



Mechanizm śmierci i starzenia ludzkich limfocytów T
– rola ścieżki sygnalizacyjnej odpowiedzi na
uszkodzenia DNA (DDR)

Zbigniew Korwek

Rozprawa doktorska
wykonana w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia
promotor: Prof. dr hab. Ewa Sikora

Warszawa, 2012

Pragnę serdecznie podziękować

Mojemu promotorowi, Prof. Ewie Sikorze
za opiekę, wszechstronną pomoc i poświęcony czas

Annie Bielak-Żmijewskiej
Grażynie Mosieniak
Oldze Alster
za pomoc w przygotowaniu tej pracy

oraz wszystkim koleżankom z
Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia i Pracowni Cytometrii
za miłą atmosferę pracy

Spis treści

1.	WYKAZ WYBRANYCH SKRÓTÓW:	6
2.	WSTĘP	10
2.1.	LIMFOCYTY T	10
2.2.	ODPOWIEDŹ NA USZKODZENIA DNA	11
2.3.	ŹRÓDŁA USZKODZEŃ DNA	12
2.4.	AKTYWACJA SZLAKU DDR	13
2.4.1	<i>Detekcja uszkodzeń DNA</i>	14
2.4.1.1.	Aktywacja kinazy ATM	14
2.4.1.2.	Aktywacja ATR	15
2.4.2	<i>Przekazanie sygnału od uszkodzeń – formowanie skupisk białek</i>	16
2.4.3	<i>Kinazy efektorowe</i>	17
2.4.4	<i>Białka efektorowe – p53</i>	18
2.4.5	<i>Inhibitor cyklu komórkowego – białko p21</i>	21
2.5.	SKUTKI AKTYWACJI SZLAKU DDR	23
2.5.1	<i>Naprawa uszkodzeń DNA</i>	23
2.5.2	<i>Apoptoza</i>	24
2.5.2.1.	Szlak wewnętrzny	26
2.5.2.2.	Szlak zewnętrzny	27
2.5.2.3.	Alternatywny szlak apoptozy – kaspaza-2	28
2.5.2.4.	Rola apoptozy w rozwoju i homeostazie limfocytów T	29
2.5.3	<i>Starzenie komórkowe</i>	30
3.	CELE I ZAŁOŻENIA	33
4.	MATERIAŁY I METODY	35
4.1.	MATERIAŁY	35
4.1.1.	<i>Odczynniki</i>	35
4.1.2.	<i>Przeciwciała</i>	37
4.1.3.	<i>Zestawy</i>	38
4.1.4.	<i>Roztwory</i>	38
4.1.4.1	Roztwory w izolacji limfocytów CD3	38
4.1.4.2	Roztwory do traktowania komórek	38
4.1.4.3	Roztwory stosowane w preparatyce mikroskopowej	38
4.1.4.4	Roztwory stosowane w oznaczaniu aktywności kwaśnej β -galaktozydazy	39
4.1.4.5	Roztwory stosowane w metodzie FADU	39
4.1.4.6	Roztwory stosowane metodzie Western blot	39
4.1.5.	<i>Żele poliakrylamidowe</i>	41
4.1.6.	<i>Wykorzystywany sprzęt i oprogramowanie</i>	41
4.2.	METODY	41
4.2.1.	<i>Materiał badawczy-komórki i linie komórkowe</i>	41

4.2.2.	<i>Izolacja limfocytów CD3+ z frakcji leukocytarno-płytkowej</i>	42
4.2.3.	<i>Traktowanie komórek</i>	43
4.2.4.	<i>Indukcja starzenia replikacyjnego limfocytów T in vitro.</i>	44
4.2.5.	<i>Indukcja przyspieszonego starzenia limfocytów T niskimi dawkami etopozydu.</i>	44
4.2.6.	<i>Oznaczenie fenotypu limfocytów T</i>	45
4.2.7.	<i>Analiza poziomu śmierci komórkowej przy użyciu Aneksyny V i 7-AAD</i>	45
4.2.8.	<i>Oznaczenie poziomu aktywnej kaspazy-2 w żywych komórkach</i>	46
4.2.9.	<i>Oznaczenie aktywności SA-β-galaktozydazy</i>	47
4.2.10.	<i>Barwienia immunocytochemiczne</i>	47
4.2.11.	<i>Analiza poziomu białek techniką Western Blotting</i>	48
4.2.11.1	<i>Izolacja białka</i>	48
4.2.11.2	<i>Wyrównanie ilości białka</i>	48
4.2.11.3	<i>Western Blotting</i>	49
4.2.11.4	<i>Stripping</i>	49
4.2.12.	<i>Detekcja uszkodzeń DNA techniką FADU</i>	50
4.2.13.	<i>Pomiar ilości DNA w komórce - cykl komórkowy</i>	51
4.2.14.	<i>Oznaczenie poziomu aktywnego białka BAX</i>	51
4.2.15.	<i>Analiza statystyczna</i>	52
5.	WYNIKI	53
5.1.	USZKODZENIA DNA PROWADZĄ DO AKTYWACJI SZLAKU DDR I APOPTOZY LUDZKICH LIMFOCYTÓW T	
	53	
5.1.1.	<i>Analiza ilości DNA w spoczynkowych limfocytach T i komórkach linii Jurkat</i>	53
5.1.2.	<i>Pomiar markerów śmierci komórkowej spoczynkowych limfocytów T i komórek linii Jurkat traktowanych etopozydem.</i>	54
5.1.3.	<i>Detekcja markerów podwójnych uszkodzeń DNA (γH2AX i 53BP1) w komórkach traktowanych etopozydem</i>	59
5.1.4.	<i>Poziom uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem mierzony metodą FADU.</i>	61
5.1.5.	<i>Szlak DDR w spoczynkowych limfocytach T i komórkach linii Jurkat traktowanych etopozydem.</i>	63
5.2.	WPLYW INHIBITORA ATM NA AKTYWACJĘ SZLAKU DDR ORAZ LOS KOMÓRKI.....	64
5.2.1.	<i>Wpływ KU-55399 na fosforylację kinazy ATM indukowaną etopozydem.</i>	64
5.2.2.	<i>Wpływ KU-55933 na poziom uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem.</i>	66
5.2.3.	<i>Wpływ KU-55933 na tworzenie skupisk γH2AX i 53BP1 w spoczynkowych limfocytach T traktowanych etopozydem.</i>	67
5.2.4.	<i>Aktywacja szlaku DDR w limfocytach T traktowanych etopozydem i KU-55933.</i>	69
5.2.5.	<i>Wpływ KU55933 na apoptozę spoczynkowych limfocytów T indukowaną etopozydem.</i>	70
5.3.	INDUKCJA ŚMIERCI KURKUMINĄ SPOCZYNKOWYCH LIMFOCYTÓW T I KOMÓREK LINII JURKAT.	73
5.3.1.	<i>Wpływ kurkuminy na przeżywalność spoczynkowych limfocytów T i komórek linii Jurkat.</i>	73
5.3.2.	<i>Markery uszkodzeń DNA w komórkach traktowanych kurkumina</i>	77

5.3.3.	<i>Poziom uszkodzeń DNA w komórkach traktowanych kurkumina mierzony metodą FADU.</i>	78
5.3.4.	<i>Aktywacja szlaku DDR w komórkach traktowanych kurkumina.</i>	80
5.4.	ROLA ŚCIEŻKI SYGNALIZACYJNEJ USZKODZEŃ DNA (DDR) W ŚMIERCI I STARZENIU LUDZKICH	
	LIMFOCYTÓW T INDUKOWANYCH STRESEM REPLIKACYJNYM <i>IN VITRO</i> .	82
5.4.1.	<i>Stymulacja limfocytów T niespecyficznym miogendem PHA.</i>	82
5.4.2.	<i>Starzenie replikacyjne limfocytów T in vitro.</i>	82
5.4.3.	<i>Uszkodzenia DNA w limfocytach T ulegających starzeniu replikacyjnemu.</i>	84
5.4.4.	<i>Aktywacji szlaku DDR podczas starzenia replikacyjnego limfocytów T.</i>	86
5.4.5.	<i>Apoptoza limfocytów T podczas starzenia replikacyjnego.</i>	87
5.5.	PRZYŚPIESZONE STARZENIE AKTYWOWANYCH LIMFOCYTÓW T INDUKOWANE ETOPOZYDEM	88
5.5.1.	<i>Przyspieszone starzenie indukowane stresem - SIPS.</i>	88
5.5.2.	<i>Indeks apoptotyczny aktywowanych limfocytów T traktowanych etopozydem.</i>	89
5.5.3.	<i>Markery uszkodzeń DNA w aktywowanych limfocytach T traktowanych niską dawką etopozydu.</i>	90
5.5.3.1	<i>Aktywacja szlaku DDR w aktywowanych limfocytach T traktowanych niską dawką etopozydu.</i>	91
5.5.4.	<i>Aktywność SA-β-galaktozydazy w aktywowanych limfocytów T hodowanych w obecności etopozydu.</i>	92
5.5.5.	<i>Indeks apoptotyczny aktywowanych limfocytów T hodowanych w obecności etopozydu</i>	94
5.5.6.	<i>Udział procentowy subpopulacji limfocytów T podczas SIPS.</i>	95
6.	DYSKUSJA	98
6.1.	ETPOZYD JAKO ZWIĄZEK INDUKUJĄCY USZKODZENIA DNA I AKTYWACJĘ SZLAKU DDR PROWADZĄCEGO DO APOPTOZY SPOCZYNKOWYCH LIMFOCYTÓW T.	98
6.2.	INHIBITOR KINAZY ATM – KU-55933 REDUKUJE USZKODZENIA DNA I APOPTOZĘ SPOCZYNKOWYCH LIMFOCYTÓW T TRAKTOWANYCH ETOPOZYDEM.	102
6.3.	KURKUMINA INDUKUJE ŚMIERĆ SPOCZYNKOWYCH LIMFOCYTÓW T ORAZ KOMÓREK LINII JURKAT W SPOSÓB NIE ZALEŻNY OD USZKODZEŃ DNA	105
6.4.	ROLA SZLAKU DDR W STARZENIU REPLIKACYJNYM LIMFOCYTÓW T IN VITRO.	109
6.5.	STARZENIE AKTYWOWANYCH LIMFOCYTÓW T INDUKOWANYCH ETOPOZYDEM.	112
7.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	114
8.	STRESZCZENIE	116
9.	BIBLIOGRAFIA	118

1. Wykaz wybranych skrótów:

- 7-AAD** – *7-aminoactinomycin D*, 7-aminoaktynomycyna D
- ACAD** – *autonomous activated cell death*, śmierć przez zaniedbanie
- AICD** – *activation-induced cell death*, śmierć komórki w wyniku aktywacji
- AIDS** – *acquired immunodeficiency syndrome*
- AIF** – *apoptosis-inducing factor*, czynnik indukujący apoptozę
- AKT** – *protein kinase B*, kinaza białkowa B
- APAF-1** – *Apoptotic protease activating factor 1*, białko wchodzące w skład apoptosomu
- APS** – *ammonium sulfate*, nadsiarczan amonu
- AP-1** – *activator protein 1*
- ASK1** – *apoptosis signal-regulating kinase 1*
- ASPP** – *apoptosis-stimulating protein of p53*
- A-T** – *ataxia telangiectasia*
- ATM** – *ataxia telangiectasia mutated*, kinaza białkowa aktywowana uszkodzeniami DNA
- ATR** – *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*, kinaza białkowa aktywowana uszkodzeniami DNA
- ATR-ATRIP** – *ATR interacting protein*
- BAX** – *Bcl-2-associated X protein*, proapoptotyczne białko z rodziny Bcl-2
- BCL-X_L** – *B-cell lymphoma-extra large*, antyapoptotyczne białko z rodziny Bcl-2
- BCL-2** – *B-cell leukaemia/lymphoma 2*, antyapoptotyczne białko z rodziny Bcl-2
- BER** – *base excision repair*, naprawa przez wycinanie zasad
- BH3** – *Bcl-2-homology domain 3*, 3 region homologii białek z rodziny Bcl-2
- 53BP1** – *p53 binding protein*
- BRCA1** – *breast cancer type 1 susceptibility protein*
- BRCA2** – *breast cancer type 2 susceptibility protein*
- BSA** – *bovine serum albumin*, albumina surowicy wołowej
- CAD** – *caspase-activated DNase*, DNaza aktywowana przez kaspazę
- CARD** – *caspase activation and recruitment domain*
- CBP** – *CREB-binding protein*
- CD** – *cluster of differentiation*, kompleks różnicowania
- Cdc25** – *cell division cycle 25*
- CDK** – *cyclin-dependent kinase*, kinaza zależna od cyklin
- c-FLIP** – *the caspase 8 homologue FLICE-inhibitory protein*, inhibitor kaspazy 8

- Chk1** – *checkpoint kinase 1*, kinaza białkowa odpowiedzialna za przekazywanie sygnału o uszkodzeniach DNA
- Chk2** – *checkpoint kinase 2*, kinaza białkowa odpowiedzialna za przekazywanie sygnału o uszkodzeniach DNA
- CK2** – *casein kinase II*
- CMV** – *cytomegalovirus*, wirus cytomegalii
- COX-2** – *cyclooxygenase 2*, cyklooksygenaza 2
- DNA** – *deoxyribonucleic acid*, kwas deoksyrybonukleinowy
- DSB** – *double strand break*, dwuniciowe uszkodzenie DNA
- DD** – *death domain*, domena śmierci
- DDR** – *DNA damage response*, odpowiedź na uszkodzenia DNA
- DED** – *death-effector domain*, domena efektorowa śmierci
- DISC** – *death-inducing signaling complex*
- DMSO** – *dimethyl sulfoxide*, dimetylosulfotlenek
- DNA-PKcs** – *DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*
- DYRK2** – *Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2*
- ECL** – *enhanced chemiluminescence*
- E2F-1** – *elongation factor 2*, czynnik elongacyjny 2
- ERK** – *extracellular signal-regulated kinases*
- FADD** – *Fas-associated protein with death domain*, białko adaptorowe wiążące się z domenami śmierci
- FADU** – *Fluorimetric detection of Alkaline DNA Unwinding*
- FANCI** – *BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1 (BRIP1)*
- FBS** – *fetal bovine serum*, wołowa surowica płodowa
- FSC** – *forward scatter*
- γH2AX** – fosforylowana forma histonu H2AX w pozycji seryny 139
- HIPK2** – *haematopoietic progenitory kinase 2*
- HIV** – *human immunodeficiency virus*, ludzki wirus niedoboru odporności
- hMof** – *histone acetyltransferase*
- HO-1** – *heme oxygenase 1*, oksygenaza hemowa 1
- HR** – *homologous recombination*, rekombinacja homologiczna
- HSV** – *herpes simplex virus*, wirus opryszczki pospolitej
- IAP** – *inhibitor of apoptosis protein*, białko będące inhibitorem kaspaz

- ICAD** – *inhibitor of caspase-activated DNase*, inhibitor DNAzy aktywowanej przez kaspazę
- ICAM-1** – *Intercellular Adhesion Molecule 1*
- IKK** – *IκB kinase*, kinaza IκB
- LHD** – *liquid handling device*
- MAPK** – *mitogen-activated protein kinases*
- MCL-1** – *mantle cell lymphoma*
- MDC1** – *mediator of DNA damage checkpoint protein 1*
- MDM2** – *murine double minute gene 2*, białko wiążące p53
- MDMX** – białko wiążące p53
- MMR** – *mismatch repair*, naprawa niesparowanych zasad
- MOMP** – *mitochondrial outer membrane permeabilization*, uprzepuszczalnienie zewnętrznej błony mitochondrialnej
- MRN** – *protein complex consisting of: Mre11, Rad50 and Nbs1*, kompleks białkowy (Mre11, Rad50, Nbs1)
- NBS1** – *nijmegen breakage syndrome protein 1*
- NER** – *nucleotide-excision repair*, naprawa DNA przez wycinanie nukleotydów
- NF-κB** – *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
- NHEJ** – *non-homologous end joining*, łączenie niehomologicznych zakończeń
- OMI** – antagonist inhibitorów apoptozy IAPs
- PARP** – *poly (ADP-ribose) polymerase*, enzym biorący udział w naprawie DNA
- PBMC** – *peripheral blood mononuclear cell*, jednojądrzaste komórki krwi
- PBS** – *phosphate buffered saline*, bufor fosforanowy
- PCNA** – *Proliferating cell nuclear antigen*
- PE** – *phycoerythrin*, fikoerytryna
- PHA** – *phytohemagglutinin*, fitohemaglutynina
- PIDD** – *p53-induced protein with a death domain*
- PIKK** – *phosphoinositide 3-kinase-related kinase*
- Pirh2** – *p53 induced ring-H2 protein*
- RAD50** – DNA repair protein
- RAD51** – *human homolog of the E.coli RecA protein*, białko zaangażowane w naprawę uszkodzeń DNA
- RAIDD** – *receptor-interacting protein (RIP)-associated ICH1/CED-3-homologous protein with a death domain*

- RIP** – *receptor interacting protein*
- RIPK** – *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase*
- ROS** – *reactive oxygen species*, reaktywne formy tlenu
- RPA** – *replication protein A*
- SA- β -Gal** – *senescence associate β galactosidase*
- SAPKs** – *stress-activated protein kinases*
- SASP** – *Senescence Associated Secretory Phenotype*
- SDS** – *sodium dodecyl sulfate*, siarczan dodecyłu sodu
- SDS-PAGE** – *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*
- SIPS** – *stress induced premature senescence*, przyspieszone starzenie indukowane stresem
- Smac/DIABLO** – *second mitochondria derived activator of caspase/ direct IAP binding protein with low pI*
- SMC1** – *structural maintenance of chromosomes 1*
- SSB** – *single strand break*, jednoniciowe uszkodzenie DNA
- SSC** – *side scatter*
- ssDNA** – *single stranded DNA*, jednoniciowe DNA
- TAC** – *trimeric antibody complexes*, kompleks przeciwciał tetramerycznych
- TBP** – *TATA- binding protein*
- TCR** – *T cell receptor*, receptor limfocytów T
- Tip60** – *histon acetyltransferase*
- Top2 α ; Top2 β** – *topoisomerase 2alfa; topoisomerase 2beta*
- TopBP1** – *DNA topoisomerase 2-binding protein 1*
- tBID** – *truncated Bid*
- TBST** – *tris-buffered saline Tween-20*, bufor trisowy z Tween-20
- TEMED** – *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine*, N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
- TLR** – *Toll-like receptor*
- TNF** – *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy nowotworu
- TNFR1** – *tumor necrosis factor receptor 1*, receptor czynnika martwicy nowotworu
- TopBP1** – *DNA topoisomerase 2-binding protein 1*
- TRADD** – *tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*
- TRAF2** – *TNF receptor-associated factor 2*
- TRAIL** – *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
- VCAM-1** – *vascular cell adhesion protein 1*, cząsteczka adhezyjna komórek śródbłónka
- XIAP** – *X-linked inhibitor of apoptosis protein*

2. Wstęp

2.1. Limfocyty T

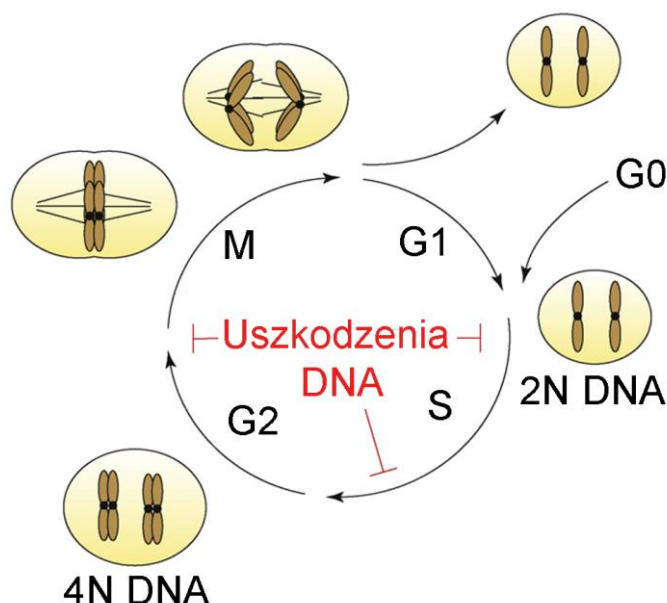
Limfocyty T biorą udział w odporności nabytej i stanowią ważną linię obrony organizmu przed patogenami. Do ich zadań należy: wspieranie odpowiedzi humoralnej (produkcji przeciwciał) i komórkowej, likwidacja komórek zainfekowanych wirusami lub nowotworowych oraz regulacja odpowiedzi odpornościowej. Cechą charakterystyczną limfocytów T jest występowanie na ich powierzchni cząsteczki CD3 oraz TCR. Powstają one w szpiku kostnym z komórek hematopoetycznych, skąd przedostają się do grasicy, gdzie następuje ich dalszy rozwój. Selekcja pozytywna i negatywna ma na celu eliminację komórek rozpoznających własne antygeny i prowadzi do powstania subpopulacji pojedynczo-pozytywnych limfocytów T CD4+ i CD8+ [1]. Ze względu na pełnioną funkcję limfocyty T można podzielić na trzy grupy: pomocnicze – promujące odpowiedź humoralną (Th2) lub komórkową (Th1), cytotoksyczne (Tc) – zabijające komórki zainfekowane patogenami i komórki nowotworowe oraz regulatorowe – hamujące odpowiedź odpornościową (Treg). Powstałe w grasicy spoczynkowe limfocyty T (naiwne, czyli takie, które nie napotkały aktywującego je antygeny) występują głównie w obwodowych narządach limfatycznych do momentu ich aktywacji przez antygeny patogenów. Antygenowo specyficzne komórki ulegają aktywacji i ekspansji klonalnej (prolifracji) oraz przemieszczają się do miejsca infekcji lub ognisk zapalnych. Po eliminacji zagrożenia duża liczba aktywowanych limfocytów T ulega apoptozie w celu zachowania homeostazy, co chroni przed rozwojem chorób autoimmunologicznych i nowotworów. Przeżywa tylko mała grupa długożyjących komórek pamięci, które zapewniają szybką odpowiedź w przypadku napotkania tego samego antygeny [2].

Powyższy opis w bardzo skrócony sposób przedstawia etapy życia limfocytów T, w których apoptoza odgrywa bardzo ważną rolę. Istnieje kilka mechanizmów śmierci limfocytów T związanych z aktywacją zewnętrznego oraz wewnętrznego szlaku apoptotycznego. Zewnętrzny jest związany z aktywacją powierzchniowych receptorów śmierci. Natomiast wewnętrzny może być indukowany różnego rodzaju czynnikami stresowymi, jak np. brak czynników wzrostowych [3]. Dodatkowo limfocyty T, jak również inne komórki organizmu, narażone są na różnego rodzaju szkodliwe czynniki prowadzące do śmierci komórkowej. Do tej grupy można zaliczyć uszkodzenia DNA indukowane przez związki cytotoksyczne, metabolizm komórki oraz przypadkowe błędy replikacji. Uszkodzenia

DNA powstają podczas skracania telomerów i wtedy mogą prowadzić do starzenia komórkowego.

2.2. Odpowiedź na uszkodzenia DNA

Informacja genetyczna zawarta w DNA jest bez wątpienia najcenniejszym składnikiem komórki. Jakiegokolwiek uszkodzenia DNA zagrażają nie tylko wiernemu przekazaniu informacji genetycznej kolejnym generacjom, ale także życiu całego organizmu. Dlatego komórki eukariotyczne wykształciły system monitorujący DNA, nazwany szlakiem odpowiedzi na uszkodzenia DNA – DDR (ang.: *DNA Damage Response*). Jest to zbiór złożonych odpowiedzi chroniących integralność genomu komórki [4], które poprzez białka detektorowe, rozpoznają uszkodzenia DNA i uruchamiają kaskadę przekazywania sygnału, aktywującą odpowiednią odpowiedź komórkową [5, 6]. Szlak DDR ma dwie różne, lecz skoordynowane funkcje: zapobiega lub zatrzymuje duplikacje, przez co uniemożliwia przekazanie uszkodzonego DNA do komórek potomnych oraz jednocześnie aktywuje mechanizmy naprawy uszkodzeń materiału genetycznego. Działania związane z zatrzymaniem cyklu komórkowego znane są jako punkty kontroli cyklu komórkowego. Komórki ssaków posiadają trzy główne punkty kontroli uszkodzeń DNA: G1/S, S i G2/M (Rys. 2.1.) [7]. Uruchomienie punktów kontroli, które wspólnie z mechanizmami naprawy nazywane jest odpowiedzią na uszkodzenia DNA, a aktywacja tej odpowiedzi może prowadzić do przeżycia lub śmierci komórki. Los komórki zależy od poziomu uszkodzeń DNA, sprawności systemów naprawczych oraz rodzaju komórki [8]. Jeżeli uszkodzenia są niewielkie, a komórka szybko i właściwie je naprawi, pozwala to przeżyć komórce i dalej prawidłowo funkcjonować. Natomiast, jeśli uszkodzenia są poważne, następuje eliminacja komórki w wyniku uruchomienia programowanej śmierci komórkowej – apoptozy [9]. Istnieje jeszcze jedna możliwość. W komórce z uszkodzonym DNA może dojść do nieodwracalnego zatrzymania cyklu komórkowego, zahamowania podziałów i komórka może ulec starzeniu. Powyższy opis dotyczy sytuacji, kiedy szlak DDR działa poprawnie. Jakiegokolwiek zaburzenia jego działania, niesprawne systemy naprawy, indukcji apoptozy lub starzenia są bardzo niebezpieczne, ponieważ mogą prowadzić do niestabilności genetycznej i transformacji nowotworowej [4].



Rys. 2.1. Punkty kontroli cyklu komórkowego. Komórki spoczynkowe (G0) pod wpływem czynników wzrostowych aktywujących cykl komórkowy, którego progresja może być zatrzymana pod wpływem uszkodzeń DNA. Wyróżnia się trzy główne punkty kontroli cyklu komórkowego G1/S, S i G2/M, w których następuje monitorowanie uszkodzeń DNA i uruchamianie szlaku DDR. Zmodyfikowane według [10]

2.3. Źródła uszkodzeń DNA

Limfocyty T, tak jak inne komórki organizmu, podczas swojego życia narażone są na różnorodne czynniki szkodliwe, które mogą powodować uszkodzenia DNA. Materiał genetyczny uszkodzany jest najczęściej podczas proliferacji komórek (replikacji DNA), zachodzącej w różnych fazach rozwoju limfocytów T. Począwszy od podziałów i różnicowania hematopoetycznych komórek macierzystych do dalszego różnicowania i aktywacji dojrzałych limfocytów [11]. Po wydostaniu się limfocytów T do krwioobiegu, okresy podziałów, różnicowania i dojrzewania rozdzielone są stadiami spoczynkowymi (zahamowanie proliferacji), w których podatność na indukcję uszkodzeń DNA jest niższa (brak replikacji DNA). Może to być pewnego rodzaju mechanizm ochrony komórek spoczynkowych przed mało toksycznymi czynnikami szkodliwymi. [12]. Jednakże odpowiednio duża dawka, bądź silny induktor jest w stanie generować uszkodzenia DNA również w komórkach spoczynkowych.

Czynniki uszkadzające DNA można podzielić na wewnętrzne – generowane spontanicznie przez metabolizm DNA i zewnętrzne – środowiskowe. Powodują one powstawanie różnego rodzaju zaburzeń (deaminację, depurynację, metylację, addukty i

pęknięcia nici DNA). Szacuje się, że w każdej komórce powstaje ponad 10^5 spontanicznych uszkodzeń DNA każdego dnia [13]. Źródłem uszkodzeń wewnętrznych generowanych w limfocytach mogą być molekularne mechanizmy zaangażowane w rozwój i dojrzewanie – programowana rearanżacja DNA V(D)J, błędy replikacji lub metabolizm komórki (reaktywne formy tlenu), który jest bardzo aktywny zwłaszcza podczas ostrej fazy odpowiedzi odpornościowej. Zewnętrzne uszkodzenia mogą pochodzić z fizycznych i chemicznych źródeł, na które komórki naszego organizmu narażone są podczas życia. Zaliczyć do nich można promieniowanie jonizujące, UV oraz różnorodne związki cytotoksyczne, które generują jednoniciowe (SSB) i dwuniciowe uszkodzenia DNA (DSB). Uszkodzenia DNA mogą być wynikiem bezpośredniego działania czynnika na łańcuch DNA lub powstawać poprzez zablokowanie replikacji i transkrypcji [14]. DSB są najgroźniejszymi uszkodzeniami DNA ponieważ brak jest komplementarnej matrycy służącej do naprawy. Nienaprawione mogą prowadzić do pęknięć chromosomów i translokacji, co jest związane z defektami w rozwoju limfocytów prowadzących do zaburzeń odporności i predyspozycji do nowotworów [4]. Należy również dodać, że gdy telomery, podczas starzenia replikacyjnego, skracają się do długości krytycznej, wyeksponowane końce chromosomów rozpoznawane są jako uszkodzenia DNA [15].

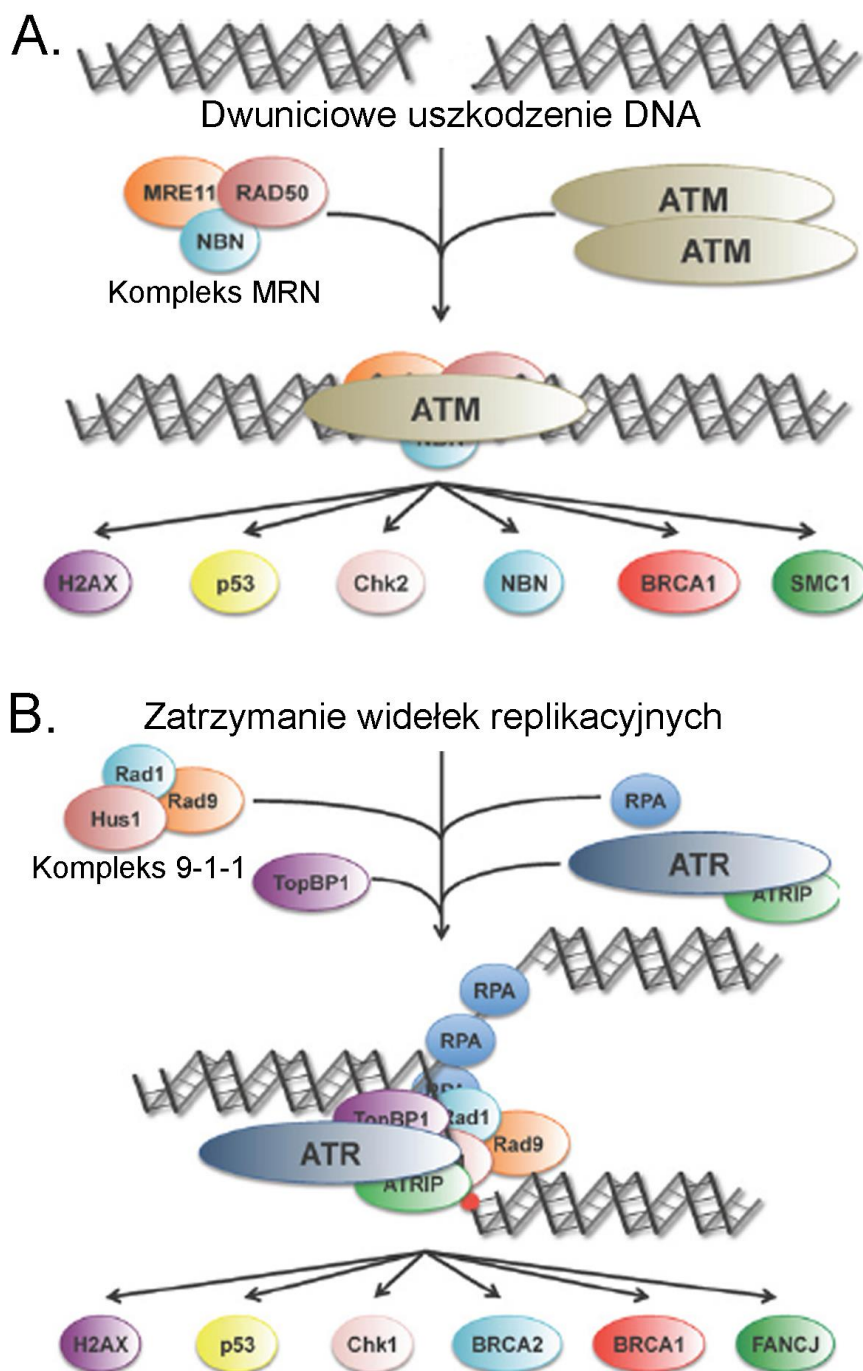
2.4. Aktywacja szlaku DDR

Centralnymi kinazami szlaku DDR są dwa duże, ściśle zachowane ewolucyjnie białka należące do rodziny PIKK (ang.: *phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase*): ATM i ATR. Kinaza ATM jest głównie aktywowana przez dwuniciowe uszkodzenia DNA [16] i działa podczas wszystkich faz cyklu komórkowego. Natomiast kinaza ATR bierze udział w przekazywaniu sygnału od jednoniciowych odcinków DNA, powstających w wyniku zatrzymania widełek replikacyjnych i jest aktywowana głównie podczas fazy S cyklu komórkowego [17-19]. ATM może również aktywować wiele białek należących do ścieżki ATR. W praktyce czynniki uszkadzające DNA mogą aktywować obie kinazy, co może świadczyć o przeplataniu się obu głównych ścieżek DDR w komórce [20]. Uszkodzenia DNA mogą również aktywować kinazę DNA-PK, która jest zaangażowana w procesy związane z naprawą DNA, regulacją cyklu i apoptozą [21].

2.4.1 Detekcja uszkodzeń DNA

2.4.1.1. Aktywacja kinazy ATM

Wykrycie DSB następuje bardzo szybko. Rozpoznanie i uruchomienie ścieżki sygnałowej od uszkodzenia wymaga wzajemnego oddziaływania między kompleksem MRN i ATM (Rys. 2.2A.). W procesie tym inicjatorową rolę odgrywa enzym PARP1, który katalizuje formowanie łańcucha poli(ADP-rybozy), ułatwia dokowanie kompleksu MRN do uszkodzenia DNA [22]. Kompleks MRN składa się z trzech białek: NBS1, MRE11 i RAD50. MRE11 wykazuje aktywność egzo- i endonukleazy i wraz z RAD50 ma zdolność do wiązania DNA. Natomiast NBS1 odpowiada za transportowanie kompleksu do jądra. RAD50 utrzymuje razem pęknięte końce nici DNA, podczas gdy MRE11, dzięki właściwościom nukleazy przetwarza wolne końce DSB. Gdy kompleks MRN zostanie przyłączony do miejsca podwójnego pęknięcia nici DNA, karboksylowy koniec białka NBS1 oddziałuje z kinazą ATM i rekrutuje ją do miejsca uszkodzenia DNA, gdzie następuje jej aktywacja [23]. Serynowo/treoninowa kinaza ATM w nieaktywnej formie występuje jako homodimer, który po rekrutacji do miejsca uszkodzenia DNA ulega autoaktywacji poprzez fosforylację. Autofosforylacji ulega seryna 1981, co prowadzi do rozpadu nieaktywnego dimeru na katalitycznie aktywne monomery [24-26]. W komórkach człowieka zostały zidentyfikowane dodatkowe miejsca autofosforylacji: Ser367 i Ser1893 niezbędne do aktywacji i funkcjonalności ATM [27]. Jednakże badania na myszach oraz komórkach ludzkich wykazały, że wyżej wymienione miejsca fosforylacji nie są niezbędne do aktywacji kinazy ATM. [23, 28]. Czynnikiem niezbędnym w aktywacji ATM są zmiany struktury chromatyny oraz udział kompleksu MRN [29]. W aktywacji kinazy ATM odgrywa również rolę acetylacja seryny 3016 przez acetylotransferazę Tip60 [30]. Aktywne monomery kinazy ATM fosforylują dużą liczbą białek takich jak: H2AX, p53, Chk2, NBS, BRCA1 i SMC1, co powoduje uruchomienie ścieżki sygnałowej od DSBs.



Rys. 2.2. Aktywacja kinazy ATM i ATR w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. (A) Kinaza ATM aktywowana jest przez kompleks MRN rozpoznający dwuniciowe uszkodzenia DNA. (B) Aktywacja kinazy ATR wynika z zatrzymania widełek replikacyjnych – udział białka RPA i kompleksu 9-1-1. Zmodyfikowane według [29].

2.4.1.2. Aktywacja ATR

Aby zapobiec powstawaniu podwójnych pęknięć nici DNA podczas zablokowania widełek replikacyjnych, został wykształcony system stabilizujący ten odcinek DNA, którego celem jest zapoczątkowanie naprawy. System ten składa się z RPA (ang.: *replication protein*

A), kompleksu ATR-ATRIP, TopBP1 (ang.: *DNA topoisomerase 2-binding protein 1*) i kompleksu 9-1-1 (Rys. 2.2B.). Podczas replikacji, RPA wiąże się do jednoniciowego odcinka DNA powstającego w widełkach replikacyjnych. Zapobiega to ponownemu połączeniu się rozwiniętych nici lub powstawaniu struktur drugorzędowych. W przypadku zablokowania replikacji, powstające długie jednoniciowe fragmenty DNA połączone z RPA powodują rekrutację serynowo/treoninowej kinazy ATR. Również jeżeli podwójne pęknięcie nici DNA jest zakończone wystarczająco długimi odcinkami jednoniciowymi następuje aktywacja kinazy ATR [31]. Proces ten odbywa się za pośrednictwem białka ATRIP [32], które oddziałuje bezpośrednio z RPA i umiejscawia kompleks ATR-ATRIP w widełkach replikacyjnych. Dodatkowo DNA połączone z RPA jest sygnałem do rekrutacji kompleksu 9-1-1 złożonego z Rad9, Hus1 i Rad1 [33]. Rad9 oddziałuje z białkiem TopBP1, które aktywuje kinazę ATR poprzez zmiany konformacyjne kompleksu ATR-ATRIP [34]. ATR aktywuje/fosforyluje wiele białek będących składowymi szlaku DDR. Należą do nich: H2AX, BRCA1, BRCA2, Rad51 czy FANCD1, [29].

2.4.2 Przekazanie sygnału od uszkodzeń – formowanie skupisk białek

Uszkodzenia DNA prowadzą do formowania skupisk białek (ang. *foci*), które można wykryć metodami immunocytochemicznymi. W miejscu uszkodzenia DNA aktywna kinaza ATM/ATR fosforyluje serynę 139 wariantu białka histonowego H2AX (ufosforylowana forma histonu nazywana jest γ H2AX). Kinaza DNA-PK również może fosforylować histon H2AX [35]. Fosforylacja H2AX może objąć do 1-2 mega par zasad otaczających uszkodzenie DNA i zapoczątkowuje rekrutację kolejnych białek [36]. Jednocześnie następuje defosforylacja tyrozyny 142 H2AX, konstytutywnie ufosforylowanej, gdy nie ma uszkodzeń DNA [37]. Defosforylacja umożliwia białku MDC1 przyłączenie się bezpośrednio do γ H2AX [38]. Gdy to nastąpi, konstytutywna fosforylacja MDC1 przez CK2 zapewnia przejściowe zakotwiczenie ATM do chromatyny przy udziale NBS1, który jednocześnie wiąże ATM i MDC1. Pozwala to na wzmocnienie lokalnej aktywności kinazy ATM i na rozprzestrzenienie fosforylacji H2AX na nukleosomy sąsiadujące z uszkodzeniem DNA [6, 39, 40]. Formowanie rozległych regionów (skupisk) γ H2AX pełni ważną rolę w akumulacji i utrzymaniu elementów składowych DDR, takich jak MRN oraz białek pośredniczących w przekazywaniu sygnału BRCA1, 53BP1 w miejscu uszkodzenia DNA, chociaż nie jest wymagane do ich początkowej rekrutacji. [41, 42]. Stabilizacja składników ścieżki DDR rekrutowanych do nukleosomów zawierających γ H2AX, jest osiągnięta dzięki udziałowi złożonej sieci

enzymów modyfikujących chromatynę poprzez ubikwitynację, sumoilację, acetylację i metylację. Wiązanie ufosforylowanego MDC1 z γ H2AX pozwala na przyłączenie ligazy ubikwitynowej E3 - RNF8 do miejsca uszkodzenia. Następnie RNF8 ubikwitynuje histon H2AX oraz prawdopodobnie inne białka, co pozwala białku RAP80 na rekrutację BRCA1 oraz 53BP1. [43]. Mechanizm rekrutacji 53BP1 do skupisk nie jest dokładnie poznany. Uważa się, że zachodzi ona dzięki zmianom konformacyjnym chromatyny spowodowanymi ubikwitynacją oraz metylacją białek histonowych [40]. Białka rekrutowane do skupiska mogą oddziaływać z kompleksem MRN i/lub kinazami ATM/ATR, dzięki czemu powstaje pozytywna pętla zwrotna, powodująca amplifikację sygnału od uszkodzenia DNA. Szacuje się, że jedno dwuniciowe uszkodzenie DNA może zgromadzić do kilkunastu tysięcy cząsteczek białek [44].

2.4.3 Kinazy efektorowe.

Do tej pory odkryto ponad 700 substratów kinazy ATM i ATR. Wśród nich znajdują się kinazy efektorowe Chk1 i Chk2, które pełnią ważną funkcję w przekazywaniu sygnału od uszkodzeń DNA. Chk1 jest aktywowana głównie przez ATR, która fosforyluje serynę 317 i 345. Fosforylacja seryny 317 powoduje oddysocjowanie białka Chk1, związanego z chromatyną, i jego transport do cytoplazmy, w którym niezbędną rolę odgrywa fosforylacja seryny 345. Dodatkowo fosforylacja obu seryn jest konieczna do lokalizacji Chk1 w centrosomach [45]. Natomiast za aktywację kinazy Chk2 odpowiada głównie ATM, która fosforyluje treoninę 68. Stanowi to sygnał do dimeryzacji białka Chk2, która prowadzi do autofosforylacji treoniny 383, treoniny 387 oraz seryny 516, co w konsekwencji prowadzi do rozpadu dimeru na aktywne monomery. Ufosforylowane dimery również są enzymatycznie aktywne. Aktywacja Chk2 powoduje oddysocjowanie białka od chromatyny i amplifikację sygnału poprzez oddziaływanie z substratami [46]. W regulacji aktywności Chk2/Chk1 mogą uczestniczyć również mediatory szlaku DDR tj.: NBS1, 53BP1, MDC1, TopBP1, BRCA1 i Claspin, które *nota bene* są też substratami tych kinaz [45].

Uważa się również, że w następstwie indukcji DSB, kinaza ATM poprzez aktywację ATR może pośrednio przyczyniać się do aktywacji Chk1. Stwierdzono również, że kinaza Chk2 może być fosforylowana nie tylko przez ATM, ale także ATR, DNA-PKcs czy inne kinazy z rodziny PIKK. Świadczy to o ścisłym powiązaniu i przeplataniu się szlaków sygnałowych ATM-Chk2 i ATR-Chk1 [45].

Aktywowane w wyniku uszkodzeń DNA kinazy Chk1 i Chk2 fosforylują wiele białek zaangażowanych w różne aspekty odpowiedzi szlaku DDR. Wpływają na naprawę i replikację DNA, mitozę, metabolizm RNA, regulację transkrypcji i translacji, przemodelowanie chromatyny oraz wiele innych procesów [47]. Niektóre procesy są wspólnie regulowane przez obie kinazy, jednak większość zależy od wpływu poszczególnych kinaz.

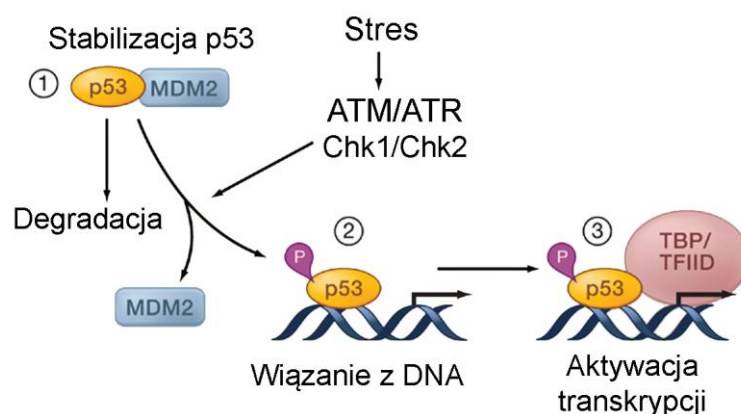
Kinazy Chk1 i Chk2 odgrywają ważną rolę w regulacji zatrzymania cyklu komórkowego podczas aktywacji punktów kontroli. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA Chk1 działa głównie podczas fazy S i G2/M, podczas gdy Chk2 odgrywa pomocniczą rolę, częściowo wpływając na punkty kontroli fazy S i G1 [48]. Chk1 i Chk2 fosforylują białka należące do rodziny fosfataz Cdc25 (Cdc25 A, B i C), co prowadzi do ich ubikwityno-zależnej degradacji. W wyniku tego procesu Cdc25 nie może dłużej defosforylować i aktywować białek CDK2 i CDK1, powodując tym samym zatrzymanie cyklu komórkowego [20].

