

Rola szlaku indukowanego uszkodzeniami DNA w apoptozie i starzeniu komórkowym

Zbigniew Korwek^{1,✉}

Olga Alster²

¹Pracownia Modelowania w Biologii i Medycynie, Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN, Warszawa

²Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego, Warszawa

✉Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN, ul. Pawińskiego 5b, 02-106 Warszawa; tel.: (22) 826 12 80 wew. 326, e-mail: zkorwek@ippt.pan.pl

Artykuł otrzymano 19 marca 2014 r.

Artykuł zaakceptowano 14 kwietnia 2014 r.

Słowa kluczowe: starzenie komórkowe, apoptoza, szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA, autofagia, naprawa uszkodzeń DNA

Wykaz skrótów: APAF-1 – ang. *apoptotic protease activating factor 1*; ATM – ang. *ataxia telangiectasia mutated*; ATR – ang. *ataxia telangiectasia Rad 3-related*; BAX – ang. *Bcl-2-associated X protein*; DDR – ang. *DNA damage response*; DISC – ang. *death-inducing signaling complex*; DSB – ang. *double strand breaks*; FADD – ang. *FAS-associated protein with death domain*; HGPS – ang. *Hutchinson-Gilford progeria syndrome*; HR – ang. *homologous recombination*; MRN – ang. *Mre11, Rad50, Nbs1*; NHEJ – ang. *non-homologous end joining*; PARP – ang. *poly (ADP-ribose) polymerase*; PIDD – ang. *p53-induced protein with a death domain*; PUMA – ang. *p53 upregulated modulator of apoptosis*; RAIDD – ang. *receptor-interacting protein (RIP)-associated ICH1/CED3-3-homologous protein with a death domain*; SA-β-Gal – ang. *senescence associated β-galactosidase*; SAHF – ang. *senescence-associated heterochromatin foci*; SASP – ang. *senescence associated secretory phenotype*; SIPS – ang. *stress induced premature senescence*; SSB – ang. *single strand breaks*; mTOR – ang. *mammalian target of rapamycin*; WS – ang. *Werner's Syndrome*

STRESZCZENIE

Materiał genetyczny każdego organizmu jest ciągle narażony na uszkodzenia spowodowane fizjologicznymi procesami zachodzącymi w komórce, jaki i działaniem szkodliwych czynników pochodzących z otaczającego środowiska. W komórkach eukariotycznych został rozwinięty system monitorujący integralność genomu, nazwany szlakiem odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR). Odpowiedź komórek na działanie czynnika indukującego uszkodzenia DNA może prowadzić do starzenia, naprawy uszkodzeń DNA, bądź śmierci komórkowej. Kluczowym elementem szlaku DDR, jest białko p53. W wyniku licznych modyfikacji potranslacyjnych zaangażowane może ono być w aktywację wielu genów i białek, prowadzących do przeżycia lub śmierci komórki. W starzeniu komórkowym białko p53 prowadzi do indukcji p21, czego konsekwencją jest zatrzymanie komórek w cyklu. W apoptozie białko p53 bierze udział w aktywacji kaspaz, które odpowiedzialne są za degradację wielu białek. Decyja o tym, która ze ścieżek będzie aktywowana zależy od stopnia uszkodzenia DNA.

WPROWADZENIE

Jednym z fundamentalnych zadań komórki jest ochrona informacji genetycznej zawartej w DNA. Uszkodzenia DNA zagrażają nie tylko wiernemu przekazaniu informacji genetycznej potomnym komórkom, ale także mogą powodować mutacje, niejednokrotnie prowadzące do rozwoju nowotworów. Szacuje się, że każdego dnia w jednej komórce powstaje ponad 10^5 spontanicznych uszkodzeń DNA [1]. Uszkodzenia DNA mogą być skutkiem działania czynników zewnętrznych, takich jak: promieniowanie jonizujące i ultrafioletowe, związki cytotoksyczne lub wewnętrznych, jakimi są: reaktywne formy tlenu i błędy polimerazy DNA podczas replikacji. Powyższe czynniki prowadzą do powstania różnych form uszkodzeń DNA, do których zaliczyć można: modyfikacje zasad azotowych lub reszt cukrowych, tworzenie adduktów, połączeń krzyżowych nici DNA oraz jednoniciowych (SSB, ang. *single strand breaks*) i dwuniciowych pęknięć DNA (DSB, ang. *double strand breaks*). Najgroźniejsze dla komórki są DSB ponieważ są wynikiem fizycznego przerwania węglowo-fosforanowego szkieletu DNA. Powstają one w wyniku działania promieniowania jonizującego lub zatrzymania widełek replikacyjnych podczas napotkania przez maszynę replikacyjną fizycznej przeszkody, jaką mogą być inne formy uszkodzeń DNA [2,3]. Zakłócenie procesu transkrypcji może także prowadzić do powstawania dwuniciowych pęknięć DNA [4,5]. Aby radzić sobie z tak dużą liczbą zagrożeń, komórki eukariotyczne wykształciły system monitorujący DNA, nazwany szlakiem odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR, ang. *DNA Damage Response*). Jest to złożona sieć aktywacji białek, która pozwala na wykrycie uszkodzeń DNA i poprzez uruchomienie kaskady przekazywania sygnału determinuje los, przeżycie albo śmierć, wystawionej na działanie czynników stresowych komórki (Ryc. 1) [3,6,7]. Aktywacja szlaku DDR prowadzi do uruchomienia punktów kontroli cyklu komórkowego i zatrzymania podziałów, co uniemożliwia przekazanie uszkodzonego DNA do komórek potomnych. Jednocześnie aktywowane zostają mechanizmy naprawy DNA. Jeżeli uszkodzenia są naprawione, następuje wznowienie cyklu komórkowego i podziałów, co pozwala przeżyć komórce i dalej prawidłowo funkcjonować. Jeśli naprawa jest niemożliwa, co często spowodowane jest występowaniem bardzo dużej liczby uszkodzeń, następuje eliminacja komórki w wyniku uruchomienia programowanej śmierci, apoptozy lub indukcja procesu starzenia komórkowego, nieodwracalnego zatrzymania cyklu komórkowego i podziałów [8]. Powyższy opis dotyczy sytuacji, kiedy szlak DDR działa prawidłowo. Jakkolwiek zaburzenia jego działania, niesprawne systemy naprawy, indukcji apoptozy lub starzenia, są bardzo niebezpieczne dla organizmu, ponieważ mogą prowadzić do niestabilności genetycznej i transformacji nowotworowej [2].

AKTYWACJA SZLAKU ODPOWIEDZI NA USZKODZENIA DNA

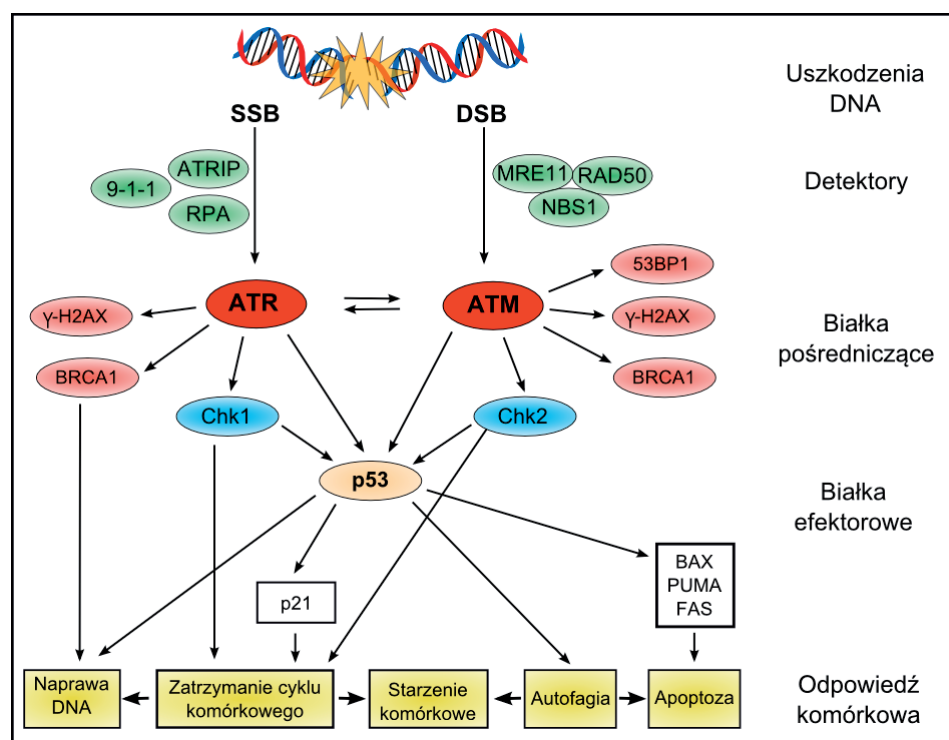
Szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA jest bardzo złożoną siecią przekazywania sygnału, w którą zaangażowanych jest wiele białek. Centralną funkcję w aktywacji szlaku odgrywają należące do rodziny PIKK (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase*) kinazy ATR (ang. *Ataxia telangiectasia Rad 3-related*) i ATM (ang. *Ataxia telangiectasia mutated*).

WYKRYWANIE USZKODZEŃ DNA

Kinaza ATR pośredniczy w przekazywaniu sygnału od pęknięć jednej nici DNA, a dokładniej jednoniciowych odcinków DNA będących wynikiem zatrzymania widełek replikacyjnych. Aktywowana jest głównie podczas fazy S cyklu komórkowego [9,10]. W mechanizm aktywacji ATR zaangażowanych jest wiele białek. Kluczową funkcję w tym procesie pełni białko RPA (ang. *replication protein A*), które wiąże się do jednoniciowych odcinków DNA powstających w widełkach replikacyjnych. Zapobiega to połączeniu się rozwiniętej nici lub powstawaniu struktur drugorzędowych. W przypadku zablokowania replikacji, powstają długie jednoniciowe odcinki nici DNA, które połączone są z RPA, co prowadzi do rekrutacji seryno-

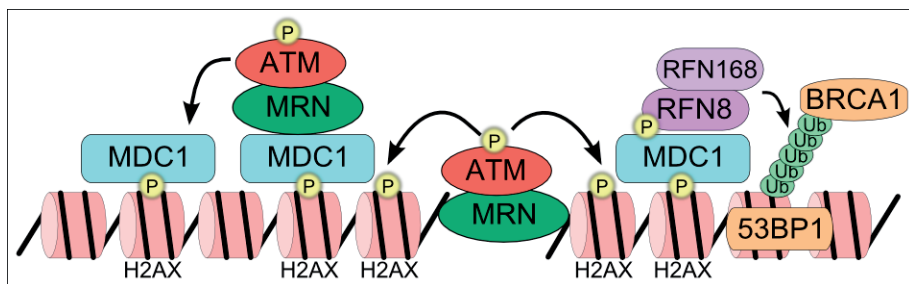
wo/treoninowej kinazy ATR. Proces ten odbywa się za pośrednictwem białka ATRIP (ang. *ATR interacting protein*) [11], które oddziałuje bezpośrednio z RPA i odpowiada za umiejscowienie kompleksu ATR-ATRIP w widełkach replikacyjnych. Dodatkowo DNA połączone z RPA stanowi sygnał do rekrutacji kompleksu 9-1-1 złożonego z RAD9, HUS1 i RAD1 [12]. RAD9 oddziałuje z białkiem TopBP1, które aktywuje kinazę ATR poprzez zmiany konformacyjne kompleksu ATR-ATRIP [13]. Następnie ATR aktywuje kinazę CHK1, a ta z kolei fosforyluje fosfatazę CDC25. Prowadzi to do jej inaktywacji, czego efektem jest zatrzymanie komórek w cyklu komórkowym [14,15] ATR fosforyluje również wiele białek będących elementami szlaku DDR. Należą do nich: H2AX, BRCA1 (ang. *breast cancer type 1 susceptibility protein*), BRCA2 (ang. *breast cancer type 2 susceptibility protein*), RAD51 i p53 [16].

Kinaza ATM jest aktywowana głównie w odpowiedzi na dwuniciowe uszkodzenia DNA i działa podczas wszystkich faz cyklu komórkowego [17]. Wykrycie DSB następuje bardzo szybko. Rozpoznanie i uruchomienie ścieżki sygnałowej od uszkodzenia wymaga wzajemnego oddziaływania między kompleksem MRN i ATM. Proces ten inicjowany jest przez enzym PARP1, katalizujący formowanie łańcucha poli(ADP-rybozy), co ułatwia przyłączenie kompleksu MRN do miejsca uszkodzenia [18].



