

Znaczenie starzenia na poziomie komórki w walce z chorobą nowotworową

Anna Litwiniec, Alina Grzanka

Odkrycie zjawiska starzenia komórek nowotworowych ujawniło istnienie pewnych niepoznanych dotychczas aspektów terapii przeciwnowotworowej. Obok różnych rodzajów śmierci, starzenie komórkowe może w znaczącym stopniu przyczynić się do zahamowania progresji nowotworu. Jednakże, rozważając terapeutyczne implikacje tego procesu, należy uwzględnić nie tylko pozytywne, ale również negatywne efekty towarzyszące starzeniu się komórek. W niniejszej pracy przedstawiono charakterystykę procesu starzenia na poziomie komórki, włącznie z opisem czynników indukujących ten program komórkowy, możliwych ścieżek jego realizacji, jak również znaczenia korzystnych i niekorzystnych komponentów tego złożonego zjawiska podczas powstawania i leczenia nowotworów.

The significance of senescence observed at the cellular level in cancer therapy

The discovery of the phenomenon of induced senescence in cancer cells revealed the existence of a number of new aspects of cancer therapy. Apart from different modes of cell death, cellular senescence may contribute to tumor suppression at a significant rate. However, considering therapeutic implications of this process, not only the potentially positive, but also the negative senescence-associated effects should be considered. The paper presents the characteristic features of the senescence process on the cellular level, including the descriptions of possible execution pathways, methods of induction, and the advantages and dangers related to this complex phenomenon.

Słowa kluczowe: starzenie indukowane, ścieżki starzenia komórkowego, supresja nowotworu, karcynogeneza, antagonistyczna plejotropia

Keywords: induced senescence, cellular senescence pathways, tumor suppression, tumorigenesis, antagonistic pleiotropy

Wprowadzenie

Starzenie na poziomie komórki jest uznawane przez wielu badaczy za stan nieodwracalnej, nawet po zadziałaniu czynnikami mitogennymi, utraty zdolności podziałowych na skutek zatrzymania cyklu komórkowego, przy jednoczesnym zachowaniu aktywności metabolicznej przez tę komórkę [1-5]. Wśród typowych symptomów procesu starzenia wyróżnić można między innymi: powiększenie rozmiarów komórki, pojawienie się ziarnistości cytoplazmatycznych oraz skupisk heterochromatyny, akumulację lipofuscyny w lizosomach, jak również wzrost aktywności β -galaktozydazy, towarzyszącej starzeniu i zmiany ekspresji białek supresji nowotworowej, między innymi: p53, p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}, p14^{Arf}, p16^{Ink4a}, pRb [1, 4, 6-8].

Po raz pierwszy starzenie się pierwotnych linii komórkowych zaobserwowano w warunkach *in vitro* jako osiągnięcie limitu podziałowego, czyli zatrzymanie wzro-

stu po określonej liczbie podwojeń populacji [9]. Zjawisko to, związane ze stopniowym skracaniem się telomerów w kolejnych rundach replikacji i przy niedostatecznej aktywności telomerazy [10], określono mianem fenomenu Hayflicka bądź też starzeniem podziałowym, w odróżnieniu od zidentyfikowanego później starzenia przedwczesnego, indukowanego stresem (SIPS – *Stress Induced Premature Senescence*), często niezależnego od długości telomerów [11, 12]. Odkrycie zjawiska przedwczesnego starzenia się komórek zapoczątkowało poznawanie różnych czynników indukujących ten proces w komórkach młodych podziałowo. Okazało się ponadto, że komórki nowotworowe, które posiadają zdolność do nieograniczonego wzrostu, także mogą ulegać procesom starzenia. Niewątpliwie przyczyniło się to do poszukiwania alternatywnych rozwiązań w terapii przeciwnowotworowej oraz do pełniejszego rozumienia działania stosowanych chemioterapeutyków. Poza tym obecnie wiadomo, że linie nowotworowe w pewnym zakresie podlegają procesom starzenia spontanicznego [13, 14].

Niniejsza praca wskazuje na korzyści, jak i zagrożenia związane z udziałem procesów starzenia się komórek w terapii przeciwnowotworowej.

Starzenie jako naturalna bariera procesu nowotworzenia i czynnik prognostyczny

Istnieją dowody wskazujące, że starzenie, podobnie do apoptozy oraz katastrofy mitotycznej, stanowi mechanizm zabezpieczający przed transformacją nowotworową, uaktywniający się w komórce na skutek stresu spowodowanego oddziaływaniem onkogenów, uszkodzeniami DNA czy zaburzeniami organizacji chromatyny odmiennego rodzaju [15, 16]. W takich warunkach supresja nowotworu następuje za pośrednictwem kontroli cyklu komórkowego z udziałem białek, takich jak: p53, pRb, p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}, p14^{Arf} (p19^{Arf} u myszy), czy p16^{Ink4a} oraz szeregu innych czynników [6, 7, 17-19]. Defekty jakiegokolwiek z tych elementów dróg sygnałowych, warunkujących prawidłową odpowiedź komórkową, w obecności czynnika onkogenego mogą sprzyjać karcynogenezie. Wyniki ostatnich badań sugerują jednoznacznie, że aktywacja mechanizmów starzenia jest decydująca dla zahamowania przekształcania się przednowotworowych zmian w złośliwą postać nowotworu [12, 17, 20, 21].

Michaloglou i wsp. (2005) dowiedli, że trwała aktywność produktu onkogeny *BRAF^{V600E}* powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w ludzkich melanocytach, łącznie z indukcją p16^{Ink4a} oraz wzrostem aktywności β-galaktozydazy, towarzyszącej starzeniu. Obecność tych markerów starzenia komórkowego w znamionach zawierających melanocyty z onkogenem *BRAF^{V600E}* i ich brak w komórkach z prawidłową postacią tego genu wskazują, że zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* aktywacja omawianego onkogeny przyczynia się do starzenia, co może stanowić czynnik ograniczający rozwój czerniaka [12]. Podobnie Braig i wsp. (2005) zwrócili uwagę na udział procesu starzenia w powstrzymywaniu nadmiernej proliferacji pierwotnych limfocytów, co z kolei zabezpiecza przed rozwojem chłoniaka. Jednocześnie zbadali oni karcynogenezę pod wpływem onkogeny *Ras* u myszy w kontekście uszkodzeń loci *p53* bądź *Suv39h1* – genu metylotransferazy histonowej, która to poprzez metylację histonów prawdopodobnie uczestniczy w represji genów sprzyjających wzrostowi. Zaobserwowano, że u zwierząt z uszkodzonym genem *p53* lub *Suv39h1* szybciej pojawiały się inwazyjne chłoniaki z komórek T. Natomiast limfocyty z niedoborem białek *Suv39h1* czy *p53* charakteryzowały się opornością na starzenie w odpowiedzi na chemioterapię [21]. Z kolei Chen i wsp. (2005) przedstawili złożony model supresji nowotworu gruczołu krokowego u myszy, zgodnie z którym aktywne *p53* jest białkiem chroniącym przed rozwojem choroby w komórkach z niedoborem produktu *Pten*. Brak funkcji tego ostatniego genu *in vitro* i *in vivo* prowadzi do starzenia zależnego od *p53*, podczas gdy równoczesna dezaktywacja *Pten* i *p53* skutkuje transformacją nowotworową mysich embrionalnych fibroblastów, natomiast u zwierząt wzmacnia inwazyjność raka gruczołu krokowego i prowadzi do śmierci [17]. Uniwersalny charakter udziału procesu starzenia w przeciwdziałaniu rozwojowi choroby nowotworowej potwierdzają obserwacje wczesnych etapów karcynogenezy w tkankach o różnorodnym pochodzeniu [20]. W zmianach przednowotwo-

rowych stwierdzono nasiloną ekspresję markerów typowych dla odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA, a w szczególności ufosforylowanych kinaz *ATM* i *Chk2* oraz ufosforylowanych postaci histonu *H2AX* i białka *p53*. Z drugiej strony, defekty ścieżki *ATM-H2AX/Chk2-p53* sprzyjają genetycznej niestabilności, a tym samym promocji nowotworu [20]. W toku dalszych prac ujawniono związek starzenia indukowanego aktywacją onkogenów z uszkodzeniami DNA. Wzmożona synteza DNA spowodowana oddziaływaniem czynników onkogennych skutkuje akumulacją zwiększonej liczby aktywnych replikonów i zaburzeniami funkcji widełek replikacyjnych, a w konsekwencji pojawia się reakcja charakterystyczna dla starzenia indukowanego stresem [16].