Kinazy efektorowe są również zaangażowane w regulację transkrypcji podczas cyklu komórkowego poprzez wpływ na szlak E2F/Rb. Chk2 fosforyluje serynę 364 białka E2F-1, co powoduje wzrost jego stabilności. Chk1 i/lub Chk2 fosforylują serynę 612 białka Rb, co zmniejsza oddziaływanie Rb z E2F-1 i powoduje uwolnienie czynnika transkrypcyjnego. Chk2, aktywując transkrypcyjny szlak E2F-1, prowadzi do apoptozy indukowanej uszkodzeniami DNA [45]. Chk2 i Chk1 wpływają na apoptozę zależną od p53; poprzez fosforylację prowadzą do aktywacji tego białka [49].

2.4.4 Białka efektorowe – p53

Uszkodzenia DNA, uruchamiając szlak DDR, prowadzą do aktywacji bardzo dużej liczby różnorodnych białek. Kluczowym białkiem efektorowym szlaku jest p53, które ze względu na swoje funkcje nazywane jest strażnikiem genomu [50]. O jego ważnej roli w życiu komórki świadczy fakt, że około 50% nowotworów człowieka jest wynikiem mutacji p53. Aktywacja prawidłowego białka p53 determinuje los komórki. W zależności od siły czynnika stresowego (poziomu uszkodzeń DNA) może prowadzić do przejściowego zatrzymania cyklu komórkowego i naprawy uszkodzeń DNA, autofagii, apoptozy lub starzenia. P53 działa głównie jako czynnik transkrypcyjny, indukujący i/lub hamujący aktywację wielu genów. Znana jest również funkcja p53 niezwiązana z regulacją transkrypcji [51].

W prawidłowych warunkach białko p53 utrzymywane jest w komórkach na niskim poziomie. Odpowiadają za to głównie białka MDM2 oraz MDMX. Wiążą się one z p53 blokując jego aktywność transkrypcyjną i prowadząc do jego zależnej od ubikwitynacji degradacji. Ekspresja MDM2 jest regulowana przez p53, co tworzy negatywną pętlę zwrotną, chroniącą komórkę przed zgubnymi skutkami nadmiaru p53. Zachwianie równowagi między p53 a MDM2/MDMX jest punktem krytycznym w aktywacji p53 [52]. Dochodzi do tego w momencie, kiedy po zadziałaniu czynnika stresowego wywołującego uszkodzenia DNA, aktywowana kinaza ATM fosforyluje serynę 15, a Chk2 – serynę 20 białka p53. ATM fosforyluje także MDM2. W wyniku tych modyfikacji oddziaływanie MDM2 z p53 jest zablokowane, co prowadzi do zahamowania MDM2-zależnej degradacji i w konsekwencji do stabilizacji p53. Następstwem stabilizacji jest aktywacja p53 w wyniku modyfikacji postranslacyjnych (dalszych fosforylacji, acetylacji, metylacji, ubikwitynacji, sumoilacji oraz neddytacji) zwiększających powinowactwo do specyficznych promotorów genów. W zależności od silnego lub słabego powinowactwa do różnych promotorów, p53 działa jako czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję docelowych genów, która również zachodzi dzięki rekrutacji koaktywatorów lub korepresorów. Wśród nich ważną funkcję pełnią acetylotransferazy. Enzymy takie jak: CBP/p300, Tip60 czy hMof acetylują p53 oraz histony, co prowadzi do zmiany konformacji chromatyny, zwiększającej dostępność dla maszyny transkrypcyjnej [51] (Rys.2.3.).



Rys. 2.3. Klasyczny model aktywacji p53. Czynniki stresowe aktywujące ścieżkę DDR powoduje oddysocjowanie p53 od MDM2 i zahamowanie degradacji p53. Następnie p53 wiąże się z promotorami docelowych genów i przy udziale kofaktorów następuje aktywacja transkrypcji. Według [51].

W odpowiedzi na warunki stresowe mogą być aktywowane produkty trzech różnych rodzajów genów. Do pierwszej klasy można zaliczyć geny produkujące białka MDM2, Pirh2 i inne, które chronią komórkę przed nadmierną aktywacją p53. Negatywna regulacja p53 jest

prawdopodobnie najwcześniejszym etapem odpowiedzi na warunki stresowe i nie wymaga acetylacji, ani rekrutacji koaktywatorów [53]. Drugą klasę białek stanowią białka zaangażowane w zatrzymanie cyklu komórkowego i naprawę uszkodzeń DNA. Najważniejszym białkiem tej grupy jest p21. Zależna od p53 rekrutacja koaktywatorów CBP/p300 i Tip60/hMOF jest absolutnie niezbędna do aktywacji p21 [53, 54]. Dodatkowo indukcja p21 wymaga przynajmniej częściowej modyfikacji p53 w niektórych miejscach (na przykład acetylacja lizyny 320). Trzecią grupę stanowią białka związane z procesem apoptozy: PUMA, BAX, NOXA i inne. Ponieważ etap ten zapoczątkowuje nieodwracalny proces apoptozy, rygorystycznie wymagana jest pełna aktywacja proapoptotycznych genów i udział wszystkich kluczowych koaktywatorów. Wymagana jest również modyfikacja p53 w wielu miejscach (np.: acetylacja lizyny 120). Również korepresory takie jak MDM2 i MDMX muszą być całkowicie usunięte [51] Tabela 2.1.


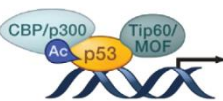
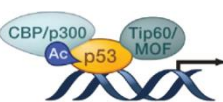
Uszkodzenia DNA (siła sygnału)	Transkrybowane geny	Skutek biologiczny	Modyfikacje p53
	MDM2, Pirh2	przeżycie komórki,	acetylacja nie jest konieczna
	p21,	zatrzymanie podziałów,	częściowa acetylacja
	BAX, PUMA, FAS, NOXA	apoptoza	niezbędna specyficzna acetylacja

Tabela 2.1. Różnorodna odpowiedź na skutek aktywacji p53, indukowana w zależności od siły czynnika stresowego. Zmodyfikowane według [51].

Sposób działania p53 można skrótowo opisać w trzech głównych punktach: stabilizacja (blokowanie MDM2), antyrepresja (fosforylacja) i aktywacja transkrypcji (udział koaktywatorów i dalsze modyfikacje potranslacyjne). Decydującą rolę w aktywacji konkretnych genów, a zarazem odpowiedzi komórkowej odgrywa siła czynnika stresowego. Łagodne uszkodzenia DNA prowadzą przeważnie do p53-zależnej indukcji inhibitorów cyklu komórkowego, takich jak p21, które zatrzymują podziały, dając czas na naprawę DNA. Natomiast, gdy uszkodzenia są nienaprawialne p53 indukuje starzenie lub apoptozę. Należy również dodać, że efekt końcowy aktywacji p53 zależy w dużej mierze od rodzaju komórek poddanych stresowi. Uważa się, że poddane działaniu czynników stresowych fibroblasty będą preferencyjnie ulegać starzeniu, podczas gdy limfocyty apoptozie. Jednakże dokładny mechanizm regulujący te procesy nie jest całkowicie poznany [55, 56].

Białko p53 może aktywować apoptozę w dwojaki sposób. W pierwszym przypadku jest czynnikiem transkrypcyjnym, aktywującym ekspresję proapoptotycznych białek z rodziny BCL-2 (BAX, PUMA, BID, NOXA), czy związanych z zewnętrznym szlakiem apoptozy receptorów FAS, TRAIL i ich ligandów. P53 prowadzi do ekspresji wielu rodzajów niekodujących mikroRNA, które promują apoptozę w wyniku wyciszenia białek związanych z cyklem komórkowym i naprawą DNA [57]. Natomiast w drugim przypadku p53 indukuje proces apoptozy niezależny od aktywności transkrypcyjnej. Może bezpośrednio aktywować białka BAX i BAK, powodując ich oligomeryzację. Białko p53 może również oddziaływać z antyapoptotycznymi BCL-2, BCL-X_L i MCL-1, co prowadzi do uwolnienia proapoptotycznych białek zawierających domenę BH3 [55]. Znane też są pewne mechanizmy regulujące proapoptotyczną aktywność p53. Zaliczyć można tutaj liczne białka, koaktywatory modyfikujące p53, takie jak już wcześniej wspomniane: CBP/p300, Tip6 i hMOF. Wiadomo również, że fosforylacja seryny 46 przez p38, DYRK2 czy HIPK2 promuje apoptozę. Jednym z możliwych skutków tej fosforylacji jest oddysocjowanie p53 od inhibitora apoptozy iASPP [51].

2.4.5 Inhibitor cyklu komórkowego – białko p21.

Aktywacja p53, na skutek uszkodzeń DNA, prowadzić może również do indukcji białek zaangażowanych w kontrolę cyklu komórkowego. Głównym celem transkrypcyjnym w tym przypadku jest gen *CDKN1A* kodujący białko p21, które pośredniczy w wielu procesach, takich jak: różnicowanie, starzenie, naprawa DNA i apoptoza. Jednak najważniejszą funkcją jest blokowanie progresji cyklu komórkowego, komórek poddanych działaniu czynników stresowych. Białko p21 wiąże się z kinazami cyklino-zależnymi (CDKs) i blokuje ich aktywność, prowadząc do zatrzymania podziałów w odpowiednich fazach cyklu komórkowego. W warunkach pozbawionych stresu, czynniki wzrostu, działając na komórki będące w cyklu komórkowym, powodują sekwencję aktywacji białek CDKs: CDK4, CDK6, CDK2 [58]. W późnej fazie G1, fosforylacja białka pRB odgrywa znaczącą rolę w progresji między fazą G1/S. Kompleks cykliny D z CDK4/6 zapoczątkowuje fosforylację pRB. Ufosforylowane białko pRB oddysocjowuje od czynnika transkrypcyjnego E2F, który aktywuje geny niezbędne do rozpoczęcia i kontynuacji fazy S, w tym cykliny E [59]. Dalsza fosforylacja, i w konsekwencji całkowite uwolnienie pRB od E2Fs, zachodzi dzięki aktywności kompleksu cyklina E CDK2. Natomiast oddziaływanie p21 z cyklina D i CDK4/6 blokuje fosforylację pRB, co skutkuje zatrzymaniem cyklu w fazie G1. Dodatkowo p21

oddziałuje z E2F, co prowadzi do jego inaktywacji i w konsekwencji do blokady cyklu komórkowego i starzenia komórkowego [60].

Białko p21, w sposób bezpośredni lub pośredni, zaangażowane jest w regulację punktu kontrolnego G2/M. Blokuje ono kompleksy cyklina B1 CDK1 i cyklina A CDK1/2 prowadząc do zatrzymania cyklu w fazie G2. Kompleks cykliny B z CDK1, który fosforyluje i blokuje fosfatazę Cdc25C, jest głównym regulatorem rozpoczęcia przez komórkę mitozy. Białko p21 współdziała również z 14-3-3, które ukierunkowuje kompleks cyklina B1 CDK1 do cytoplazmy, blokując przejście z fazy G2 do M [58].

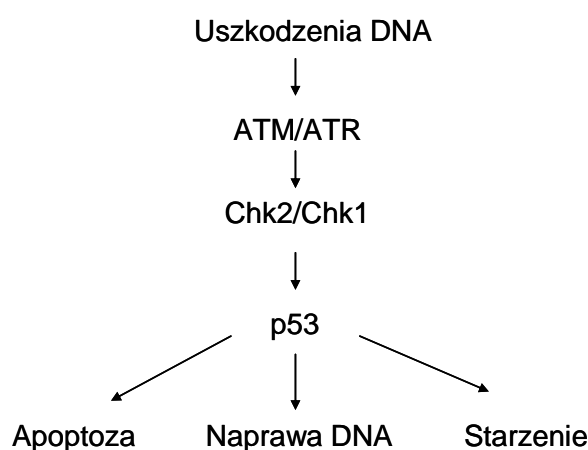
Białko p21 znane jest najlepiej ze swoich zdolności do hamowania wzrostu komórek, aczkolwiek wykazuje również właściwości antyapoptotyczne. Wynika to z faktu, iż wiele związków cytotoksycznych najsilniej działa na komórki dzielące się, a zatem p21 blokując cykl komórkowy, chroni komórki przed śmiercią. Jednakże cytostatyczny efekt działania p21 może być zniesiony dzięki pewnym mechanizmom. Jednym z nich może być indukcja apoptozy dzięki transkrypcyjnej represji genu *CDKN1A*, kodującego p21. Modyfikacje potranslacyjne, takie jak fosforylacja, mogą także wpływać na stabilność białka, cytoplazmatyczną lokalizację czy proteolizę przez kaspazę-3 [61].

Białko p21 może także chronić przed apoptozą indukowaną brakiem czynników wzrostowych, nadekspresją p53 czy podczas różnicowania monocytów. Właściwości antyapoptotyczne, w tym przypadku, nie są skutkiem blokady cyklu, tylko zależną od p21 regulacją transkrypcji poprzez różnorodne oddziaływania białko-białko lub udział p21 w naprawie DNA. Na przykład, zlokalizowane w cytoplazmie p21 wiąże się z białkami zaangażowanymi bezpośrednio w apoptozę i blokuje ich aktywność. Zaliczyć do tej grupy można: prokaspazę-3, kaspazę-8, kaspazę-10, SAPKs (stress-activated protein kinases) i ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1). Białko p21 może również pozytywnie regulować geny kodujące antyapoptotyczne czynniki sekrecyjne. Na przykład p21 może także wiązać się z MYC i E2F1, dzięki czemu hamuje ich proapoptotyczną aktywność transkrypcyjną [62, 63].

Paradoksalnie, w pewnych warunkach p21 może promować apoptozę zależną lub nie od p53. Dokładny mechanizm tego zjawiska nie jest znany, ale może zależeć od pozytywnej regulacji białka BAX, aktywacji receptorów śmierci z rodziny TNF lub wpływu na naprawę DNA [64]. Jednakże badania wskazujące na proapoptotyczną funkcję p21 pokazują tylko, że indukcja p21 zbiega się z apoptozą, a nie, że p21 jest niezbędne do jej indukcji. Dlatego dalsze szczegółowe analizy potrzebne są, aby to zweryfikować [65].

2.5. Skutki aktywacji szlaku DDR

Pojedyncze i podwójne pęknięcia nici DNA są bardzo silnymi aktywatorami szlaku DDR [5]. Uruchamiana jest złożona sieć wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych składająca się z sensorów uszkodzeń, białek pośredniczących i efektorowych. Pierwszym etapem jest rozpoznanie i wiązanie się do uszkodzonego DNA białek sensorycznych. Następnie aktywowana jest kaskada kinaz białkowych, które wraz z białkami pośredniczącymi prowadzą do amplifikacji sygnału od uszkodzenia DNA i aktywacji białek efektorowych, odpowiedzialnych za odpowiedź komórkową [20] (Rys. 2.4).



Rys. 2.4. Uproszczony schemat szlaku DDR przedstawiający ścieżkę od uszkodzeń DNA oraz możliwość różnych odpowiedzi komórki. Główne kinazy ATM i ATR aktywowane uszkodzeniami DNA, przy udziale kinaz efektorowych (Chk2/Chk1), wpływają na p53, którego aktywacja, w zależności od poziomu uszkodzeń, może prowadzić do naprawy DNA, apoptozy lub starzenia komórki.

2.5.1 Naprawa uszkodzeń DNA

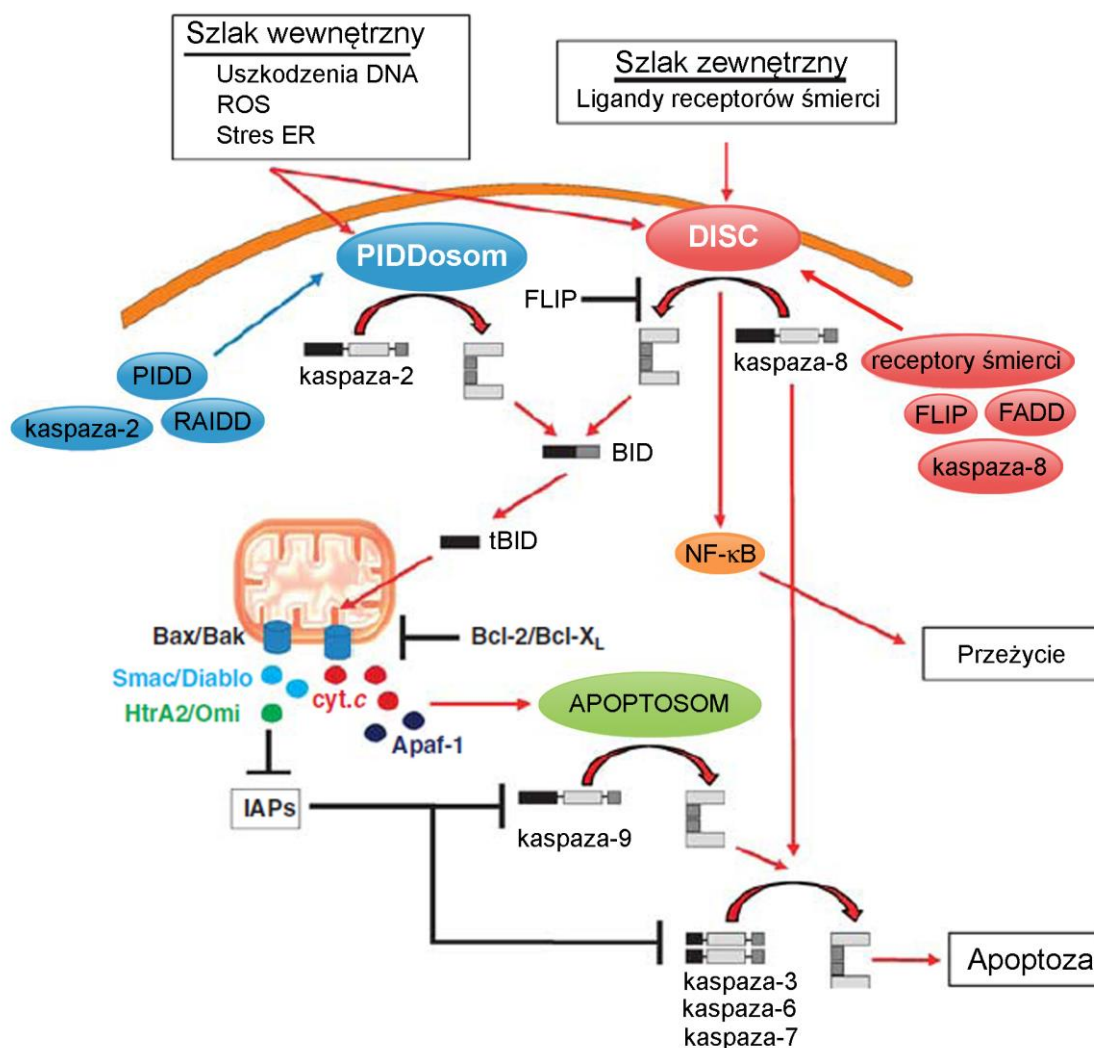
Duża różnorodność uszkodzeń DNA wymaga wielu, często bardzo różniących się mechanizmów naprawy. Podczas gdy niektóre uszkodzenia podlegają naprawie w wyniku bezpośredniego działania białka na zmodyfikowany nukleotyd, większość jest naprawiana w wyniku uruchamiania sekwencji katalitycznych zdarzeń, w które zaangażowanych jest wiele białek. Znanych jest kilka mechanizmów naprawy różnych uszkodzeń DNA takich jak addukty, delecje, insercje, błędy replikacji czy pojedyncze pęknięcia nici DNA. Zalicza się do nich naprawę niesparowanych zasad (MMR – *mismatch repair*), naprawę przez wycinanie zasad (BER – *base excision repair*), naprawę przez wycinanie nukleotydów (NER – *nucleotide-excision repair*) [66-69]. Należy również dodać, że niektóre nienaprawione uszkodzenia DNA są omijane podczas replikacji DNA przez polimerazy niewymagające ścisłego dopasowania zasad [70].

W naprawę dwuniciowych uszkodzeń DNA zaangażowane są głównie dwa procesy: łączenie niehomologicznych zakończeń (NHEJ) oraz rekombinacja homologiczna (HR) [4]. Podczas NHEJ podwójne pęknięcie nici rozpoznawane jest przez kompleks Ku70/80, który wiąże i aktywuje kinazę DNA-PKcs. Prowadzi to do rekrutacji i aktywacji enzymów przetwarzających końce DNA, polimeraz i ligazy IV DNA. Znany jest również mechanizm niezależny od Ku70/80, zwany alternatywnym NHEJ (alt-NHEJ), który wymaga mikrohomologii końców i zawsze prowadzi do delecji. Naprawa NHEJ i alt-NHEJ mogą zachodzić w każdej fazie cyklu komórkowego, jak również poza nim (faza G₀), jednakże prowadzi to do powstawania błędów, ponieważ nie wymaga obecności komplementarnej matrycy. Mechanizm NHEJ jest także zaangażowany w rearanżację regionów V (D) J podczas rozwoju limfocytów [71]. Natomiast homologiczna rekombinacja HR jest głównie ograniczona do fazy S i G₂ cyklu komórkowego i wymaga obecności chromatyny siostrzanej, co zapewnia wierną naprawę uszkodzenia. HR zapoczątkowana jest przez tworzenie krótkich odcinków jednoniciowego DNA na końcach podwójnego pęknięcia, powstających w wyniku wycięcia jednej nici przez kompleks różnorodnych białek, w tym kompleks MRN. Następnie przy udziale białek takich jak: RAD51, BRCA1 i BRCA2, ssDNA łączy się z nieuszkodzoną matrycą i w następstwie działania polimeraz, nukleaz, helikaz i wielu innych białek następuje naprawa uszkodzenia [72]. HR jest również zaangażowana we wznowienie replikacji spowodowanej zablokowaniem widełek replikacyjnych [4].

2.5.2 Apoptoza

Apoptoza jest jednym z najlepiej poznanych rodzajów śmierci komórkowej. Jest procesem ściśle regulowanym, w który zaangażowana jest bardzo duża liczba różnorodnych białek. Centralną rolę w regulacji i egzekucji większości rodzajów apoptozy odgrywiają kaspazy. Produkowane są one w formie nieaktywnych zymogenów, które ulegają proteolizie podczas aktywacji [73]. Ze względu na strukturę i funkcję wyróżnić można dwa rodzaje kaspaz: grupę I – zapalne, zaangażowane w proces dojrzewania cytokin (kaspaza-1, -4 i -5) i grupa II – kaspazy związane z apoptozą. Są to kaspazy efektorowe (tj.: kaspaza-3, -6 i -7) i inicjatorowe (tj.: kaspaza-2, -8, -9 i -10). Kaspazy efektorowe są konstytutywnie produkowane przez komórki w formie dimerów, które ulegają aktywacji w wyniku trawienia przez kaspazy inicjatorowe i odpowiedzialne są za proteolizę białek strukturalnych komórki. Aktywacja kaspaz inicjatorowych zachodzi przy udziale dużych kompleksów białek przyporządkowanych do dwóch głównych szlaków apoptotycznych: zewnętrznego i

wewnętrznego [74]. Kaspazy inicjatorowe charakteryzują się występowaniem domen DED oraz CARD, dzięki którym łączą się z kompleksem białek adaptorowych (FADD, APAF1 czy RAIDD) (Rys. 2.5.) i w następstwie dimeryzacji dochodzi do ich aktywacji [75, 76]. Dodatkowo kaspazy efektorowe, mogą aktywować kaspazy inicjatorowe, co świadczy o istnieniu wewnętrznej pętli amplifikującej aktywację tych białek [3]. Aktywacja kaskady kaspaz prowadzi do proteolizy ważnych białek komórkowych tj.: lamina, której cięcie prowadzi do kondensacji chromatyny i obkurczenia jądra. Dodatkowo cięcie inhibitora DNAazy (ICAD) prowadzi do aktywacji endonukleazy (CAD) i fragmentacji DNA. Trawienie białek cytoszkieletu (aktyna) powoduje rozpad komórki na ciała apoptotyczne, które usuwane są przez fagocyty rozpoznające eksponowane na powierzchni błony umierającej komórki cząsteczki, takie jak fosfatydyloseryna oraz różnorodne cukry, określane jako sygnał „zjedz mnie” [77]. Ponieważ usuwanie martwych komórek przez fagocyty zachodzi szybko, apoptoza jest w bardzo małym stopniu procesem immunogennym [78]. Substratami kaspaz efektorowych (głównie kaspazy-3) są również białka związane ze szlakiem DDR, takie jak PARP, DNA-PKcs oraz ATM. Prowadzi to do wyciszenia odpowiedzi na uszkodzenia DNA, które powstają w wyniku fragmentacji DNA przez endonukleazy (CAD). Dzięki działaniu kaspaz proces naprawy i przekazywania sygnału jest specyficznym wyłączany w umierających komórkach [79]. Należy dodać, że poza główną funkcją apoptotyczną, kaspazy mogą być również zaangażowane w aktywację, proliferację i przeżycie limfocytów T [77].



Rys. 2.5. Główne szlaki apoptozy. Zmodyfikowane według [74].

2.5.2.1. Szlak wewnętrzny

Szlak wewnętrzny, nazywany jest również mitochondrialnym, może być aktywowany różnego rodzaju czynnikami: uszkodzeniami DNA, stresem siateczki wewnątrzplazmatycznej, brakiem sygnału wzrostowego (na przykład cytokin), stymulacją TCR, szokiem cieplnym czy hormonami. Jego głównym etapem jest uprzepuszczalnienie zewnętrznej błony mitochondrialnej (MOMP) i uwolnienie różnorodnych białek z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Jednym z nich jest cytochrom c, który wraz z białkiem APAF-1 tworzy apoptosom. Stanowi on platformę aktywującą inicjatorową kaspazę-9, która następnie aktywuje kaspazy efektorowe [80].

Wewnętrzny szlak apoptotyczny jest regulowany poprzez oddziaływania między sobą anty i proapoptotycznych białek z rodziny BCL-2. Głównymi białkami odpowiedzialnymi za uwolnienie zawartości mitochondriów do cytoplazmy są BAX i BAK, które w wyniku

aktywacji oligomeryzują i tworzą kanały w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Gdy brak jest czynnika indukującego apoptozę, właściwości proapoptotyczne BAX i BAK są zahamowane w wyniku wiązania ich przez białka antyapoptotyczne (BCL-2, BCL-X_L) [81]. Pod wpływem różnych czynników stresowych aktywowane są proapoptotyczne białka należące do grupy BH3-only, takie jak PUMA, NOXA, BID czy BIM, które indukują apoptozę w dwojaki sposób. Jedną z możliwości jest wiązanie się białek BH3-only z białkami antyapoptotycznymi BCL-2/BCL-X_L, co prowadzi do blokowania ich funkcji i uwolnienia BAX/BAK. Drugi model zakłada, że białka BH3-only (BIM, tBID, PUMA) przejściowo oddziałują bezpośrednio z BAX/BAK, powodując zmianę ich konformacji i aktywację [82].

Formowanie apoptosomu i aktywacja kaspazy-9 nie jest konieczna do aktywacji śmierci komórek. Sugeruje to istnienie innych mechanizmów, w których udział biorą inne czynniki uwalniane z mitochondriów [83]. Uwalniane z mitochondriów białka SMAC/DIABLO oraz OMI/HtrA2 indukują apoptozę poprzez hamowanie inhibitorów kaspaz-3, -7 i -9 - IAPs. Dodatkowo w sposób niezależny od kaspaz działają Endonukleaza G i AIF, które biorą udział we fragmentacji, a AIF także kondensacji DNA [84].

2.5.2.2. Szlak zewnętrzny

Szlak zewnętrzny aktywowany jest sygnałem pochodzącym od powierzchniowych receptorów błonowych. Należą one do rodziny receptorów śmierci TNFR i zalicza się do nich: CD95/FAS, TNFR1, TRAILR. Receptory śmierci aktywowane są poprzez związanie specyficznego liganda (np.: CD95L/FASL, TNF czy TRAIL) [77]. Jednym z najlepiej poznanych mechanizmów jest aktywacja CD95/FAS w wyniku związania jego liganda CD95L/FASL. Prowadzi to do formowania kompleksu DISC, w którym w wyniku dimeryzacji zachodzi aktywacja kaspazy-8 lub 10 [85]. Ze względu na sposób przekazywania sygnału od receptorów można podzielić komórki na dwa typy. W komórkach typu I poziom aktywowanej w DISC kaspazy-8, jest wystarczający do indukcji apoptozy. Natomiast w komórkach typu II uruchamiany jest dodatkowy mechanizm, polegający na cięciu białka BID przez kaspazę-8. Następnie cięty BID, tBID, aktywuje ścieżkę mitochondrialną [3, 77].

Negatywnym regulatorem szlaku zewnętrznego jest strukturalnie podobne do kaspazy-8 białko c-FLIP. Wiążąc się do kompleksu zawierającego FADD, blokuje rekrutację i aktywację kaspazy-8 [86]. Ponadto c-FLIP oddziałuje z białkiem RAF1 i RIP, promując aktywację ścieżki ERK i NF-κB, odpowiedzialnych za przeżycie komórki [87].

Szlak sygnałowy uruchamiany aktywacją TNFR1 jest bardziej złożony od ścieżki aktywowanej przez FASL i może prowadzić do śmierci, jak również do przeżycia komórki. TNF wiążąc się z TNFR1 prowadzi do tworzenia związanego z błoną komórkową kompleksu I, złożonego z dwóch ligaz ubikwitynowych TRAF2 i cIAP1, białka adaptorowego TRADD i PIRK1. Prowadzi to do aktywacji NF- κ B, który następnie indukuje ekspresję genu białka c-FLIP. Gdy kompleks TRADD i RIPK1 odłączy się od TNFR1, w wyniku przyłączenia FADD oraz kaspazy-8/-10, tworzony jest w cytoplazmie kompleks II, którego powstanie prowadzi do apoptozy. Poziom białka c-FLIP determinuje, czy kompleks II zostanie utworzony. Gdy NF- κ B jest aktywowany przez kompleks I, wzrost poziomu białka c-FLIP jest wystarczający do blokowania wiązania kaspazy-8/-10 z FADD i tworzenia kompleksu II. Natomiast, gdy kompleks I nie jest w stanie aktywować NF- κ B, tworzony jest kompleks II, który indukuje apoptozę [88]. Znany jest również trzeci kompleks (IIb), w którym RIPK1 bezpośrednio oligomeryzuje FADD, co prowadzi do rekrutacji kaspazy-8 i c-FLIP. Wydaje się, że ten kompleks może być tworzony w odpowiedzi na duży poziom uszkodzeń DNA i prowadzić do apoptozy zależnej od aktywacji kaspazy-8. Kompleks IIb może być tworzony bez udziału TNF α . RIPK1 może również łączyć się z RIPK3, co prowadzi do nekrozy. Nekroza zależna od RIPK3 obserwowana jest podczas aktywacji limfocytów T, receptorów TLR w obecności inhibitorów kaspaz oraz w odpowiedzi na infekcje wirusowe [89].

2.5.2.3. Alternatywny szlak apoptozy – kaspaza-2

Kaspaza-2 jest najbardziej konserwowaną ewolucyjnie z całej rodziny kaspaz. Zaliczana jest do kaspaz inicjatorowych, ale posiada pewne cechy kaspaz efektorowych. Dodatkowo, jako jedyna może występować w jądrze komórkowym. Aktywowana jest w odpowiedzi na zewnętrzne i wewnętrzne czynniki apoptotyczne tj.: uszkodzenia DNA, stres ER, szok cieplny, aktywacja receptorów śmierci. Stwierdzono również, że w odpowiedzi na uszkodzenia DNA może być zaangażowana nie tylko w śmierć komórki (zależną od p53), ale także w regulację cyklu komórkowego i naprawę DNA. Jednakże dokładny mechanizm aktywacji i rola kaspazy-2 nie są w pełni poznane. W regulację jej aktywności zaangażowane może być kilka kinaz i platform aktywacyjnych. Zależnym od indukcji p53 kompleksem aktywującym kaspazę-2 jest tak zwany PIDDsom. Złożony jest z białka PIDD oraz białka adaptorowego RAIDD, które dzięki domenom (CED) rekrutuje kaspazę-2. W wyniku dimeryzacji następuje autoaktywacja kaspazy-2. Jej głównym substratem jest BID, którego cięcie prowadzi do uruchomienia szlaku mitochondrialnego. Inną platformą aktywacyjną powstającą w wyniku uszkodzeń DNA jest jądrowy kompleks DNA-PKcs-PIDDsom. DNA-

PKcs rekrutuje PIDD i kaspazę-2, która ulega fosforylacji. Ufosforylowana kaspaza-2 odgrywa rolę w regulacji cyklu komórkowego i naprawie DNA. [90]. Udział białka PIDD w regulacji kaspazy-2 koreluje z jej jądrową lokalizacją. Natomiast aktywacja cytoplazmatycznej kaspazy-2 nie jest zależna od PIDD i może być wynikiem działania białek związanych ze szlakami zewnętrznymi apoptozy (FADD, TRADD). Aktywacja kaspazy-2 może być również wynikiem jej proteolizy przez kaspazę-3 podczas egzekutorowej fazy śmierci komórki [91].

2.5.2.4. Rola apoptozy w rozwoju i homeostazie limfocytów T

Apoptoza odgrywa kluczową rolę w rozwoju, różnicowaniu i homeostazie limfocytów T. Jakiegokolwiek zaburzenia tego procesu mogą prowadzić do transformacji nowotworowej, chronicznych stanów zapalnych, a nawet chorób autoimmunologicznych. Podczas dojrzewania limfocytów T w grasicy, w wyniku pozytywnej i negatywnej selekcji, umiera ponad 90% komórek. Apoptoza w grasicy związana jest z aktywacją białka BIM i zależy od sygnału pochodzącego od receptora TCR [92]. Limfocyty T opuszczające grasicę nazywane są komórkami naiwnymi, czyli takimi, które nie miały kontaktu ze specyficznym antygenem. Są to komórki w fazie G₀, określane jako spoczynkowe. Ten stan rzeczy trwa do momentu napotkania specyficznego antygeny np.: podczas infekcji. Aktywacja receptora TCR antygenem powoduje proliferację i różnicowanie limfocytów T. Powstaje duża liczba komórek efektorowych, niezbędnych do prawidłowej odpowiedzi odpornościowej. Aktywacja prowadzi do produkcji IL-2 oraz jej receptora CD25 na powierzchni limfocytów T, co jest niezbędne do ich proliferacji i przeżycia [93]. Po zwalczeniu infekcji aktywowane limfocyty, w celu zachowania homeostazy, usuwane są w wyniku apoptozy. Znane są dwa modele indukcji śmierci aktywowanych limfocytów T podczas wyciszenia odpowiedzi odpornościowej: AICD (ang.: *Activation Induced Cell Death*) i ACAD (ang.: *Activated Cell Autonomous Death*). W przypadku AICD śmierć limfocytów jest wynikiem restymulacji TCR i udziału receptorów śmierci. Dużą rolę odgrywa tutaj receptor CD95/FAS, który pojawia się na powierzchni limfocytów w wyniku aktywacji, oraz jego ligand CD95L – również produkowany przez aktywowane komórki [77]. ACAD, często określana jako śmierć przez zaniedbanie lub w wyniku niedoboru cytokin, jest śmiercią niezależną od restymulacji TCR i aktywacji receptorów śmierci. W tym przypadku, śmierć aktywowanych limfocytów T jest wynikiem uruchomienia ścieżki wewnętrznej apoptozy, w której główną rolę odgrywa BIM i PUMA. Prawdopodobnie AICD i ACAD współdziałają podczas wygaszania odpowiedzi

odpornościowej. Jednakże AICD wydaje się odgrywać większą rolę w eliminacji chronicznie aktywowanych limfocytów (potencjalnie autoreaktywnych). ACAD natomiast odpowiada głównie za śmierć komórek po zwalczeniu infekcji [2]. Mechanizm uwrażliwiający limfocyty T na śmierć jest zależny od IL-2, która w początkowej fazie (prolifracji) chroni komórki przed śmiercią, a następnie ją promuje. Proces wygaszenia odpowiedzi odpornościowej przeżywa tylko mała grupa komórek pamięci, które w przypadku napotkania tego samego antygeny ulegają aktywacji, zapewniając szybką eliminację zagrożenia, po czym ponownie następuje apoptoza aktywowanych komórek. Decyzja, czy komórka umrze czy przeżyje jest procesem skomplikowanym i zależy od udziału jeszcze wielu innych czynników: NF-kB, ścieżki MAPK czy HPK1 [77].

Dodatkowo w wyniku poważnych uszkodzeń DNA, które mogą nastąpić na różnym etapie życia limfocytów T, aktywacja szlaku DDR może prowadzić do śmierci komórki. Główną rolę w tym procesie odgrywa białko p53, które z jednej strony jest czynnikiem transkrypcyjnym, aktywującym geny białek proapoptotycznych PUMA i NOXA czy FAS, a z drugiej jest bezpośrednim aktywatorem białka BAX [3].

2.5.3 Starzenie komórkowe

W hodowli, komórki prawidłowe w przeciwieństwie do nowotworowych, wyczerpują swój potencjał proliferacyjny. Zjawisko to po raz pierwszy opisali Moorhead i Hayflick, nazywając je starzeniem replikacyjnym. Zaobserwowali, że ludzkie fibroblasty płuc hodowane *in vitro*, tracą zdolność do proliferacji po określonej liczbie podziałów [94]. Obecnie wiadomo, że starzeniu replikacyjnemu *in vitro* ulegają również inne typy komórek ludzkich, takie jak: keratynocyty, melanocyty, komórki nabłonkowe i śródbłonna, komórki mięśni gładkich, mezenchymalne komórki macierzyste i limfocyty [95]. Zjawisko wyczerpania zdolności do podziałów spowodowane jest skracaniem telomerów po każdej rundzie replikacyjnej, wynikające z tak zwanego problemu końca replikacji. Gdy długość jednego lub kilku telomerów spadnie poniżej określonej wartości następuje uruchomienie szlaków sygnałowych prowadzących do zatrzymania cyklu komórkowego i w konsekwencji starzenia [96]. Krótkie telomery rozpoznawane są także jako uszkodzenia DNA, co prowadzi do permanentnej aktywacji klasycznego szlaku DDR, prowadzącego do starzenia zależnego od p21 [15]. Dodatkowo starzenie związane z ciągłą aktywacją ścieżki DDR, może być wynikiem nienaprawialnych uszkodzeń telomerowych oraz poza telomerowych odcinków DNA [97] a także nieprawidłowościami białek wiążących telomery [98]. Starzenie, które jest

niezależne od podziałów komórkowych i zachodzi znacznie szybciej niż starzenie replikacyjne, zwane jest przyspieszonym (lub przedwczesnym) starzeniem indukowanym stresem – SIPS (ang.: *Stress Induced Premature Senescence*). Podwójne pęknięcia nici DNA są szczególnie silnymi induktorami starzenia i powstawać mogą w wyniku działania czynników stresowych (UV, ROS, związki cytotoksyczne). Silne mitogeny pobudzające komórki do wzmożonej proliferacji (na przykład aktywacja onkogenów) mogą powodować stres replikacyjny, skutkujący powstaniem uszkodzeń DNA i aktywacją ścieżki DDR, co w konsekwencji prowadzi do starzenia indukowanego onkogenem (OIS - *oncogen induced senescence*). Starzenie komórkowe może być wynikiem powstawania skupisk heterochromatyny, infekcji czy stresu hodowlanego związanego z prowadzeniem hodowli *in vitro* [99]. Biorąc pod uwagę wszystkie wyżej wymienione czynniki, starzenie komórkowe można określić jako proces odpowiedzi komórki na stres, które obok apoptozy jest także mechanizmem obronnym przed nowotworami [100].

Komórki ulegające starzeniu charakteryzują się pewnymi specyficznymi cechami. Jednakże, w zależności od rodzaju komórek i czynnika indukującego starzenie, nie wszystkie są wyrażane w jednakowym stopniu. Do istotnych cech starzenia zalicza się permanentne zatrzymanie podziałów komórkowych, pomimo obecności czynników odżywczych i mitogennych. Uniwersalnym, chociaż nie zawsze specyficznym markerem jest aktywność tak zwanej związanej ze starzeniem β -galaktozydazy (SA- β -Gal). Komórki stare może cechować podwyższony poziom białek p16 i p21 (inhibitorów cyklu komórkowego), permanentna aktywacja szlaku DDR, związana z występowaniem nienaprawialnych uszkodzeń DNA oraz skupiska heterochromatyny. Komórki stare nie dzielą się, ale pozostają metabolicznie aktywne i wydzielają wiele czynników wzrostowych i cytokin prozapalnych, które wpływają na sąsiadujące komórki. Tę ostatnią cechę nazywa się fenotypem sekrecyjnym związanym ze starzeniem – SASP (*Senescence Associated Secretory Phenotype*) [96]. Proces starzenia komórkowego obserwowany *in vitro* zachodzi również w wielu komórkach *in vivo* [95, 100].

W przypadku limfocytów T, które stanowią integralną część układu odpornościowego, można wymienić jeszcze kilka charakterystycznych cech związanych z procesem starzenia. Dobrze udokumentowanym zjawiskiem jest przemodelowanie subpopulacji limfocytów T. Wraz z wiekiem zmniejsza się liczba komórek naiwnych. Redukcja różnorodności repertuaru TCR, skutkuje upośledzeniem odporności w podeszłym wieku w stosunku do nowych antygenów. Wzrasta natomiast liczba komórek pamięci, jednakże ich zdolności do reakcji odpornościowej są osłabione. Powodem tego może być zmniejszenie liczby pomocniczych

limfocytów T CD4+, pozytywnie regulujących odpowiedź odpornościową. Zwiększa się udział limfocytów T CD8+, jednakże ich odpowiedź jest też osłabiona, ponieważ również zależy od limfocytów CD4+. Kolejną cechą wpływającą na funkcje limfocytów T jest utrata cząsteczki CD28, która jest niezbędna do ich aktywacji, dając dodatkowy sygnał kostymulujący. Zaobserwowano, że utrata CD28 dotyczy głównie limfocytów CD8+. Charakterystyczny dla ludzi w podeszłym wieku wzrost odsetka limfocytów CD8+CD28-, jest także obserwowany u osób zarażonych HIV, CMV czy cierpiących na choroby autoimmunologiczne [101].

Podobny proces selekcji limfocytów CD8+CD28- można zaobserwować podczas replikacyjnego starzenia *in vitro*, występującego podczas długoterminowej hodowli limfocytów T w obecności IL-2, oraz kilkukrotnej stymulacji do proliferacji. Do aktywacji limfocytów T *in vitro* wykorzystuje się specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko CD3 i CD28 lub traktuje się komórki PHA (lektyna), co naśladuje stymulację TCR w organizmie podczas infekcji. Limfocyty CD28- uzyskane *in vitro* lub izolowane od dawców mają krótsze telomery niż CD28+[102, 103].

Zmiany fenotypowe limfocytów T podczas starzenia replikacyjnego są dobrze udokumentowane. Natomiast informacji na temat pojawiania się innych markerów starzenia (takich jak aktywacja DDR) jest niewiele. Pojawiła się jak do tej pory jedna praca na ten temat [104].

3. Cele i założenia

Wszystkie komórki żywych organizmów narażone są na uszkodzenia DNA powodowane czynnikami zarówno wewnętrznymi jak i zewnętrznymi. W celu ochrony DNA, w toku ewolucji zostały wykształcone mechanizmy nie tylko naprawy uszkodzonego DNA, ale również odpowiedzi komórkowej na występowanie nienaprawionego DNA. Należą do nich śmierć komórkowa oraz starzenie komórkowe.

Uszkodzenia DNA w komórce są wykrywane przez tak zwane punkty kontroli (checkpoints), które działają w różnych fazach cyklu komórkowego, powodując jego czasowe zatrzymanie umożliwiające naprawę lub permanentne zatrzymanie, prowadzące do zahamowania podziałów i starzenia komórkowego. Kiedy uszkodzenia są bardzo rozległe uruchamiany jest mechanizm śmierci komórkowej.

Starzenie komórkowe jest indukowane uszkodzeniami DNA generowanymi przez skracające się z każdym podziałem telomery. Jest to starzenie replikacyjne. Znane jest również starzenie przyspieszone, indukowane uszkodzeniami w dowolnym miejscu DNA (SIPS).

W Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia od dawna zainteresowania naukowe skupiają się wokół mechanizmów śmierci komórkowej i starzenia komórkowego zarówno komórek prawidłowych jak i nowotworowych.

W niniejszej pracy podstawowym celem było badanie mechanizmów śmierci i starzenia ludzkich limfocytów T (CD3+) pod wpływem uszkodzeń DNA.

W szczególności chcieliśmy zweryfikować hipotezę, zakładającą, że podobne ścieżki sygnalizacyjne indukowane uszkodzeniami DNA uruchamiane są zarówno w limfocytach spoczynkowych, jak też i proliferujących. W związku z tym postanowiono:

1. Zbadać rolę uszkodzeń DNA w śmierci spoczynkowych limfocytów T traktowanych:
 - etopozydem, który jest inhibitorem topoizomerazy II i powszechnie stosowanym lekiem przeciwnowotworowym

- kurkumina, która jest naturalnym związkiem roślinnym o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym i będącą przedmiotem naszego zainteresowania od wielu lat.

Jako komórki referencyjne postanowiono wykorzystać komórki białaczki limfocytarnej linii Jurkat. Badania te miały pokazać działanie etopozydu oraz kurkuminy na komórki prawidłowe, co może stanowić uboczny niepożądany efekt leczenia nowotworu tymi związkami.