Rycina 1. Szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR). Pęknięcia nici DNA prowadzą do aktywacji szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA. W szlaku tym wyróżnić można następujące grupy białek: zaangażowanych w wykrywanie uszkodzenia (detektory), pośredniczących w przekazywaniu sygnału (mediatory) oraz decydujących o specyficznej odpowiedzi komórki, białka efektorowe. Uszkodzenia DNA, jedno- (SSB) i dwuniciowe (DSB), rozpoznawane są odpowiednio przez RPA/ATRIP i kompleks MRN. Prowadzi to do aktywacji głównych kinaz szlaku DDR, ATR i ATM. Następstwem tego procesu jest formowanie w obrębie uszkodzenia DNA dużych skupisk białek niezbędnych do aktywacji białek efektorowych. Kluczowym białkiem efektorowym jest p53. W zależności od stopnia uszkodzenia DNA, białko p53 ulega specyficznym modyfikacjom potranslacyjnym. Mogą one prowadzić do zatrzymania komórek w cyklu i w konsekwencji do naprawy uszkodzeń, bądź starzenia komórkowego lub do autofagii czy apoptozy. Transaktywacja białka p21 prowadzi do zatrzymania komórek w cyklu, co daje czas na naprawienie uszkodzeń, a gdy jest to niemożliwe, komórka ulega starzeniu, czemu towarzyszy trwale zatrzymanie komórek w cyklu. Indukcja autofagii pozwala na przetrwanie niekorzystnych warunków bądź prowadzi do starzenia lub apoptozy, gdy czynnik stresowy nie zanika. W odpowiedzi na wysoki poziom uszkodzeń DNA, białko p53 indukuje ekspresję genów białek proapoptycznych, prowadzących do śmierci komórki.

Kompleks MRN składa się z trzech białek: NBS1 (ang. *Nijmegen breakage syndrome protein 1*), MRE11 (ang. *Meiotic recombination 11*) i RAD50. Gdy kompleks MRN zostanie przyłączony do miejsca podwójnego pęknięcia nici DNA, karboksylowy koniec białka NBS1 oddziałuje z kinazą ATM i rekrutuje ją do miejsca uszkodzenia DNA, gdzie następuje jej aktywacja. Serynowo/treoninowa kinaza ATM w nieaktywnej formie występuje jako homodimer, który po rekrutacji do miejsca uszkodzenia DNA ulega autoaktywacji poprzez fosforylację. Autofosforylacji ulega na reszcie seryny 1981, co prowadzi do rozpadu nieaktywnego dimeru na katalitycznie aktywne monomery [19]. W komórkach ludzkich, ale nie mysich, zostały zidentyfikowane dodatkowe miejsca autofosforylacji, reszty Ser367 i Ser1893 niezbędne do aktywacji i prawidłowego funkcjonowania kinazy ATM [20]. W aktywacji kinazy ATM odgrywa również rolę acetylowanie na reszcie seryny 3016 przez acetylotransferazę Tip60 [21]. Ponadto aktywność kinazy ATM jest również regulowana przez fosfatazy takie jak PP2A



Rycina 2. Tworzenie skupisk białek - odpowiedź na uszkodzenia DNA. Za pośrednictwem kompleksu MRN (Mre11, Rad50, Nbs1) dochodzi do przyłączenia do miejsca pęknięcia nici DNA, kinazy ATM. Aktywna kinaza ATM fosforyluje histon H2AX, do którego przyłącza się białko MDC1. Kompleks MRN-ATM łącząc się do MDC1, prowadzi do rozprzestrzenienia się fosforylacji H2AX na odcinku 1-2 mega par zasad od miejsca uszkodzenia nici DNA. MDC1 stanowi również platformę, do której przyłączane są ligazy ubikwitynowe (RNF8, RNF168), które poprzez ubikwitynację chromatyny prowadzą do przyłączania kolejnych białek szlaku DDR takich jak: BRCA1 czy 53BP1. P - fosforylacja, Ub - ubikwitynacja. Zmodyfikowane według [28].

(ang. *Protein Phosphatase 2A*) i PP5 (ang. *Protein Phosphatase 5*). Defosforylacja kinazy ATM, zachodząca za pośrednictwem fosfatazy PP2A, hamuje jej aktywację, podczas gdy fosfataza PP5 bierze udział w aktywacji tego białka [22,23]. Aktywne monomery kinazy ATM fosforylują wiele białek. Znalazionych zostało ponad 700 substratów tej kinazy. Należą do nich między innymi białka, takie jak: H2AX, CHK2, NBS1, BRCA1, SMC1 i p53, biorące udział w kontroli cyklu komórkowego, naprawie uszkodzeń DNA i apoptozie.

PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU OD USZKODZEŃ DNA – TWORZENIE SKUPISK BIAŁEK

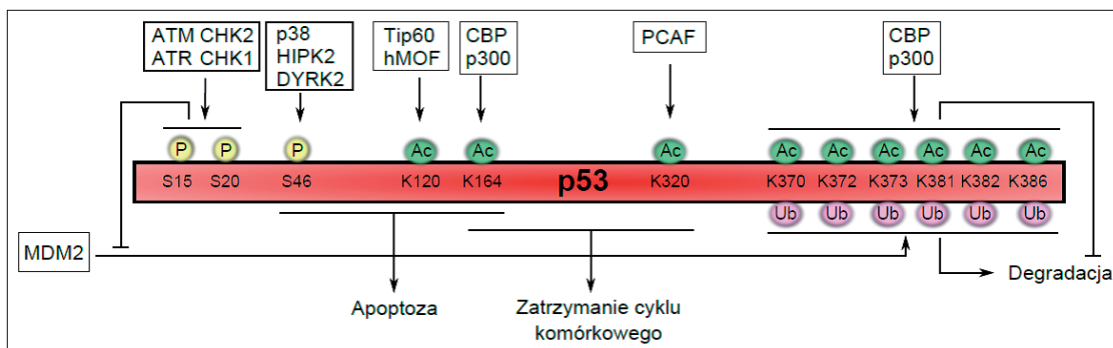
Jednym z pierwszych substratów kinaz ATR i ATM jest histon H2AX. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA jest on także fosforylowany przez kinazę DNA-PKcs (ang. *DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*), również należąca do rodziny PIKK. Histon ufosforylowany na reszcie seryny 139, nazywany jest γ H2AX i zapoczątkowuje przyłączanie kolejnych elementów szlaku sygnałowego [24]. Jednocześnie dochodzi do defosforylacji histonu H2AX na reszcie tyrozyny 142, konstytutywnie fosforylowanej, gdy nie ma uszkodzeń DNA [25]. Defosforylacja umożliwia białku MDC1 (ang. *mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) bezpośrednie przyłączenie do γ H2AX. Zakotwiczenie MDC1 w miejscu uszkodzenia stanowi platformę do przyłączania się kolejnych białek należących do szlaku DDR oraz kompleksu MRN-ATM. Pozwala to na wzmocnienie lokalnej aktywności kinazy ATM i na rozszerzenie obszaru fosforylacji H2AX na nukleosomy sąsiadujące z uszkodzeniem DNA, obejmując odcinek do 1-2 mega par zasad (Ryc. 2). Formowanie rozległych regionów (skupisk) γ H2AX pełni ważną rolę w akumulacji i utrzymaniu elementów składowych szlaku DDR, takich jak MRN oraz białek związanych z naprawą DNA tj.: BRCA1 i 53BP1 [26,27]. Stabilizacja składników ścieżki DDR, rekrutowanych do nukleosomów zawierających γ H2AX, jest osiągnięta dzięki udziałowi enzymów modyfikujących chromatynę poprzez ubikwitynację, sumoilację, acetylację i metylację. Wiązanie ufosforylowanego MDC1 z γ H2AX pozwala na przyłączenie do miejsca uszkodzenia ligaz ubikwitynowych E3, RNF8

i RNF168, które ubikwitynując chromatynę prowadzą do przyłączenia BRCA1 i 53BP1 [28]. Białka rekrutowane do skupiska mogą oddziaływać z kompleksem MRN i/lub kinazami ATM i ATR, dzięki czemu powstaje pozytywna pętla zwrotna, powodująca amplifikację sygnału od uszkodzenia DNA. Szacuje się, że jedno dwuniciowe uszkodzenie DNA może zgromadzić do kilkunastu tysięcy cząsteczek białek [29]. Obecność tych skupisk białek można wykrywać metodami immunocytochemicznymi, a jedno skupisko odpowiada jednemu dwuniciowemu pęknięciu DNA [30].

p53 – KLUCZOWE BIAŁKO SZLAKU DDR DETERMINUJĄCE LOS KOMÓRKI

Uszkodzenia DNA, uruchamiając szlak DDR, prowadzą do aktywacji bardzo dużej liczby różnych białek. Kluczowym składnikiem szlaku jest białko supresorowe nowotworu, p53, aktywacja determinuje los komórki. Białko p53 działa głównie jako czynnik transkrypcyjny, indukujący i/lub hamujący aktywację wielu genów. Znana jest również funkcja p53 niezwiązana z regulacją transkrypcji [31]. W zależności od siły czynnika stresowego (poziomu uszkodzeń DNA) p53 może prowadzić do przejściowego zatrzymania cyklu komórkowego i naprawy uszkodzeń DNA, autofagii, apoptozy lub starzenia. Ze względu na regulację tak ważnych procesów komórkowych (które są mechanizmami supresji nowotworów), białko p53 nazywane jest strażnikiem genomu. Jego inaktywacja w wyniku mutacji związana jest z akumulacją uszkodzonych komórek i rozwojem nowotworów [32]. W ok. 50% nowotworów człowieka białko p53 jest zmutowane, a myszy z delecją genu *Tp53* są wysoce podatne na rozwój nowotworów w młodym wieku [33].

W warunkach, w których komórka nie jest wystawiona na działanie czynnika stresowego, białko p53 utrzymywane jest w komórkach na niskim poziomie. Odpowiada za to białko MDM2 (ang. *murine double minute gene 2*), które wiążąc się z p53, blokuje jego aktywność transkrypcyjną i prowadzi do jego degradacji zależnej od ubikwitynacji. Synteza MDM2 jest regulowana przez p53, co tworzy negatywną pętlę zwrotną, prowadząc do obniżenia poziomu p53 po jego indukcji. Zachwianie równowagi pomiędzy p53 a MDM2 jest punktem krytycznym w aktywacji p53 [34]. Dochodzi do tego w momencie, kiedy po zadziałaniu czynnika wywołującego uszkodzenia DNA, aktywowana kinaza ATM i/lub ATR fosforyluje białko p53 na reszcie seryny 15, a CHK2 na reszcie seryny 20. ATM fosforyluje także MDM2. W wyniku tych modyfikacji oddziaływanie MDM2 z p53 jest zablokowane, co prowadzi do zahamowania zależnej od MDM2 degradacji i w konsekwencji do akumulacji p53. Następnie dochodzi do aktywacji p53 w wyniku modyfikacji postranslacyjnych (fosforylacji, acetylacji, metylacji, ubikwitynacji, sumoilacji oraz neddytacji) zwiększających powinowactwo do promotorów określonych genów (Ryc. 3). Białko p53



Rycina 3. Modyfikacje potranslacyjne białka p53 i ich funkcje. Na schemacie przedstawione zostały niektóre z modyfikacji potranslacyjnych białka p53, niezbędne do aktywacji specyficznej odpowiedzi komórkowej. Gdy komórka nie jest poddana działaniu czynnika stresowego, poziom p53 jest regulowany przez białko MDM2. Ubikwitynowane przez MDM2 białko p53 jest degradowane. W odpowiedzi na czynniki stresowe (np. uszkodzenia DNA), kinazy ATM i ATR oraz CHK1 i CHK2 fosforylują p53 na resztach seryny 15 i 20. Prowadzi to do zahamowania oddziaływania p53 z MDM2 i jego ubikwitynacji. W wyniku zablokowania degradacji, poziom białka p53 wzrasta. Dalsza stabilizacja p53 jest wynikiem acetylacji na sześciu resztach lizyny (K370, K372, K373, K381, K382 i K386), które są celem ubikwitynacji przez MDM2. Aktywacja genów proapoptotycznych jest związana z fosforylacją na reszcie seryny 46 (p38, HIPK2, DYRK2), acetylacją na reszcie lizyny 120 (Tip60, hMOF) i lizyny 164 (CEP, p300). Acetylacje na resztach lizyny 164 o 320 (PCAF) są również wymagane do indukcji genów związanych z zatrzymaniem cyklu komórkowego. P – fosforylacja, Ac – acetylacja, Ub – ubikwitynacja.

działa jako czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję docelowych genów, która również zachodzi dzięki rekrutacji koaktywatorów lub korepresorów. Wśród nich ważną funkcję pełnią acetylotransferazy. Enzymy takie jak: CBP (ang. *CREB-binding protein*), p300, Tip60 (ang. *60-kDa tat-interactive protein*), hMOF, (ang. *human males absent on the first*) czy PCAF (ang. *P300/CBP-associated factor*) acetyluje p53 oraz histony, co prowadzi do zmiany konformacji chromatyny, zwiększającej dostępność matrycy DNA dla maszynierii transkrypcyjnej [31]. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA, CBP i/lub p300 acetyluje p53 na sześciu resztach lizyny (K370, K372, K373, K381, K382 i K386), które są również celem ubikwitynacji dla MDM2, dzięki czemu zwiększa się stabilność i zdolność białka p53 do wiązania z DNA. Acetylacja na reszcie lizyny 320 przez PCAF, powoduje preferencyjną aktywację genów zaangażowanych w zatrzymanie cyklu komórkowego, podczas gdy acetylacja na reszcie lizyny 120 przez Tip60 i/lub hMOF promuje zależną od p53 apoptozę. Natomiast acetylacja na reszcie lizyny 164 jest wymagana zarówno do zatrzymania cyklu komórkowego, jaki i apoptozy [33]. Modyfikacją potranslacyjną p53 niezbędną do indukcji apoptozy jest fosforylacja na reszcie seryny 46, przez p38, DYRK2 czy HIPK2 [35-37]. Oprócz modyfikacji potranslacyjnych, stabilność i translacja mRNA p53 jest regulowana przez różne białka wiążące RNA (HuR, RPL26, RNPC1) oraz miRNA (miR-125b, miR125a, miR-504) [38].

