

Olga Alster^{1,✉}

Zbigniew Korwek²

¹Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, Warszawa

²Pracownia Modelowania w Biologii i Medycynie, Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN, Warszawa

✉Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa; tel.: (22) 589 22 60, e-mail: o.alster@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 14 marca 2014 r.

Artykuł zaakceptowano 9 kwietnia 2014 r.

Słowa kluczowe: znaki starzenia, starzenie replikacyjne, starzenie przyspieszone, fenotyp sekrecyjny, β -galaktozydaza związana ze starzeniem

Wykaz skrótów: CDK – ang. *cyclin-dependent kinases*; CIP/KIP – ang. *CDK interacting protein/kinase inhibitory protein*; CKI – ang. *cyclin-dependent kinase inhibitors*; DNA-SCARS – ang. *DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence*; PML – ang. *promyelocytic leukemia protein*; SA- β -Gal – ang. *senescence associated β -galactosidase*; SAHF – ang. *senescence associated heterochromatin foci*; SASP – ang. *senescence associated secretory phenotype*

STRESZCZENIE

Starzenie jest złożonym procesem związanym z nieodwracalnym zatrzymaniem komórek w cyklu. Wyróżnić można starzenie replikacyjne, zależne od skracania telomerów, i starzenie przyspieszone, które jest niezależne od ich skracania. Starzenie replikacyjne obserwowane jest w hodowli jako skończona liczba podziałów komórek, co może trwać od kilku tygodni do miesięcy, w zależności od typu komórek. Starzenie przyspieszone zachodzi już po kilku dniach od zadziałania czynnika je indukującego. Nie ma jednego uniwersalnego znacznika procesu starzenia komórkowego. Badanie starzenia komórkowego możliwe jest dzięki występowaniu szeregu znaczników tego procesu, które pozwalają obserwować zmiany zarówno na poziomie molekularnym jak i biochemicznym. Dopiero ich współwystępowanie pozwala na uzyskanie pewności, że komórki uległy starzeniu.

WPROWADZENIE

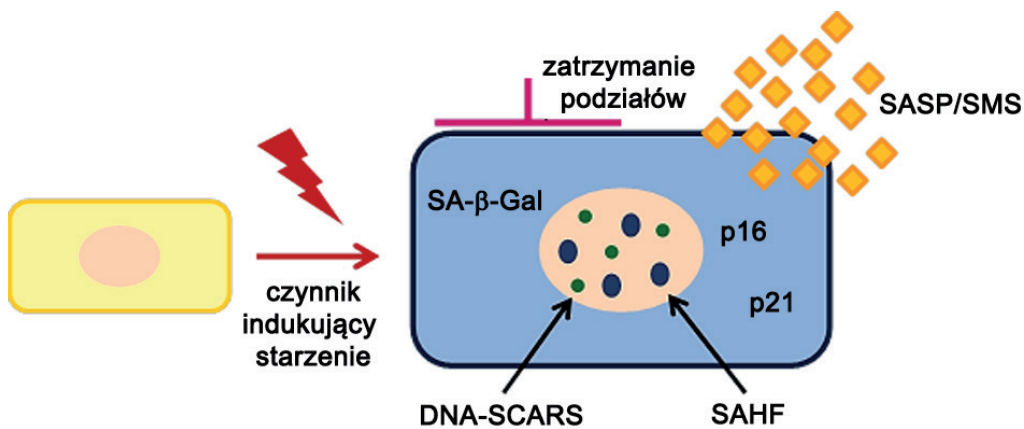
Starzenie komórkowe jest bardzo złożonym i wieloetapowym procesem. Wyróżnić możemy starzenie replikacyjne, które związane jest ze skracaniem telomerów i obserwowane jest w hodowli po kilku tygodniach lub miesiącach, oraz starzenie przyspieszone, które jest niezależne od skracania telomerów i może być obserwowane po kilku dniach od zadziałania czynnika je indukującego. Badanie starzenia możliwe jest dzięki istnieniu licznych metod, pozwalających śledzić ten proces. W chwili obecnej nie ma jednego markera typowego wyłącznie dla procesu starzenia, jednak występuje szereg cech, które charakteryzują ten proces. Opisanych zostało wiele znaczników starzenia i można je podzielić na dwie grupy: uniwersalne i komórkowo specyficzne¹. Możemy wyróżnić następujące uniwersalne znaki starzenia: zmianę morfologii, wzrost syntezy i aktywności β -galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA- β -Gal, ang. *Senescence associated β -galactosidase*), wzrost ziarnistości, wzrost poziomu lipofuscyny, zmiany w cytoszkieletcie, zahamowanie proliferacji, wzrost poziomu inhibitorów cyklu komórkowego (m.in. p16^{INK4a} (p16) i p21^{WAF1/CIP1} (p21)), zatrzymanie komórek w cyklu, występowanie skupisk białek stanowiących element szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DNA-SCARS, ang. *DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence*), występowanie skupisk heterochromatyny związanych ze starzeniem (SAHF, ang. *Senescence Associated Heterochromatin Foci*), wzrost poziomu białka PML (ang. *promyelocytic leukemia protein*), skracanie telomerów, spadek poziomu laminy B1, zmiany metylacji DNA oraz pojawienie się fenotypu sekrecyjnego związanego ze starzeniem (SASP, ang. *Senescence Associated Secretory Phenotype*; SMS, ang. *Senescence-messaging Secretome*) [1-3]. Schemat na rycinie 1 przedstawia zmiany występujące w komórce, która uległa starzeniu. Większość z wyżej wymienionych znaczników starzenia, w zależności od typu badanych zmian, można zakwalifikować do następujących grup: na poziomie struktury i morfologii komórki (wielkość i rozkładzenie, aktywność SA- β -Gal, ziarnistość, wzrost poziomu lipofuscyny oraz zmiany cytoszkieletu), zmiany związane z regulacją cyklu komórkowego (zahamowanie proliferacji, wzrost poziomu inhibitorów cyklu komórkowego i cykliny D1 oraz zatrzymanie komórek w cyklu), znaki związane z DNA i heterochromatyną (występowanie DNA-SCARS, SAHF, PML-NB, skracanie telomerów, spadek poziomu laminy B1 i zmiany metylacji) oraz fenotyp wydzielniczy (SASP). Wszystkie te znaki zostaną omówione poniżej.

ZMIANY NA POZIOMIE STRUKTURY I MORFOLOGII KOMÓRKI

ZMIANA MORFOLOGII KOMÓREK ULEGAJĄCYCH STARZENIU

Komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu, jak i przyspieszonemu, powiększają się i stają się płaskie. Zmiana ta obserwowana jest zarówno w przypadku

¹Zagadnienie to zostało szerzej omówione w artykule „Rola starzenia komórkowego w starzeniu organizmu i chorobach związanych z wiekiem”, opublikowanym w niniejszym zeszycie Postępów Biochemii.