2. Zweryfikować hipotezę mówiącą, że w limfocytach T, ulegającym *in vitro* tak zwanemu starzeniu replikacyjnemu, dochodzi pod wpływem mitogenu do aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej od uszkodzeń DNA, która może być bezpośrednią przyczyną ich starzenia
3. Zweryfikować hipotezę mówiącą, że aktywowane (dzielące się) limfocyty T, traktowane związkiem uszkadzającym DNA (etopozydem), mogą ulegać nie tylko śmierci komórkowej, ale również przyspieszonemu starzeniu (SIPS).

Badania te stanowić miały wkład w poparcie jednej z wiodących teorii starzenia komórkowego mówiącej, że główną przyczyną starzenia się komórek są uszkodzenia DNA.

4. Materiały i metody

4.1. Materiały

4.1.1. Odczynniki

- Akrylamid/bis-akrylamid 40%, roztwór 29:1 (BioShop # ACR004)
- Alkohol etylowy 96% cz.d.a. (CHEMPUR # UN 1170)
- Alkohol metylowy cz.d.a. (CHEMPUR # UN 1230)
- Antybiotyki do pożywki: *Penicillin – Streptomycin solution stabilised* (10000 U penicyliny i 10 mg streptomycyny na ml) (Sigma # P4333)
- APS: *ammonium persulfate* (Sigma # A3678)
- Bydłęca surowica płodowa (FBS): *fetal bovine serum*, (CytoGen # CA5-104)
- Błękit bromofenolowy: *Bromophenol Blue sodium salt* (Sigma # B7021)
- Chlorek sodu cz.d.a. (CHEMPUR # 117941206)
- Błękit Coomassie: *Coomassie Brilliant Blue G-250* (SERVA # 35050)
- Błękit Coomassie: *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Bio-Rad # 161-0400)
- Dodecylosiarczan sodowy (DMSO): *Dimethyl sulfoxide 99.5%* (Sigma # D4540)
- Ditiotretitol (DTT): *DL-dithiothreitol electrophoresis reagent 99%* (Sigma # D9163);
- Draq5; *1,5-Bis[[2-(dimethylamino)etyl]amino]-4,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione* (Biostat Limited # BOS-889-001)
- Substrat do chemiluminescencji: *ECL Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare # RPN2209)
- Etopozyd (Sigma # E1383)
- Formaldehyd (Sigma # F8775)
- Klisza fotograficzna: *KODAK Medical X-Ray Film General Purpose Blue* (KODAK # 5256433)
- Glicerol (Sigma # G2025)
- Glicyna cz.d.a. (POCh # 527560117)
- Glutaraldehyd (Sigma # G7526)
- Interleukina-2; recombinant human IL-2 (R&D System; 202)
- KU55933; *2-(4-Morpholinyl)-6-(1-thianthrenyl)-4H-pyran-4-one* (Tocris # 3544)
- Kwas octowy 80% cz.d.a. (POCh # 568733117)
- Kwas solny 35-38% cz.d.a. (POCh # 575283115)

- L-glutamina 200mM (Sigma # G7513)
- *Lymphocyte Separation Medium* (LSM) (MP Biomedicals # 50494)
- Marker białkowy: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas # SM0671)
- Marker białkowy: *ProSieve® QuadColor™ Protein Marker* (Lonza # 00193837)
- Membrana nitrocelulozowa (Whatman; 10 401 197)
- N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED) (Sigma # T9281)
- Nadsiarczan amonowy (APS): *Ammonium persulfate* (Sigma # A3678)
- Odtłuszczone mleko w proszku
- Paraformaldehyd (Sigma # P6148)
- PBS: buforowany fizjologiczny roztwór soli bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN)
- PHA, fitohemaglutynina [105] (Sigma# L2769)
- Pożywka RPMI 1640: *Roswell Park Memorial Institute medium series 1640* (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN)
- Ponceau S (Sigma # P3504)
- RNAza A; *Ribonuclease A* (Sigma # R6513)
- Sybr®Green, (Invitrogen, Darmstadt, Germany)
- surowicza albumina wołowa (BSA) (Sigma # A2153)
- szkiełka: Superfrost Plus (Thermo Scientific # 4951PLUS)
- Tris: *Trisma base* (Sigma # T1503)
- Triton X-100 (Sigma # T9284)
- Tween 20 (Sigma # P7949)
- X-gal (5-bromo-4-chloro-3-inodyl-β-D galactopyranoside) (Sigma # B9146)

4.1.2. Przeciwciała

Antygen	Pochodzenie	Producent
p-ATM (Ser1981)	mysz	Abcam (#ab 81292)
ATM	królik	Millipore (# 07-1286)
PARP	mysz	Enzo Life Sciences (# SA 249)
p-Chk2 (Thr68)	królik	Cell Signaling (# 2661)
Chk2	mysz	Millipore (# 05-649)
p-Chk1 (Ser317)	królik	Cell Signaling (# 2344)
Chk1	królik	Cell Signaling (#2345)
p-p53 (Ser15)	królik	Cell Signaling (# 9284)
p53 DO-1	mysz	Santa Cruz Biotechnology (# sc-126)
Aktyna	mysz	Sigma (# A5541)
p21	królik	Santa Cruz Biotechnology (# sc-397)
γ H2AX	mysz	Abcam (# ab18311)
H2AX	królik	Millipore (# 07-627)
Puma	królik	Cell Signaling (# 4976)
Bax	mysz	BD Bioscience (556467)
Kaspaza-2	mysz	Cell Signaling (# 2224)
Kaspaza-3	królik	Cell Signaling (# 9665)
Kaspaza-8	mysz	Cell Signaling (# 9746)
Kaspaza-9	mysz	Cell Signaling (# 9508)

Tabela 4.1. Wykaz klasycznych przeciwciał monoklinalnych.

Antygen	Pochodzenie	Enzym	Producent
część Fc króliczych IgG	koza	peroksydaza chrzanowa	Dako (# P0448)
część Fc mysich IgG	koza	peroksydaza chrzanowa	Dako (# P0447)

Tabela 4.2. Wykaz przeciwciał sprzężonych z enzymem HRP.

Antygen	Pochodzenie	Fluorochrom	Producent
CD3	mysz	FITC	BD Bioscience (#555339)
CD4	mysz	PE	BD Bioscience (#555347)
CD8	mysz	PerCP	BD Biosciences (# 345774)
CD28	Mysz	APC	BD Bioscience (# 559770)
część Fc króliczych IgG	koza	Alexa555	Invitrogen (# A21428)
część Fc mysich IgG	koza	Alexa488	Invitrogen (# A11001)

Tabela 4.3. Wykaz przeciwciał sprzężonych z fluorochromem.

4.1.3. Zestawy

- Annexin V : PE Apoptosis Detection Kit I (BD Bioscience # 559763)
 - 7-aminoaktynomycyna (7-AAD)
 - aneksyna V PE
 - bufor do wiązania aneksyny V 10x
- CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-2 Staining Kit (BioVision # K182-25)
 - bufor do płukania
 - FITC-VDVAD-FMK
 - Z-VAD-FMK
- RosetteSep® Human T Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies # 28570)
 - koktajl tetramerycznych przeciwciał anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD56, anti-CD66b i anti-glikoforyna A

4.1.4. Rozwory

4.1.4.1 Roztwory w izolacji limfocytów CD3

- PBS z 2% FBS – (PBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺). Roztwór przechowywano w 4°C, przed użyciem ogrzewano do temperaturze pokojowej.

4.1.4.2 Roztwory do traktowania komórek

- etopozyd – roztwór wyjściowy (25 mg/ml) przygotowywano w DMSO i przechowywano w -20°C. Bezpośrednio przed użyciem roztwór wyjściowy rozcieńczano w pożywce i dodawano do hodowli w odpowiedniej objętości dającej pożądane stężenie.
- KU55933 – roztwór wyjściowy (100 mM) przygotowywano w DMSO i przechowywano w -20°C. Przed użyciem rozcieńczano w stosunku 1:10 w DMSO i dodawano w objętości 1 µl/ml otrzymując stężenie 10 µM.
- Kurkumina – roztwór wyjściowy (1mg/ml) przygotowywano w DMSO. Do każdego doświadczenia przygotowywano świeży roztwór i dodawano do hodowli w odpowiedniej objętości dającej pożądane stężenie.

4.1.4.3 Roztworystosowane w preparatyce mikroskopowej

- Draq5 – rozcieńczano w stosunku 1:400 w PBS i przechowywano w 4°C.
- 2% paraformaldehyd –paraformaldehydu rozpuszczano w H₂O i przechowywano w -20°C. Każdorazowo korzystano ze świeżo rozmrożonej porcji.
- 70% alkohol etylowy

- bufor do blokowania – 5% BSA w PBS z dodatkiem 0,5% Tween20 i 0,1% Triton X-100.
- bufor do rozcieńczania przeciwciał – 1% BSA w PBS z dodatkiem 0,5% Tween20 i 0,1% Triton X-100.

4.1.4.4 Roztwory stosowane w oznaczaniu aktywności kwaśnej β -galaktozydazy

- Bufor do utrwalania komórek: PBS zawierający 2% formaldehyd i 0,2% glutaraldehyd
- Bufor do wykrywania β -galaktozydazy: wodny roztwór zawierającym 1mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-inodyl (x-gal), 5mM żelazo(II)cyjanek potasu ($C_6FeK_4N_6 \cdot 3H_2O$), 5mM żelazo(III)cyjanek potasu ($C_6FeK_3N_6$), 150mM NaCl, 2mM $MgCl_2$ i bufor fosforanowy pH 6,0
- bufor fosforanowy pH 6,0 przygotowywano poprzez zmieszanie 87,7 ml NaH_2PO_4 0,1M (13,79 g/l) z 12,3 ml Na_2HPO_4 0,1M (17,79 g/l), co dawało pożądaną wartość pH.

4.1.4.5 Roztwory stosowane w metodzie FADU

- Bufor do zawieszenia komórek (Mezo-inozytol 0,25M; Na_2PO_4 10mM; $MgCl_2$ 1mM)
- Bufor lizujący (mocznik 9M; NaOH 10mM; czteroocian cykloheksyloaminy 2,5mM; SDS 0,1%)
- Bufor alkaliczny (42,5% bufor lizujący; NaOH 0,2M)
- Bufor neutralizujący (glukoza 1M; β -merkaptoetanol 14mM)

4.1.4.6 Roztwory stosowane metodzie Western blot

- 1 M DTT –rozpuszczono w H_2O i przechowywano w temperaturze $-20^\circ C$.
- 10% APS – rozpuszczano w H_2O i przechowywano w temperaturze $-20^\circ C$.
- 10% SDS –rozpuszczono w H_2O i przechowywano w temperaturze pokojowej.
- 5% mleko –rozpuszczano w TBST i przechowywano w $4^\circ C$.
- 7% kwas octowy
- bufor do elektroforezy – roztwór wyjściowy (5x stężony) przygotowywano poprzez rozpuszczenie w H_2O : 30,2 g Trisu, 188 g glicyny oraz 10 g SDS w końcowej objętości 2 litrów i przechowywano w temperaturze pokojowej. Do rozdziału elektroforetycznego roztwór wyjściowy rozcieńczano 5x w H_2O .
- bufor do strippingu – 1,5 g glicyny, 0,1 g SDS i 1 ml Tween20 rozpuszczono w 90 ml H_2O i ustalano pH 2.2 za pomocą stężonego HCl, po czym uzupełniano H_2O do 100 ml.

- bufor do transferu – roztwór wyjściowy (5x stężony) przygotowywano poprzez rozpuszczenie w H₂O: 30,28 g Trisu, 144 g glicyny i 5 g SDS w końcowej objętości 2 litrów i przechowywano w temperaturze pokojowej. Przed użyciem 200 ml 5x stężonego roztworu rozcieńczano w 600 ml H₂O i dodawano 200 ml metanolu, po czym pozostawiano do schłodzenia w 4°C.
- bufor Laemmli'go – 10 ml 2x stężonego buforu przygotowano przez wymieszanie: 1,25 ml 1M Tris-HCl pH 6.8, 4 ml 10% SDS, 2 ml glicerolu, 1,75 ml H₂O. Roztwór zabarwiono szczyptą błękitu bromofenolowego, a przed użyciem dodawano 1 M DTT (czynnik redukujący) w proporcji 1:9.
- bufony na bazie Trisu do przygotowania żelu poliakrylamidowego; przechowywane były w temperaturze 4°C:
 - 1 M Tris-HCl pH 6.8 – 60,57 g Trisu rozpuszczano w 400 ml H₂O, pH ustalano po dobie od przygotowania za pomocą stężonego HCl, po czym uzupełniono do 500 ml.
 - 1,5 M Tris-HCl pH 8.8 – 90,85 g Trisu rozpuszczono w 400 ml H₂O, pH ustalano po dobie od przygotowania za pomocą stężonego HCl, po czym uzupełniono do 500 ml.
- Ponceau S – 1 g różu Ponceau S rozpuszczano w 100 ml 3% kwasu octowego. Przechowywano w temperaturze pokojowej.
- roztwór błękitu Coomassie – 2 g Coomassie Brilliant Blue R-250 i 0,5g Coomassie Brilliant Blue G-250 rozpuszczono w 425 ml 96% alkoholu etylowego, 50 ml alkoholu metylowego, 100 ml 80% kwasu octowego i 425 ml H₂O. Po wymieszaniu i przesączeniu przechowywano w temperaturze pokojowej i używano wielokrotnie.
- TBST – TBS z 0,1% Tween20 – roztwór wyjściowy (10x) przygotowano rozpuszczając 48,4 g Trisu i 160 g NaCl w 1800 ml H₂O. Po upływie doby ustalano pH 7,6 za pomocą stężonego HCl i uzupełniono H₂O do końcowej objętości 2l. Roztwór przechowywano w temperaturze 4°C. Przed użyciem roztwór rozcieńczano 10x w H₂O i dodawano Tween20 (0,1%). TBST przechowywano w 4°C.

4.1.5. Żele poliakrylamidowe

Odczynnik	Żel rozdzielający 8%	Żel rozdzielający 12%	Żel zagęszczający
H ₂ O	5,3	4,3	2,166
akrylamid	2	3	0,384
1 M Tris-HCl pH 6.8	2,5	2,5	0,38
10% SDS	0,1	0,1	0,03
10 % APS	0,1	0,1	0,03
TEMED	0,006	0,004	0,003

Tabela 4.4. Objętości odczynników do przygotowania 10 ml żelu rozdzielającego i 3 ml żelu zagęszczającego – wystarczające do przygotowania dwóch żeli.

4.1.6. Wykorzystywany sprzęt i oprogramowanie

- aparat do elektroforezy – Mini-PROTEAN 3-cell i transferu – Mini trans-Blot® (Bio-Rad)
- cytometr przepływowy BD FACSCalibur; oprogramowanie CellQuestPro (BD Bioscience)
- mikroskopy konfokalne - Leica TCS SP5 i Leica TCS SP2; oprogramowanie LAS AF (Leica)
- mikroskop świetlny Olympus (D45); oprogramowanie StudioLite
- oprogramowanie do obróbki zdjęć – Adobe Photoshop
- oprogramowanie do obróbki danych – Microsoft Excel
- oprogramowanie do obliczenia statystyki GraphPad Prism 4.02.
- skaner SYNGENE InGenius; oprogramowanie GeneSnap i GeneTools (SYNGENE)
- Genesis RSP 100 liquid handling device (LHD) (TECAN AG, Hombrechtikon, Switzerland)
- oprogramowanie GEMINI V4.0 (TECAN GmbH) (Berlin, Germany)
- wywoływarka Fuji FPM 800A

4.2. Metody

4.2.1. Materiał badawczy-komórki i linie komórkowe

- Pierwotne ludzkie limfocyty T izolowano z frakcji leukocytno-płytkowej otrzymywanego z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa przy ul.

Saskiej 63/75 w Warszawie. Według Dyrektywy Komisji 2004/33/WE frakcja leukocytarно-platekowa oznacza składniki krwi powstałe z odwirowania jednostki krwi pełnej i zawiera znaczną część leukocytów i płytek krwi. Dawcami były młode osoby w wieku 20-30 lat.

- Komórki białaczki limfocytarnej linii Jurkat E6.1 zakupiono z ECACC (European Collection of Cell Culture). 24 godziny przed traktowaniem komórki wysiewano w gęstości 4×10^5 komórek na ml.

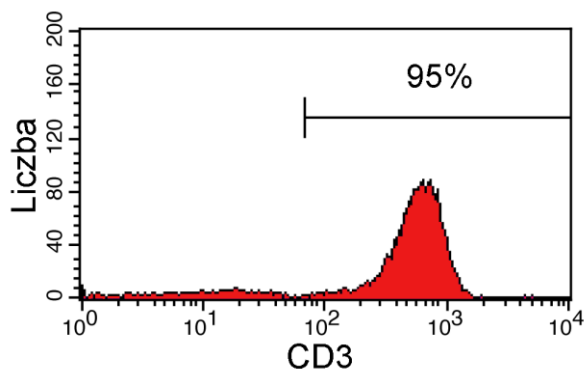
Zarówno limfocyty T jak i komórki linii Jurkat hodowano w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem 10% FBS, 2mM L-glutaminy i antybiotyków (50µg/ml streptomycyny i 50 U/ml penicyliny) w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂, 95% wilgotności)

4.2.2. Izolacja limfocytów CD3+ z frakcji leukocytarно-platekowej

Limfocyty T (CD3+) izolowano w wyniku negatywnej selekcji przy pomocy zestawu RosetteSep® Human T Cell Enrichment Cocktail, który zawiera koktajl przeciwciał skierowanych przeciwko wszystkim elementom morfotycznym krwi poza limfocytami T (patrz tabela 5). Przeciwciała wyprodukowane są w formie tetrametrów (TAC – tetrameric antibody complexes) rozpoznających z jednej strony komórki niepożądane a z drugiej erytrocyty, bądź tylko erytrocyty. W wyniku dodania koktajlu przeciwciał do krwi, tworzone są duże agregaty komórkowe (rozetki immunologiczne) złożone z elementów nieporządných, a tylko limfocyty T pozostają niezwiązane. W wyniku wirowania w gradiencie gęstości duże agregaty komórkowe, jako cięższe opadają na dno probówki. Natomiast na granicy faz osocza i medium znajdują się limfocyty T. W wyniku zastosowania zestawu RosetteSep® Human T Cell Enrichment Cocktail uzyskano populację limfocytów T o czystości ok. 95% (Rys. 4.1.).

ANTYGEN PRZECIWCIAŁA	KOMÓRKI WYKAZUJĄCE EKSPRESJĘ
CD16	granulocyty, komórki NK
CD19	limfocyty B
CD36	monocyty, płytki krwi
CD56	komórki NK
CD66b	granulocyty
glikoforyna A	erytrocyty

Tabela 4.5. Wykaz specyficzności przeciwciał występujących w zestawie RosetteSep® Human T Cell Enrichment Cocktail.



Rys. 4.1. Odsetek limfocytów T w populacji komórek izolowanych za pomocą zestawu RosetteSep® Human T Cell Enrichment Cocktail z frakcji leukocyarno-płytkowej.

Do 20 ml frakcji leukocyarno-płytkowej dodawano 1 ml koktajlu przeciwciał (stężenie 50 $\mu\text{l/ml}$) i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próbę rozcieńczano PBS bez jonów wapnia i magnezu z dodatkiem 2% FBS w stosunku 1:1. Roztwór nakładano na LSM (Lymphocyte Separation Medium) w stosunku 2:1 i wirowano przy 1200 x g przez 20 minut. Powstałą „interfazę” stanowiącą pożądaną komórkę zbierano za pomocą pipety pasterowskiej, dwukrotnie płukano 15 ml PBS bez wapnia i magnezu z dodatkiem 2% FBS oraz wirowano przy 165 x g przez 5 min. Następnie komórki liczone przy użyciu komory Neubauera i zawieszano w pożywce RPMI-1640 z dodatkiem 10% FBS, 2mM glutaminy, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycyny i 50 U/ml penicyliny w gęstości $1 \times 10^6/\text{ml}$. Stres wywołany izolacją komórek minimalizowano pozostawiając hodowlę przez noc w inkubatorze (temperatura 37°C, 5% CO₂ oraz 95% wilgotności) przed docelowymi eksperymentami.

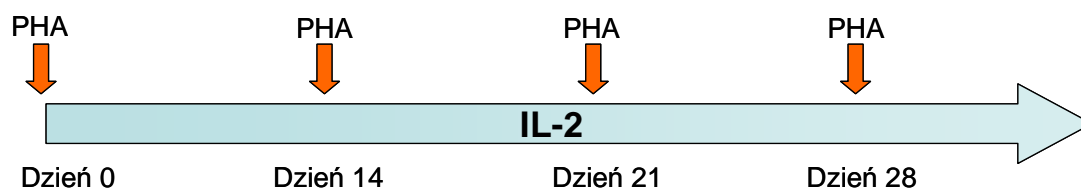
4.2.3. Traktowanie komórek

W zależności od doświadczenia spoczynkowe limfocyty T i komórki linii Jurkat traktowano etopozydem lub kurkumina. W celu wyznaczenia krzywej przeżywalności limfocyty T i komórki linii Jurkat były traktowane etopozydem w różnym stężeniu (1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 μM) lub kurkumina (5, 10, 20, 30, 50 μM), a następnie po 24 godziny dokonywano pomiaru (AneksynaV/7-AAD). Do dalszych doświadczeń wybrano stężenie 10 μM etopozydu i 50 μM kurkuminy, dla których wykonywano pomiary różnych parametrów w punktach czasowych 3, 6, 12, 24 i 48 godziny. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane w czasie „0h” lub traktowane DMSO w odpowiednim do doświadczenia czasie i stężeniu, które nie przekraczało 0,5%.

W doświadczeniach z zastosowaniem inhibitora kinazy ATM (KU-55933), badano cztery warianty doświadczalne. Limfocyty T traktowane DMSO (0,1%), tylko KU-55933 (10 μ M), tylko etopozydem (10 μ M) oraz KU-55933 (10 μ M) z etopozydem (10 μ M). Dla uproszczenia opisów rysunków wprowadzono odpowiednio skróty, oznaczające rodzaj traktowania: DMSO, KU, KU+ETO oraz ETO. Inhibitor ATM, był dodawany do hodowli 2 godziny przed traktowaniem etopozydem.

4.2.4. Indukcja starzenia replikacyjnego limfocytów T *in vitro*.

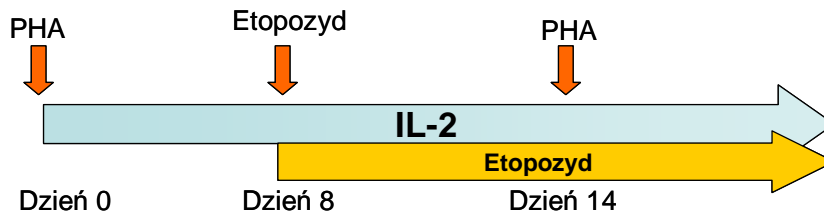
Limfocyty T stymulowano PHA 5 μ g/ml przez 48 godzin, po czym komórki zawieszano w świeżej pożywce z dodatkiem IL-2 (20U/ml). Co 2-3 dni komórki były przenoszone do nowej pożywki z IL-2 w gęstości 1x10⁶/ml. W dniach 0, 14, 21, 28 i 35 przed restymulacją pobierano odpowiednią liczbę komórek w celu przeprowadzenia poszczególnych pomiarów, a resztę traktowano PHA (5 μ g/ml) przez 48 godzin, w obecności IL-2. (Rys. 4.2.)



Rys. 4.2. Stosowany w doświadczeniach schemat indukcji replikacyjnego starzenia limfocytów T *in vitro*.

4.2.5. Indukcja przyspieszonego starzenia limfocytów T niskimi dawkami etopozydu.

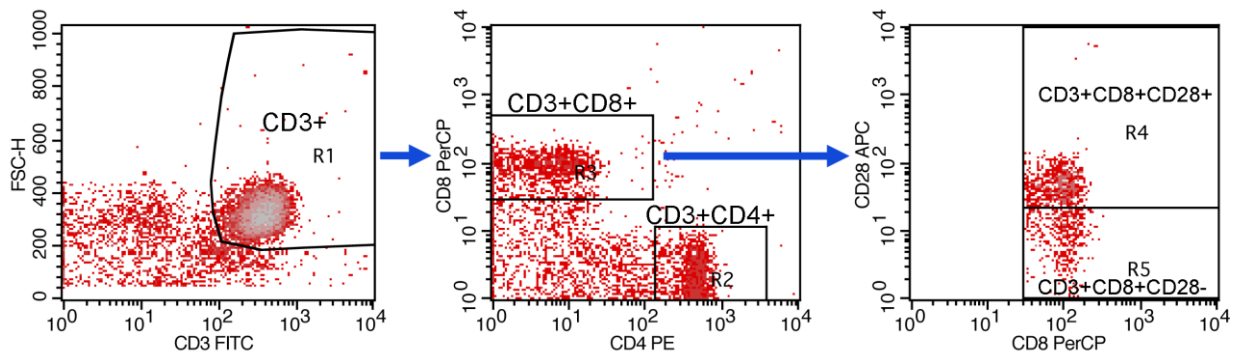
Limfocyty T stymulowane PHA przez 48 godzin były następnie hodowane w pożywce z IL-2. W dniu 8 hodowli komórki traktowano różnymi stężeniami etopozydu (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1; 2; 3; 5; 10; 20 μ M), w celu wybrania dawki indukującej uszkodzenia DNA ale nie powodującej znacznego wzrostu śmierci komórkowej. Do dalszych doświadczeń wybrano stężenie 0,1 μ M. W dniu 8 hodowli aktywowanych PHA i hodowanych z IL-2 limfocytów T, komórki traktowano 0,1 μ M etopozydem (Rys. 4.3.). Co 2-3 dni komórki w gęstości 1x10⁶/ml były przenoszone do nowej pożywki z IL-2 i 0,1 μ M etopozydem. W kolejnych dniach po dodaniu etopozydu, przeprowadzano poszczególne pomiary. Kontrolę stanowiły równoległe hodowane limfocyty T bez etopozydu.



Rys. 4.3. Stosowany w doświadczeniach schemat indukcji przyspieszonego starzenia limfocytów T *in vitro* niskim stężeniem etopozydu.

4.2.6. Analiza fenotypu limfocytów T

W celu sprawdzenia fenotypu subpopulacji limfocytów 50 μ l hodowli (ok. 50 tys. komórek) płukano w 3 ml PBS i wirowano przy 165 x g przez 5 min. Komórki zawieszano w 50 μ l PBS i dodawano po 2 μ l odpowiednich przeciwciał: anti-CD3 FITC, anti-CD4 PE, anti-CD8 PerCP i anti-CD28 APC. Następnie komórki inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej w ciemności. Próbki rozcieńczano 200 μ l PBS i mierzono przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur. Analizowano 10 000 komórek przy użyciu programu CellQuestPro. Rysunek 4.4. przedstawia sposób bramkowania subpopulacji limfocytów T.

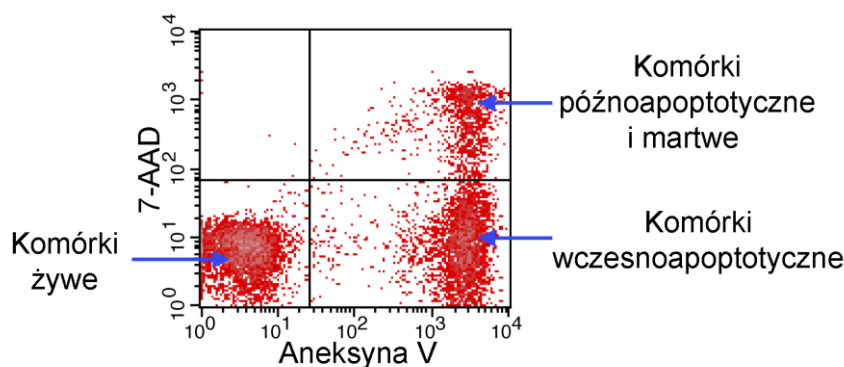


Rys. 4.4. Sposób oznaczania subpopulacji limfocytów T. Reprezentatywne wykresy gęstościowe przedstawiające sposób bramkowania (dzień 0).

4.2.7. Analiza poziomu śmierci komórkowej przy użyciu Aneksyny V i 7-AAD

Do oznaczenia poziomu apoptozy używano zestawu Annexin V: PE Apoptosis Detection Kit I. Utrata asymetrii błony komórkowej jest jednym z wczesnych markerów apoptozy. Prowadzi to do przemieszczenia lipidu – fosfatydyloseryny [37] z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony komórkowej. W obecności jonów wapnia aneksyna V przyłącza się do wyeksponowanej na zewnątrz fosfatydyloseryny, pozwalając na rozpoznanie komórek wczesnoapoptotycznych. Jednoczesne użycie barwnika 7-AAD, znakującego komórki późnoapoptotyczne i martwe pozwala na wyróżnienie poszczególnych etapów apoptozy (Rys. 4.5.). W celu przedstawienia odsetka komórek umierających w poszczególnych

doświadczeniach wprowadzono pojęcie indeksu apoptotycznego, który określa sumę komórek wczesnoapoptotycznych i późnoapoptotycznych/martwych.



Rys. 4.5. Przykładowy wykres gęstościowy przedstawiający sposób bramkowania komórek wyznakowanych aneksyną V-PE i 7-AAD. Wyróżnić można 3 populacje komórek: żywe (nie wyznakowane aneksyną V i 7-AAD), wczesnoapoptotyczne (wyznakowane aneksyną V, ale nie 7-AAD) oraz późnoapoptotyczne bądź martwe (wyznakowane aneksyną V i 7-AAD). Indeks apoptotyczny oznacza sumę komórek wczesnoapoptotycznych i późnoapoptotycznych/martwych.

W poszczególnych punktach czasowych pobierano 100 tys. komórek, dodawano 3 ml PBS i wirowano przy 165 x g przez 5 min. Komórki zawieszano w 100 µl buforu do aneksyny rozcieńczonego 10x w wodzie. Do próbek dodawano po 4 µl aneksyny V sprzężonej z PE oraz 7-amino-aktynomycyny D (7-AAD). Po 15 minutach inkubacji w ciemności w temperaturze pokojowej, próbki rozcieńczano 200 µl buforu do aneksyny, po czym dokonywano pomiaru za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur. Używając programu CellQuestPro analizowano 10 tys. komórek.

4.2.8. Oznaczanie poziomu aktywnej kaspazy-2 w komórkach

FITC-VDVAD-FMK jest specyficznym inhibitorem kaspazy-2 sprzężonym z fluorochromem. Wnika do wnętrza komórki, gdzie łączy się nieodwracalnie z aktywną kaspazą-2, której poziom jest proporcjonalny do intensywności świecenia.

Do oznaczenia używano zestawu CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-2 Staining Kit zgodnie z zaleceniami producenta. Do 300 µl zawiesiny komórek w pożywce (ok. 300 tys. komórek) dodawano po 1 µl FITC-VDVAD-FMK, po czym inkubowano przez 1h w 37°C i 5% CO₂. Komórki płukano dwukrotnie 3 ml buforu do płukania wirując przy 165 x g przez 5 min. Następnie zawieszano w 500 µl i analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur.

4.2.9. Oznaczanie aktywności SA- β -galaktozydazy

Jednym z najbardziej powszechnych markerów starych komórek jest aktywność tak zwanej SA- β -galaktozydazy (SA- β -Gal), którą oznaczano za pomocą dwóch metod:

Mikroskopia – według protokołu opisanego przez Dimri i współl. [106]. 3×10^5 komórek płukano w 5ml PBS (165 x g, 5 min) i zawieszono w 150 μ l PBS, przenoszono na szkiełka podstawowe i cytospinowano przy 800 RPM przez 5 min. Po wirowaniu nadmiar płynu odsączono bibułą i osadzone na szkiełku komórki utrwalano 2% formaldehydem i 0,2% glutaraldehydem w PBS przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie płukano w PBS i inkubowano przez noc w 37°C, w szalce zalanej parafilmem w ciemności w wodnym roztworze zawierającym 1mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-inodyl (x-gal), 5mM żelazo(II)cyjanek potasu ($C_6FeK_4N_6 \cdot 3H_2O$), 5mM żelazo(III)cyjanek potasu ($C_6FeK_3N_6$), 150mM NaCl, 2mM $MgCl_2$ i bufor fosforanowy pH 6. Po nocy preparaty płukano PBS, zakrywano szkiełkiem nakrywkowym w roztworze zatapiającym (mounting medium). Aktywność β -galaktozydazy (niebieskie zabarwienie) analizowano w świetle przechodzącym za pomocą mikroskopu świetlnego Olympus (D45).

Metoda cytometryczna – według protokołu opisanego przez Kurz i wsp. [107], polegającego na inkubacji komórek z substratem kwaśnej β -galaktozydazy – $C_{12}FDG$, który ulegając hydrolizie daje fluorescencyjny produkt. 600 μ l hodowli komórkowej inkubowano z $C_{12}FDG$ w stężeniu 33 μ M przez 2h w 37°C. Następnie płukano 2 razy w 5ml PBS, zawieszono w 500 μ l PBS i mierzono przy pomocy cytometru przepływowego FACSCalibur. Korzystając z programu CellQuestPro analizowano 10 tys. komórek i wyniki przedstawiono jako średnią fluorescencje (Geo Mean).

4.2.10. Barwienia immunocytochemiczne

300 μ l hodowli komórkowej (ok. 300 tys.) płukano w 5 ml PBS i wirowano przy 165 x g przez 5 min. Następnie do zawieszonych w 0,5 ml PBS komórek dodawano 0,5 ml roztworu paraformaldehydu otrzymując stężenie 2%. Po 20 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej komórki płukano dwa razy 10 ml PBS wirując przy 235 x g przez 5 min. Osad zawieszano w 150 μ l PBS, przenoszono na szkiełka podstawowe i cytospinowano przy 800 RPM przez 5 min. Szkiełka osuszano i płukano przez 15 minut w PBS, po czym przenoszono do 70% alkoholu etylowego o temperaturze -20°C i przechowywano w -20°C minimum 24h. Zebrane preparaty płukano przez 15 min w PBS w temperaturze pokojowej, a następnie blokowano przez 30 minut w wilgotnej komorze nakraplając 75 μ l buforu do

blokowania (5% BSA w PBS z 0,5% Tween-20 i 0,1% Triton X-100). Następnie płukano 15 minut w PBS i inkubowano 2 godziny z przeciwciałami I-rzędowymi (anty-fosfo-ATM, anty- γ H2AX i anty-53BP1) rozcieńczonymi 1:500 w 1% BSA w PBS z 0,5% Tween-20 i 0,1% Triton X-100. Po etapie 15 min płukania w PBS preparaty inkubowano 1 godzinę z odpowiednimi przeciwciałami II-rzędowymi (anty-mouse-Alexa488 i anty-rabbit-Alexa555) rozcieńczonymi 1:500 w 1% BSA w PBS z 0,5% Tween-20 i 0,1% Triton X-100. Po płukaniu, (PBS 15 min) barwiono DNA przez 10 min, używając roztworu Draq5 (1:400 w PBS). Po kolejnym płukaniu (PBS 15 min), preparaty zamykano szkiełkiem nakrywkowym w płynie zatapiającym. Gotowe preparaty przechowywano w -20°C .

Tworzenie skupisk γ -H2AX i 53BP1 oraz intensywność fluorescencji fosfo-ATM oceniano za pomocą mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5 lub TCS SP2, wykorzystując oprogramowanie LAS AF (Leica Microsystems). W przypadku barwienia fosfo-ATM, średni poziom fluorescencji był mierzony za pomocą programu LAS AF, a analizie poddano co najmniej 50 komórek z każdego punktu czasowego eksperymentu.

4.2.11. Analiza poziomu białek techniką Western Blotting

4.2.11.1 Izolacja białka

Całkowite ekstrakty białkowe uzyskiwano stosując metodę Laemmliego (Laemmli 1970). W poszczególnych punktach czasowych pobierano ok. 5 mln komórek, płukano dwukrotnie w 10 ml PBS i wirowano przy $165 \times g$ przez 5 min. Osad komórek zawieszano w 1 ml PBS i wirowano przy $6720 \times g$ przez 5 min. Supernatant odrzucano, natomiast osad komórek przechowywano w -20°C . Po zebraniu prób ze wszystkich punktów czasowych osady komórkowe rozmrażano powoli na lodzie i zawieszano w PBS oraz dodawano równą objętość 2x stężonego buforu Laemmliego. W celu uzyskania jednorodnej zawiesiny próbki homogenizowano przy użyciu strzykawki insulinówki (BD Bioscience) i gotowano w 95°C przez 10 min. Następnie otrzymane ekstrakty wirowano przy $10500 \times g$ przez 5 min, a zebrany nasącz zawierający białka całkowite przechowywano w -20°C .

4.2.11.2 Wyrównanie ilości białka

W celu wyrównania ilości białka preparaty rozdzielano elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowy w aparacie Mini-PROTEAN 3-cell (Bio-Rad) w buforze do elektroforezy. Podczas przemieszczania się białek. W żelu zagęszczający napięcie wynosiło 50 V, natomiast po przejściu do żelu rozdzielającego 120 V. Po rozdziale żel barwiono błękitem Coomassie

przez 5 min, a następnie odbarwiano 7% kwasem octowym do uzyskania wyraźnych prążków. Na podstawie intensywności prążków organoleptycznie wyznaczano objętości próbek nanoszonych na żel. W razie potrzeby czynność powtarzano do uzyskania równych ilości białka.

4.2.11.3 Western Blotting

W zależności od wielkości badanych białek rozdział elektroforetyczny przeprowadzano w 10% lub 12% (H2AX) żelu poliakrylamidowy przy napięciu 120V. Natomiast do rozdzielania białek o wysokich masach cząsteczkowych (ATM) stosowano żel 8% i napięcie 80V. Po rozdziale wykonywano mokry transfer białek na membranę nitrocelulozową (Wathmann) przy użyciu aparatu Mini trans-Blot® (Bio-Rad) w buforze do transferu przez 1 godzinę w 4°C przy natężeniu 400mA. W przypadku dużych białek transfer prowadzono 2,5h w 4°C przy natężeniu 370 mA. Skuteczność transferu potwierdzano barwieniem membrany przy użyciu barwnika Ponceau-S przez 1 min, który następnie odbarwiano płuczając wodą. Po potwierdzeniu przeniesienia białek na membranę blokowano ją przez 1h w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBST (TBS z 0,1% Tween 20). Następnie membranę inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami I-rzędowymi przez noc w wilgotnej komorze w temp. 4°C. Przeciwciała rozcieńczano w 5% mleku w TBST (Tab. 6). Po nocnej inkubacji membranę płukano 3x w TBST przez 10 min, a następnie inkubowano przez 1h w temperaturze pokojowej z II-rzędowymi przeciwciałami połączonymi z peroksydazą chrzanowa (HRP) (Tab. 6). Dzięki kolejnemu 3x płukaniu w TBST przez 10 min pozbywano się nadmiaru niezwiązanych przeciwciał. Detekcja odbywała się w ciemni przy użyciu systemu do chemiluminescencji: ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare). Membranę inkubowano z substratem (nadtlenek wodoru i luminol) przez 1 min, a następnie prowadzono detekcję sygnału na kliszy fotograficznej w kasecie. Obraz wywoływano automatycznie za pomocą FPM 800A. Klisze skanowano (InGenius) oraz poddawano obróbce przy użyciu programów GeneSnap, GeneTools, Adobe Photoshop.

4.2.11.4 Stripping

Jeżeli na jednej membranie badano białka o zbliżonych masach cząsteczkowych bądź jedno białko za pomocą przeciwciał skierowanym przeciw różnym epitopom korzystano z techniki strippingu tj. usunięcia przeciwciał I i II rządowych związanych z membraną. Po przeprowadzeniu całej procedury Western Blot i detekcji szukanych białek membranę płukano dwa razy w buforze do strippingu 5-10 min. Następnie dwa razy w PBS (10 min) i

dwa razy w TBST (5-10 min). Tak przygotowana membrana była gotowa do etapu blokowania w 5% mleku i dalszych etapów preparatyki.

Antygen przeciwciała I-rzędowego	Rozcieńczenie
p-ATM (Ser1981)	1:500
ATM	1:500
PARP	1:1000
p-Chk1 (Ser317)	1:500
Chk1	1:500
p-Chk2 (Thr68)	1:500
Chk2	1:500
p-p53 (Ser15)	1:500
p53 DO-1	1:500
Aktyna	1:50000
p21	1:250
γ -H2AX	1:1000
H2AX	1:1000
PUMA	1:1000
BAX	1:500
Kaspaza-2	1:500
Kaspaza-3	1:500
Kaspaza-8	1:500
Kaspaza-9	1:500
Przeciwciała II-rzędowe	Rozcieńczenie
Królicze IgG	1:2000
Mysie IgG	1:2000

Tabela 4.6. Rozcieńczenia przeciwciał używane w technice Western blot.

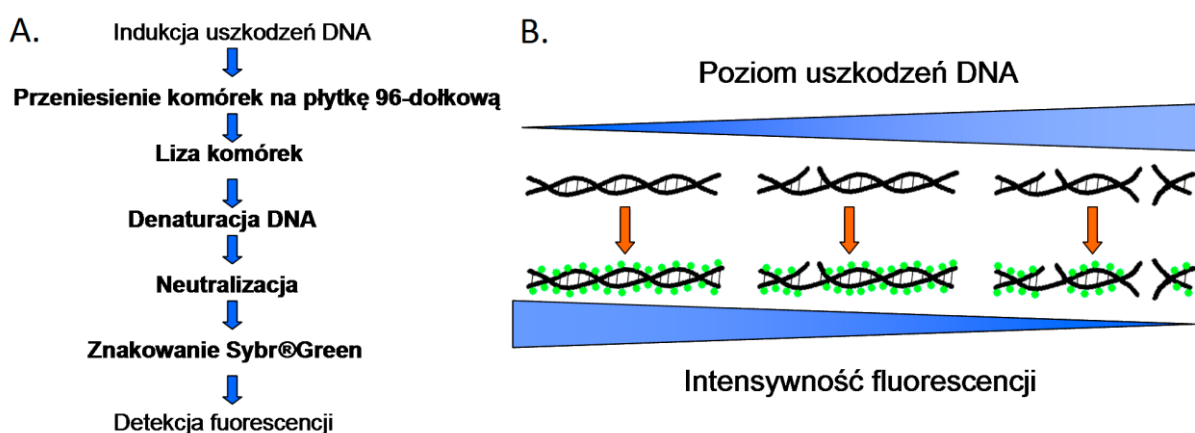
4.2.12. Detekcja uszkodzeń DNA techniką FADU

Pomiar ilości uszkodzeń DNA zmodyfikowaną i zautomatyzowaną metodą fluorometrycznej detekcji kontrolowanej denaturacji DNA w środowisku alkalicznym (Fluorimetric Detection of Alkaline DNA Unwinding) wykonano według protokołu opisanego przez Moreno-Villanueva [108]. Jest to bardzo dokładna metoda pomiaru pęknięć nici i naprawy DNA *in vitro*. Polega na częściowej denaturacji nici DNA w miejscach pojedynczych i podwójnych pęknięć, zachodzącej w kontrolowanych warunkach pH, czasu i temperatury (pH 12,5; 1h, 30°C).

Uproszczony schemat metody przedstawia rysunek 4.6A. Pierwszym etapem doświadczeń było traktowanie komórek badanym związkami (etopozyd lub kurkumina) przez 10, 20 lub 30 min. Dalsze etapy były wykonywane w sposób zautomatyzowany przez robota TECAN Genesis RSP 100 liquid handling device (LHD) (TECAN AG) (Hombrechtikon, Switzerland) obsługiwane przez program GEMINI V4.0 (TECAN GmbH) (Berlin,

Germany): przeniesienie komórek na płytkę 96-dółkowa, liza komórek, denaturacja DNA (alkaliczna), neutralizacja i znakowanie barwnikiem fluorescencyjnym Sybr®Green, (Invitrogen, Darmstadt, Germany), który wiąże się do dwuniciowego DNA. Następnie poziom fluorescencji mierzono czytnikiem przy 492nm.

Intensywność fluorescencji wyrażano jest jako procent świecenia Sybr®Green w próbie kontrolnej (komórki nietraktowane badanym związkiem). Spadek poziomu fluorescencji świadczy o wzroście poziomu uszkodzeń DNA. Rys. 4.6B.



Rys. 4.6. (A.) Schemat przedstawiający kolejne etapy metody FADU. Pogrubiona czcionka oznacza zautomatyzowane etapy, wykonywane przez robota. (B.) Zasada znakowania próbki Sybr®Green, który wiąże się do dwuniciowych odcinków DNA. Wzrost poziomu uszkodzeń DNA koreluje ze spadkiem intensywności fluorescencji.

4.2.13. Pomiar ilości DNA w komórce - cykl komórkowy

1×10^6 komórek płukano w 5ml PBS 165 x g przez 5 min. Następnie zawieszono w 300µl PBS i utrwalono wstrzykując je energicznie do zmrożonego (-20°C) 70% etanolu i przechowywano w -20°C przynajmniej przez noc. Utrwalone komórki płukano dwa razy w 10 ml PBS wirując przy 235 x g przez 5 min, zawieszono w 0,5 ml PBS i dodawano 1 ml roztworu PBS z 0,2M Na_2HPO_4 i 4 mM kwasem cytrynowy na 5 min. Następnie komórki zwirowano i inkubowano 30 min w temperaturze pokojowej w roztworze PBS z 3,8 mM cytrynianem sodu, 50 µl/ml jodku propidyny i 0,5 mg/ml RNAzy A. Po tym czasie mierzono ilość DNA przy pomocy cytometru przepływowego FACSCalibur w 10 tys. komórkach.