W zależności od typu i liczby uszkodzeń DNA, dochodzi do różnych modyfikacji potranslacyjnych p53 (Ryc. 3), co przekłada się na różną odpowiedź komórkową. Czyni to białko p53 głównym przełącznikiem, decydującym o przeżyciu bądź śmierci, wystawionej na działanie czynników stresowych komórki. Wśród genów regulowanych przez p53 w odpowiedzi na uszkodzenia DNA można wyróżnić kilka grup. Jedną stanowią negatywne regulatory/inhibitory cyklu komórkowego takie jak: p21, 14-3-3 σ i GADD45 α , prowadzące do zatrzymania cyklu komórkowego i podziałów [39]. Pozwala to na na-

prawę uszkodzeń DNA zależną od enzymów, których synteza jest regulowana przez p53 (DDB2 (ang. *damage-specific DNA binding protein 2*), XPC (ang. *Xeroderma pigmentosum*), FEN1 (ang. *Flap-structure-specific endonuclease 1*), MGMT (ang. *O6-alkylguanine DNA alkyltransferase*) i MSH2 (ang. *mutS homolog 2 gene*) [40]. Kolejną grupę stanowią geny kodujące białka proapoptotyczne: PUMA (ang. *p53 upregulated*

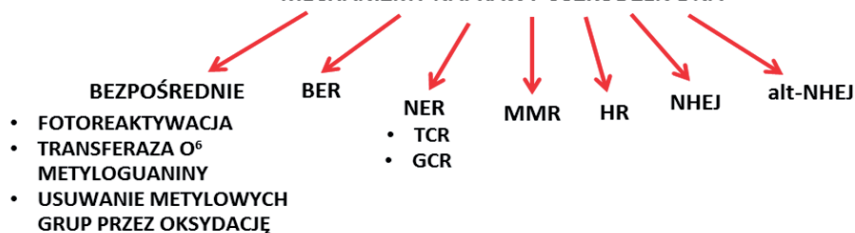
modulator of apoptosis), BAX (ang. *Bcl-2-associated X protein*), NOXA czy FAS [41]. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA białko p53 jest zaangażowane w regulację procesów związanych z metabolizmem komórki oraz w autofagię. Dodatkowo znana jest także funkcja p53 niezależna od transkrypcji, a zależna od miRNA [31].

NAPRAWA USZKODZEŃ DNA

Podstawowym zadaniem szlaku DDR jest identyfikacja uszkodzeń DNA, i jeżeli jest to możliwe, uruchomienie procesów naprawczych. W toku ewolucji powstało wiele mechanizmów naprawiających różnego rodzaju uszkodzenia DNA. Wyróżnić można bezpośrednio mechanizmy, w których specyficzny enzym oddziałuje na zmodyfikowany nukleotyd tj.: fotoreaktywację, mechanizm z udziałem transferazy O⁶ metyloguaniny oraz usuwanie grup metylowych przez oksydację. Natomiast większość uszkodzeń DNA naprawianych jest w wyniku uruchamiania sekwencji katalitycznych zdarzeń, w które zaangażowanych jest wiele białek. Zaliczyć można do nich: naprawę przez wycinanie zasad (BER, ang. *base excision repair*), naprawę przez wycinanie nukleotydów (NER, ang. *nucleotide excision repair*), naprawę niesparowanych zasad (MMR, ang. *mismatch repair*), rekombinację homologiczną (HR, ang. *homological recombination*) oraz łączenie niehomologicznych zakończeń (NHEJ, ang. *non homologous end joining*). Występują dwa typy naprawy przez wycinanie nukleotydów. Jeden jest aktywny podczas transkrypcji (TCR, ang. *transcription coupled repair*), natomiast drugi jest od niej niezależny (GGR, ang. *global genomic repair*) [2,42] (Ryc. 4).

Aktywacja konkretnego mechanizmu jest zależna od typu powstałego uszkodzenia. Szlaki BER, NER i MMR odgrywają rolę w naprawie takich uszkodzeń jak pojedyncze pęknięcia nici DNA, błędy replikacji, insercje, delecje oraz addukty [2]. Mutacje w genach kodujących białka uczestniczące w szlakach naprawy uszkodzeń DNA są

MECHANIZMY NAPRAWY USZKODZEŃ DNA



Rycina 4. Mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA. Wyróżnić można następujące mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA: bezpośrednie: (fotoreaktywacja, z udziałem transferazy O⁶ metyloguaniny oraz usuwanie metylowych grup przez oksydację), BER-naprawa przez wycinanie zasad, NER-naprawa przez wycinanie nukleotydów, MMR-naprawa niesparowanych zasad, HR-rekombinacja homologiczna, NHEJ-łączenie niehomologicznych końców, alt-NHEJ-alternatywny mechanizm łączenia niehomologicznych końców.

przyczyną powstania wielu chorób genetycznych takich jak zespół Cockayne (CS, ang. *Cockayne syndrome*), skóra pergaminowa (XP, ang. *Xeroderma pigmentosum*), zespół Lyncha (HNPCC, ang. *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) czy ciężki złożony niedobór odporności (SCID, ang. *severe combined immunodeficiency*) [43].

W naprawie podwójnych uszkodzeń DNA biorą udział dwa procesy, HR i NHEJ. Rekombinacja homologiczna może zachodzić w fazach S i G2 cyklu komórkowego. Natomiast naprawa uszkodzeń na drodze niehomologicznej rekombinacji może zachodzić w każdej fazie cyklu komórkowego, również w komórkach będących w fazie G0. Szacuje się, że u ssaków ponad 90% dwuniciowych pęknięć DNA ulega naprawie na drodze NHEJ, podczas gdy u drożdży i bakterii większość uszkodzeń ulega naprawie poprzez HR. Zaburzenia funkcjonowania tych szlaków prowadzą między innymi do wzrostu śmiertelności komórek, niestabilności genetycznej, zaburzeń w przebiegu mejozy, osłabienia funkcjonowania układu odpornościowego oraz zaburzeń rozwoju układu nerwowego [43,44].

Rekombinacja homologiczna uwarunkowana jest obecnością chromatydy siostrzanej, stanowiącej matrycę do naprawy uszkodzeń DNA. W tym typie naprawy kluczową rolę odgrywają białka kompleksu MRN (MRE11, RAD50 i NBS1) oraz białko CtIP (ang. *BRCA1 C-terminal Interacting Protein*). Białka te uczestniczą w powstaniu krótkich odcinków jednoniciowego DNA (ssDNA), co zapoczątkowuje naprawę uszkodzeń na drodze homologicznej rekombinacji. Przy udziale białek: BRCA1, BRCA2 oraz RAD51 dochodzi do połączenia krótkich odcinków jednoniciowego DNA z nieuszkodzoną matrycą. W wyniku działania polimeraz, nukleaz, helikaz oraz innych białek, następuje naprawa uszkodzeń. HR jest również zaangażowana we wznowienie replikacji spowodowanej zablokowaniem widełek replikacyjnych [45-47].

W przypadku NHEJ podwójne uszkodzenia nici DNA rozpoznawane są przez heterodimerski kompleks białek Ku70/Ku80, który następnie wiąże się z kinazą DNA-PK. Dochodzi do rekrutacji i aktywacji enzymów przetwarzających końce DNA: polimeraz i ligazy IV DNA. Ponadto możliwa jest również naprawa uszkodzeń DNA, związana z łączeniem niehomologicznych zakończeń, ale zachodząca niezależnie od białka Ku, zwana alternatyw-

nym NHEJ (alt-NHEJ), bądź mikrohomologicznym łączeniem zasad (MMEJ, ang. *microhomology-mediated end-joining*). Mechanizm NHEJ jest także zaangażowany w rearanżację regionów V(D)J podczas rozwoju limfocytów [48].

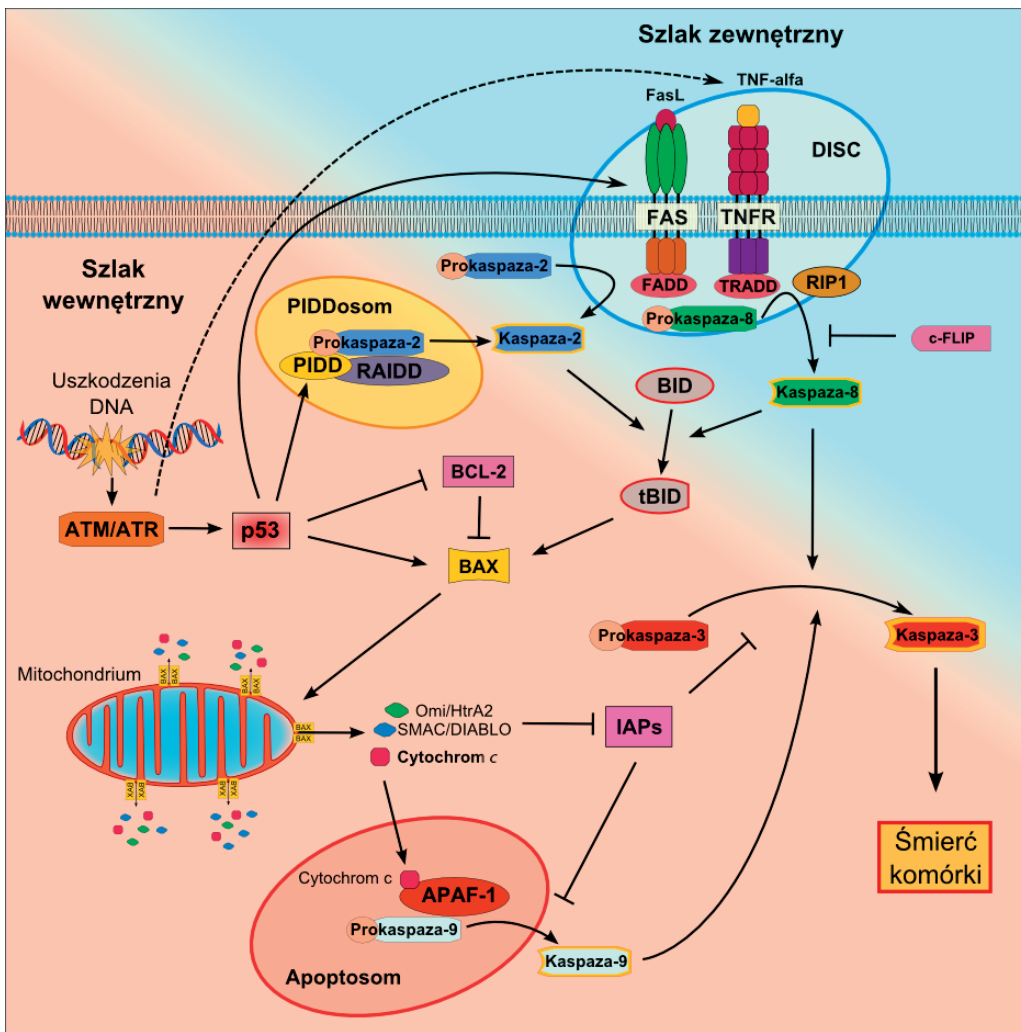
APOPTOZA

W przypadku gdy liczba uszkodzeń DNA przekracza zdolności komórki do ich naprawy, aktywacja szlaku DDR może prowadzić do uruchomienia procesu samozniszczenia komórki, apoptozy. Dochodzi wówczas do eliminacji komórki z uszkodzonym DNA, która stanowi potencjalne zagrożenie dla or-

ganizmu [16].