Rycina 1. Znaczniki starzenia komórkowego. Wśród znaczników procesu starzenia można wyróżnić: zatrzymanie podziałów, zwiększenie rozmiarów komórki, wzrost aktywności i poziomu SA-β-Gal, wzrost poziomu inhibitorów cyklu komórkowego (białek p16 i/lub p21), pojawienie się fenotypu sekrecyjnego związanego ze starzeniem (SASP, ang. *senescence associated secretory phenotype*), pojawienie się skupisk heterochromatyny związanych ze starzeniem oraz skupisk białek związanych z aktywacją szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DNA-SCARS, ang. *DNA segments with chromatin alterations*). Zmodyfikowane według [73].

komórek prawidłowych np. ludzkich komórek mięśni gładkich, fibroblastów, jak i komórek nowotworowych: ludzkich komórkach raka okrężnicy (HCT116), liniach glejaka (U343 MG-A, U87 MG, U343 MG), linii kostniakomięsaka (U2OS) i ludzkich komórkach raka piersi (MCF-7) [4-6]. Ponadto, w melanocytach, ulegających starzeniu spowodanym nadekspresją onkogenu RAS, stwierdzona jest intensywne wakuolizacja [7]. Zaobserwowano, że melanocyty ulegające starzeniu w wyniku nadekspresji onkogenu BRAF, mają wrzecionowate jądra komórkowe [8].

WZROST AKTYWNOŚCI I POZIOMU β-GALAKTOZYDAZY ZWIĄZANEJ ZE STARZENIEM (SA-β-GAL)

Podstawowym markerem procesu starzenia komórkowego jest wzrost aktywności i poziomu enzymu lizosomalnego β-galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA-β-Gal). Jest to najbardziej znany i najpowszechniej używany w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* marker starzenia, który został opisany przez Dimri i wsp [9]. SA-β-Gal jest markerem, którego obecność została opisana zarówno w starzeniu replikacyjnym, jak również przyspieszonym [1]. Obecność tego znacznika stwierdzono w komórkach, które uległy starzeniu, ale nie w spoczynkowych fibroblastach czy zróżnicowanych keratynocytach. Ponadto obserwowano wzrost aktywności SA-β-Gal wraz z wiekiem dawcy w fibroblastach skórnych i epidermalnych keratynocytach. Znacznik ten również był przydatny w badaniu starzenia u gryzoni czy naczelnych [10]. Ponadto ma on zastosowanie u starzejących się organizmów modelowych, jak np. u *Danio* pręgowanego i *Caenorhabditis elegans*. Niestety okazało się, że wzrost aktywności SA-β-Gal nie towarzyszy jedynie starzeniu, ale może również być wykrywany w warunkach nie związanych z nim jak np. w przypadku nieprawidłowych warunków hodowli komórek, jej przegęszczenia oraz w świetle cebulek włosowych oraz przewodów ekrynowych i łojotokowych [11]. Wzrost aktywności tego enzymu koreluje ze wzrostem masy lizosomów, który jest obserwowany w komórkach starych [12].

Obecność SA-β-Gal nie jest jednak niezbędna do indukcji starzenia. Fibroblasty pochodzące od pacjentów z gangliozydazą G_{M1} , chorobą spichrzeniową spowodowaną brakiem β-galaktozydazy, ulegały starzeniu replikacyjnemu, jak również przyspieszonemu, pod wpływem adriamycyny, związku który indukuje powstawanie uszkodzeń DNA. Starzeniu tych komórek nie towarzyszył wzrost aktywności SA-β-Gal, gdyż wzrost poziomu tego znacznika uwarunkowany jest obecnością lizosomalnej β-galaktozydazy. Ponadto stwierdzono, że obniżenie poziomu β-galaktozydazy przy użyciu technik siRNA bądź

shRNA w komórkach prawidłowych czy nowotworowych nie hamuje indukcji starzenia [12].

Aby uniknąć potencjalnie fałszywie dodatnich wyników dobrze jest badać wzrost aktywności SA-β-Gal z innymi znacznikami starzenia jak np. z zatrzymaniem komórek w cyklu, które jest również znacznikiem tego procesu. Równoczesne pokazanie, że komórki są zatrzymane w cyklu przy wzroście aktywności SA-β-Gal świadczy o tym, że wzrost aktywności tego enzymu związany jest ze starzeniem.

W celu zbadania aktywności SA-β-Gal przy użyciu mikroskopu świetlnego komórki utrwalano, a następnie inkubowano w roztworze barwiącym zawierającym x-gal, który jest substratem β-galaktozydazy. W wyniku cięcia x-gal przez enzym dochodzi do powstawania barwnego produktu, który obserwowany jest w komórkach w postaci niebieskiego precipitatu. Do pomiaru aktywności SA-β-Gal, oprócz mikroskopii świetlnej można również wykorzystać metodę z zastosowaniem cytometru przepływowego. Wykorzystuje się do tego określony substrat, który pod wpływem β-galaktozydazy emituje zieloną fluorescencję. Metoda z zastosowaniem cytometru przepływowego pozwala na dokonanie szybkiej oceny ilościowej komórek wykazujących wzrost aktywności SA-β-Gal [9,13].

Dotychczas nie została poznana funkcja SA-β-Gal w przebiegu starzenia. Przypuszcza się, że wzrost aktywności tego enzymu wynika jedynie ze wzrostu liczby lizosomów, a nie jego związku przyczynowo-skutkowego w starzeniu.

WZROST ZIARNISTOŚCI

Jedną z kolejnych zmian towarzyszących starzeniu jest wzrost ziarnistości komórek. Związane jest to prawdopodobnie ze wzrostem masy lizosomów, w komórkach, które uległy starzeniu [12]. Wzrost ziarnistości komórek

można określić przy użyciu cytometru przepływowego lub obserwacji mikroskopowej.

WZROST POZIOMU LIPOFUSCYNY

Innym markerem procesu starzenia jest lipofuscyna, która jest brązowożółtym barwnikiem wytwarzanym podczas utleniania lipoprotein w lizosomach. Stwierdzono, że ilość lipofuscyny wzrasta w komórkach starych organizmów [14]. Wzrost poziomu lipofuscyny można ocenić poprzez wykonanie barwień histochemicznych.

ZMIANY CYTOSZKIELETU TOWARZYSZĄCE STARZENIU

Starzeniu komórkowemu towarzyszy również szereg zmian związanych z białkami cytoszkieletu. Zaobserwowano zmiany w poziomie następujących białek: wimentyny, β -aktyny i tubuliny.

