

EWA RADZISZEWSKA

*Instytut Biologii Doświadczalnej im. M Nenckiego*

*Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia*

*Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

*e-mail: ewar@nencki.gov.pl*

## REGULACJA CYKLU KOMÓRKOWEGO A STARZENIE SIĘ I ŚMIERĆ KOMÓRKI

### WSTĘP

Proces starzenia się organizmu opisany jest przez bardzo wiele różnych teorii. Jednakże żadna z nich nie jest uniwersalna (JAŻWIŃSKI 1996). Wiąże się to z niezwykle złożonością procesu starzenia. Wraz z upływem czasu każdy organizm podlega nieodwracalnym zmianom prowadzącym do ograniczenia jego możliwości adaptacyjnych, coraz większej niewydolności i wreszcie śmierci. Na starzenie się organizmu ludzkiego ma bowiem wpływ funkcjonowanie układu nerwowego, endokrynnego i odpornościowego. Z drugiej strony uważa się, że organizm starzeje się, bo starzeją się jego komórki. Prawdopodobnie starzenie się komórek w organizmie polega na wyczerpaniu limitu ich podziałów.

Prawie czterdzieści lat temu Hayflick po raz pierwszy wykazał, że fibroblasty dzielą się w hodowli około 60 razy, po czym, mimo obecności w pożywce czynników wzrostowych i substancji odżywczych, wchodzą w bezpodziałową fazę wzrostu, czyli starzenie. Proces starzenia się komórek w hodowli nazwano starzeniem replikacyjnym. Nie wszystkie jednak komórki podlegają starzeniu replikacyjnemu. Komórki takie jak nerwowe i miokardialne nie dzielą się w hodowli w ogóle. Natomiast embrionalne komórki macierzyste, podobnie jak nowotworowe i unieśmiertelnione, dzielą się w hodowli w sposób nieograniczony i nie wykazują znamion procesu starzenia (SMITH i PEREIRA-SMITH 1996). Większość badaczy uważa, że starzenie replikacyjne komórek odzwierciedla proces zachodzący *in vivo*. Świadczy o tym fakt, że liczba podziałów jakim ulegają fibroblasty w hodowli jest odwrotnie proporcjonalna do wieku dawcy i wprost proporcjonalna do średniej długości życia osobników danego gatunku. Ponadto, fi-

broblasty ludzi z zespołami przyspieszonego starzenia (zespół Wernera, Downa), ulegają mniejszej liczbie podziałów w hodowli niż fibroblasty pobrane od ludzi zdrowych (FRANCESCHI i współaut. 1991). Nastomiast CAMPISI (1992) wykazała, że w starych komórkach, zarówno starzejących się *in vivo* jak i *in vitro*, pojawia się aktywność kwaśnej  $\beta$ -galaktozydazy, enzymu którego aktywności nie obserwuje się w młodych komórkach (DIMRI i współaut. 1995). Ostatnio jednak został podważony fakt występowania odwrotnej proporcjonalności pomiędzy liczbą podziałów, jakim ulegną komórki w hodowli, a wiekiem dawcy. Mianowicie, CRISTOFALO wykazał, że ilość podziałów fibroblastów w hodowli, zależy nie tyle od wieku metrykalnego dawcy, co od jego stanu zdrowotnego (CRISTOFALO i współaut. 1998). Również nasze własne badania wskazują, że fibroblasty osób stu- i więcej letnich dzielą się w hodowli średnio tyle samo, co fibroblasty ludzi młodych (FRANCESCHI i współaut. 1995, TESCO i współaut. 1998). Mimo istnienia tych kontrowersji, samo zjawisko starzenia replikacyjnego takich komórek, jak fibroblasty, komórki nabłonkowe i limfocyty jest niezwykle interesujące i warte szczególnych badań.

Liczba komórek w organizmie regulowana jest przez dwa procesy — proliferację i śmierć, jakiegokolwiek zachwianie równowagi pomiędzy tymi procesami powoduje patologiczne zmiany w organizmie. I tak na przykład przewaga podziałów nad śmiercią komórek związana jest z transformacją nowotworową. Natomiast nadumieralność komórek jest zjawiskiem występującym w chorobach neurodegeneracyjnych i AIDS. Podział komórki nazwany cyklem komórkowym podzielono na fazy G1 (ang. Gap1), S

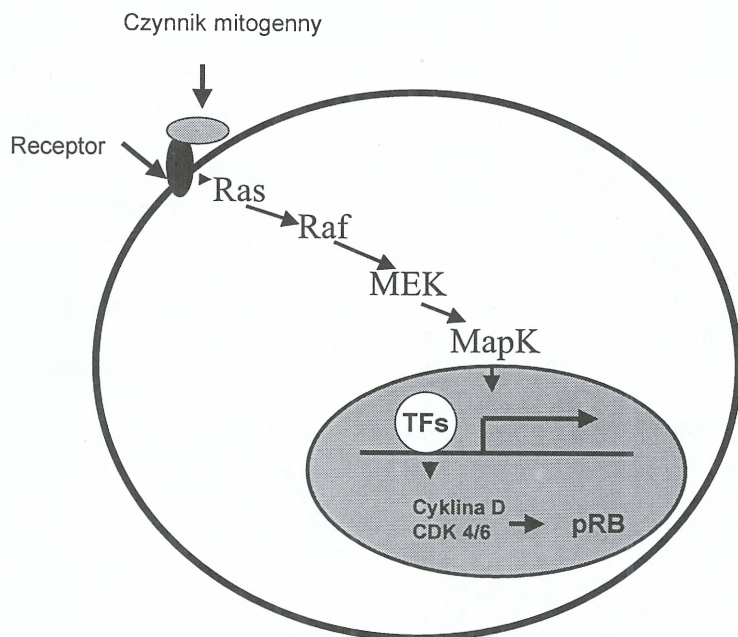
(syntezy), G2 i M (mitoza). System regulacji cyklu komórkowego opiera się przede wszystkim na aktywności białek z rodziny cyklinozależnych kinaz (CDKs — cycline dependent kinases) aktywowanych przez cykliny i hamo-

wanych przez inhibitory należące do rodziny INK4 oraz CIP/KIP. Ponadto w regulacji podziału komórek uczestniczą geny supresory nowotworów p53 i pRb.

