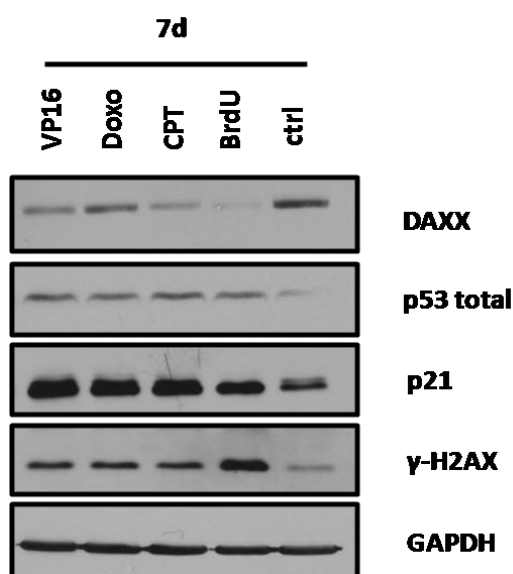


Obr. 14 Indukce senescence v buňkách MCF-7. Aktivita SA- β -galaktosidázy (modré zbarvení) byla detekována v kontrolních buňkách MCF-7 (ctrl) a buňkách po 7 dnech od ošetření chemikáliemi BrdU, Doxo, VP16 a CPT. Měřítka 200 μ m.

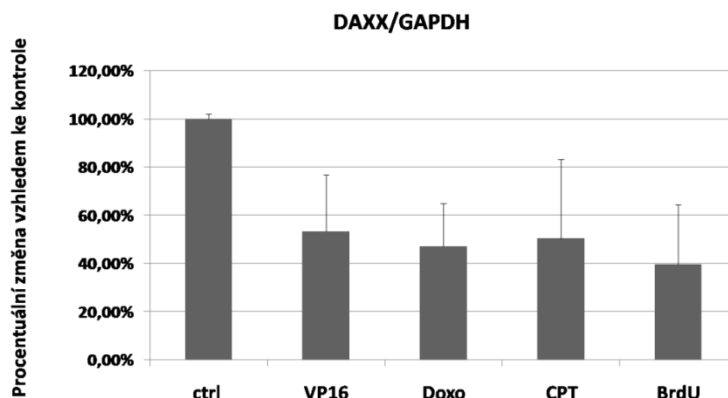
Ze zbylých buněk v Petriho misce jsem připravil buněčný lyzát a technikou Western blot analyzoval množství proteinů p21, p53 a modifikovaného histonu H2AX - γ H2AX (Obr. 15). U buněk vystavených chemikáliím došlo k navýšení p53 a p21, které jsou

nadprodukovány v senescentních buňkách (Romanov et al., 2010; Serrano et al., 1997). Současně se zvedla hladina γ H2AX, který je znakem poškození DNA v senescentních buňkách (Sedelnikova et al., 2004). Z toho lze usoudit, že se u buněk MCF-7 podařila navodit senescence všemi používanými typy látek.

Ve všech připravených senescentních buňkách došlo k poklesu množství proteinu DAXX (Obr. 15). Western blot byl analyzován denzitometricky v programu AIDA Image Analyzer. Analýza ukázala, že ošetření buněk BrdU mělo největší efekt na snížení množství proteinu DAXX (Obr. 16).



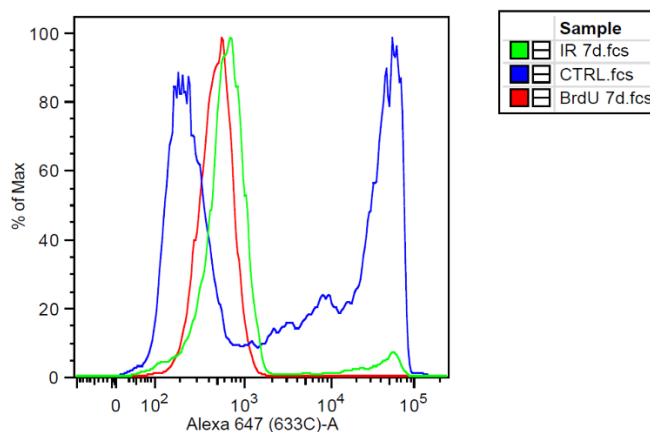
Obr. 15 Reprezentativní Western blot zobrazuje množství proteinů DAXX, p53, p21 a γ H2AX v MCF-7 buňkách. Buňky byly ošetřeny VP16 (5 μ M, 48 hodin), Doxo (0,75 μ M, 2 hodiny), CPT (0,25 μ M, 48 hodin) a BrdU (100 μ M, výměna každých 48 hodin po dobu ošetření). Jako interní kontrola nanášky proteinu byla zvolena GAPDH. (ctrl – kontrolní neošetřené buňky).



Obr. 16 Denzitometrická analýza Western blotu provedena v programu AIDA. Na ose y je zobrazena procentuální změna množství proteinu DAXX u různých typů senescence vztažena ke kontrolním buňkám se zobrazenou směrodatnou odchylkou stanovenou ze tří experimentů. Vztaženo na GAPDH. (ctrl – kontrolní neošetřené buňky)

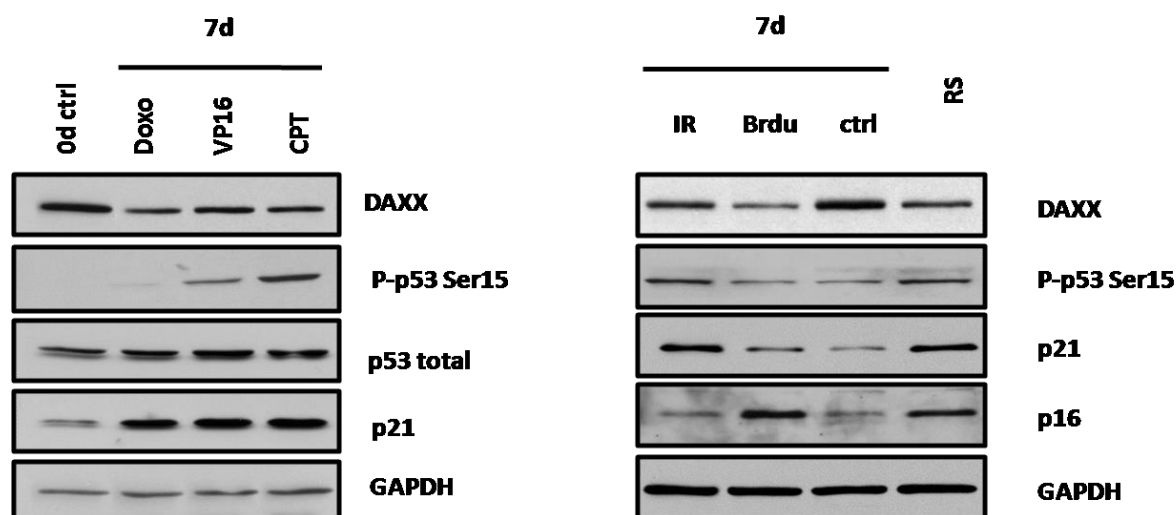
U primárních fibroblastů BJ jsem senescenci indukoval podobně, chemikáliemi a navíc ionizujícím zářením.

Po sedmi dnech jsem sesbíral vzorky na Western blot. U buněk vystavených BrdU a ionizujícímu záření jsem provedl analýzu buněčného cyklu změřením inkorporace EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) na průtokovém cytometru (Obr. 17). Kontrolní buňky byly proliferačně aktivní a inkorporovaly EdU. U buněk vystavených BrdU nedocházelo k inkorporaci a buňky vystavené ionizujícímu záření inkorporovaly ve velmi malém množství.



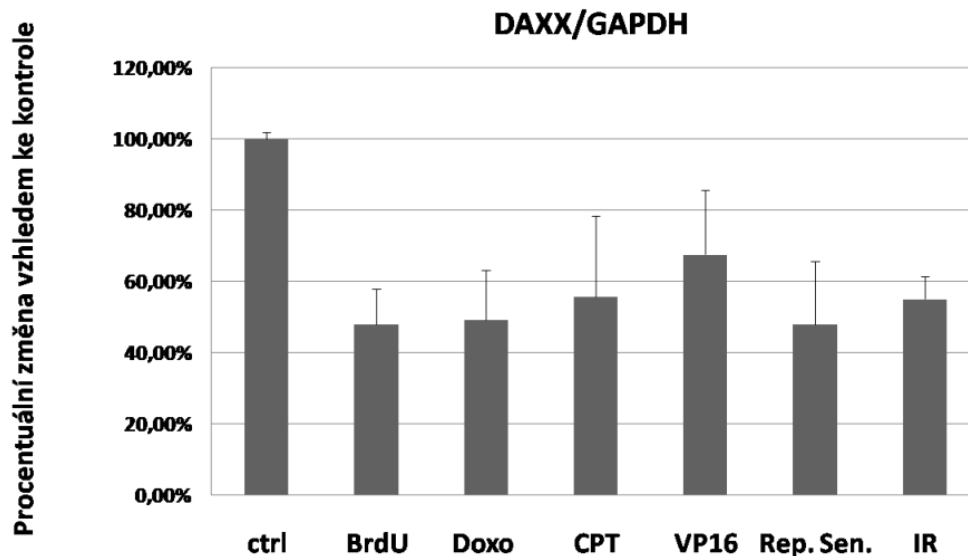
Obr. 17 Inhibice replikace DNA během rozvoje senescence provedená průtokově-cytometrickou analýzou inkorporace EdU. Histogram fluorescenční intenzity protilátky Alexa 647 detekované při 633 nm. U kontrolních buněk (ctrl) docházelo k inkorporaci EdU během proliferace. Buňky ošetřené BrdU (BrdU 7d) byly zastavené v buněčném cyklu a neinkorporovaly Edu a u buněk ozářených 10 Gy ionizujícího záření (IR 7d) docházelo k nízké inkorporaci. Analyzováno v programu FlowJo.

Technikou Western blot jsem v buněčných lyzátech analyzoval hladiny proteinů DAXX, p21, p16, p53 a fosforylovaného p53 na serinu 15 u všech typů použitých chemikálií. Jako pozitivní kontrolu jsem použil replikačně senescentní (RS) fibroblasty s populačním zdvojením 83 (PD83). Stejně jako u nádorových buněk MCF-7, došlo ke zvýšení proteinů, které se podílejí na navození senescence nebo proteinů, které signalizují poškození DNA (Obr. 18).



Obr. 18 Aktivace DDR a represe DAXX během chemicky indukované senescence. Imunoblot proteinů DAXX, p16, p21, p53 a fosforylovaného p53 na serinu 15 ve fibroblastech BJ. Buňky byly ošetřeny IR (10 Gy), BrdU (100 μ M, výměna každých 48 hodin po dobu ošetřování), Doxo (0,75 μ M, 4 hodiny), VP16 (10 μ M, 48 hodin) a CPT (0,5 μ M, 48 hodin). Jako negativní kontrola sloužily neošetřené proliferující fibroblasty BJ. Pozitivní kontrola byly RS fibroblasty BJ. Jako interní kontrola nanášky proteinu byla zvolena GAPDH.

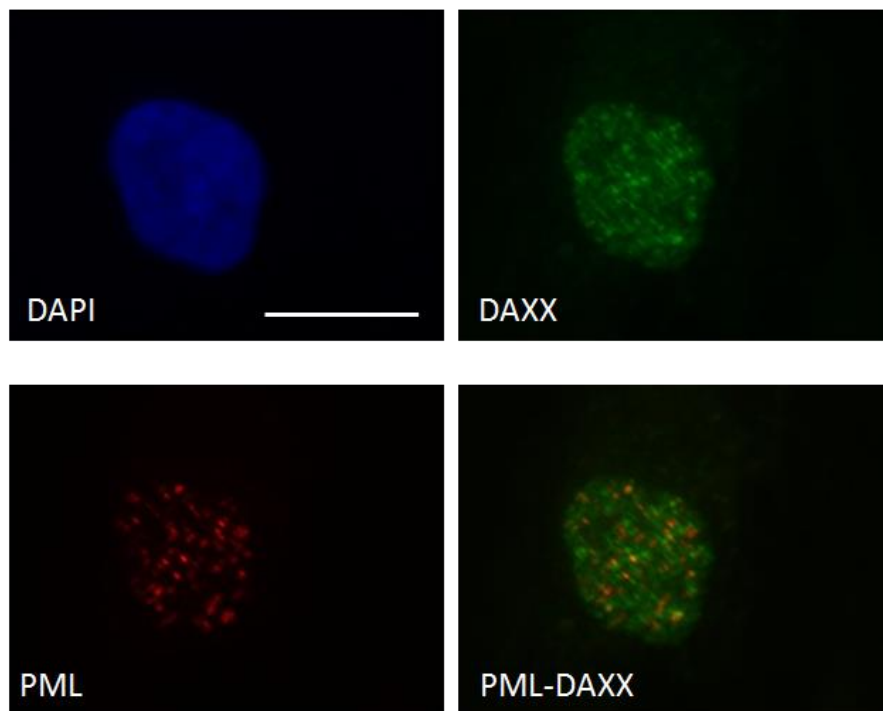
Množství proteinu DAXX jsem kvantifikoval denzitometricky. Nejnižší hladina byla opět pozorována v buňkách ošetřených BrdU. Toto množství bylo téměř shodné s množstvím proteinu DAXX v replikačně senescentních (RS) buňkách (Obr. 19).