4.2.14. Oznaczanie poziomu aktywnego białka BAX

1×10^6 komórek płukano w 5 ml PBS (165 x g przez 5 min) i utrwalano w 4% PFA 15min w 4°C. Następnie płukano w 10 ml PSB (235 x g przez 5 min) i permabilizowano w

PBS z 0,05% saponiną przez 10 min w temp. pokojowej. Po zwirowaniu komórki blokowano w PBS z 3% surowicą kozią przez 30 min temp. pokojowej. Płukano w 5ml PBS z 0,05% saponiną (235 x g przez 5 min) i inkubowano 1 godzinę w 300 μ l z przeciwciałem I-rzędowym anti-Bax 6A7 rozcieńczonym 1:500 w PBS z 0,05% saponiną. Następnie płukano 2 razy w PBS z 0,05% saponiną i inkubowano 1 godzinę w 300 μ l z przeciwciałem II-rzędowym anti-mouse – Alexa488 rozcieńczonym 1:500 w PBS z 0,05% saponiną. Po dwukrotnym płukaniu w PBS z 0,05% saponiną komórki zawieszano w 500 μ l PBS i mierzono przy pomocy cytometru przepływowego FACSCalibur. Analizowano 10 tys. komórek.

4.2.15. Analiza statystyczna

Przedstawione wyniki stanowią wartości średnie z co najmniej trzech powtórzeń. Dokładna liczba powtórzeń znajduje się w opisach rysunków. Wszystkie wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD).

Dla porównani dwóch grup stosowano test Manna-Whitney'a. Podczas porównywania wyników za istotne statystycznie przyjęto różnice dla $P < 0,05$. Zastosowano następujące oznaczenia: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$. Do obliczeń używano oprogramowania Microsoft Excel oraz GraphPad Prism 4.02.

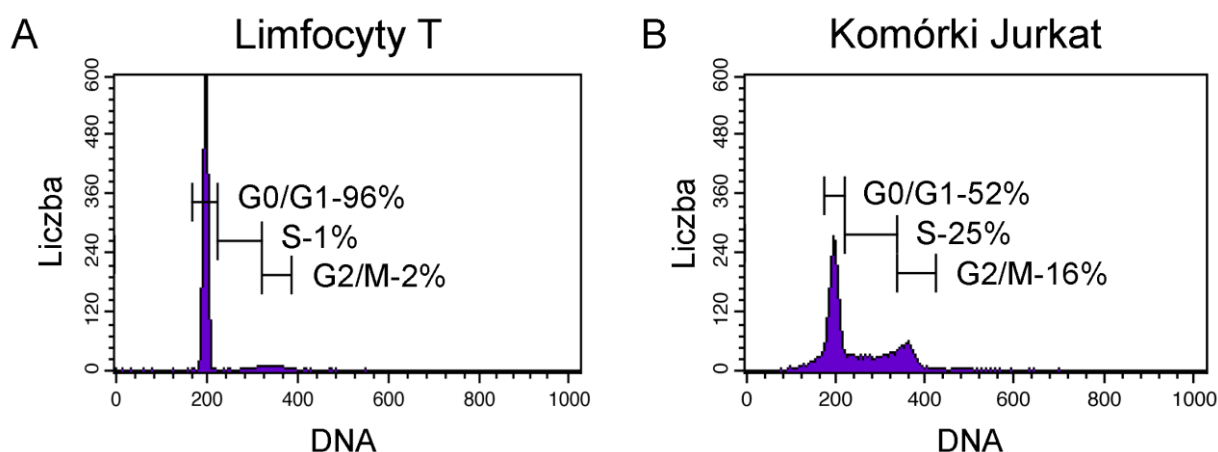
5. Wyniki

5.1. Uszkodzenia DNA prowadzą do aktywacji szlaku DDR i apoptozy ludzkich limfocytów T

5.1.1. Analiza ilości DNA w spoczynkowych limfocytach T i komórkach linii Jurkat

Głównym celem pracy było zbadanie szlaku DDR w limfocytach T. Limfocyty T pochodzące od zdrowych osób są komórkami spoczynkowymi. Dla porównania wykorzystano komórki białaczki limfocytarnej, które pochodzą od limfocytów T (komórki linii Jurkat). Użycie do badań limfocytów T stymulowanych do proliferacji niesło pewne ograniczenia, gdyż aktywacja limfocytów T prowadzi do podziałów, którym towarzyszy śmierć (AICD - *Activation-Induced Cell Death*).

Rysunek 5.1. przedstawia przykładowe histogramy pomiaru ilości DNA w prawidłowych, nieproliferujących limfocytach T (A) oraz dzielących się komórkach linii Jurkat (B). Na wykresie podano procent komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Analiza cytometryczna nie pozwala na rozróżnienie faz G0 od G1 oraz G2 od M. 96% spoczynkowych limfocytów T posiadało 2N DNA, co oznacza, że były w fazie G0 lub G1. Tylko 3% komórek posiadało większą ilość DNA (fazy S i G2/M). W proliferujących komórkach linii Jurkat wartości te przedstawiały się następująco: G0/G1-52%, S-25 i G2/M-16%.



Rys. 5.1. Ilość DNA w spoczynkowych limfocytach T i komórkach linii Jurkat. Przykładowe histogramy przedstawiające zawartość DNA w obwodowych limfocytach T izolowanych od dawców (A) i komórek linii Jurkat (B). Procenty przedstawiają odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

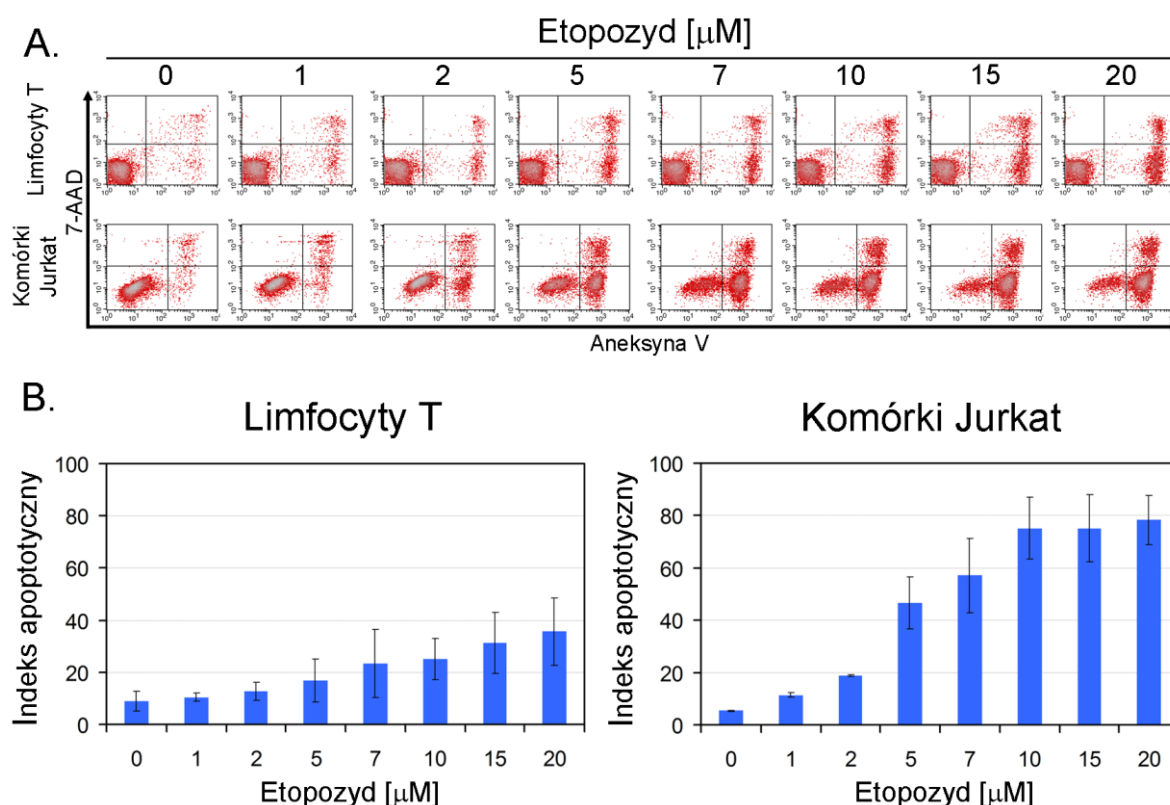
Spoczynkowe limfocyty T są komórkami poza cyklem komórkowym w fazie G0. Zawierają 2N DNA, co jest ilością charakterystyczną także dla fazy G1. Jednakże bardzo

mały odsetek komórek w fazie syntezy (G2) i mitozy (M) świadczy o tym, że są to komórki nieproliferujące. Ponad 40 % komórek linii Jurkat ma więcej niż 2N DNA, co jest charakterystyczne dla dzielących się komórek będących w cyklu komórkowym.

5.1.2. Pomiar markerów śmierci komórkowej spoczynkowych limfocytów T i komórek linii Jurkat traktowanych etopozydem

Etopozyd jest silnym induktorem apoptozy dzielących się komórek nowotworowych. Dlatego na początku sprawdzono wpływ etopozydu na przeżywalność spoczynkowych limfocytów T. Komórki traktowano etopozydem w stężeniach 1-20 μ M. Po upływie 24h oznaczono indeks apoptotyczny. Indeks apoptotyczny zdefiniowany został jako suma komórek wczesnoapoptotycznych (wyznakowanych aneksyną V) i późnoapoptotycznych/martwych (wyznakowanych aneksyną V i 7-AAD). Rysunek 5.2A. przedstawia reprezentatywne wykresy gęstościowe i sposób bramkowania populacji wczesno- i późnoapoptotycznej spoczynkowych limfocytów T i komórek linii Jurkat. Dane otrzymane z oceny indeksu apoptotycznego limfocytów T od pięciu dawców i trzech powtórzeń dla komórek linii Jurkat przedstawiają wykresy słupkowe (Rys.5.2B.).

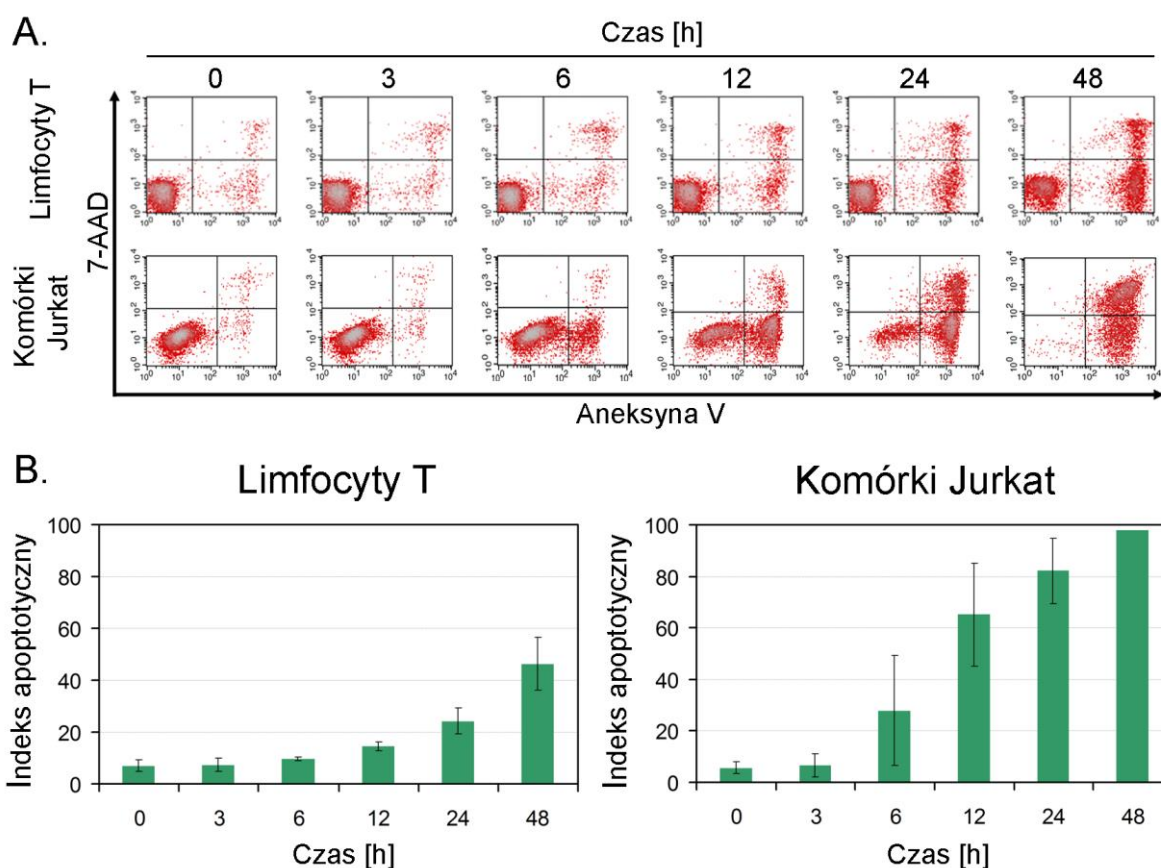
Indeks apoptotyczny wzrastał wraz ze stężeniem etopozydu w przypadku obu typów komórek. Dla spoczynkowych limfocytów T najwyższą wartość (35%) osiągał przy stężeniu 20 μ M. Dzielące się komórki linii Jurkat były bardziej wrażliwe na etopozyd. Indeks apoptotyczny, począwszy od stężenia 5 μ M, był znacznie wyższy niż w spoczynkowych limfocytach i dla najwyższego badanego stężenia (20 μ M) wyniósł 78%. Etopozyd w stężeniu 10 μ M, powodował śmierć ok. 25% spoczynkowych limfocytów T oraz dużego odsetka (75%) komórek linii Jurkat. Zwiększenie dawki etopozydu w przypadku komórek linii Jurkat nie zwiększało w znacznym stopniu i tak wysokiego indeksu apoptotycznego. Komórki kontrolne (bez etopozydu) były traktowane DMSO w stężeniu 0,002%, co odpowiadało zawartości DMSO w próbach z dodatkiem etopozydu (10 μ M), i były analizowane po 24 godzinach. Do dalszych badań zostało wybrane stężenie 10 μ M, które odpowiada poziomowi etopozydu w surowicy osiąganemu podczas terapii przeciwnowotworowej [109].



Rys. 5.2. Indeks apoptotyczny spoczynkowych limfocytów T i komórek linii Jurkat traktowanych etopozydem w różnych stężeniach. Komórki analizowano 24 godziny po dodaniu etopozydu (5-20 μM). (A) Przykładowe wykresy gęstościowe przedstawiające sposób bramkowania komórek wczesno- i późnoapoptotycznych. (B) Indeks apoptotyczny otrzymany z pięciu niezależnych doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach T wyizolowanych od pięciu dawców oraz trzech powtórzeń dla komórek linii Jurkat. Słupki przedstawiają średnią; \pm SD.

Następnie oznaczono indeks apoptotyczny spoczynkowych limfocytów T i komórek linii Jurkat traktowanych 10 μM etopozydem (Rys. 5.3.). Pomiaru dokonano po 3, 6, 12, 24 i 48 godzinach po dodaniu związku. Indeks apoptotyczny wzrastał wraz z czasem traktowania komórek. Pomiar komórek znakowanych aneksyną V i 7-AAD w różnych czasach traktowania pozwala na zaobserwowanie zmian w liczbie komórek wczesno- i późnoapoptotycznych. Analizując cytogramy można zaobserwować wzrost odsetka komórek wczesnoapoptotycznych (wybarwionych tylko aneksyną V), po którym następuje akumulacja populacji komórek późnoapoptotycznych i martwych. Zjawisko to jest zwłaszcza dobrze widoczne w komórkach, w których poziom śmierci jest bardzo wysoki. Po 48h traktowania etopozydem większość komórek linii Jurkat była podwójnie pozytywna, podczas gdy w czasie 24h główną populację stanowiły komórki tylko aneksyno-pozytywne (Rys. 5.3A.). Wyniki uzyskane z doświadczeń przeprowadzonych na spoczynkowych limfocytach T wyizolowanych od 7 dawców i trzech powtórzeń na komórkach linii Jurkat przedstawia

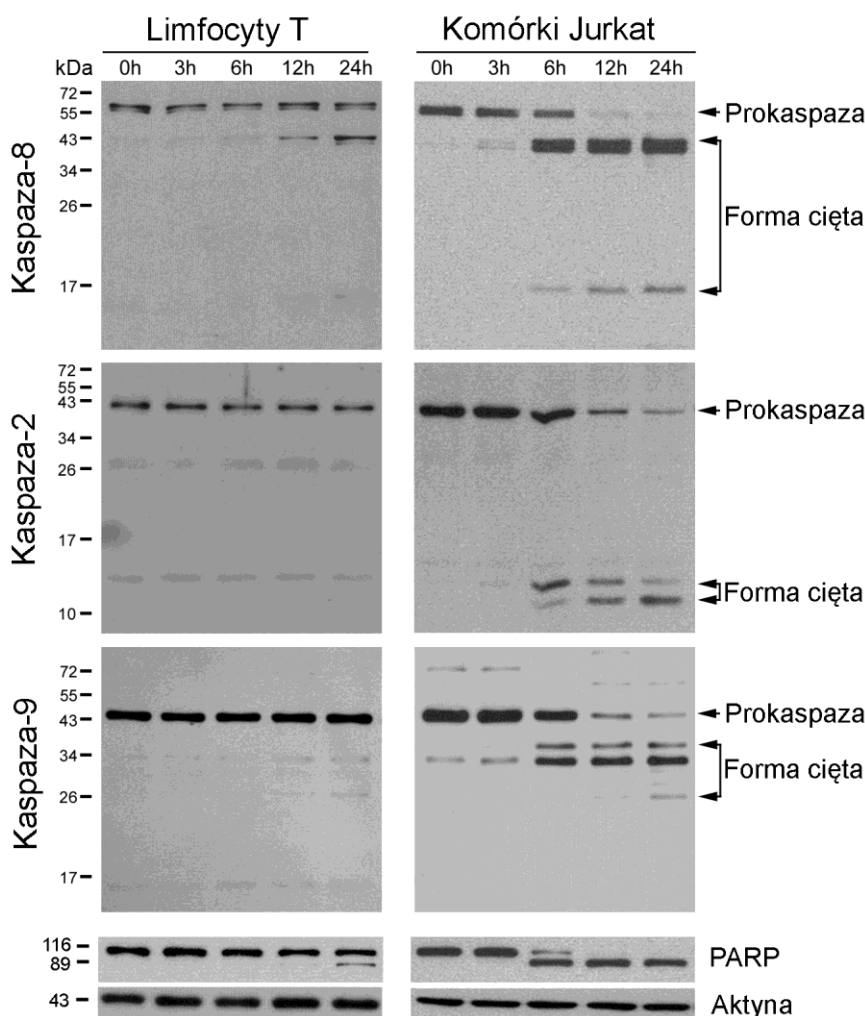
Rys. 5. 3B. Indeks apoptotyczny (Rys. 5.3B.) spoczynkowych limfocytów T zaczął wzrastać w stosunku do kontrolnych komórek (7%) (DMSO 24h) od 12 godziny traktowania (14%) i rósł wraz z upływem czasu osiągając do 24% i 46% odpowiednio po 24h i 48h. W przypadku komórek linii Jurkat znaczny wzrost indeksu apoptotycznego nastąpił już po 6h inkubacji z etopozydem (27%) i wraz z upływem czasu osiągnął 64% po 12 i 82% po 24 godzinach. Po 48 godzinach praktycznie wszystkie komórki linii Jurkat były martwe (98%).



Rys. 5.3. Kinetyka indeksu apoptotycznego spoczynkowych limfocytów T i komórek linii Jurkat traktowanych $10\mu\text{M}$ etopozydem. Komórki znakowano aneksyną V i 7-AAD po: 0, 3, 6, 12, 24 i 48 godzinach. (A) Reprezentatywne wykresy gęstościowe przedstawiające sposób bramkowania populacji komórek apoptotycznych. (B) Indeks apoptotyczny otrzymany z pięciu niezależnych doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach T wyizolowanych od siedmiu dawców oraz trzech powtórzeń dla komórek linii Jurkat. Słupki przedstawiają średnią; (\pm SD).

Przeprowadzone doświadczenia dowodzą, że zarówno w spoczynkowych limfocytach T jak i komórkach linii Jurkat apoptoza indukowana etopozydem jest zależna od stężenia i czasu (w przypadku $10\mu\text{M}$ etopozydu). Jednakże etopozyd jest silniejszym induktorem śmierci komórkowej w proliferujących komórkach linii Jurkat niż spoczynkowych limfocytach T.

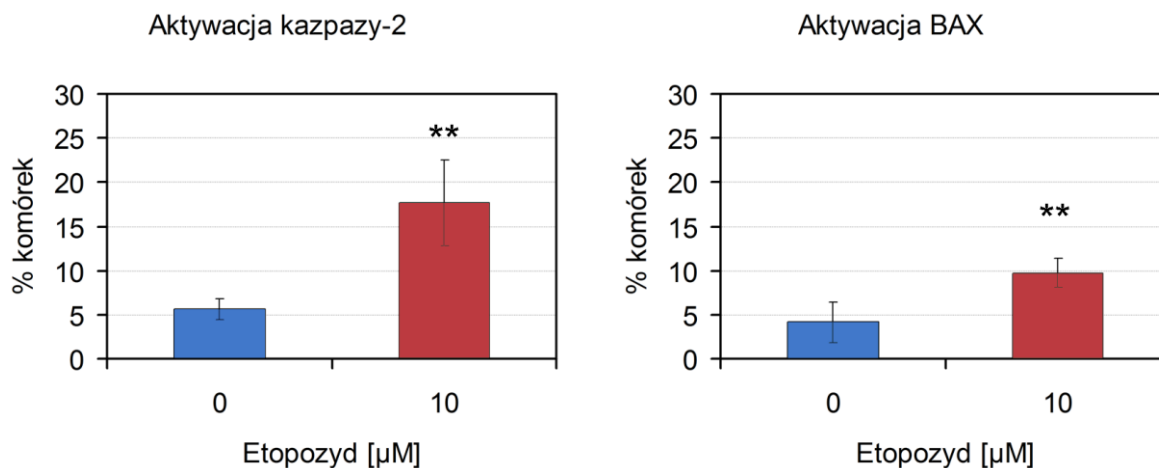
Ekspozycja fosfatydyloseryny na powierzchni komórki jest wczesnym markerem apoptozy. Innym markerem tego procesu jest aktywacja kaspaz. Poziom aktywnych kaspaz 2, 8 i 9 badano przy pomocy techniki Western blot. Oznaczano również poziom całkowitego i ciętego białka PARP (Rys. 5.4.). W spoczynkowych limfocytach T etopozyd po 12 godzinach traktowania powodował pojawianie się prążka odpowiadającego aktywnej formie kaspazy-8 i kaspazy-9 oraz proteolizie białka PARP. Nie zaobserwowano prążków odpowiadających aktywnej kaspazie-2 (prawdopodobnie poziom poniżej detekcji), natomiast spadał poziom prokaspazy. W przypadku komórek linii Jurkat już po 6h traktowania etopozydem pojawiały się prążki aktywnych kaspaz (-8, -2, -9) oraz zaobserwowano proteolizę białka PARP.



Rys.5.4. Wpływ etopozydu na aktywację kaspaz w spoczynkowych limfocytach T i komórkach linii Jurkat. Spoczynkowe limfocyty T i komórki linii Jurkat traktowano 10 μ M etopozydem. Pojawianie się prążków odpowiadających aktywnym kaspazom oraz proteolizę białka PARP analizowano w czasie 0, 3, 6, 12, 24 godzin po podaniu etopozydu. Przedstawiono reprezentatywne bloty otrzymane z doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach T wyizolowanych od 3 dawców oraz trzech powtórzeń na komórkach linii Jurkat. Strzałki wskazują prążki odpowiadające prokaspazom oraz ich ciętym formom, kaspazom

Intensywność prążków aktywnych form kaspaz była większa w komórkach linii Jurkat niż w limfocytach T, co jest zgodne z wysokim indeksem apoptotycznym w tych komórkach.

Stosując metodę Western blot nie wykryto prążków odpowiadających aktywnej kaspazie-2 w spoczynkowych limfocytach T traktowanych etopozydem. Dlatego poziom jej aktywacji zmierzono także metodą cytometryczną używając CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-2 Staining Kit (Rys. 5.5A.). Komórki traktowano etopozydem i po 24 godzinach dokonano pomiaru. Etopozyd powodował aktywację kaspazy-2 w ok. 15% komórek. Dla porównania w populacji komórek kontrolnych obserwowano 6% kaspazo-pozytywnych. Specyficzność barwienia sprawdzono stosując inhibitor kaspaz – Z-VAD, który obniżał poziom aktywnej kaspazy-2 do obserwowanego w komórkach kontrolnych (DMSO 24 godziny). Za pomocą cytometru przepływowego zbadano również aktywność białka BAX w komórkach – kolejnego markera związanego z apoptozą (Rys. 5.5B.). Po 24 godzinach traktowania etopozydem spoczynkowych limfocytów T stwierdzono aktywację białka BAX w 10% komórek w porównaniu do 3% kontroli (DMSO).



Rys. 5.5. Aktywacja kaspazy-2 i białka BAX w spoczynkowych limfocytach T traktowanych etopozydem. Komórki traktowano 10μM etopozydem i po upływie 24 godzin cytometrycznie mierzono w nich aktywną kaspazę-2 i aktywne białko BAX. Słupki przedstawiają średnią z doświadczeń na limfocytach wyizolowanych od 3 dawców (\pm SD;** - $p < 0,01$).

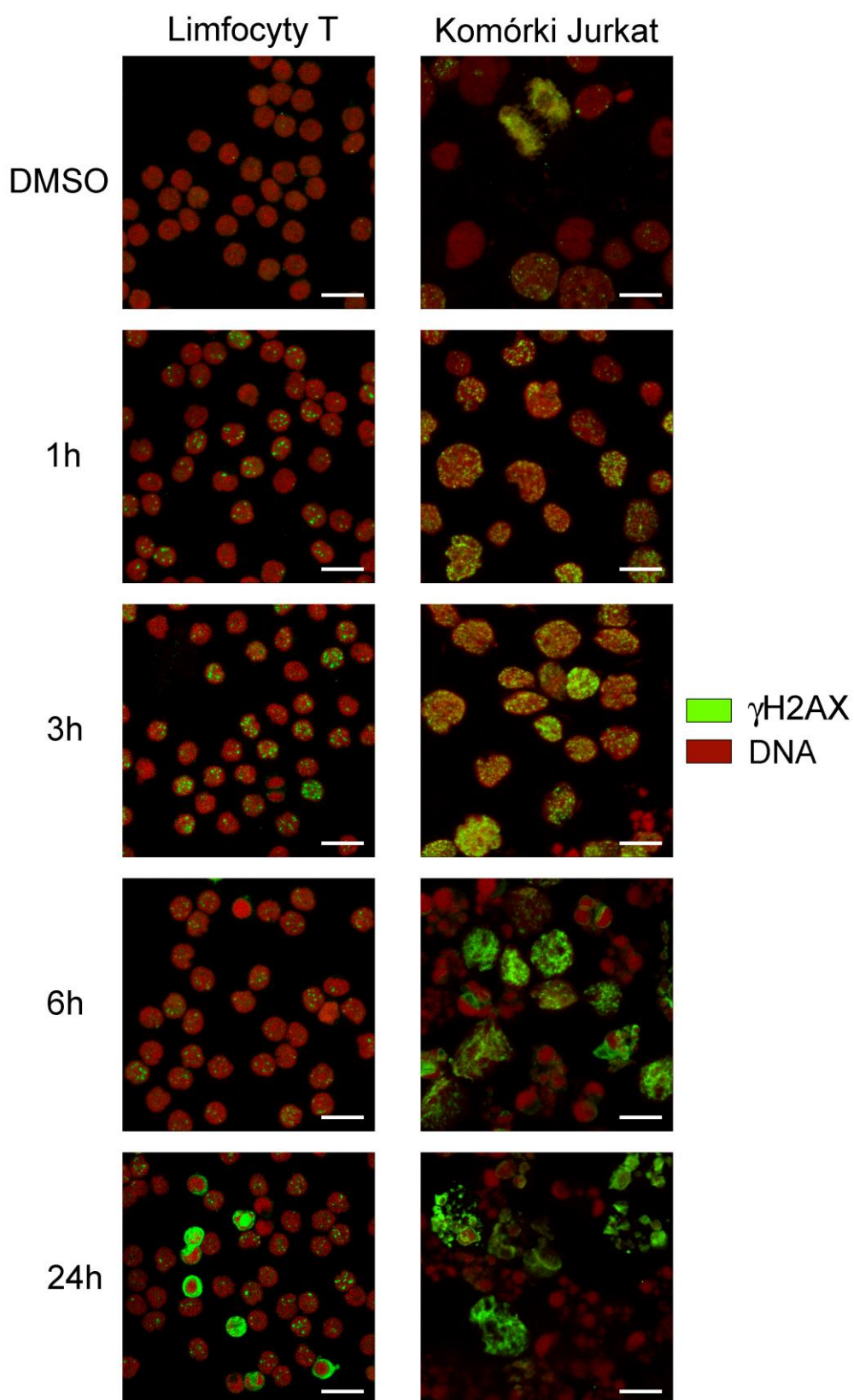
Badania poziomu śmierci i aktywacji kaspaz pokazują, że etopozyd indukuje kaspazo-zależną apoptozę komórek proliferujących linii Jurkat oraz spoczynkowych limfocytów T. Jednakże efekt działania etopozydu jest wyraźniejszy w przypadku komórek proliferujących.

5.1.3. Detekcja markerów podwójnych uszkodzeń DNA (γ H2AX i 53BP1) w komórkach traktowanych etopozydem

W miejscu uszkodzenia DNA następuje tworzenie kompleksu złożonego z kilku tysięcy białek zaangażowanych w wykrywanie, przekazywanie sygnału oraz naprawę DNA. W celu sprawdzenia czy etopozyd indukuje uszkodzenia DNA w spoczynkowych limfocytach T, metodą immunocytochemiczną zbadano obecność wybranych białek, uznawanych za markery podwójnych pęknięć nici DNA, jakimi są γ H2AX i 53BP1.

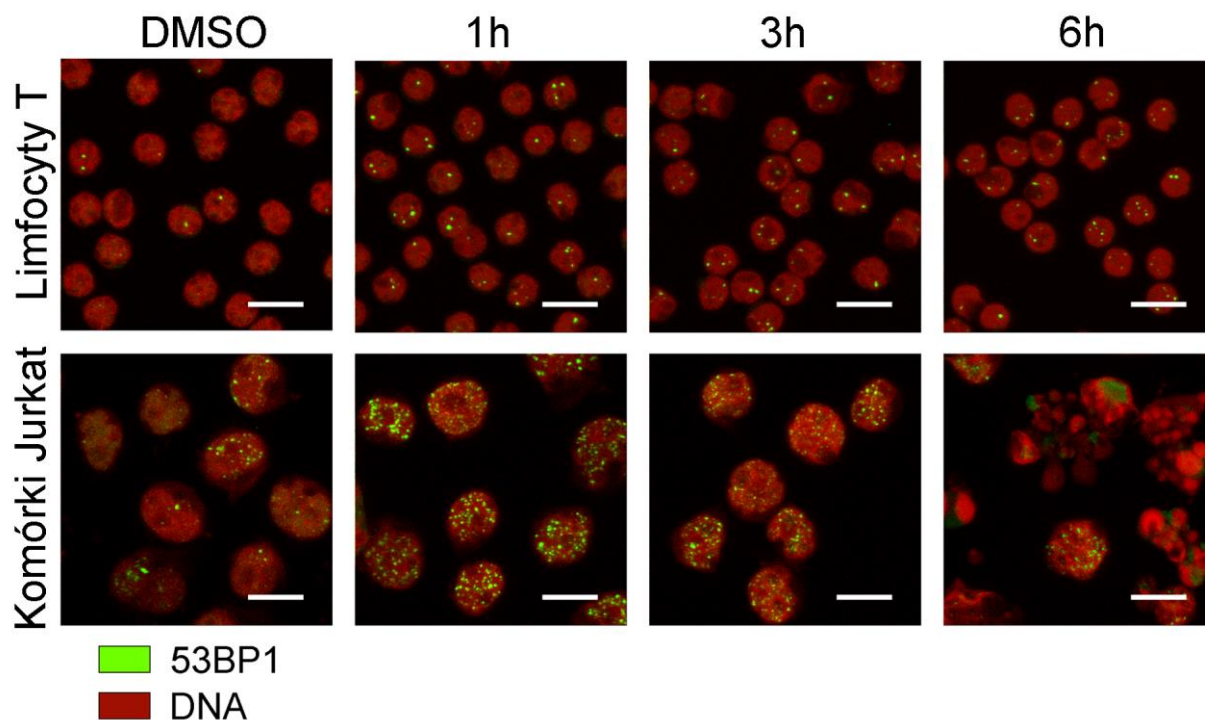
Spoczynkowe limfocyty T i dla porównania komórki linii Jurkat traktowano 10 μ M etopozydem i po upływie 1, 3, 6, 12, 24 godzin inkubowano z przeciwciałem rozpoznającym ufosforylowaną (Ser 139) formę H2AX. Po dodaniu etopozydu następowało formowanie skupisk γ H2AX, a ich liczba wahała się od 1-10 na komórkę (Rys. 5.6.). W komórkach kontrolnych, traktowanych DMSO (0,002%) przez 1 godzinę, nie obserwowano skupisk γ H2AX. Natomiast po 24 godzinach traktowania etopozydem zaobserwowano komórki o intensywnej fluorescencji. Jest to zjawisko charakterystyczne dla komórek we wczesnej fazie apoptozy [110]. Nazwane zostało pierścieniem apoptotycznym (apoptotic ring), które zanika w późniejszych etapach śmierci komórki [111].

W komórkach linii Jurkat etopozyd również prowadził do tworzenia skupisk γ H2AX. Jednak ich liczba była duża i trudna do dokładnego określenia. Według danych literaturowych liczba skupisk w komórkach dzielących się wynosi co najmniej 50 [112]. Skupiska γ H2AX powstają w miejscu pęknięć nici DNA nie tylko indukowanych związkiem cytotoksycznym, ale również podczas fizjologicznych procesów, takich jak replikacja czy rekombinacja DNA, co widać na przykładzie kontrolnych, nietraktowanych etopozydem komórek linii Jurkat. Po 6 godzinach traktowania etopozydem widać już pierwsze symptomy apoptozy (intensywne świecące komórki) oraz rozpad komórek na ciała apoptotyczne. Apoptozę większości komórek zaobserwowano po 24 godzinach.



Rys. 5.6. Detekcja skupisk γ H2AX w komórkach traktowanych etopozydem. Spoczynkowe limfocyty T i komórki linii Jurkat traktowano 10 μ M etopozydem i po upływie 1, 3, 6, 24 godzin wyznakowano γ H2AX (zielony) i DNA (czerwony). Przystawiono reprezentatywne zdjęcia zrobione przy pomocy mikroskopu konfokalnego. Skala wynosi 10 μ m.

Innym markerem podwójnych uszkodzeń DNA jest tworzenie skupisk 53BP1. W miejscu uszkodzenia następuje akumulacja białka, które odgrywa rolę w naprawie DNA. Detekcji skupisk 53BP1 dokonano po 1, 3 i 6 godzinach od dodania 10 μ M etopozydu. Podobnie jak w przypadku γ H2AX, liczba skupisk 53BP1 w spoczynkowych limfocytach T i komórkach linii Jurkat wzrastała po podaniu związku cytotoksycznego (Rys. 5.7.). Liczba skupisk w limfocytach T wahała się w granicach 1-5 na komórkę, a w komórkach linii Jurkat powyżej 30.



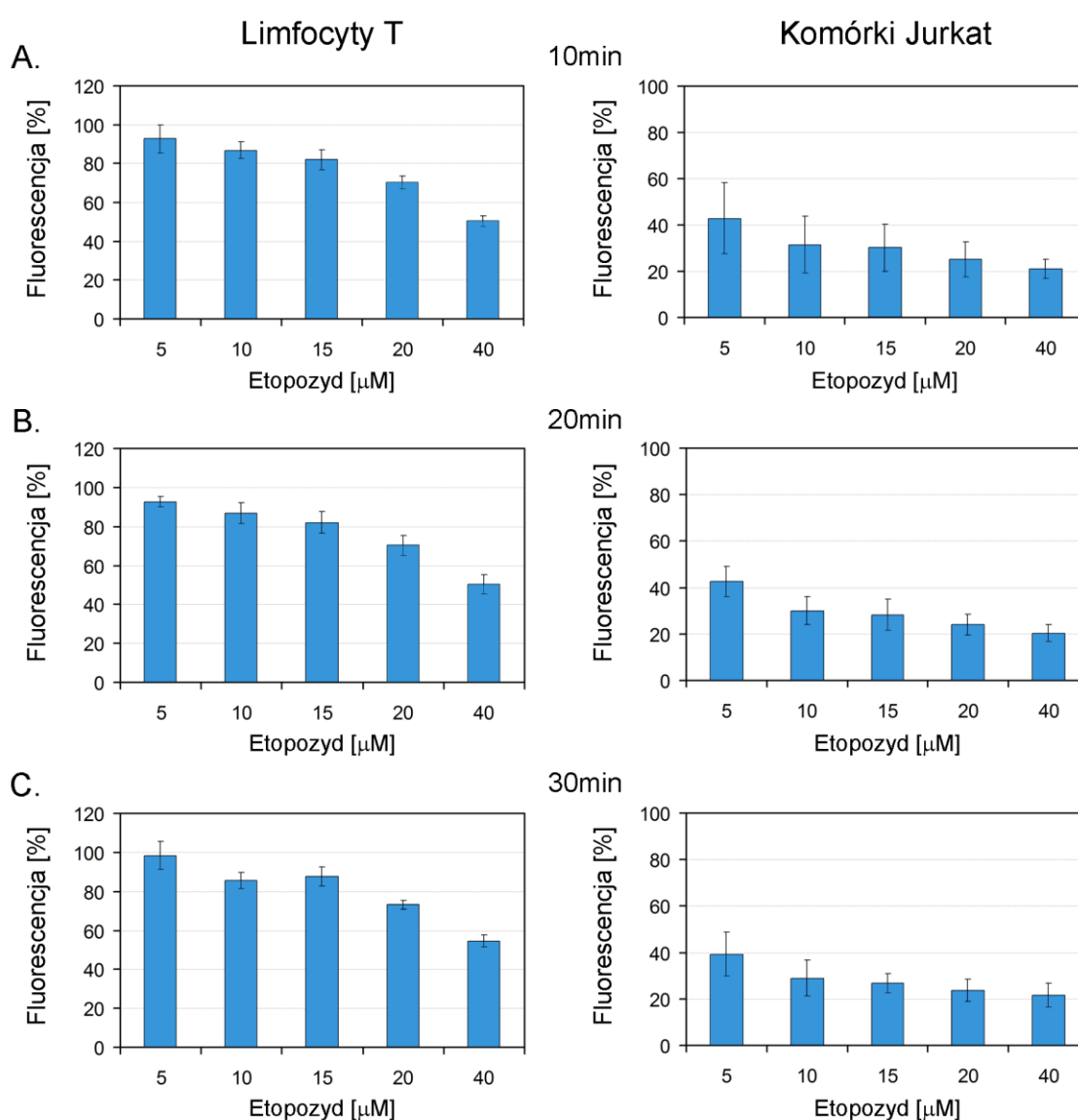
Rys. 5.7. Detekcja skupisk 53BP1 w komórkach traktowanych etopozydem. Spoczynkowe limfocyty T i komórki linii Jurkat traktowano 10 μ M etopozydem i po upływie 1, 3, 6 godzin, wyznakowano 53BP1 (zielony) i DNA (czerwony). Przystawiono reprezentatywne zdjęcia z mikroskopu konfokalnego. Skala wynosi 10 μ m.

Etopozyd indukował uszkodzenia DNA w spoczynkowych limfocytach T i komórkach linii Jurkat, o czym świadczy tworzenie skupisk γ H2AX i 53BP1.

5.1.4. Poziom uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem mierzony metodą FADU

Dzięki metodzie immunocytochemicznej można wykrywać białka rekrutowane w miejscu uszkodzenia DNA. Zastosowanie techniki FADU pozwala na określenie poziomu uszkodzonego DNA. Jest to czuła metoda wykrywająca pojedyncze i podwójne pęknięcia nici DNA, będące wynikiem działania czynników zewnętrznych, replikacji, a także fragmentacji DNA podczas apoptozy. Dlatego pomiar przeprowadzono w krótkich czasach (10, 20, 30 minut) od podania etopozydu, gdy nie obserwowano jeszcze symptomów apoptozy.

Spoczynkowe limfocyty T i komórki linii Jurkat traktowano etopozydem w stężeniu 5-40 μ M. Rysunek 5.8. przedstawia wyniki otrzymane na limfocytach T wyizolowanych od 6 dawców i trzech powtórzeniach wykonanych na komórkach linii Jurkat. Spadek poziomu fluorescencji świadczy o wzroście poziomu uszkodzeń. W obu typach komórek ilość uszkodzeń DNA wzrastała wraz ze wzrostem stężenia etopozydu i nie ulegała zmianie w badanym czasie. W spoczynkowych limfocytach T 10 μ M etopozyd powodował spadek fluorescencji o 15% w stosunku do komórek kontrolnych (100%) traktowanych DMSO, natomiast w przypadku 40 μ M etopozydu, spadek wynosił aż 50%. W komórkach linii Jurkat ilość uszkodzeń była większa i poziom fluorescencji wynosił ok. 70% dla stężenia 10 μ M oraz 80% dla 40 μ M etopozydu.



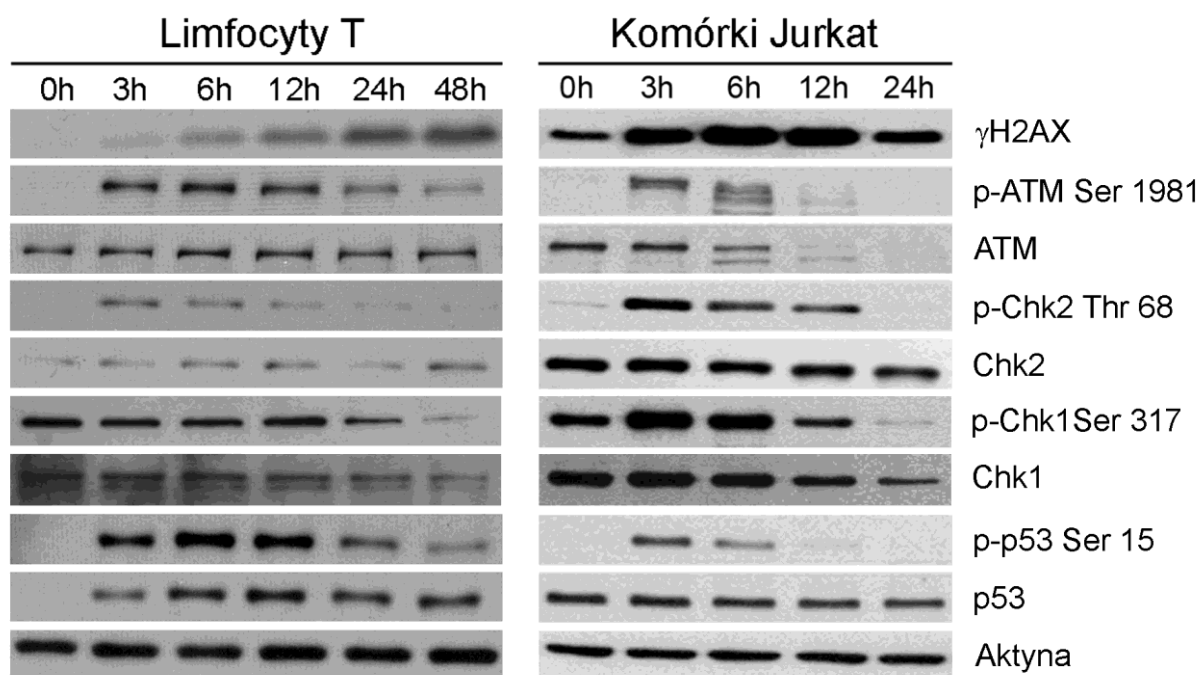
Rys. 5.8. Poziom uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem mierzony techniką FADU. Spoczynkowe limfocyty T i komórki linii Jurkat traktowano etopozydem w stężeniach 5-40 μ M. Po upływie (A) 10min, (B) 20min, (C) 30min mierzono poziom uszkodzeń DNA.

Słupki przedstawiają średnią względną wartość fluorescencji uzyskaną z doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach T wyizolowanych od 6 dawców oraz trzech powtórzeń na komórkach linii Jurkat. Fluorescencja komórek kontrolnych wynosi 100% (\pm SD).