### REGULACJA CYKLU PODZIAŁOWEGO KOMÓRKI

Aby komórka mogła prawidłowo powielić i podzielić swój materiał genetyczny na dwie identyczne i nieuszkodzone kopie, wszystkie opisane białka muszą ulec prawidłowej ekspresji i aktywacji w określonym czasie (SHERR 1996). Komórka wchodzi w cykl podziałowy po pobudzeniu jej czynnikiem mitogennym (Ryc. 1). Czynniki mitogenne, aktywują specyficzny receptor poprzez fosforylację reszt tyrozyn-

Rb, uwalniając go z nim w kompleksie czynnika transkrypcyjnego E2F, aktywującego geny niezbędne w fazie S, a wśród nich geny cyklin A i E. Cyklina E łączy się z kinazą CDK2 utrzymując białko Rb w stanie dalszej fosforylacji. Czynniki transkrypcyjne E2F stymulują również własną ekspresję, wytwarzając dodatnie sprzężenie zwrotne. W fazie S pojawia się cyklina B, która łączy się w kompleks z CDK1 na granicy



Ryc. 1. Schemat drogi przekazywania sygnału do proliferacji w komórce.

nowych w jego cząsteczce. To z kolei powoduje aktywację innych białek między innymi Ras i Raf, które również na skutek fosforylacji, w dalszej kolejności aktywują kaskadę kinaz MAP (ang. mitogen activated protein). MAP kinazy przemieszczając się do jądra komórkowego przenoszą sygnał prowadzący do ekspresji szeregu genów związanych z uruchomieniem cyklu komórkowego, w tym cykliny D1. Cyklina D1 tworzy aktywne kompleksy z kinazami CDK4 i CDK6, które fosforylują białko Rb. Fosforylacja tego białka jest kluczowa dla przejścia przez komórkę z fazy G1 do S. Ufosforylowane białko

faz G2-M. Aktywność tego kompleksu kontroluje przebieg replikacji DNA i rozpoczęcie mitozy, a także między innymi rozpad otoczki jądrowej. Rozpad otoczki jądrowej pozwala na rozdzielanie chromosomów i przejście do następnego etapu mitozy. Po zakończeniu mitozy, komórka ponownie wchodzi w fazę G1 i rozpoczyna się nowy cykl komórkowy lub też pod wpływem specyficznych sygnałów wchodzi w fazę różnicowania albo w przypadku braku sygnałów, w fazę spoczynku (G0) (JACKS i WEINBERG 1998).

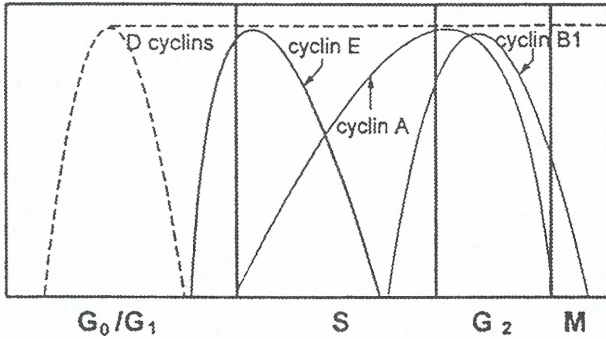
### KINAZY CYKLINOZALEŻNE I CYKLINY

Cyklinozależne kinazy (CDK) są enzymami regulującymi kolejne fazy cyklu, poprzez fosforylację różnych swoistych substratów. Znanych

jest kilka kinaz to jest CDK1, CDK2, CDK4 i CDK6. Ich aktywność regulowana jest poprzez białkowe aktywatory i inhibitory. Do białko-



wych aktywatorów kinaz należą cykliny. Do dzisiaj zidentyfikowano kilkanaście cyklin, które podzielono na grupy A, B, D, E. Ostatnio wykryto również cyklinę zaliczoną do grupy G. Poszczególne cykliny ulegają ekspresji przejściowo w kolejnych fazach cyklu komórkowego (Ryc. 2). Po pobudzeniu komórki czynnikami mitogennymi, w trakcie przejścia komórki z fazy G0 do G1 pojawiają się cykliny typu D (D1, D2,



Ryc. 2. Kolejność pojawiania się cyklin w cyklu komórkowym.

D3). Cyklina D1 tworzy aktywny kompleks z kinazami CDK4 lub CDK6, dalej opisywany jako kompleks CyklinaD/CDK4/6. Tak zaktivowane kinazy fosforylują białko Rb, co pozwala komórce wejść w kolejną fazę cyklu — fazę S.

Pozostałe cykliny z grupy D są słabiej poznane. Jednakże ich oddziaływanie z kinazami CDK4 i CDK2 świadczy o tym że podobnie jak cyklina D1 uczestniczą w regulacji cyklu komórkowego.

Na granicy faz G1/S cyklu komórkowego pojawia się kolejna cyklina — E, której ekspresja jest już niezależna od obecności sygnału mitogennego (SHERR 1996). Łączy się ona ze kinazą CDK2 powodując dalszą fosforylację białka Rb.