W świetle powyższych doniesień podkreślających znaczenie spontanicznych mechanizmów starzenia, wydaje się, że analiza markerów tego procesu mogłaby stanowić pomocny czynnik prognostyczny w oszacowaniu ryzyka rozwoju i inwazyjności wielu nowotworów [22, 23].

Z drugiej strony kwestią dyskusyjną pozostaje wciąż odpowiedź na pytanie, czy indukcja procesu starzenia w komórkach nowotworów złośliwych może równie skutecznie i bezpiecznie, jak na wczesnych etapach karcynogenezy, zahamować postęp choroby. Dla wyjaśnienia powyższego zagadnienia konieczna jest niewątpliwie znajomość długotrwałych efektów tego typu terapii przeciwnowotworowej, z uwzględnieniem statusu szlaków warunkujących program starzenia, kontekstu innych zmian molekularnych oraz wpływu mikrośrodowiska nowotworu.

Starzenie komórek nowotworowych – czynniki indukujące i korzystne efekty

Istnieją doniesienia wskazujące, że starzenie komórek nowotworowych na skutek chemioterapii faktycznie przyczynia się do poprawy rezultatów leczenia *in vivo* [22, 24, 25]. Myszy z chłoniakami, których wzrost ulegał zatrzymaniu w efekcie chemioterapii z użyciem cyklofosfamid, wykazywały znacznie lepsze rokowania od zwierząt z defektami istotnych w procesie starzenia genów, takich jak *p53*, czy *p16^{Ink4a}*. Jednocześnie, po leczeniu aktywność białek supresji nowotworowej kodowanych przez te geny miała decydujące znaczenie dla akumulacji markerów starzenia, w tym: *PML* oraz towarzyszącej starzeniu β-galaktozydazy [24]. Podobnie, znaczący poziom tego ostatniego enzymu, jak również p16^{Ink4a} zaobserwowano w komórkach nowotworowych pochodzących od pacjentów z rakiem piersi po chemioterapii według schematu CAF (cyklofosfamid, doksorubicyna, fluorouracyl), w porównaniu do próbek tkanek zdrowych oraz pochodzących od pacjentów poddanych wyłącznie leczeniu operacyjnemu [22]. Analogicznie, stwierdzono znaczący udział komórek z podwyższoną ekspresją β-galaktozydazy, towarzyszącej starzeniu, w biopatach uzyskanych od pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca, poddawanych chemioterapii z zastosowaniem karboplatyny i taksolu, w porównaniu z tkankami zdrowymi bądź biopatami pochodzącymi od pacjentów, u których jedyną

metodą leczenia była chirurgia [25]. W świetle tych obserwacji wydaje się zatem, że starzenie stanowi nie tylko barierę na wczesnych etapach nowotworzenia, ale również fizjologiczną reakcją na działanie chemioterapeutyków w komórkach nowotworów złośliwych, natomiast w warunkach klinicznych proces ten może być główną formą odpowiedzi w przypadku stabilizacji choroby [22].

Wyniki licznych eksperymentów w warunkach *in vitro* sugerują z kolei, że do wywołania procesu starzenia się komórek nowotworowych wystarczają już niskie/średnie zakresy dawek cytostatyków w odniesieniu do stosunkowo wysokich dawek proapoptotycznych [2, 13, 26-28]. Wśród korzystnych aspektów związanych z indukcją starzenia na wyróżnienie mogłaby zatem zasługiwać potencjalnie mniejsza toksyczność dla organizmu oraz ograniczenie skutków ubocznych terapii przeciwnowotworowej. Pełne zastosowanie omawianych efektów *in vivo* wymagałoby jednakże opanowania oporności, która często rozwija się spontanicznie w populacji komórek nowotworowych w odpowiedzi na niski poziom czynnika stresogennego, a może być związana z niestabilnością i przełamaniem komórkowego programu starzenia [14, 28, 29].

Mimo że komórki nowotworowe nie są tak podatne na starzenie pod wpływem czynników fizjologicznych, jak komórki niezmiennione nowotworowo [29], istnieją przesłanki wskazujące, że na skutek chemioterapii to właśnie komórki nowotworowe mogą ulegać starzeniu w większym zakresie. Zgodnie z tym, Poole i wsp. (2002) podkreślili, iż tkanki nie objęte chorobą nowotworową, pochodzące od pacjentów poddawanych uprzednio chemioterapii według schematu CAF, wykazywały reakcję negatywną na aktywność β -galaktozydazy towarzyszącej starzeniu [22]. Ponadto, wiele linii komórkowych z zaburzeniami ścieżek apoptotycznych w dalszym ciągu podlega zatrzymaniu podziałów na skutek działania chemioterapeutyków [29]. Dowiedziono również, że w warunkach zablokowania mechanizmów apoptozy przez mutacje *p53*, nadekspresję Bcl-2 czy inhibicję kaspaz, odpowiedź komórkowa w postaci starzenia może wciąż funkcjonować, nawet przy stosunkowo wysokich, proapoptotycznych dawkach cytotoksycznego czynnika [24, 26, 30, 31]. Zatem zatrzymanie cyklu komórkowego na drodze starzenia mogłoby stać się głównym celem terapii przeciwnowotworowej jako czynnik ograniczający proliferację nowotworu, w przypadku, gdy jego komórki cechują się opornością na chemioterapię związaną z dysfunkcjami ścieżek apoptotycznych. Wydaje się, że w pewnych okolicznościach przywrócenie wrażliwości na cytostatyki jest związane z indukcją starzenia. Przykładowo, dezaktywacja lizosomalnego enzymu katepsyny L przyczynia się do starzenia przez nasilenie jądrowej akumulacji doksorubicyny, a tym samym do zwiększonej wrażliwości na działanie tego cytostatyku [32]. Z drugiej strony, wśród przyczyn oporności nowotworów na chemioterapię wymienić należy defekty nie tylko mechanizmów śmierci komórki, ale przede wszystkim jej starzenia [29].

Dla uzyskania większej skuteczności terapii przeciwnowotworowej należy zatem poszukiwać różnych metod

wywoływania starzenia, udoskonalać metody wykrywania starych komórek oraz dokładnie poznać molekularne podłoże tego procesu, aby uniknąć oporności na jego indukcję.