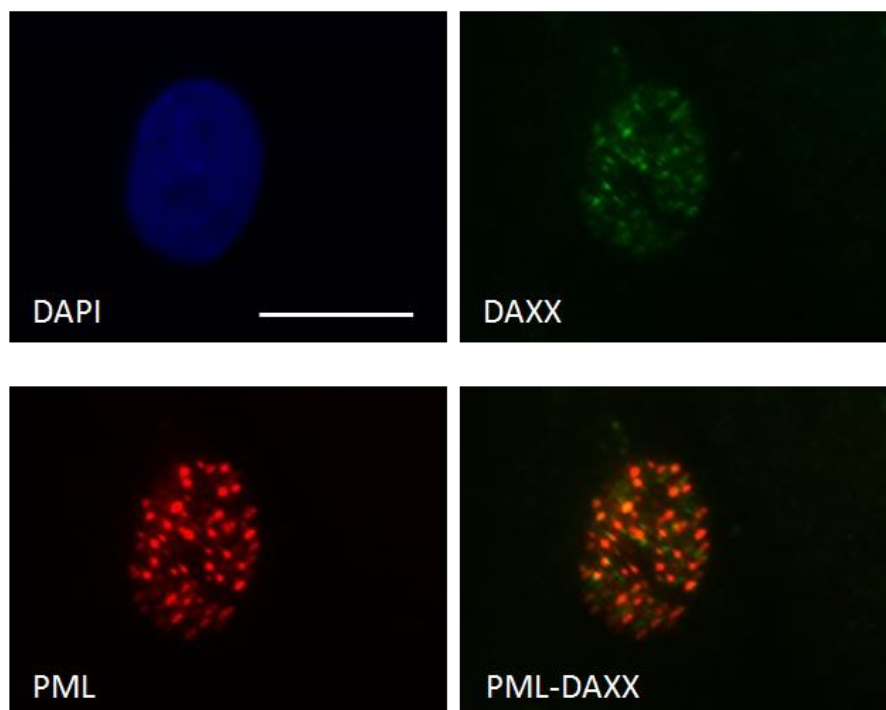
Obr. 19 Represe hladiny proteinu DAXX během rozvoje buněčné senescence. Denzitometrická analýza intenzity signálu DAXX na imunoblotu se zobrazenou směrodatnou odchylkou stanovenou ze tří experimentů. Analýza byla provedena v programu AIDA. Vztaženo na GAPDH. (ctrl – kontrolní neošetřené buňky)

U všech použitých chemikálií došlo k navození buněčné senescence u obou buněčných typů. Současně došlo ke snížení hladiny proteinu DAXX. Největší úbytek oproti kontrolním buňkám byl pozorován při replikační senescenci a po ošetření BrdU. Po pozorování, že u ošetření BrdU dochází k efektivní zástavě buněčného cyklu a současně k výraznému snížení hladiny proteinu DAXX, jsem krycí sklíčka s kontrolními buňkami (ctrl) a buňkami ošetřenými BrdU (BrdU 7d) barvil protilátkou proti proteinu DAXX a PML (Obr. 20). V senescenci dochází ke zvýšení množství PML a současně počtu PML-NB, pro jejichž tvorbu je PML nezbytný (Ferbeyre et al., 2000). Analýza krycích sklíček na mikroskopu scan^R (OLYMPUS) potvrdila snížení množství proteinu DAXX (Obr. 21a). Současně došlo k nárůstu hladiny proteinu PML a průměrného počtu PML-NB v jádře (Obr. 21b). Jelikož protein DAXX a PML společně interagují (Ishov et al., 1999), analyzoval jsem kolokalizaci v proliferačně aktivních a senescentních buňkách. Změna jejich vzájemné kolokalizace nebyla pozorována (Obr. 21c).

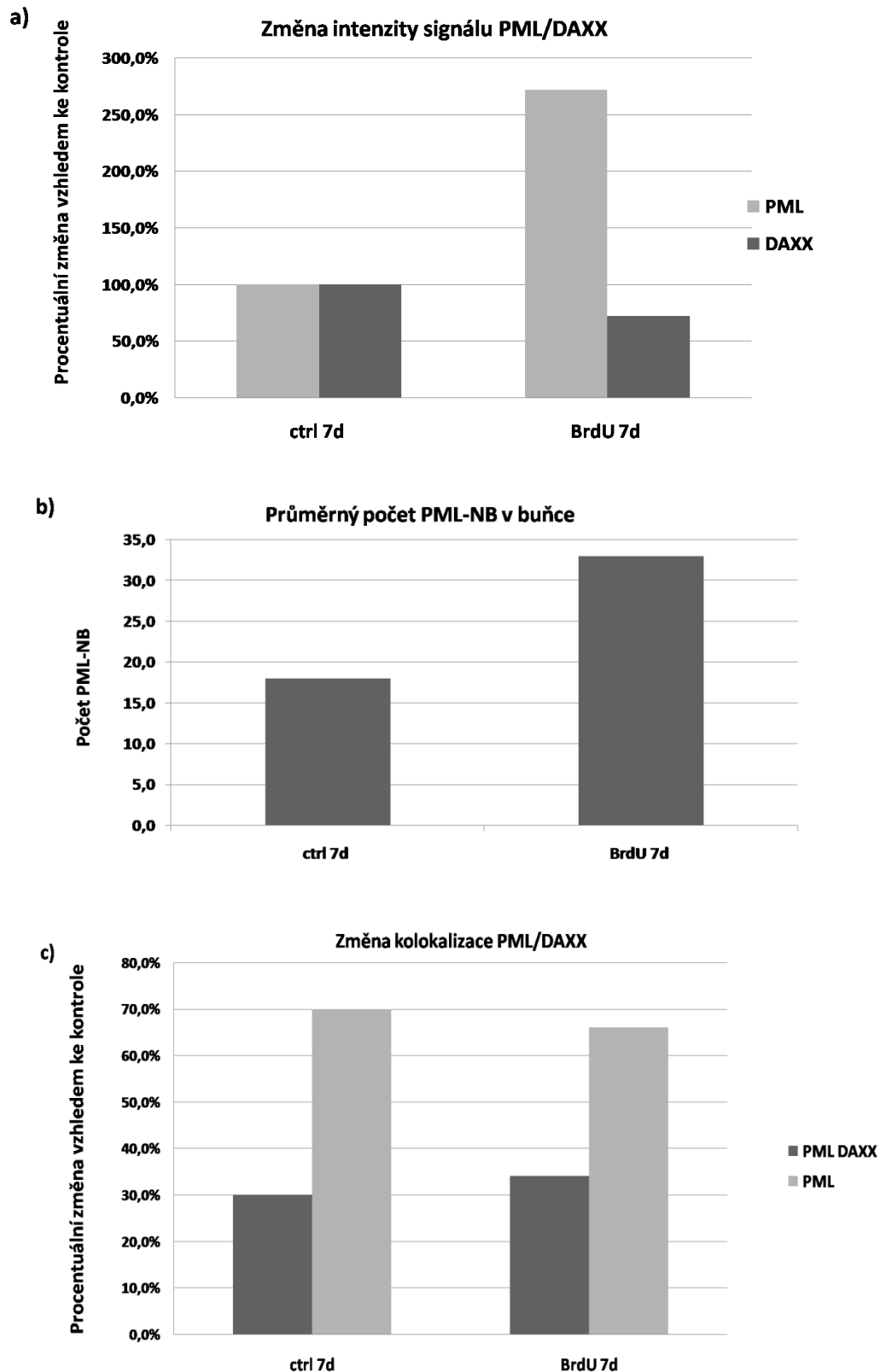
Ctrl 7d



BrdU 7d



Obr. 20 Expres proteinu DAXX a PML v kontrolních a senescentních buňkách. Buňky byly barveny specifickou protilátkou pro DAXX (zelený), PML (červený) a DAPI (modrá) barví DNA. Senescence byla u buněk navozena ošetřením BrdU (100 μ M, výměna každých 48 hodin po dobu ošetřování).

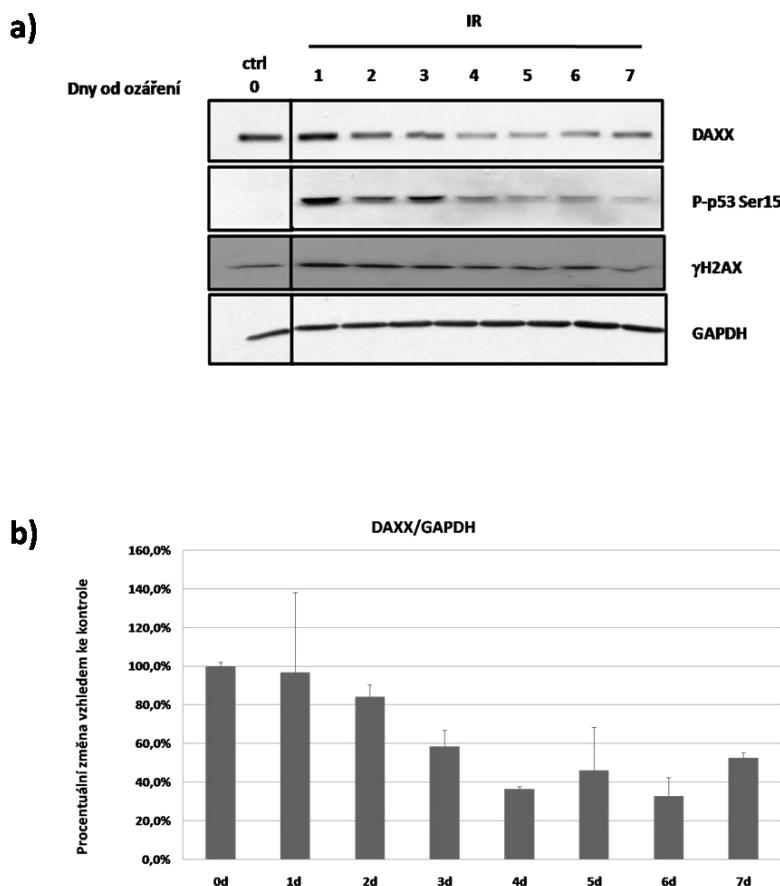


Obr. 21 Analýza změny hladiny a kolokalizace proteinů DAXX a PML. **a)** Změna intenzity signálu proteinu DAXX a PML v kontrolních buňkách (ctrl 7d) a BrdU ošetřených buňkách (BrdU 7d). **b)** Rozdílné množství průměrného počtu PML-NB u kontrolních a senescentních buněk. **c)** Vyhodnocení změny kolokalizace proteinu DAXX s PML v proliferačně aktivních a senescentních buňkách.

5.2. Stanovení způsobu regulace množství proteinu DAXX v senescentních buňkách

5.2.1. Pokles hladiny proteinu DAXX vykazuje pomalou kinetiku

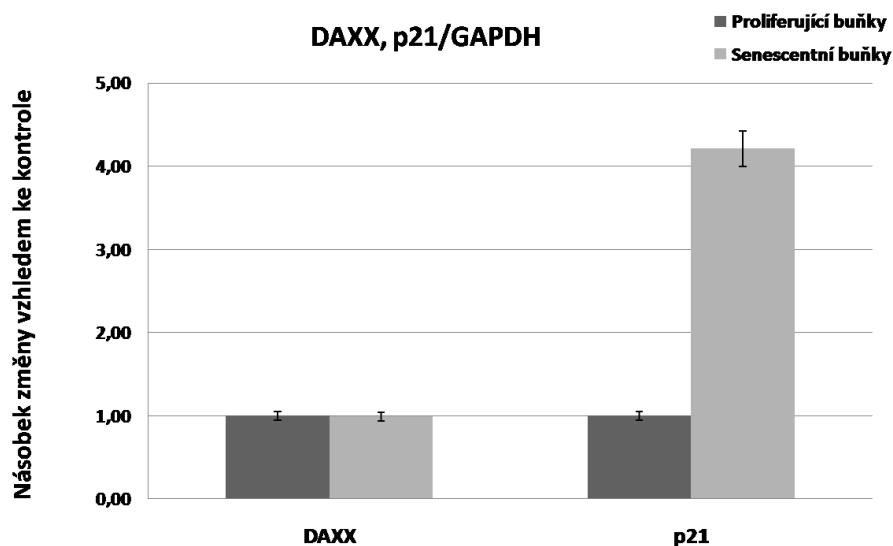
Pro popis kinetiky snížení proteinu DAXX jsem nasadil fibroblasty BJ na 6 cm Petriho misky a ozářil 10 Gy. Každých 24 hodin po dobu 7 dní jsem sbíral vzorky na analýzu technikou Western blot. Stanovil jsem hladinu proteinu DAXX, fosforylovaného p53 na serinu 15 a fosforylovaného histonu γ H2AX. K nejvýraznějšímu poklesu množství proteinu DAXX došlo čtvrtého dne, poté se jeho hladina začala pomalu navracet, ale ani sedmého dne nedosáhla hladiny v kontrolních buňkách (Obr. 22).