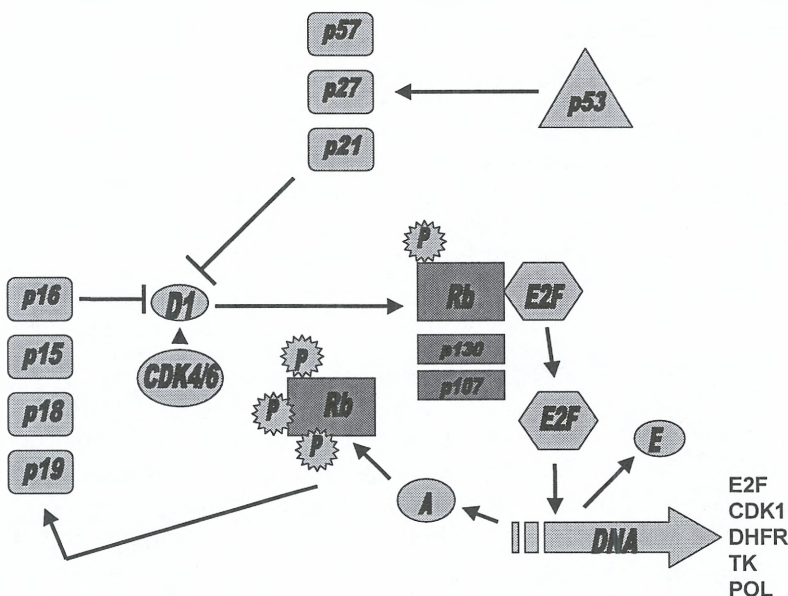
Cykliny A i B pozostając w kompleksach z kinazami podtrzymują białko Rb w stanie ufosforylowania, umożliwiając kontynuację cyklu komórkowego i zakończenie mitozy. Zahamowanie syntezy cykliny A w późnej fazie G1 zatrzymuje cykl komórkowy i uniemożliwia wejście w fazę S, albowiem wiele komórek wymaga do swego wzrostu nie tylko fosforylacji Rb, ale również tak zwanych sygnałów adhezyjnych. Wiadomo, że ekspresja genu cykliny A jest zależna od tych sygnałów. Ponadto substratami dla kompleksów cykliny E/CDK2 i cykliny A/CDK2 są między innymi tak zwane białka inicjatorowe, które wiążą się ze specyficznymi sekwencjami w widełkach replikacyjnych i wspomagają proces replikacji DNA. Zahamowanie ekspresji cykliny A powoduje rozpad kompleksu białek inicjatorowych i zatrzymanie syntezy DNA.

#### INHIBITORY KINAZ ZALEŻNYCH OD CYKLIN

Cyklinozależne kinazy są negatywnie regulowane przez białka należące do dwóch rodzin INK4 i CIP/KIP (JACKS i WEINBERG 1998).

Do rodziny inhibitorów INK4 należą białka p15, p16, p18 i p19 (Ryc. 3). Białka z tej rodziny,

mają zdolność wiązania się do kinaz CDK4 i CDK6 i hamowania aktywności kompleksu CyklinaD/CDK4/6 (ROBLES i ADAMI 1998, SERRANO 1997). Wszystkie białka z rodziny INK4 charakteryzują się obecnością czterech lub pięciu



Ryc. 3. Uproszczony schemat regulacji fosforylacji białka pRb, w cyklu komórkowym.

powtórzeń ankrynowych. Powtórzenia te obecne są w strukturze wielu białek i generalnie odpowiadają za oddziaływanie białko-białko. W przypadku białek z rodziny INK4, powtórzenia te umożliwiają wiązanie się z kinazami CDK4 i hamowanie ich aktywności. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że miejsce wiązania na przykład białka p16 z CDK4 jest różne od miejsca wiązania cykliny D, a więc możliwe jest powstanie kompleksu trzyskładnikowego. Jednak mutacje CDK4 w miejscu wiązania p16, wykazały również istotną redukcję wiązania cykliny D do kinazy, co sugeruje, że mimo różnych miejsc wiązania cykliny D i p16 do CDK4 istotne są ich wzajemne oddziaływania konformacyjne. Białko p16 może prawdopodobnie hamować aktywność CDK4 przez taką zmianę konformacji kinazy, która uniemożliwia związanie cykliny D. Poza tym, podwyższoną ekspresję białka p16 obserwuje się w trakcie starzenia replikacyjnego (komórkowego) oraz w odpowiedzi na pewne sygnały onkogenne, natomiast białko p15 jest produkowane głównie w odpowiedzi na czynnik wzrostu nowotworu TGF $\beta$  (SHAPIRO i współaut. 1998). Natomiast ekspresja p18 i p19 jest regulowana w trakcie cyklu komórkowego z maksimum w fazie S. Ciekawą cechą rodziny białek inhibitorowych INK4 jest występowanie dwóch nakładających się genów w tym samym locus. W promotorze genu *INK4a* znajdują się dwie różne, otwarte ramki odczytu, które pozwalają na rozpoczęcie transkrypcji z dwóch niezależnych miejsc (CHIN i współaut. 1998). Mechanizm ten pozwala na zakodowanie w jednym genie dwóch kompletnie różnych produktów białkowych, jak ma to miejsce w przypadku białek p16 i p19. W skład drugiej rodziny inhibitorów cyklinozależnych kinaz CIP/KIP wchodzi białka p21, p27 i p57. W przeciwieństwie do inhibitorów z rodziny INK4, białka z tej rodziny mają zdolność hamowania aktywności nie tylko kinaz CDK4 i CDK6, ale również kinazy CDK2. W komórkach spoczynkowych poziom białka p27 jest bardzo wysoki i gwałtownie obniża się po wejściu komórki w cykl podziałowy. Kontrola ilości tego białka w komórce zachodzi na poziomie translacji, jak i obróbki potranslacyjnej. Poza tym, białko p27 może być