Wimentyna jest białkiem o masie 58 kDa, które należy do III grupy filamentów pośrednich i obecne jest w komórkach pochodzenia mezenchymalnego. Białko to wykazuje dużą homologię międzygatunkową [15,16]. W embrionalnych fibroblastach linii TIG3 zaobserwowano, że wraz z liczbą podziałów rósł poziom wimentyny. Ponadto stwierdzono, że ludzkie fibroblasty skórne linii TIG101, które uległy starzeniu, miały ponad dwukrotnie wyższy poziom wimentyny niż komórki linii TIG3, które były na wczesnym pasażu. Również wykazano, że płodowe fibroblasty skórne linii TIG3S miały istotnie niższy poziom tego białka niż komórki linii TIG101. Zmianie poziomu wimentyny towarzyszyły również zmiany poziomu tubuliny i aktyny. Zaobserwowano, że komórki, które uległy starzeniu miały odpowiednio cztero- i dwukrotnie niższy poziom aktyny i tubuliny niż komórki młode [17]. Wzrost poziomu wimentyny można ocenić poprzez wykonanie barwień immunocytochemicznych oraz z zastosowaniem techniki Western blotting.

ZNACZNIKI ZWIĄZANE Z PROLIFERACJĄ I REGULACJĄ CYKLU KOMÓRKOWEGO

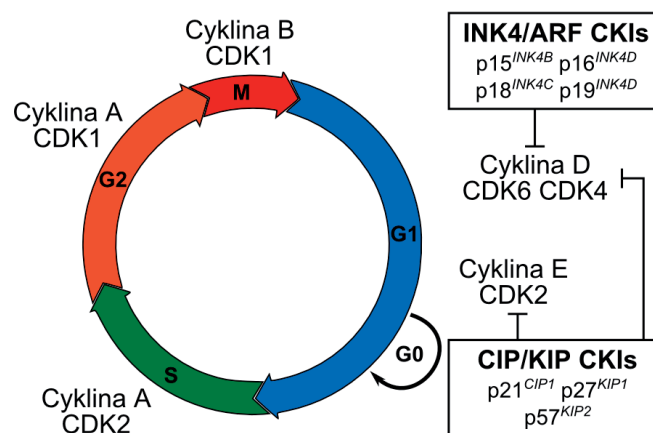
ZAHAMOWANIE PROLIFERACJI

Podstawowym znacznikiem starzenia, który pozwala określić czy komórki proliferują jest określenie ich liczby. Gdy dojdzie do zahamowania proliferacji liczba komórek nie ulega zmianie. Proliferację komórek można również badać poprzez określanie zdolności do wbudowywania do DNA bromodeoksyurydyny (BrdU) bądź 5-etynyl-2-deoksyurydyny (EdU). Brak komórek zdolnych do wbudowywania BrdU do DNA świadczy o zahamowaniu syntezy DNA, a zatem proliferacji co jest równoznaczne z zatrzymaniem komórek w cyklu. Zdolność komórek do wbudowywania do DNA BrdU czy EdU można wykrywać immunocytochemicznie, przy użyciu techniki ELISA, jak również przy pomocy cytometru przepływowego [18]. Kolejnym powszechnie stosowanym znacznikiem proliferacji jest białko Ki67. Brak skupisk tego białka w komórkach świadczy o zatrzymaniu proliferacji. Obecność tego białka można wykrywać immunocytochemicznie [19,20].

WZROST POZIOMU INHIBITORÓW CYKLU KOMÓRKOWEGO

Cykl komórkowy jest ściśle regulowany dzięki wzajemnemu oddziaływaniu cyklin, kinaz zależnych od cyklin (CDK, ang. *cyclin-dependent kinases*) i inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (CKI, ang. *cyclin-dependent kinase inhibitors*). Wyróżnić można cztery fazy cyklu komórkowego: G1, S, G2 i M. Każda z faz cyklu komórkowego charakteryzuje się dominacją odpowiednich kompleksów cykliny z kinazą zależną od cyklin. W fazie G1 kluczową rolę odgrywają dwa takie kompleksy, cyklina D-CDK6-CDK4 oraz cyklina E-CDK2, w fazie S: cyklina A-CDK2 i w fazie G2 cyklina A-CDK1. Dwie klasy inhibitorów zależnych od cyklin uczestniczą w regulacji cyklu komórkowego: INK4/ARF (ang. *Inhibitor of kinase 4/ alternative reading frame*) oraz CIP/KIP (ang. *CDK interacting protein/ kinase inhibitory protein*). Do klasy INK4/ARF zaliczamy następujące białka: p15^{INK4B} (p15), p16^{INK4A} (p16), p18^{INK4C} (p18) oraz p19^{INK4D} (p19). Białka należące do tej klasy wiążą się z CDK4 i CDK6 co prowadzi do allosterycznej zmiany, która uniemożliwia oddziaływanie z cyklinami D. Wśród białek należących do klasy CIP/KIP można wyróżnić: p21^{CIP1} (p21), p27^{KIP1} (p27) i p57^{KIP2} (p57). Białka te hamują enzymatyczną funkcję kompleksu cyklina-CDK poprzez wiązanie się z katalityczną szczeliną kompleksu [21]. Udział inhibitorów kinaz zależnych od cyklin został przedstawiony na rycinie 2.

W starzeniu komórkowym kluczową rolę odgrywają dwa szlaki sygnałowe: p53-p21 i p16-pRb [22]. Szlak z udziałem białek p53-p21 głównie pełni funkcję w starzeniu indukowanym uszkodzeniami DNA oraz w starzeniu replikacyjnym, natomiast szlak z udziałem białek p16-pRb w starzeniu indukowanym nadekspresją onkogenów. Stwierdzono jednak, że część białek jest wspólna dla obydwu



Rycina 2. Udział inhibitorów kinaz zależnych od cyklin w przebiegu cyklu komórkowego. Cykl komórkowy jest ściśle regulowany dzięki wzajemnemu oddziaływaniu cyklin, kinaz zależnych od cyklin (CDK, ang. *cyclin-dependent kinases*) i inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (CKI, ang. *cyclin-dependent kinase inhibitors*). Każda z faz cyklu komórkowego charakteryzuje się dominacją odpowiednich kompleksów cykliny z kinazą zależną od cyklin. W fazie G1 kluczową rolę odgrywają dwa takie kompleksy, cyklina D-CDK6-CDK4 oraz cyklina E-CDK2, w fazie S: cyklina A-CDK2 i w fazie G2 cyklina A-CDK1. Dwie klasy inhibitorów zależnych od cyklin uczestniczą w regulacji cyklu komórkowego: INK4/ARF (ang. *Inhibitor of kinase 4/ alternative reading frame*) oraz CIP/KIP (ang. *CDK interacting protein/ kinase inhibitory protein*). Do klasy INK/ARF należą następujące białka: p15, p16, p18 i p19. W klasie CIP/KIP można wyróżnić następujące białka: p21, p27 i p57. Zmodyfikowane według [21].