Obr. 22 Dynamika poklesu hladiny DAXX během rozvoje senescence. a) Technikou Western blot byla zobrazena změna hladin proteinů DAXX, P-p53 Ser15 a γ H2AX v průběhu sedmi dní po ozáření. Jako interní kontrola nanášky proteinu byla zvolena GAPDH. b) Denzitometrická analýza hladiny proteinu DAXX se zobrazenou směrodatnou odchylkou stanovenou ze tří experimentů. Vzaženo na GAPDH. (ctrl – kontrolní neošetřené buňky)

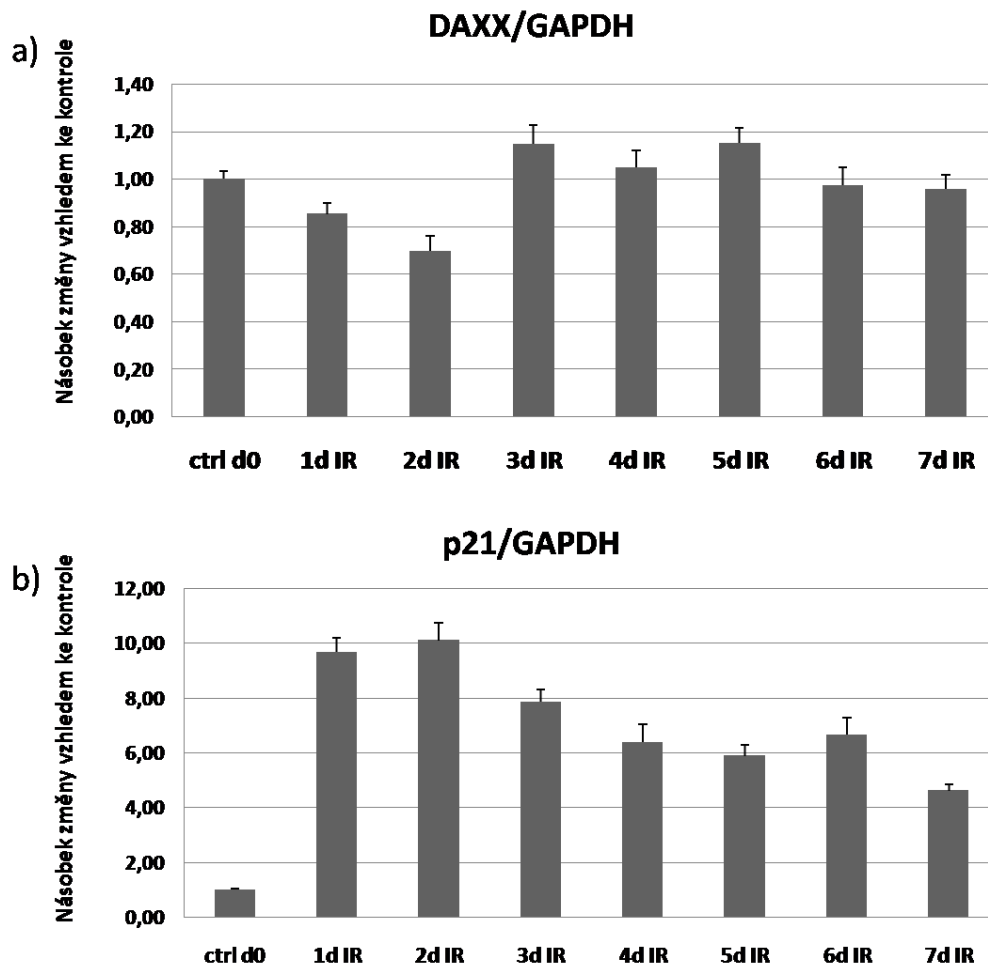
5.2.2. Hladina mRNA DAXX se během senescence nemění

K určení mechanismu, jakým je hladina proteinu DAXX regulována během rozvoje senescence, jsem změřil hladinu jeho transkriptu. Pro tento účel jsem zvolil metodu qRT-PCR, jako interní standard jsem vybral *gapdh* a jako znak senescence *p21*. Porovnal jsem hladinu mRNA *daxx* v mladých proliferačně aktivních a replikačně senescentních buňkách BJ. Předběžné výsledky naznačují, že exprese genu *daxx* byla v obou případech téměř totožná, kdežto hladina mRNA *p21* byla v replikačně senescentních buňkách BJ podle očekávání zvýšená (Obr. 21).



Obr. 21 Porovnání hladiny mRNA genu *daxx* a *p21* v proliferačních (PD26) a replikačně senescentních (PD81) buňkách BJ stanovené pomocí qRT-PCR. Osa y znázorňuje násobek hladiny mRNA vzhledem ke kontrolním buňkám se zobrazenou směrodatnou odchylkou stanovenou trojtým opakováním jednoho experimentu. *gapdh* byla použita jako interní standard.

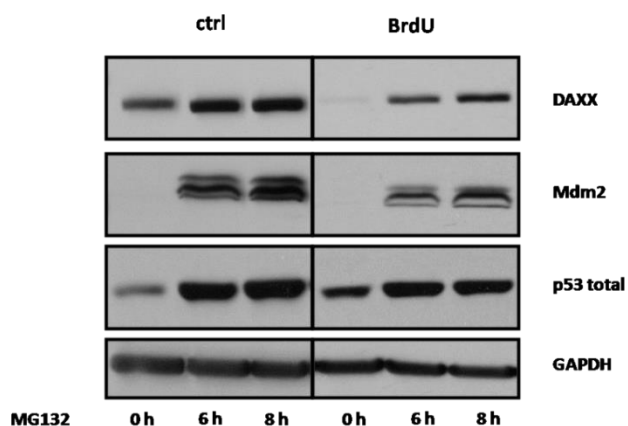
Z dříve popsaného experimentu, kde se po sedm dní po ozáření pozorovala změna hladiny proteinu DAXX byly rovněž sbírány vzorky na qRT-PCR. Sledovala se změna exprese mRNA genu *daxx*. V průběhu 7 dní nebyla pozorována významná změna jeho exprese (Obr. 22a). Pro porovnání byla analyzována změna exprese *p21*. U všech ozářených vzorků v celé časové řadě byla hladina mRNA *p21* zvýšená (Obr. 22b).



Obr. 22 Kvantitativní stanovení hladin mRNA genu *daxx* (a) a *p21* (b) v kontrolních a ozářených buňkách BJ. Buňky jsem ozářil 10 Gy a sbíral každých 24 hodin po dobu 7 dní. Výsledky jsou průměrem tří opakování jednoho experimentu se zobrazenou směrodatnou odchylkou. Stanovení exprese mRNA jsem provedl metodou qRT-PCR. Vztaženo na *gapdh* (interní standard).

5.2.3. Množství proteinu DAXX je regulováno jeho degradací v proteozomu

Po zjištění, že DAXX nejspíše není regulován na úrovni hladiny mRNA, jsem provedl pokus, kdy jsem pozoroval jeho stabilitu po inhibici proteazomální degradace v kontrolních a senescentních buňkách. Ke kontrolním a senescentním fibroblastům BJ, u kterých jsem navodil senescenci ošetřením BrdU, jsem přidal inhibitor proteazomu MG132 na 6 a 8 hodin. Následně jsem z kontrolních buněk a buněk s MG132 připravil lyzáty a změnu hladiny proteinu DAXX pak analyzoval technikou Western blot (Obr. 23).



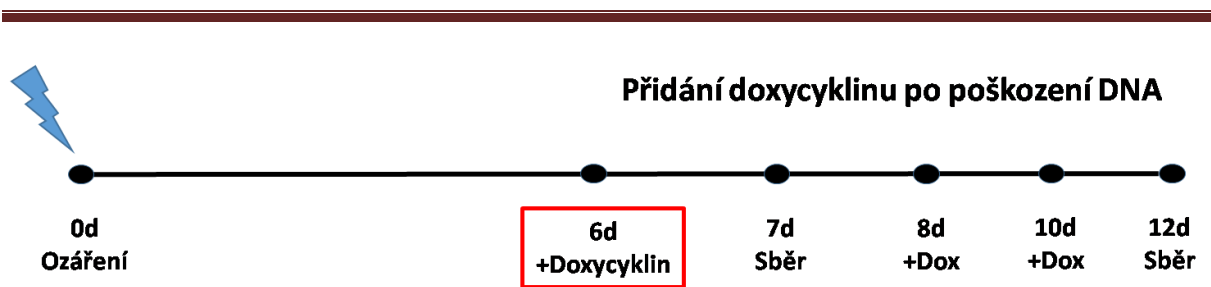
Obr. 23 Stabilita proteinu DAXX po inhibici proteazomu. Detekce DAXX, Mdm2 a p53 v kontrolních (ctrl) a BrdU vystavených (BrdU) buňkách BJ popřídání MG132 na dobu 6 a 8 hodin technikou Western blot. Jako interní kontrola nanášky proteinu byla zvolena GAPDH.

Po 6 a 8 hodinách jsem pozoroval stabilizaci proteinů DAXX, Mdm2 a p53, které spolu tvoří komplex (Tang et al., 2006). To naznačuje, že množství proteinu DAXX je v buňce regulováno jeho degradací v proteazomu.

5.3. Nadměrná exprese proteinu DAXX v senescentních buňkách RPE-1 nemá vliv na obnovení buněčné proliferace

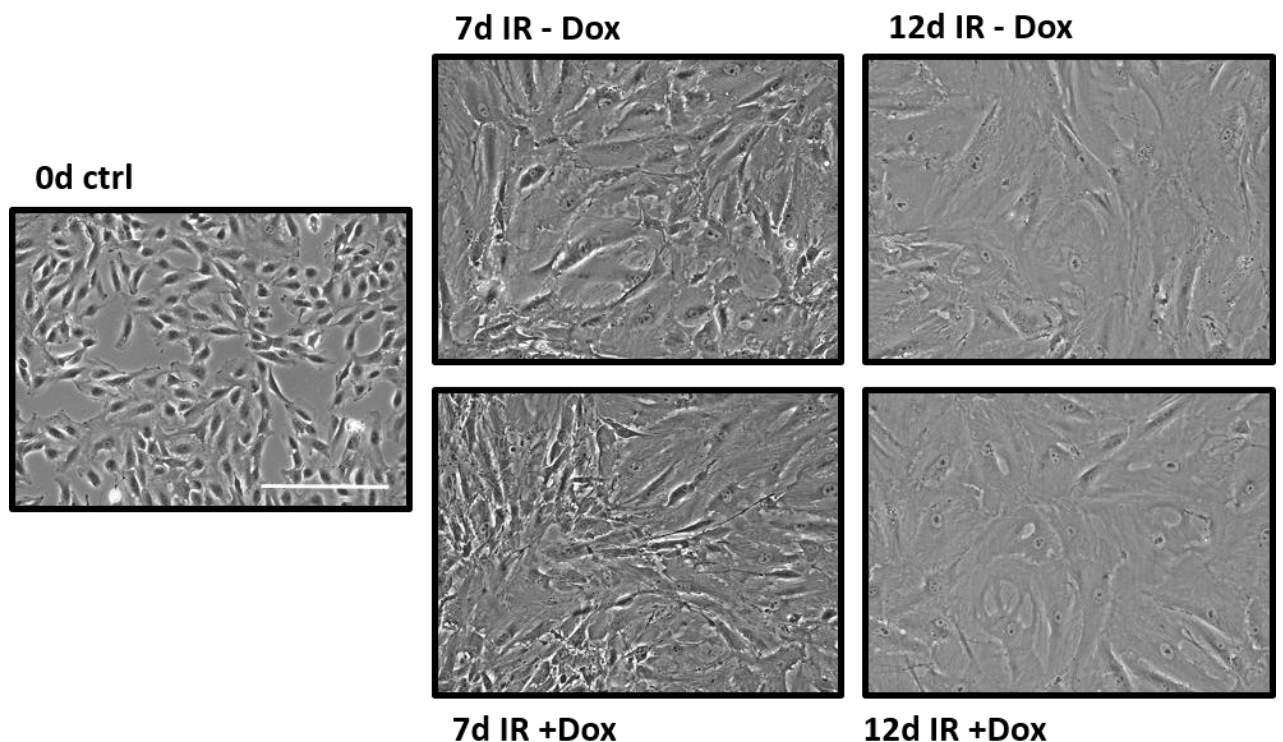
Dříve bylo v naší laboratoři pozorováno, že po snížení hladiny proteinu DAXX dochází k indukci senescence (nepublikovaná data). Výše uvedené výsledky ukazují, že po navození senescence se jeho hladina snižuje. Proto jsem testoval hypotézu, zda pokles hladiny DAXX je příčinou rozvoje senescence. Pro tento účel byl DAXX ektopicky exprimován v senescentních buňkách a byla sledována změna proliferační aktivity.