Przedstawione wyniki dowodzą, że etopozyd indukuje uszkodzenia DNA w spoczynkowych limfocytach T, a ich poziom był mniejszy niż w komórkach linii Jurkat.

5.1.5. Szlak DDR w spoczynkowych limfocytach T i komórkach linii Jurkat traktowanych etopozydem

Odpowiedź na uszkodzenia DNA prowadzi do aktywacji wielu białek. Za pomocą metody Western blot badano poziom białek biorących udział w szlaku DDR, takich jak: ATM, Chk2, p53, p21 i γ H2AX (Rys. 5.9.). Komórki traktowano 10 μ M etopozydem, a następnie dokonywano pomiaru po 3, 6, 12, 24 i 48 godzinach. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane. Doświadczenie było przeprowadzone na limfocytach wyizolowanych od trzech dawców i powtórzone trzy razy na komórkach linii Jurkat. Ze względu na wysoki poziom śmierci, komórki linii Jurkat badano do 24 godzin. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 7. W limfocytach T obserwowano przejściowy wzrost poziomu ufosforylowanej kinazy ATM (Ser 1981) i kinazy Chk2 (Thr 68), pojawiający się po 3 godzinach od podania etopozydu. Zaobserwowano także indukcję białka p53 i jego fosforylację (Ser 15). Ponieważ badano limfocyty T spoczynkowe, nie stwierdzono indukcji inhibitora cyklu komórkowego, białka p21 (nie pokazano) oraz fosforylowanego przez ATR (aktywowane przez zatrzymanie replikacji) białka Chk1. Wraz z upływem czasu wzrastał poziom γ H2AX i był najwyższy po 24h i 48h, co świadczy o jego silnej ekspresji podczas apoptozy. W komórkach linii Jurkat etopozyd prowadził do fosforylacji kinazy ATM, jednakże już po 6 godzinach nastąpiła jej proteoliza związana z masową apoptozą komórek. Zaobserwowano również fosforylację kinazy Chk2, Chk1 i p53. Wzrost poziomu γ H2AX w krótkich czasach potwierdza silne uszkodzenia DNA obserwowane przy użyciu innych metod.



Rys. 5.9. Wpływ etopozydu na poziom kluczowych białek szlaku DDR. Komórki traktowano 10 μM etopozydem i w czasie 0, 3, 6, 12, 24 i 48 godzin, badano poziom ufosforylowanych (ATM, Chk2, Chk1, p53 i H2AX) i całkowitych (ATM, Chk2, Chk1 i p53) białek. Przedstawiono reprezentatywne wyniki otrzymane z doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach T wyizolowanych o 3 dawców i 3 powtórzeń na komórkach linii Jurkat.

Fosforylacja kluczowych komponentów szlaku DDR świadczy o jego aktywacji pod wpływem związku uszkodzającego DNA (etopozydu), zarówno w proliferujących komórkach linii Jurkat jak i spoczynkowych limfocytach T.

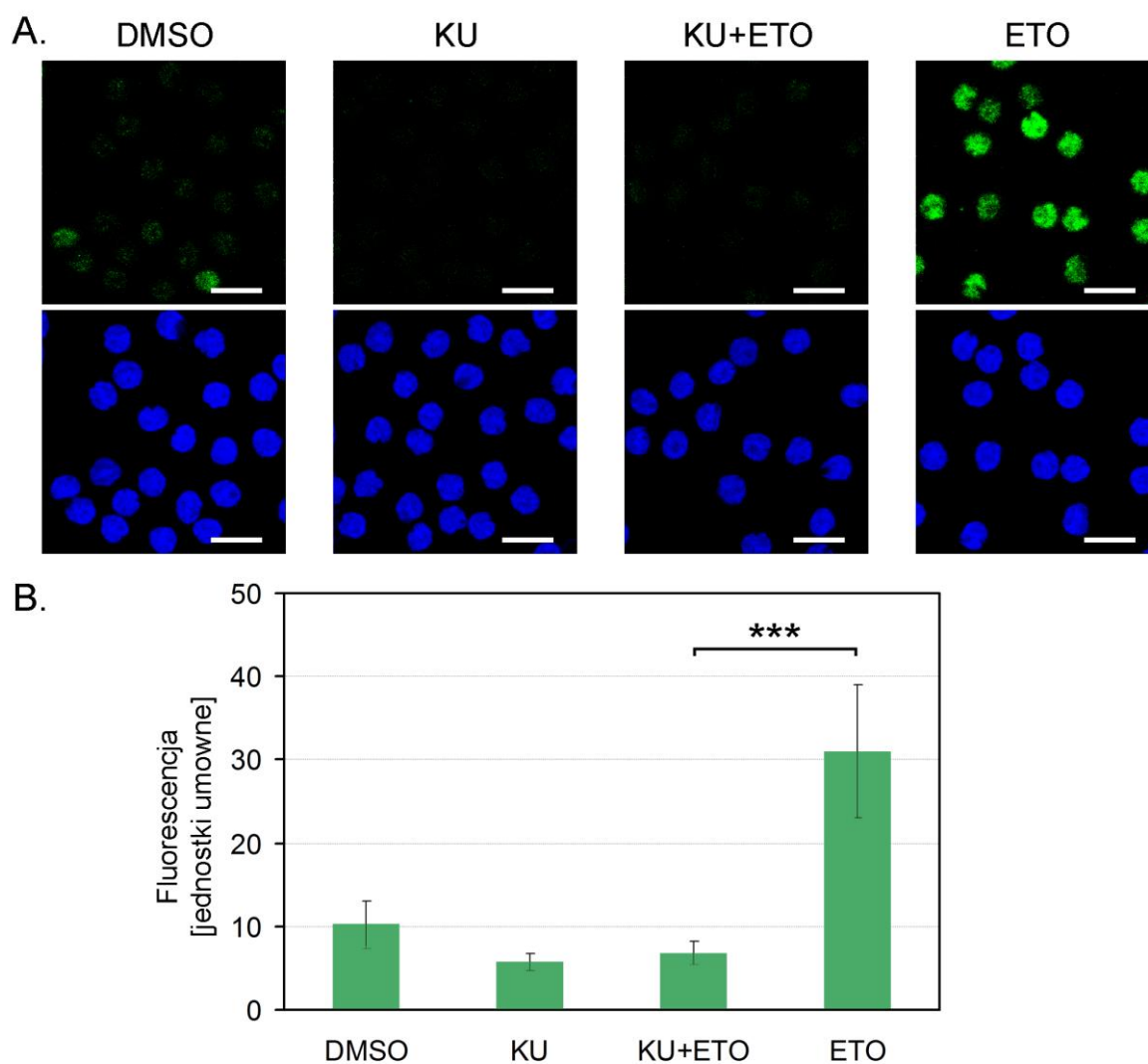
5.2. Wpływ inhibitora ATM na aktywację szlaku DDR oraz los komórki

Wyniki przedstawione w poprzednim rozdziale wykazały, że etopozyd prowadzi do indukcji uszkodzeń DNA i aktywacji szlaku DDR prowadzącego do apoptozy spoczynkowych limfocytów T. W następnych doświadczeniach zastosowano specyficzny inhibitor kinazy ATM – KU-55933, który znany jest jako związek uwrażliwiający komórki nowotworowe na związki cytotoksyczne.

5.2.1. Wpływ KU-55399 na fosforylację kinazy ATM indukowanej etopozydem.

Spoczynkowe limfocyty T hodowano w obecności inhibitora kinazy ATM (10 μM) przez 2 godziny, a następnie traktowano 10 μM etopozydem. Po upływie 6 godzin barwieniem immunocytochemicznym wykrywano ufosforylowaną formę (aktywną) kinazy ATM (Ser 1981). Równolegle analizowano limfocyty T traktowane tylko KU-55933, etopozydem lub

DMSO (0,1%). Doświadczenie przeprowadzono na limfocytach T wyizolowanych od 3 dawców. Rysunek 5.10A. przedstawia reprezentatywne zdjęcia uzyskane za pomocą mikroskopu konfokalnego. Intensywnie zabarwione są komórki traktowane tylko etopozydem. Dodatkowo z pomocą programu LAS AF (Leica) dokonano pomiaru poziomu fluorescencji komórek (Rys. 5.10B.). Analizę przeprowadzono w każdym przypadku na co najmniej 50 komórkach. Poziom fluorescencji jest trzykrotnie wyższy w komórkach traktowanych tylko etopozydem niż w pozostałych komórkach, czyli traktowanych DMSO, samym inhibitorem, czy inhibitorem z etopozydem (***) - $p < 0,001$).

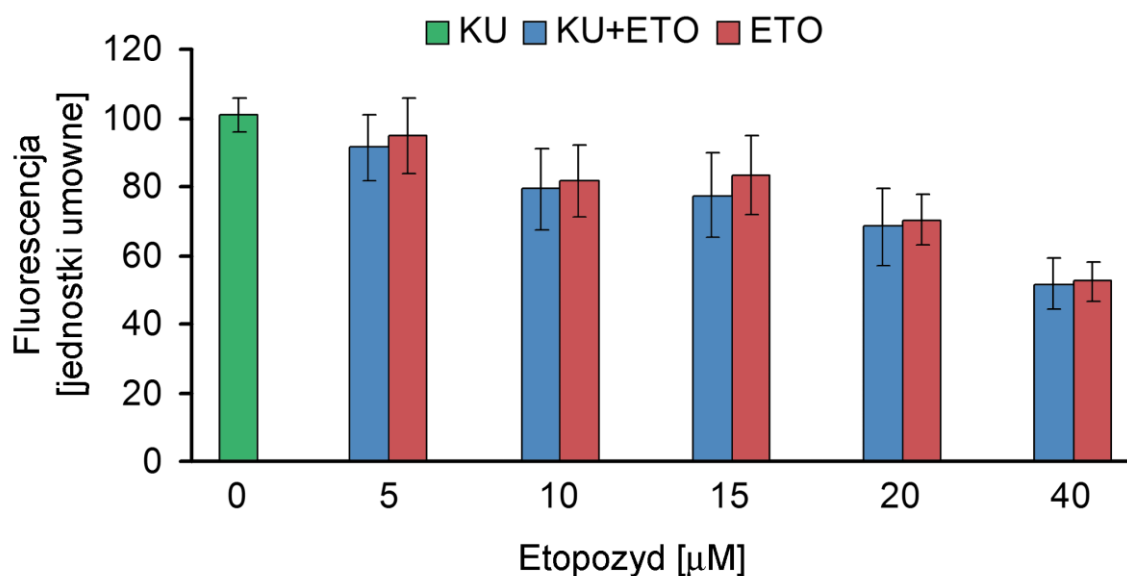


Rys. 5.10. Poziom fosforylacji kinazy ATM w limfocytach T. Limfocyty T były traktowane przez 6 godzin: DMSO, KU-55933 (KU), KU-55933 z etopozydem (KU+ETO) i tylko etopozydem (ETO). W wariacie KU+ETO, inhibitor ATM był dodany do hodowli 2 godziny przed etopozydem. (A) Reprezentatywne zdjęcia z mikroskopu konfokalnego uzyskane w wyniku znakowania ufosforylowanej formy kinazy ATM (zielony) i DNA (niebieski). (B) Intensywność fluorescencji uzyskana po przeanalizowaniu co najmniej 50 komórek z każdego typu traktowania (\pm SD; *** - $p < 0,001$). Doświadczenie powtórzono na limfocytach T wyizolowanych od 3 dawców. Skala wynosi $10\mu\text{m}$.

Zastosowanie inhibitora ATM hamowało w sposób istotny statystycznie, indukowaną przez etopozyd fosforylację kinazy ATM.

5.2.2. Wpływ KU-55933 na poziom uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem

W celu sprawdzenia jak KU wpływa na poziom uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem przeprowadzono analizę FADU. Badano 4 warianty traktowania komórek: DMSO, tylko KU-55933, KU-55933 z etopozydem oraz sam etopozyd. Pomiaru poziomu uszkodzeń DNA dokonano 30 minut po dodaniu etopozydu w stężeniach 5-40 μ M. KU było dodawane 2 godziny przed podaniem etopozydu. Rysunek 5.11. przedstawia wyniki otrzymane na limfocytach T wyizolowanych od sześciu dawców. Jako 100% przyjęto poziom fluorescencji (uszkodzeń DNA) komórek traktowanych DMSO. Poziom uszkodzeń DNA rósł wraz ze wzrostem stężenia etopozydu, na co wskazuje malejąca fluorescencja. Jest on praktycznie taki sam w przypadku komórek traktowanych tylko etopozydem oraz etopozydem z inhibitorem ATM.



Rys. 5.11. Poziom uszkodzeń DNA w spoczynkowych limfocytach T traktowanych inhibitorem kinazy ATM i etopozydem. Komórki analizowano po 30 minutach traktowania DMSO, KU-55933 (KU), KU-55933 z etopozydem (KU+ETO) i tylko etopozydem (ETO). Poziom fluorescencji komórek kontrolnych traktowanych DMSO wynosi 100%. Słupki przedstawiają średnią z 6 eksperymentów przeprowadzonych na limfocytach T od 6 dawców (\pm SD).

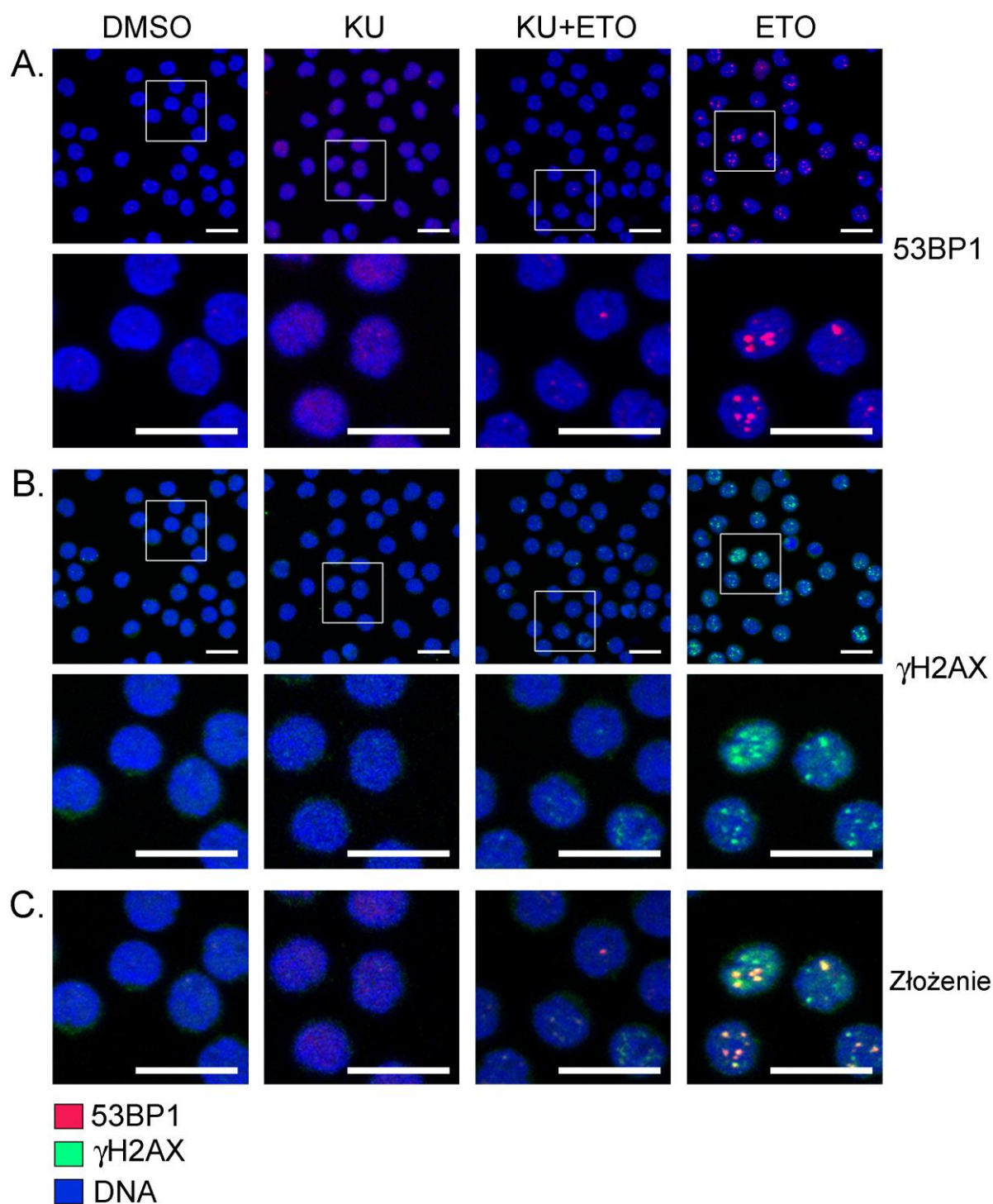
Na podstawie uzyskanych danych można wnioskować, że inhibitor kinazy ATM w warunkach pomiaru nie ma wpływu na poziom uszkodzeń DNA w spoczynkowych limfocytach T traktowanych etopozydem.

5.2.3. Wpływ KU-55933 na tworzenie skupisk γ H2AX i 53BP1 w spoczynkowych limfocytach T traktowanych etopozydem

Podanie KU-55933 nie wpływa na poziom uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem. Hamuje natomiast fosforylację (aktywację) kinazy ATM, odpowiedzialnej za przekazywanie sygnału od uszkodzonego DNA. Jednym z jej substratów jest H2AX, którego fosforylacja jest ważnym etapem w rekrutacji wielu białek zaangażowanych w przekazywanie sygnału i naprawę DNA. Rekrutacja 53BP1 do miejsca uszkodzenia DNA następuje w wyniku modyfikacji białek histonowych, będących następstwem fosforylacji H2AX. Barwienia immunocytochemiczne pozwalają uwidocznić współwystępowanie tych dwóch białek, co jest markerem podwójnych pęknięć nici DNA i uważane jest jako etap początkowy przekazywania sygnału do naprawy DNA.

Rysunek 5.12. obrazuje barwienie immunocytochemiczne skupisk γ H2AX i 53BP1 w limfocytach T. Zdjęcia uzyskano przy pomocy mikroskopu konfokalnego. Komórki traktowano 6 godzin odpowiednio: DMSO (0,1%), KU-55933 (10 μ M), KU-55933 z etopozydem (10 μ M) i tylko etopozyd (10 μ M). Inhibitor ATM był podany 2 godziny przed dodaniem etopozydu.

Tworzenie skupisk 53BP1 obserwowano tylko w komórkach traktowanych samym etopozydem. Natomiast traktowanie komórek inhibitorem ATM redukowało liczbę skupisk indukowanych etopozydem. Skupisk 53BP1 nie indukowało podanie samego inhibitora lub DMSO (Rys. 5.12A.). Podobny obraz uzyskano badając tworzenie skupisk γ H2AX. Zaobserwowano ich obecność tylko w komórkach traktowanych samym etopozydem (Rys. 5.12B.). Panel C rysunku 5.12. przedstawia nałożenie obrazów uzyskanych z barwienia 53BP1 i γ H2AX, a żółty kolor świadczy o współwystępowaniu tych dwóch markerów uszkodzeń DNA.

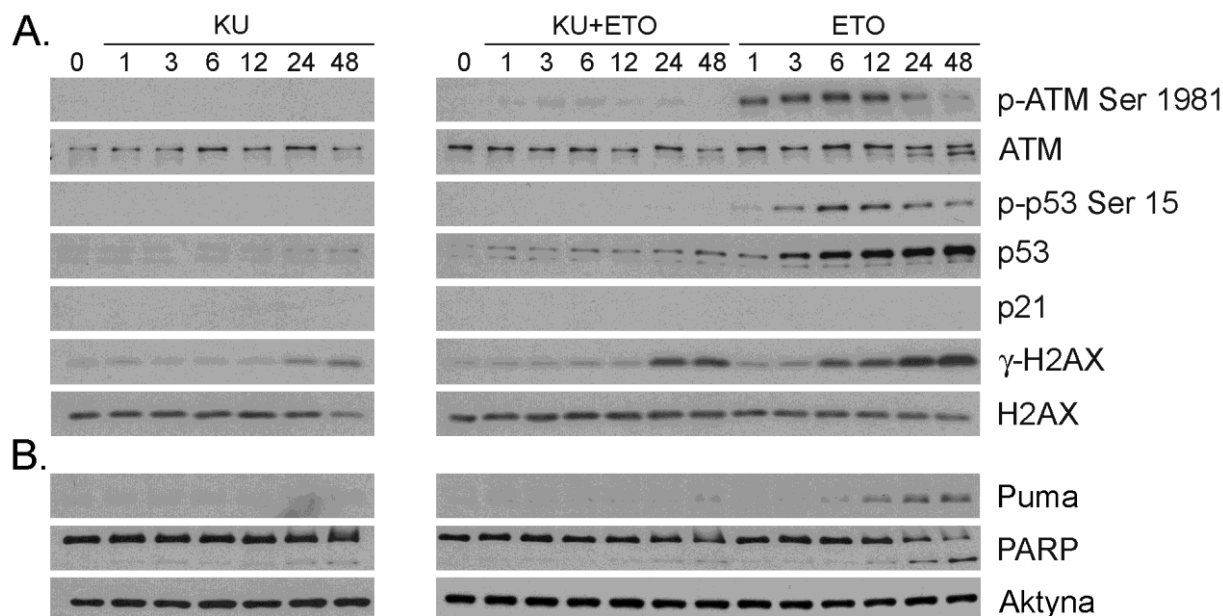


Rys. 5.12. KU-55933 blokuje formowanie skupisk γ H2AX i 53BP1. Spoczynkowe limfocyty T traktowano DMSO, KU-55933 (KU), KU-55933 z etopozydem (KU+ETO) i tylko etopozydem (ETO) przez 6 godzin, a następnie barwiono 53BP1 (czerwony), γ H2AX (zielony) i DNA (niebieski). Dolne zdjęcia panelu (A) i (B) przedstawiają powiększenie pola znaczonego kwadratem. Skala wynosi 10 μ m.

Podsumowując, inhibitor ATM, KU-55933, hamował tworzenie skupisk γ H2AX i 53BP1 w miejscu uszkodzeń DNA w limfocytach T traktowanych etopozydem.

5.2.4. Aktywacja szlaku DDR w limfocytach T traktowanych etopozydem i KU-55933

Zastosowanie inhibitora ATM, powodowało skuteczne obniżenie aktywnej formy kinazy w spoczynkowych limfocytach T traktowanych etopozydem. Zadano, więc pytanie, czy równie skutecznie hamowane są zdarzenia poniżej kinazy ATM. Metodą Western blot zbadano poziom białek szlaku DDR w komórkach traktowanych KU-55933 (10 μ M), KU-55933 (10 μ M) z etopozydem (10 μ M) i tylko etopozydem (10 μ M) w czasie 0, 1, 3, 6, 12, 24 i 48 godzin. Inhibitor ATM podawano 2 godziny przed etopozydem. Wyniki przedstawione na rysunku 5.13A dowodzą, że etopozyd indukował przejściową fosforylację seryny 1981 kinazy ATM. Proces ten był hamowany podaniem KU55933, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi metodą barwienia immunocytochemicznego. Inhibitor ATM redukował powodowaną etopozydem indukcję białka p53 oraz jego fosforylację. W żadnym przypadku nie obserwowano indukcji białka p21. Zastosowanie inhibitora ATM obniżało również fosforylację H2AX indukowaną etopozydem. Obserwowany po 24 i 48 godzinach wzrost poziomu γ H2AX w komórkach traktowanych KU-55933 oraz KU-55933 z etopozydem, świadczy o spontanicznej apoptozie. Potwierdza to również proteoliza białka PARP w komórkach traktowanych KU-55933 lub KU-55933 z etopozydem. Zahamowanie szlaku DDR wpływało również na obniżenie poziomu proapoptycznego białka PUMA (Rys. 5.13B.). Sam inhibitor kinazy ATM nie wpływał na zmianę poziom kluczowych białek szlaku DDR.



Rys. 5.13. Poziom białek szlaku DDR w komórkach traktowanych KU i ETO. Komórki traktowano KU-55933 (KU), KU-55933 z etopozydem (KU+ETO) i tylko etopozydem (ETO) i zbierano w czasie 0, 1, 3, 6, 12, 24 i 48 godzin. Metodą Western blot badano poziom (A.) ufosforylowanych (ATM, p53 i H2AX) i całkowitych (ATM, p53 i p21) białek oraz (B.) poziom białka PUMA i proteolizę białka PARP. Przedstawiono reprezentatywne wyniki otrzymane z doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach T wyizolowanych o 3 dawców. Aktyna – białko o stałym poziomie ekspresji, stanowiło kontrolę ilości nakładanego na żel białka całkowitego.

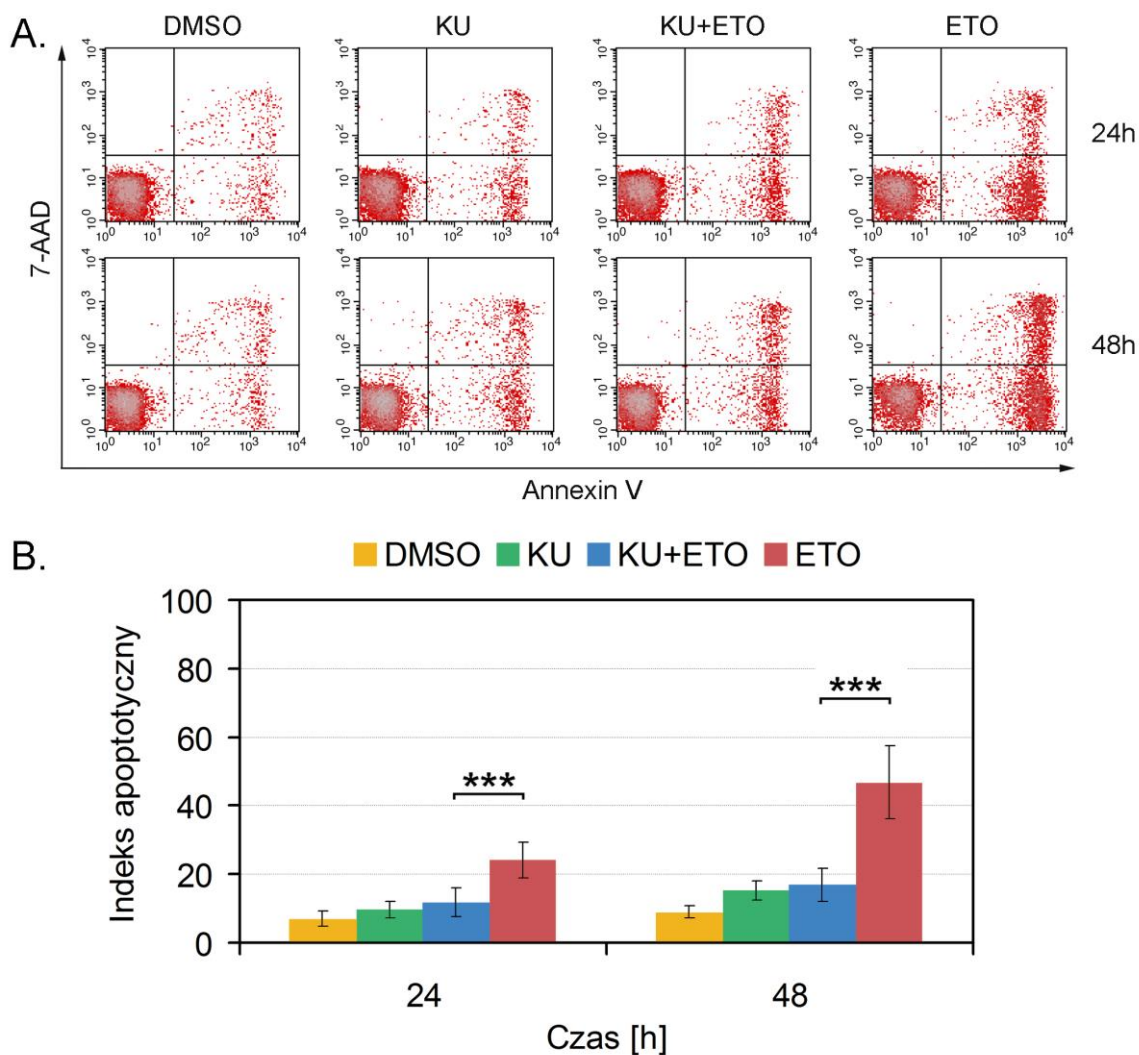
Pomimo występowania uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem, inhibitor kinazy ATM hamował aktywację szlaku DDR w limfocytach T.

5.2.5. Wpływ KU55933 na apoptozę spoczynkowych limfocytów T indukowaną etopozydem

Ponieważ w komórkach traktowanych jednocześnie KU55933 i etopozydem zaobserwowano redukcję poziomu markerów charakterystycznych dla procesu apoptozy (indukcja białka PUMA, proteoliza białka ATM i PARP), sprawdzono wartość indeksu apoptotycznego, przy pomocy cytometru przepływowego, znakując komórki aneksyną V i 7-AAD. Limfocyty T traktowane DMSO (0,1%), KU-55933 (10 μ M), KU-55933 (10 μ M) z etopozydem (10 μ M) i samym etopozydem (10 μ M), analizowano po upływie 24 i 48 godzin. Inhibitor ATM podawano 2 godziny przed etopozydem.

Rysunek 5.14A. przedstawia reprezentatywne wykresy gęstościowe, obrazujące sposób bramkowania populacji komórek umierających. Wykres słupkowy (Rys. 5.14B.)

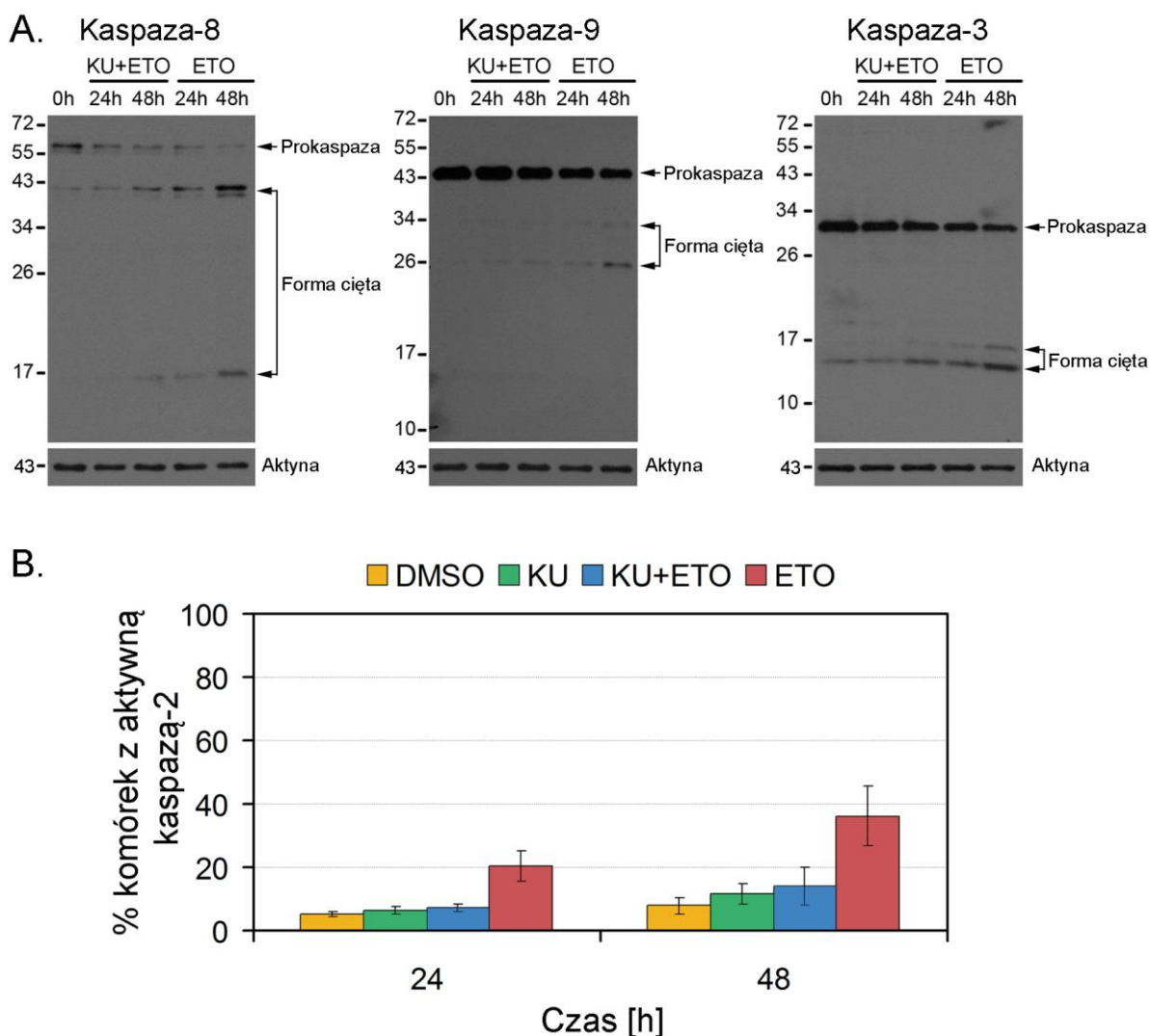
przedstawia zbiorcze wyniki otrzymane z doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach T wyizolowanych od 8 dawców. Indeks apoptotyczny limfocytów T traktowanych samym etopozydem wynosił 24% po 24 godzinach i 46% po 48 godzinach. Podanie inhibitora ATM obniżało poziom śmierci do 11% po 24 godzinach i do 16% po 48 godzinach, co odpowiadało indeksowi apoptotycznemu komórek traktowanych samym inhibitorem. Poziom śmierci komórek traktowanych DMSO był nieznacznie niższy (brak istotności statystycznej) niż w komórkach po podaniu KU-55933 lub KU-55933 z etopozydem.



Rys. 5.14. Wpływ KU-55933 na indeks apoptotyczny spoczynkowych limfocytów T traktowanych DMSO, KU-55933 (KU), KU-55933 z etopozydem (KU+ETO) i samym etopozydem (ETO) przez 24 i 48 godzin (A.) Reprezentatywne wykresy gęstościowe przedstawiające sposób bramkowania populacji komórek umierających. (B.) Słupki przedstawiają wartości średnie indeksu apoptotycznego ($n=8$; $\pm SD$, *** - $p<0,001$).

Sprawdzono również wpływ inhibitora ATM na poziom aktywacji kaspaz. Limfocyty T traktowano KU-55933 z etopozydem lub tylko etopozydem przez 24 i 48 godzin, a

następnie metodą Western blot zbadano pojawianie się prążków odpowiadających aktywnym formom kaspazy-3, -8 i -9. Jak widać na rysunku 5.15A., intensywność prążków odpowiadających aktywnym kaspazom była większa w przypadku traktowania komórek tylko etopozydem niż w komórkach, którym podano inhibitor ATM z etopozydem. Cytometryczny pomiar aktywnej kaspazy-2 również pokazał, że zastosowanie KU-55933 obniżało liczbę komórek pozytywnych pojawiających się po traktowaniu etopozydem z 20% do 7% po 24 godzinach oraz z 36% do 11% po 48 godzinach (Rys. 5.15B.).



Rys. 5.15. Wpływ KU-55933 na aktywację kaspaz w spoczynkowych limfocytach T traktowanych etopozydem. (A) Aktywacja kaspazy-3, -8, -9 mierzona techniką Western blot. Strzałki wskazują prążki odpowiadające prokaspazom oraz ciętym formom kaspaz. (B) Cytometryczny pomiar aktywnej kaspazy-2 w komórkach ($n=3; \pm SD$).

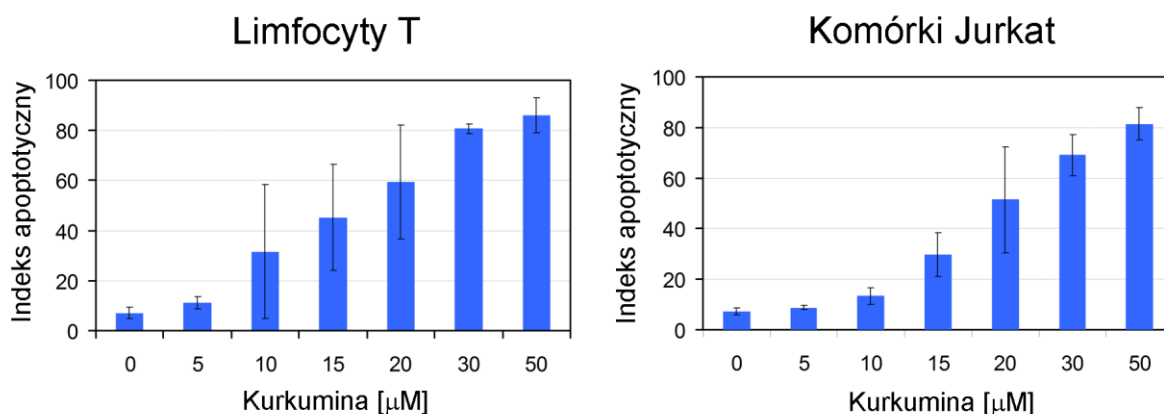
Zastosowanie inhibitora kinazy ATM obniżało poziom apoptozy i poziom białek proapoptotycznych w limfocytach T traktowanych etopozydem.

5.3. Indukcja śmierci kurkuminȧ spoczynkowych limfocyṫ T i koṁrek linii Jurkat

Kurkumina jest zwi̇zkiem pochodzenia rȯslinnego, kṫry od stuleci stosowany jest w medycynie naturalnej Dalekiego Wschodu w leczeniu wielu dolegliẇsci. Oddziȧluje ona na wiele białek i proceṡw koṁrkowych oraz wykazuje silne ẇl̇sciwȯsci przeciwnowotworowe. Pojawily si̇e tėz dane ṁowi̇ace o indukcji uszkodzėn DNA przez kurkuminȧ [113]. Dlatego kolejnym celem niniejszej pracy bylo zbadanie czy kurkumina indukuje uszkodzenia DNA i aktywaċe szlaku DDR w spoczynkowych limfocytach T. Dla poṙownania, zbadano roẇniėz odpoẇiedz koṁrek linii Jurkat.

5.3.1. Wpłẏw kurkuminy na przėżywalnȯśc spoczynkowych limfocyṫ T i koṁrek linii Jurkat

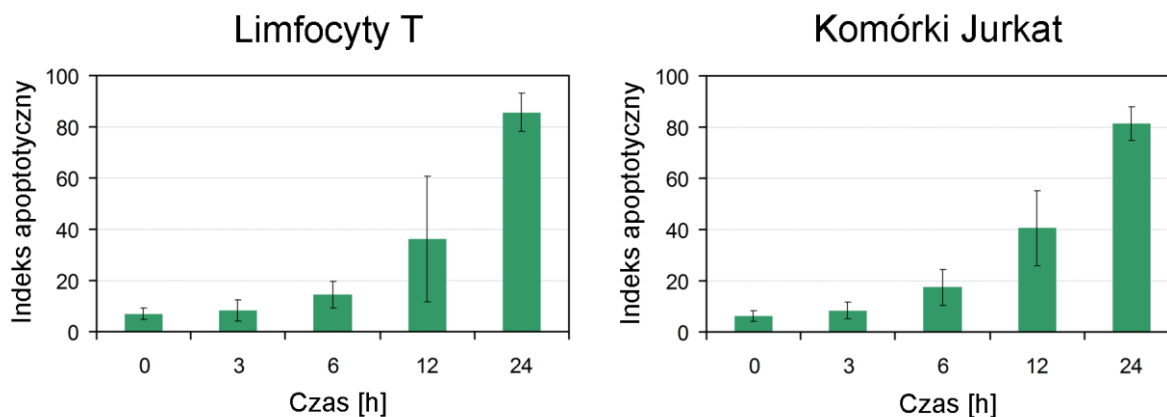
Kurkumina jest silnym induktorem śmierci koṁrek nowotworowych, dlatego zbadano indeks apoptotyczny koṁrek traktowanych kurkuminȧ w ṙȯznych stėzeniach (5-50̇ μ M). Pomiaru cytometrycznego dokonano 24h po dodaniu zwi̇zku, znakuj̇ac koṁarki aneksynȧ V i 7-AAD. Rysunek 5.16. przedstawia zbiorcze wyniki otrzymane z dȯswiadczėn przeprowadzonych na spoczynkowych limfocytach T wyizolowanych od 3 dawċow i trzech powṫorzėn na koṁrkach linii Jurkat. Koṁarki kontrolne byly traktowane DMSO (0,5%) przez 24h, co odpoẇiadalo stėzeniu DMSO w hodowli traktowanej 50̇ μ M kurkuminȧ. W obu typach koṁrek indeks apoptotyczny zwi̇ekszȧl si̇e wraz ze wzrostem stėzenia kurkuminy. W spoczynkowych limfocytach T kurkumina w stėzeniu 10̇ μ M powodowala znaczny wzrost poziomu śmierci (30%), si̇egaj̇ac 85% dla stėzenia 50̇ μ M. Indeks apoptotyczny koṁrek linii Jurkat byl nieznacznie nizszy niz w limfocytach T w przypadku nizszych stėzėn, ale praktycznie taki sam (82%) dla najwyzszego stosowanego stėzenia, 50̇ μ M.



Rys. 5.16. Indeks apoptotyczny spoczynkowych limfocytów T i komórek linii Jurkat w zależności od stężenia kurkuminy. Komórki były traktowane kurkumina w stężeniach 5-50 μM i po 24 godzinach mierzono indeks apoptotyczny znakując komórki aneksyną V i 7-AAD. Słupki przedstawiają średnią uzyskaną z doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach od 3 dawców i 3 powtórzeń na komórkach linii Jurkat (\pm SD).

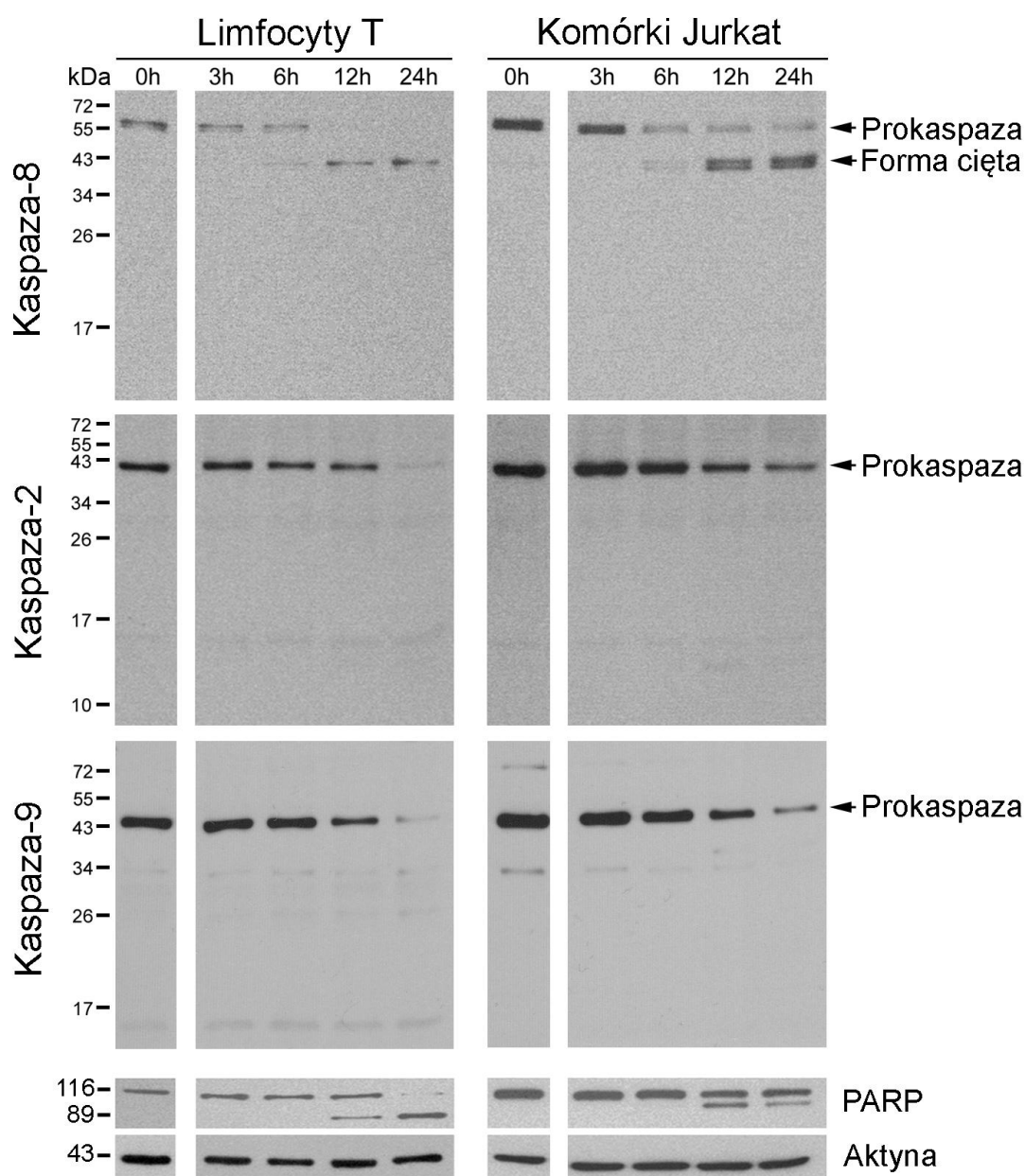
Uzyskane wyniki pokazują, że kurkumina w podobnym stopniu jest związkiem cytotoksycznym dla komórek prawidłowych – spoczynkowych limfocytów T, jak i dla komórek nowotworowych linii Jurkat. Odsetek komórek martwych zwiększa się wraz ze wzrostem stosowanego stężenia kurkuminy.