inaktywowane przez fosforylację katalizowaną przez aktywny kompleks cykliny E/ CDK2. Wpływ białka p27 na funkcjonowanie komórek został dobrze udokumentowany w opisanych poniżej doświadczeniach. Pozbawienie fibroblastów w hodowli źródła czynników wzrostowych jakim jest surowica, spowodowało nie tylko gwałtowny wzrost ekspresji białka p27, ale również degradację cykliny D. Utrata aktywności kinazy CDK4 połączona ze wzrostem p27 spowodowała zatrzymanie cyklu komórkowego. Z kolei myszy pozbawione genu p27 znacznie szybciej rosły wykazując często przerost organów wewnętrznych, które zawierały zwiększoną ilość mniejszych komórek w tkance. Tego typu fenotyp wskazuje, że białko to kontroluje nie tylko liczbę, ale też wielkość komórek. Białko p21 jest szczególnie ważnym inhibitorem cyklu komórkowego, ponieważ jego ekspresja jest regulowana między innymi przez białko p53. Do indukcji ekspresji białka p53 dochodzi w odpowiedzi na różne czynniki wywołujące stres komórkowy, a zwłaszcza na czynniki uszkadzające DNA. Tak więc, jeżeli w komórkach proliferujących dojdzie do jakichkolwiek uszkodzeń DNA, natychmiast pojawia się podwyższona ekspresja białka p53 i zatrzymanie podziałów komórkowych do czasu naprawy uszkodzeń. Białko p21 zawiera domenę umożliwiającą związanie czynnika transkrypcyjnego PCNA (ang. proliferating cell nuclear activator) co powoduje zahamowanie syntezy DNA w celu umożliwienia naprawy uszkodzonego miejsca. Ponadto p21 może brać udział w samej reperacji uszkodzeń i w regulacji metylacji DNA. Eksperymentalnie wykazano również możliwość zablokowania fenotypu nowotworowego przez wprowadzenie białka p21 do komórek rakowych, co spowodowało zatrzymanie ich proliferacji i końcowe różnicowanie tychże. Podobnie zainaktywowanie genu *p21* w fibroblastach ludzkich hodowanych *in vitro*, nie pozwalało tym komórkom wejść w fazę starzenia, co jasno wskazuje na kluczową rolę tego białka nie tylko w końcowym różnicowaniu, ale również w starzeniu komórkowym (BARLEY i współaut. 1998, BROWN i współaut. 1997).

#### BIĄŁKA PUNKTU RESTRYKCYJNEGO FAZY G1/S

W fazie G1 cyklu komórkowego miejsce, w którym następuje podjęcie przez komórkę decyzji o wejściu w dalszy etap cyklu, nazwano punktem restrykcyjnym. W punkcie restrykcyjnym decydującą rolę odgrywają białka genów supresorów nowotworów, takie jak p53 i Rb.

Zaobserwowano, że geny kodujące białka Rb i p53, podobnie zresztą, jak geny kodujące białko p16 i cyklinę D1, ulegają mutacjom, w tym delecjom w około 80% typów nowotworów występujących u ludzi. Wskazuje to, jak ważne są wszystkie te białka dla prawidłowego przebiegu



cyklu komórkowego. W komórkach znajdujących się w fazie G0 bądź wczesnej fazie G1, białko Rb jest nieufosforylowane, bądź słabo ufosforylowane (JUAN i współaut. 1998). Przejście komórek do dalszych etapów cyklu wymaga ufosforylowanego białka Rb, które uwalnia z kompleksu czynnik transkrypcyjny E2F niezbędny do aktywacji genów których produkty białkowe są potrzebne do syntezy DNA. Ufosforylowane białko Rb indukuje również ekspresję genu białka p16, które hamując aktywność kinaz CDK4/6 prowadzi do zahamowania fosforylacji Rb, gdy przestaje już być potrzebna (BARTEK i współaut. 1997). W komórkach, które zakończyły podział następuje defosforylacja Rb przez fosfatazę PP1 (ang. protein-serin/threonine phosphatase type 1). W komórkach, które są pozbawione funkcjonalnego białka Rb, aktywność kinaz zależnych od cyklin D nie ma żadnego znaczenia dla pokonania przez komórkę punktu restrykcyjnego. Dlatego, jak już wspomniano powyżej, w wielu komórkach nowotworowych dochodzi do takich mutacji, które w efekcie prowadzą nie tylko do bezpośredniego unieczynnienia białka Rb, ale także pośrednio przez na przykład nadekspresję cykliny D, amplifikację genu CDK4, czy delecję genu *p16* lub delecję samego białka Rb. Białko Rb pełni istotną rolę nie tylko jako regulator cyklu, ale również odgrywa zasadniczą rolę w procesach różnicowania. I tak, na przykład u myszy pozbawionych genu białka Rb, dochodzi do poważnych zaburzeń w rozwoju układu nerwowego i upośledzonej erytropoezy, co stanowi przyczynę obumierania zarodków tych zwierząt w 15 dniu rozwoju embrionalnego. Prawdopodobnie tylko na wczesnym etapie rozwoju embrionalnego, inne białka z rodziny Rb, takie jak p107 i p130, są w stanie rekompensować brak białka Rb. Zresztą myszy pozbawione białek p107 i p130, z zachowanym białkiem Rb, umierają tuż po urodzeniu z powodu poważnych defektów w rozwoju chrząstek i kości. Obydwa te przykłady jednoznacznie wskazują na zasadniczą rolę białek z rodziny Rb w różnicowaniu tkanek i narządów (YEE i współaut. 1998). Drugim białkiem, odgrywającym istotną rolę w kontroli przejścia G1/S cyklu komórkowego, jest białko p53. Gen kodujący to białko jest genem ulegającym mutacjom w 50% nowotworów ludzkich. I chociaż całkowita delecja tego genu nie wpływa na rozwój zarodkowy myszy, to częstość z jaką te zwierzęta zapadają na nowotwory wskazuje na kluczową rolę tego białka w kontroli normalnego wzrostu komórek i ich przeżywania. Podobnie u ludzi z synromem Li-Fraumeni,

obserwuje się wielokrotnie wzmożoną zapadalność na różne rodzaje nowotworów już w bardzo młodym wieku, na skutek wielomiejscowych mutacji w obrębie genu białka p53 (BARLEY i współaut. 1998).

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który wiąże się do swoistych sekwencji w promotorach wielu genów związanych z cyklem komórkowym, wpływając na ich aktywację. Są to między innymi takie geny jak: *p21*, *GADD45*, *IGF-BP-3*, *Bax*, *Fas* oraz różne bliżej niezidentyfikowane geny związane z komórkowymi procesami oksydacyjnymi.