Telomerázou immortalizované buňky sítnicového epitelu RPE-1 byly transdukovány lentivirovým tetracyklin-indukovatelným (TetON) systémem pro vnesení genu *daxx*. Po transdukcii jsem do kultivačního média přidával selekční antibiotika puromycin (4 μ /ml) a blasticidin (5 μ g/ml). Buněčnou senescenci jsem navodil ozářením buněk 20 Gy. Šestáho dne jsem k části buněk přidal doxycyklin (100 ng/ml) pro navození exprese proteinu DAXX. Sedmého dne jsem část vzorků sesbíral pro analýzu hladiny DAXX technikou Western blot. Zbylé buňky jsem kultivoval do dvanáctého dne. K polovině buněk jsem každých 48 hodin přidával doxycyklin pro udržení zvýšené exprese proteinu DAXX (Obr. 24).

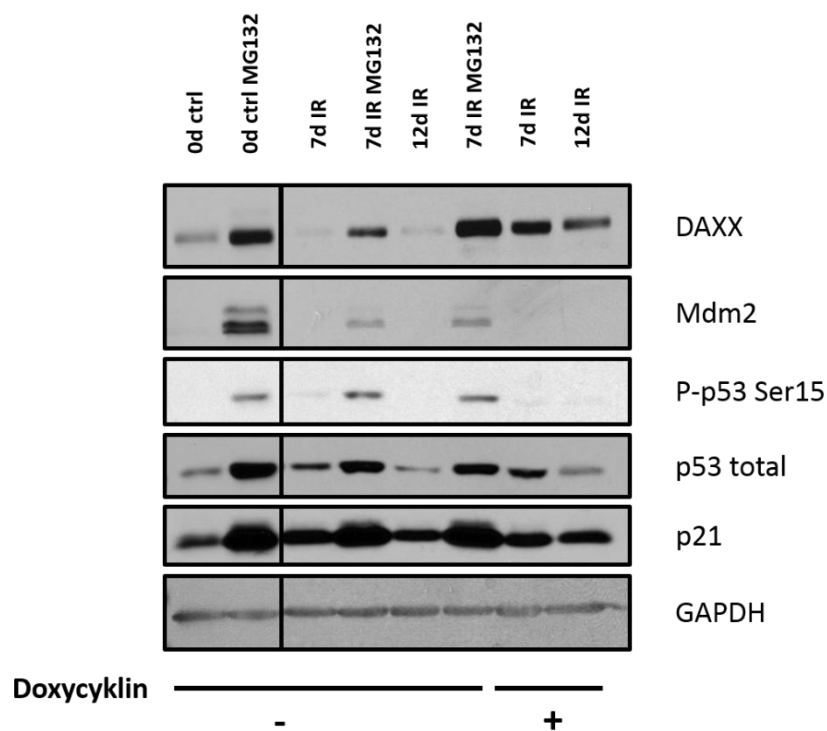


Obr. 24 Schéma experimentu indukce ektopické exprese proteinu DAXX v senescentních buňkách. Buňkám RPE-1 byl šestý den po ozáření 20 Gy přidán doxycyklin. 12. den byly buňky sklizeny na analýzu.

Sledoval jsem, zdali nadprodukce DAXX v senescentních buňkách ovlivní buněčnou morfologii (Obr. 25). Změna morfologie senescentních buněk nebyla po sedmi dnech od navození exprese proteinu DAXX pozorována. Technikou Western blot jsem stanovil účinnost exprese proteinu DAXX po přidání doxycyklinu a množství proteinů zodpovědných za udržení buněčné senescence (Obr. 26). Množství proteinů p53, Mdm2 a p21 bylo přibližně stejné u buněk s nízkou i vysokou hladinou proteinu DAXX.



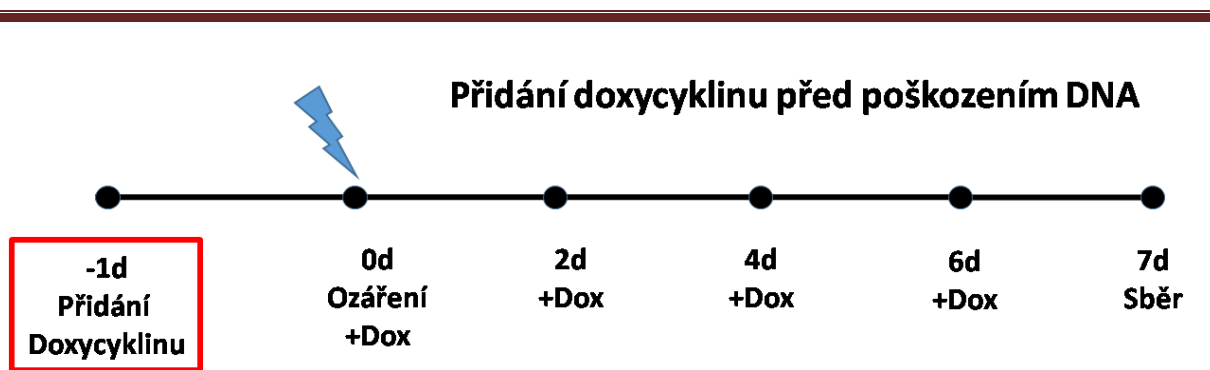
Obr. 25 Ektopická exprese DAXX nemá vliv na senescentní fenotyp. Mikroskopické zobrazení kontrolních buněk (0 d ctrl) a ozářených (20 Gy) RPE-1 s neaktivní (-Dox) a aktivní (+Dox) expresí proteinu DAXX (7. a 12. den, 7d IR a 12d IR). Měřítka 200 μ m.



Obr. 26 Expres vybraných proteinů v RPE-1 buňkách bez a s indukcí proteinu DAXX. Zobrazení imunoblotu kontrolních buněk (0 d ctrl) a ozářených (20 Gy) RPE-1 s neaktivní (-Dox) a aktivní (+Dox) expresí proteinu DAXX 7. a 12. den. Analyzovány byly proteiny DAXX, Mdm2, fosforylovaného p53 na serinu 15, p53 a p21. Ke kontrolním a senescentním buňkám s neaktivní i aktivní expresí proteinu DAXX byl přidán inhibitor MG132. Jako interní kontrola nanášky proteinu byla zvolena GAPDH.

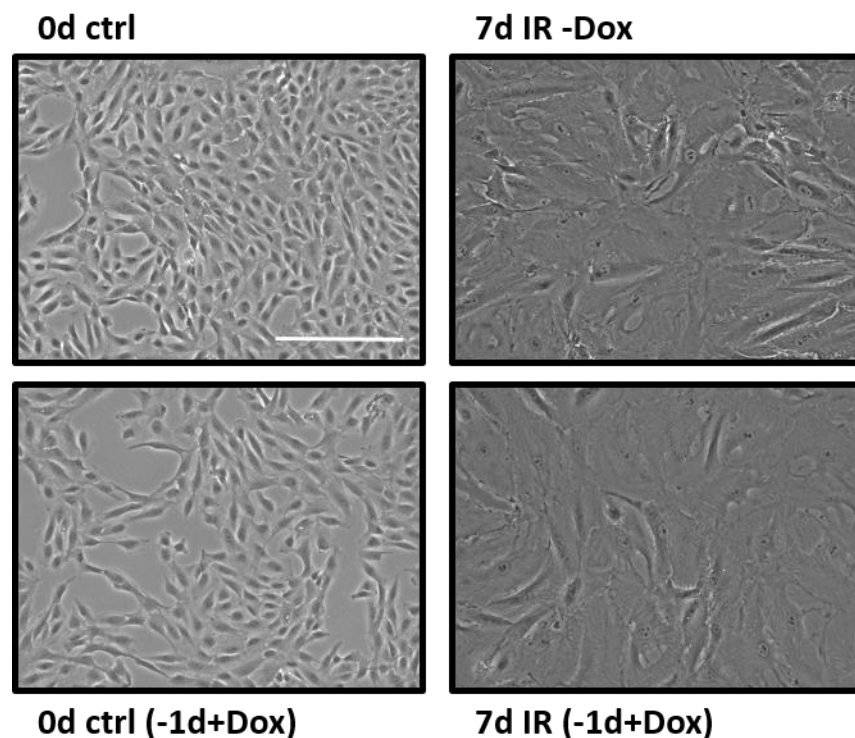
5.4. Nadprodukce proteinu DAXX v proliferačně aktivních RPE-1 buňkách nemá vliv na navození buněčné senescence

Dále jsem testoval alternativní hypotézu, zdali zvýšení množství proteinu DAXX zabrání navození buněčné senescence v proliferačně aktivních buňkách. Za tímto účelem byly použity také lentivirálně transdukované RPE-1 buňky s TetON systémem. Buňky jsem ozářil 20 Gy ionizujícího záření. O den dříve jsem indukoval expresi proteinu DAXX přidáním doxycyklinu do média. Každých 48 hodin od ozáření jsem vyměnil kultivační médium za čerstvé s doxycyklinem pro udržení zvýšené exprese proteinu DAXX (Obr. 27).



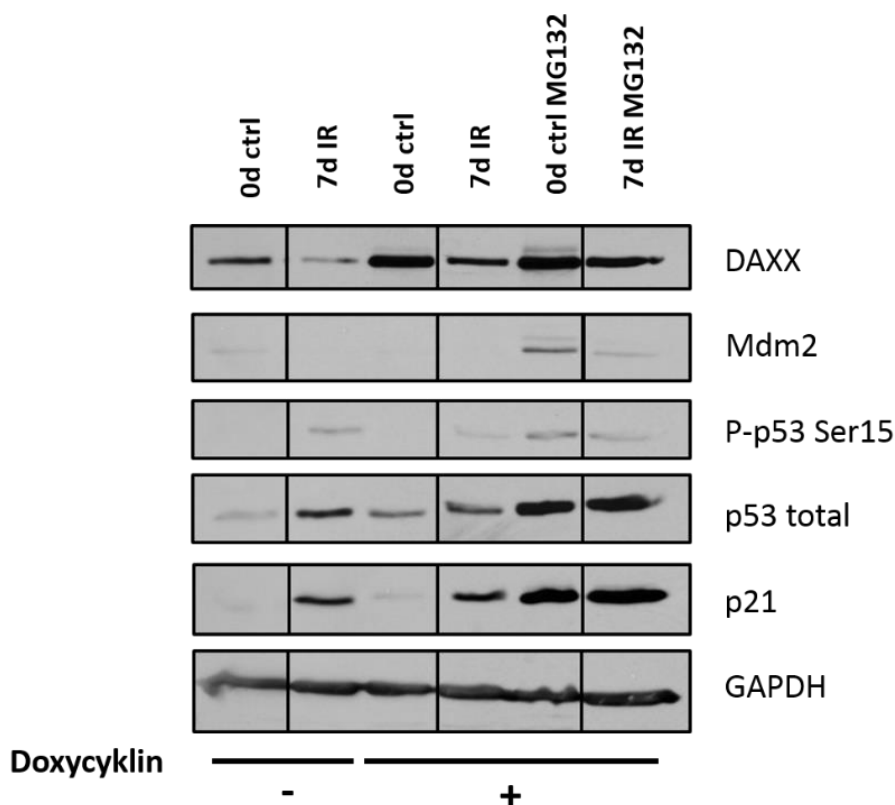
Obr. 27 Schéma experimentu indukce ektopické exprese proteinu DAXX před navozením buněčné senescence. Buňkám RPE-1 byl den před ozářením přidán doxycyklin. Den 0 (0d) byly buňky ozářeny 20 Gy. Každých 48 hodin byl dodáván doxycyklin a 7. den byly buňky sklizeny na analýzu.

Pozoroval jsem, zdali nadprodukce DAXX před ozářením zabrání navození buněčné senescenci a ovlivní buněčnou morfologii u ozářených buněk (Obr. 28). Nebyl pozorován žádný rozdíl mezi kontrolními buňkami a buňkami s navýšenou expresí proteinu DAXX.