Podczas gdy spontaniczne starzenie się komórek nowotworowych występuje jedynie w ograniczonym zakresie, głównie na skutek zmian środowiska komórkowego bądź też osiągnięcia krytycznej długości telomerów [13, 14], opisano dotychczas wiele sposobów indukcji tego procesu, przede wszystkim z wykorzystaniem manipulacji genetycznych, działania promieniowania jonizującego, chemioterapeutyków, czynników różnicujących, wywołujących stres oksydacyjny, czy też cytokin [13, 33-39]. Odnośnie indukcji starzenia na drodze manipulacji genetycznych – możliwe są dwa główne podejścia: poprzez nadekspresję genów supresji nowotworowej bądź wywołanie w pośredni sposób ich wzmożonej aktywności, lub poprzez zablokowanie funkcji białek uniemożliwiających realizację programu starzenia komórkowego i tym samym sprzyjających nowotworzeniu. Przykładowo, nadekspresja manganowej dysmutazy ponadtlenkowej MnSOD, związana z depolaryzacją błony mitochondrialnej, przyczynia się do starzenia się komórek raka jelita grubego HCT116, poprzez stymulację aktywności *p53* oraz wzrost ekspresji inhibitora kinaz cyklinozależnych *p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}* [37]. Jednocześnie dowiedziono, że podobny skutek przynosi bezpośrednia nadekspresja białek supresji nowotworowej – np. indukcja starzenia w komórkach raka szyjki macicy HeLa czy w komórkach włókniakomięsaka HT1080 pod wpływem *p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}* [27, 40]. Z drugiej strony wymuszenie w komórkach raka szyjki macicy ekspresji białka regulatorowego E2 wirusa brodawczaka umożliwiło m.in. przywrócenie endogennej aktywności *p53* i *pRb* poprzez inaktywację onkogenów E6 i E7 wirusa brodawczaka, a tym samym doprowadziło do zainicjowania programu starzenia [33, 40]. Spośród chemioterapeutyków wykorzystywanych do indukcji starzenia najbardziej spektakularne efekty uzyskano z zastosowaniem czynników oddziałujących z DNA, takich jak np. doksorubicyna, afidikolina, cisplatyna, cytarabina i etopozyd, mniej skuteczne w tym zakresie okazały się natomiast zaburzające dynamikę mikrotubul – winkrystyna i taksol [2, 13, 27, 28, 41-43]. Jednakże, inne badania wskazują, że również diskodermid, należący do czynników stabilizujących mikrotubule, może stanowić efektywny czynnik w indukcji starzenia [44]. Promieniowanie jonizujące, ze względu na jego wpływ na materiał genetyczny, przejawiający się m.in. w powstawaniu dwuniciowych pęknięć DNA, może także wywoływać starzenie komórek nowotworowych w zakresie zbliżonym do skutecznych chemioterapeutyków [13, 36]. Interesującą alternatywą dla starzenia indukowanego uszkodzeniami DNA i/lub innych elementów komórki w konsekwencji chemio- bądź radioterapii wydaje się stosowanie czynników indukujących różnicowanie, a w szczególności retinoidów. Użycie tych ostatnich często pozwala uniknąć indukcji inhibitora CDK – *p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}*, który prawdopodobnie sprzyja pozytywnej regulacji genów istotnych dla promocji nowotworu. Stwierdzono natomiast, pod wpływem retinoidów, aktywność wielu białek

hamujących rozwój komórek rakowych, m.in. nowotworu piersi MCF-7 [45]. Ostatnio opisano nowy sposób indukowania starzenia się komórek, który wykorzystuje szlaki sygnałowe związane z odpowiedzią na uszkodzenia DNA poprzez zastosowanie oligonukleotydów homologicznych do odcinków telomerowego DNA [46, 47]. Ze względu na możliwość wywołania apoptotycznej śmierci i/lub starzenia nawet w niektórych komórkach nowotworowych opornych na cytostatyki, niską toksyczność dla komórek normalnych oraz poprawę przeżywalności w modelach mysich, podejście to może stanowić nową, obiecującą formę terapii przeciwnowotworowej. Prawdopodobnie analogicznie oddziałują czynniki wywołujące utworzenie czteroniciowych struktur DNA z jednoniciowych odcinków na końcach 3' telomerów i stabilizację takich struktur. Tym samym uniemożliwione zostaje formowanie prawidłowych kompleksów zabezpieczających końce chromosomów oraz pośrednio następuje zahamowanie właściwej katalitycznej aktywności telomerazy, co w konsekwencji przyczynia się do indukcji starzenia podziałowego w komórkach nowotworowych *in vitro* i *in vivo* [48, 49]. Podstawą obiecujących rozwiązań w terapii przeciwnowotworowej mogą poza tym stać się ostatnie doniesienia wskazujące, iż pewne kłony komórek w obrębie linii komórek nowotworowych podlegają procesowi spontanicznego starzenia podziałowego, związanego ze skracaniem telomerów i represją ekspresji katalitycznej podjednostki telomerazy *hTERT*. Szczególnie znaczący wydaje się fakt, iż procesy te zachodzą nawet bez indukcji *p53*, *p16^{Ink4a}*, *p14^{Arf}* czy *p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}*, decydującą rolę odgrywają natomiast inne geny, np. *SIP1* [50]. Do perspektywicznych metod walki z chorobą nowotworową, w tym indukcji starzenia, zalicza się również zastosowanie mikro-RNA, czyli krótkich fragmentów niekodującego RNA, które uczestniczą w posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów [51]. Wykazano m.in., że komórki nowotworowe pochodzące z linii komórkowych raka jelita grubego HCT 116 i RKO, poddane działaniu *miR-34a*, charakteryzowały się obecnością morfologicznych cech starzenia, zatrzymaniem proliferacji oraz podwyższonym poziomem białek *p53* i *p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}*. Ponadto, zahamowanie rozwoju guzów pochodzących z tych komórek nowotworowych pod wpływem *miR-34a* zostało potwierdzone w warunkach *in vivo* [52]. Pomimo że wdrożenie rozwiązań opartych na mikro-RNA wciąż jeszcze pozostaje w fazie eksperymentów na modelach zwierzęcych, cząstki te budzą ogromne zainteresowanie wśród badaczy. Wydaje się bowiem, że zmiany w obrębie kodujących je genów mogą odgrywać krytyczną rolę w patofizjologii wielu nowotworów, a co się z tym wiąże, niektóre z mikro-RNA pełnią prawdopodobnie istotne funkcje supresorowe, podczas gdy inne posiadają udokumentowane działanie onkogenne [51, 52].

Warto zaznaczyć, że różnorodne czynniki indukujące proces starzenia mogą wymagać określonych, odmiennych komórkowych kontekstów, a w związku z tym ich działanie jest determinowane szeregiem uwarunkowań, m.in. fazą cyklu komórkowego, stanem fizjologicznym, a przede wszystkim tłem genetycznym komórki. Przykła-

dowo, w zależności od rodzaju linii komórkowej, a także od aktywności określonych ścieżek starzenia w danej linii, traktowanie komórek nowotworowych doksorubicyną bądź etopozydem, w połączeniu z inhibitorem kinaz zależnych od cyklin – roskowityną, przynosi zróżnicowane efekty – od śmierci, poprzez starzenie, do naprawy DNA i wznowienia podziałów [35]. Prawdopodobnie każdy z inhibitorów kinaz cyklinozależnych, w pewnych warunkach, może odgrywać istotną rolę w procesie starzenia. Dowiedziono na przykład, że starzeniu komórek linii szczurzego raka wątroby McA-RH7777 na skutek traktowania hydroksymocznikiem towarzyszy podwyższony poziom *p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}*, bez udziału *p53*, czy *p27^{Kip1}* [34]. Jak istotne jest precyzyjne poznanie i zrozumienie zależności pomiędzy ścieżkami starzenia i ich antagonistami na poziomie komórki ukazuje praca Roberson i wsp. (2005). W komórkach linii niedrobnokomórkowego raka płuca H1299 z brakiem aktywności *p53* i *p16^{Ink4a}*, nadekspresja kinazy *Cdc2/Cdk1* sprzyja odejściu od realizacji indukowanego chemioterapią programu starzenia i wznowieniu podziałów, co z kolei stwarza dogodne warunki dla progresji nowotworu. Jednakże, w warunkach *in vitro* wykazano, że zahamowanie aktywności ww. kinazy z wykorzystaniem inhibitorów farmakologicznych lub metody siRNA przyczynia się do śmierci komórek, zwiększając tym samym efektywne działanie cytostatyków [25]. Reasumując, skuteczność indukcji starzenia komórek wymaga uwzględnienia możliwie dużej liczby czynników warunkujących ten program komórkowy, a przede wszystkim potencjalnych ścieżek realizacji starzenia w danym środowisku komórkowym.