Białko p53 posiada szereg domen, z których każda odpowiada za jedną lub więcej funkcji. Domena N-końcowa oddziałuje z podstawowymi czynnikami transkrypcyjnymi TFIID i TFIIF i działa jako aktywator transkrypcji (DYNLACHT 1997). Domena ta wiąże również białko MDM2, które jest produktem jednego z genów transaktywowanych przez p53 i będące negatywnym regulatorem p53 (POMERANTZ i współaut. 1998, ZHANG i współaut. 1998). Domena środkowa odpowiada za specyficzne wiązanie się do DNA. Pomiedzy tymi dwoma domenami znajduje się region bogaty w prolinę, którego funkcja wiąże się z realizacją programowanej śmierci komórki zależnej od p53. Na C-końcu jest domena odpowiadająca za niespecyficzne wiązanie się do DNA i dobudowywanie komplementarnej pojedynczej nici DNA. Na samym końcu zaś znajduje się region niezbędny do oligomeryzacji białka p53 (WIMAN 1997). W większości komórek w normalnych warunkach ekspresja p53 jest na niskim poziomie. Jeżeli w komórkach proliferujących dojdzie do jakichkolwiek uszkodzeń DNA, natychmiast pojawia się podwyższona ekspresja tego białka i zatrzymanie podziału komórkowego do czasu naprawy uszkodzeń (BUTZ i współaut. 1998). Ekspresja białka p53 wpływa na aktywację transkrypcji genów, które zapobiegają wejściu przez komórkę w fazę S. Między innymi są to wspomniane wcześniej białka p21 i GADD45. Białko GADD45 wiąże się z czynnikiem transkrypcyjnym PCNA, niezbędnym do replikacji DNA. Poziom ekspresji p53 jest proporcjonalny do wielkości uszkodzeń DNA i decyduje o tym czy komórka podejmie naprawę uszkodzonego DNA, czy też uruchomi program apoptozy. Jeżeli uszkodzenia są zbyt rozległe, poziom ekspresji białka p53 jest bardzo wysoki, komórka włącza program śmierci. Natomiast niski, bądź podprogowy poziom białka p53 powoduje wzrost ekspresji białka p21 i zahamowanie cyklu komórkowego.

## BIAŁKA CYKLU KOMÓRKOWEGO A APOPTOZA

Apoptoza, podobnie jak proliferacja i różnicowanie, odgrywa istotną rolę w procesach fizjologicznych, zachodzących w żywym organizmie. Poprzez apoptozę usuwane są z organizmu komórki niepotrzebne, to znaczy takie, które spełniły już swoją rolę na pewnym etapie rozwoju lub też wypełniły swoją funkcję. Apoptoza jest procesem genetycznie kontrolowanym, charakteryzującym się szeregiem zmian biochemicznych i morfologicznych. Opisano to szczegółowo w piśmiennictwie polskim, w pracach przeglądowych (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1998; SIKORA 1994, 1996).

Ostatnie lata przyniosły również wiele dowodów na to że te same sygnały, które zaangażowane są w regulację proliferacji i kontrolę cyklu biorą również udział w apoptozie.

W trakcie apoptozy dochodzi do aktywacji szeregu specyficznych, cysteinowych proteaz — kaspaz. Uruchomienie kaskady kaspaz prowadzi do degradacji wielu istotnych białek komórkowych, a pośrednio również do fragmentacji DNA. Wykazano, że w trakcie apoptozy ludzkich komórek białaczkowych, wywołanej lekami przeciwnowotworowymi, dochodzi do defosforylacji białka Rb, a następnie do jego proteolizy przez kaspazę 3 (DOU i AN 1998). Co więcej, zablokowanie możliwości cięcia białka Rb przez kaspazę 3 w komórkach nowotworowych, może być jedną z przyczyn oporności lekowej tych komórek. W eksperymentach, w których komórki rakowe pozbawione białka Rb, transfekowano formą nieufosforylowaną tego białka, a następnie traktowano INF- $\gamma$ , nie obserwowano fragmentacji DNA charakterystycznej dla apo-

ptozy. Potwierdza to hipotezę o inhibitorowym działaniu nieufosforylowanego białka Rb na proces apoptozy (TAN i WANG 1998).

Innym białkiem odgrywającym istotną rolę w apoptozie jest p53. Jak zostało to już wspomniane, poziom ekspresji tego białka jest decydujący dla uruchomienia programu śmierci, a to z kolei zależy zarówno od czynnika indukującego śmierć, jak i od rodzaju komórki. Jednak mechanizm molekularny z udziałem p53 w szlaku sygnałowym prowadzącym do apoptozy jest słabo poznany. Wiadomo, że p53 prowadzi do transaktywacji proapoptotycznego białka Bax, które tworzy heterodimery z antyapoptotycznym białkiem Bcl-2 i w ten sposób może prowadzić do apoptozy. Jednakże, jak wykazano na tymocytach pozbawionych białka Bax, nie jest on konieczny do zajścia apoptozy indukowanej przez p53. Białko p53 może wpływać także na indukcję receptora Fas (receptor z rodziny TNF, którego aktywacja uruchamia program śmierci) oraz transaktywować całą serię genów związanych z kontrolą stanu red-ox komórki i tym samym wpływać na aktywację apoptozy (SUZUKI i współaut. 1998). Jak już wspomniano, bardzo istotny jest region prolinowy występujący w białku p53, gdyż jego delecja całkowicie znosi apoptozę zależną od p53, ale zachowana jest możliwość zablokowania komórek w cyklu. Co więcej, transaktywacja innych genów regulowanych przez p53, w tym genu dla Bax, nie jest zniesiona po delecji tego regionu. Stanowi to kolejny dowód na to, że Bax nie jest wystarczający do indukcji apoptozy przez p53.