Obr. 28 Ektopická exprese DAXX před poškozením DNA nemá vliv na navození senescentního fenotypu. Mikroskopické zobrazení RPE-1 buněk s neaktivní expresí proteinu DAXX kontrolní (0d ctrl) a ozářené (7d IR) buňky. Kontrolní (0d ctrl -1d+Dox) a ozářené (7d IR -1d+Dox) s aktivovanou expresí proteinu DAXX před poškozením DNA. Buňky byly ozářeny 20 Gy. Měřítko 200 μ m.

Technikou Western blot jsem stanovil účinnost exprese proteinu DAXX po přidání doxycyklinu a množství proteinů zodpovědných za udržení buněčné senescence (Obr. 29). Nadprodukce proteinu DAXX před poškozením DNA a jeho zvýšení hladinu po dobu 7 dní neměla vliv na změnu hladin proteinů Mdm2, fosforylovaného p53 na serinu 15, p53 a p21 v senescentních buňkách.



Obr. 29 Expresa vybraných proteinů v RPE-1 buňkách s indukcí proteinu DAXX před navozením senescence. Zobrazení imunoblotu kontrolních buněk (0 d ctrl) a ozářených (20 Gy) RPE-1 s neaktivní a aktivní expresí proteinu DAXX 7. den. Analyzovány byly proteiny DAXX, Mdm2, fosforylovaného p53 na serinu 15, p53 a p21. Ke kontrolním a senescentním buňkám s indukovanou expresí proteinu DAXX byl přidán inhibitor MG132. Jako interní kontrola nanášky proteinu byla zvolena GAPDH.

Při testování obou hypotéz jsem pozoroval, že i přes nadprodukci proteinu DAXX v senescentních buňkách docházelo k jeho degradaci. I přesto bylo jeho množství vyšší v porovnání s kontrolními buňkami bez aktivní exprese proteinu DAXX. Také se podařilo ověřit jeho stabilizaci po přidání inhibitoru MG132.

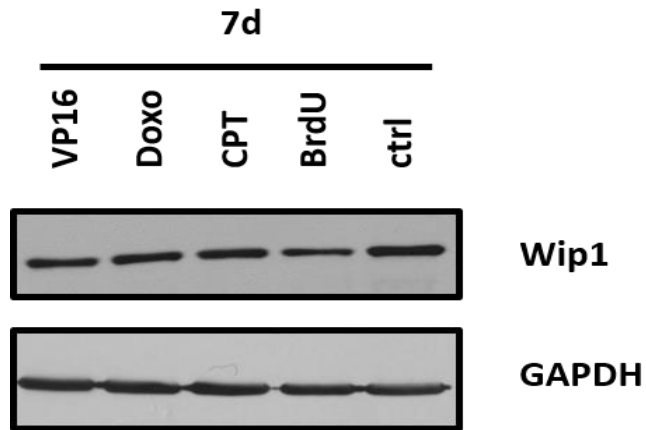
V různých typech buněčné senescence navozené u nádorových i normálních buněk jsem pozoroval pokles proteinu DAXX v porovnání s proliferujícími buňkami. Dynamika jeho úbytku je pozvolná a nejvýraznější je 4. den od navození senescence. Mechanismus snížení množství proteinu není regulován stabilizací mRNA *daxx* nebo její zvýšenou transkripcí, ale proteinovou degradací ve 26S proteazomu. Dále jsem nepozoroval výraznou změnu kolokalizace proteinu DAXX s PML u proliferujících a nádorových buněk.

Zjistil jsem, že zvýšení hladiny proteinu DAXX před poškozením DNA nemá vliv na navození senescence. Stejně tak jsem nepozoroval žádný efekt na obnovení proliferace při nadprodukci proteinu DAXX v senescentních buňkách. V průběhu těchto dvou experimentů jsem nepozoroval, že by DAXX ovlivňoval stabilizaci Mdm2 nebo p53, jak publikoval Tang et al. (Tang et al., 2006).

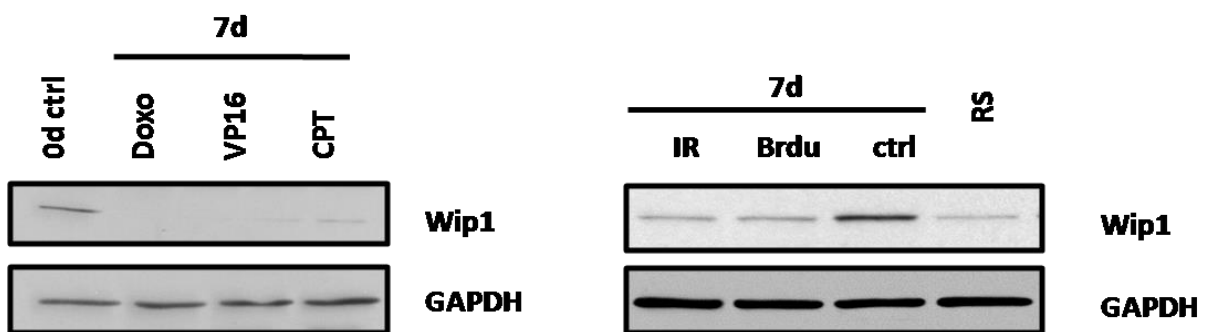
5.5. Snížení hladiny proteinu fosfatázy Wip1 během rozvoje buněčné senescence

Předmětem výzkumu naší laboratoře není pouze buněčná senescence, ale také studium signalizace odpovědi buňky na poškození DNA. Proto se současně s určováním množství proteinu DAXX v senescentních buňkách pozorovala změna hladiny fosfatázy Wip1. Bylo publikováno, že se její množství snižuje u buněk MCF-7 po navození senescence doxorubicinem (Crescenzi et al., 2013). V průběhu vypracování této diplomové práce byly získány výsledky, které naznačují, že hladina fosfatázy Wip1 se liší mezi senescentními a proliferačně aktivními buňkami.

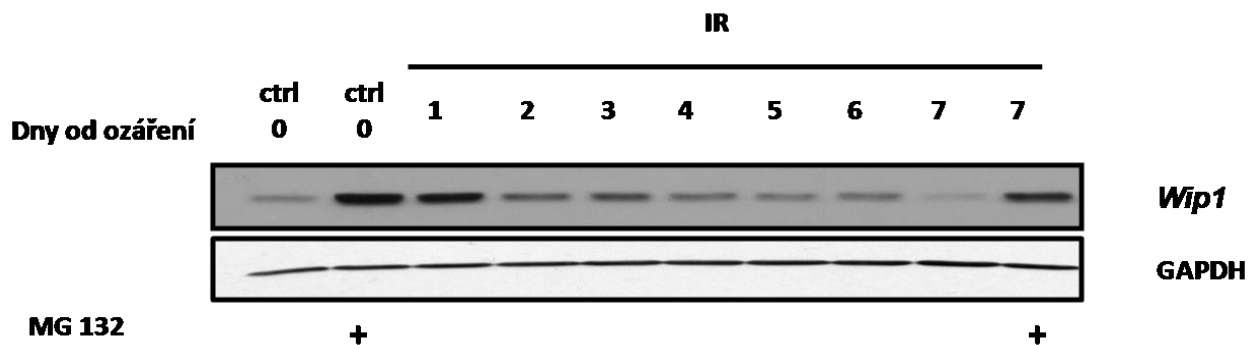
U nádorových buněk MCF-7 a primárních fibroblastů BJ jsem pozoroval snížení hladiny fosfatázy Wip1 po různých stresových stimulech navozujících senescenci (Obr. 30, 31). Po ošetření buněk ionizujícím zářením došlo v prvním dni k výraznému nárůstu jejího množství a od druhého dne její hladina klesala. Sedmého dne bylo její množství nižší ve srovnání s kontrolními buňkami (Obr. 32). Po přidání inhibitoru MG132 ke kontrole (0d) a senescentním buňkám (7d IR) byla pozorována její výrazná stabilizace. Také jsem stanovil hladinu Wip1 v replikačně senescentních fibroblastech BJ, u kterých dochází ke snížení podobně jako u stresem navozené senescence (Obr. 31).



Obr. 30 Hladina fosfatázy Wip1 u nádorových buněk MCF-7 po vystavení genotoxickému stresu. Detekce fosfatázy Wip1 imunoblotem. Buňky byly ošetřeny VP16 (5 μ M, 48 hodin), Doxo (0,75 μ M, 2 hodiny), CPT (0,25 μ M, 48 hodin) a BrdU (100 μ M, výměna každých 48 hodin po dobu ošetření). Jako interní kontrola nanášky proteinu byla zvolena GAPDH. (ctrl – kontrolní neošetřené buňky)

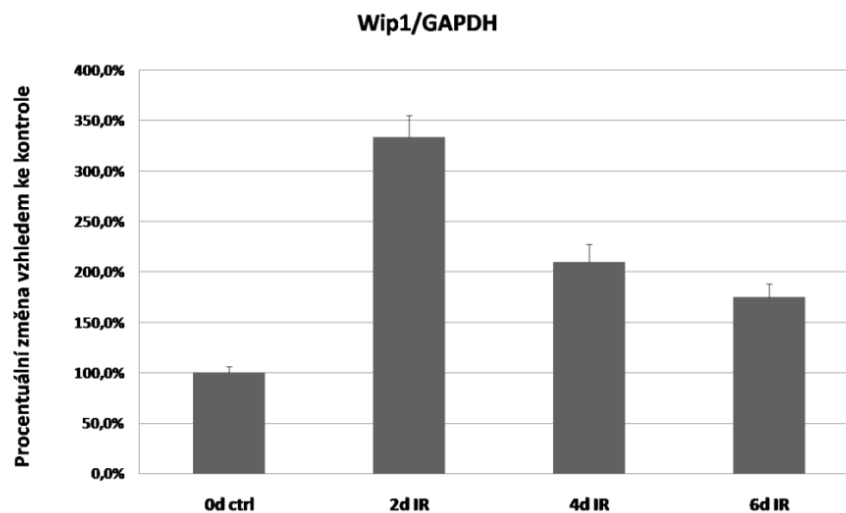


Obr. 31 Hladina fosfatázy Wip1 u primárních fibroblastů BJ po vystavení genotoxickému stresu. Imunoblot proteinu Wip1. Buňky byly přivedeny do senescence: Doxo (0,75 μ M, 4 hodiny), VP16 (10 μ M, 48 hodin), CPT (0,5 μ M, 48 hodin), IR (10 Gy), BrdU (100 μ M, výměna každých 48 hodin po dobu ošetřování). Jako negativní kontrola sloužily neošetřené proliferující fibroblasty BJ (ctrl). Pozitivní kontrola byly replikačně senescentní fibroblasty BJ (RS). Jako interní kontrola nanášky proteinu byla zvolena GAPDH.



Obr. 32 Zobrazení kinetiky úbytku hladiny Wip1 během rozvoje senescence. Technikou Western blot byla zobrazena změna hladiny Wip1 fosfatázy v průběhu sedmi dní po ozáření. Buňky byly ozářeny 10 Gy. Ke kontrole (0d ctrl) a senescentním buňkám (7d IR) byl přidán inhibitor proteazomu MG132. Jako interní kontrola nanášky proteinu byla zvolena GAPDH. (ctrl – neošetřené kontrolní buňky).

V průběhu výše zmíněného experimentu jsem odebral vzorky mRNA Wip1 v kontrolním vzorku 0.den a u ozářených vzorků 2.den, 4.den a 6.den po ozáření 10 Gy. Buňky reagovaly na ozáření zvýšením exprese mRNA genu *wip1*. Nejvyšší nárůst byl pozorován druhého dne (Obr. 33).



Obr. 33 Kvantitativní stanovení hladin mRNA genu *wip1* v kontrolních a ozářených buňkách BJ. Buňky jsem ozářil 10 Gy a sbíral každých 48 hodin po dobu 6 dní. Výsledky jsou průměrem tří opakování jednoho experimentu se zobrazenou směrodatnou odchylkou. Stanovení exprese mRNA jsem provedl metodou qRT-PCR. Vztaženo na GAPDH (interní standard).