Komórkowe ścieżki starzenia

Już na podstawie obserwacji dotyczących indukcji starzenia linii komórek nowotworowych na skutek wprowadzania do komórek różnych chromosomów, czy też zważywszy na liczbę genów, których mutacje/inaktywacja jest niezbędna dla uzyskania immortalizacji komórek, pojawiały się hipotezy sugerujące istnienie wielu alternatywnych ścieżek realizacji programu starzenia na poziomie komórki [53]. Te przypuszczenia potwierdza również fakt, że omawiany proces może zachodzić w komórkach z brakiem niektórych białek supresji nowotworowej, istotnych w starzeniu, jak np. *p53*, bądź też *pRb* i *p16^{Ink4a}* [27, 54-56]. Przykładowo, w ludzkich fibroblastach wykazano udział *p16^{Ink4a}* w niezależnej od *p53* odpowiedzi na uszkodzenia telomerów. Niedobór funkcji *p53* jest niewystarczający w tym układzie dla całkowitego przełamania programu starzenia, a dopiero równoczesne zahamowanie ekspresji *p16^{Ink4a}* umożliwia znaczące ograniczenie odpowiedzi, chociaż część komórek wciąż wykazuje niski stopień proliferacji [54]. Podobnie, realizacja programu starzenia w komórkach raka piersi i immortalizowanych keratynocytach z niefunkcyjnym *p53* jest możliwa dzięki niezależnej od *p53* transkrypcyjnej indukcji *p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}*, zachodzącej z udziałem kinazy *Chk2* [55]. Z drugiej strony, brak dostatecznej aktywności *p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}*, związany z działaniem onkogenego białka *E6*

wirusa brodawczaka, przyczynia się prawdopodobnie do zwiększenia potencjału podziałowego populacji ludzkich fibroblastów, mimo ich znacznego wieku replikacyjnego i wystąpienia fenotypowych cech starzenia [19]. Wyniki te wskazują na istotną rolę $p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$ w typowym dla starzenia komórek zjawisku zatrzymania cyklu komórkowego poprzez inaktywację kompleksów cykliny E-Cdk2 oraz, prawdopodobnie, poprzez hamowanie kompleksów cykliny D1-Cdk4/Cdk6. W innych badaniach dowiedziono natomiast, że dla zapoczątkowania starzenia w komórkach linii raka szyjki macicy HeLa poprzez represję białka E7 wirusa HPV kluczowym wydarzeniem jest aktywacja ścieżki pRb [57]. Wydaje się więc, że mimo funkcjonowania różnych szlaków sygnałowych, w pewnych warunkach aktywność konkretnych białek supresji nowotworowej bądź aktywacja określonych ścieżek jest niezbędna dla zainicjowania/utrzymania procesu starzenia.

Jakie zatem opisano alternatywne ścieżki starzenia komórek? Czy w komórkach nowotworowych proces ten przebiega z udziałem podobnych, czy raczej zupełnie innych mechanizmów w porównaniu z komórkami normalnymi?

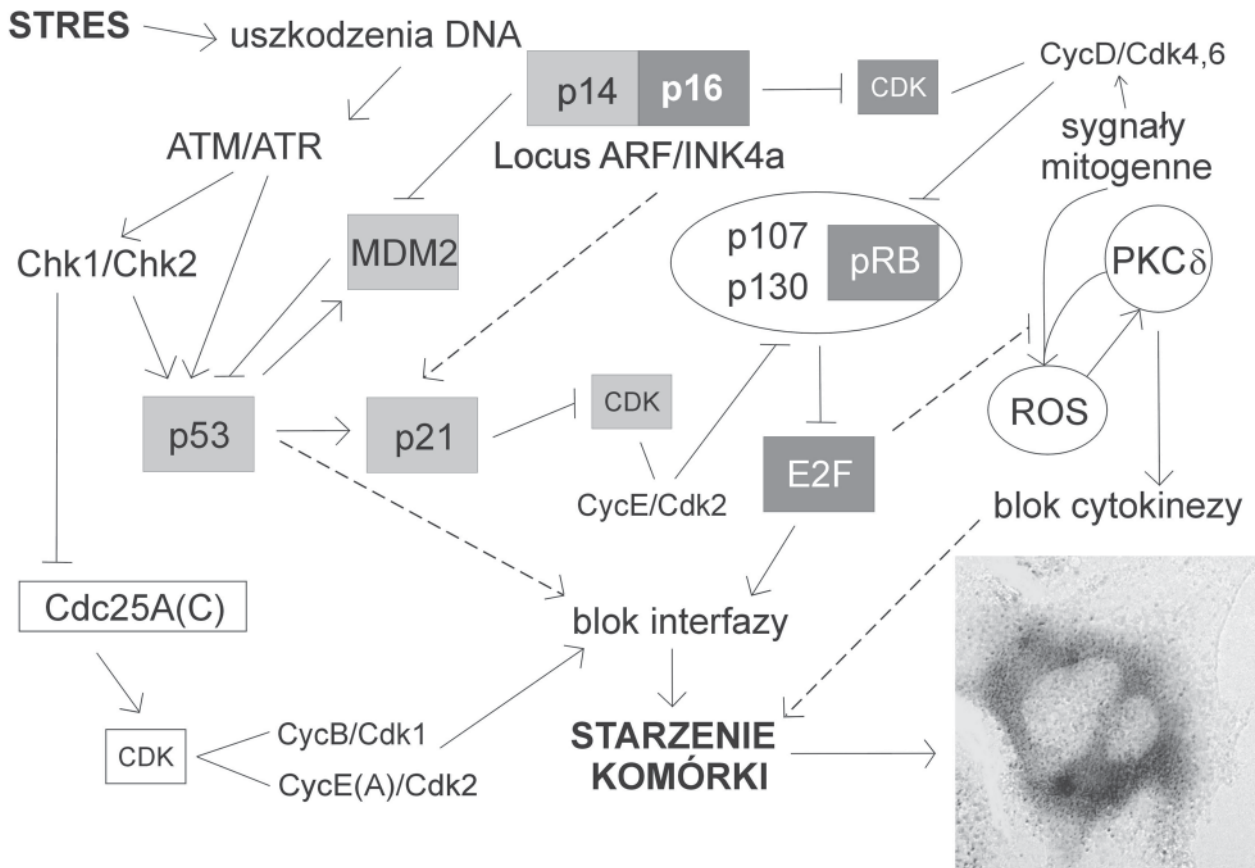
Sam fakt, że komórki nowotworowe podlegają procesom starzenia, wskazuje na funkcjonowanie kilku różnych potencjalnych ścieżek, na których może dojść do realizacji tego procesu. Przekształcenie się komórek normalnych w nowotworowe wymaga pojawienia się zmian pozwalających na przełamanie aktywności takich białek supresji nowotworowej, jak p53 czy $p16^{Ink4a}$, które są kluczowe dla starzenia na poziomie komórki.

W związku z tym w większości nowotworów występują mutacje w przynajmniej jednym z genów kodujących wymienione białka bądź zachodzi inaktywacja samych białek, a mimo to zdolność do realizacji omawianego programu zostaje zachowana [58]. Mianowicie, w komórkach nowotworowych możliwa jest indukcja tego procesu poprzez aktywację różnych niedziałających ścieżek bądź też z wykorzystaniem innego rodzaju szlaków zastępczych [55, 57]. Ostatnie doniesienia z badań na mysim modelu chłoniaka dowodzą nawet, iż zależne od p53 starzenie się komórek nowotworowych występuje także na skutek skracania się telomerów, a więc w odpowiedzi na czynnik warunkujący starzenie podziałowe w komórkach normalnych [30]. Na podstawie przytoczonych danych oraz wielu innych doniesień można zatem sądzić, że w komórkach nowotworowych niejednokrotnie są indukowane te same ścieżki starzenia, które warunkują działanie programu starzenia się jako istotnej bariery dla powstawania nowotworów.