Apoptoza jest jednym z najczęściej badanych i najlepiej poznanych rodzajów śmierci komórkowej. Termin ten został po raz pierwszy wprowadzony przez Kerr'a w 1972 [49] i w tłumaczeniu dosłownym z języka greckiego oznacza opadanie liści. Apoptoza odgrywa ważną rolę, nie tylko w eliminacji uszkodzonych komórek, ale również w usuwaniu zbędnych komórek podczas rozwoju i wzrostu organizmu, co zapewnia prawidłową budowę narządów i tkanek. W wyniku apoptozy eliminowane są także komórki zakażone wirusami, czy komórki układu odpornościowego (autoreaktywne limfocyty T w grasicy oraz aktywowane limfocyty podczas wygaszania odpowiedzi immunologicznej). O bardzo ważnej roli apoptozy w życiu organizmu świadczy fakt, że zbyt wysoki poziom może być przyczyną chorób degeneracyjnych czy bezpłodności, a jej zahamowanie może stanowić przyczynę rozwoju nowotworów [50].

Apoptoza może być indukowana różnymi czynnikami, zarówno zewnętrznymi, jak i wewnętrznymi. Oprócz wspomnianych wyżej uszkodzeń DNA, można wyróżnić stres oksydacyjny, stres siateczki wewnątrzplazmatycznej, brak czynników wzrostowych (np. cytokin) i pokarmowych, szok cieplny, niedotlenienie, hormony oraz aktywację powierzchniowych receptorów śmierci odpowiednimi ligandami. Wyróżnia się dwa główne szlaki aktywacji apoptozy: wewnętrzny (mitochondrialny) i zewnętrzny (związany z receptorami śmierci) [51]. Szlaki apoptotyczne zostały przedstawione na rycinie 5. Pod wpływem działania wymienionych wyżej czynników, dochodzi do charakterystycznych zmian morfologicznych i biochemicznych w komórce. Cały proces apoptozy, od momentu zadziałania czynnika stresowego do rozpadu komórki, zajmuje najczęściej kilka godzin. W trakcie apoptozy dochodzi do obkurczenia i zaokrąglenia komórki, kondensacji chromatyny oraz fragmentacji jądra. Błona komórkowa zachowuje swoją integralność aż do końcowego etapu procesu, kiedy następuje formowanie i rozpad komórki na ciała apoptotyczne. Obserwowane są one bardzo często w warunkach hodowli *in vitro*. Ciała apoptotyczne rozpadają się, co przypomina proces nekrozy i nazywane jest wtórną nekrozą. W organizmie komórki apoptotyczne fagocytowane są przez makrofagi



Rycina 5. Wewnętrzny i zewnętrzny szlak apoptotyczny - rola p53. Centralną rolę w procesie apoptozy indukowanej uszkodzeniami DNA odgrywa białko p53. Białko p53 zaangażowane jest w proces aktywacji kaspaz inicjatorowych, zarówno szlaku wewnętrznego, jak i zewnętrznego oraz wpływa na oligomeryzację białka BAX, tworzącego kanały, przez które uwalniane są z mitochondriów czynniki proapoptotyczne. Jednym z nich jest cytochrom c, który wraz z APAF-1 tworzy platformę aktywującą kaspazę-9. Z mitochondriów wydostają się do cytoplazmy białka OMI/HTRA2 i SMAC/DIABLO, które blokują IAPs, inhibitory kaspazy-3 i kaspazy-9. Drugą platformą szlaku wewnętrznego, aktywującą kaspazę inicjatorową – kaspazę-2, jest zależny od p53 kompleks PIDDosom. p53 zaangażowane jest w regulację syntezy receptorów śmierci i ich ligandów, które tworzą kolejną, zaliczaną do szlaku zewnętrznego, platformę DISC. Następuje w niej proteoliza kaspazy-8, która może bezpośrednio prowadzić do aktywacji kaspaz efektorowych lub za pośrednictwem białka tBid poprzez uruchamianie ścieżki wewnętrznej/mitochondrialnej. W odpowiedzi na wysoki poziom uszkodzeń DNA kinaza ATM może prowadzić do zależnej od NF- κ B produkcji TNF- α , który autokrywnie, przy udziale RIP1, aktywuje kaspazę-8. Inhibitorami aktywacji kaspaz są c-FLIP (kaspaza-8) oraz IAPs (kaspaza-9 i kaspaza-3).

przeważnie przed rozpadem na ciała apoptotyczne. Sygnałem do rozpoczęcia fagocytozy jest przemieszczenie fosfatydyloseryny z wewnętrznej na zewnętrzną warstwę błony komórkowej umierającej komórki [52]. Zapobiega to uwolnieniu czynników prozapalnych z wnętrza komórki do otaczającej tkanki. Dzięki temu apoptoza jest procesem w bardzo małym stopniu immunogennym [53,54].

Z biochemicznego punktu widzenia, w proces apoptozy zaangażowanych jest bardzo duża liczba różnych białek. Centralną rolę w regulacji i egzekucji apoptozy odgrywają zazwyczaj kaspazy. Są to proteazy cysteinowe, które katalizują reakcję rozpadu wiązania peptydowego w pozycji Asp-Xxx [55]. Produkowane są one w formie nieaktywnych zymogenów, które w wyniku proteolizy ulegają

aktywacji [56]. Ze względu na strukturę i funkcję wyróżnić można dwie grupy kaspaz związanych z apoptozą, inicjatorowe (tj. kaspaza-2, -8, -9 i -10) oraz efektorowe (wykonawcze) (tj. kaspaza-3, -6 i -7). Kaspazy inicjatorowe w odpowiedzi na czynnik stresowy ulegają aktywacji przy udziale dużych kompleksów białek przyporzadkowanych do dwóch głównych szlaków apoptotycznych, wewnętrznego (apoptosom, PIDDosom) i zewnętrznego (DISC, ang. *death-inducing signaling complex*) [57]. Kaspazy efektorowe są konstytutywnie produkowane przez komórki w formie dimerów, które ulegają aktywacji w wyniku trawienia przez kaspazy inicjatorowe, co świadczy o istnieniu wewnętrznej pętli amplifikującej aktywację tych białek [58]. Aktywacja kaskady kaspaz prowadzi do proteolizy ważnych białek komórkowych. Jednym z nich jest białko ICAD (ang. *inhibitor of caspase-activated DNase*), które jest inhibitorem endonukleazy DAF40/CAD. Jego proteoliza prowadzi do aktywacji endonukleazy i fragmentacji DNA. Obkurczenie i fragmentacja jądra następuje w wyniku proteolizy laminy [59]. Natomiast trawienie białek cytoszkieletu (akty-

na) powoduje rozpad komórki na ciała apoptotyczne. Substratami kaspaz efektorowych (głównie kaspazy-3) są również białka związane ze szlakiem DDR, takie jak PARP (ang. *poly (ADP-ribose) polymerase*), DNA-PKcs oraz ATM. Prowadzi to do wyciszenia odpowiedzi na uszkodzenia DNA będącej skutkiem fragmentacji DNA przez endonukleazy. Dzięki działaniu kaspaz proces naprawy i przekazywania sygnału od uszkodzeń DNA jest wyłączany w umierających komórkach [60]. Zaobserwowano również, że apoptoza może zachodzić bez oligonukleosomalnej degradacji DNA, czy aktywacji kaspaz. [61].

ROLA p53 W APOPTOZIE

W apoptozie indukowanej uszkodzeniami DNA, białko p53 bierze udział w różnych etapach aktywacji,

zarówno szlaku wewnętrznego, jak i zewnętrznego. Jest to związane z jego funkcją jako czynnika transkrypcyjnego genów proapoptotycznych oraz z bezpośrednim oddziaływaniem z białkami antyapoptotycznym, czego skutkiem jest ich zablokowanie [16]. Znany jest również mechanizm proapoptotyczny p53, który stymuluje ekspresję wielu rodzajów niekodujących mikroRNA, które wyciszają białka związane z cyklem komórkowym i naprawą DNA [62].

SZLAK WEWNĘTRZNY

Białkami proapoptotycznymi szlaku wewnętrznego indukowanymi przez p53 są należące do dwóch grup białka z rodziny BCL-2 (ang. *B-cell leukemia/lymphoma 2*). Cechą charakterystyczną tej rodziny białek jest występowanie jednej lub większej liczby z czterech domen BH (ang. *Bcl-2 homology*), czyli BH1, BH2, BH3 i BH4. Do pierwszej grupy należą białka BAX i BAK, które odpowiedzialne są za tworzenie kanałów w wewnętrznej błonie mitochondriów, przez które wydostają się do cytoplazmy czynniki proapoptotyczne. Do drugiej grupy, której cechą charakterystyczną jest występowanie tylko domeny BH3 zalicza się białka: PUMA, NOXA, BID czy BIM. Gdy na komórkę nie działają czynniki stresowe, białka BAX i BAK są związane przez antyapoptotyczne białka z rodziny BCL-2 (BCL-2, BCL-XL, MCL-1) [63,64]. Pod wpływem uszkodzeń DNA, białka z jedną domeną BH3 indukują szlak wewnętrzny apoptozy w dwojaki sposób. W pierwszym wariantcie, wiążą się do białek antyapoptotycznych BCL-2 i BCL-XL, co prowadzi do blokowania ich funkcji i uwolnienia BAX i BAK. Drugi model zakłada, że białka z samą domeną BH3 (BIM, tBID, PUMA) przejściowo oddziałują bezpośrednio z BAX i BAK, powodując zmianę ich konformacji i aktywację. Białko p53 również może, na drodze niezależnej od transkrypcji, bezpośrednio aktywować BAX lub w wyniku oddziaływania z BCL-2 prowadzić do jego uwolnienia [65]. Przez kanały utworzone przez BAX i BAK w mitochondriach, wydostaje się cytochrom *c*, który wraz z białkiem APAF-1 (ang. *apoptotic protease activating factor 1*) tworzy w cytoplazmie heptameryczny kompleks, apoptosom. Stanowi on platformę aktywującą inicjującą kaspazę-9, która następnie aktywuje kaspazy efektorowe [51]. Z mitochondriów uwalniane są również białka takie jak SMAC/DIABLO (ang. *second mitochondria-derived activator of caspases/ direct IAP binding protein with low pI*) oraz OMI/HTRA2, które indukują apoptozę poprzez hamowanie inhibitorów kaspaz-3, -7 i -9, IAPs (ang. *inhibitors of apoptosis*) oraz odpowiedzialne za fragmentację i kondensację DNA endonukleazy G i AIF (ang. *apoptosis-inducing factor*) [66].

SZLAK ZEWNĘTRZNY

Apoptoza indukowana uszkodzeniami DNA może również aktywować szlak zewnętrzny związany z aktywacją powierzchniowych receptorów śmierci. Odpowiedzialne za to jest również białko p53 będące w tym przypadku czynnikiem transkrypcyjnym receptorów, takich jak: CD95/FAS i TRAIL (ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) oraz ich ligandów (FASL, TRAIL). Receptory śmierci należą do rodziny TNFR (ang. *tumor necrosis*

factor receptor) i zalicza się do nich oprócz CD95/FAS i TRAILR (ang. *receptor of TNF-related apoptosis-inducing ligand*), również TNFR1. Zbudowane są one z domeny zewnątrzkomórkowej, części transbłonowej oraz z cytoplazmatycznej domeny śmierci (DD), która jest niezbędna do oddziaływania z kompleksem białek adaptorowych. Receptory śmierci aktywowane są poprzez związanie specyficznego liganda (np. CD95L/FASL, TNF- α , TRAIL) [52]. Jednym z najlepiej poznanych mechanizmów jest aktywacja CD95/FAS w wyniku związania jego liganda CD95L/FASL. Prowadzi to do zmiany konformacyjnej domeny wewnętrznej receptora i formowania kompleksu DISC, złożonego z receptora śmierci, białka adaptorowego FADD (ang. *Fas-associated protein with death domain*) i prokaspazy-8 lub prokaspazy-10. W wyniku dimeryzacji zachodzi aktywacja kaspazy-8 lub kaspazy-10, które następnie aktywują kaspazy wykonawcze [50,67]. Ze względu na sposób przekazywania sygnału od receptorów śmierci, komórki można podzielić na dwa typy. W komórkach typu I poziom aktywowanej w kompleksie DISC kaspazy-8, jest wystarczający do indukcji kaspaz efektorowych, a tym samym apoptozy. Natomiast w komórkach typu II uruchamiany jest dodatkowy mechanizm, polegający na proteolizie białka BID przez kaspazę-8. Następnie skrócone białko BID, tBID (ang. *truncated BID*), aktywuje ścieżkę mitochondrialną [52]. Negatywnym regulatorem szlaku zewnętrznego jest strukturalnie podobne do kaspazy-8 białko c-FLIP (ang. *cellular FLICE-like inhibitory protein*). Wiążąc się do kompleksu zawierającego białko FADD, blokuje rekrutację i aktywację kaspazy-8 [68]. Ponadto c-FLIP, w odpowiedzi na związanie swoich ligandów przez receptory śmierci, oddziałuje z białkiem RAF1 i RIP (ang. *receptor interacting protein*), promując aktywację ścieżek ERK i NF- κ B, odpowiedzialnych za przeżycie komórki [69].