6. Diskuze

Protein DAXX byl poprvé popsán v roce 1994. Ani po 20 letech nejsou jeho vlastnosti a funkce stále objasněné. Kontroverzní je jeho úloha v apoptóze, kde část studií popisuje jeho proapoptotickou funkci (Chang et al., 1998; Li et al., 2007; Perlman et al., 2001; Yang et al., 1997) a druhá se přiklání k jeho antiapoptotickému efektu (Chen and Chen, 2003; Michaelson et al., 1999). Další popsanou funkcí je jeho úloha transkripčního represoru, např. v komplexu s HDAC II (Kuo et al., 2005) nebo DNMT-1 (Muromoto et al., 2004). Ovšem v signalizační dráze Wnt byl popsán jako koaktivátor transkripce (Huang and Shih, 2009). Z tohotostručného výčtu funkcí proteinu DAXX je zřejmé, že ovlivňuje široké spektrum protichůdných buněčných drah. V souvislosti s udržením integrity genomu buňky byl DAXX popsán jako součást komplexu s Mdm2 a HASUP, který ovlivňuje stabilitu p53 (Tang et al., 2006). Významným nádorovým supresorem je p53, který se uplatňuje v odpovědi buňky na poškození DNA (Bunz et al., 1998; Waldman et al., 1995). Pokud poškození není pro buňku letální, ale zabraňuje jejímu řádnému dělení, dochází k navození stavu buněčné senescence prostřednictvím p53. Současně je tímto způsobem zamezeno rozvoji kancerogeneze (Xue et al., 2007).

V naší laboratoři, která se zabývá studiem buněčné senescence, bylo pozorováno, že po cíleném snížení hladiny proteinu DAXX dochází u nenádorových primárních buněk k navození senescentního fenotypu. Proto bylo jedním z cílů této diplomové práce stanovit množství proteinu DAXX v senescentních nádorových a nenádorových buňkách. Jako zástupce nádorových buněk byla zvolena buněčná linie adenokarcinomu prsu MCF-7. Primární fibroblasty BJ reprezentovaly nenádorové buňky. K navození senescence jsem použil chemikálie a ionizující záření v subletálních dávkách, užívané při léčbě rakoviny. Patří mezi ně doxorubicin a etoposid, které jsou inhibitory topoizomerázy II způsobující dvouřetězcové zlomy (Chang et al., 1999; Robles et al., 1999). Dále jsem zvolil kamptotecin, inhibitor topoizomerázy I, který vyvolává jednořetězcové zlomy (Han et al., 2002), syntetický analog thyminu - bromodeoxyuridin (Michishita et al., 1999) a ionizující záření (Jones et al., 2005). Buňky jsem při kultivaci ošetřil výše zmíněným stresovým faktorům. Po sedmi dnech od expozice jsem u buněk MCF-7 pozoroval změnu morfologie, kdy tvarem připomínaly senescentní buňky a bylo detekováno barvení na SA- β -galaktosidázu, jejíž zvýšená aktivita je jedním ze znaků senescence (Dimri et al., 1995). Pozoroval jsem zvýšení hladiny proteinů p53

a p21, které se účastní zástavy buněčného cyklu při odpovědi na poškození DNA (Romanov et al., 2010; Serrano et al., 1997) a při navození senescence (Stein et al., 1999). Detekoval jsem γ H2AX, který signalizuje vznik dvouřetězcových zlomů či replikační stres, a jehož hladina přetrvává v senescentních buňkách (Ferbeyre et al., 2002; Romanov et al., 2010; Sedelnikova et al., 2004). Společně tyto výsledky naznačují, že se mi podařilo u buněk vyvolat senescenci. Hladina proteinu DAXX v senescentních buňkách byla ve srovnání s proliferačně aktivními buňkami snížena. Stejným přístupem jsem navodil senescenci u primárních fibroblastů BJ, u kterých jsem navíc použil ionizující záření. Stanovoval jsem stejné proteiny jako u MCF-7 buněk a došel jsem k podobným výsledkům. Dále jsem u ozářených buněk a buněk ošetřených s BrdU změřil pomocí průtokové cytometrie míru inkorporace 5-ethynyl-2'-deoxyuridinu (EdU) do nově syntetizované DNA (Yu et al., 2009). Inkorporace probíhala u kontrolních buněk a v malé míře u buněk vystavených ionizujícímu záření. U buněk ošetřených BrdU k inkorporaci nedocházelo. Důvodem rozdílné účinnosti těchto dvou stresových faktorů je zřejmě ten, že u buněk vystavených ionizujícímu záření mohla být část populace rezistentní a pokračovala v proliferaci. To naznačuje, že použitá dávka 10 Gy nebyla dostatečná pro navození trvalé zástavy buněčného cyklu. Nicméně u všech typů stresu byl pozorován trend snížení hladiny proteinu DAXX. U buněk ošetřených BrdU jsem pozoroval největší úbytek a současně jeho hladina odpovídala hladině proteinu DAXX v replikačně senescentních buňkách. Dále jsem metodou fluorescenční mikroskopie a analýzy obrazu ověřil pokles množství proteinu DAXX po ošetření BrdU. Současně jsem pozoroval nárůst množství jaderných tělísek PML, což je popsáný znak u Ras-indukované senescence (Ferbeyre et al., 2000). Jelikož bylo popsáno, že DAXX interaguje s PML-NB (Ishov et al., 1999; Li et al., 2000), rozhodl jsem se porovnat změnu jejich kolokalizace v proliferačně aktivních a senescentních buňkách. Přestože počet PML-NB narůstá, nedochází k jejich nabohacení proteinem DAXX.

Je možné, že pokles množství proteinu DAXX a udržení jeho nízké hladiny jsou důležité v prvních fázích navození senescence. Proto byla popsána kinetika a způsob regulace snížení množství proteinu DAXX. Testoval jsem ji ve fibroblastech BJ, které byly vystaveny ionizujícímu záření a sledovány po dobu sedmi dní. V jejich průběhu došlo k pozvolnému snížení jeho hladiny, kdy největší úbytek byl pozorován 4. dne. Současně se pomocí qRT-PCR stanovila exprese mRNA. Ukázalo se, že změna množství proteinu DAXX nekoreluje se změnou hladiny jeho mRNA, která v průběhu sedmi dní zůstávala přibližně stejná. Dále jsem

testoval, zdali je množství proteinu DAXX regulováno jeho degradací prostřednictvím 26S proteazomu. U buněk ošetřených inhibitorem proteazomu MG132 došlo k jeho stabilizaci. To naznačuje, že při navození senescence je DAXX částečně degradován na proteinové úrovni a k jeho regulaci dochází pravděpodobně i jiným mechanismem.

Po stanovení množství proteinu DAXX a určení způsobu jeho regulace byly formulovány dvě hypotézy o vlivu množství proteinu DAXX na buněčnou senescenci.

- 1) Zvýšení hladiny proteinu DAXX v senescentních buňkách obnoví buněčnou proliferaci
- 2) Zvýšení hladiny proteinu DAXX před poškozením DNA zabrání navození buněčné senescence

Hypotézy vycházejí z dřívějších pozorování v naší laboratoři, kdy umlčením exprese genu *daxx* pomocí shRNA došlo k navození senescence u fibroblastů BJ. To je v souladu s prací Pan et al. (Pan et al., 2013a), kde bylo publikováno, že po delecii genu *daxx* dojde k navození senescence signální dráhou p53/p21. Dalším podkladem byla publikace, kde byla popsána tvorba komplexu Mdm2-DAXX-HAUSP, který reguluje stabilitu p53 v buňce. DAXX v tomto komplexu stabilizuje HAUSP i Mdm2. Současně podporuje E3 ligázovou aktivitu Mdm2 vůči p53, který je následně degradován. Dále popsali, že nadprodukovaný DAXX silně stabilizuje Mdm2 (Tang et al., 2006). K ověření těchto hypotéz byly vybrány immortalizované buňky sítnicového epitelu RPE-1, z důvodu jejich efektivní transdukce lentivirovým TetON systémem.

V buňkách RPE-1 jsem indukoval senescenci dávkou 20 Gy ionizujícího záření, což je dostatečná dávka na navození senescence (Fumagalli et al., 2012). Po šesti dnech od ozáření byl DAXX nadprodukován a jeho exprese byla udržována po dobu dalších šesti dní. Buňky, které měly nadprodukovaný DAXX, nevykazovaly žádnou změnu morfologie. Nepozoroval jsem pokles p53 a stabilizaci Mdm2 v porovnání se senescentními buňkami bez nadprodukovaného proteinu DAXX. Na základě těchto výsledků jsem zamítnul hypotézu, že nadprodukovaný DAXX v senescentních buňkách obnoví buněčnou proliferaci.

Pro nadprodukcii proteinu DAXX byl den před ozářením přidán do média doxycyklin. Po sedmi dnech od ozáření vykazovaly buňky senescentní fenotyp. Přestože byl do média každých 48 hodin přidáván doxycyklin pro udržení zvýšené hladiny proteinu DAXX, pozoroval

jsem snížení hladiny proteinu DAXX i při jeho nadprodukci. Opět nedošlo ke stabilizaci Mdm2 a poklesu hladiny p53 a p21. Těmito výsledky byla zamítnuta hypotéza vlivu nadprodukce proteinu DAXX na zabránění navození senescence.

Získané výsledky naznačují, že zvýšená hladina proteinu DAXX neovlivňuje navození buněčné senescence nebo její zvrát. Dále se mi nepodařila potvrdit stabilizace Mdm2 po navýšení proteinu DAXX.

Ke stejným výsledkům došli členové laboratoře buněčné signalizace a apoptózy na ÚMG AV ČR v dosud nepublikovaném článku (Brazina et al., v přípravě). Pomocí TALENových endonukleáz připravili dosud první buněčný model, kde byl gen *daxx* v nádorových buňkách osteosarkomu U2OS kompletně deletován. Nebyla pozorována změna stability Mdm2 a p53 mezi *daxx*^{+/+} a *daxx*^{-/-} buňkami U2OS bez nebo s poškozením DNA. Současně delece genu *daxx* neovlivnila expresi genů zprostředkovanou p53 proteinem.

Ke sporné úloze proteinu DAXX v navození buněčné senescence přispívá i zjištění funkce komplexu ATRX-DAXX s PML v akutní promyelocytární leukémii. Komplex ATRX-DAXX a PML protein jsou potřebné pro navození buněčné senescence po léčbě kyselinou retinovou (z angl. All-Trans-Retinoic Acid, ATRA). Při umlčení exprese genu *daxx* pomocí shRNA v myších buňkách kostní dřeně ošetřených ATRA nedochází k ovlivnění hladiny proteinu p21. Ovšem po shRNA genu *atrx* dojde ke snížení množství p21. To naznačuje, že ATRX a nikoli DAXX ovlivňuje navození senescence po ošetření ATRA (Korf et al., 2014).

Vzhledem k protichůdným publikacím, které se zabývají úlohou proteinu DAXX v odpovědi buňky na poškození DNA a ovlivnění stabilizace nádorového supresoru p53, je jeho úloha v těchto procesech nejasná a dosti komplikovaná.

V průběhu vypracovávání diplomové práce jsem při pokusech vyhodnocoval hladinu fosfatázy Wip1, jelikož byla studována v naší laboratoři v souvislosti odpovědi buňky na poškození DNA. Současně Crescenzi *et al.* publikovali její snížení u MCF-7 buněk po ošetření doxorubicinem (Crescenzi et al., 2013). Pozoroval jsem snížení Wip1 při navození senescence po všech výše zmíněných stresových faktorech u nádorových buněk MCF-7 i fibroblastů BJ. Současně byla jeho hladina snížena i v replikační senescenci. Při pozorování jeho kinetika po poškození DNA ionizujícím zářením došlo v prvních dvou dnech k jejímu nárůstu a poté k pozvolnému poklesu. Sedmý den byla její hladina nižší než v kontrolních buňkách. Došlo

také ke stabilizaci mRNA genu *wip1*. Zvýšení hladiny Wip1 v prvních dvou dnech nastalo kvůli jeho úloze ve zpětné smyčce v DDR. Po poškození DNA defosforyluje protein γ H2AX (Cha et al., 2010), Chk2 (Fujimoto et al., 2006), Mdm2 (Lu et al., 2007), ATM (Shreeram et al., 2006) a DAXX (Brazina et al., v přípravě). Snížení její hladiny v senescenci může být z důvodu aktivní signalizace DDR při trvalé zástavě buněčného cyklu. Bylo publikováno, že Wip1 reguluje vstup do buněčného cyklu z G2 kontrolního bodu po poškození DNA (Lindqvist et al., 2009). Současně zmírňuje DDR při poškození DNA během její replikace a brání navození předčasné senescence při fyziologické hladině kyslíku (Sakai et al., 2013). Bylo by zajímavé zjistit, jaký je funkční význam poklesu fosfatázy Wip1 v senescenci. Mohl by se provést principiálně podobný pokus jako s proteinem DAXX. Pravděpodobně by její nadprodukce v senescentních buňkách nějaký fenotyp vykazovala, jelikož defosforyluje mnoho substrátů podílejících se na zástavě buněčného cyklu.