## CYKL PODZIAŁOWY A STARZENIE SIĘ KOMÓRKI

Ludzkie fibroblasty ulegające starzeniu replikacyjnemu przestają się dzielić i zatrzymują się w fazie G1, pomimo obecności czynników wzrostowych. W fazie bezpodziałowej mogą przeżyć w hodowli jeszcze około roku. Usunięcie na okres dwóch tygodni z pożywki hodowlanej surowicy, jako źródła czynników wzrostowych, nie powodowało śmierci programowanej tych komórek. Tak więc, nie można powiedzieć, że starzenie się fibroblastów związane z zatrzymaniem ich w fazie G1, równoznaczne jest z umieraniem ich przez apoptozę. Bowiem starzenie się komórek nie jest, jak niesłusznie się często uważa, tożsame ze śmiercią programowaną. Problem mechanizmu śmierci starych komórek, w tym podatności ich na śmierć indukowa-

na kontrolowanymi czynnikami zewnętrznymi, pozostaje ciągle otwarty.

Podziały starych fibroblastów są zatrzymane, gdyż jak wykazano białko Rb w tych komórkach jest w formie nieufosforylowanej. W związku z tym pozostaje w kompleksie E2F, uniemożliwiając temu ostatniemu transaktywację genów niezbędnych w kolejnej fazie cyklu komórkowego. Za brak fosforylacji białka Rb odpowiedzialny jest wielokrotny wzrost poziomu inhibitorów cyklinozależnych kinaz, to jest białek p16, p21. Natomiast brak w komórce aktywności białka p16, spowodowany mutacjami w tym delecją, stanowi przyczynę niekontrolowanego podziału wielu komórek nowotworowych (KATO i współaut. 1998, SERRANO i współaut. 1997).



Zwierzęta całkowicie pozbawione genu p16, już w bardzo młodym wieku, spontanicznie rozwijają wiele typów nowotworów. Natomiast komórki nowotworowe, które utraciły funkcjonalne białko Rb, nawet przy podwyższonym poziomie białka p16, nie wchodzi w stan starzenia replikacyjnego (HARA i współaut. 1996). Dzieje się tak, ponieważ: 1) szlak od p16 do pRb zachowuje się jak pojedynczy cel mutagenezy i wzajemnie się wyklucza (SERRANO 1997), 2) białka pRb i p16 wzajemnie wpływają na regulację swojej transkrypcji (FANG i współaut. 1998, PALMERO i współaut. 1997). W doświadczeniach, w których do komórek ludzkiego glejaka ze zmutowanym genem białka p16 (i funkcjonalnym białkiem Rb) wprowadzono prawidłową formę p16, zaobserwowano zatrzymanie podziałów i starzenie tych komórek (UHRBOM i współaut. 1997). W prawidłowych komórkach poziom p16 wzrasta systematycznie wraz z każdym kolejnym podziałem, aż do momentu wyczerpania limitu podziałów. W starych, niedzieliących się komórkach obserwowany jest nawet 40 razy wyższy poziom tego białka (ALCORTA i współaut. 1996). W związku z tym, uważa się, że wzrost poziomu białka p16 jest częścią programu, który „włącza” się w starych komórkach, po poprzedzającym go czasowo wzroście poziomu białka p21 i jest niezbędny do permanentnego zatrzymania podziałów (STEIN i współaut. 1999). Natomiast w eksperymentach, w których próbowano odwrócić fenotyp starych komórek i przywrócić im możliwość podziałów, konieczne jest przywrócenie funkcji zarówno białka Rb, jak i p53. Na przykład podanie przeciwciał skierowanych przeciwko domenie N-końcowej p53 umożliwia reinicjację syntezy DNA w ludzkich fibroblastach (GIRE i WYNFORD-THOMAS 1998).

W starych komórkach dochodzi również do zmian aktywności czynników transkrypcyjnych takich jak na przykład: AP-1, CRE, NF-B, czy NF-AT. Szczególnie interesującym czynnikiem transkrypcyjnym indukowanym zarówno w komórkach dzielących się, jak i umierających przez apoptozę jest AP-1. AP-1 jest dimerem składającym się z produktów białkowych protoonkogenów *c-jun* i *c-fos*. Protoonkogeny te należą do rodziny genów tak zwanej szybkiej odpowiedzi komórkowej. Ich natychmiastową ekspresję obserwuje się między innymi w komórkach stymulowanych do proliferacji różnymi czynnikami wzrostowymi, jak również wirusami onkogennymi. Rodzina białek mogących wchodzić w skład czynnika transkrypcyjnego AP-1 jest bardzo liczna, ale tylko białka c-Jun mogą tworzyć homodimer budujący czynnik transkrypcyjny AP-1. Istnieje wiele danych wy-

kazujących albo obniżoną aktywność AP-1 lub jej całkowity brak, jak również preferencyjne tworzenie się homodimeru Jun-Jun w komórkach starzejących się *in vitro*, jak też *in vivo* (CAMPISI 1992, CHOI i współaut. 1995, DIMRI i CAMPISI 1994). Badania innych czynników transkrypcyjnych również wskazują na obniżoną aktywność ich wiązania w komórkach pochodzących ze starych organizmów, jak i strzejących się *in vitro* w hodowli.

Za zatrzymanie starych komórek w fazie G1 i wyczerpanie limitu podziałów, odpowiadają nie tylko białka regulujące przebieg cyklu komórkowego, ale również skracanie telomerów. Każdemu podziałowi komórki towarzyszy utrata niewielkiego fragmentu końca chromosomu — telomeru. Zaobserwowano, że długość telomerów jest odwrotnie proporcjonalna do ilości przebytych podziałów. Związane jest to z brakiem aktywności enzymu, telomerazy, odpowiedzialnego za replikację telomerów z matrycowego RNA. Enzym ten jest nieaktywny w większości prawidłowych komórek somatycznych (ale nie rozrodczych i nowotworowych). Wyjątkowe pod tym względem okazały się limfocyty ludzkie, w których telomeraza jest aktywna nawet w komórkach spoczynkowych, a jej aktywność gwałtownie rośnie po stymulacji mitogenami. Ponieważ jednak wzrost aktywności tego enzymu w limfocytach jest przejściowy, nie zapobiega to skracaniu telomerów i limfocyty podobnie jak inne komórki somatyczne ulegają w hodowli starzeniu replikacyjnemu. Znane są różne hipotezy wyjaśniające jak skracanie telomerów może włączyć program starzenia i zatrzymać podziały komórkowe. Jedna z nich mówi między innymi o tym, że skracanie telomerów może zostać odczytane przez komórkę jako nienaprawialne uszkodzenie DNA indukujące ekspresję genów *p53* i *p21*. Wzrost poziomu obydwu tych białek również odpowiada za nieodwracalne zatrzymanie komórki w fazie G1 (SUGRUE i współaut. 1997, XU i współaut. 1997). Więcej informacji na ten temat znajdzie czytelnik w artykule autorstwa E. JARUGI w tym numerze KOSMOSU.