Badania prowadzone w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia dowiodły, że kurkumina w stężeniu 50 μM efektywnie indukuje śmierć różnych typów komórek (nowotworowych i prawidłowych), dlatego też do dalszych badań wybrano właśnie to stężenie. Zbadano poziom indeksu apoptotycznego spoczynkowych limfocytów T i komórek linii Jurkat dla tego stężenia po 3, 6, 12, 24 godzinach od dodania kurkuminy (Rys. 5.17.). Kontrolę stanowiły komórki traktowane DMSO (0,5%) przez 24 godziny. W przypadku obu typów komórek śmiertelność rosła wraz z czasem traktowania. W spoczynkowych limfocytach T wzrost odsetka komórek martwych w stosunku do komórek kontrolnych (7%) nastąpił już po 6 godzinach – 14%, a w kolejnych punktach czasowych wynosił 36% po 12 i 85% po 24 godzinach. Indeks apoptotyczny komórek linii Jurkat traktowanych 50 μM kurkumina wynosił 17% po 6, 40% po 12 i 81% po 24 godzinach.



Rys. 5.17. Indeks apoptotyczny spoczynkowych limfocytów T i komórek linii Jurkat w zależności od czasu traktowania. Komórki były traktowane kurkumina w stężeniu $50\mu\text{M}$. W wybranych punktach czasowych mierzono indeks apoptotyczny znakując komórki aneksyną V i 7-AAD. Słupki przedstawiają średnią uzyskaną z doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach T od 5 dawców i 5 powtórzeń na komórkach linii Jurkat (\pm SD).

Wyniki otrzymane z pomiarów cytometrycznych pokazują, że kurkumina w stężeniu $50\mu\text{M}$ indukuje śmierć na wysokim poziomie. Dlatego przy pomocy metody Western blot zbadano aktywację kaspaz. Spoczynkowe limfocyty T wyizolowane od trzech dawców i komórki linii Jurkat traktowano $50\mu\text{M}$ kurkumina i sprawdzano pojawianie się aktywnych kaspaz-8, -2, -9 w czasie 0, 3, 6, 12, 24 godziny po podaniu związku. Badano również pojawianie się ciętego białka PARP, substratu aktywnej kaspazy-3. Rysunek 5.18. przedstawia reprezentatywne bloty otrzymane z doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach T wyizolowanych od 3 dawców i 3 powtórzeń na komórkach linii Jurkat. W spoczynkowych limfocytach T aktywną kaspazę-8 wykrywano już po 6 godzinach traktowania kurkumina. Wraz z upływem czasu zmniejszała się intensywność prążków prokaspazy-2, i -9, jednak nie zaobserwowano prążków odpowiadających aktywnym formom tych kaspaz. Stwierdzono natomiast pojawianie się prążka ciętego białka PARP po 12 i w większym stopniu 24 godzinach, świadczącego o aktywacji kaspazy-3. Wyniki otrzymane dotyczące komórek linii Jurkat były bardzo podobne jak w przypadku limfocytów T. Po 6 godzinach zaczął pojawiać się prążek aktywnej kaspazy-8, a jego intensywność zwiększała się wraz z upływem czasu. Zaobserwowano również spadek intensywności prążków prokaspaz (-8, -2, -9) wraz z wydłużaniem się czasu traktowania kurkumina. Po 12 i 24 godzinach pojawiły się także prążki świadczące o proteolizie białka PARP.

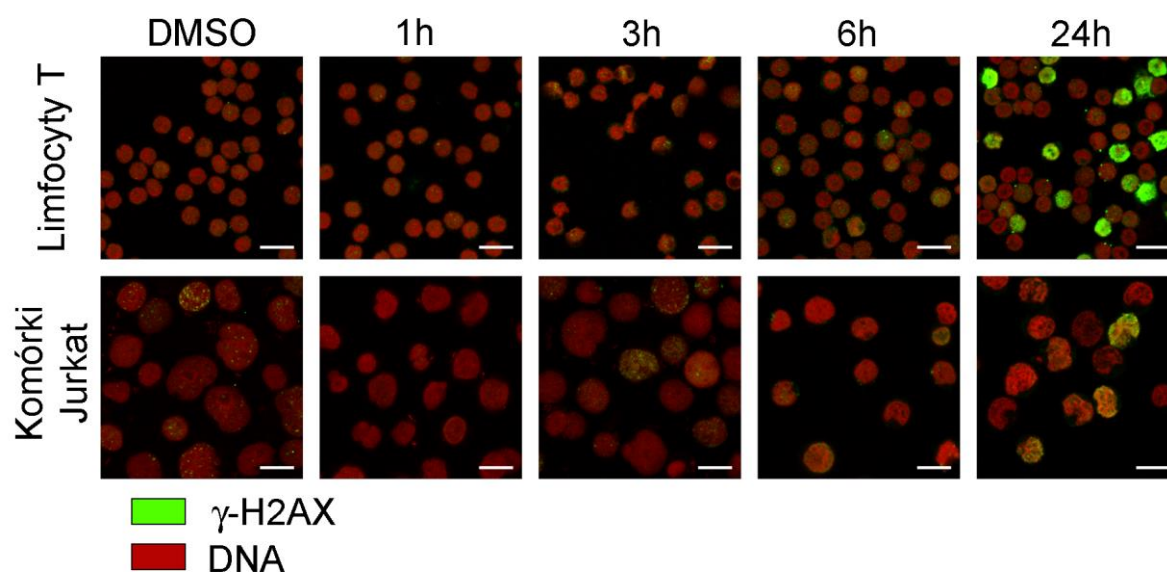


Rys. 5.18. Aktywacja kaspaz w komórkach traktowanych kurkumina. Spoczynkowe limfocyty T i komórki linii Jurkat traktowano 50 μM kurkumina. Pojawianie się prążków odpowiadających prokaspazom, aktywnym kaspazom oraz proteolizie białka PARP analizowano w czasie 0, 3, 6, 12, 24 godziny po podaniu kurkuminy. Przedstawiono reprezentatywne bloty otrzymane z doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach T wyizolowanych od 3 dawców i trzech powtórzeń na komórkach linii Jurkat.

Uzyskane wyniki pokazują, że kurkumina jest tak samo silnym induktorem śmierci spoczynkowych limfocytów T jak i komórek linii Jurkat. Mechanizm śmierci związany jest z aktywacją kaspazy-8, lecz nie kaspazy-2 i -9, co sugeruje udział zewnętrznego szlaku prowadzącego do indukcji apoptozy w obydwu typach komórek.

5.3.2. Markery uszkodzeń DNA w komórkach traktowanych kurkumina

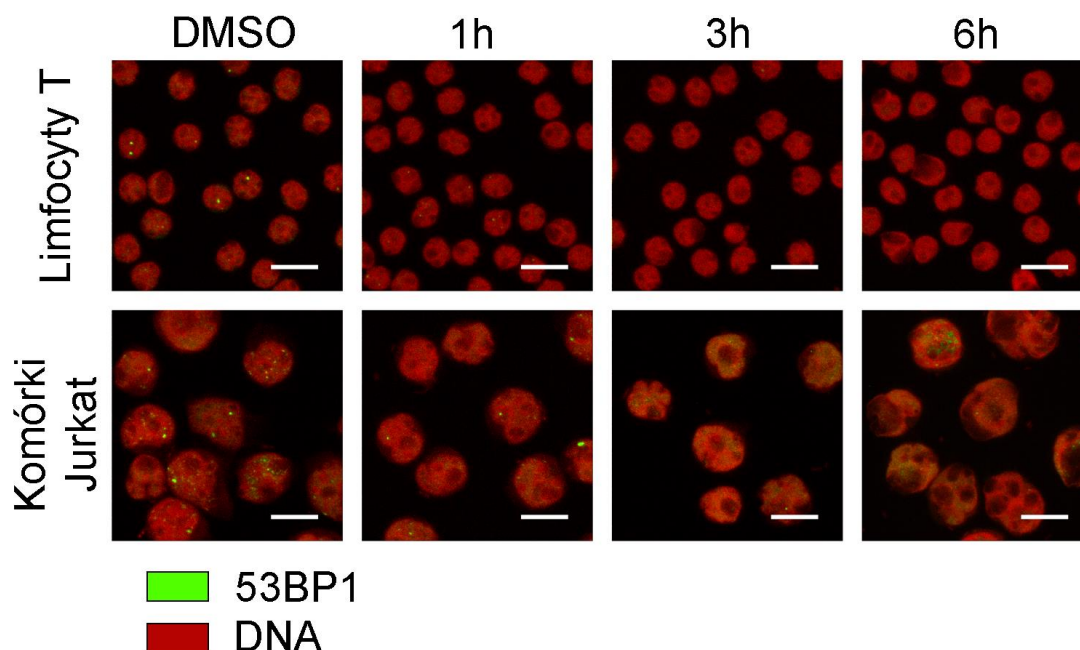
Jednym z markerów uszkodzeń DNA jest fosforylacja seryny 139 białka H2AX. Spoczynkowe limfocyty T i komórki linii Jurkat traktowano 50 μ M kurkumina. Po upływie 1, 3, 6, 24 godzin metodą immunocytochemiczną wykrywano tworzenie skupisk γ H2AX (Rys. 5.19.). Doświadczenie przeprowadzono na limfocytach T pochodzących od 3 dawców i powtórzono trzy razy na komórkach linii Jurkat. Kontrolą były komórki traktowane DMSO (0,5%; 1 godzina). W spoczynkowych limfocytach T nie zaobserwowano indukcji skupisk γ H2AX w żadnym z badanych czasów. Natomiast już po 6, oraz w większym stopniu po 24 godzinach, pojawiły się komórki o intensywnym zabarwieniu, charakterystycznym dla komórek umierających. W komórkach linii Jurkat kurkumina również nie indukowała tworzenia skupisk γ H2AX. Ich poziom (obserwowany np.: po 3 godzinach) nie był większy od tego w komórkach kontrolnych. Pojawienie się intensywnie świecących komórek po 6 i 24 godzinach, świadczy o ich śmierci. Kurkumina (Rys. 5.19.) w przeciwieństwie do etopozydu (Rys. 5.6.) nie powodowała rozpadu komórek na ciała apoptotyczne.



Rys. 5.19. Detekcja skupisk γ H2AX w komórkach traktowanych kurkumina. Spoczynkowe limfocyty T i komórki linii Jurkat traktowano 50 μ M kurkumina i po upływie 1, 3, 6, 24 godzin, wyznakowano γ H2AX (zielony) i DNA (czerwony). Przetawiono reprezentatywne zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu konfokalnego. Skala wynosi 10 μ m.

Przeprowadzono również barwienie immunocytochemiczne skupisk 53BP1 w komórkach poddanych działaniu 50 μ M kurkuminy. Rysunek 5.20. przedstawia reprezentatywne zdjęcia uzyskane po traktowaniu spoczynkowych limfocytów T od 3 dawców i dla 3 powtórzeń w przypadku komórek linii Jurkat. Barwienie przeprowadzono po

1, 3, 6 godzinach, a kontrolą były komórki traktowane DMSO (0,5%; 1 godzina). Kurkumina nie powodowała formowania skupisk 53BP1 w badanych komórkach.



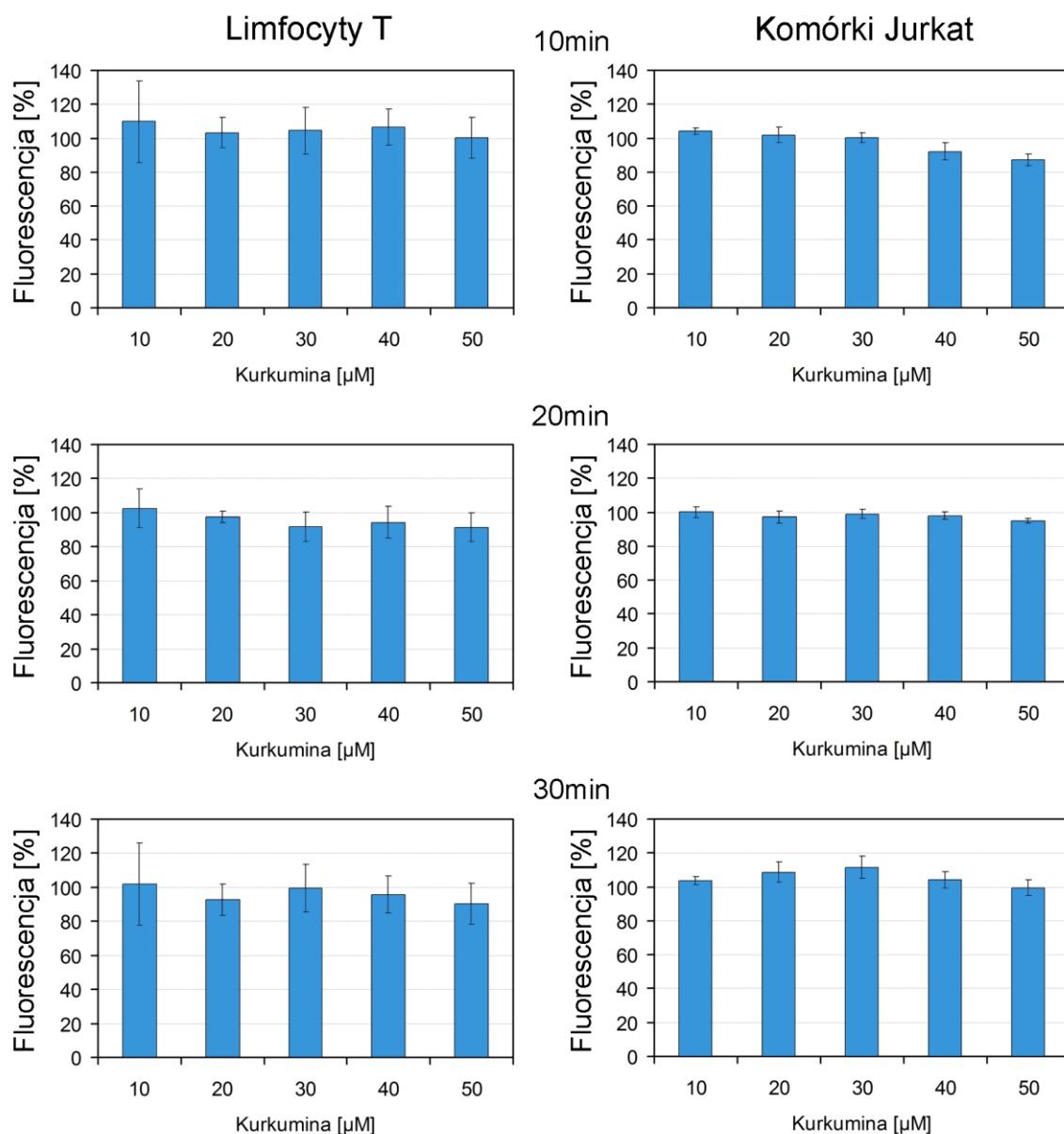
Rys. 5.20. Wykrywanie skupisk 53BP1 w komórkach traktowanych kurkumina. Spoczynkowe limfocyty T i komórki linii Jurkat traktowano 50 μ M kurkumina i po upływie 1, 3, 6h wyznakowano 53BP1 (zielony) i DNA (czerwony). Przystawiono reprezentatywne zdjęcia z mikroskopu konfokalnego. Skala wynosi 10 μ m.

Stosując barwienia immunocytochemiczne nie wykryto obecności γ H2AX i 53BP1 - markerów uszkodzeń DNA w komórkach traktowanych kurkumina. Sugeruje to, że kurkumina nie indukuje uszkodzeń DNA, które mogłyby być przyczyną śmierci komórek.

5.3.3. Poziom uszkodzeń DNA w komórkach traktowanych kurkumina mierzony metodą FADU

W celu dalszej analizy wpływu kurkuminy na indukcję uszkodzeń DNA, dokonano pomiaru ich poziomu metodą FADU. Spoczynkowe limfocyty T i komórki linii Jurkat traktowano kurkumina w stężeniach 10-50 μ M. W celu zbadania poziomu pierwotnych uszkodzeń DNA (niezwiązanych z apoptozą), pomiar przeprowadzono w krótkich czasach (10, 20, 30 min) po podaniu kurkuminy. Rysunek 5.21. przedstawia wyniki otrzymane na limfocytach T wyizolowanych od 2 dawców i 5 powtórzeniach na komórkach linii Jurkat. Sto jednostek oznacza poziom uszkodzeń komórek kontrolnych traktowanych DMSO. W spoczynkowych limfocytach T kurkumina nie powodowała wzrostu poziomu uszkodzeń DNA niezależnie od stężenia i czasu traktowania. Widoczny mały wzrost ich poziomu dla stężeń

30, 40, 50 μ M (20 min) oraz stężenia 20 i 50 μ M (30 min) (spadek fluorescencji o około 9%) nie był istotny statystycznie. W komórkach linii Jurkat stwierdzono nieznaczny wzrost poziomu uszkodzeń DNA po 10 minutach traktowania kurkumina w stężeniu 40 μ M (8%) i 50 μ M (13%). Jednakże w kolejnych punktach czasowych nie obserwowano już zmiany poziomu uszkodzeń DNA w stosunku do komórek kontrolnych.

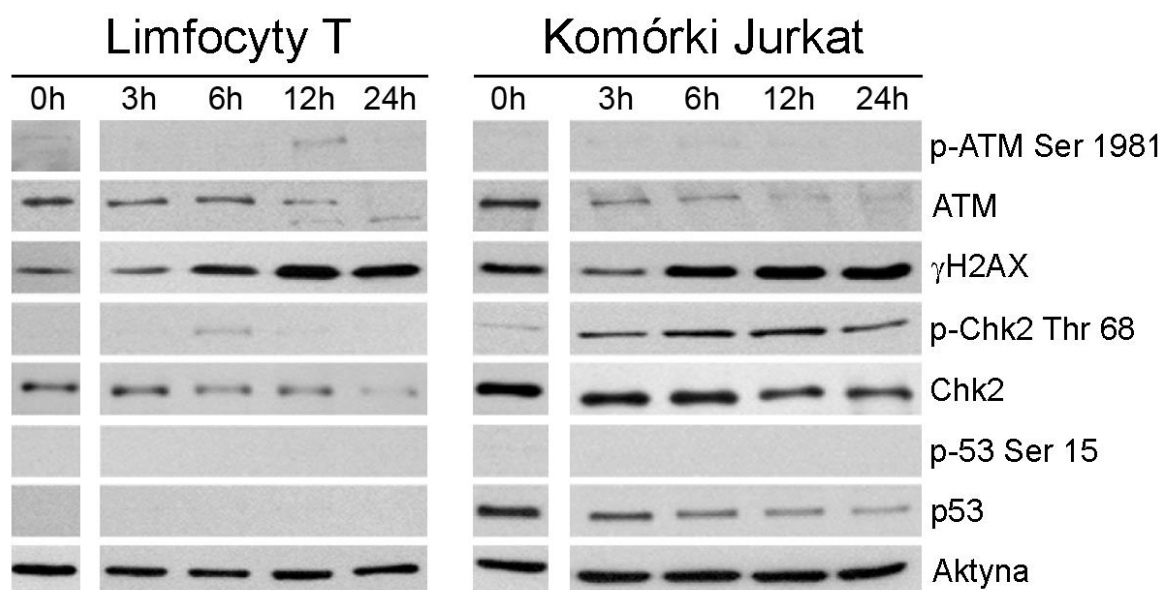


Rys. 5.21. Poziom uszkodzeń DNA indukowany kurkumina i mierzony techniką FADU. Spoczynkowe limfocyty T i komórki linii Jurkat traktowano kurkumina w stężeniu 10-50 μ M i po upływie (A) 10min, (B) 20min, (C) 30min mierzono poziom uszkodzeń DNA. Słupki przedstawiają średnią uzyskaną z doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach T wyizolowanych od 6 dawców oraz trzech powtórzeń na komórkach linii Jurkat. 100% oznacza poziom fluorescencji komórek kontrolnych, traktowanych DMSO. (\pm SD)

Badanie poziomu uszkodzeń DNA metodą FADU wykazało, że kurkumina nie indukuje uszkodzeń DNA w spoczynkowych limfocytach T i komórkach linii Jurkat, co również wykazano przy pomocy barwienia immunocytochemicznego γ H2AX i 53BP1.

5.3.4. Aktywacja szlaku DDR w komórkach traktowanych kurkumina

Kurkumina w stężeniu 50 μ M indukowała wysoki poziom apoptozy, zarówno spoczynkowych limfocytów T jak i komórek linii Jurkat. Jednakże, nie zaobserwowano indukcji pierwotnych uszkodzeń DNA. Sprawdzone również (metodą Western blot), czy kurkumina nie powoduje aktywacji szlaku DDR. Spoczynkowe limfocyty T wyizolowane od 3 dawców i komórki linii Jurkat (trzy powtórzenia) traktowano 50 μ M kurkumina. Po upływie 3, 6, 12, 24 godzin badano poziom ekspresji całkowitych i ufosforylowanych białek szlaku DDR (Rys. 5.22.). W spoczynkowych limfocytach nie zaobserwowano obecności ufosforylowanej na Ser 1981 kinazy ATM po 3, 6 i 24 godzinach. Tylko w 12 godzinie traktowania kurkumina stwierdzono wystąpienie ufosforylowanej kinazy ATM, lecz na stosunkowo niskim poziomie. Był to czas, w którym część komórek wchodziła w apoptozę, o czym świadczy proteoliza kinazy ATM i fosforylacja H2AX w późniejszych czasach. Mimo braku aktywnej kinazy ATM po 6h pojawił się prążek odpowiadający ufosforylowanej Thr 68 białka Chk2. Nie zaobserwowano fosforylacji białka p53. W spoczynkowych limfocytach T poddanych działaniu kurkuminy nie zaobserwowano indukcji takich białek jak p21, PUMA Chk1 oraz fosforylacji Chk1. W komórkach linii Jurkat traktowanych kurkumina nie stwierdzono fosforylacji kinazy ATM i p53. Całkowity poziom tych dwóch białek zmniejszał się wraz z upływem czasu. Może to być skutkiem śmierci komórek, na co wskazuje wzrost intensywności prążka odpowiadającego γ H2AX. Zaobserwowano natomiast pojawianie się prążka odpowiadającego ufosforylowanemu na Thr 68 białku Chk2 indukowanego kurkumina.



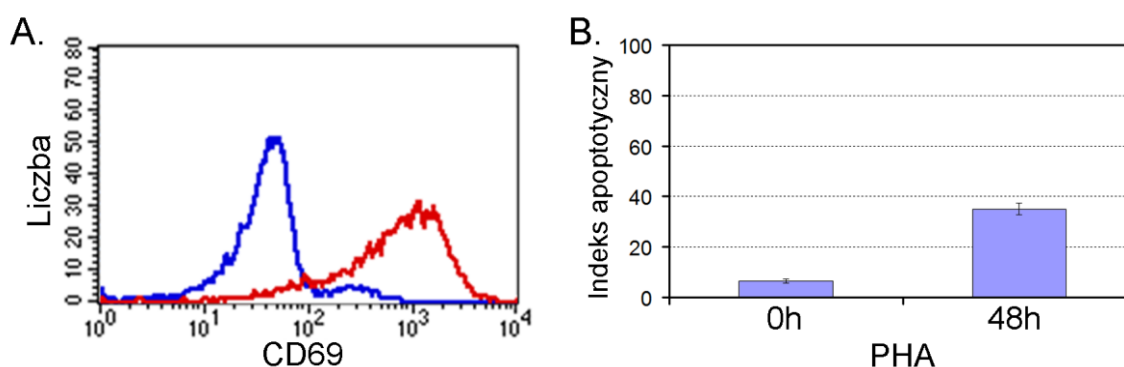
Rys. 5.22. Wpływ kurkuminy na poziom kluczowych białek szlaku DDR. Komórki traktowano 50 μ M kurkuminy. W czasie 0, 3, 6, 12 i 24 godziny, metodą Western blot, badano poziom ufosforylowanych (ATM, Chk2, p53 i H2AX) i całkowitych (ATM, Chk2 i p53) białek. Przedstawiono reprezentatywne wyniki otrzymane z doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach T wyizolowanych od 3 dawców i 3 powtórzeń na komórkach linii Jurkat.

Traktowanie komórek kurkuminy nie indukowało uszkodzeń DNA oraz nie prowadziło do aktywacji szlaku DDR. Zaobserwowano fosforylację treoniny 68 białka Chk2, która jednak była niezależna od aktywacji kinazy ATM.

5.4. Rola ścieżki sygnalizacyjnej od uszkodzeń DNA (DDR) w śmierci i starzeniu ludzkich limfocytów T pod wpływem stresu replikacyjnego *in vitro*

5.4.1. Stymulacja limfocytów T niespecyficznym miogenem PHA

W zdrowym organizmie limfocyty T występują w stanie spoczynkowym. Rozpoczęcie podziałów jest wynikiem aktywacji specyficznymi antygenami podczas infekcji. Prowadzi to do wejścia komórek w cykl komórkowy i wzmożonej syntezy DNA i proliferacji antygenowo specyficznych klonów limfocytów T. *In vitro*, proliferacja limfocytów T uzyskiwana jest w wyniku stymulacji tak zwanymi miogenami, do których zalicza się fitohemaglutyninę (PHA) [105]. Jest to lektyna pochodzenia roślinnego, która w sposób niespecyficzny aktywuje limfocyty T. Na powierzchni aktywowanych limfocytów T pojawia się cząsteczka CD69 (wczesny marker aktywacji) (Rys. 5.23A.) oraz CD25 (łańcuch α receptora IL-2). Aktywowane komórki również zaczynają syntezę i wydzielanie IL-2, niezbędnej do ich wzrostu. Stymulacja PHA prowadzi do proliferacji, ale również do śmierci części komórek (35%) (Rys. 5.23B.).



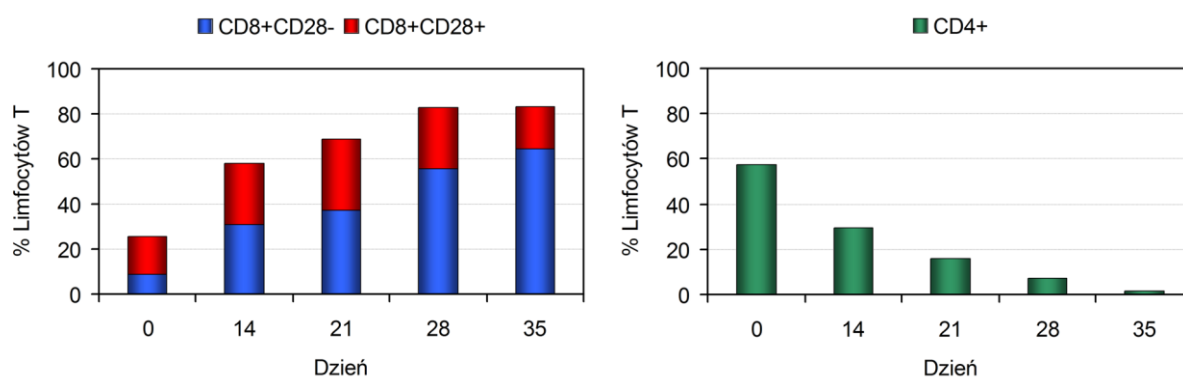
Rys. 5.23. Poziom cząsteczki CD69 i indeks apoptotyczny limfocytów T stymulowanych PHA. (A.) Histogram przedstawiający poziom cząsteczki CD69 na powierzchni limfocytów T spoczynkowych (linia niebieska) i stymulowanych PHA przez 24 godziny (linia czerwona). (B.) Indeks apoptotyczny limfocytów T stymulowanych PHA, mierzony w czasie 0h i po 48 godzinach stymulacji ($n=3$, \pm SD).

Wykazano, więc, że limfocyty T ulegały aktywacji *in vitro* pod wpływem PHA.

5.4.2. Starzenie replikacyjne limfocytów T *in vitro*

Starzenie replikacyjne jest związane z wyczerpaniem potencjału proliferacyjnego. Jest ono wynikiem skracania telomerów podczas podziałów komórkowych. Limfocyty T

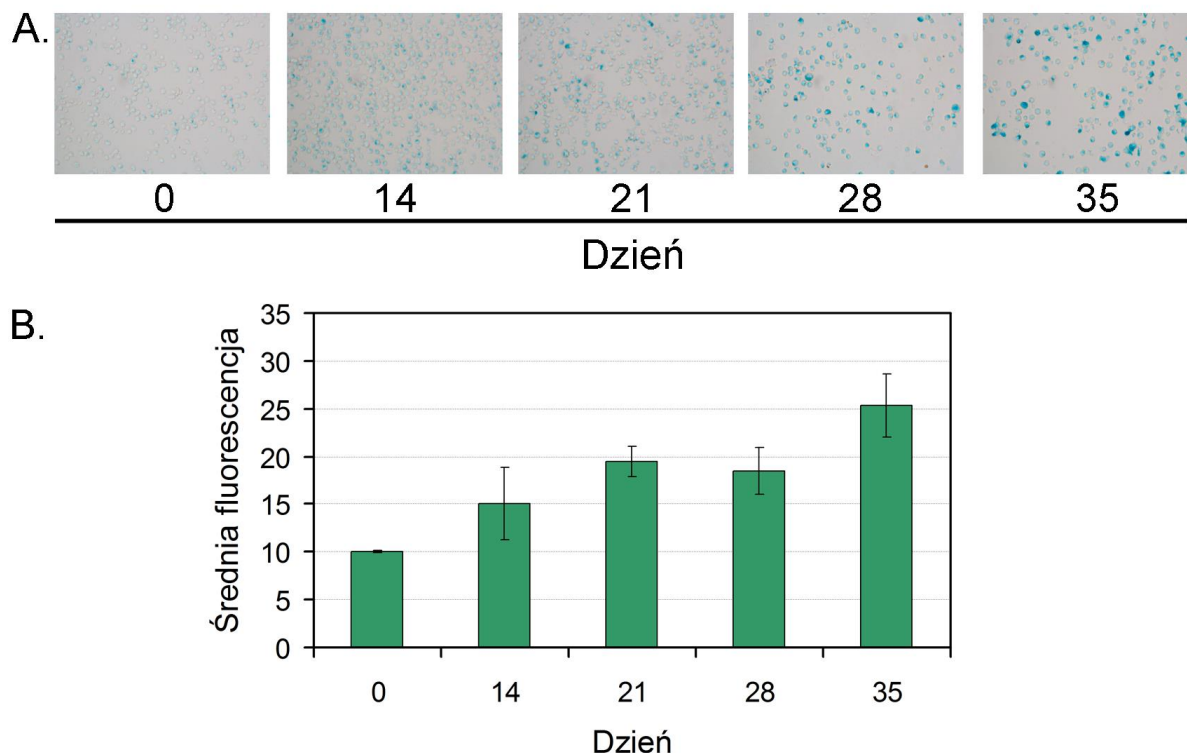
stymulowano do podziałów traktując je PHA (5mg/ml) przez 48 godzin. Następnie hodowane były w pożywce z dodatkiem IL-2 i ponownie stymulowane PHA w 14, 21 i 28 dniu hodowli (opis w materiałach i metodach). Jedną z cech charakterystycznych starzenia ludzkich limfocytów T *in vivo* oraz *in vitro* jest akumulacja subpopulacji limfocytów T CD8+CD28-. Rysunek 5.24. przedstawia pomiar fenotypu limfocytów restymulowanych PHA, mierzony w dniu restymulacji. Słupki przedstawiają średnią uzyskaną z 8 hodowli limfocytów T i pokazują odsetek komórek CD3+ (patrz materiały i metody). Począwszy od dnia 14 zaobserwowano znaczny wzrost odsetka CD8+CD28- subpopulacji limfocytów CD3+ (30%). W dniu 35 subpopulacja CD8+CD28- stanowiła większość komórek (65%). Natomiast odsetek subpopulacji CD4+ zmniejszył się podczas prowadzenia hodowli i z prawie 60% w dniu 0 spadł do ok. 1% w dniu 35. Komórki w dniu 0 są komórkami spoczynkowymi, wyizolowanymi od dawców przed pierwszą stymulacją PHA.



Rys. 5.24. Udział procentowy subpopulacji limfocytów T CD8+CD28+, CD8+CD28- i CD4+ w poszczególnych dniach hodowli. Słupki przedstawiają procent poszczególnych subpopulacji limfocytów T, badany w dniu izolacji – dzień 0 i kolejnych dniach hodowli 14, 21, 28, 35. (n=8)

Uniwersalnym markerem komórek starych jest aktywność SA- β -galaktozydazy. W poszczególnych dniach hodowli limfocytów T restymulowanych PHA, zbadano aktywność tego enzymu wykorzystując dwie metody: mikroskopową (barwienie histochemiczne) oraz cytometryczną. W dniu 0, 14, 21, 28 i 35 do komórek dodawano substrat β -galaktozydazy – X-gal i z pomocą mikroskopu świetlnego obserwowano pojawienie się produktu o niebieskim zabarwieniu. Rysunek 5.25 A. przedstawia reprezentatywne zdjęcia z poszczególnych dni hodowli. W dniu 0 (komórki spoczynkowe) nieliczne komórki były zabarwione na niebiesko. Liczba niebiesko zabarwionych komórek znacząco wzrosła po stymulacji PHA, co widać na zdjęciach z kolejnych dni hodowli. W celu dokonania ilościowego pomiaru komórek z aktywną SA- β -galaktozydazą zastosowano metodę cytometryczną. Do komórek dodawano substrat SA- β -galaktozydazy, który w wyniku proteolizy dawał fluorescencyjny produkt.

Rysunek 5.25 B. przedstawia średnią fluorescencję komórek z trzech hodowli. Zaobserwowano wzrost poziomu fluorescencji wraz z czasem trwania hodowli. W dniu 21 poziom fluorescencji był 2 razy, a w dniu 35 - 2,5 raza większy niż w komórkach nietaktowanych PHA (spoczynkowych).



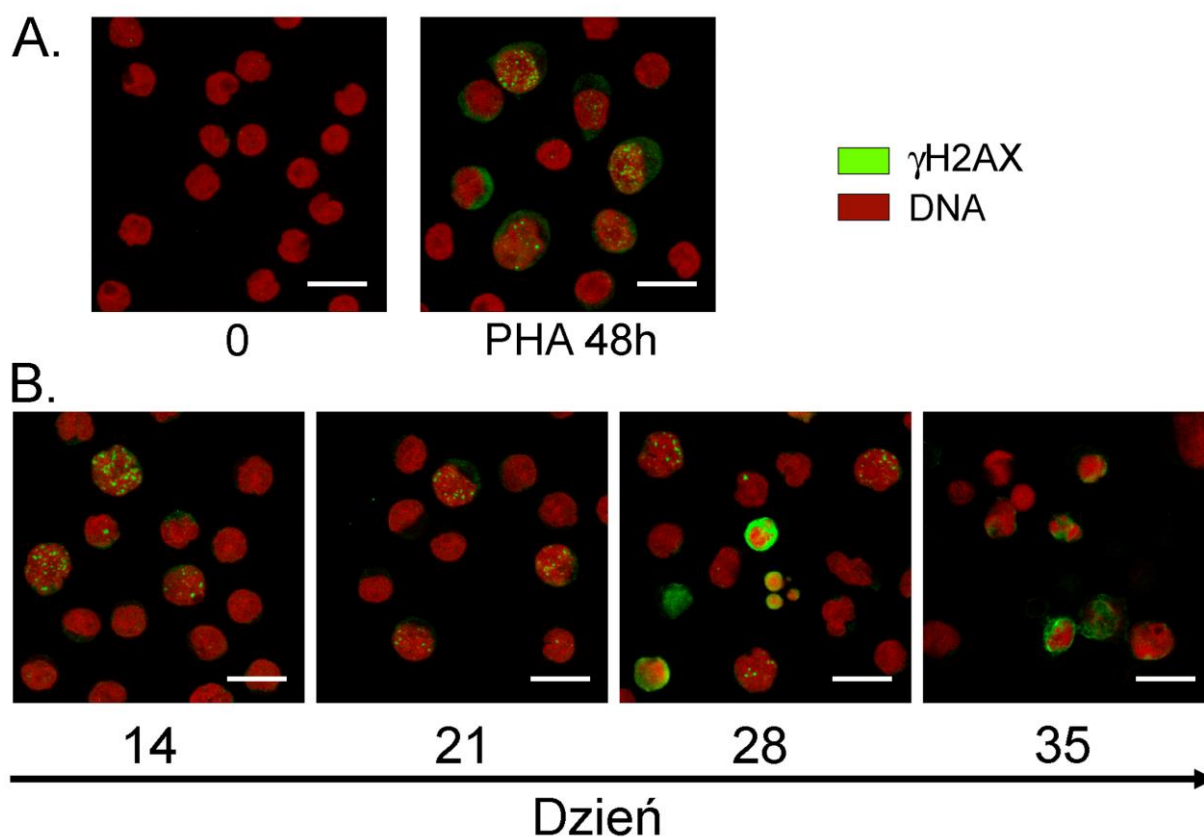
Rys. 5.25 Aktywność SA- β -galaktozydazy podczas starzenia replikacyjnego limfocytów T. (A.) Reprezentatywne zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu świetlnego przedstawiające barwienie histochemiczne. Niebieski kolor świadczy o aktywności SA- β -galaktozydazy. (B.) Poziom aktywnej SA- β -galaktozydazy - średnia fluorescencja komórek z poszczególnych dni hodowli. Słupki przedstawiają średnią z 3 doświadczeń (\pm SD).

Wzrost odsetka subpopulacji CD8+CD28- oraz aktywność SA- β -galaktozydazy świadczą o tym, że kilkukrotna stymulacja limfocytów T *in vitro* prowadzi do starzenia się tych komórek.

5.4.3. Uszkodzenia DNA w limfocytach T ulegających starzeniu replikacyjnemu

Stymulacja limfocytów T mitogenem PHA prowadzi do ich aktywacji i podziałów. Odpowiedź proliferacyjna komórek na silne mitogeny może powodować stres replikacyjny prowadzący do indukcji uszkodzeń DNA, które mogą aktywować szlak DDR prowadzący do starzenia lub apoptozy. Dlatego postanowiono zbadać obecność markera uszkodzeń DNA (γ H2AX) w limfocytach T stymulowanych PHA do starzenia replikacyjnego. Na początku sprawdzono tworzenie skupisk γ H2AX w spoczynkowych limfocytach T stymulowanych

PHA. Barwienie immunocytochemiczne przeprowadzono po 48 godzinach od pierwszej stymulacji PHA (Rys. 5.26A.). Zaobserwowano tworzenie skupisk γ H2AX w komórkach stymulowanych PHA, których nie było w komórkach kontrolnych (spoczynkowe). Następnie zbadano obecność markerów uszkodzeń DNA w limfocytach T podczas starzenia replikacyjnego. Rysunek 5.26B. przedstawia zdjęcia barwienia γ H2AX wykonane przy pomocy mikroskopu konfokalnego w dniu 0, 14, 21, 28 i 35 hodowli (tuż przed każdą kolejną restymulacją PHA). Zaobserwowano występowanie skupisk γ H2AX w komórkach w dniach 14, 21 i 28, chociaż liczba komórek z uszkodzeniami DNA malała i w 35 dniu praktycznie ich nie obserwowano. Wiązać się to może ze wzrostem poziomu śmierci komórkowej, o czym świadczą komórki o intensywnym zielonym zabarwieniu. Doświadczenie przeprowadzono na limfocytach pochodzących od 3 dawców.

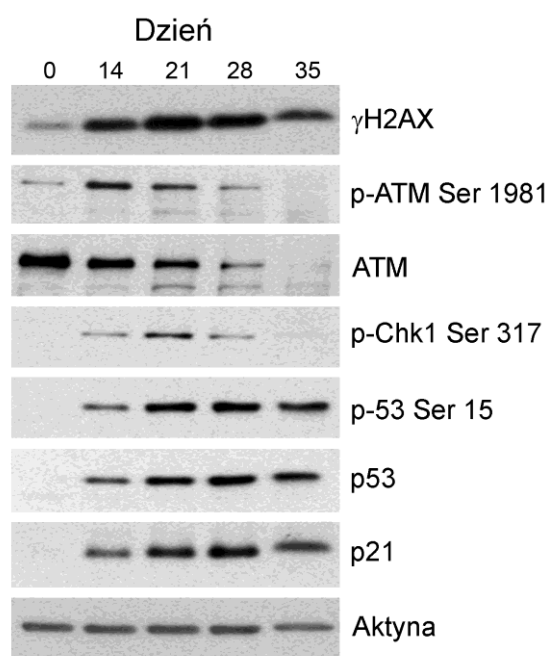


Rys. 5.26. Detekcja γ H2AX w limfocytach T stymulowanych PHA. Reprezentatywne zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu konfokalnego. (A) Tworzenie skupisk γ H2AX po stymulacji limfocytów T PHA przez 48 godzin. (B) Detekcja γ H2AX podczas starzenia replikacyjnego limfocytów T *in vitro*. Skala wynosi 10 μ m.

Stymulacja spoczynkowych limfocytów T przy użyciu PHA prowadziła do indukcji uszkodzeń DNA oraz starzenia komórek.

5.4.4. Aktywacji szlaku DDR podczas starzenia replikacyjnego limfocytów T

Barwienie immunocytochemiczne wykazały obecność uszkodzeń DNA w limfocytach T indukowanych do starzenia replikacyjnego. Postanowiono zbadać, czy aktywują one szlak DDR. Metodą Western blot badano fosforylację i poziom białek zaangażowanych w ścieżkę odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Pomiaru dokonano w dniu 0 (pierwszej stymulacji PHA), 14, 21, 28 i 35 hodowli (dni restymulacji, przed podaniem PHA). Rysunek 5.27. przedstawia reprezentatywne bloty otrzymane z doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach T wyizolowanych od 5 dawców. Zaobserwowano wzrost intensywności prążka odpowiadającego ufosforylowanej na serynie 1981 kinazie ATM w dniu 14, 21 i 28. Jego intensywność była największa w dniu 14, po czym systematycznie malała i w dniu 35 nie obserwowano jego obecności. Może być to wynikiem apoptozy, o czym świadczy wzrost fosforylacji H2AX oraz spadek poziomu i proteoliza kinazy ATM. Zaobserwowano również pojawianie się prążka odpowiadającego fosforylacji seryny 317 białka Chk1 w dniu 14, 21 i 28. Stymulacja limfocytów PHA prowadziła do fosforylacji seryny 15 oraz indukcji białka p53. Począwszy od dnia 14, poziom oraz fosforylacja p53 wzrastała w czasie, utrzymując się do ostatnich dni hodowli komórkowej. Kilkukrotna stymulacja komórek PHA prowadziła do akumulacji białka p21 – inhibitora cyklu komórkowego.

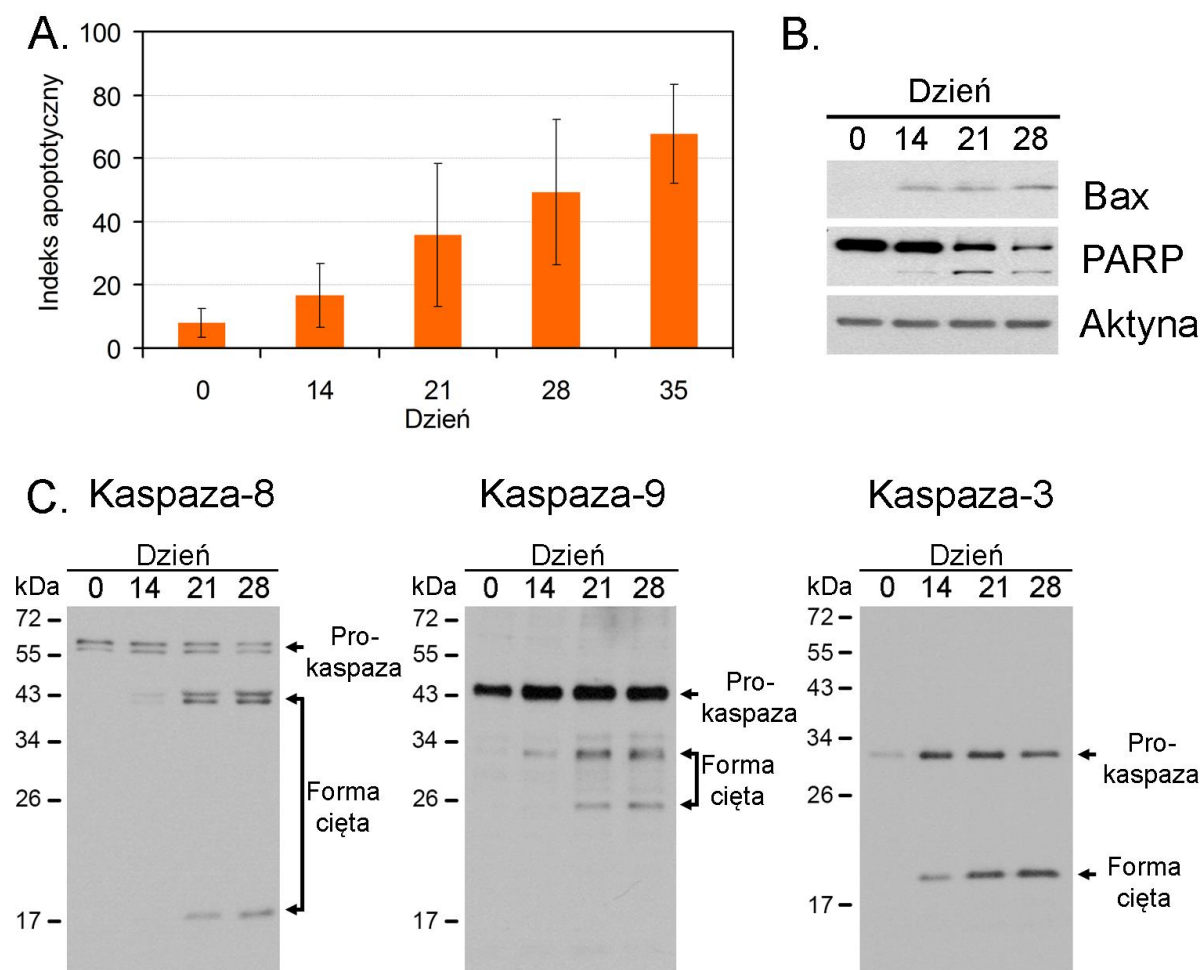


Rys. 5.27. Poziom białek szlaku DDR w limfocytach T indukowanych do starzenia replikacyjnego. Metodą Western blot badano poziom ufosforylowanych (ATM, Chk1, p53 i H2AX) i całkowitych (ATM, Chk1, p53 i p21) białek. Przedstawiono reprezentatywne wyniki otrzymane z doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach T wyizolowanych o 5 dawców.