7. Souhrn

- Podařilo se indukovat senescenci ionizujícím zářením a různými typy chemikálií u nádorových buněk MCF-7 a primárních fibroblastů BJ. Buňky vstupují do senescence 4. den po ošetření.
- Hladina proteinu DAXX byla ve všech testovaných typech senescence snížena. Nejvýznamnější snížení bylo pozorováno u BrdU indukované senescence a replikační senescence.
- Pokles proteinu DAXX během senescence je z části regulován na proteinové úrovni.
- Kinetika snížení proteinu DAXX po ošetření je v primárních fibroblastech BJ pozvolná a nejvýraznější snížení nastává čtvrtého dne.
- Nadprodukce proteinu DAXX v proliferačně aktivních buňkách neovlivní navození senescence.
- Při nadprodukci proteinu DAXX v senescentních buňkách nedochází ke zvratu senescentního fenotypu.
- V senescentních buňkách dochází ke stabilizaci mRNA genu *wip1*. Množství proteinu Wip1 je ovšem sníženo v porovnání s dělícími se buňkami a je regulováno prostřednictvím degradace ve 26S proteazomu.

8. Seznam použité literatury

- Alcorta, D.A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., and Barrett, J.C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13742-13747.
- Amato, A., Schillaci, T., Lentini, L., and Di Leonardo, A. (2009). CENPA overexpression promotes genome instability in pRb-depleted human cells. *Molecular Cancer* 8.
- Apicelli, A.J., Maggi, L.B., Hirbe, A.C., Miceli, A.P., Olanich, M.E., Schulte-Winkeler, C.L., Saporita, A.J., Kuchenreuther, M., Sanchez, J., Weilbaecher, K., *et al.* (2008). A non-tumor suppressor role for basal p19(ARF) in maintaining nucleolar structure and function. *Molecular and Cellular Biology* 28, 1068-1080.
- Baker, D.J., Weaver, R.L., and van Deursen, J.M. (2013). p21 Both Attenuates and Drives Senescence and Aging in BubR1 Progeroid Mice. *Cell Reports* 3, 1164-1174.
- Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonia, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., and van Deursen, J.M. (2011). Clearance of p16(Ink4a)-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232-U112.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.
- Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M., and Francz, P.I. (1988). HUMAN-SKIN FIBROBLASTS INVITRO DIFFERENTIATE ALONG A TERMINAL CELL LINEAGE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5112-5116.
- Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P.G., and Dejean, A. (2002). Deconstructing PML-induced premature senescence. *Embo Journal* 21, 3358-3369.
- Bitterge, B., and Schneider, R. (2014). Histone variants: key players of chromatin. *Cell and Tissue Research* 356, 457-466.
- Blazkova, H., Krejčíková, K., Moudry, P., Frisan, T., Hodny, Z., and Bartek, J. (2010). Bacterial intoxication evokes cellular senescence with persistent DNA damage and cytokine signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14, 357-367.
- Brown, E.J., and Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes & Development* 14, 397-402.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G(2) arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-1501.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* 276, 42462-42467.
- Campisi, J., and di Fagagna, F.D. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 729-740.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., *et al.* (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296, 922-927.

-
- Cha, H., Lowe, J.M., Li, H.H., Lee, J.S., Belova, G.I., Bulavin, D.V., and Fornace, A.J. (2010). Wip1 Directly Dephosphorylates (Y)-H2AX and Attenuates the DNA Damage Response. *Cancer Research* 70, 4112-4122.
- Chang, B.D., Broude, E.V., Dokmanovic, M., Zhu, H.M., Ruth, A., Xuan, Y.Z., Kandel, E.S., Lausch, E., Christov, K., and Roninson, I.B. (1999). A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Research* 59, 3761-3767.
- Chang, H.Y., Nishitoh, H., Yang, X.L., Ichijo, H., and Baltimore, D. (1998). Activation of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281, 1860-1863.
- Chehab, N.H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T.D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes & Development* 14, 278-288.
- Chen, L.Y., and Chen, J.D. (2003). Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Molecular and Cellular Biology* 23, 7108-7121.
- Chuikov, S., Kurash, J.K., Wilson, J.R., Xiao, B., Justin, N., Ivanov, G.S., McKinney, K., Tempst, P., Prives, C., Gamblin, S.J., *et al.* (2004). Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* 432, 353-360.
- Coppe, J.-P., Kauser, K., Campisi, J., and Beausejour, C.M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *Journal of Biological Chemistry* 281, 29568-29574.
- Coppe, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Munoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *Plos Biology* 6, 2853-2868.
- Corpet, A., Olbrich, T., Gwerder, M., Fink, D., and Stucki, M. (2014). Dynamics of histone H3.3 deposition in proliferating and senescent cells reveals a DAXX-dependent targeting to PML-NBs important for pericentromeric heterochromatin organization. *Cell Cycle* 13, 249-267.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: Partners in checkpoint signaling. *Science* 294, 1713-1716.
- Crescenzi, E., Raia, Z., Pacifico, F., Mellone, S., Moscato, F., Palumbo, G., and Leonardi, A. (2013). Down-regulation of Wild-type p53-induced Phosphatase 1 (Wip1) Plays a Critical Role in Regulating Several p53-dependent Functions in Premature Senescent Tumor Cells. *Journal of Biological Chemistry* 288, 16212-16224.
- D'Amours, D., and Jackson, S.P. (2002). The Mre11 complex: At the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 317-327.
- Dalal, S.N., Schweitzer, C.M., Gan, J.M., and DeCaprio, J.A. (1999). Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Molecular and Cellular Biology* 19, 4465-4479.
- Dammann, R., Li, C., Yoon, J.H., Chin, P.L., Bates, S., and Pfeifer, G.P. (2000). Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nature Genetics* 25, 315-319.
- de Stanchina, E., Querido, E., Narita, M., Davuluri, R.V., Pandolfi, P.P., Ferbeyre, G., and Lowe, S.W. (2004). PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Molecular Cell* 13, 523-535.
- Delbarre, E., Ivanauskienė, K., Kuentziger, T., and Collas, P. (2013). DAXX-dependent supply of soluble (H3.3-H4) dimers to PML bodies pending deposition into chromatin. *Genome Research* 23, 440-451.
- di Fagagna, F.D., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194-198.
-

-
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* *444*, 638-642.
- Dimri, G.P., Lee, X.H., Basile, G., Acosta, M., Scott, C., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., *et al.* (1995). A BIOMARKER THAT IDENTIFIES SENESCENT HUMAN-CELLS IN CULTURE AND IN AGING SKIN IN-VIVO. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 9363-9367.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). MICE DEFICIENT FOR P53 ARE DEVELOPMENTALLY NORMAL BUT SUSCEPTIBLE TO SPONTANEOUS TUMORS. *Nature* *356*, 215-221.
- Drane, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., and Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes & Development* *24*, 1253-1265.
- Dulic, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Reed, S.I. (1994). P53-DEPENDENT INHIBITION OF CYCLIN-DEPENDENT KINASE-ACTIVITIES IN HUMAN FIBROBLASTS DURING RADIATION-INDUCED G1 ARREST. *Cell* *76*, 1013-1023.
- Elsaesser, S.J., Huang, H., Lewis, P.W., Chin, J.W., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2012). DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition. *Nature* *491*, 560-+.
- Escobar-Cabrera, E., Lau, D.K.W., Giovinazzi, S., Ishov, A.M., and McIntosh, L.P. (2010). Structural Characterization of the DAXX N-Terminal Helical Bundle Domain and Its Complex with Rassf1C. *Structure* *18*, 1642-1653.
- Evangelou, K., Bartkova, J., Kotsinas, A., Pateras, I.S., Liontos, M., Velimezi, G., Kosar, M., Liloglou, T., Trougakos, I.P., Dyrskjot, L., *et al.* (2013). The DNA damage checkpoint precedes activation of ARF in response to escalating oncogenic stress during tumorigenesis. *Cell Death and Differentiation* *20*, 1485-1497.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Lin, A.W., Querido, E., McCurrach, M.E., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2002). Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Molecular and Cellular Biology* *22*, 3497-3508.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., and Lowe, S.W. (2000). PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes & Development* *14*, 2015-2027.
- Fiscella, M., Zhang, H.L., Fan, S.J., Sakaguchi, K., Shen, S.F., Mercer, W.E., VandeWoude, G.F., Oconnor, P.M., and Appella, E. (1997). Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 6048-6053.
- Fujimoto, H., Onishi, N., Kato, N., Takekawa, M., Xu, X., Kosugi, A., Kondo, T., Imamura, M., Oishi, I., Yoda, A., *et al.* (2006). Regulation of the antioncogenic Chk2 kinase by the oncogenic Wip1 phosphatase. *Cell Death and Differentiation* *13*, 1170-1180.
- Fumagalli, M., Rosiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J.M., Bucci, G., Dobрева, M., Matti, V., Beausejour, C.M., *et al.* (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature Cell Biology* *14*, 355-+.
- Giovinazzi, S., Morozov, V.M., Summers, M.K., Reinhold, W.C., and Ishov, A.M. (2013). USP7 and Daxx regulate mitosis progression and taxane sensitivity by affecting stability of Aurora-A kinase. *Cell Death and Differentiation* *20*, 721-731.
- Gire, W., Roux, P., Wynford-Thomas, D., Brondello, J.M., and Dulic, V. (2004). DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *Embo Journal* *23*, 2554-2563.
-

-
- Gu, W., and Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.
- Gurrieri, C., Capodiecici, P., Bernardi, R., Scaglioni, P.P., Nafa, K., Rush, L.J., Verbel, D.A., Cordon-Cardo, C., and Pandoli, P.P. (2004). Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. *Journal of the National Cancer Institute* 96, 269-279.
- Han, Z.Y., Wei, W.Y., Dunaway, S., Darnowski, J.W., Calabresi, P., Sedivy, J., Hendrickson, E.A., Balan, K.V., Pantazis, P., and Wyche, J.H. (2002). Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *Journal of Biological Chemistry* 277, 17154-17160.
- Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P.M., Dobrowolski, S., Bai, C., Connellcrowley, L., Swindell, E., *et al.* (1995). INHIBITION OF CYCLIN-DEPENDENT KINASES BY P21. *Molecular Biology of the Cell* 6, 387-400.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). SERIAL CULTIVATION OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Experimental Cell Research* 25, 585-&.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Molecular Cell* 14, 501-513.
- Huang, C., and Zhu, B. (2014). H3.3 turnover: A mechanism to poise chromatin for transcription, or a response to open chromatin? *Bioessays* 36, 579-584.
- Huang, Y.-S., and Shih, H.-M. (2009). Daxx positively modulates beta-catenin/TCF4-mediated transcriptional potential. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 386, 762-768.
- Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T.H., Strauss, J.F., and Maul, G.G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein Daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *Journal of Cell Biology* 147, 221-233.
- Jackson, S.P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks - Commentary. *Carcinogenesis* 23, 687-696.
- Jang, M.S., Ryu, S.W., and Kim, E. (2002). Modification of Daxx by small ubiquitin-related modifier-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295, 495-500.
- Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P.S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20, 7223-7233.
- Jones, K.R., Elmore, L.W., Jackson-Cook, C., Demasters, G., Povirk, L.F., Holt, S.E., and Gewirtz, D.A. (2005). p53-dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells. *International Journal of Radiation Biology* 81, 445-458.
- Kakizuka, A., Miller, W.H., Umesono, K., Warrell, R.P., Frankel, S.R., Murty, V., Dmitrovsky, E., and Evans, R.M. (1991). CHROMOSOMAL TRANSLOCATION T(15-17) IN HUMAN ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA FUSES RAR-ALPHA WITH A NOVEL PUTATIVE TRANSCRIPTION FACTOR, PML. *Cell* 66, 663-674.
- Korf, K., Harald Wodrich, H., Haschke, H., Ocampo, C., Harder, L., Gieseke, F., Pollmann, A., Dierck, K., Prall, S., Staeger, H., Ma, H., Horstmann, M.A., Evans, R.M., and Sternsdorfa, T. (2014). The PML domain of PML-RAR α blocks senescence to promote leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, doi: 10.1073/pnas.1412944111
-