Znany jest także mechanizm, w którym wysoki poziom uszkodzeń DNA może również aktywować apoptozę związaną z aktywacją receptora TNF. Gdy komórka wystawiona jest na działanie silnego czynnika cytotoksycznego, kinaza ATM przy udziale NEMO i RIP1 (ang. *receptor interacting protein 1*) może aktywować szlak NF- κ B, który prowadzi do produkcji i wydzielania TNF- α . Cytokina ta w sposób autokryny aktywuje receptor TNFR1. Przy udziale RIP1 następuje rekrutacja FADD i aktywacja kaspazy-8 [70].

AKTYWACJA KASPAZY-2 W ODPOWIEDZI NA USZKODZENIA DNA

Kaspaza-2 jest najlepiej zachowaną ewolucyjnie kaspazą z całej rodziny tych białek. Zaliczana jest do kaspaz inicjatorowych, ale posiada pewne cechy kaspaz efektorowych. Dodatkowo, jako jedyna może występować w jądrze komórkowym. Aktywowana jest w odpowiedzi na zewnętrzne i wewnętrzne czynniki apoptotyczne tj.: uszkodzenia DNA, stres ER, szok cieplny czy aktywację receptorów śmierci. Stwierdzono również, że w odpowiedzi na uszkodzenia DNA może być zaangażowana, nie tylko w śmierć komórki (zależną od p53), ale także w aktywację NF- κ B, regulację cyklu komórkowego i naprawę DNA. Związane jest to z występowaniem kilku platform aktywacyjnych. Dokładny mechanizm aktywacji apopto-

zy indukowanej uszkodzenia DNA, z udziałem kaspazy-2 nie jest w pełni poznany. W pewnych określonych warunkach (nadprodukcja białka PIDD, ang. *p53-induced protein with a death domain* lub kaspazy-2), indukcja uszkodzeń DNA prowadziła do aktywacji kaspazy-2 w zależnym od p53 kompleksie zwanym PIDDosomem [71]. Złożony jest on z białka PIDD oraz białka adaptorowego RAIDD (ang. *RIP-associated protein with a death domain*), które rekrutuje kaspazę-2. W wyniku dimeryzacji następuje autoaktywacja kaspazy-2. Jej głównym substratem jest białko BID, którego proteoliza prowadzi do uruchomienia szlaku mitochondrialnego. Jednakże badania na myszach z delecją genów kodujących PIDD i RAIDD nie potwierdziły udziału tych białek w aktywacji kaspazy-2, co sugeruje występowanie innych, nieodkrytych dotychczas mechanizmów [72].

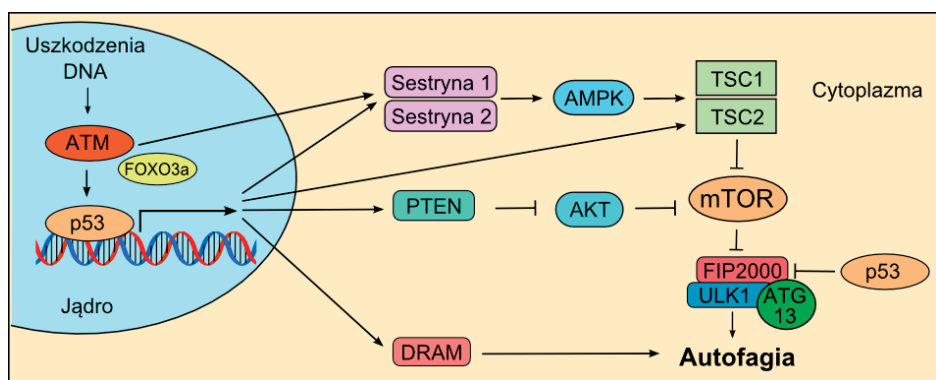
Inną platformą aktywacyjną powstającą w wyniku uszkodzeń DNA jest jądrowy kompleks DNA-PKcs-PIDDosom. DNA-PKcs rekrutuje PIDD i kaspazę-2, która ulega fosforylacji. Ufosforylowana kaspaza-2 odgrywa rolę w regulacji cyklu komórkowego i w naprawie DNA [73]. Natomiast kompleks NEMO-PIDDosom prowadzi do aktywacji NF- κ B [74]. Udział białka PIDD w regulacji kaspazy-2 koreluje z jej jądrową lokalizacją. Natomiast aktywacja cytoplazmatycznej kaspazy-2 nie jest zależna od PIDD i może być wynikiem działania białek związanych ze szlakiem zewnętrznym apoptozy, które tworzą kompleks DISC (FADD, TRADD) [75]. Aktywacja kaspazy-2 może być również wynikiem jej proteolizy przez kaspazę-3 podczas egzekutorowej fazy śmierci komórki [76].

USZKODZENIA DNA W AUTOFAGII

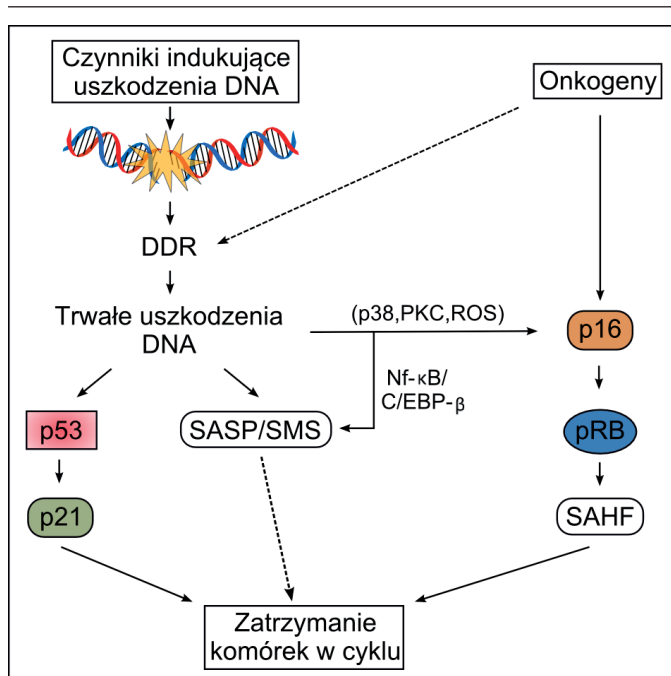
Czynniki stresowe, w tym indukujące uszkodzenia DNA, nie pozostają również bez wpływu na metabolizm komórki, a konsekwencją ich działania jest aktywacja procesu autofagii. Udział szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA i białka p53 w indukcji autofagii został przedstawiony na rycinie 6. Autofagia jest to proces kataboliczny, w którym komórka trawi własne struktury w celu pozys-

kania energii i składników odżywczych/prekursorów metabolicznych. Istnieje kilka rodzajów autofagii: makroautofagia, mikroautofagia oraz autofagia zależna od białek opiekuńczych (CMA, ang. *chaperone-mediated autophagy*). Makroautofagia odgrywa główną rolę w degradacji struktur cytoplazmatycznych. Polega na otoczeniu fragmentu cytoplazmy wraz z organellami komórkowymi podwójną błoną lipidową tworząc pęcherzyk zwany autofagosomem. Następnie jego zawartość ulega rozkładowi w wyniku połączenia się z lizosomem. W warunkach fizjologicznych, niski poziom autofagii zapewnia utrzymanie homeostazy komórki poprzez usuwanie nieprawidłowo sfałdowanych białek czy uszkodzonych organelli komórkowych. W sytuacjach stresowych, takich jak: głodzenie, stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA, hipoksja czy infekcje poziom autofagii wzrasta. Pozwala to na dostarczenie substancji odżywczych umożliwiających przetrwanie komórce niekorzystnych warunków. Jednakże gdy czynnik stresowy po pewnym czasie nie znika, autofagia może prowadzić do całkowitej destrukcji komórki i jej śmierci [77]. Wzrost poziomu autofagii jest również obserwowany podczas starzenia komórkowego. Jednakże, co do roli autofagii w starzeniu komórkowym, zdania badaczy są podzielone. Niektórzy uważają, że autofagia odgrywa ważną rolę w indukcji procesu starzenia [78]. Natomiast inni twierdzą, że są to zjawiska równoległe, a blokowanie autofagii nie zapobiega starzeniu komórek, tylko opóźnia ten proces [79]. W niektórych nowotworach, poziom autofagii wzrasta w odpowiedzi na chemio- czy radioterapię, co pozwala na przetrwanie komórek nowotworowych. Stosowanie inhibitorów autofagii wraz ze związkami przeciwnowotworowymi, zwiększało śmiertelność komórek nowotworowych [80].

Jednym z głównych regulatorów autofagii jest, zaangażowana w regulację metabolizmu i wzrostu komórki, kinaza mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*). W sytuacji, gdy substancje odżywcze i czynniki wzrostu są dostępne, mTOR aktywuje translację, promuje wzrost komórki i aktywność metaboliczną. Wtedy proces autofagii jest zahamowany. Podczas głodzenia aktywność mTOR spada i dochodzi do indukcji autofagii. Podobnie dzieje się, gdy na komórkę działają czynniki uszkodzające DNA. Aktywacja szlaku DDR i białka p53 prowadzi do uruchomienia punktów kontroli cyklu komórkowego i zatrzymania podziałów, czemu towarzyszy także zahamowanie procesów metabolicznych. Blokowana jest aktywność kinazy mTOR, czego wynikiem jest zahamowanie syntezy nowych białek i indukcja autofagii. W tym procesie znaczącą rolę odgrywa białko p53, które jest czynnikiem transkrypcyjnym białek regulujących aktywność szlaku AKT/mTOR. Jednym z nich jest fosfataza PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*), która hamuje aktywność kinazy AKT,



Rycina 6. Udział szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA i białka p53 w autofagii. Białko p53 może indukować, bądź hamować proces autofagii. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA, p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym białek (PTEN, Sestriny 1 i 2) związanych ze szlakami blokującymi kinazę mTOR, co prowadzi do aktywacji autofagii. Białko p53 jest także regulatorem genu lizosomalnego białka DRAM indukującego autofagię. Dodatkowo kinaza ATM i białko FOXO3a aktywują autofagię poprzez wpływanie na szlak z udziałem Sestriny/AMPK. Natomiast cytoplazmatyczna pula p53 może zapobiegać autofagii blokując, aktywując ją, kompleks FIP200/ULK1/ATG13.



Rycina 7. Uproszczony schemat aktywacji dwóch głównych szlaków sygnałowych podczas indukcji starzenia (p53-p21, p16-pRb). W wyniku zadziałania czynnika powodującego uszkodzenia DNA dochodzi do trwałej aktywacji szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR). Trwała aktywacja szlaku DDR prowadzi do zatrzymania komórek w cyklu, pojawienia się fenotypu sekrecyjnego związanego ze starzeniem (SASP/ SMS), aktywacji białek p38 i PKC (kinaza białkowa C) oraz wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu. W starzeniu indukowanym onkogenami aktywacji ulega szlak z udziałem białek p16-pRb. Jednym z markerów tego typu starzenia jest powstawanie ognisk heterochromatyny związanych z starzeniem (SAHF). Zmodyfikowane według [92].

będącej negatywnym regulatorem inhibitorów mTOR, białek TSC1 (ang. *tuberous sclerosis protein 1*) i TSC2. Co więcej, p53 transaktywuje gen kodujący białko TSC2, co wzmacnia blokowanie mTOR [81]. Uszkodzenia DNA oraz stres oksydacyjny prowadzą do indukowanej przez p53 syntezy białek sestrzyn (sestryna 1 i 2). Wpływają one na aktywację kinazy AMPK (ang. *5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*), która blokuje mTOR poprzez pozytywne oddziaływanie na kompleks TSC1 i TSC2 [82]. Białko p53 transaktywuje gen lizosomalnego białka DRAM (ang. *damage-regulated autophagy modulator*) indukującego autofagię [83]. Kinaza ATM oraz FOXO3a w odpowiedzi na cytotoksyczny i oksydacyjny stres zaangażowane są w hamowanie mTOR na drodze zależnej od szlaku sestrzyn/AMPK [84,85].