Odnośnie różnorodności samych ścieżek istnieją natomiast sugestie, iż różne czynniki indukujące, jak np. skracanie telomerów, czy nadekspresja czynnika transkrypcyjnego E2F1, mogą aktywować nieco odmienne szlaki, co w rezultacie prowadzi do pojawienia się podobnych, ale nie identycznych fenotypów starzejącej się komórki [6]. Iwasa i wsp. (2003) sugerują jednak, że aktywacja MAPK p38 najwyraźniej stanowi element wspólny w starzeniu wywołanym skracaniem telomerów,

aktywacją onkogenów, stresem oksydacyjnym oraz nieprzyjającymi warunkami hodowli komórkowej [59]. Spostrzeżenia te wydają się również potwierdzać obserwacje indukcji starzenia poprzez aktywację ścieżek MEK-ERK, a następnie MKK3/6-p38 MAPK na skutek ekspresji onkogenego *ras*. Jednocześnie dowiedziono, że aktywacja p38 przyczynia się do akumulacji białek $p16^{Ink4a}$ i p53 [60]. Przypuszcza się, że czynniki transkrypcyjne Ets2 i Ets1, jak również $p15^{Ink4b}$ poprzez TGF β są elementami istotnymi dla bezpośredniej indukcji promotora i utrzymania podwyższonej ekspresji $p16^{Ink4a}$ w tym szlaku [61, 62]. Białko p53 może natomiast podlegać bezpośredniej fosforylacji przez p38 w pozycji Ser33 i Ser46 [63]. Reasumując, p38 uczestniczy najprawdopodobniej we wstępnej fazie odpowiedzi komórkowej, związanej z różnymi typami starzenia, niezależnie od względnego udziału p53 i/lub pRb w dalszych etapach realizacji tego procesu [59]. Poza tym czynnikiem wpływającym na inicjację i realizację programu starzenia na poziomie komórki może być gen *PML* (po raz pierwszy zidentyfikowany u pacjentów z ostrą formą białaczki promielocytarnej), ponieważ jego obecność warunkuje stabilizację, modyfikacje posttranslacyjne oraz transkrypcyjną aktywację *p53*, nie tylko na skutek nadekspresji izoformy *PML IV*, ale także *Ras* [64]. Jednocześnie, inne ogniwa sygnałowe, jak PEA-15, czy też komponenty szlaku związanego z odpowiedzią na uszkodzenia DNA, przykładowo ATM, w określonych warunkach mogą mieć kluczowe znaczenie dla indukcji starzenia za pośrednictwem p53 [65, 66] (Ryc. 1).

Pomimo ogromnej różnorodności elementów indukujących program starzenia, dwie najlepiej poznane ścieżki kolejnych faz wykonawczych tego procesu zależą od p53 i pRb (Ryc. 1). Regulację poziomu/aktywności tych białek zapewniają m.in. alternatywne produkty locus *INK4a/ARF*, a mianowicie białka supresorowe: $p16^{Ink4a}$ oraz $p14^{Arf}$ [67]. W przebiegu cyklu komórkowego białko p53 podlega degradacji, zależnej od ubikwityny pod wpływem MDM2 (Mouse Double Minute 2) [68]. Jednakże inicjacja starzenia skutkuje destabilizacją MDM2 w wyniku wiązania z $p14^{Arf}$, a w konsekwencji stabilizacją i akumulacją p53 [67]. Przyczynia się to następnie do transkrypcyjnej aktywacji genu $p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$ [67], którego produkt poprzez inhibicję kinaz zależnych od cyklin uczestniczy w zatrzymaniu cyklu komórkowego [69]. Natomiast w alternatywnej kaskadzie zdarzeń kluczową rolę odgrywa aktywacja białka pRb za pośrednictwem $p16^{Ink4a}$. Ten ostatni czynnik wpływa na inhibitory CDK z rodziny Cip/Kip, tj. $p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$ i $p27^{Kip1}$ oraz łącznie z nimi hamuje działanie kinaz cyklinozależnych CDK4, CDK6 i CDK2, które inaktywują pRb na drodze fosforylacji [70, 71]. Dzięki temu następuje interakcja słabo ufosforylowanego pRb z czynnikiem transkrypcyjnymi z rodziny E2F, istotnymi dla przejścia z fazy G_1 do S w cyklu komórkowym [72]. Oddziaływania tego rodzaju modulują m.in. status acetylacji i metylacji histonów w rejonach promotorów zależnych od E2F [42, 72]. Przykładowo, rekrutacja deacetylaz histonowych do rejonów promotorowych, zależnych od E2F, przez białka z rodziny Rb, a w szczególności p107 i p130, stanowi jeden z praw-



Ryc. 1. Schemat przedstawiający wybrane elementy ścieżek starzenia na poziomie komórki w odpowiedzi na stres związany z uszkodzeniami DNA (wg [74], zmodyfikowany). Obok dwóch najlepiej poznanych szlaków p16^{Ink4a}/pRb oraz p14^{Arf}/p53/p21^{Cip1/Waf1/Sdi1} uwzględniono także kaskadę kinaz ATM/ATR-Chk1/Chk2. Na drodze fosforylacji, np. z udziałem Chk1 dochodzi do inaktywacji Cdc25A i Cdc25C, nie powstają kompleksy cykliny E (A)-CDK2 i cykliny B-CDK1 i następuje zatrzymanie progresji cyklu komórkowego w fazie S bądź w G2/M. Brak kompleksów cykliny A-CDK2 skutkuje zatrzymaniem fazy S ze względu na niekontrolowane wiązanie E2F do DNA. Natomiast niedobór kompleksów cykliny B-CDK1 może warunkować zatrzymanie cyklu w fazie G2. Zaznaczono uruchomienie bloku cytokinezy w wyniku pełnej aktywacji pRb przez p16^{Ink4a} (wg [5], zmodyfikowano) oraz wzajemne powiązania elementów sygnałowych różnych ścieżek. Model komórki podlegającej starzeniu stanowi komórka niedrobnokomórkowego raka płuc linii A549 po traktowaniu doksorubicyną – o typowej morfologii i z podwyższoną aktywnością towarzyszącej starzeniu β-galaktozydazy

dopodobnych mechanizmów represji genów niezbędnych dla progresji cyklu komórkowego [73]. Wyciszeniu genów zależnych od E2F poprzez ścieżkę p16^{Ink4a}/pRb towarzyszy także reorganizacja chromatyny, z wykształceniem się skupisk typowych dla starzenia (SAHF – Senescence Associated Heterochromatin Foci), które są istotne dla utrzymania stabilności i nieodwracalności procesu starzenia się komórek [7].