Replikacyjne starzenie limfocytów T, będące wynikiem kilkukrotnej stymulacji mitogenem – PHA, prowadziło do aktywacji szlaku DDR, o czym świadczy fosforylacja oraz wzrost poziomu kluczowych jego elementów. Zaobserwowany wzrost poziomu inhibitora cyklu komórkowego, białka p21, będącego również markerem komórek starych.

5.4.5. Apoptoza limfocytów T podczas starzenia replikacyjnego

Starzeniu replikacyjnemu limfocytów T towarzyszyło powstawanie uszkodzeń DNA i aktywacja szlaku DDR oraz pojawianie się markerów procesu starzenia. Postanowiono również sprawdzić poziom śmierci komórkowej podczas tego procesu. Ponieważ PHA indukuje wysoki poziom śmierci aktywowanych limfocytów T (AICD), analizę przeprowadzono w komórkach hodowanych z dodatkiem IL-2, w dniach restymulacji 0, 14, 21, 25 i 35, przed podaniem PHA. Rysunek 5.28A. przedstawia indeks apoptotyczny, określony dzięki barwieniu komórek aneksyną V i 7-AAD. Pomiaru dokonano za pomocą cytometru przepływowego analizując limfocyty T wyizolowane od 8 dawców. Zaobserwowano wzrost indeksu apoptotycznego wraz z czasem trwania hodowli i wynosił on odpowiednio w dniu: 0 -8 %, 14- 17%, 21 - 36%, 28 – 49% i 35 – 68%. Dodatkowo metodą Western blot sprawdzono poziom białek związanych z procesem apoptozy. Pomiaru dokonano do dnia 28, ponieważ poziom śmierci komórek w dniu 35 był wysoki i mała liczba komórek nie pozwalała na przeprowadzenie wszystkich analiz w tym dniu. Rysunek 5.28B. przedstawia wzrost poziomu białka BAX w komórkach aktywowanych PHA, począwszy od dnia 14. W tych samych punktach czasowych obserwowano również proteolizę białka PARP. Zbadano także aktywację kaspazy-8, -9 i -3 podczas starzenia replikacyjnego limfocytów T. Rysunek 5.28C. obrazuje pojawianie aktywnych form trzech badanych kaspaz już w dniu 14 dnia, a ich intensywność rosła wraz z czasem trwania hodowli.



Rys. 5.28. Indeks apoptotyczny oraz aktywacja kaspaz podczas starzenia replikacyjnego limfocytów T. (A). Indeks apoptotyczny na podstawie znakowania aneksyną V i 7-AAD. Słupki przedstawiają średnią z eksperymentów *przeprowadzonych* na limfocytach T wyizolowanych od 8 dawców (\pm SD). (B) Poziom białka BAX oraz proteoliza białka PARP. (C) Reprezentatywne bloty przedstawiające aktywację kaspazy-8, -9 i -3. Strzałki wskazują prążki odpowiadające prokaspazom oraz ciętym formom kaspaz.

Starzeniu replikacyjnemu limfocytów T *in vitro* towarzyszył wzrost poziomu śmierci komórkowej, która była wynikiem aktywacji kaspaz zewnętrznego i wewnętrznego szlaku apoptotycznego.

5.5. Przyspieszone starzenie aktywowanych limfocytów T indukowane etopozydem

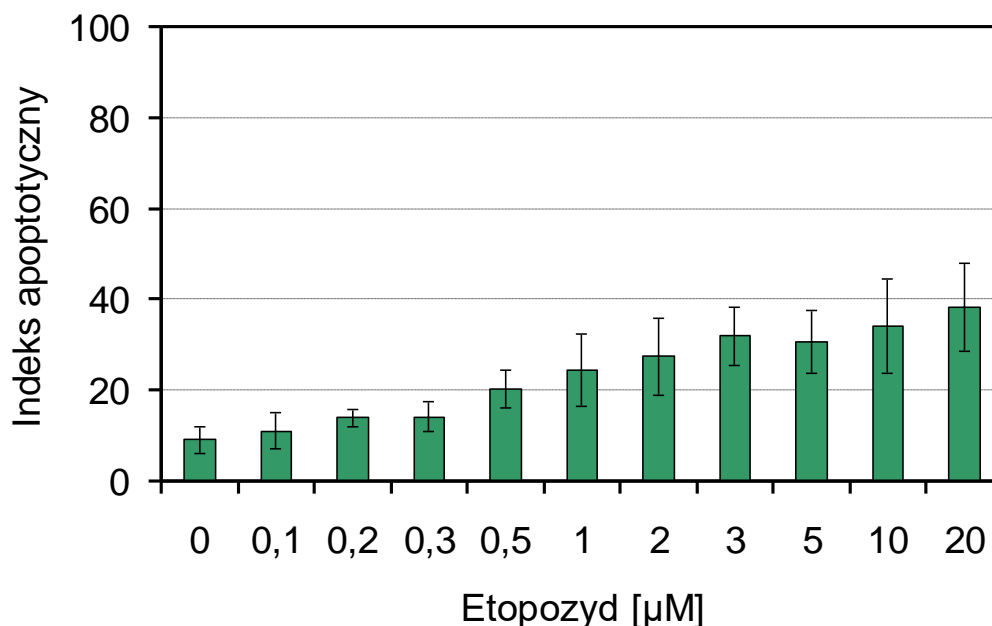
5.5.1. Przyspieszone starzenie indukowane stresem - SIPS

Uszkodzenia DNA odgrywają kluczową rolę w indukcji starzenia komórkowego. Podczas starzenia replikacyjnego, krótkie telomery rozpoznawane są jako uszkodzenia podwójnej nici DNA, które aktywują szlak DDR prowadzący do trwałego zatrzymania cyklu

komórkowego i starzenia. Dodatkowo indukowane różnego rodzaju czynnikami stresowymi uszkodzenia telomerowych i nietelomerowych odcinków DNA, również mogą prowadzić do aktywacji ścieżki DDR i starzenia komórkowego. Zjawisko to nazwane zostało przyspieszonym starzeniem indukowanym stresem (ang.: *SIPS – Stress Induced Premature Senescence*) i zachodzi w krótkim czasie (kilka dni) od zadziałania czynnika stresowego. Dlatego zadano pytanie czy aktywowane limfocyty T poddane działaniu związku uszkadzającego DNA (etopozydu) będą ulegały przyspieszonemu starzeniu. Przedstawione poniżej dane są wynikami wstępnymi, uzyskanymi głównie z dwóch doświadczeń.

5.5.2. Indeks apoptotyczny aktywowanych limfocytów T traktowanych etopozydem.

W modelu przyspieszonego starzenia dawka związku cytotoksycznego powinna indukować uszkodzenia DNA i jednocześnie nie prowadzić do znacznego wzrostu śmiertelności komórek. Dlatego na początku postanowiono zbadać indeks apoptotyczny aktywowanych limfocytów T w zależności od stężenia etopozydu. Spoczynkowe limfocyty T były stymulowane PHA przez 2 dni, a następnie przenoszone do świeżej pożywki i hodowane w obecności IL-2. W ósmym dniu hodowli komórki traktowano etopozydem w stężeniu 0,1-20 μ M. Po upływie 24 godzin za pomocą cytometru przepływowego mierzono indeks apoptotyczny, znakując komórki aneksyną V i 7-AAD. Rysunek 5.29. przedstawia wyniki uzyskane z doświadczeń przeprowadzonych na limfocytach T wyizolowanych od 3 dawców. Zaobserwowano wzrost poziomu śmierci komórek wraz ze wzrostem stężenia etopozydu. Najwyższy indeks apoptotyczny (38%) indukował etopozyd o stężeniu 20 μ M. Natomiast dla 0,1 μ M etopozydu poziom śmierci był praktycznie taki sam jak w komórkach kontrolnych, nietraktowanych etopozydem.

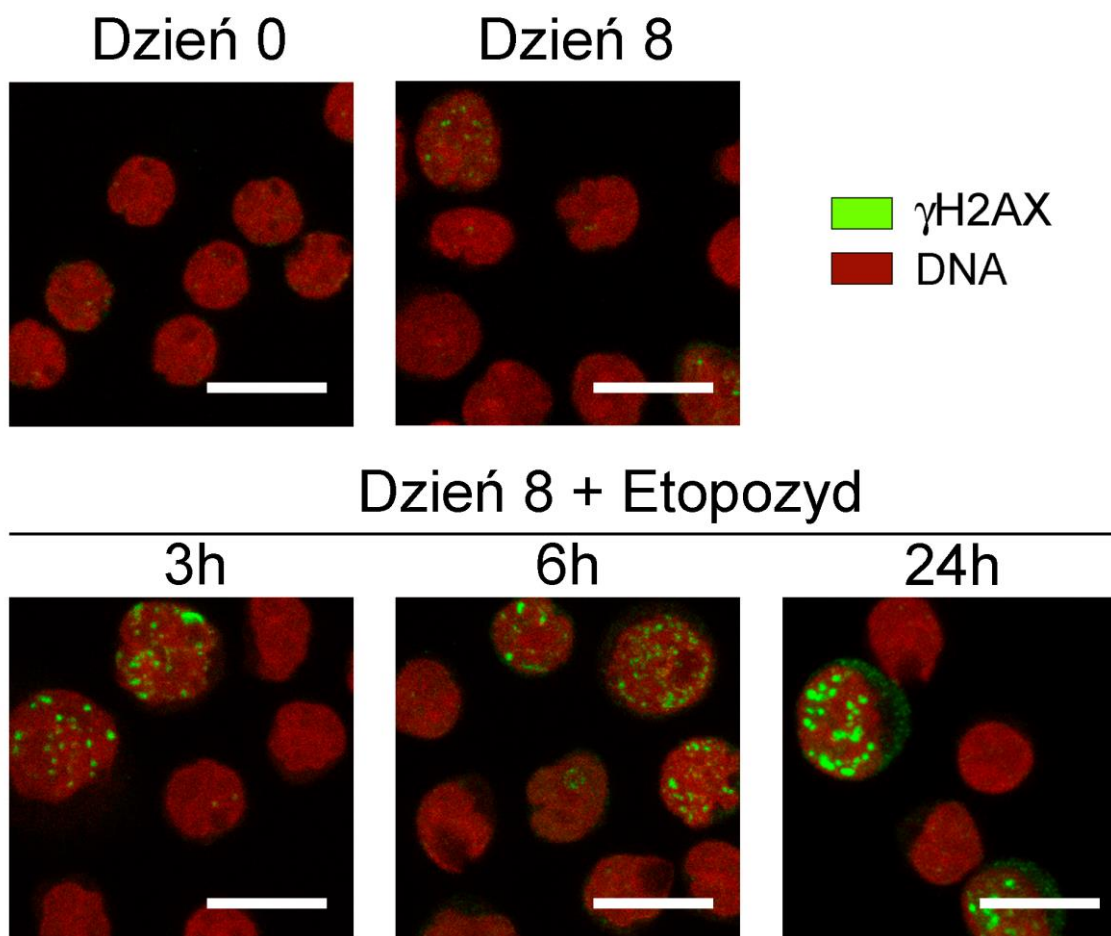


Rys. 5.29. Indeks apoptotyczny aktywowanych limfocytów T traktowanych etopozydem. Aktywowane limfocyty T, w ósmym dniu hodowli, traktowano etopozydem w różnych stężeniach. Po 24 godzinach komórki znakowano aneksyną V i 7-AAD i analizowano przy pomocy cytometru przepływowego ($n=3$; $\pm\text{SD}$).

Ponieważ etopozyd w stężeniu $0,1\mu\text{M}$ nie powodował wzrostu indeksu apoptotycznego aktywowanych limfocytów T, zostało ono wybrane do dalszych doświadczeń związanych ze starzeniem indukowanym uszkodzeniami DNA.

5.5.3. Markery uszkodzeń DNA w aktywowanych limfocytach T traktowanych niską dawką etopozydu

W celu sprawdzenia czy niska dawka etopozydu ($0,1\mu\text{M}$) jest wystarczająca do indukcji uszkodzeń DNA w aktywowanych limfocytach T, w ósmym dniu hodowli komórki traktowano etopozydem i po 3, 6 i 24 godzinach, metodą immunocytochemiczną, dokonano detekcji skupisk γH2AX (Rys. 5.30.). Kontrolę stanowiły limfocyty T spoczynkowe oraz aktywowane w ósmym dniu hodowli, nietraktowane etopozydem. Wyniki przedstawione w poprzednim rozdziale pokazywały tworzenie ognisk γH2AX w aktywowanych limfocytach T. Na rysunku 5.30. również widać skupiska γH2AX w aktywowanych limfocytach T w ósmym dniu hodowli. Podanie etopozydu w stężeniu $0,1\mu\text{M}$ prowadziło do wzrostu liczby skupisk w aktywowanych limfocytach T.



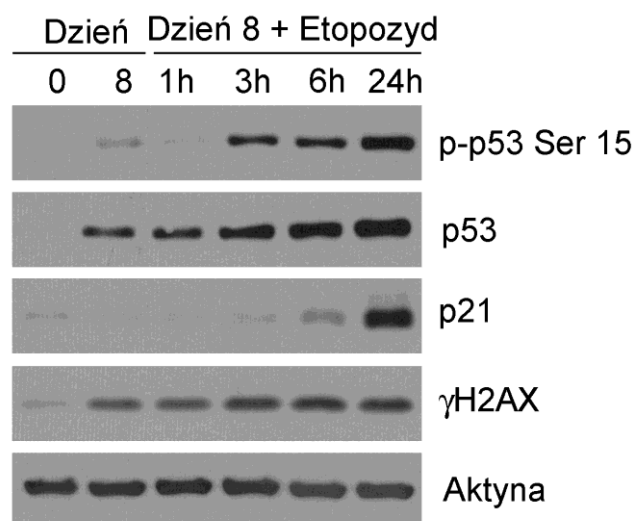
Rys. 5.30. Skupiska γ H2AX w aktywowanych limfocytach T traktowanych niską dawką etopozydu. Aktywowane limfocyty T (dzień 8) traktowano $0,1\mu\text{M}$ etopozydem i po upływie 3, 6 i 24 godzin wyznakowano γ H2AX (zielony) i DNA (czerwony). Przedstawiono reprezentatywne zdjęcia wykonane przy pomocy mikroskopu konfokalnego. Komórkami nietraktowanymi etopozydem są limfocyty z dnia 0 (spoczynkowe) i 8 hodowli. Skala wynosi $10\mu\text{m}$.

Traktowanie aktywowanych limfocytów T etopozydem w stężeniu $0,1\mu\text{M}$ prowadziło do wzrostu ilości uszkodzeń DNA w limfocytach T.

5.5.3.1 Aktywacja szlaku DDR w aktywowanych limfocytach T traktowanych niską dawką etopozydu

Podczas starzenia replikacyjnego limfocytów T obserwowano indukcję białek charakterystycznych dla szlaku DDR. Znaczny wzrost ich poziomu obserwowano w 14 dniu hodowli. Postanowiono sprawdzić czy traktowanie aktywowanych limfocytów T etopozydem w ósmym dniu hodowli, przyspieszy ten proces. Metodą Western blot badano poziom fosforylowanego i całkowitego białka p53 oraz p21 i γ H2AX w aktywowanych limfocytach T

(dzień 8) traktowanych 0,1 μ M etopozydem po 1, 3, 6 i 24 godzinach. Kontrolę stanowiły limfocyty T spoczynkowe oraz aktywowane, nietraktowane etopozydem (dzień 8) (Rys. 5.31.). W 8 dniu hodowli aktywowanych limfocytów T zaobserwowano wzrost poziomu fosforylowanego i całkowitego p53 oraz γ H2AX względem komórek spoczynkowych. Traktowanie 0,1 μ M etopozydem aktywowanych limfocytów T w dniu 8, już po 3 godzinach indukowało wzrost poziomu fosforylowanego i całkowitego p53 oraz γ H2AX względem aktywowanych komórek nietraktowanych. Zaobserwowano również, wywołaną etopozydem indukcję białka p21, którego nie stwierdzono w limfocytach T nietraktowanych związkiem cytotoksycznym.



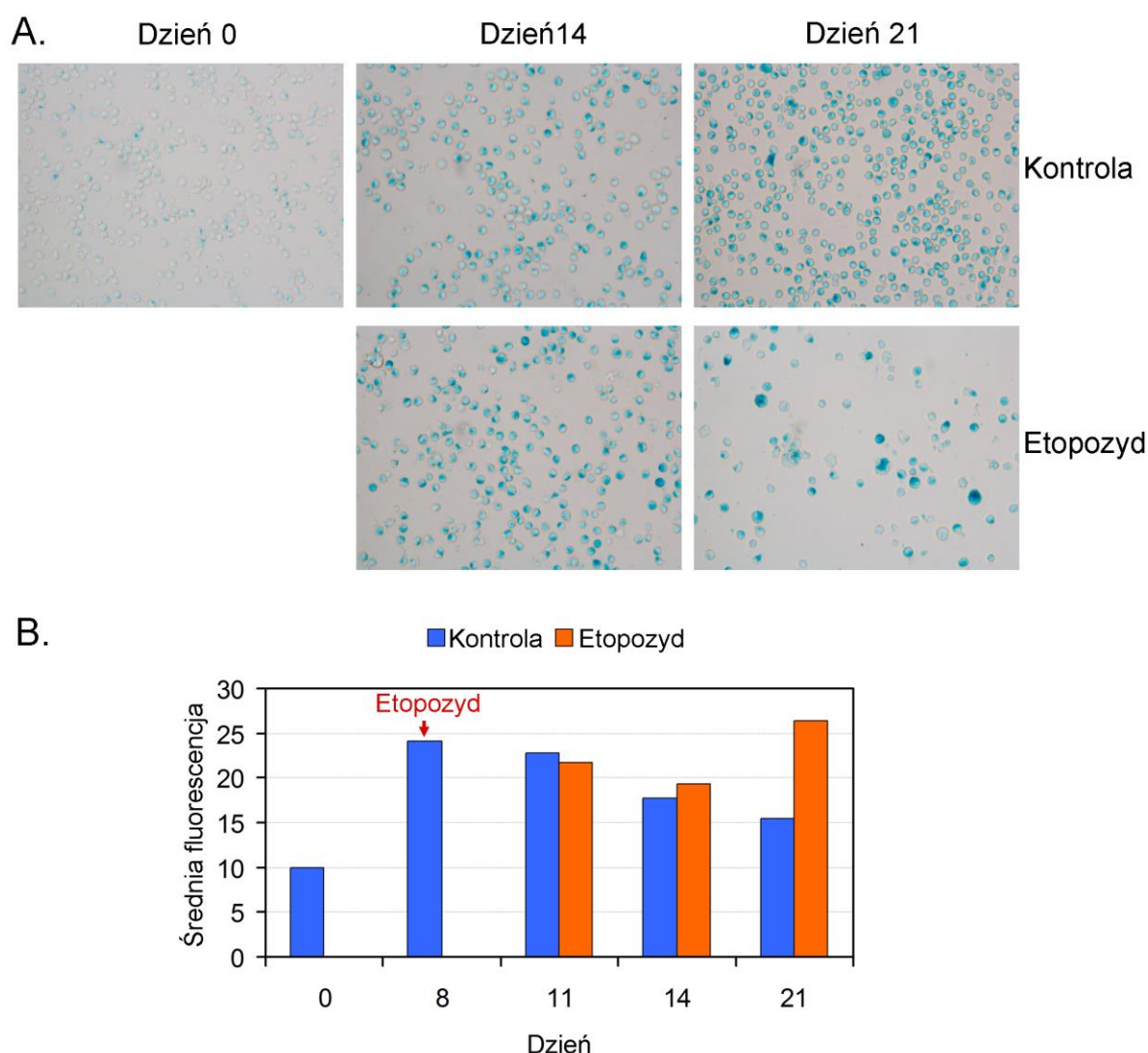
Rys. 5.31. Poziom białek szlaku DDR w aktywowanych limfocytach T traktowanych etopozydem. Aktywowane limfocyty T (dzień 8) traktowano 0,1 μ M etopozydem i po upływie 1, 3, 6 i 24 godzin badano poziom p-p53, γ H2AX oraz całkowitych białek p53 i p21. Kontrolę stanowią limfocyty z dnia 0 (spoczynkowe) i 8 hodowli.

Traktowanie aktywowanych limfocytów T etopozydem w stężeniu 0,1 μ M prowadziło do wzrostu poziomu kluczowych białek szlaku DDR, świadczących o jego aktywacji.

5.5.4. Aktywność SA- β -galaktozydazy w aktywowanych limfocytów T hodowanych w obecności etopozydu

Traktowanie aktywowanych limfocytów T 0,1 μ M etopozydem powodowało wzrost liczby uszkodzeń DNA. Prowadziło to do wzrostu poziomu białek związanych z aktywacją szlaku DDR, który następował wcześniej niż w komórkach nietraktowanych. Zaobserwowano indukcję białka p21, które uważane jest za jeden z markerów komórek starych. Postanowiono sprawdzić czy traktowanie etopozydem aktywowanych limfocytów T prowadzi do przyspieszonego starzenia.

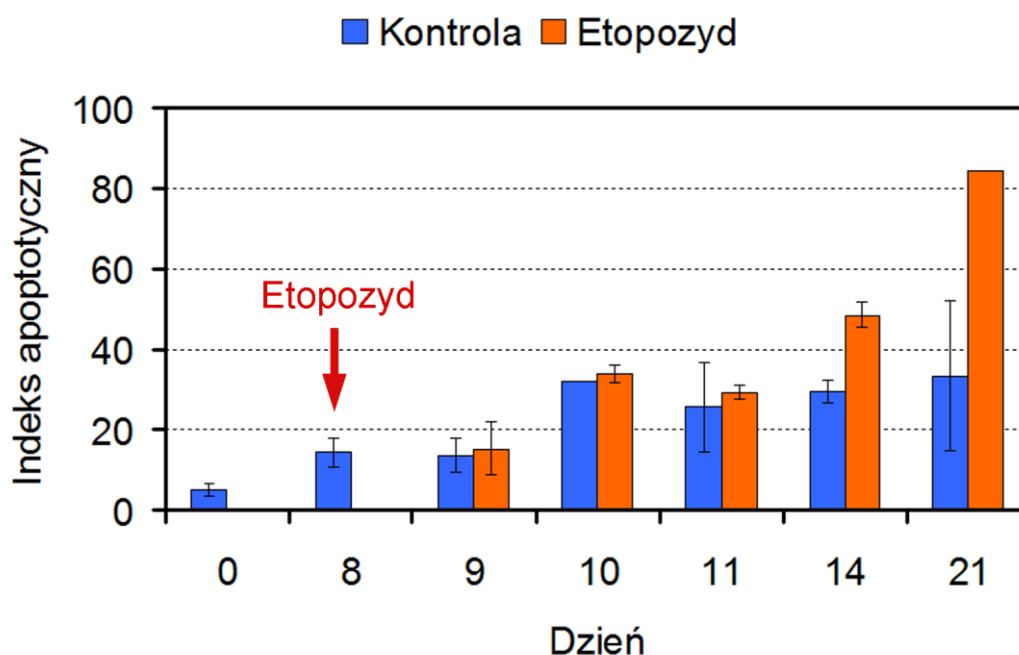
W tym celu zbadano aktywność SA- β -galaktozydazy. Rysunek 5.32A. pokazuje zdjęcia komórek o niebieskim zabarwieniu w poszczególnych dniach hodowli. W porównaniu do komórek spoczynkowych (dzień 0) w obu hodowlach obserwowano znaczący wzrost liczby komórek z aktywnym enzymem. Jednakże nie stwierdzono różnic wynikających z traktowania etopozydem. Analiza cytometryczna poziomu aktywności SA- β -galaktozydazy wykazała, że aktywność enzymu była podobna w obu typach hodowli w dniu 11 i 14. Natomiast po 13 dniach hodowli limfocytów T z etopozydem (dzień 21) zaobserwowano znaczny wzrost aktywności enzymu w stosunku do kontroli (komórki starzejące się replikacyjnie) (Rys. 5.32B.).



Rys. 5.32. Aktywność SA- β -galaktozydazy podczas starzenia replikacyjnego i SIPS. (A) Zdjęcia z mikroskopu świetlnego, na których niebieski kolor świadczy o aktywności SA- β -galaktozydazy. (B) Średnia fluorescencja SA- β -galaktozydazy w aktywowanych limfocytach T traktowanych 0,1 μ M etopozydem bądź nie, mierzona za pomocą cytometru przepływowego. (n=2)

5.5.5. Indeks apoptotyczny aktywowanych limfocytów T hodowanych w obecności etopozydu

Sprawdzono jak etopozyd wpływa na poziom śmierci aktywowanych limfocytów T (Rys. 5.33.). Zaprezentowane wcześniej wyniki, opisujące brak wzrostu śmiertelności aktywowanych limfocytów T traktowanych $0,1\mu\text{M}$ etopozydem względem kontroli po 24 godzinach od dodania związku cytotoksycznego, przedstawiają słupki w dniu 9. Indeks apoptotyczny utrzymywał się na podobnym poziomie w komórkach traktowanych i nietraktowanych etopozydem do dnia 11. Jednakże od dnia 14 (5 dni po dodaniu etopozydu) zaobserwowano znaczny wzrost poziomu śmierci komórek hodowanych z etopozydem (ok. 50%) w stosunku do komórek kontrolnych (30%). Natomiast w dniu 21 (13 dzień hodowli z etopozydem) poziom śmierci komórek hodowanych w obecności związku cytotoksycznego wynosił ponad 80%, podczas gdy dla komórek kontrolnych ok. 35%.

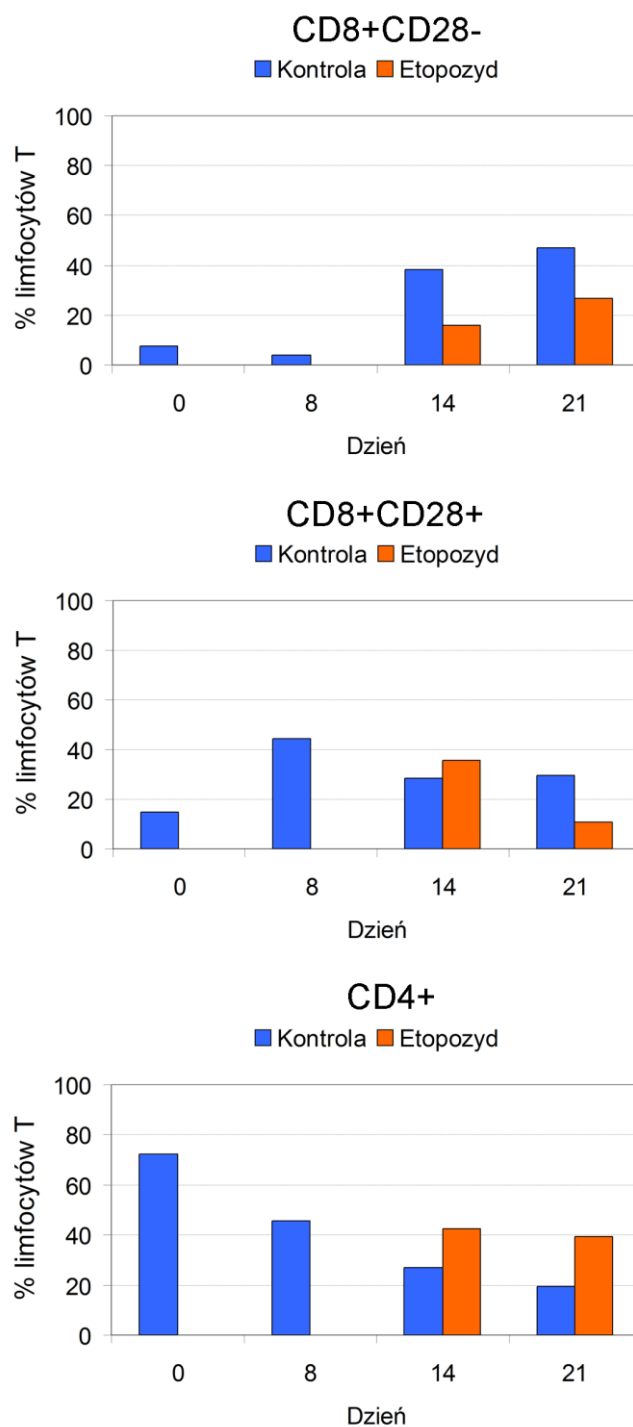


Rys. 5.33. Indeks apoptotyczny limfocytów T indukowanych do starzenia replikacyjnego *in vitro* hodowanych w obecności etopozydu. Aktywowane limfocyty T były hodowane w obecności $0,1\mu\text{M}$ etopozydu począwszy od dnia 8. Równoległe prowadzono hodowle limfocytów bez etopozydu. Słupki przedstawiają średnią uzyskaną z 2 doświadczeń ($\pm\text{SD}$).

Etopozyd w stężeniu $0,1\mu\text{M}$ nie powodował wzrostu poziomu śmierci aktywowanych limfocytów T w pierwszych trzech dniach hodowli. Jednakże w późniejszym czasie, kiedy powinny obserwowane być symptomy przyspieszonego starzenia, limfocyty traktowane etopozydem, w dużo wyższym stopniu niż komórki kontrolne ulegały apoptozie.

5.5.6. Udział procentowy subpopulacji limfocytów T podczas SIPS

Sprawdzono również wpływ etopozydu na udział procentowy subpopulacji limfocytów CD8+CD28⁻ i CD8+CD28⁺ w prowadzonych hodowlach limfocytów T. Jak widać na rysunku 5.34. w dniu 14 i 21, udział limfocytów T CD8+CD28⁻ był około dwa razy mniejszy w przypadku traktowania 0,1μM etopozydem niż w komórkach kontrolnych. W dniu 21 zaobserwowano również zmniejszenie puli komórek CD8+CD28⁺ w stosunku do komórek hodowanych bez etopozydu. Natomiast odsetek limfocytów T CD4⁺ był wyższy w komórkach hodowanych w obecności etopozydu. Bardzo duży poziom śmierci limfocytów traktowanych etopozydem w dniu 21 wpływa na oznaczenie fenotypu, dlatego suma poszczególnych populacji nie wynosi 100%.



Rys. 5.34. Wpływ etopozydu na udział procentowy subpopulacji CD8+CD28- i CD8+CD28+ oraz CD4+ w poszczególnych dniach hodowli. Słupki przedstawiają procent poszczególnych subpopulacji limfocytów T, badany w dniu izolacji (dzień 0), w dniu podania etopozydu (dzień 8) i kolejnych dniach hodowli 14, 21 (n=2).

Podsumowując uzyskane wstępne wyniki, nie można stwierdzić czy aktywowane limfocyty T hodowane w obecności etopozydu ulegają przyspieszonemu starzeniu. Etopozyd poprzez indukcję szlaku DDR prowadzi raczej do śmierci niż starzenia aktywowanych limfocytów T. Nie można jednak wykluczyć, że etopozyd prowadzi do przyspieszonego

starzenia limfocytów (wyższy poziom SA- β -galaktozydazy oraz liczba CD8+CD28-), które są bardziej wrażliwe na śmierć niż komórki niewykazujące symptomów starzenia. W celu weryfikacji postawionej hipotezy, niezbędne są dalsze doświadczenia.

6. Dyskusja

6.1. Etopozyd, jako związek indukujący uszkodzenia DNA i aktywację szlaku DDR, prowadzącego do apoptozy spoczynkowych limfocytów T

Celem niniejszej pracy było zbadanie mechanizmów śmierci i starzenia ludzkich limfocytów T (CD3+) pod wpływem uszkodzeń DNA. Na początku chcieliśmy zweryfikować hipotezę zakładającą, że ścieżka sygnalizacyjna odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR), która jest indukowana w komórkach proliferujących, może być też aktywowana w spoczynkowych limfocytach T. Komórki dzielące się są bardzo podatne na indukcję uszkodzeń DNA, ze względu na zachodzącą replikację DNA. Wykorzystane do doświadczeń limfocyty T, pochodzące od zdrowych dawców, są głównie komórkami dzielącymi się (określane jako post-mitotyczne), będącymi poza cyklem komórkowym w tak zwanej fazie G0. Mimo, że nie zachodzi w nich synteza DNA, są one komórkami transkrypcyjnie aktywnymi [114, 115], a indukcja uszkodzeń DNA może być wynikiem zakłócenia tego procesu. Badania przeprowadzone przez Sordet i wsp. [116] wykazały, że inhibitor topoiomerazy I – kamptotecyna, zakłócając transkrypcję, indukuje dwuniciowe uszkodzenia DNA oraz tworzenie skupisk białek charakterystycznych dla szlaku DDR (p-ATM, p-Chk2, 53BP1) w komórkach post-mitotycznych, takich jak neurony i komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC). Jednakże nie badali oni wpływu aktywacji ścieżki DDR na los komórki. Ponadto PBMC stanowią zbiór limfocytów T, B i NK oraz monocytów, a każdy rodzaj komórek może w różny sposób reagować na uszkodzenia DNA. Dlatego w niniejszej pracy postanowiono zbadać odpowiedź oczyszczonej populacji limfocytów T na uszkodzenia DNA.

W celu indukcji uszkodzeń DNA zastosowaliśmy powszechnie stosowany lek przeciwnowotworowy, etopozyd – inhibitor topoiomerazy II, enzymu wpływającego na zmianę topologii podwójnej helisy DNA. Mechanizm działania topoiomerazy II polega na zależnym od ATP cięciu obu nici DNA, co prowadzi do tworzenia przejściowych dwuniciowych uszkodzeń DNA, pozwalających na relaksację i rozwinięcie superhelisy. Jest to niezbędny etap w procesach takich jak: replikacja, transkrypcja, rekombinacja oraz przemodelowanie chromatyny. W komórkach ssaków występują dwie izoformy topoiomerazy II: Top2 α i Top2 β . Komórki proliferujące, w odróżnieniu od dzielących się, posiadają wysoki poziom Top2 α , która w głównej mierze odpowiedzialna jest za replikację, natomiast Top2 β związana jest z transkrypcją [117]. Ze względu na udział topoiomeraz w tych podstawowych procesach życiowych, stanowią one atrakcyjny cel dla leków

przeciwnotworowych. Etopozyd zaliczany jest do klasy trucizn topoizomerazy II, ponieważ powoduje stabilizację (przejściowego w normalnych warunkach) kompleksu Top2 z DNA, co zapobiega ponownemu połączeniu się przeciętej nici. Powstawanie dwuniciowych uszkodzeń DNA indukowanych etopozydem jest wynikiem dwóch procesów. Po pierwsze, stabilizacja kompleksu Top2:DNA może prowadzić do zatrzymania widełek replikacyjnych, bądź transkrypcji i powstawania DSB. Drugi mechanizm związany jest z proteosomalną degradacją enzymu zablokowanego w kompleksie Top2:DNA i uwolnieniu wolnych końców przeciętej nici DNA indukujących szlak DDR. Preferencyjnie degradacji ulega Top2 β , natomiast Top2 α usuwana jest w dużo mniejszym stopniu [118]. Etopozyd może również prowadzić do uszkodzeń DNA w sposób zależny od reaktywnych form tlenu. Zjawisko to obserwowane jest podczas syntezy DNA i nie występuje w komórkach spoczynkowych [119]. Biorąc pod uwagę efekt działania etopozydu, można powiedzieć, że czym wyższa jest aktywność topoizomerazy w komórce, tym związek ten jest bardziej toksyczny [120].

Wykazaliśmy, że etopozyd indukował uszkodzenia DNA w spoczynkowych limfocytach T oraz proliferujących komórkach linii Jurkat, co prowadziło do aktywacji szlaku DDR oraz apoptozy. Pomiar uszkodzeń DNA metodą FADU w krótkich czasach pozwala na zbadanie poziomu pierwotnych uszkodzeń indukowanych przez działanie związku, a nie powodowanych wtórnymi procesami, na przykład apoptozą. Etopozyd indukował uszkodzenia DNA już po kilku minutach i ich poziom nie zmieniał się w badanym czasie (10, 20 i 30 min), niezależnie od stosowanego stężenia.

Technika FADU pozwala na wykrywanie zarówno jednoniciowych jak i dwuniciowych uszkodzeń DNA. Wiadomo jednakże, że etopozyd nie powoduje jednoniciowych uszkodzeń (patrz poniżej). Natomiast DSB badano poprzez detekcję skupisk γ H2AX i 53BP1. Wokół DSB następuje fosforylacja seryny 139 histonu H2AX, która może objąć nawet do 1-2 mega par zasad, co osiągnęte jest w pierwszych 30 minutach po indukcji uszkodzeń. W spoczynkowych limfocytach T i komórkach linii Jurkat, począwszy od pierwszej godziny po traktowaniu etopozydem, obserwowano pojawianie się skupisk γ H2AX. Jest to zdarzenie zapoczątkowujące akumulację w miejscu uszkodzenia wielu różnorodnych białek zaangażowanych w przekazywanie sygnału o uszkodzeniach jak i naprawie DNA [44]. Jednym z nich jest 53BP1, którego skupiska również były indukowane etopozydem. Detekcja powyższych markerów DSB, świadczy o zapoczątkowaniu ścieżki przekazywania sygnału od uszkodzeń.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki doświadczeń, przeprowadzonych na spoczynkowych limfocytach T traktowanych etopozydem, wykazują brak fosforylacji seryny

317 białka Chk1, które jest substratem ATR, co pośrednio świadczy o braku aktywacji tej kinazy. Jest to zgodne z wynikami otrzymanymi przez Jones i wsp., którzy pokazali, że w dzielących się limfocytach, kinaza ATR jest nieaktywna [12]. Dwuniciowe uszkodzenia DNA, powstałe w wyniku blokady transkrypcji w limfocytach T, prowadziły do fosforylacji (aktywacji) seryny 1981 kinazy ATM oraz jej substratów Chk2 (Thr68) i p53 (Ser15), co sugeruje, że główną rolę w przekazywaniu sygnału indukowanego etopozydem odgrywa ATM. W przypadku dzielących się komórek linii Jurkat obserwowano aktywację obu głównych kinaz szlaku DDR (ATM i ATR), o czym świadczyła fosforylacja Chk2 i Chk1.

Uszkodzenia DNA powodowane przez etopozyd prowadziły do śmierci zarówno spoczynkowych limfocytów T jak i komórek linii Jurkat. Jednakże poziom apoptozy w komórkach proliferujących był znacznie wyższy, co przekładało się na silniejszą ekspresję jej markerów w tych komórkach. Wydaje się, że jest to związane z tym, że etopozyd hamuje tylko transkrypcję w limfocytach spoczynkowych, a w proliferujących transkrypcję oraz replikację.

W przypadku spoczynkowych limfocytów T etopozyd powodował śmierć około 40% populacji komórek po 48 godzinach. Proces ten wiązał się ekspozycją fosfatydyloseryny na powierzchni zewnętrznej błony komórkowej oraz aktywacją kaspaz szlaku wewnętrznego (-9 i-2) i zewnętrznego (-8) apoptozy, czego następstwem jest aktywacja kaspazy-3 i proteoliza białka PARP. Uszkodzenia DNA indukowane przez etopozyd prowadziły do aktywacji białka p53, co z kolei wiązało się z aktywacją białka BAX i pojawianiem się białka PUMA. Wraz z aktywacją kaspazy-9 świadczy to o aktywacji szlaku wewnętrznego apoptozy. Dodatkowo etopozyd prowadził również do aktywacji kaspazy-8. Jest ona typową kaspazą inicjatorową aktywowaną przez receptor śmierci CD95 w szlaku zewnętrznym apoptozy. Wiadomo również, że p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywującym ekspresję genu białka CD95. Jednakże badania Stahnke i wsp. [121] nie wykazały wzrostu poziomu CD95 w ludzkich limfocytach spoczynkowych traktowanych etopozydem. Również badania na limfocytach pochodzących od myszy transgenicznym wykazały, że apoptoza indukowana etopozydem była zależna od p53 i BCL-2, lecz niezależna od białka FADD [122]. Co więcej brak FADD lub nadekspresja c-FLIP nie blokowały proteolizy prokaspazy-8 indukowanej związkami cytotoksycznymi, co sugeruje inny, niezwiązany z receptorami śmierci mechanizm jej aktywacji [123]. Najprawdopodobniej proteoliza prokaspazy-8 jest następstwem zdarzeń zachodzących w wyniku aktywacji szlaku wewnętrznego i aktywacji kaspazy-3 [124]. Pojawiły się pewne doniesienia sugerujące również aktywację kaspazy-8 z udziałem kompleksu APAF-1 [125]. Liu i wsp. [126] pokazali, że aktywacja pod wpływem etopozydu

kaspazy-8 w komórkach nowotworowych jest następstwem aktywacji kaspazy-9 oraz kaspazy-3 i daje sygnał amplifikujący apoptozę. Badania przeprowadzone na komórkach nowotworowych wykazały istnienie jeszcze innego mechanizmu aktywacji kaspazy-8. Mianowicie, uszkodzenia DNA aktywując ATM, prowadzą do przebiegającej z udziałem kinazy RIP1 i kompleksu FADD jej aktywacji. W proces ten zaangażowany jest także czynnik transkrypcyjny NF- κ B [127]. Większość informacji przedstawionych powyżej była uzyskana w badaniach przeprowadzonych na komórkach nowotworowych, ale wydaje się, że podobne mechanizmy aktywacji kaspazy-8 mogą mieć miejsce również w prawidłowych limfocytach T.

Śmierć limfocytów T indukowana etopozydem, była związana również z aktywacją kaspazy-2, która może być aktywowana w kompleksie PIDD w wyniku indukcji uszkodzeń DNA i pełnić funkcję kaspazy inicjatorowej. Nie zaobserwowaliśmy proteolizy prokaspazy na wystarczająco wysokim poziomie, pozwalającym na wykrycie jej metodą Western blot po 24 godzinach. Jednakże obserwowany przy pomocy metody cytometrycznej znaczny wzrost liczby komórek z aktywną kaspazą-2 po 48h działania etopozydu sugeruje, że może ona być aktywowana wtórnie przez kaspazy efektorowe. W celu zbadania dokładnej funkcji kaspazy-8 i kaspazy-2 w spoczynkowych limfocytach T niezbędne są dalsze doświadczenia.

Etopozyd w stosowanym stężeniu 10 μ M był dużo bardziej cytotoksyczny dla proliferujących komórek linii Jurkat niż spoczynkowych limfocytów T. Po 48 godzinach indukował śmierć prawie wszystkich komórek linii Jurkat. Uszkodzenia w tych komórkach powstały nie tylko w wyniku hamowania transkrypcji, ale również syntezy DNA i ich poziom był dużo wyższy niż w spoczynkowych limfocytach T. Potwierdza to również większa liczba ognisk γ H2AX i 53BP1, wyższy poziom aktywacji kaspaz (-2, -9, -8 i -3) oraz masowa fragmentacja jąder komórkowych.

W przeprowadzonych w niniejszej pracy doświadczeniach, przekazywanie sygnału od uszkodzeń DNA do apoptozy wiązało się z indukcją i fosforylacją p53. Jednakże w literaturze pojawiają się sprzeczne informacje, co do obecności i funkcjonalności p53 w komórkach linii Jurkat (E.6.1). Jak pokazali Karpinac i wsp. [128-130] komórki linii Jurkat są pozbawione białka p53. Natomiast inni [131] donoszą o jego aktywności. W przypadku naszych doświadczeń, obserwowaliśmy indukcję oraz fosforylację p53, jednakże nie jesteśmy pewni czy przekładało się to na jego funkcjonalność. Aktywacji szlaku DDR nie towarzyszyła indukcja białka p21, którego czynnikiem transkrypcyjnym jest p53. W spoczynkowych limfocytach T również nie obserwowaliśmy indukcji p21, co wynika z faktu, że komórki te, jako dzielące się, są poza cyklem komórkowym. Natomiast w proliferujących komórkach

p21 jest niezbędne do zatrzymania cyklu w wyniku indukcji uszkodzeń DNA. Również nie zaobserwowaliśmy obecności białka proapoptotycznego BAX w komórkach linii Jurkat (dane niepokazane), co jest zgodne z obserwacjami innych badaczy [128]. Możemy przypuszczać, że posiadane przez nas komórki linii Jurkat mają niefunkcjonalne białko p53. Pomimo tego, uszkodzenia DNA prowadziły do aktywacji apoptozy związanej z aktywacją kaspaz szlaku wewnętrznego i zewnętrznego. Badania Karpinach i wsp. [128] wykazały, że śmierć komórek linii Jurkat indukowana etopozydem jest zależna od aktywacji białka p73, należącego do rodziny p53 i była związana z aktywacją ścieżki wewnętrznej. Natomiast aktywacja kaspazy-8 i prawdopodobnie również kaspazy-2 jest wynikiem działania kaspaz efektorowych.