Wykazano również, że białko p53 w sposób niezależny od regulacji transkrypcji może hamować autofagię. Jest to związane z cytoplazmatyczną lokalizacją p53, jednakże dokładny mechanizm tego procesu nie jest w pełni poznany. Jak dotąd jedynym znanym białkiem związanym z autofagią, oddziałującym z p53, jest FIP200. Jest ono wraz z ULK1 (ang. *unc-51 like autophagy activating kinase 1*) i ATG13 składnikiem kompleksu aktywującego autofagię [86].

STARZENIE KOMÓRKOWE

Nienaprawialne uszkodzenia DNA nie zawsze prowadzą do śmierci komórkowej. W pewnych sytuacjach

dochodzi do nieodwracalnego zatrzymania podziałów komórkowych, czyli zjawiska nazwanego starzeniem komórkowym. Wyróżniamy starzenie replikacyjne, które jest związane ze skracaniem telomerów oraz starzenie przyspieszone, które jest niezależne od ich skracania. Starzenie replikacyjne może być obserwowane w hodowli po kilku tygodniach lub miesiącach, natomiast starzenie przyspieszone po kilku dniach od zadziałania czynnika indukującego. Starzenie przyspieszone (SIPS, ang. *Stress Induced Premature Senescence*) może być indukowane wieloma czynnikami. Wśród nich można wyróżnić stres oksydacyjny, aktywację onkogenów, czynniki indukujące uszkodzenia DNA, między innymi związki stosowane w chemioterapii i promieniowanie jonizujące oraz niewłaściwe warunki hodowli, które są określane mianem stresu hodowlanego [87].

Komórki ulegające starzeniu charakteryzują się pewnymi specyficznymi cechami. Jednakże, w zależności od rodzaju komórek i czynnika indukującego starzenie, nie wszystkie są wyrażane w jednakowym stopniu. Do istotnych cech starzenia zalicza się trwałe zatrzymanie podziałów komórkowych, pomimo dostępności komórki do czynników odżywczych i mitogennych. Uniwersalnym, chociaż nie zawsze specyficznym markerem starzenia komórkowego jest aktywność tak zwanej, związanej ze starzeniem, β-galaktozydazy (SA-β-Gal, ang. *senescence associated β-galactosidase*). Komórki stare mogą cechować podwyższony poziom białek p16 i p21 (inhibitorów cyklu komórkowego), trwała aktywacja szlaku DDR, związana z występowaniem nienaprawialnych uszkodzeń DNA oraz związane ze starzeniem skupiska heterochromatyny. Komórki stare nie dzielą się, ale pozostają metabolicznie aktywne i wydzielają wiele czynników wzrostowych i cytokin prozapalnych, które wpływają na sąsiadujące komórki. Tę ostatnią cechę nazywa się związanym ze starzeniem fenotypem sekrecyjnym (SASP, ang. *Senescence Associated Secretory Phenotype*) [88]. Proces starzenia komórkowego obserwowany *in vitro* zachodzi również w wielu komórkach *in vivo* [89,90].¹

W starzeniu komórkowym kluczową rolę odgrywają dwa szlaki sygnałowe p53-p21 i p16-pRb [91] (Ryc. 7). Trwała aktywacja lub nadprodukcja któregoś z tych białek jest wystarczającym bodźcem do indukcji starzenia komórkowego [92]. Ścieżka z udziałem białek p53-p21 pełni istotną rolę w starzeniu komórkowym indukowanym poprzez aktywację szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Początkowa odpowiedź komórek na czynnik indukujący uszkodzenia DNA jest szybka oraz przejściowa, zanika w ciągu 24–48 h od zadziałania czynnika ją aktywującego [93]. W przypadku, gdy uszkodzenia są wystarczające, aby doszło do indukcji starzenia, aktywacja białka p53 nie zanika i utrzymuje się na pewnym poziomie. Towarzyszy temu podwyższony poziom białka p21 [94]. Białko p53 transaktywuje ekspresję genu kodującego białko p21. Białko p21 jest inhibitorem kinaz zależnych od cyklin. Trwała aktywacja szlaku DDR prowadzi do zatrzymania komórek w cyklu. Następnie dochodzi do ak-

¹Znaczniki starzenia zostały szerzej omówione w artykule pt. „Znaczniki starzenia komórkowego”, zamieszczonym w niniejszym zeszycie Postępów Biochemii.

tywacji innych szlaków sygnałowych, w których uczestniczą między innymi p38MAPK, kinaza białkowa C oraz reaktywne formy tlenu [95,96]. Dodatkowe szlaki sygnałowe, w których biorą udział wyżej wymienione elementy, wywołują wzrost zawartości białka p16, które poprzez wiązanie białka pRb prowadzi do nieodwracalnego zatrzymania komórek w cyklu [97]. Białko p16 podobnie jak p21 jest inhibitorem kinaz zależnych od cyklin. Zarówno p16, jak i p21 mogą utrzymywać białko pRb w formie aktywnej, hipofosforylowanej. Dochodzi wówczas do zahamowania transkrypcji genów zależnych od czynnika transkrypcyjnego E2F, które są niezbędne do proliferacji. Szlak z udziałem białek p16-pRb odgrywa główną rolę w starzeniu indukowanym poprzez aktywację onkogenów i jest niezbędny do powstania skupisk heterochromatyny związanych ze starzeniem (SAHF, ang. *Senescence Associated Heterochromatin Foci*), które są jednym z markerów tego procesu. Część białek jest wspólna dla obydwu szlaków, a aktywacja ich jest zależna od rodzaju bodźca działającego na komórkę [88].

STARZENIE REPLIKACYJNE

Starzenie replikacyjne zostało po raz pierwszy opisane w 1961 roku przez Hayflicka i Moorhead'a [98]. Wykazali oni, że prawidłowe ludzkie fibroblasty mają ograniczoną zdolność do proliferacji w hodowli. Zaobserwowali oni, że wraz z liczbą podziałów zdolność do proliferacji komórek malała. Niedzielące się komórki pozostawały żywe w hodowli przez wiele tygodni, ale nie były zdolne do podziału pomimo zapewnienia im odpowiednich warunków hodowlanych. Komórki po przejściu określonej liczby podziałów zatrzymywały się w cyklu komórkowym, ale pozostawały aktywne metabolicznie. Hayflick i Moorhead zaobserwowali, że wzrost komórek w hodowli ma charakter trójfazowy. Faza I rozpoczyna się w momencie założenia hodowli pierwotnej. Charakteryzuje się ona zwykle wolnym tempem podziałów i trwa do momentu pokrycia przez komórki całej powierzchni naczynia hodowlanego. Faza II charakteryzuje się szybkim tempem wzrostu. Podczas Fazy III dochodzi do spowolnienia podziałów, a następnie ich zatrzymania. Stan, w którym dochodzi do wyczerpania zdolności replikacyjnej został nazwany starzeniem replikacyjnym, a maksymalna liczba podziałów jakiej komórka może ulec została określona limitem Hayflicka. Ten typ starzenia komórkowego jest wynikiem skracania się telomerów. Krótkie telomery prowadzą do aktywacji szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR), który zapoczątkowuje i podtrzymuje zatrzymanie komórek w cyklu [88].²

STARZENIE PRZYSPIESZONE

Ten typ starzenia nazwę swą zawdzięcza temu, że występuje ono niezależnie od skracania telomerów, powodującego starzenie replikacyjne. Jedną z grup czynników indukujących starzenie przyspieszone stanowią związki indukujące uszkodzenia DNA, jak na przykład związki stosowane w chemioterapii. Związki takie indu-

kują starzenie komórek prawidłowych, a także prowadzą do starzenia komórek nowotworowych, w warunkach *in vitro* jak *in vivo* [99]. Przykładem komórek prawidłowych ulegających starzeniu pod wpływem związku stosowanego w chemioterapii są ludzkie komórki mięśni gładkich aorty (VSMC, ang. *vascular smooth muscle cells*), które ulegają przyspieszonemu starzeniu pod wpływem krótkotrwałego traktowania wyższym stężeniem dokso-rubicyny, bądź długotrwałą hodowlą w obecności niskiego stężenia tego związku [100]. Natomiast przykładem komórek nowotworowych ulegających w warunkach *in vitro* przyspieszonemu starzeniu pod wpływem tego samego związku są ludzkie komórki raka okrężnicy linii HCT116, które w ciągu kilku dni od potraktowania ich przez dobę niskim stężeniem dokso-rubicyny ulegają starzeniu [101]. Zaobserwowano również, że pod wpływem innych czynników indukujących uszkodzenia DNA, takich jak promieniowanie jonizujące, stres oksydacyjny (H₂O₂) czy traktowanie komórek radiomimetykami (bleomycyna), komórki mogą ulegać przyspieszonemu starzeniu [102,103]. Stres oksydacyjny, indukowany różnego rodzaju czynnikami, prowadzi zwykle do powstania jednoniciowych pęknięć DNA które podczas replikacji mogą być przekształcane w dwuniciowe pęknięcia DNA [104]. Ponadto stres oksydacyjny może przyspieszać skracanie telomerów [105]. Przypuszczalnie jest to spowodowane tym, że bogate w guaninę telomerowe DNA jest bardzo wrażliwe na działanie reaktywnych form tlenu. Prowadzi to do powstania dwuniciowych pęknięć DNA, będących skutkiem występowania krytycznie krótkich telomerów, jak ma to miejsce w przypadku starzenia replikacyjnego. Zaobserwowano, że stres oksydacyjny przyspiesza skracanie telomerów podczas gdy stosowanie antyoksydantów opóźnia to zjawisko. Stwierdzono, że traktowanie komórek endotelialnych i fibroblastów fosforanem kwasu askorbinowego bądź zmiataczem wolnych rodników zwalniało tempo skracania telomerów w porównaniu z komórkami hodowanymi w standardowych warunkach.

Modelem przyspieszonego starzenia jest także opisane po raz pierwszy przez Manuela Serrano starzenie komórkowe indukowane poprzez aktywację onkogenów [106]. Wykazano wówczas, że synteza onkogenego białka RAS w prawidłowych fibroblastach prowadzi do starzenia komórkowego. Stwierdzono również, że nadprodukcja innych onkogenów (RAF, MEK, MOS i BRAF) także prowadzi do indukcji starzenia [107-110]. Ponadto stwierdzono, że proces ten ma miejsce nie tylko *in vitro*. Istnieją dowody pokazujące, że występuje również *in vivo* u myszy i ludzi. Mechanizm indukcji starzenia onkogenami jest zależny od aktywacji szlaku p16-pRb. Dodatkowo temu procesowi towarzyszy wzrost poziomu ROS, które mogą powodować stres oksydacyjny i aktywację szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Ponadto silne mitogeny, jak na przykład onkogeny, prowadzą do wzmożonej proliferacji, co może powodować stres replikacyjny i powstanie uszkodzeń DNA oraz aktywację ścieżki DDR. W konsekwencji prowadzi to do starzenia indukowanego onkogenami [110].³

²Mechanizm starzenia replikacyjnego został szerzej omówiony w artykule pt. „Rola starzenia komórkowego w starzeniu organizmu i chorobach związanych z wiekiem”, zamieszczonym w niniejszym zeszycie Postępów Biochemii.

³Zagadnienie to zostało szerzej omówione w artykule pt. „Rola starzenia komórkowego w kancerogenezie i terapii przeciwnowotworowej”, zamieszczonym w niniejszym zeszycie Postępów Biochemii.

Trwała aktywacja szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR), prowadzi do indukcji przyspieszonego starzenia i w odróżnieniu od przejściowej aktywacji tego szlaku, charakteryzuje się długotrwałym występowaniem skupisk białek będących elementami szlaku DDR tak jak np. γ H2AX i 53BP1 [94,102,111]. Do niedawna uważano, że przyspieszone starzenie może być indukowane uszkodzeniami DNA występującymi zarówno w telomerowym, jak i nietelomerowym DNA [112]. Jednakże ostatnie publikacje [111,113,114] pokazują, że trwała aktywacja DDR jest wynikiem występowania uszkodzeń w odcinkach telomerowych. W ludzkich spoczynkowych fibroblastach starzenie było indukowane poprzez poddawanie je działaniu promieniowania. Komórki barwiono na obecność 53BP1 i znakowano telomery przy użyciu techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, ang. *fluorescent in situ hybridization*). Wraz z upływem czasu od traktowania komórek promieniowaniem część uszkodzeń ulegała naprawie natomiast, te które pozostawały i prowadziły do indukcji starzenia, występowały w obrębie telomerów. Takich samych obserwacji dokonano, gdy starzenie komórkowe było indukowane bleomycyną, która jest radiomimetykiem oraz, gdy jako znacznika uszkodzeń DNA używano γ H2AX. Występowanie kilku uszkodzeń w odcinkach telomerowych stanowi wystarczający bodziec do indukcji starzenia [111].