Dotychczas najpowszechniej stosowany model starzenia replikacyjnego stanowiły ludzkie i mysie fibroblasty. Obecnie pojawiły się również prace, w których bada się starzenie *in vitro* ludzkich limfocytów interleukino-2-zależnych. Komórki te, podobnie jak fibroblasty, ulegają określonej liczbie podziałów, a następnie wchodzi w bezpodziałową fazę starzenia. W zależności od sposobu prowadzenia hodowli liczba podziałów waha się średnio od 20 do 40, ale też obserwowano klony limfocytów, które ulegały więcej niż 60 podziałom. Pomimo tych

znaczących różnic, wszystkie klony limfocytów po pewnym czasie zaprzestawały podziałów, pomimo obecności w pożywce czynnika wzrostowego, jakim dla limfocytów jest interleukina-2, czy też dodatkowej restymulacji poprzez TCR (ang. T-cell receptor). Stare limfocyty, podobnie jak fibroblasty, zatrzymane są w fazie G1 cyklu komórkowego. Wykazują obecność, nieufosforylowanego białka Rb, wysoki poziom białek inhibitorów kinaz cyklinozależnych, takich jak p15, p16 i p21, aktywność kwaśnej  $\beta$ -galaktozydazy, a także skrócone telomery (ERICKSON i współaut. 1998). Badania prowadzone na limfocytach są istotne nie tylko dlatego, że stanowią inny model badawczy niż fibroblasty, ale również ze względu na fizjologię tych komórek. Limfocyty T, jedne z głównych komórek układu odpornościowego odpowiadające na antygeny będące zagrożeniem dla całego organizmu, aby móc efektywnie je niszczyć muszą zachować

swój potencjał proliferacyjny i funkcję efektorową przez całe życie osobnicze. Ponadto wszystkie zmiany, jakie zachodzą w komórkach wraz z ich starzeniem replikacyjnym mają niezwykle istotne znaczenie dla terapii antynowotworowej (BRENNER i współaut. 1998). U ludzi w podeszłym wieku funkcje układu odpornościowego są zmienione. Dotyczy to zarówno zmian w obrębie poszczególnych populacji limfocytów, jak na przykład wzrost liczby komórek pamięci i zmniejszenie się puli komórek naiwnych, jak też defektów w przesyłaniu sygnału do wnętrza komórki. Generalnie, obserwuje się obniżenie zdolności proliferacyjnej limfocytów mierzonej w testach *in vitro*, jak i *in vivo*. Spada także produkcja kluczowej dla tych komórek cytokiny, interleukiny-2. Wszystkie te zmiany związane ze starzeniem, zarówno na poziomie organizmu, jak i komórkowym, prowadzą do upośledzenia funkcji układu odpornościowego.

## REGULATION OF THE CELL CYCLE, AGEING AND CELL DEATH

### Summary

The number of cells in a multicellular organism is regulated by two processes — proliferation and cell death. Any dysregulation of this balance leads to pathological changes such as cancer or tissue atrophy. Control of cell cycle progression is based on cyclin dependent kinases (CDKs) which are positively regulated by cyclins and negatively by protein inhibitors belonging to INK4 and Cip/Kip

families. Moreover, tumor suppressor proteins pRb and p53 are also involved in this control system. Senescent cells are blocked in the G1 phase of the cell cycle and are not able to enter the S phase, therefore it is not surprising that the proteins involved in control of the cell cycle undergo functional changes. The role of cell cycle regulation in senescence and cell death is discussed.

### LITERATURA

- ALCORTA D. A., XIONG Y., PHELPS D., HANNON G., BEACH D., BARRETT J. C., 1996. *Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 INK4a in replicative senescence of normal human fibroblasts*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 13742–13747.
- BARLEY R. D., ENNS L., PATERSON M. C., MIRZAYANS R., 1998. *Aberrant p21WAF1 dependent growth arrest as the possible mechanism of abnormal resistance to ultraviolet light cytotoxicity in Li-fraumeni syndrome fibroblast strains heterozygous for TP53 mutations*. Oncogene 17, 533–543.
- BARTEK J., BARTKOVA J., LUKAS J., 1997. *The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer*. Exp. Cell. Res. 237, 1–6.
- BRENNER A. J., STAMPFER M. R., ALDAZ C. M., 1998. *Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation*. Oncogene 17, 199–205.
- BROWN J. P., WEI W. i SEDIVY J. M., 1997. *Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts*. Science 277, 831–834.
- BUTZ K., GEISEN C., ULLMANN A., ZENTGRAF H., HOPPE-SEYLER F., 1998. *Uncoupling of p21WAF1/CIP1/SDI1 mRNA and protein expression upon genotoxic stress*. Oncogene 17, 781–787.
- CAMPISI J., 1992. *Gene expression in quiescent and senescent fibroblasts*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 663, 195–201.
- CHIN L., POMERANTZ J., DEPINHO R. A., 1998. *The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene — two products — two pathways*. Trends. Biochem. Sci. 23, 291–296.
- CHOI A. M., PIGNOLO R. J., RHYS C. M., CRISTOFALO V. J., HOLBROOK N. J., 1995. *Alterations in the molecular response to DNA damage during cellular aging of cultured fibroblasts: reduced AP-1 activation and collagenase gene expression*. J. Cell. Physiol. 164, 65–73.
- CRISTOFALO V. J., ALLEN R. G., PIGNOLO R. J., MARTIN B. G., BECK J. C., 1998. *Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 10614–10619.
- DIMRI G. P., CAMPISI J., 1994. *Altered profile of transcription factor-binding activities in senescent human fibroblasts*. Exp. Cell. Res. 212, 132–140.
- DIMRI G. P., LEE X., BASILE G., ACOSTA M., SCOTT G., ROSKELLEY C., MEDRANO E. E., LINSKENS M., RUBEL J., PEREIRA-SMITH O., współaut. 1995. *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 9363–9367.
- DOU Q. P., AN B. 1998. *RB and apoptotic cell death*. Front. Biosci. 3, d419–d430.
- DYNLACHT B. D., 1997. *Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle*. Nature 389, 149–152.
- ERICKSON S., SANGFELT O., HEYMAN M., CASTRO J., EINHORN S., GRANDER D., 1998. *Involvement of the Ink4 proteins p16 and p15 in T-lymphocyte senescence*. Oncogene 17, 595–602.
- FANG X., JIN X., XU H. J., LIU L., PENG H. Q., HOGG D., ROTH J. A., YU Y., XU F., BAST R. C., JR., MILLS G. B., 1998. *Expression of p16 induces transcriptional downregulation of the RB gene*. Oncogene 16, 1–8.