Z opisanych powyżej zależności jasno wynika, że p21^{Cip1/Waf1/Sdi1} może pełnić rolę ogniwa spletającego dwa główne szlaki – p53 i pRb. Ponadto badania eksperymentalne potwierdzają, iż poszczególne elementy tych ścieżek w określonych warunkach współdziałają ze sobą w realizacji wspólnego programu (Ryc. 1). Zaobserwowano, że indukcja p53 w warunkach niefunkcyjnego szlaku p16^{Ink4a}/pRb prowadzi do wzrostu ekspresji białka p130 (Rb2), należącego do rodziny Rb, w linii komórkowej glejaka szczurzego C6. Stwierdzono ponadto, że zjawisko to ma kluczowe znaczenie dla zatrzymania cyklu komórkowego w związku z represją cykliny A [56]. Pozostaje to również w zgodzie z modelem liniowej aktywacji pRb przez p53, typowej dla komórek mysich, jednakże w ludzkich komórkach za bardziej prawdopodobny uznaje się

model równoległego i niezależnego działania dwóch głównych szlaków, który gwarantuje skuteczniejsze zabezpieczenie przed transformacją nowotworową [74]. Poza tym, uwzględniając profile ekspresji poszczególnych białek supresorowych w trakcie procesu starzenia, przypuszcza się, iż spełniają one odrębne, ale uzupełniające się zadania. Podczas gdy p21^{Cip1/Waf1/Sdi1} odgrywa istotną rolę związaną z zahamowaniem progresji cyklu komórkowego we wstępnej fazie procesu starzenia, dla długotrwałego utrzymania tego stanu i jego nieodwracalnego charakteru niezbędna wydaje się raczej aktywność p16^{Ink4a} [49, 69]. Niedawno zwrócono również uwagę na ujawniające się w trakcie podziałowego starzenia różnice w statusie metylacji genów kodujących ww. białka supresorowe. Nie zaobserwowano w tym zakresie znaczących zmian dla p16^{Ink4a}, jednak promotor p21^{Cip1/Waf1/Sdi1} początkowo, tzn. w komórkach niestarzejących się, podlega stopniowej metylacji, natomiast spadek metylacji wiąże się ze wzmożoną ekspresją tego genu i przyczynia się w ten sposób do procesu starzenia replikacyjnego, ale także warunkuje starzenie w odpowiedzi na uszkodzenia DNA [75].

Jednocześnie istnieją sugestie odnośnie funkcjonowania dodatkowych mechanizmów hamujących pro-

liferację komórek, już po pokonaniu bariery starzenia bezpośrednio zależnego od p53 i pRb [5, 66] (Ryc. 1). Mianowicie, pomimo zablokowania p53 i pRb w komórkach z nadekspresją onkogenów, zaobserwowano utrzymywanie się typowych dla uszkodzeń DNA skupisk, które powstają na skutek aktywacji poprzez fosforylację następujących kinaz: ATM, ATR, Chk1 i Chk2. Sama odpowiedź, związana z uszkodzeniami DNA, mogłaby w tej sytuacji zapewniać dalsze zabezpieczenie przed karcynogenezą w komórkach, w których nastąpiło odejście od stabilnego procesu starzenia według poznanych już szlaków [66] (Ryc. 1). Przedstawiona hipoteza wydaje się tym bardziej prawdopodobna, że kinaza Chk2 jest zdolna do indukcji $p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}$ z pominięciem p53 [55]. Z kolei Takahashi i wsp. (2006) zaproponowali, że wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) na skutek pełnej aktywacji pRb przez $p16^{Ink4a}$, we współdziałaniu z sygnałami mitogennymi i kinazą PKC δ , mógłby stanowić dodatkowy, zabezpieczający mechanizm (Ryc. 1). W ten sposób następuje blok przejścia z fazy G₂ do M cyklu komórkowego, nie dochodzi do cytokinezy, pojawiają się natomiast liczne komórki wielojądrowe [5].

Jakkolwiek ww. skomplikowane mechanizmy prowadzą do starzenia, ostatecznie podczas realizacji tego procesu następuje zatrzymanie cyklu komórkowego przy jednocześnie zachowanej aktywności metabolicznej, co może mieć także swoje negatywne implikacje.

Zagrożenia związane z procesem starzenia się komórek

Skuteczność terapii przeciwnowotworowej poprzez indukcję starzenia wymaga nieodwracalnego zahamowania progresji cyklu komórek nowotworowych. Jednakże, pojawiają się doniesienia, iż w pewnych warunkach dochodzi do przełamania programu starzenia komórek, czy też raczej zainicjowany zostaje jedynie stan przypominający starzenie, niegwarantujący pełnego zatrzymania cyklu komórkowego ani w fazie G₁, ani G₂ [2, 18, 25, 46, 76, 77]. Jeśli w tej sytuacji nie nastąpi również aktywacja punktu kontrolnego wrzeciona podziałowego, który jest związany ze śmiercią komórki poprzez katastrofę mitotyczną bądź też śmierć innego rodzaju, wówczas poliploidalna komórka nowotworowa może podlegać dalszym podziałom, np. na drodze neozy. Zaproponowano, że zjawisko to może występować niesynchronicznie w gigantycznych poliploidalnych komórkach nowotworowych, z których, na skutek kariokinezy bez naruszenia otoczki jądrowej i na skutek asymetrycznej cytokinezy, powstaje szereg aneuploidalnych komórek potomnych aktywnych mitotycznie, podlegających ostatecznie kolejnym cyklom neotycznym. W ten sposób utrzymana zostaje pula komórek odtwarzających nowotwór, co więcej, proces ten najprawdopodobniej determinuje różnorodność genetyczną i przyczynia się do oporności komórek nowotworowych na chemioterapię [78, 79]. Dlatego też kluczowe wydaje się określenie czynników decydujących dla nieodwracalnego stanu starzenia się komórek nowotworowych.

Proces ten na poziomie molekularnym powinien charakteryzować się przede wszystkim zahamowaniem ekspresji genów odpowiedzialnych za proliferację, onkogenów oraz jednoczesną aktywacją wielu inhibitorów wzrostu [2]. Pewne prace wskazują, że $p16^{Ink4a}$ posiada szczególnie istotne znaczenie dla podtrzymania procesu starzenia [7, 18, 49, 69, 77], stanowiąc kolejną obok p53 barierę dla transformacji nowotworowej i czynnik wpływający wraz z pRb na reorganizację chromatyny. Jednakże w liniach komórek nowotworowych nie wykazujących ekspresji $p16^{Ink4a}$ może również występować stabilne starzenie, związane z działaniem innych genów hamujących wzrost, między innymi p53 i $p21^{Ink4a}$ [2]. Podobnie, dla supresji nowotworu w mysim modelu raka piersi bardziej istotna jest funkcjonalna ścieżka p19^{Arf}/p53, niż aktywność $p16^{Ink4a}$ [76]. Natomiast w fibroblastach ludzkich zakłócenie ścieżki p53/p21^{Cip1/Waf1/Sdi1} poprzez ekspresję onkogenego E6 wiąże się z wystąpieniem jedynie fenotypowych cech starzenia, bez zahamowania cyklu komórkowego, mimo aktywności pRb i $p16^{Ink4a}$ [19]. Z pewnością, w zależności od typu komórek, inicjacja/utrzymanie starzenia indukowanego różnymi czynnikami wymagać będzie innego względnego udziału ścieżek p53 i pRb. Co więcej, ponieważ dowiedziono, iż ekspresja towarzyszących starzeniu genów regulujących wzrost może mieć znaczenie prognostyczne, dopiero szczegółowa ocena ekspresji wielu genów, uwzględniająca także ich epigenetyczne modulacje, daje szansę zidentyfikowania markerów charakteryzujących stabilny proces starzenia w określonych warunkach [80].

Dodatkowo, zgodnie z hipotezą antagonistycznej plejotropii, te same mechanizmy, które w młodym organizmie skutecznie zabezpieczają przed nowotworzeniem, wraz z wiekiem mogą sprzyjać rozwojowi chorób wieku podeszłego oraz raka [81]. Z jednej strony, nagromadzenie w ciągu dłuższego życia większej puli starzejących się komórek prawdopodobnie przyczynia się do upośledzenia prawidłowych funkcji tkanek i narządów, a zatem do różnego rodzaju chorób degeneracyjnych [81-83]. Komórki starzejące się pozostają jednocześnie aktywne metabolicznie, wydzielając do środowiska czynniki nie tylko hamujące, ale również sprzyjające karcynogenezie, takie jak: cytokiny prozapalne i czynniki wzrostu, enzymy przekształcające macierz pozakomórkową oraz czynniki o aktywności antyapoptotycznej i angiogennej [2, 3, 84, 85]. Z drugiej strony, nagromadzenie się mutacji i zmian epigenetycznych na poziomie komórkowym może zaburzać prawidłowe mechanizmy supresorowe, zwiększając tym samym ryzyko przełamania programu starzenia, co z kolei mogłoby raczej promować proces neozy.