-
- Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., and Bartek, J. (2011). Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner, and follow expression of p16(ink4a). *Cell Cycle* *10*, 457-468.
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R.A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., and Lowe, S.W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* *134*, 657-667.
- Kubbutat, M.H.G., Jones, S.N., and Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* *387*, 299-303.
- Kumagai, A., Kim, S.M., and Dunphy, W.G. (2004). Claspin and the activated form of ATR-ATRIP collaborate in the activation of Chk1. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 49599-49608.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H.Y., and Dunphy, W.G. (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* *124*, 943-955.
- Kuo, H.Y., Chang, C.C., Jeng, J.C., Hu, H.M., Lin, D.Y., Maul, G.G., Kwok, R.P.S., and Shih, H.M. (2005). SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 16973-16978.
- Kwan, P.S., Lau, C.C., Chiu, Y.T., Man, C., Liu, J., Tang, K.D., Wong, Y.C., and Ling, M.T. (2013). Daxx regulates mitotic progression and prostate cancer predisposition. *Carcinogenesis* *34*, 750-759.
- Lacoste, N., Woolfe, A., Tachiwana, H., Garea, A.V., Barth, T., Cantaloube, S., Kurumizaka, H., Imhof, A., and Almouzni, G. (2014). Mislocalization of the Centromeric Histone Variant CenH3/CENP-A in Human Cells Depends on the Chaperone DAXX. *Molecular Cell* *53*, 631-644.
- Lee, A.C., Fenster, B.E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N.S., Hirai, T., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Howard, B.H., and Finkel, T. (1999). Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 7936-7940.
- Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* *5*, 187-195.
- Lee, J., Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2007). The Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint interaction of TopBP1 with ATR. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 28036-28044.
- Lee, J.H., and Paull, T.T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* *308*, 551-554.
- Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Noh, K.-M., Stadler, S.C., and Allis, C.D. (2010). Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 14075-14080.
- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X.Y., O'Neil, J., Park, E.J., and Chen, J.D. (2000). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Molecular and Cellular Biology* *20*, 1784-1796.
- Li, M.Y., Chen, D.L., Shiloh, A., Luo, J.Y., Nikolaev, A.Y., Qin, J., and Gu, W. (2002). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* *416*, 648-653.
- Li, Q., Wang, X., Wu, X., Rui, Y., Liu, W., Wang, J., Wang, X., Lion, Y.-C., Ye, Z., and Lin, S.-C. (2007). Daxx cooperates with the Axin/HIPK2/p53 complex to induce cell death. *Cancer Research* *67*, 66-74.
- Lin, S.-C., and Li, Q. (2007). Axin bridges Daxx to p53. *Cell Research* *17*, 301-302.
- Lindqvist, A., de Bruijn, M., Macurek, L., Bras, A., Mensinga, A., Bruinsma, W., Voets, O., Kranenburg, O., and Medema, R.H. (2009). Wip1 confers G2 checkpoint recovery competence by counteracting p53-dependent transcriptional repression. *Embo Journal* *28*, 3196-3206.
-

-
- Lindsay, C.R., Giovinazzi, S., and Ishov, A.M. (2009). Daxx is a predominately nuclear protein that does not translocate to the cytoplasm in response to cell stress. *Cell Cycle* 8, 1544-1551.
- Lindsay, C.R., Scholz, A., Morozov, V.M., and Ishov, A.M. (2007). Daxx shortens mitotic arrest caused by paclitaxel. *Cell Cycle* 6, 1200-1204.
- Liu, C.-P., Xiong, C., Wang, M., Yu, Z., Yang, N., Chen, P., Zhang, Z., Li, G., and Xu, R.-M. (2012). Structure of the variant histone H3.3-H4 heterodimer in complex with its chaperone DAXX. *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 1287-+.
- Liu, Q.H., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G.B., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., *et al.* (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes & Development* 14, 1448-1459.
- Lu, X., Ma, O., Nguyen, T.-A., Jones, S.N., Oren, M., and Donehower, L.A. (2007). The Wip1 phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop. *Cancer Cell* 12, 342-354.
- Lu, X.B., Nannenga, B., and Donehower, L.A. (2005). PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes & Development* 19, 1162-1174.
- Macurek, L., Lindqvist, A., Voets, O., Kool, J., Vos, H.R., and Medema, R.H. (2010). Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gamma H2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene* 29, 2281-2291.
- Maier, B., Gluba, W., Bernier, B., Turner, T., Mohammad, K., Guise, T., Sutherland, A., Thorner, M., and Scoble, H. (2004). Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes & Development* 18, 306-319.
- Maki, C.G., Huibregtse, J.M., and Howley, P.M. (1996). In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Research* 56, 2649-2654.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer* 9, 153-166.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., III, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., *et al.* (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160-1166.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., and Elledge, S.J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10389-10394.
- Meek, D.W. (2009). Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nature Reviews Cancer* 9, 714-723.
- Michaelson, J.S., Bader, D., Kuo, F., Kozak, C., and Leder, P. (1999). Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes & Development* 13, 1918-1923.
- Michishita, E., Nakabayashi, K., Suzuki, T., Kaul, S.C., Ogino, H., Fujii, M., Mitsui, Y., and Ayusawa, D. (1999). 5-bromodeoxyuridine induces senescence-like phenomena in mammalian cells regardless of cell type or species. *Journal of Biochemistry* 126, 1052-1059.
- Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., Wang, Y.W., and Murray, D. (2013). Ionizing Radiation-Induced Responses in Human Cells with Differing TP53 Status. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 22409-22435.
- Morozov, V.M., Gavrilova, E.V., Ogryzko, V.V., and Ishov, A.M. (2012). Dualistic function of Daxx at centromeric and pericentromeric heterochromatin in normal and stress conditions. *Nucleus-Austin* 3, 276-285.
-

-
- Munoz-Espin, D., and Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 482-+.
- Muromoto, R., Sugiyama, K., Takachi, A., Imoto, S., Sato, N., Yamamoto, T., Oritani, K., Shimoda, K., and Matsuda, T. (2004). Physical and functional interactions between Daxx and DNA methyltransferase 1-associated protein, DMAP1. *Journal of Immunology* 172, 2985-2993.
- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., and Shaw, A.S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84, 889-897.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.
- O'Brien, W., Stenman, G., and Sager, R. (1986). SUPPRESSION OF TUMOR-GROWTH BY SENESCENCE IN VIRALLY TRANSFORMED HUMAN-FIBROBLASTS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 8659-8663.
- Oliva-Trastoy, M., Berthonaud, V., Chevalier, A., Ducrot, C., Marsolier-Kergoat, M.C., Mann, C., and Leteurtre, F. (2007). The Wip1 phosphatase (PPM1D) antagonizes activation of the Chk2 tumour suppressor kinase. *Oncogene* 26, 1449-1458.
- Pan, W.W., Yi, F.P., Cao, L.X., Liu, X.M., Shen, Z.F., Bu, Y.Q., Xu, Y., Fan, H.Y., and Song, F.Z. (2013a). DAXX silencing suppresses mouse ovarian surface epithelial cell growth by inducing senescence and DNA damage. *Gene* 526, 287-294.
- Pan, W.W., Zhou, J.J., Liu, X.M., Xu, Y., Guo, L.J., Yu, C., Shi, Q.H., and Fan, H.Y. (2013b). Death Domain-associated Protein DAXX Promotes Ovarian Cancer Development and Chemoresistance. *Journal of Biological Chemistry* 288, 13620-13630.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P.P., *et al.* (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406, 207-210.
- Peng, C.Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z.Q., Shaw, A.S., and PiwnickaWorms, H. (1997). Mitotic and G(2) checkpoint control: Regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 277, 1501-1505.
- Perlman, R., Schiemann, W.P., Brooks, M.W., Lodish, H.F., and Weinberg, R.A. (2001). TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nature Cell Biology* 3, 708-714.
- Puto, L.A., and Reed, J.C. (2008). Daxx represses RelB target promoters via DNA methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation. *Genes & Development* 22, 998-1010.
- Robles, S.J., and Adami, G.R. (1998). Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16(INK4a) enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16, 1113-1123.
- Robles, S.J., Buehler, P.W., Negrusz, A., and Adami, G.R. (1999). Permanent cell cycle arrest in asynchronously proliferating normal human fibroblasts treated with doxorubicin or etoposide but not camptothecin. *Biochemical Pharmacology* 58, 675-685.
- Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology* 192, 547-556.
-

-
- Romanov, V.S., Abramova, M.V., Svetlikova, S.B., Bykova, T.V., Zubova, S.G., Aksenov, N.D., Fornace, A.J., Jr., Pospelova, T.V., and Pospelov, V.A. (2010). p21(Waf1) is required for cellular senescence but not for cell cycle arrest induced by the HDAC inhibitor sodium butyrate. *Cell Cycle* 9, 3945-3955.
- Sakai, H., Redon, C.E., Bonner, W.M., Appella, E., and Mazur, S. (2013). Wild-type p53-induced phosphatase 1 (Wip1) prevents cellular senescence at physiological oxygen levels by regulating DNA damage signaling during DNA replication. *Cancer Research* 73.
- Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M., and Barrett, J.C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nature Cell Biology* 6, 168-+.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell* 88, 593-602.
- Shi, X., Kachirskaja, L., Yamaguchi, H., West, L.E., Wen, H., Wang, E.W., Dutta, S., Appella, E., and Gozani, O. (2007). Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382. *Molecular Cell* 27, 636-646.
- Shiloh, Y. (2001). ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Current Opinion in Genetics & Development* 11, 71-77.
- Shreeram, S., Demidov, O.N., Hee, W.K., Yamaguchi, H., Onishi, N., Kek, C., Timofeev, O.N., Dudgeon, C., Fornace, A.J., Anderson, C.W., *et al.* (2006). Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways. *Molecular Cell* 23, 757-764.
- Song, J.J., and Lee, Y.J. (2003). Catalase, but not MnSOD, inhibits gluc deprivation-activated ASK1-MEK-MAPK signal transduction pathway and prevents relocalization of Daxx: Hydrogen peroxide as a major second messenger of metabolic oxidative stress. *Journal of Cellular Biochemistry* 90, 304-314.
- Song, M.S., Song, S.J., Kim, S.Y., Oh, H.J., and Lim, D.-S. (2008). The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex. *Embo Journal* 27, 1863-1874.
- Stein, G.H., Drullinger, L.F., Soulard, A., and Dulic, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 19, 2109-2117.
- Stewart, G.S., Wang, B., Bignell, C.R., Taylor, A.M.R., and Elledge, S.J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 961-966.
- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213-1226.
- Su, B., Yang, Y.-B., Tuo, Q.-H., Zhu, B.-Y., Lei, X.-Y., Yin, W., and Liao, D.-F. (2007). Anti-apoptotic effects of probucol are associated with downregulation of Daxx expression in THP-1 macrophage. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 21, 37-45.
- Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Current Biology* 13, 1549-1556.
- Tang, J., Agrawal, T., Cheng, Q., Qu, L., Brewer, M.D., Chen, J., and Yang, X. (2013). Phosphorylation of Daxx by ATM Contributes to DNA Damage-Induced p53 Activation. *Plos One* 8.
- Tang, J., Qu, L.K., Zhang, J., Wang, W., Michaelson, J.S., Degenhardt, Y.Y., El-Deiry, W.S., and Yang, X.O. (2006). Critical role for Daxx in regulating Mdm2. *Nature Cell Biology* 8, 855-U115.
-

-
- Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C., and Abraham, R.T. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes & Development* 13, 152-157.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., and Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Embo Journal* 22, 5612-5621.
- Ventura, J.J., Hubner, A., Zhang, C., Flavel, R.A., Shokat, K.M., and Davis, R.J. (2006). Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Molecular Cell* 21, 701-710.
- Vernier, M., Bourdeau, V., Gaumont-Leclerc, M.F., Moiseeva, O., Begin, V., Saad, F., Mes-Masson, A.M., and Ferbeyre, G. (2011). Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes & Development* 25, 41-50.
- Waldman, T., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1995). P21 IS NECESSARY FOR THE P53-MEDIATED G(1) ARREST IN HUMAN CANCER-CELLS. *Cancer Research* 55, 5187-5190.
- Ward, I.M., and Chen, J.J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *Journal of Biological Chemistry* 276, 47759-47762.
- Wold, M.S. (1997). Replication protein A: A heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annual Review of Biochemistry* 66, 61-92.
- Wu, X.W., Bayle, J.H., Olson, D., and Levine, A.J. (1993). THE P53 MDM-2 AUTOREGULATORY FEEDBACK LOOP. *Genes & Development* 7, 1126-1132.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656-660.
- Yang, J., Yu, Y.N., Hamrick, H.E., and Duerksen-Hughes, P.J. (2003). ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* 24, 1571-1580.
- Yang, X.L., KhosraviFar, R., Chang, H.Y., and Baltimore, D. (1997). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89, 1067-1076.
- Yu, Y.M., Arora, A., Min, W.X., Roifman, C.M., and Grunebaum, E. (2009). EdU incorporation is an alternative non-radioactive assay to H-3 thymidine uptake for in vitro measurement of mice T-cell proliferations. *Journal of Immunological Methods* 350, 29-35.
- Zhang, H., He, J., Li, J., Tian, D., Gu, L., and Zhou, M. (2013). Methylation of RASSF1A gene promoter is regulated by p53 and DAXX. *Faseb Journal* 27, 232-242.
- Zhao, H., and Piwnicka-Worms, H. (2001). ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Molecular and Cellular Biology* 21, 4129-4139.
- Zhou, B.B.S., and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433-439.
- Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542-1548.