- FRANCESCHI C., MONTI D., COSSARIZZA A., FAGNONI F., PASSERI G., SANSONI P., 1991. Aging, longevity, and cancer: studies in Down's syndrome and centenarians. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 621, 428–440.
- FRANCESCHI C., MONTI D., SANSONI P., COSSARIZZA A., 1995. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians [see comments]. *Immunol Today* 16, 12–16.
- GIRE V., WYNFORD-THOMAS D., 1998. Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1611–1621.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1998. Molecular mechanisms of apoptosis induced by activation of membrane receptors from the TNF-R superfamily. *Postępy Biochem.* 44, 8–21.
- HARA E., SMITH R., PARRY D., TAHARA H., STONE S., PETERS G., 1996. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol. Cell. Biol.* 16, 859–867.
- JACKS T., WEINBERG R. A., 1998. The expanding role of cell cycle regulators [comment]. *Science* 280, 1035–1036.
- JAŻWINSKI S. M., 1996. Longevity, genes, and aging. *Science* 273, 54–59.
- JUAN G., GRUENWALD S., DARZYŃKIEWICZ Z., 1998. Phosphorylation of retinoblastoma susceptibility gene protein assayed in individual lymphocytes during their mitogenic stimulation. *Exp. Cell. Res.* 239, 104–110.
- KATO D., MIYAZAWA K., RUAS M., STARBORG M., WADA I., OKA T., SAKAI T., PETERS G., HARA E., 1998. Features of replicative senescence induced by direct addition of antenapedia-p16INK4A fusion protein to human diploid fibroblasts. *FEBS Lett.* 427, 203–208.
- PALMERO I., MCCONNELL B., PARRY D., BROOKES S., HARA E., BATES S., JAT P., PETERS G., 1997. Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status. *Oncogene* 15, 495–503.
- POMERANTZ J., SCHREIBER-AGUS N., LIEGEOIS N. J., SILVERMAN A., ALLAND L., CHIN L., POTES J., CHEN K., ORLOW I., LEE H. W., CORDON-CARDO C., DEPINHO R. A., 1998. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92, 713–723.
- ROBLES S. J., ADAMI G. R., 1998. Agents that cause DNA Double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16, 1113–11123.
- SERRANO M., 1997. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp. Cell. Res.* 237, 7–13.
- SERRANO M., LIN A. W., MCCURRACH M. E., BEACH D., LOWE S. W., 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593–602.
- SHAPIRO G. I., EDWARDS C. D., EWEN M. E., ROLLINS B. J., 1998. p16INK4A participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 18, 378–387.
- SHERR C. J., 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672–1677.
- SIKORA E., 1994. Mechanism of programmed cell death (apoptosis). *Postępy Biochem.* 40, 150–160.
- SIKORA E., 1996. Cell cycle and apoptosis: death of a senescent cell. *Postępy Biochem.* 42, 108–113.
- SMITH J. R., PEREIRA-SMITH O. M., 1996. Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science* 273, 63–67.
- STEIN G. H., DRULLINGER L. F., SOULARD A., DULIC V., 1999. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2109–2117.
- SUGRUE M. M., SHIN D. Y., LEE S. W., AARONSON S. A., 1997. Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9648–9653.
- SUZUKI A., TSUTOMI Y., AKAHANE K., ARAKI T., MIURA M., 1998. Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* 17, 931–939.
- TAN X., WANG J. Y., 1998. The caspase-RB connection in cell death. *Trends. Cell. Biol.* 8, 116–120.
- TESCO G., VERGELLI M., GRASSILLI E., SALOMONI P., BELLESIA E., SIKORA E., RADZISZEWSKA E., BARBIERI D., LATORRACA S., FAGIOLO U., SANTACATERINA S., AMADUCCI L., TIOZZO R., FRANCESCHI C., SORBI S., 1998. Growth properties and growth factor responsiveness in skin fibroblasts from centenarians. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 912–916.
- UHRBOM L., NISTER M., WESTERMARK B., 1997. Induction of senescence in human malignant glioma cells by p16INK4A. *Oncogene* 15, 505–514.
- WIMAN K. G., 1997. p53: emergency brake and target for cancer therapy. *Exp. Cell. Res.* 237, 14–18.
- XU H. J., ZHOU Y., JI W., PERNG G. S., KRUSZELOCK R., KONG C. T., BAST R. C., MILLS G. B., LI J., HU S. X., 1997. Reexpression of the retinoblastoma protein in tumor cells induces senescence and telomerase inhibition. *Oncogene* 15, 2589–2596.
- YEE A. S., SHIH H. H., TEVOSIAN S. G., 1998. New perspectives on retinoblastoma family functions in differentiation. *Front. Biosci.* 3, D532–547.
- ZHANG Y., XIONG Y., YARBROUGH W. G., 1998. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92, 725–734.