Podsumowanie i perspektywy

Reasumując, wprawdzie indukowanie starzenia komórek nowotworowych wydaje się atrakcyjną, alternatywną metodą leczenia nowotworów, jednakże skuteczne i bezpieczne wykorzystanie tego podejścia wymagałoby możliwie jak największej redukcji potencjalnych skutków ubocznych. Ostateczny cel powinno zatem stanowić uzy-

skanie w komórkach nowotworowych nieodwracalnego procesu starzenia, który byłby utrzymywany dzięki aktywności inhibitorów wzrostu, bez jednoczesnego pobudzenia czynników sprzyjających nowotworzeniu, czy chorobom wieku podeszłego. Dlatego też w ocenie przydatności takiego rozwiązania w leczeniu nowotworów należy przede wszystkim uwzględnić trwałość zatrzymania progresji cyklu komórkowego oraz relatywną stymulację ekspresji genów kodujących białka o przeciwstawnej aktywności biologicznej – tj. zarówno białka supresorowe, jak i sprzyjające promocji nowotworu. Identyfikacja genów hamujących rozwój nowotworu może z kolei przyczynić się do znalezienia czynników efektywnie modulujących ich aktywność oraz do opracowania udoskonalonych systemów selekcji leków przeciwnowotworowych. Istnieją bowiem sugestie, iż optymalny dobór czynników indukujących starzenie umożliwia eliminację negatywnych składników omawianego procesu, czego przykładem może być działanie retinoidów na komórki linii MCF-7 z raka piersi [45]. Jednocześnie, nawet przejściowa reaktywacja określonych ścieżek starzenia może znacząco wpływać na skuteczność terapii przeciwnowotworowej *in vivo* [86]. W tej sytuacji racjonalnym podejściem wydaje się terapia celowana, związana z doбором określonych leków dla nowotworów powstałych wskutek specyficznych mutacji bądź modyfikacji epigenetycznych w genach supresorowych. Pomimo, że kwestią nierozstrzygniętą pozostaje również dalszy los starzejących się komórek, czy sposób skierowania ich na drogę śmierci, ostatnie wyniki badań wskazują, że w eliminacji takich komórek *in vivo* istotną rolę mogą odgrywać komponenty wrodzonej odpowiedzi immunologicznej [87].

Starzenie na poziomie komórki funkcjonuje nie tylko jako naturalna bariera, której pominięcie przyczynia się do transformacji nowotworowej, ale jednocześnie badania *in vivo* podkreślają znaczenie tego procesu dla rezultatów terapii przeciwnowotworowej. Stąd też lepsze rozumienie mechanizmów niezbędnych dla jego indukcji w określonych warunkach, z uwzględnieniem i wyeliminowaniem potencjalnych zagrożeń, może przyczynić się do wykorzystania pozytywnych właściwości starzenia w nowoczesnych strategiach walki z rakiem. Jednakże, przed rozpoczęciem badań na pacjentach, a następnie wdrożeniem terapii klinicznej, konieczne jest dokładniejsze poznanie molekularnych podstaw procesu starzenia komórek nowotworowych, czynników decydujących o jego nieodwracalnym charakterze, jak również opracowanie markerów, które definiują stabilność starzenia komórkowego i skuteczność leczenia różnych rodzajów nowotworów w badaniach z użyciem modeli zwierzęcych.

Mgr Anna Litwiniec

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz
e-mail: annalitiniec@wp.pl

Piśmiennictwo

- Fang L, Igarashi M, Leung J i wsp. p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53. *Oncogene* 1999; 18: 2789-97.
- Chang B-D, Swift ME, Shen M i wsp. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 389-94.
- Parrinello S, Coppe J-P, Krtolica A i wsp. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci* 2005; 118: 485-96.
- Węsierska-Gądek J, Wojciechowski J, Ranftler C i wsp. Role of p53 tumor suppressor in ageing: regulation of transient cell cycle arrest and terminal senescence. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56: 15-28.
- Takahashi A, Ohtani N, Yamakoshi K i wsp. Mitogenic signalling and the p16^{INK4a}-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 1291-7.
- Dimri GP, Itahana K, Acosta M i wsp. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14^{ARF} tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 273-85.
- Narita M, Nunez S, Heard E i wsp. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003; 113: 703-16.
- Dimri GP, Lee X, Basile G i wsp. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 9363-7.
- Hayflick L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-36.
- Aisner DL, Wright WE, Shay JW. Telomerase regulation: not just flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 80-5.
- Jones CJ, Kipling D, Morris M i wsp. Evidence for a telomere-independent "clock" limiting RAS oncogene-driven proliferation of human thyroid epithelial cells. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 5690-9.
- Michaloglou C, Vredeveld LCW, Soengas MS i wsp. BRAF^{E600}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005; 436: 720-4.
- Chang B-D, Broude EV, Dokmanovic M i wsp. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res* 1999; 59: 3761-7.
- Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 2004; 23: 2919-33.
- Eom Y-W, Kim MA, Park SS i wsp. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene* 2005; 24: 4765-77.
- Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A i wsp. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 2006; 444: 638-42.
- Chen Z, Trotman LC, Shaffer D i wsp. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 2005; 436: 725-30.
- Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H i wsp. Cellular senescence in naevi and immortalization in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer* 2006; 95: 496-505.
- Dulić V, Beney G-E, Frebourg G i wsp. Uncoupling between phenotypic senescence and cell cycle arrest in aging p21-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 6741-54.
- Bartkova J, Hořejší Z, Koed K i wsp. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005; 434: 864-70.
- Braig M, Lee S, Loddenkemper C i wsp. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 2005; 436: 660-5.
- te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L i wsp. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2002; 62: 1876-83.
- Collado M, Gil J, Efeyan A i wsp. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005; 436: 642.
- Schmitt CA, Fridman JS, Yang M i wsp. A senescence program controlled by p53 and p16^{INK4a} contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 2002; 109: 335-46.
- Roberson RS, Kussick SJ, Vallieres E i wsp. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res* 2005; 65: 2795-803.
- Rebbaa A, Zheng X, Chou PM i wsp. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene* 2003; 22: 2805-11.