szlaków. Zwiększona synteza inhibitorów cyklu komórkowego takich jak białka p21 i p16 towarzyszy starzeniu replikacyjnemu, jak i przyspieszonemu. Zaobserwowano, że poziom p16 rośnie wraz z wiekiem u ludzi i myszy. U ludzi syntezę p16 wykazano w skórze oraz w limfocytach T [23-25]. Ponadto stwierdzono, że wzrost poziomu tego białka koreluje ze zmniejszoną liczbą komórek progenitorowych, co jest obserwowane wraz z wiekiem w wielu tkankach [26]. Starzenie komórkowe obserwowane jest również podczas rozwoju embrionalnego. Dochodzi wówczas to wzrostu poziomu białka p21, natomiast nie obserwowany jest wzrost białka p16 [27,28]. Szerzej to zagadnienie zostało omówione przez Annę Bielak-Żmijewską i wsp. [4]. Wzrost poziomu białka p16 nie jest jedynie związany ze starzeniem komórkowym, a obserwowany jest również w komórkach gruczołu mlekowego [29]. Występują również dane pokazujące, że wzrost poziomu białka p16 jest wystarczającym dowodem na występowanie starzenia komórkowego. Brak białka p16 stwierdzono w przypadku wielu typów nowotworów: w glejaku wielopostaciowym, czerniaku, gruczolakoraku trzustki, nie drobnokomórkowym raku płuc, raku pęcherza i raku ustnogiardłowym. Można zatem wnioskować, że obecność białka p16 hamuje rozwój nowotworu [30].²

Oprócz powszechnie znanych i stosowanych znaczników starzenia jakimi są białka p16 i p21 istotną rolę w tym procesie odgrywają również inne inhibitory kinaz zależnych od cyklin, należące do dwóch klas: INK4/ARF i CIP/KIP. Zaobserwowano, że starzeniu komórkowemu towarzyszy wzrost poziomu białka p15. Wyższy poziom tego białka obserwowano w zmianach łagodnych występujących w skórze, płucach i trzustce, ale nie w złośliwych nowotworach występujących w tych samych tkankach i narządach. Podwyższony poziom tego białka korelował z występowaniem innych znaczników starzenia; wzrostem aktywności SA-β-Gal i występowaniem skupisk heterochromatyny (SAHF) [31]. U gryzoni zaobserwowano wzrost poziomu p19^{Ink4d} wraz z wiekiem, ale nie w takim stopniu jak p16^{Ink4a} [32]. Ponadto, u gryzoni stwierdzono, że wzrostowi poziomu białka p16^{Ink4a} towarzyszy wzrost poziomu p19^{Arf} (u ludzi odpowiednikiem tego białka jest p14^{ARF}) [23]. Równie istotną rolę, jak białka należące do klasy INK4/ARF, pełni białka należące do klasy CIP/KIP. Stwierdzono, że nadprodukcja białka p57 w komórkach raka prostaty, linii PPC-1, prowadzi do pojawienia się kilku znaczników starzenia komórkowego. Obserwowane jest wtedy zatrzymanie komórek w fazie G1 cyklu komórkowego. Dochodzi również do wzrostu aktywności SA-β-Gal oraz komórki stają się duże i płaskie. W komórkach linii HUC (ang. *human uroepithelial cells*) stwierdzono również, że wraz z rosnącą liczbą podziałów dochodzi do wzrostu poziomu białka p57 [33]. Wprowadzenie białka p57 do trzech linii komórkowych glejaka (U343 MG-A, U87 MG, U343 MG) prowadziło do pojawienia się kilku znaczników starzenia. Komórki stawały się duże i płaskie, zatrzymywały się w fazie G1 cyklu komórkowego oraz dochodziło do wzrostu aktywności SA-β-Gal [6]. Kolejnym białkiem należącym do klasy CIP/KIP, które również pełni istotną funkcję w starzeniu jest białko p27. Zaobserwowano, że nie tylko nadprodukcja białka p21, ale również białka

p27 w ludzkich komórkach kostniakomięsa linii U2OS prowadziła do indukcji starzenia. Znacznikami procesu starzenia nie są jedynie inhibitory kinaz zależnych od cyklin, ale również cykliny. Wykazano, że cyklina D1 jest znacznikiem starzenia nowotworowych komórek epitelialnych [20,34]. Ponadto wzrost poziomu tego znacznika starzenia był również obserwowany w komórkach mięśni gładkich [35]. Zmiany poziomu inhibitorów cyklu komórkowego jak i cykliny D1 można między innymi ocenić przy użyciu techniki Western blotting.

ZATRZYMANIE KOMÓREK W CYKLU KOMÓRKOWYM

Związane ze starzeniem zatrzymanie komórek w cyklu postrzegane jest jako proces nieodwracalny, ponieważ nie ma znanych czynników fizjologicznych, które mogłyby ten proces odwrócić [36]. W zależności od typu komórek oraz od czynnika indukującego starzenie, może dochodzić do zatrzymania komórek w fazie G1 bądź G2 cyklu komórkowego. W przypadku starzenia replikacyjnego dochodzi zazwyczaj do zatrzymania komórek w fazie G1 cyklu komórkowego. Tak jak opisano w pracy Mao i wsp. [37] – może również dojść do zatrzymania komórek w fazie G2 cyklu komórkowego. Przyspieszonemu starzeniu towarzyszy zatrzymanie komórek w fazie G2 cyklu komórkowego [5,20,38]. Zatrzymanie komórek w cyklu można zbadać przy użyciu cytometru przepływowego.

ZNACZNIKI ZWIĄZANE Z DNA I CHROMATYNĄ

WYSTĘPOWANIE SKUPISK BIAŁEK BĘDĄCYCH ELEMENTAMI SZLAKU ODPOWIEDZI NA USZKODZENIA DNA (DNA-SCARS)

Uszkodzenia DNA, powodujące trwałą aktywację szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR, ang. *DNA Damage Response*), prowadzą do indukcji przyspieszonego starzenia. Trwała aktywacja szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA, w odróżnieniu od przejściowej aktywacji tego szlaku, charakteryzuje się długotrwałym występowaniem skupisk białek będących elementami szlaku DDR tak jak np. γH2AX i 53BP1 [39-41].³ Do niedawna uważano, że przyspieszone starzenie może być indukowane uszkodzeniami DNA występującymi zarówno w telomerowym, jak i nietelomerowym DNA [42]. W 2012 roku kilka zespołów badawczych [39,43,44] pokazało, że trwała aktywacja DDR jest wynikiem występowania uszkodzeń w odcinkach telomerowych. Występowanie kilku uszkodzeń w odcinkach telomerowych stanowi wystarczający bodziec do indukcji starzenia [39].

Komórki, które uległy starzeniu w wyniku trwałej aktywacji szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA, mają w jądrze komórkowym skupiska białek będących elementami tego szlaku (DNA-SCARS, ang. *DNA segments with chromatin alterations*). Skupiska te zawierają takie białka jak np.: ATM, γH2AX i 53BP1 [41,45]. W obrębie DNA-SCARS można również wyróżnić skupiska powstałe w wyniku aktywacji szlaku wynikającego z uszkodzonych, bądź zbyt krótkich telomerów (TIF, ang. *telomere dysfunction-indu-*

²Zagadnienie to zostało szerzej omówione w artykule „Rola starzenia komórkowego w kancerogenezie i terapii przeciwnowotworowej”, opublikowanym w niniejszym zeszycie Postępów Biochemii.