ZESPOŁY PRZYSPIESZONEGO STARZENIA

Oprócz badań na poziomie komórek, tkanek i organizmów zarówno ludzi, jak i zwierząt, wiedzę dotyczącą starzenia pozwalają nam wzbogacić również zespoły przyspieszonego starzenia. Są to choroby genetyczne cechujące się wczesnym występowaniem zmian związanych z wiekiem. Wiele spośród tych zespołów doczekało się swoich odpowiedników w świecie zwierząt dzięki stworzeniu mysich modeli.

Powszechnie znane są takie zespoły przyspieszonego starzenia jak zespół Wernera (WS, ang. *Werner's syndrome*), Cockayne (CS, ang. *Cockayne Syndrome*) czy progeria Hutchinsona-Gilforda (HGPS, ang. *Hutchinson-Gilford progeria syndrome*). Spośród nich najlepiej przebadane zostały zespoły Wernera i progeria Hutchinsona-Gilforda.

Zespół Wernera spowodowany jest mutacją w genie WRN. Białko WRN należy do rodziny helikaz RecQ i jest zaangażowane w transkrypcję, replikację, naprawę DNA oraz w utrzymywanie prawidłowej struktury telomerów [115]. U osób dotkniętych zespołem Wernera bardzo wczesnie pojawiają się takie zmiany jak: siwienie, łysienie, zaćma, cukrzyca typu 2, osteoporoza i miażdżyca. Objawy zespołu zwykle pojawiają się w trzeciej dekadzie życia, a osoby z WS umierają między 47 a 54 rokiem życia na skutek nowotworów bądź choroby wieńcowej. Komórki pochodzące od osób z zespołem Wernera charakteryzuje występowanie niestabilności chromosomowej i przyspieszone skracanie telomerów. Komórki te podobnie, jak pochodzące od pacjentów z HGPS, ulegają szybszemu starzeniu replikacyjnemu [116].

Progeria Hutchinsona-Gilforda spowodowana jest mutacją w genie *LMNA*, kodującym laminy A/C. Lamyne wchodzi w skład otoczki jądrowej. Biorą udział w regulacji transkrypcji i cyklu komórkowego oraz w proliferacji i różnicowaniu komórek. U osób dotkniętych HGPS, na skutek mutacji w genie *LMNA* kodującym laminę A, dochodzi do powstania krótszej o pięćdziesiąt reszt aminokwasowych formy tego białka zwanej progeryną. Dzieci dotknięte zespołem HGPS są niskiego wzrostu i szybko łysieją. Występuje u nich twardzina skóry, osteoliza, lipodystrofia oraz miażdżyca. Osoby dotknięte zespołem HGPS starzeją się dziesięciokrotnie szybciej niż osoby zdrowe i umierają w wieku około 12 lat na skutek zawału bądź udaru. [90,117]. Komórki pochodzące od osób z HGPS ulegają w hodowli szybszemu starzeniu. Obserwowane jest występowanie zaburzeń segregacji chromosomów, komórek dwujędrzastych, przyspieszone skracanie telomerów oraz podwyższony poziom uszkodzeń DNA [118]. Co ciekawe, komórki osób dotkniętych progerią Hutchinsona-Gilforda charakteryzują się aktywacją szlaku DDR [119]. Zaobserwowano, że fibroblasty pochodzące od osób z HGPS w hodowli przejściowo ulegają hiperprolifracji, po której następuje szybka śmierć na drodze apoptozy [120]. Ponadto w komórkach pochodzących od osób z HGPS obserwuje się obniżony poziom histonów H3K9me9 i H3K27me3, podniesiony poziom acetylacji histonów oraz obniżony poziom białka HP1. W skupiskach heterochromatyny związanych ze starzeniem (SAHF) obecne są następujące modyfikacje histonu H3: H3K9me9 i H3K27me3 oraz białko HP1. Są one uznawane za jeden ze znaczników tego procesu. Krótsza forma laminy A, progeryna obecna u osób dotkniętych progerią Hutchinsona-Gilforda jest również wykrywana u zdrowych osób starszych. Obserwowano ją w fibroblastach pochodzących od osób między 81 a 96 rokiem życia. Występowaniu progeryny towarzyszył zarówno obniżony poziom białka HP1, jak i histonu H3K9me3, co również było obserwowalne u osób dotkniętych HGPS. Ponadto, jedną ze zmian występującą u osób z HGPS jest obecność w komórkach dużej liczby uszkodzeń DNA. Podobnie jak w komórkach pochodzących od osób dotkniętych HGPS, w fibroblastach uzyskanych od osób starszych obserwowano występowanie dużej liczby uszkodzeń DNA [121]. Wykazano również, że traktowanie komórek pochodzących od osób z HGPS inhibitorem kinazy mTOR, rapamycyną, eliminowało progerynę z tych komórek. Przypuszcza się, że usuwanie z komórek progeryny na drodze autofagii wzmagало proliferację [122].

Ze względu na to, że u osób dotkniętych WS i HGPS wczesnie dochodzi do pojawienia się zmian związanych z wiekiem, stanowią one interesujący model do badania przebiegu starzenia. Istotną grupę tworzą również zespoły przyspieszonego starzenia spowodowane mutacjami w genach kodujących białka szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA, bądź naprawy. Wśród nich można wyróżnić zespoły Nijmegen, Blooma, Niedokrwistość Fanconiego oraz Ataxia telangiectasia [123]. W tabeli 1 przedstawione zostały choroby spowodowane mutacjami w genach kodujących białka uczestniczące w szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA.

Tabela 1. Przykładowe choroby genetyczne spowodowane mutacjami w genach kodujących białka uczestniczące w szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA.

| Choroba genetyczna | Mutacja w genie |
|--|-----------------|
| Ataxia telangiectasia | ATM |
| Zespół Seckel | ATR |
| Zespół Li-Fraumeni | TP53 |
| Zespół Nijmegen | NBS1 |
| Ataxia telangiectasia-like disorder | MRE11 |
| Nijmegen breakage syndrome-like disorder | RAD50 |

Wiedzę dotyczącą starzenia wzbogaciły badania prowadzone na organizmach modelowych. Wszystkie wyżej wymienione zespoły przyspieszonego starzenia są niezwykle rzadkie i ich dokładniejsze poznanie było możliwe dzięki stworzeniu tzw. modeli mysich. Zespoły przyspieszonego starzenia, wraz z odpowiednimi modelami mysimi, zostały przedstawione w tabeli 2. W przypadku niektórych zespołów przyspieszonego starzenia, jak np. zespół Cockayne (CS, ang. *Cockayne syndrome*) czy niedokrwiistość Fanconiego, stworzono kilka modeli mysich. Warto mieć na uwadze fakt, że modele mysie nie do końca mogą odzwierciedlać wszystkie zmiany towarzyszące zespołom, które występują u ludzi. Niekiedy objawy obserwowane u myszy mogą być bardziej nasilone lub osłabione od tych, które widoczne są u ludzi. Takie rozbieżności obserwowane są między innymi w przypadku zespołu TTD (ang. *Trichodystrophy*). Zespół ten spowodowany jest mutacją punktową w genie *XPD*, czego skutkiem jest występowanie zaburzeń naprawy uszkodzeń DNA. Oprócz występowania u myszy przedwczesnego starzenia, stwierdzono występowanie zwiększonej wrażliwości na promienie UV i działanie związków chemicznych, które prowadzą do rozwoju nowotworów. W modelu mysim zespołu Cockayne (*Csb^{m/m}*) stwierdzono, że nie występują wszystkie zmiany związane z wiekiem, występują u ludzi. Ponadto u myszy *Csb^{m/m}* obserwowana jest zwiększona podatność na rozwój nowotworów, co nie objawia się u ludzi dotkniętych tym zespołem. U myszy *Wrn^{-/-}* pojawiają się cechy związane ze starzeniem, które zauważalne są u osób dotkniętych zespołem Wernera. Jednakże, fenotyp komórek w obu przypadkach jest zbliżony na poziomie komórkowym [124,125].

PODSUMOWANIE

Uszkodzenia DNA są poważnym zagrożeniem dla prawidłowego funkcjonowania komórki, jak i całego organizmu. Szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR), jako system monitorujący integralność DNA, powinien natychmiast wykrywać uszkodzenia DNA i uruchamiać odpowiednie mechanizmy naprawy. W sytuacji, gdy nie jest to możliwe może prowadzić do śmierci lub starzenia komórki. Odpowiedź komórkowa aktywowana w wyniku występowania w komórce uszkodzeń nici DNA wymaga udziału wielu białek, które są elementami szlaku DDR. Kluczową rolę w tym szlaku pełni białko p53, którego obecność jest niezwykle istotna zarówno w starzeniu komórkowym, jak i w apoptozie. W przypadku starzenia komórkowego białko p53 prowadzi do aktywacji białka p21, które jest inhibitorem kinaz zależnych od cyklin. Konsekwencją tego jest zatrzymanie komórek w cyklu. W apoptozie białko p53 zaangażo-

Tabela 2. Przykładowe zespoły przyspieszonego starzenia wraz z genami, których mutacje prowadzą do ich powstania, oraz odpowiadające im modele mysie.

| Zespół przyspieszonego starzenia | Mutacja w genie | Model mysie |
|----------------------------------|-----------------|--|
| Zespół Cockayne (CS) | CSA, CSB | <i>Csa^{-/-} Csb^{m/m}</i> |
| Zespół Wernera (WS) | WRN | <i>Wrn^{-/-}</i> |
| Progeria Hutchinsona-Gilforda | LMNA | <i>Zmpste24^{-/-}</i> |
| Trichothiodystrofia | XPB, XPD | <i>Xpd^{td}</i> |
| Skóra pergaminowa (XPE) | XPE/ERCC1 | <i>Ercc1^{-/-}</i> |

wane jest w aktywację kaspaz, które zaś odpowiedzialne są za degradację wielu białek. Brak prawidłowej postaci białka p53, jak i również innych białek szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA prowadzi do powstania ciężkich chorób genetycznych. Charakteryzują się one zwiększoną wrażliwością na działanie czynników indukujących uszkodzenia DNA oraz niestabilnością genomową. Szczegółowe poznanie szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA jest niezbędne dla dobrego poznania procesów, w których uczestniczy.

PIŚMIENNICTWO

- Hoeijmakers JH (2009) DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 361: 1475-1485
- Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071-1078
- Ciccia A, Elledge SJ (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40: 179-204
- Sordet O, Nakamura AJ, Redon CE, Pommier Y (2010) DNA double-strand breaks and ATM activation by transcription-blocking DNA lesions. *Cell Cycle* 9: 274-278
- Korwek Z, Sewastianik T, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Alster O, Moreno-Villanueva M, Burkle A, Sikora E (2012) Inhibition of ATM blocks the etoposide-induced DNA damage response and apoptosis of resting human T cells. *DNA Repair (Amst)* 11: 864-873
- d'Adda di Fagagna F (2008) Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 8: 512-522
- Nagaraja P, Robert C, Rassool FV (2013) DNA double-strand break response in stem cells: mechanisms to maintain genomic integrity. *Biochim Biophys Acta* 1830: 2345-2353
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 231-241
- Abraham RT (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15: 2177-2196
- Zou L, Elledge SJ (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300: 1542-1548
- Ward IM, Chen J (2001) Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replication stress. *J Biol Chem* 276: 47759-47762
- Parrilla-Castellar ER, Arlander SJ, Karnitz L (2004) Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair (Amst)* 3: 1009-1014
- Kumagai A, Lee J, Yoo HY, Dunphy WG (2006) TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* 124: 943-955
- Shiloh Y (2006) The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* 31: 402-410
- Nam EA, Cortez D (2011) ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem J* 436: 527-536
- Roos WP, Kaina B (2012) DNA damage-induced apoptosis: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett* 332: 237-248

17. Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3: 155-168
18. Haince JF, McDonald D, Rodrigue A, Dery U, Masson JY, Hendzel MJ, Poirier GG (2008) PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J Biol Chem* 283: 1197-1208
19. Lee JH, Paull TT (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308: 551-554
20. Daniel JA, Pellegrini M, Lee JH, Paull TT, Feigenbaum L, Nussenzweig A (2008) Multiple autophosphorylation sites are dispensable for murine ATM activation *in vivo*. *J Cell Biol* 183: 777-783
21. Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD (2005) A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13182-13187
22. Ali A, Zhang J, Bao S, Liu I, Otterness D, Dean NM, Abraham RT, Wang XF (2004) Requirement of protein phosphatase 5 in DNA-damage-induced ATM activation. *Genes Dev* 18: 249-254
23. Goodarzi AA, Jonnalagadda JC, Douglas P, Young D, Ye R, Moorhead GB, Lees-Miller SP, Khanna KK (2004) Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *EMBO J* 23: 4451-4461
24. Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 5: 675-679
25. Xiao A, Li H, Shechter D, Ahn SH, Fabrizio LA, Erdjument-Bromage H, Ishibe-Murakami S, Wang B, Tempst P, Hofmann K, Patel DJ, Elledge SJ, Allis CD (2009) WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature* 457: 57-62
26. Harper JW, Elledge SJ (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28: 739-745
27. Lukas J, Lukas C, Bartek J (2011) More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol* 13: 1161-1169
28. Price BD, D'Andrea AD (2013) Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell* 152: 1344-1354
29. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y (2008) GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 957-967
30. Noon AT, Goodarzi AA (2011) 53BP1-mediated DNA double strand break repair: insert bad pun here. *DNA Repair (Amst)* 10: 1071-1076
31. Kruse JP, Gu W (2009) Modes of p53 regulation. *Cell* 137: 609-622
32. Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16
33. Qian Y, Chen X (2013) Senescence regulation by the p53 protein family. *Methods Mol Biol* 965: 37-61
34. Chakraborty A, Uechi T, Kenmochi N (2011) Guarding the 'translation apparatus': defective ribosome biogenesis and the p53 signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2: 507-522
35. Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y (2000) p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102: 849-862
36. Vousden KH, Lu X (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2: 594-604
37. Bode AM, Dong Z (2004) Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4: 793-805
38. Deng Q, Becker L, Ma X, Zhong X, Young K, Ramos K, Li Y (2014) The dichotomy of p53 regulation by noncoding RNAs. *J Mol Cell Biol, w druku*
39. Hasty P, Christy BA (2013) p53 as an intervention target for cancer and aging. *Pathobiol Aging Age Relat Dis, w druku*
40. Christmann M, Kaina B (2013) Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Res* 41: 8403-8420
41. Reinhardt HC, Schumacher B (2012) The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet* 28: 128-136
42. McKinnon PJ (2009) DNA repair deficiency and neurological disease. *Nat Rev Neurosci* 10: 100-112
43. Hakem R (2008) DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J* 27: 589-605
44. Pardo B, Gomez-Gonzalez B, Aguilera A (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* 66: 1039-1056
45. Czornak K, Chughtai S, Chrzanowska KH (2008) Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *J Appl Genet* 49: 383-396
46. San Filippo J, Sung P, Klein H (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* 77: 229-257
47. Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450: 509-514
48. Lieber MR (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* 283: 1-5
49. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257
50. Wong RS (2011) Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 30: 87
51. Xu G, Shi Y (2007) Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res* 17: 759-771
52. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN (2007) Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 7: 532-542
53. Ziegler U, Groscurth P (2004) Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 19: 124-128
54. Nagata S, Hanayama R, Kawane K (2010) Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 140: 619-630
55. Stennicke HR, Salvesen GS (2000) Caspases – controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* 1477: 299-306
56. Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316
57. Olsson M, Zhivotovsky B (2011) Caspases and cancer. *Cell Death Differ* 18: 1441-1449
58. Strasser A (2005) The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5: 189-200
59. Sankari SL, Masthan KM, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M (2012) Apoptosis in cancer-an update. *Asian Pac J Cancer Prev* 13: 4873-4878
60. Smith GC, d'Adda di Fagagna F, Lakin ND, Jackson SP (1999) Cleavage and inactivation of ATM during apoptosis. *Mol Cell Biol* 19: 6076-6084
61. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G (2007) Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 14: 1237-1243
62. Hu H, Gatti RA (2011) MicroRNAs: new players in the DNA damage response. *J Mol Cell Biol* 3: 151-158
63. Youle RJ, Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 47-59
64. Kelly PN, Strasser A (2011) The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ* 18: 1414-1424
65. Zuckerman V, Wolynec K, Sionov RV, Haupt S, Haupt Y (2009) Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol* 219: 3-15
66. Vaux DL (2011) Apoptogenic factors released from mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1813: 546-550
67. Krammer PH (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789-795

68. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388: 190-195
69. Kataoka T, Budd RC, Holler N, Thome M, Martinon F, Irmeler M, Burns K, Hahne M, Kennedy N, Kovacsovics M, Tschopp J (2000) The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol* 10: 640-648
70. Biton S, Ashkenazi A (2011) NEMO and RIP1 control cell fate in response to extensive DNA damage *via* TNF-alpha feedforward signaling. *Cell* 145: 92-103
71. Pick R, Badura S, Bossler S, Zornig M (2006) Upon intracellular processing, the C-terminal death domain-containing fragment of the p53-inducible PIDD/LRDD protein translocates to the nucleoli and interacts with nucleolin. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 1329-1338
72. Janssens S, Tinel A (2012) The PIDDosome, DNA-damage-induced apoptosis and beyond. *Cell Death Differ* 19: 13-20
73. Shi M, Vivian CJ, Lee KJ, Ge C, Morotomi-Yano K, Manzl C, Bock F, Sato S, Tomomori-Sato C, Zhu R, Haug JS, Swanson SK, Washburn MP, Chen DJ, Chen BP, Villunger A, Florens L, Du C (2009) DNA-PKcs-PIDDosome: a nuclear caspase-2-activating complex with role in G2/M checkpoint maintenance. *Cell* 136: 508-520
74. Janssens S, Tinel A, Lippens S, Tschopp J (2005) PIDD mediates NF-kappaB activation in response to DNA damage. *Cell* 123: 1079-1092
75. Olsson M, Vakifahmetoglu H, Abruzzo PM, Hogstrand K, Grandien A, Zhivotovsky B (2009) DISC-mediated activation of caspase-2 in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 28: 1949-1959
76. Kumar S (2009) Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more? *Nat Rev Cancer* 9: 897-903
77. Markaki M, Tavernarakis N (2013) Metabolic control by target of rapamycin and autophagy during ageing — a mini-review. *Gerontology* 59: 340-348
78. Narita M, Young AR, Narita M (2009) Autophagy facilitates oncogene-induced senescence. *Autophagy* 5: 1046-1047
79. Gewirtz DA (2013) Autophagy and senescence: a partnership in search of definition. *Autophagy* 9: 808-812
80. Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R (2011) Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 8: 528-539
81. Maiuri MC, Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Malik SA, Kroemer G (2010) Autophagy regulation by p53. *Curr Opin Cell Biol* 22: 181-185
82. Budanov AV, Karin M (2008) p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* 134: 451-460
83. Crichton D, Wilkinson S, Ryan KM (2007) DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death. *Autophagy* 3: 72-74
84. Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A, Panayiotidis MI, Franco R (2011) DNA damage and autophagy. *Mutat Res* 711: 158-166
85. Strozzyk E, Kulms D (2013) The role of AKT/mTOR pathway in stress response to UV-irradiation: implication in skin carcinogenesis by regulation of apoptosis, autophagy and senescence. *Int J Mol Sci* 14: 15260-15285
86. Liang C (2010) Negative regulation of autophagy. *Cell Death Differ* 17: 1807-1815
87. Collado M, Serrano M (2006) The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 6: 472-476
88. Campisi J, d'Adda di Fagagna F (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 729-740
89. Sikora E, Arendt T, Bennett M, Narita M (2011) Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev* 10: 146-152
90. Jeyapalan JC, Sedivy JM (2008) Cellular senescence and organismal aging. *Mech Ageing Dev* 129: 467-474
91. Ben-Porath I, Weinberg RA (2005) The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 961-976
92. Campisi J (2013) Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* 75: 685-705
93. Levine AJ, Oren M (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9: 749-758
94. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11: 973-979
95. Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, Miwa S, Olijslagers S, Hallinan J, Wipat A, Saretzki G, Rudolph KL, Kirkwood TB, von Zglinicki T (2010) Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol* 6: 347
96. Freund A, Patil CK, Campisi J (2011) p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* 30: 1536-1548
97. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 22: 4212-4222
98. Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621
99. Roninson IB (2003) Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* 63: 2705-2715
100. Bielak-Zmijewska A, Wnuk M, Przybylska D, Grabowska W, Lewinska A, Alster O, Korwek Z, Cmoch A, Myszk A, Pikula S, Mosieniak G, Sikora E (2014) A comparison of replicative senescence and doxorubicin-induced premature senescence of vascular smooth muscle cells isolated from human aorta. *Biogerontology* 15: 47-64
101. Sliwinska MA, Mosieniak G, Wolanin K, Babik A, Piwocka K, Magalska A, Szczepanowska J, Fronk J, Sikora E (2009) Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mech Ageing Dev* 130: 24-32
102. Sedelnikova OA, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, Barrett JC (2004) Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 6: 168-170
103. Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T (2009) DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Ageing Cell* 8: 311-323
104. Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM (2010) Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res* 704: 152-159
105. von Zglinicki T (2002) Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27: 339-344
106. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88: 593-602
107. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW (1998) Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 12: 3008-3019
108. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM (1998) Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* 12: 2997-3007
109. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peepers DS (2005) BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436: 720-724
110. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, Andersen CL, Dyrskjot L, Orntoft T, Lukas J, Kittas C, Helleday T, Halazonetis TD, Bartek J, Gorgoulis VG (2006) Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444: 633-637
111. Fumagalli M, Rossiello F, Clerici M, Barozzi S, Cittaro D, Kaplunov JM, Bucci G, Dobrev M, Matti V, Beausejour CM, Herbig U, Longhese MP, d'Adda di Fagagna F (2012) Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol* 14: 355-365
112. Nakamura AJ, Chiang YJ, Hathcock KS, Horikawa I, Sedelnikova OA, Hodes RJ, Bonner WM (2008) Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics Chromatin* 1: 6

113. Hewitt G, Jurk D, Marques FD, Correia-Melo C, Hardy T, Gackowska A, Anderson R, Taschuk M, Mann J, Passos JF (2012) Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat Commun* 3: 708
114. Suram A, Kaplunov J, Patel PL, Ruan H, Cerutti A, Boccardi V, Fumagalli M, Di Micco R, Mirani N, Gurung RL, Hande MP, d'Adda di Fagagna F, Herbig U (2012) Oncogene-induced telomere dysfunction enforces cellular senescence in human cancer precursor lesions. *EMBO J* 31: 2839-2851
115. Rossi ML, Ghosh AK, Bohr VA (2010) Roles of Werner syndrome protein in protection of genome integrity. *DNA Repair (Amst)*. 9: 331-344
116. Ding SL, Shen CY (2008) Model of human aging: recent findings on Werner's and Hutchinson-Gilford progeria syndromes. *Clin Interv Aging* 3: 431-444
117. Kudlow BA, Kennedy BK, Monnat RJ, Jr. (2007) Werner and Hutchinson-Gilford progeria syndromes: mechanistic basis of human progeroid diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 394-404
118. Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, Varga R, Collins FS (2004) Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8963-8968
119. Musich PR, Zou Y (2011) DNA-damage accumulation and replicative arrest in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Biochem Soc Trans* 39: 1764-1769
120. Bridger JM, Kill IR (2004) Aging of Hutchinson-Gilford progeria syndrome fibroblasts is characterised by hyperproliferation and increased apoptosis. *Exp Gerontol* 39: 717-724
121. Scaffidi P, Misteli T (2006) Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 312: 1059-1063
122. Scaffidi P, Misteli T (2005) Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* 11: 440-445
123. Schumacher B, Garinis GA, Hoeijmakers JH (2008) Age to survive: DNA damage and aging. *Trends Genet* 24: 77-85
124. Hasty P, Campisi J, Hoeijmakers J, van Steeg H, Vijg J (2003) Aging and genome maintenance: lessons from the mouse? *Science* 299: 1355-1359
125. Garinis GA, van der Horst GT, Vijg J, Hoeijmakers JH (2008) DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nat Cell Biol* 10: 1241-1247

The role of the DNA damage response in apoptosis and cell senescence

Zbigniew Korwek^{1,✉}, Olga Alster²

¹Laboratory of Modeling in Biology and Medicine, Institute of Fundamental Technological Research PAS, 5B Pawińskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

²Laboratory of Molecular Bases of Aging, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteura St., 02-093 Warsaw, Poland

✉e-mail: zkorwek@ippt.pan.pl

Key words: apoptosis, autophagy, DNA damage response, DNA repair, senescence

ABSTRACT

The genetic material is constantly subjected to DNA damage which is caused by physiological processes occurring in the cell and is exposed to exogenous DNA damaging agents. Eucariotic cells have developed a system called the DNA damage response (DDR), which is responsible for maintaining genomic integrity. DNA damage can lead to senescence, DNA repair as well as to cell death. The key protein in the DDR pathway is p53. This protein undergoes numerous posttranslational modifications and can be involved in the activation of many genes and proteins leading to survival or cell death. In cell senescence the p53 protein leads to the induction of p21, which causes cell cycle arrest. In apoptosis p53 participates in the activation of caspases, which are responsible for the degradation of many proteins.