27. Chang B-D, Xuan Y, Broude EV i wsp. Role of p53 and p21^{waf1/cip1} in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 1999; 18: 4808-18.
28. Wang X, Wong SCH, Pan J i wsp. Evidence of cisplatin-induced senescence-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res* 1998; 58: 5019-22.
29. Rebbaa A. Targeting senescence pathways to reverse drug resistance in cancer. *Cancer Lett* 2005; 219: 1-13.
30. Feldser DM, Greider CW. Short telomeres limit tumor progression *in vivo* by inducing senescence. *Cancer Cell* 2007; 11: 461-9.
31. Douarre C, Gomez D, Morjani H i wsp. Overexpression of Bcl-2 is associated with apoptotic resistance to the G-quadruplex ligand 12459 but is not sufficient to confer resistance to long-term senescence. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 2192-203.
32. Zheng X, Chou PM, Mirkin BL i wsp. Senescence-initiated reversal of drug resistance: specific role of cathepsin L. *Cancer Res* 2004; 64: 1773-80.
33. Goodwin EC, Yang E, Lee C-J i wsp. Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10978-83.
34. Hong S-H, Hong B-S, Kim D-C i wsp. Involvement of mitogen-activated protein kinases and p21^{waf1} in hydroxyurea-induced G1 arrest and senescence of McA-RH7777 rat hepatoma cell line. *Exp Mol Med* 2004; 36: 493-8.
35. Crescenzi E, Palumbo G, Brady HJM. Roscovitine modulates DNA repair and senescence: implications for combination chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8158-71.
36. Mirzayans R, Scott A, Cameron M i wsp. Induction of accelerated senescence by γ radiation in human solid tumor-derived cell lines expressing wild-type TP53. *Radiat Res* 2005; 163: 53-62.
37. Behrend L, Mohr A, Dick T i wsp. Manganese superoxide dismutase induces p53-dependent senescence in colorectal cancer cells. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 7758-69.
38. Kwak IH, Kim HS, Choi OR i wsp. Nuclear accumulation of globular actin as a cellular senescence marker. *Cancer Res* 2004; 64: 572-80.
39. Buckley S, Shi W, Driscoll B i wsp. BMP4 signaling induces senescence and modulates the oncogenic phenotype of A549 lung adenocarcinoma cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: L81-6.
40. Wells SI, Francis DA, Karpova AY i wsp. Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21^{CIP}-dependent pathways. *EMBO J* 2000; 19: 5762-71.
41. Chiu C-C, Li C-H, Ung M-W i wsp. Etoposide (VP-16) elicits apoptosis following prolonged G₂-M cell arrest in p53-mutated human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett* 2005; 223: 249-58.
42. Jackson JG, Pereira-Smith OM. Primary and compensatory roles for RB family members at cell cycle gene promoters that are deacetylated and downregulated in doxorubicin-induced senescence of breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 2501-10.
43. Marusyk A, Wheeler LJ, Mathews CK i wsp. p53 mediates senescence-like arrest induced by chronic replicational stress. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 5336-51.
44. Klein LE, Freeze BS, Smith AB III i wsp. The microtubule stabilizing agent discodermolide is a potent inducer of accelerated cell senescence. *Cell Cycle* 2005; 4: 501-7.
45. Roninson IB, Dokmanovic M. Induction of senescence-associated growth inhibitors in the tumor-suppressive function of retinoids. *J Cell Biochem* 2003; 88: 83-94.
46. Li G-Z, Eller MS, Hanna K i wsp. Signaling pathway requirements for induction of senescence by telomere homolog oligonucleotides. *Exp Cell Res* 2004; 301: 189-200.
47. Yaar M, Eller MS, Panova I i wsp. Telomeric DNA induces apoptosis and senescence of human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R13.
48. Gowan SM, Harrison JR, Patterson L i wsp. A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting *in vitro* and *in vivo* antitumor activity. *Mol Pharmacol* 2002; 61: 1154-62.
49. Incles CM, Schultes CM, Kempinski H i wsp. A G-quadruplex telomere targeting agent produces p16-associated senescence and chromosomal fusions in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 1201-6.
50. Ozturk N, Erdal E, Mumcuoglu M i wsp. Reprogramming of replicative senescence in hepatocellular carcinoma-derived cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2178-83.
51. Negrini M, Ferracin M, Sabbioni S i wsp. MicroRNAs in human cancer: from research to therapy. *J Cell Sci* 2007; 120: 1833-40.
52. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M i wsp. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 15472-7.
53. Sasaki M, Honda T, Yamada H i wsp. Evidence for multiple pathways to cellular senescence. *Cancer Res* 1994; 54: 6090-3.
54. Jacobs JLL, de Lange T. Significant role for p16^{INK4a} in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr Biol* 2004; 14: 2302-8.
55. Aliouat-Denis CM, Dendouga N, Van den Wyngaert I i wsp. p53-independent regulation of p21^{waf1/Cip1} expression and senescence by Chk2. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 627-34.
56. Kapić A, Helmbold H, Reimer R i wsp. Cooperation between p53 and p130(Rb2) in induction of cellular senescence. *Cell Death Differ* 2006; 13: 324-34.
57. Psyrrri A, DeFilippis RA, Edwards APB i wsp. Role of the retinoblastoma pathway in senescence triggered by repression of the human papillomavirus E7 protein in cervical carcinoma cells. *Cancer Res* 2004; 64: 3079-86.
58. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002; 2: 103-12.
59. Iwasa H, Han J, Ishikawa F. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells* 2003; 8: 131-44.
60. Wang W, Chen JX, Liao R i wsp. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic *ras*-induced premature senescence. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 3389-403.
61. Tremain R, Marko M, Kinnimulki V i wsp. Defects in TGF β signaling overcome senescence of mouse keratinocytes expressing *v-ras*^{Hs}. *Oncogene* 2000; 19: 1698-709.
62. Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ i wsp. Opposing effects of Est and Id proteins on p16^{INK4a} expression during cellular senescence. *Nature* 2001; 409: 1067-70.
63. Bulavin DV, Demidov ON, Saito S i wsp. Amplification of *PPM1D* in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat Genet* 2002; 31: 210-5.
64. Bischof O, Kirsh O, Pearson M i wsp. Deconstructing PML-induced premature senescence. *EMBO J* 2002; 21: 3358-69.
65. Gaumont-Leclerc MF, Mukhopadhyay UK, Goumard S i wsp. PEA-15 is inhibited by adenovirus E1A and plays a role in ERK nuclear export and Ras-induced senescence. *J Biol Chem* 2004; 279: 46802-9.
66. Mallette FA, Gaumont-Leclerc M-F, Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* 2007; 21: 43-8.
67. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: *ARF-INK4a* locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 1998; 92: 725-34.
68. Fang S, Jensen JP, Ludwig RL i wsp. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* 2000; 275: 8945-51.
69. Stein GH, Drullinger LF, Souillard A i wsp. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2109-17.
70. McConnell BB, Gregory FJ, Stott FJ i wsp. Induced expression of p16^{INK4a} inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassembly of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1981-9.
71. Berthet C, Klarman KD, Hilton MB i wsp. Combined loss of Cdk2 and Cdk4 results in embryonic lethality and Rb hypophosphorylation. *Dev Cell* 2006; 10: 563-73.
72. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene* 2006; 25: 5220-7.
73. Rayman JB, Takahashi Y, Indjeian VB i wsp. E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression *in vivo* by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev* 2002; 16: 933-47.
74. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 961-76.
75. Zheng QH, Ma LW, Zhu WG i wsp. p21^{waf1/Cip1} plays a critical role in modulating senescence through changes of DNA methylation. *J Cell Biochem* 2006; 98: 1230-48.
76. Debies MT, Gestl SA, Mathers JL i wsp. Tumor escape in a *Wnt1*-dependent mouse breast cancer model is enabled by p19^{Arf}/p53 pathway lesions but not p16^{INK4a} loss. *J Clin Invest* 2007; 118: 51-63.
77. Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F i wsp. Reversal of human senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 2003; 22: 4212-22.
78. Sundaram M, Guernsey DL, Rajaraman MM i wsp. Neosis: a novel type of cell division in cancer. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 207-18.
79. Rajaraman R, Guernsey DL, Rajaraman MM i wsp. Neosis – a parasexual somatic reduction division in cancer. *Int J Hum Genet* 2007; 7: 29-48.
80. Wells SI, Aronow BJ, Wise TM i wsp. Transcriptome signature of irreversible senescence in human papillomavirus-positive cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 7093-8.

81. Campisi J. Aging, tumor suppression and cancer: high wire-act! *Mech Ageing Dev* 2005; 126: 51-8.
82. Martin JA, Buckwalter JA. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biogerontology* 2002; 3: 257-64.
83. Kurz DJ, Kloeckener-Gruissem B, Akhmedov A i wsp. Degenerative aortic valve stenosis, but not coronary disease, is associated with shorter telomere length in the elderly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: e114-7.
84. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S i wsp. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12072-7.
85. Bavik C, Coleman I, Dean JP i wsp. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res* 2006; 66: 794-802.
86. Vassilev LT, Vu BT, Graves B i wsp. *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004; 303: 844-8.
87. Xue W, Zender L, Miething C i wsp. Senescence and tumor clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 2007; 445: 656-60.

Otrzymano: 9 lipca 2008 r.

Przyjęto do druku: 19 września 2008 r.