³Zagadnienie to zostało szerzej omówione w artykule „Rola szlaku indukowanego uszkodzeniami DNA w apoptozie i starzeniu komórkowym”, opublikowanym w niniejszym zeszycie Postępów Biochemii.

ced foci) [45,46]. Zaobserwowano, że DNA-SCARS często współwystępują z PML (ang. *Promyelocytic Leukemia Protein*) [41]. Występowanie DNA-SCARS można zbadać poprzez wykonanie barwień immunocytochemicznych.

SKUPISKA HETEROCHROMATYNY ZWIĄZANE ZE STARZENIEM (SAHF)

W komórkach, które uległy starzeniu, stwierdzono występowanie tzw. skupisk heterochromatyny związanych ze starzeniem (SAHF, ang. *Senescence Associated Heterochromatin Foci*). Zostały one po raz pierwszy opisane w 2003 przez Naritę i wsp. [47] w ludzkich fibroblastach, w których heterochromatyna uległa starzeniu w postaci 30–50 skupisk, widocznych w wyniku barwienia DAPI. SAHF powstają w obszarach promotorowych genów kodujących białka regulujące fazę S cyklu komórkowego. Skupiska te są wykrywane dzięki znakowaniu na obecność histonu H3, który uległ metylacji w pozycji lizyny 9 (H3 Lys 9), białka HP-1 (ang. *heterochromatin protein-1*), histonu makroH2A i białka HMGA (ang. *High Mobility Group A*) [47]. W obrębie rodziny makroH2A wyróżnić można histon makroH2A1.1, 1.2 i 2. [48]. Występują trzy białka należące do rodziny HP1: HP1 α , β i γ oraz dwa białka HMGA: HMGA1 i 2 [49]. W początkowym etapie powstawania SAHF udział biorą następujące białka: ASF1a, HIRA i PML [50]. Zaobserwowano, że w komórkach pozbawionych kinaz ATM czy ATR, białek które pełnią kluczową rolę w szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA, nie dochodzi do powstawania skupisk heterochromatyny związanych ze starzeniem [51]. Pierwszy etap związany jest z kondensacją chromosomów. Wykrywany jest poprzez barwienie jądra komórkowego przy użyciu DAPI i obserwowany zanim dojdzie do wzbogacenia SAHF w białko HP1 oraz histony makroH2A czy H3K9Me. Za kondensację chromosomów podczas tworzenia SAHF odpowiadają dwa białka opiekuńcze histonów HIRA i ASF1a. Nadprodukcja HIRA czy ASF1a w komórkach pierwotnych przyspiesza tworzenie SAHF. Zaobserwowano, że wyciszenie ASF1a hamuje tworzenie SAHF w starzeniu indukowanym nadekspresją onkogeny RAS. Kolejnym krokiem w powstawaniu SAHF jest metylacja histonu H3 na reszcie lizyny 9. Następnie dochodzi do powstania miejsca wiązania białka HP1 i wbudowania histonu macroH2A. W komórkach ulegających starzeniu, przed powstaniem SAHF, białka HIRA i HP1 ulegają translokacji do PML-NB [48]. SAHF są markerem charakterystycznym zarówno dla przyspieszonego starzenia indukowanego aktywacją onkogenów, jak i replikacyjnego, jednakże zaobserwowano, że jest to zależne od typu komórek [47,50]. W starzeniu replikacyjnym ludzkich fibroblastów linii IMR90 i WI38, ale nie BJ, zaobserwowano powstawanie SAHF. Co ciekawe, gdy starzenie w komórkach linii BJ było indukowane nadekspresją onkogenów znacznik ten już się pojawiał [47].

Pierwotnie stwierdzono, że jednym z elementów SAHF jest występowanie metylacji histonu H3 na reszcie lizyny 9. Nie potrafią jednak rozróżnić poszczególnych modyfikacji histonu H3: H3K9me3, H3K9me2, H3K9me i H3K27me. Wszystkie wyżej wymienione modyfikacje charakteryzują się występowaniem identycznych aminokwasów wokół miejsca modyfikacji lizyny. Stworzenie bardziej specyficznych przeciwciał pozwoliło na dokładniejsze poznanie

struktury SAHF. Wykazano, że SAHF mają budowę warstwową. Rdzeń bogaty jest w H3K9me3 i otoczony jest pierścieniem, w którym dominuje H3K27me3. Podczas tworzenia SAHF dochodzi do wzrostu poziomu białka HP1, które wiąże się z H3K9me3, natomiast nie obserwowany jest znaczny wzrost poziomu histonu H3K9me3. Zaobserwowano, że pozbawienie ludzkich fibroblastów histonu H3K9me3 lub H3K27me3 nie uniemożliwiało powstawania SAHF [52]. Ponadto obniżenie poziomu białek HP1 nie uniemożliwia tworzenia SAHF [49].

WZROST ZAWARTOŚCI BIAŁKA PML

Białko PML (ang. *promyelocytic leukemia protein*) zostało po raz pierwszy opisane u osób dotkniętych ostrą białaczką promielocytarną. Stanowi ono główny składnik PML-NB (ang. *PML nuclear bodies*), zwanych również ND10 (ang. *nuclear bodies*) i POD (ang. *promyelocytic oncogenic domains*) [53–54]. W PML-NB stwierdzono obecność ponad 50 białek, między innymi Rb, p53, ATM, ATR, helikaz, topoizomera oraz białek biorących udział w naprawie uszkodzeń DNA. Występują dowody świadczące o bezpośrednim związku białka PML ze starzeniem. Synteza PML w komórkach prawidłowych prowadzi do nieodwracalnego zatrzymania komórek w cyklu i indukcji starzenia komórkowego. Ponadto stwierdzono, że białko to odgrywa istotną rolę w przyspieszonym starzeniu indukowanym onkogenami [51,55]. Zaobserwowano, że podczas starzenia zwiększa się liczba i wielkość PML-NB, natomiast nowotworzeniu towarzyszy zmniejszenie ich liczby wynikające z obniżonej syntezy PML [56]. Nadekspresja onkogeny RAS prowadzi do indukcji starzenia, czemu towarzyszy zwiększenie liczby PML-NB w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Ponadto w starzeniu indukowanym RAS zaobserwowano występowanie białka Rb i p53 w obrębie PML-NB. Stwierdzono, że brak białka PML uniemożliwia indukcję starzenia spowodowanego nadprodukcją białka RAS [57]. W komórkach, w których do zatrzymania cyklu dochodzi w wyniku braku surowicy, osiągnięcia konfluencji czy też nadprodukcji białka p53, nie obserwowane jest pojawienie się większej liczby PML-NB. Wykazano również, że nadprodukcja białka PML prowadzi do indukcji starzenia. W powstawaniu skupisk heterochromatyny związanych ze starzeniem biorą udział PML-NB. Stwierdzono również, że w fibroblastach linii IMR90, starzeniu replikacyjnemu towarzyszył wzrost poziomu białka PML [57]. Białko PML można wykryć poprzez wykonywanie barwień immunocytochemicznych na obecność tego białka.

SKRACANIE TELOMERÓW I AKTYWNOŚĆ TELOMERAZY

Telomery są to fragmenty DNA, obecne na zakończeniach chromosomów. U ssaków zbudowane są z powtórzeń sekwencji sześciu nukleotydów TTAGGG. Telomery wraz z kompleksem białek pełnią funkcję ochronną. Wyróżnić można sześć białek związanych z telomerami zwanych szelterynami: TRF1 (ang. *telomeric repeat binding factor 1*), TRF2 (ang. *telomeric repeat binding factor 2*), POT1 (ang. *protection of telomeres 1*), TIN2 (ang. *TRF1-interacting nuclear protein 2*), TPP1 i Rap1 (ang. *repressor-activator protein 1*). Z każdym podziałem komórkowym telomery ulegają skracaniu. Maksymalna liczba podziałów, której komórka może ulec

nazwana jest limitem Hayflicka, a starzenie spowodowane skracaniem telomerów nazwane zostało starzeniem replikacyjnym. Za odbudowywanie telomerów odpowiedzialna jest telomeraza. Poziom enzymu i liczba komórek, które wykazują jego aktywność jest bardzo różna u różnych gatunków. U myszy w komórkach somatycznych obserwowana jest aktywność telomerazy, podczas gdy u ludzi takie zjawisko jest rzadkie [1,58]. Badanie długości telomerów jest znacznikiem stosowanym do badania starzenia replikacyjnego i można go oznaczać przy użyciu technik FISH (ang. *Fluorescence in situ hybridization*) oraz Southern blotting.⁴

OBNIŻENIE POZIOMU LAMINY B1

Jednym ze znaczników starzenia jest towarzyszący temu procesowi spadek poziomu laminy B1, który obserwowany był zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [2]. Laminy należą do filamentów pośrednich typu V i wchodzi w skład błony jądrowej. Spadek poziomu laminy B1 widoczny był zarówno w starzeniu replikacyjnym, jak również indukowanym nadekspresją onkogenów, czy też uszkodzeniami DNA. Stwierdzono, że spadek poziomu laminy B1 związany ze starzeniem, był niezależny od obecności następujących białek: p38, ATM i czynnika transkrypcyjnego NF-κB, natomiast niezbędna była aktywność jednego z kluczowych szlaków biorących udział w starzeniu, p16-pRb bądź p53-p21. Starzeniu może również towarzyszyć wzrost poziomu reaktywnych form tlenu [59]. Obniżenie ich poziomu nie hamowało spadku poziomu laminy B1 [60]. Poziom laminy B1 można zbadać poprzez wykonanie barwień immunocytochemicznych, jak również przy użyciu techniki Western blotting.

OKSYDACYJNE MODYFIKACJE ZASAD AZOTOWYCH

Za kolejny znacznik starzenia komórkowego może być uznany poziom utlenionych pochodnych zasad azotowych i nukleozydów np. 8-oksoguaniny (8-oksogua) oraz jej nukleozydu 8-oksoguaniny (8-oksogua). Wolnorodnikowa teoria starzenia sformułowana przez Denhama Harmana w 1956 roku zakłada, że krytyczną rolę w starzeniu organizmu odgrywają wolne rodniki, które prowadzą do uszkodzenia makrocząstek komórkowych takich jak DNA, lipidy i białka [61]. Analiza tkanek zwierzęcych oraz ludzkich, dostarcza licznych dowodów na korelację pomiędzy występowaniem zmian spowodowanych obecnością wolnych rodników a wiekiem [62]. Stwierdzono zależny od wieku wzrost liczby oksydacyjnych uszkodzeń DNA oraz 8-oksoguaniny (8-oksogua) w tkankach zwierząt doświadczalnych. U gryzoni zaobserwowano wyższy poziom 8-oksogua w jądrowym DNA wyizolowanym z różnych narządów, pochodzących od zwierząt starszych niż od zwierząt młodych [63]. U ludzi wykazano, że poziom znacznika oksydacyjnych uszkodzeń DNA 8-oksogua jest wyższy w dwóch grupach wiekowych, w których średnia wieku wynosiła odpowiednio 67 i 50 lat niż u osób w wieku około 31 lat. Wykazana została również dodatnia korelacja pomiędzy poziomem 8-oksogua, a wiekiem badanych osób. Poziom 8-oksogua badano w leukocytach i moczu. Ponadto,

w moczu zaobserwowano nie tylko zależny od wieku podwyższony poziom 8-oksogua, ale również 8-oxoGua, który jest postrzegany jako najbardziej czuły znacznik wpływu stresu oksydacyjnego na DNA [64].

METYLACJA

Starzeniu towarzyszy globalna demetylacja, która obserwowana jest w wielu typach komórek i tkanek. Obserwacji tych dokonano badając poziom 5-metylocytozyny (5-mC). Stwierdzono, że poziom tego znacznika metylacji spada w komórkach hodowanych *in vitro* wraz z liczbą pasaży. Transformacja komórek wirusem SV-40 prowadzi do utrzymywania się 5-mC na stałym poziomie. Oprócz globalnej demetylacji, starzeniu towarzyszy również występowanie demetylacji konkretnych genów jak na przykład: *MYC* i *β-aktyna*. Ponadto stwierdzono, że w starzeniu występuje również hipometylacja [65]. Badania fibroblastów pokazały, że starzeniu replikacyjnemu towarzyszy zarówno hipometylacja i skupiskowo występująca hipermetylacja dotycząca konkretnych genów. Profil metylacji w komórkach, które uległy starzeniu był podobny do tego, który występuje w komórkach nowotworowych [66].

FENOTYP SEKRECYJNY ZWIĄZANY ZE STARZENIEM (SASP/SMS)

Inną cechą charakterystyczną dla komórek starych jest występowanie tzw. fenotypu wydzielniczego zwanego SASP (ang. *Senescence Associated Secretory Phenotype*) lub SMS (ang. *Senescence-Messaging Secretome*) [41,67,68]. W obrębie SASP/SMS wyróżnić można takie czynniki jak: cytokiny, proteazy, czynniki wzrostu, czy też inne związki wykazujące działanie autokrynne bądź parakrynne. Fenotyp sekrecyjny komórek zależny jest zarówno od bodźca indukującego starzenie, jak i typu komórek. Aktywność jego jest regulowana przez niektóre białka szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA: ATM (ang. *Ataxia telangiectasia mutated*), NBS1 (ang. *Nijmegen breakage syndrome protein-1*) i CHK2 (ang. *checkpoint kinase 2*) [41]. Natomiast inaktywacja białka p53 powoduje zwiększone wydzielanie niektórych elementów SASP [67]. Ponadto SASP jest regulowany przez następujące czynniki transkrypcyjne: NF-κB (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i C/EBP-β (ang. *CCAAT-enhancer-binding proteins*) [69,70]. Fenotyp sekrecyjny pojawia się, gdy dochodzi do trwałej aktywacji szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Podczas przejściowej aktywacji szlaku, czynniki wchodzące w skład SASP nie są wydzielane przez komórki. Zauważono, że istotną rolę w regulacji fenotypu sekrecyjnego pełni również kinaza p38MAPK pojawiająca się pod wpływem nadekspresji onkogenu RAS, jak również promieniowania X. Kinaza p38MAPK indukowała SASP poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Zastosowanie inhibitora kinazy p38MAPK zmniejszyło wydzielanie większości elementów SASP [71]. Czynniki wydzielane przez komórki ulegające starzeniu mogą mieć zarówno pozytywny, jak i negatywny wpływ na wiele procesów zachodzących w organizmie. Elementy SASP indukują angiogenezę, proliferację i różnicowanie komórek, naprawę tkanek, transformację epithelialno-mezenchymalną oraz prowadzą do występowania oporności na chemioterapię (Ryc. 3). Jedną z pierwszych cytokin

⁴Zagadnienie to zostało szerzej omówione w artykule „Rola starzenia komórkowego w starzeniu organizmu i chorobach związanych z wiekiem”, opublikowanym w niniejszym zeszycie Postępów Biochemii.



Rycina 3. Procesy, na które wpływają elementy fenotypu sekrecyjnego związanego ze starzeniem (SASP/SMS). Czynniki wydzielane przez komórki ulegające starzeniu indukują angiogenezę, oporność na chemioterapię, transformację epitelialno-mezenchymalną, proliferację komórek, regenerację tkanek i prowadzą do aktywacji układu odpornościowego. Zmodyfikowane według [2].

wydzielanych przez komórki, w wyniku indukcji starzenia jest IL-1 α [72]. IL-1 α wiąże się z receptorem IL1R, który aktywuje kaskadę sygnałów prowadzącą do aktywacji NF- κ B. Ten czynnik indukuje transkrypcję genów kodujących cytokiny prozapalne, IL-6 i IL-8 [72]. Fenotyp sekrecyjny można zmierzyć przy użyciu cytometru przepływowego, jak również z użyciem techniki ELISA.

ZNACZNIKI STARZENIA INDUKOWANE AKTYWACJĄ ONKOGENÓW

WZROST POZIOMU BIAŁEK: DEC1 I DCR2

Występuje szereg markerów przyspieszonego starzenia indukowanego aktywacją onkogenów. Zaobserwowano podwyższony poziom białek DEC1 (ang. *differentiated embryo-chondrocyte expressed-1*) i DCR2 (ang. *decoy death receptor-2*). DEC1 i DCR2 ulegają aktywacji przez p53. Wyższy poziom tych białek obserwowano w zmianach łagodnych występujących w skórze, płucach i trzustce, ale nie w złośliwych nowotworach występujących w tych samych tkankach i narządach. Podwyższony poziom tych białek korelował z występowaniem innych znaczników starzenia, wzrostem aktywności SA- β -Gal i występowaniem skupisk heterochromatyny (SAHF) [31].

PODSUMOWANIE

Starzenie komórkowe jest bardzo złożonym procesem, którego wnikliwe poznanie i zrozumienie możliwe jest dzięki zbadaniu szeregu jego znaczników. Znanych jest wiele znaczników starzenia komórkowego. Umożliwiają one wykrywanie zarówno zmian biochemicznych, jak i morfologicznych. Aby scharakteryzować starzenie komórkowe niezbędne jest zbadanie przynajmniej kilku znaczników tego procesu i dopiero ich współwystępowanie pozwala na uzyskanie pewności, że komórki uległy starzeniu.

PIŚMIENNICTWO

- de Jesus BB, Blasco MA (2012) Assessing cell and organ senescence biomarkers. *Circ Res* 111: 97-109
- Campisi J (2013) Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* 75: 685-705
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of ageing. *Cell* 153: 1194-1217
- Bielak-Zmijewska A, Wnuk M, Przybylska D, Grabowska W, Lewinska A, Alster O, Korwek Z, Cmoch A, Myszka 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

- Mosieniak G, Adamowicz M, Alster O, Jaskowiak H, Szczepankiewicz AA, Wilczynski GM, Ciechomska IA, Sikora E (2012) Curcumin induces permanent growth arrest of human colon cancer cells: link between senescence and autophagy. *Mechanism of ageing and Development* 133: 444-455
- Tsugu A, Sakai K, Dirks PB, Jung S, Weksberg R, Fei YL, Mondal S, Ivanchuk S, Ackersley C, Hamel PA, Rutka JT (2000) Expression of p57(KIP2) potentially blocks the growth of human astrocytomas and induces cell senescence. *Am J Pathol* 157: 919-932
- Denoyelle C, Abou-Rjaily G, Bezrookove V, Verhaegen M, Johnson TM, Fullen DR, Pointer JN, Gruber SB, Su LD, Nikiforov MA, Kaufman RJ, Bastian BC, Soengas MS (2006) Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 8: 1053-1063
- 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
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, O Pereira-Smith, Peacocke M, Campisi J (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9363-9367
- Itahana K, Campisi J, Dimri GP (2004) Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* 5: 1-10
- Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ (2000) Is beta-galactosidase staining a marker of senescence *in vitro* and *in vivo*? *Exp Cell Res* 257: 162-171
- Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES (2006) Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 5: 187-195
- Kurz JD, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD (2000) Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 113: 3613-3622
- Georgakopoulou EA, Tsimaratou K, Evangelou K, Fernandez Marcos PJ, Zoumpourlis V, Trougakos IP, Kletsas D, Bartek J, Serrano M, Gorgoulis VG (2013) Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging (Albany NY)* 5: 37-50
- Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, Goldman RD (2009) Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest* 119: 1763-1771
- Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE (2007) Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res* 313: 2050-2062
- Nishio K, Inoue A (2005) Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescence human fibroblasts. *Histochem Cell Biol* 123: 263-273
- Itahana K, Itahana Y, Dimri GP (2013) Colorimetric detection of senescence-associated β galactosidase. *Methods Mol Biol* 965: 143-56
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31: 13-20
- 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
- Kepp O, Martins I, Menger L, Michaud M, Adjemian S, Sukkurwala AQ, Galluzzi L, Kroemer G (2013) Quantification of cell cycle-arresting proteins. *Methods Mol Biol* 965: 121-142
- Ben-Porath I, Weinberg RA (2005) The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 961-976

23. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE (2004) Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 114: 1299-1307.
24. Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Dürr P, Wlaschek M (2006) p16INK4A is a robust *in vivo* biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* 5: 379-389
25. Liu Y, Sanoff HK, Cho H, Burd CE, Torrice C, Ibrahim JG, Thomas NE, Sharpless NE (2009) Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell* 8: 439-448
26. Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, Sharpless NE (2006) p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 443: 453-457
27. Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreas J, Murillo-Cuesta S, Rodríguez-Baeza A, Varela-Nieto I, Ruberte J, Collado M, Serrano M (2013) Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155: 1104-1118
28. Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, Yosef R, Pilpel N, Krizhanovsky V, Sharpe J, Keyes WM (2013) Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155: 1119-1130
29. Gadd M, Pisc C, Branda J, Ionescu-Tiba V, Nikolic Z, Yang C, Wang T, Shackelford GM, Cardiff RD, Schmidt EV (2001) Regulation of cyclin D1 and p16(INK4A) is critical for growth arrest during mammary involution. *Cancer Res* 61: 8811-8819
30. Rocco JW, Sidransky D (2001) p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 264: 42-55
31. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M (2005) Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436: 642
32. Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ (1997) Expression of the p16^{INK4a} tumor suppressor *versus* other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 15: 203-211
33. Schwarze SR, Shi Y, Fu VX, Watson PA, Jarrard DF (2001) Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells. *Oncogene* 20: 8184-8192
34. Sabisz M, Skladanowski A (2009) Cancer stem cells and escape from drug-induced premature senescence in human lung tumor cells: implications for drug resistance and *in vitro* drug screening models. *Cell Cycle* 8: 3208-3217
35. Burton DG, Sheerin AN, Ostler EL, Smith K, Giles PJ, Lowe J, Rhys-Williams W, Kipling DG, Faragher RG (2007) Cyclin D1 overexpression permits the reproducible detection of senescent human vascular smooth muscle cells. *Ann N Y Acad Sci* 1119: 20-31
36. Beauséjour CM1, 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
37. Mao Z1, Ke Z, Gorbunova V, Seluanov A. (2012) Replicatively senescent cells are arrested in G1 and G2 phases. *Aging (Albany NY)* 4: 431-435
38. Chatterjee N, Kiran S, Ram BM, Islam N, Ramasarma T, Ramakrishna G (2011) Diperoxovanadate can substitute for H₂O₂ at much lower concentration in inducing features of premature cellular senescence in mouse fibroblasts (NIH3T3). *Mech Ageing Dev* 132: 230-239
39. 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
40. Sedelnikova OA1, 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
41. Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Muñoz 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
42. 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
43. 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
44. 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
45. Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM (2004) Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* 14: 501-513
46. Herbig U1, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM (2006) Cellular senescence in aging primates. *Science* 311: 1257
47. Narita M1, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113: 703-716
48. Adams PD (2007) Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging. *Gene* 397: 84-93
49. Zhang R, Chen W, Adams PD (2007) Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol* 27: 2343-2358
50. Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, Santos HA, Chen W, Daganzo SM, Erzberger JP, Serebriiskii IG, Canutescu AA, Dunbrack RL, Pehrson JR, Berger JM, Kaufman PD, Adams PD (2005) Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 8: 19-30
51. O'Sullivan RJ, Karlseder J (2012) The great unravelling: chromatin as a modulator of the aging process. *Trends Biochem Sci* 37: 466-476
52. Chandra T, Kirschner K, Thuret JY, Pope BD, Ryba T, Newman S, Ahmed K, Samarajiwa SA, Salama R, Carroll T, Stark R, Janky R, Narita M, Xue L, Chicas A, Nunez S, Janknecht R, Hayashi-Takanaka Y, Wilson MD, Marshall A, Odom DT, Babu MM, Bazett-Jones DP, Tavaré S, Edwards PA, Lowe SW, Kimura H, Gilbert DM, Narita M (2012) Independence of repressive histone marks and chromatin compaction during senescent heterochromatic layer formation. *Mol Cell* 47: 203-214
53. Negorev D, Maul GG (2001) Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* 20: 7234-7242
54. Ivanschitz L, De Thé H, Le Bras M (2013) PML, SUMOylation, and Senescence. *Front Oncol* 3: 171
55. Scaglioni PP1, Rabellino A, Yung TM, Bernardi R, Choi S, Konstantidou G, Nardella C, Cheng K, Pandolfi PP (2012) Translation-dependent mechanisms lead to PML upregulation and mediate oncogenic K-RAS-induced cellular senescence. *EMBO Mol Med* 4: 594-602
56. Koken MH, Linares-Cruz G, Quignon F, Viron A, Chelbi-Alix MK, Sobczak-Thépot J, Juhlin L, Degos L, Calvo F, de Thé H (1995) The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* 10: 1315-1324
57. Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, Lowe SW (2000) PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 2000 14: 2015-2027
58. Correia-Melo C, Hewitt G, Passos JF (2014) Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence? *Longev Healthspan* 3: 1
59. 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

60. Freund A, Laberge RM, Demaria M, Campisi J (2012) Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell* 23: 2066-2075
61. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300
62. Tudek B, Winczura A, Janik J, Siomek A, Foksinski M, Oliński R (2010) Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. *Am J Transl Res* 2: 254-284
63. Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, Walter CA, Richardson A (2001) Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10469-10474
64. Olinski R, Siomek A, Rozalski R, Gackowski D, Foksinski M, Guz J, Dziaman T, Szpila A, Tudek B (2007) Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochim Pol* 54: 11-26
65. Issa JP (1999) Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 32: 31-43
66. Cruickshanks HA, McBryan T, Nelson DM, Vanderkraats ND, Shah PP, van Tuyn J, Singh Rai T, Brock C, Donahue G, Dunican DS, Drotar ME, Meehan RR, Edwards JR, Berger SL, Adams PD (2013) Senescent cells harbour features of the cancer epigenome. *Nat Cell Biol* 15: 1495-506
67. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 6: 2853-2868
68. Kuilman T, Peeper DS (2009) Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer* 9: 81-94
69. Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y, Melamed J, d'Adda di Fagagna F, Bernard D, Hernando E, Gil J (2008) Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 133: 1006-1018
70. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS (2008) Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133 : 1019-1031
71. 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
72. Orjalo AV, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK, Campisi J (2011) Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17031-17036
73. Rodier F, Campisi J (2011) Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192: 547-556

Markers of cellular senescence

Olga Alster^{1,✉}, Zbigniew Korwek²

¹Laboratory of Molecular Bases of Aging, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteura St., 02-093 Warsaw, Poland
²Laboratory of Modeling in Biology and Medicine, Institute of Fundamental Technological Research PAS, 5B Pawińskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

✉e-mail: o.alster@nencki.gov.pl

Key words: markers of senescence, replicative senescence, premature senescence, secretory phenotype, senescence associated β -galactosidase

ABSTRACT

Cellular senescence is a complex process associated with irreversible cell cycle arrest. We can distinguish replicative senescence, which is telomere dependent and stress-induced premature senescence (SIPS), which is telomere independent. Replicative senescence can be observed in culture after a few weeks or months, depending on the cell type. On the other hand SIPS can be observed a few days after treating with a senescence inducing agent. Till now a universal marker of senescence has not been described. Studies concerning senescence are possible thanks to the existence of many markers of senescence which enable to observe molecular as well as biochemical changes associated with this process. The presence of a few markers of senescence allows us to be sure that cells underwent senescence.