Jak pokazują przedstawione w niniejszej pracy wyniki doświadczeń, etopozyd jest silnym induktorem śmierci proliferujących komórek nowotworowych. Jest to oczywiście wykorzystywane w leczeniu chorób nowotworowych. Jednakże związek ten nie pozostaje bez wpływu na inne komórki organizmu podczas terapii. Indukcji apoptozy powodowanej uszkodzeniami DNA również komórek dzielących się, takich jak spoczynkowe limfocyty T, należy spodziewać się jako skutku ubocznego klinicznego zastosowania etopozydu.

6.2. Inhibitor kinazy ATM – KU-55933 redukuje uszkodzenia DNA i apoptozę spoczynkowych limfocytów T traktowanych etopozydem

Przedstawione w tej pracy wyniki sugerują, że kinaza ATM odgrywa główną rolę w przekazywaniu sygnału od dwuniciowych uszkodzeń DNA w spoczynkowych limfocytach T. Postanowiono, zatem sprawdzić, co stanie się z limfocytami traktowanymi etopozydem, w których zostanie zablokowane działanie kinazy ATM. Mutacja w genie kodującym ATM prowadzi u ludzi do recesywnej, autosomalnej choroby genetycznej - zespołu ataksja-teleangiektazja, która charakteryzuje się takimi symptomami jak: ataksja mózdkowa, teleangiektazje (obecności poszerzonych drobnych naczyń krwionośnych) w obrębie skóry i gałki ocznej oraz niedobór immunologiczny, jak również predyspozycja do zmian nowotworowych (zwłaszcza białaczek i chłoniaków) oraz przedwczesne starzenie. Na poziomie komórkowym choroba ta charakteryzuje się wzmożoną wrażliwością komórek na promieniowanie jonizujące i leki radiomimetyczne. Komórki nie są zdolne do zatrzymania cyklu komórkowego z powodu dwuniciowych uszkodzeń DNA. Zmniejsza to możliwość naprawy uszkodzeń przed replikacją DNA i mitozą, co prowadzi może do niestabilności genomowej [132].

Natomiast w komórkach nowotworowych zahamowanie szlaku DDR uwrażliwia je na czynniki indukujące apoptozę inicjowaną uszkodzeniami DNA, co wykazano w badaniach przeprowadzonych na komórkach HeLa, raka piersi [132], raka prostaty [133]. Wiele inhibitorów szlaku DDR jest już w badaniach klinicznych jako wspomagające leczenie chorób nowotworowych [4]. Należą do nich inhibitory kinazy ATM, której również inhibitorem jest użyty w niniejszej pracy związek – KU-55933. Jest to silny i specyficzny inhibitor kinazy ATM. Mechanizm jego działania polega na kompetycyjnym względem ATP wiązaniu się z ATM [132].

Zaobserwowaliśmy, że zastosowanie KU-55933 hamowało indukowaną przez etopozyd fosforylację seryny 1981 kinazy ATM w spoczynkowych limfocytach T. Pomimo obecności uszkodzeń DNA (pomiar metodą FADU), nie obserwowano skupisk γ H2AX i 53BP1 oraz fosforylacji p53. Sordet i współ. [116] również obserwowali, że KU-55933 hamował akumulację charakterystycznych białek wokół uszkodzeń DNA w komórkach postmitotycznych traktowanych inhibitorem topoizomerazy I. W komórkach nowotworowych traktowanych związkami cytotoksycznymi lub naświetlanych promieniami gamma, także nie obserwowano symptomów aktywacji szlaku DDR po zastosowaniu inhibitora ATM [134]. Nie mniej blokowanie aktywności ATM uwrażliwiało komórki nowotworowe na apoptozę indukowaną czynnikami powodującymi DSB. Zupełnie odwrotny skutek blokowania szlaku DDR obserwowaliśmy w traktowanych etopozydem spoczynkowych limfocytach T. Mianowicie inhibitor ATM hamował indukowaną etopozydem apoptozę. Brak aktywacji p53 przekładał się na brak indukcji proapoptotycznego białka PUMA oraz obniżenie aktywacji kaspaz (-9, -8, -2 i -3). Otrzymane wyniki sugerują potencjalne, bardzo korzystne działanie inhibitora ATM w terapii przeciwnowotworowej. Mianowicie, stosowanie etopozydu i KU-55933, może selektywnie zabijać komórki nowotworowe i jednocześnie zapobiegać limfopenii powodowanej związkiem cytotoksycznym. Dodatkowo pozwalałoby na zmniejszenie dawki leku, która indukuje śmierć komórek nowotworowych.

Skąd wynika tak różna odpowiedź prawidłowych i nowotworowych komórek? Jednym z wytłumaczeń jest zakłócenie naprawy uszkodzeń DNA w komórkach traktowanych KU-55933. Kinaza ATM będąc głównym mediatorem sygnału DSB, zaangażowana jest również w ich naprawę. Bierze udział w HR oraz fosforyluje kinazę DNA-PKcs, która jest niezbędna do NHEJ [135]. Hamowanie aktywacji ATM prowadzi do wadliwej naprawy i aberracji chromosomowych, co skutkuje śmiercią komórki. White i wsp. [136] wykazali, że przejściowe blokowanie ATM prowadzi do powstawania nienaprawialnych uszkodzeń chromosomów w komórkach dzielących się. Powstawały one głównie podczas faz S i G2

cyklu komórkowego, co wskazuje na większą wrażliwość komórek dzielnych się na śmierć. Nie badali oni jednak mechanizmu śmierci komórek.

Jednakże Veuger i Durkacz [137] dowodzą, że głównym mechanizmem tego zjawiska jest blokowanie zależnej od kinazy ATM aktywacji NF- κ B, który promuje przeżycie komórki z uszkodzonym DNA [138]. Hamowanie aktywności kinazy ATM powodowało blokowanie aktywacji NF- κ B i prowadziło do apoptozy [137]. Ponieważ większość nowotworów, w przeciwieństwie do komórek spoczynkowych, charakteryzuje się podwyższoną aktywnością NF- κ B, hamowanie ATM prowadzi do uwrażliwienia komórek nowotworowych na śmierć indukowaną czynnikami cytotoksycznymi.

Badania przeprowadzone przez Li i Yanga [139] wykazały, że sam KU-55933 prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego i zablokowania proliferacji oraz indukcji apoptozy komórek nowotworowych. Proces ten był wynikiem hamowania zależnej od ATM ścieżki kinazy AKT, której wysoka aktywność obserwowana jest w komórkach nowotworowych. Natomiast brak wzrostu poziomu śmierci spoczynkowych limfocytów T traktowanych samym KU-55933 może być związany z niską aktywnością szlaku AKT w tych komórkach.

Jednak blokowanie kinazy ATM mimo pozytywnego ochronnego efektu przed śmiercią limfocytów T na skutek działania związku cytotoksycznego, może nieść również niepożądane skutki. KU-55933, chroniąc limfocyty T z uszkodzonym DNA przed apoptozą jednocześnie blokuje mechanizmy jego naprawy. NHEJ jest głównym mechanizmem naprawy DNA w komórkach w fazie G₀ i jest to proces zależny od kinazy DNA-PKcs, która aktywowana jest w wyniku fosforylacji przez ATM. Tworzenie skupisk γ H2AX i 53BP1 oraz ich współwystępowanie uznawane jest nie tylko jako marker dwuniciowego uszkodzenia DNA ale również początkowych etapów związanych z naprawą DNA. Zastosowanie KU-55933 nie tylko hamowało aktywację ATM i jej substratów, ale również naprawę uszkodzeń. Konsekwencją tego może być apoptoza w późniejszym czasie lub niestabilność genomowa, na przykład podczas aktywacji limfocytów antygenami. Aby odpowiedzieć na to pytanie potrzebne są dalsze badania.

Jak pokazują badania Stangi i wsp. [140], limfocyty pochodzące od osób chorych na A-T oraz immortalizowane mioblasty, traktowane KU-55933 były odporne na apoptozę indukowaną FASL. Było to związane z podwyższonym poziomem białka c-FLIP w komórkach z nieaktywną kinazą ATM. Wykazano również, że uszkodzenia DNA aktywując ATM prowadzą do obniżenia poziomu białka FLIP, co promuje śmierć indukowaną aktywacją receptorów śmierci. Zatem, blokowanie apoptozy zależnej od Fas, która jest

ważnym mechanizmem eliminacji aktywowanych limfocytów (AICD), może prowadzić do zaburzeń homeostazy układu odpornościowego i być przyczyną rozwoju białaczek oraz chłoniaków.

Z drugiej strony, jak wiadomo hamowanie ATM przez inhibitor kompetycyjny względem ATP jest przejściowe. Po usunięciu inhibitora ze środowiska komórki spoczynkowe będą mogły naprawić powstałe uszkodzenia. Tak, więc, potencjalne szkodliwe działanie inhibitora na komórki spoczynkowe, takie jak brak reperacji uszkodzeń DNA i hamowanie apoptozy, może mieć mniejsze znaczenie niż zysk w postaci skutecznej terapii przeciwnowotworowej.

6.3. Kurkumina indukuje śmierć spoczynkowych limfocytów T oraz komórek linii Jurkat w sposób nie zależny od uszkodzeń DNA

W kolejnych doświadczeniach skupiono się na badaniu wpływu kurkuminy na indukcję uszkodzeń DNA i aktywację szlaku DDR w spoczynkowych limfocytach T oraz komórkach linii Jurkat. Kurkumina jest naturalnym związkiem roślinnym o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym i jest przedmiotem zainteresowania Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia od wielu lat. Uzyskiwana jest z kłącza ostryżu długiego (*Curcuma longa*). Stosowana jest jako przyprawa w kuchni orientalnej (składnik przyprawy curry) oraz w przemyśle spożywczym jako barwnik (E100). Kurkumina od ponad 4000 lat jest stosowana w medycynie tradycyjnej Dalekiego Wschodu w leczeniu wielu dolegliwości: trudno gojących się ran, artretyzmu, gorączki, żółtaczki, schorzeń wątroby i układu trawiennego, chorób skóry czy depresji [141]. Intensywne badania *in vitro* i *in vivo* z ostatnich lat wykazały przeciwnowotworowe, antyseptyczne, przeciwreumatyczne, antyoksydacyjne, przeciwzapalne, antyproliferacyjne i proapoptotyczne właściwości kurkuminy, które mogą wywierać korzystny efekt w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, nowotworów, reumatoidalnego zapalenia stawów, alergii, przewlekłego zapalenia jelit, chorób autoimmunologicznych, cukrzycy, AIDS, astmy, chorób krążenia i wielu innych [142]. Kurkumina jest obecnie na etapie badań klinicznych jako związek przeciwnowotworowy oraz przeciw chorobie Alzheimera [143]. Plejotropowe właściwości kurkuminy są wynikiem jej działania na wiele różnorodnych białek i procesów komórkowych [144]. Do molekularnych celów kurkuminy, z którymi może oddziaływać bezpośrednio lub pośrednio, można zaliczyć: czynniki transkrypcyjne (NF- κ B, AP-1), czynniki wzrostu (VEGF), kinazy (AKT, MAPKs, mTOR), cytokiny pozapalne (TNF, IL-1, IL-6), cząsteczki

adhezyjne (ICAM-1, VCAM-1), białka związane z apoptozą (p53, BCL-X_L, BAX) i wiele innych (COX-2, HO-1) [141]. Różnorodny efekt wywoływany przez kurkuminę zależy od dawki oraz rodzaju traktowanych komórek. Często obserwuje się, że niskie dawki pomagają w przeżyciu i wzroście komórek, a wysokie działają antyproliferacyjnie bądź proapoptotycznie. Zjawisko dwufazowego działania jakiegoś czynnika nazwane zostało hormezą. W takim znaczeniu kurkumina jest hormetyną [145].

Czynnik transkrypcyjny NF-κB odgrywa główną rolę w wielu procesach wzrostowych, zapalnych oraz odpowiedzi odpornościowej. Przeciwnowotworowe właściwości kurkuminy są głównie skutkiem hamowania NF-κB, którego poziom jest podwyższony w komórkach nowotworowych. Natomiast uważa się, że komórki prawidłowe, w których aktywność NF-κB jest niska są mniej podatne na śmierć indukowaną kurkuminą [146]. Jednakże w badaniach *in vitro* prowadzonych na prawidłowych limfocytach, które bez stymulacji nie wykazują wysokiej aktywności NF-κB wykazano, że kurkumina jest także silnym induktorem śmierci [147, 148].

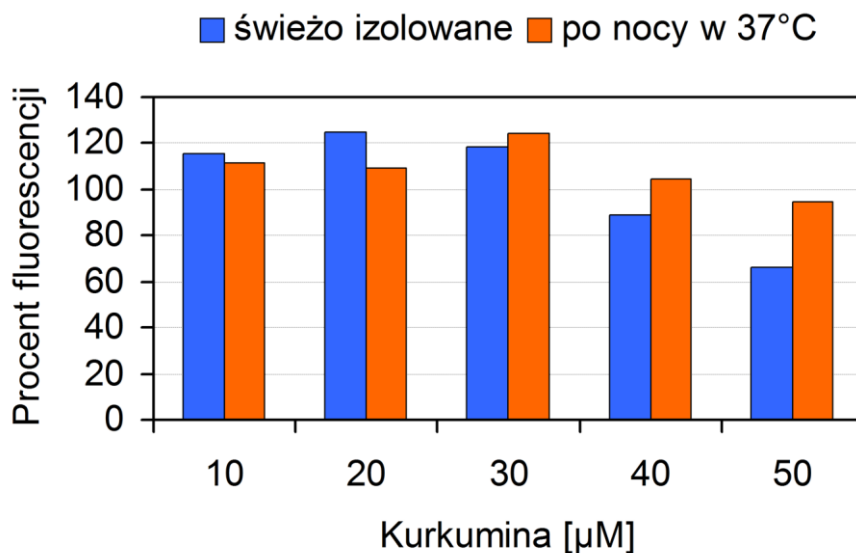
Przeprowadzone w niniejszej pracy doświadczenia wykazały praktycznie jednakową podatność na śmierć spoczynkowych limfocytów T i proliferujących komórek białaczkowych linii Jurkat. Poziom śmierci był podobny w obu typach komórek w przypadku wysokich i niskich stężeń kurkuminy. Również prawidłowe dojrzewające oocyty oraz wczesne mysie zarodki (brak aktywnego NF-κB) były podatne na śmierć indukowaną kurkuminą, co miało miejsce w wyniku zaburzeń wrzeciona podziałowego [149]. Śmierci komórek traktowanych kurkuminą w stężeniu 50μM nie towarzyszyła oligonukleosomalna degradacja DNA [150], co tłumaczy brak ciałek apoptotycznych w obserwowanych przez nas preparatach mikroskopowych.

Bazując na danych literaturowych mówiących o indukcji przez kurkuminę uszkodzeń DNA w ludzkich [113, 151] i mysich [152, 153] limfocytach, zbadaliśmy czy za śmierć tych komórek odpowiada aktywacja szlaku DDR. Jednakże przeprowadzone przez nas doświadczenia nie wykazały indukcji uszkodzeń DNA przez ten związek, zarówno w spoczynkowych limfocytach T jak i proliferujących komórkach linii Jurkat. Inni badacze opisujący indukcję uszkodzeń DNA przez kurkuminę, stosowali metodę elektroforezy pojedynczych komórek w żelu agarozowym – „kometki alkalicznej”. W skrócie, polega ona na osadzeniu komórek w żelu agarozowym, lizie komórek oraz rozwijaniu DNA (w miejscu uszkodzeń DNA) w warunkach alkalicznych (pH>13) i przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego. Powstałe w wyniku dwuniciowych uszkodzeń DNA fragmenty i rozluźnione nici DNA powstałe po lizie alkalicznej (w miejscu jednoniciowych uszkodzeń)

wydstają się z obszaru komórki i migrują w żelu tworząc tak zwany „ogon”. Następnie preparaty są neutralizowane, aby zakończyć etap lizy alkalicznej i DNA jest barwione. Długość i kształt „ogona” jest analizowana i świadczy o uszkodzeniach DNA. Metoda kometki uważana jest za bardzo czułą metodę, ponieważ analizowane są poszczególne komórki [154]. O ile procedura wydaje się być stosunkowo nieskomplikowana, istnieją jej pewne modyfikacje, które mogą być powodem rozbieżności w wynikach uzyskiwanych w różnych laboratoriach. Dlatego należy zwrócić baczną uwagę na standaryzację procedury [155]. W przeprowadzonych przez nas doświadczeniach zastosowaliśmy pomiar metodą FADU oraz detekcję skupisk γ H2AX i 53BP1. Podczas, gdy tworzenie skupisk γ H2AX i 53BP1 świadczy o DSB, metoda FADU pozwala na wykrycie również SSB. Procedura tej metody wykorzystuje takie same założenia jak metoda „kometki”. Polega na lizie komórek, a następnie rozwijaniu DNA w miejscach uszkodzeń w środowisku alkalicznym (pH 12,5) i neutralizacji. Natomiast do barwienia używany jest związek, który znakuje tylko dwuniciowe DNA. Etapy lizy komórek, rozwijania DNA, neutralizacji i barwienia DNA przeprowadzane są automatycznie, co znacznie zwiększa dokładność i powtarzalność metody. Dodatkowo w porównaniu do metody „kometki”, analizie poddawana jest bardzo duża liczba komórek. Oczywiście otrzymany wynik jest średnią dla całej populacji i nie jesteśmy w stanie analizować pojedynczych komórek. Naszym zdaniem jednak obserwowanie rozbieżności między wynikami uzyskanymi przez nas oraz przez innych badaczy, nie powinny wynikać z zastosowania różnych metod.

Doświadczenia, w których wykrywano uszkodzenia powodowane przez kurkuminę metodą „kometki” były prowadzone w puli limfocytów jednojądrzastych krwi, które stanowią heterogenną populację komórek (limfocytów T, B, NK, monocytów). Przeprowadzone przez nas doświadczenia były wykonane na oczyszczonej populacji limfocytów T. Niewykluczone, więc, że kurkumina nie indukuje uszkodzeń DNA w limfocytach T, ale innych komórkach frakcji komórek jednojądrzastych. Obecność tych populacji komórek w badaniach innych może być przyczyną obserwowanych różnic. Wykonaliśmy również pomiar uszkodzeń DNA w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) traktowanych kurkuminą. PBMC stosowane do pomiaru były badane od razu po izolacji lub pozostawione na noc w inkubatorze (rysunek 6.1. poniżej). Wyraźnie widać, że zwłaszcza w wysokich stężeniach (40 i 50 μ M) kurkumina indukuje więcej uszkodzeń zarówno w przypadku świeżo izolowanych jak i inkubowanych komórek. Ponadto wydaje się, że poziom uszkodzeń może być faktycznie wyższy w przypadku świeżo izolowanych komórek, ale było to tylko jedno doświadczenie i trudno jest wyciągać z niego jednoznaczne wnioski. Aczkolwiek, podobnych obserwacji

dotyczących ilość uszkodzeń DNA w świeżo izolowanych i hodowanych w inkubatorze PBMC traktowanych H_2O_2 , dokonał Colins i wsp. [156]. Autorzy tłumaczą ten efekt stresem powodowanym izolacją. Inkubacja natomiast pozwalała na naprawę uszkodzeń powodowanych tym stresem.



Rys. 6.1. Uszkodzenia DNA w PBMC traktowanych kurkumina mierzone metodą FADU. PBMC bezpośrednio po izolacji lub po całonocnej inkubacji w 37°C i 5%CO₂ traktowano kurkumina w różnych stężeniach (10-50µM). Poziom uszkodzeń mierzono po upływie 30 minut. Fluorescencja komórek traktowanych DMSO wynosi 100%.

Nasze pomiary były prowadzone na świeżo izolowanych limfocytach T i nie obserwowaliśmy w nich uszkodzeń DNA. Co więcej, nie obserwowaliśmy ich również w komórkach linii Jurkat. Badania przeprowadzone na dzielących się komórkach zarodka myszy [149] i komórkach mieloidalnych HL-60 [157] przeprowadzone innymi metodami, również nie wykazały indukcji pierwotnych uszkodzeń DNA. Możemy, więc śmiało wnioskować, że kurkumina nie indukuje uszkodzeń DNA w spoczynkowych limfocytach T oraz komórkach linii Jurkat, co zresztą potwierdziły dalsze nasze badania. Mianowicie, nie stwierdziliśmy aktywacji szlaku DDR (fosforylacji ATM i fosforylacji p53) w spoczynkowych limfocytach T i komórkach linii Jurkat traktowanych tym związkiem. Jednakże w spoczynkowych limfocytach T po 12 godzinach od dodania kurkuminy, zaobserwowano niewielki i przejściowy wzrost fosforylacji ATM. Wy tłumaczeniem tego zjawiska może być indukcja przez kurkumina stresu oksydacyjnego. Wykazano, że aktywacja ATM może zachodzić bez uszkodzeń DNA, właśnie na skutek wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu [158].

W komórkach linii Jurkat traktowanych kurkumina fosforylacji ulegała natomiast kinaza Chk2, która jest zwykle fosforylowana przez kinazę ATM. Ostatnio jednakże

wykazano, że kinaza Ckh2 może być fosforylowana podczas mitozy, bez obecności uszkodzeń DNA. Jej substratem, w tym przypadku jest białko BRCA1. Aktywacja tych białek ma chronić komórki przed niestabilnością chromosomową prowadzącą do katastrofy mitotycznej dzielących się komórek [159, 160]. Jak pokazują doświadczenia na komórkach linii HCW-2, kurkumina indukowała śmierć komórek, która była następstwem katastrofy mitotycznej [161]. Niewykluczone, że indukowana traktowaniem kurkumina komórek linii Jurkat fosforylacja Chk2 jest odpowiedzią, która prowadzi do zaburzeń wrzeciona podziałowego podczas podziałów, co w konsekwencji prowadzi do katastrofy mitotycznej. Aby zweryfikować tę sugestię należy przeprowadzić dodatkowe badania. Tym bardziej, że nieznaczną, niezależną od ATM fosforylację Chk2, obserwowaliśmy w spoczynkowych limfocytach T. W tym przypadku jednak nie można tego wytłumaczyć katastrofą mitotyczną, gdyż są to komórki dzielące się. Z drugiej jednak strony są dane, które pokazują, iż komórki post-mitotyczne, neurony wchodzi przed śmiercią w poronny cykl komórkowy [162].

Śmierć spoczynkowych limfocytów T i komórek linii Jurkat, indukowana 50μM kurkumina, związana była z aktywacją kaspazy-8 oraz kaspazy-3. Natomiast nie zaobserwowaliśmy aktywacji kaspazy-2 i kaspazy-9. Nie stwierdziliśmy także indukcji proapoptotycznego białka PUMA w limfocytach spoczynkowych traktowanych kurkumina (nie pokazano). Świadczy to o aktywacji zewnętrznego szlaku apoptozy przez kurkuminę, a nie wewnętrznego, który między innymi uruchamiany jest uszkodzeniami DNA. Aktywacja kaspazy-8 może następstwem powodowanej przez kurkuminę niezależnej od FASL agregacji receptora FAS [163]. Wykazano również, że kurkumina wpływa na śmierć komórkową poprzez obniżenie poziomu białek przeciwapoptotycznych: BCL-2, BCL-X_L, inhibitorów kaspaz IAPs oraz c-FLIP [164]. Większość przeciwapoptotycznych białek regulowana jest przez czynnik transkrypcyjny NF-κB, którego inhibitorem jest kurkumina. W przypadku komórek z aktywnym NF-κB jest to bardzo prawdopodobny mechanizm śmierci, jednakże, jeżeli chodzi o komórki spoczynkowe, już niekoniecznie. Jak pokazuje praca Hang i wsp. [165], c-FLIP chroni przed apoptozą również naiwne (nieproliferujące) limfocyty T, więc obniżenie jego poziomu przez kurkuminę może odgrywać rolę w śmierci tych komórek.

6.4. Rola szlaku DDR w starzeniu replikacyjnym limfocytów T *in vitro*

Starzenie układu odpornościowego człowieka charakteryzuje się inwolucją grasicy, spadkiem liczby limfocytów naiwnych, redukcją różnorodności repertuaru TCR oraz

akumulacją w pełni zróżnicowanych komórek pamięci i efektorowych. Następuje również zmniejszenie liczby pomocniczych limfocytów T CD4⁺ i zwiększenie udziału limfocytów T CD8⁺, a zwłaszcza pozbawionych cząsteczki CD28 zaangażowanej w aktywację limfocytów [102, 103]. Skutkuje to upośledzeniem odporności u osób starszych w stosunku do rozpoznawania nowych antygenów, co wiąże się wzrostem podatności na infekcję i rozwój nowotworów.

Opisane powyżej zachodzące z wiekiem zmiany są efektem powtarzających się cykli odpowiedzi odpornościowej na napotykanie podczas całego życia antygeny. Prowadzi to do wyczerpania potencjału replikacyjnego limfocytów i ich starzenia [166]. Limfocyty stare i w pełni zróżnicowane charakteryzują się obniżoną odpowiedzią proliferacyjną na patogeny, co prawdopodobnie związane jest z utratą pewnych cząsteczek powierzchniowych (CD28) [101].

W celu lepszego poznania zjawiska starzenia limfocytów T, wykorzystuje się badania *in vitro*. W tych doświadczeniach limfocyty stymuluje się kilkukrotnie mitogenem, co naśladuje wielokrotne infekcje podczas życia organizmu. Jednakże zwykle do tego typu badań stosuje się komórki jednojądrzaste (PBMC) stymulowane PHA. My natomiast wykorzystaliśmy do hodowli limfocyty T, których proces starzenia *in vivo* został najlepiej zbadany.

PHA jest niespecyficznym mitogenem, który powoduje aktywację limfocytów, co objawia się ekspresją CD69, CD25 i produkcją IL-2, która niezbędna jest do ich podziałów. Na powierzchni aktywowanych limfocytów pojawia się również cząsteczka CD95/FAS, zaangażowana w AICD [2]. Ponowna stymulacja mitogenem wiąże się z masową śmiercią aktywowanych limfocytów. Obserwowana przez nas apoptoza komórek po 48 godzinach po pierwszej stymulacji PHA, wynika z faktu, że wykorzystane do doświadczeń limfocyty T pochodziły od dawców w wieku 20-30 lat, u których część limfocytów miała już kontakt z antygenami i była podatna na AIDC. W modelu starzenia replikacyjnego stosowanym w niniejszej pracy, ze względu na dużą śmiertelność limfocytów powodowaną restymulacją, pomiaru parametrów związanych ze starzeniem dokonano przed kolejnymi stymulacjami PHA (dzień: 0, 14, 21, 28 i 35).

Hodowla *in vitro* stymulowanych limfocytów T (CD3⁺) w obecności IL-2 prowadziła do zmian ilościowych subpopulacji komórek, podobnych do obserwowanych podczas starzenia układu odpornościowego. Mianowicie, wraz z upływem czasu zmniejszał się udział limfocytów T CD4⁺, zwiększał się limfocytów T CD8⁺CD28⁻. Jest to zgodne wynikami badań nad starzeniem replikacyjnym *in vitro* PBMC [103, 167]. Cząsteczka CD28 jest receptorem powierzchniowym limfocytów T, który łączy się z cząsteczką B7 komórki

prezentującej antygen i stanowi dodatkowy sygnał kostymulujący, niezbędny do aktywacji naiwnych limfocytów. CD28 jest niezbędna do aktywacji produkcji IL-2 oraz zaangażowana jest w aktywację NF- κ B [168]. Osłabiona zdolności proliferacyjna limfocytów CD28- jest również wynikiem obecności krótkich telomerów w tych komórkach, co było obserwowane *in vitro* [104] i *in vivo* [169]. Limfocyty ulegające starzeniu *in vitro* CD8+CD28- tracą zdolność proliferacji, jednakże izolowane od dawców w podeszłym wieku i stymulowane mitogenem wykazywały zdolność do podziałów [170].

Jaki jest mechanizm indukujący starzenie limfocytów? Wiadomo, że skrócone telomery rozpoznawane są jako uszkodzenia DNA, co prowadzi do indukcji ścieżki p53-p21, skutkującej zatrzymaniem podziałów i starzeniem. Już jeden skrócony do krytycznej wartości telomer jest w stanie aktywować zatrzymanie podziałów [15]. Starzenie komórkowe może być indukowane nie tylko przez skracające się telomery, ale również przez stres. Jednym z nich jest również stres replikacyjny spowodowany intensywną proliferacją, co zaobserwowano podczas indukcji starzenia indukowanego onkogenami [171]. Zakładamy, że w przypadku limfocytów T stymulowanych niespecyficznym mitogenem, w wyniku silnej proliferacji komórek, dochodzi do stresu replikacyjnego indukującego uszkodzenia DNA, które akumulują się i stanowią obok skracania telomerów dodatkowy sygnał do starzenia. Jak wykazaliśmy, stymulacja PHA powodowała wzrost liczby skupisk γ H2AX w limfocytach już po 48 godzinach. W późniejszych dniach hodowli również wykrywaliśmy obecność skupisk, jednakże liczba komórek posiadających je malała. Po pierwsze jest to związane prawdopodobnie ze zmniejszaniem się zdolności do proliferacji limfocytów w trakcie hodowli, co wiąże się z kolei mniejszym stresem replikacyjnym powodowanym stymulacją. Po drugie rosła liczba komórek umierających, co również mogło wpłynąć na obserwowany obraz. Wykrywana obecność uszkodzeń DNA bardzo dobrze koreluje z obserwowanym profilem białek szlaku DDR. W 14 dniu fosforylacja kinazy ATM oraz Chk1, świadczącej o aktywacji ATR, malała w czasie i w 35 dniu prowadzonej hodowli praktycznie zanikała. Jak wykazano [79] kinaza ATM ulega degradacji podczas apoptozy. Natomiast, mimo spadku aktywności głównych kinaz ścieżki, poziom i fosforylacja p53 były wysokie do ostatnich dni hodowli, co może mieć związek nie tylko ze starzeniem, ale również śmiercią komórek.

Aktywacja szlaku DDR z jednej strony prowadziła do indukcji starzenia, o czym świadczy wzrost poziomu inhibitora cyklu komórkowego p21 oraz wzrostu aktywności SA- β -galaktozydazy, a z drugiej do apoptozy, której poziom zwiększał się wraz z czasem prowadzenia hodowli. W literaturze pojawiają się sprzeczne informacje na temat długości życia akumulujących się wraz z wiekiem w organizmie limfocytów T CD8+CD28-. Jedni

uważają je za komórki długo żyjące i odporne na apoptozę [172, 173], a inni wręcz przeciwnie [174, 175]. *In vitro* obserwowaliśmy wzrost poziomu śmierci stymulowanych limfocytów wraz z czasem prowadzenia hodowli. Prawdopodobnie jest to związane z warunkami hodowli komórkowej, gdzie głównym czynnikiem wzrostowym jest interleukina-2 (IL-2), na którą starzejące się limfocyty przestają być wrażliwe. Dodatkowo słabsza odpowiedź na stymulację mitogenem może wiązać się z obniżeniem poziomu białek przeciwapoptotycznych, a z drugiej strony aktywacją białek proapoptotycznych takich jak Bim, które jest zaangażowane w apoptozę na skutek braku cytokin [77]. Natomiast w organizmie limfocyty występują w odpowiednich niszach, gdzie otrzymują dodatkowe czynniki promujące przeżycie, na przykład IL-15 [176]. Jak pokazał Brunner i wsp. [177] IL-15 prowadziła do wzrostu poziomu antyapoptotycznego białka BCL-X_L w limfocytach T CD8+CD28-.

Stymulacja limfocytów T mitogenem prowadziła do indukcji uszkodzeń DNA, aktywacji szlaku DDR, czemu towarzyszyło pojawianie się markerów starzenia komórkowego (SA-β-galaktozydaza, p21). Jednakże rosnący odsetek komórek umierających może sugerować, że starzejące się limfocyty ulegały apoptozie wynikającej z warunków hodowli, co było również, obserwowane przez innych badaczy [51, 104]. Być może zmiana warunków hodowli (dodanie innych cytokin np.: IL-15) wpłynie na lepszą przeżywalność starzejących się komórek.

Wyniki naszych doświadczeń wykazały, że stres replikacyjny może wpływać na proces starzenia limfocytów T poprzez indukcję uszkodzeń DNA. Wskazują również na fakt, że starzenie limfocytów T *in vitro*, może w pewnych aspektach odbiegać od procesu starzenia *in vivo*. Do podobnego wniosku doszła również Brzezińska [178] na podstawie badań fenotypu i zdolności do proliferacji limfocytów CD8+CD28- badanych *in vitro* i *ex vivo*.

6.5. Starzenie aktywowanych limfocytów T indukowanych etopozydem

Jak wykazaliśmy, starzenie limfocytów T *in vitro* związane jest z uruchomieniem szlaku DDR, który może być aktywowany mitogenem. Zadaliśmy sobie następnie pytanie, czy traktowanie aktywowanych limfocytów związkiem uszkadzającym DNA będzie w stanie przyspieszyć proces starzenia tych komórek. Wiadomo, bowiem, że związki indukujące stres powodują SIPS (*stress induced premature senescence*) w wielu prawidłowych [179, 180] i nowotworowych komórkach [181]. Brak jest jednak danych na temat SIPS ludzkich limfocytów.

W przeprowadzonych przez nas wstępnych badaniach traktowaliśmy proliferujące limfocyty T 0,1 μM etopozydem. W limfocytach T obserwowaliśmy wzrost ognisk γH2AX po

dodaniu etopozydu. Prowadziło to do aktywacji p53 i indukcji p21 już po 24 godzinach. Jednocześnie nie obserwowaliśmy wzrostu indeksu apoptotycznego w tym czasie. W przypadku starzenia indukowanego stresem zatrzymanie podziałów i indukcja markerów starzenia następuje w ciągu kilku dni. W przypadku limfocytów T po 5 dniach hodowli z etopozydem obserwowaliśmy nieznaczny wzrost aktywności SA- β -galaktozydazy w komórkach (pomiar cytometryczny), ale wzrastała również liczba komórek apoptotycznych. Dodatkowo, w porównaniu do równolegle prowadzonej hodowli starzenia replikacyjnego limfocytów T, apoptoza wiązała się ze zmniejszeniem odsetka limfocytów CD8+CD28-, a zwiększeniem liczby limfocytów CD4+. Sugeruje to większą podatność limfocytów T CD8+CD28- na śmierć indukowaną uszkodzeniami DNA *in vitro*. Podobny efekt zaobserwowany był przez Brunner'a i wsp. [177] i tłumaczony jest zaburzeniami szlaku DDR i braku indukcji p21 w tej subpopulacji komórek. Dodanie do hodowli IL-15 hamowało śmierć limfocytów T CD8+CD28- indukowaną etopozydem [177]. Podobnie jak w przypadku starzenia replikacyjnego zmiana warunków hodowli, na takie, które lepiej oddają środowisko występujące w organizmie, pozwoliłaby na dokładniejsze zbadanie procesu przyspieszonego starzenia limfocytów T oraz udziału w nim uszkodzeń DNA.

Podsumowując, możemy wnioskować, że starzenie limfocytów T *in vitro* zarówno replikacyjne jak i prawdopodobnie przyspieszone (SIPS) ma związek z uszkodzeniami DNA indukowanymi w pierwszym przypadku stresem replikacyjnym, a w drugim przypadku etopozydem. Jednakże badanie procesu starzenia limfocytów T w hodowli jest trudne ze względu na fakt, że aktywacja limfocytów do podziału wiąże się z ich śmiercią (AICD). Ponadto, uszkodzenia DNA oraz następująca po nich aktywacja odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR) mogą prowadzić zarówno do starzenia komórkowego jak i apoptozy. Nasze badania są prekursorskie i mamy nadzieję dają początek dalszym badaniom w tej dziedzinie.

7. Podsumowanie i wnioski

- Etopozyd indukował uszkodzenia DNA oraz ścieżkę sygnalizacyjną DDR zarówno w spoczynkowych limfocytach T jak i komórkach linii Jurkat
- Aktywacja DDR w obu typach komórek prowadziła do kaspazo-zależnej apoptozy
- Poziom apoptozy był znacznie wyższy w komórkach linii Jurkat niż w spoczynkowych limfocytach T; wiąże się to z faktem hamowania przez etopozyd topoizomerazy II, aktywnej w limfocytach T tylko podczas transkrypcji a w komórkach linii Jurkat podczas transkrypcji i replikacji
- Zastosowanie inhibitora kinazy ATM blokowało aktywację szlaku DDR i apoptozę spoczynkowych limfocytów T

Inhibitor ATM niweluje szkodliwy efekt etopozydu, obserwowany w spoczynkowych limfocytach T w czasie dwóch dni od podania. Jednakże długofalowe skutki są trudne do przewidzenia, gdyż mogą objawiać się zarówno opóźnioną śmiercią limfocytów T, jak również naprawą DNA.

- Apoptoza indukowana przez kurkuminę w spoczynkowych limfocytach T i komórkach linii Jurkat nie była związana z indukcją uszkodzeń DNA i aktywacją szlaku DDR
- Kurkumina (50 μ M) powoduje w takim samym stopniu śmierć spoczynkowych limfocytów T jak i komórek linii Jurkat.
- Kurkumina powodowała śmierć obydwu typów komórek poprzez aktywację kaspazy-8 i -3, co sugeruje zaangażowania w ten proces szlaku zewnętrznego apoptozy.

Kurkumina uważana jest za związek w pełni bezpieczny. Może to być jednak związane z jej niską biodostępnością. Wysokie stężenie kurkuminy stosowane przez nas w badaniach *in vitro*, może być osiągnięte podczas iniekcji lub zastosowania nośników kurkuminy. W takim przypadku kurkumina może wykazywać cytotoksyczność w stosunku do limfocytów T, i niewykluczone, innych komórek prawidłowych, a nie tylko nowotworowych.

- Starzenie replikacyjne limfocytów T *in vitro*, indukowane kilkukrotną stymulacją mitogenem, było związane z indukcją uszkodzeń DNA
- Aktywacja szlaku DDR podczas starzenia replikacyjnego prowadziła również do śmierci limfocytów

- Indukcja uszkodzeń DNA etopozydem w proliferujących limfocytach T, prowadziła do ich opóźnionej apoptozy i niewykluczone, że również do przyspieszonego starzenia (SIPS).

Uszkodzenia DNA i szlak DDR odgrywają dużą rolę w śmierci i starzeniu ludzkich limfocytów T. Uważa się, że starzenie *in vitro* w pewnym stopniu odzwierciedla proces zachodzący *in vivo*. Tak więc, możemy przypuszczać, że podobne mechanizmy molekularne odgrywają rolę w starzeniu komórek układu odpornościowego.

8. Streszczenie

Wszystkie komórki żywych organizmów narażone są na uszkodzenia DNA powodowane czynnikami zarówno wewnętrznymi jak i zewnętrznymi. Uszkodzenia DNA w komórce są wykrywane przez tak zwane punkty kontroli (checkpoints), które działają w różnych fazach cyklu komórkowego powodując jego czasowe zatrzymanie umożliwiające naprawę lub permanentne zatrzymanie prowadzące zahamowania podziałów i starzenia komórkowego. Kiedy uszkodzenia są bardzo rozległe uruchamiany jest mechanizm śmierci komórkowej.

Starzenie komórkowe jest indukowane uszkodzeniami DNA generowanymi przez skracające się z każdym podziałem telomery. Jest to starzenie replikacyjne. Znane jest również starzenie przyspieszone, SIPS (*stress induced premature senescence*) indukowane uszkodzeniami w dowolnym miejscu DNA i przebiegające znacznie szybciej od starzenia replikacyjnego.

W niniejszej pracy podstawowym celem było badanie mechanizmów śmierci i starzenia ludzkich limfocytów T (CD3+) pod wpływem uszkodzeń DNA. W szczególności chcieliśmy zweryfikować hipotezę, zakładającą, że ścieżka sygnalizacyjna odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR), która jest indukowana w komórkach proliferujących, może być też aktywowana w limfocytach spoczynkowych. Drugim szczegółowym celem było zweryfikowanie hipotezy, że starzenie replikacyjne ludzkich limfocytów T *in vitro* jest powodowane stresem replikacyjnym indukowanym przez mitogen oraz, że uszkodzenia DNA indukowane etopozydem mogą prowadzić w proliferujących limfocytach T do przyspieszonego starzenia (SIPS).

Pierwszy etap pracy polegał na zbadaniu roli uszkodzeń DNA w śmierci spoczynkowych limfocytów T traktowanych: (i) etopozydem, który jest inhibitorem topoiizomerazy II i powszechnie stosowanym lekiem przeciwnowotworowym, lub (ii) kurkumina, która jest naturalnym związkiem roślinnym o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym i będącą przedmiotem naszego zainteresowania od wielu lat. W badaniach wykorzystaliśmy również dla porównania proliferujące komórki białaczki limfocytarnej linii Jurkat.

W obu typach komórek etopozyd indukował uszkodzenia DNA, jak wykazała analiza z zastosowaniem techniki FADU oraz detekcja skupisk γ H2AX i 53BP1 metodą immunocytochemiczną. Aktywacji ulegały także kluczowe białka szlaku DDR, takie jak ATM, Chk2 i p53. Następstwem tych zjawisk była śmierć traktowanych komórek zależna od

aktywacji kaspaz (-2, -9, -8 i -3). Spoczynkowe limfocyty T były około 2,5 razy mniej wrażliwe na śmierć i indukcję uszkodzeń DNA niż proliferujące komórki linii Jurkat. Zahamowanie szlaku DDR w komórkach nowotworowych uwrażliwia je na związki indukujące apoptozę poprzez uszkodzenia DNA. Wiele takich związków jest już w badaniach klinicznych, jako wspomagające leczenie nowotworu. Należą do nich inhibitory kinazy ATM. Zadaliśmy sobie, więc pytanie o efekt działania inhibitora ATM, KU-55933 na prawidłowe limfocyty spoczynkowe traktowane etopozydem. Otrzymane wyniki pokazują, że KU-55933 hamuje DDR natomiast pozostaje bez wpływu na uszkodzenia DNA. Co ciekawe KU-55933 hamuje również aktywację kaspaz i apoptozę, co może mieć korzystne działanie - zapobiegające limfopenii powodowanej etopozydem.

Kurkumina, w odróżnieniu od etopozydu nie indukowała uszkodzeń DNA i DDR zarówno w komórkach linii Jurkat jak i spoczynkowych limfocytach T, natomiast w obydwu typach komórek indukowała w takim samym stopniu apoptozę. Wyniki tych doświadczeń są różne od danych literaturowych mówiących o mniejszej wrażliwości na kurkuminę komórek prawidłowych w porównaniu z komórkami nowotworowymi, jak również danych sugerujących indukcję uszkodzeń DNA przez kurkuminę.

Badania dotyczące roli uszkodzeń DNA w starzeniu replikacyjnym oraz przyspieszonym prowadzono na limfocytach T stymulowanych w hodowli niespecyficznym mitogenem, PHA. Już po 14 dniach hodowli obserwowano uszkodzenia DNA oraz aktywację DDR jak również pojawianie się komórek z aktywną SA- β -galaktozydazą będącą powszechnym markerem starzenia komórkowego. Proces starzenia się limfocytów związany był też ze śmiercią komórek w hodowli oraz selekcją limfocytów CD8⁺CD28⁻. Traktowanie proliferujących limfocytów T etopozydem o niskim stężeniu (niepowodującym śmierci komórek w ciągu 24h) powodowało wzmocnienie ścieżki DDR, co przekładało się na indukcję apoptozy w późniejszym czasie, natomiast nie obserwowano wzmocnienia efektu starzenia komórkowego, który świadczyłby o zajściu SIPS.

Podsumowując, wykazano, że indukcja uszkodzeń DNA w spoczynkowych limfocytach T prowadzi do aktywacji szlaku DDR i apoptozy. Efekt ten może być zahamowany przez zastosowanie inhibitora kinazy ATM, blokującego ścieżkę odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Natomiast śmierć limfocytów T indukowana kurkuminą nie była związana z indukcją uszkodzeń DNA i aktywacją szlaku DDR. Stwierdzono również, że aktywacja mitogenem limfocytów T prowadziła do aktywacji ścieżki DDR dającej sygnał do starzenia komórkowego oraz apoptozy. Uszkodzenia DNA odgrywają bardzo ważną rolę w starzeniu i śmierci ludzkich limfocytów.

9. Bibliografia

1. Palmer, E., Negative selection-clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(5): p. 383-91.
2. Brenner, D., P.H. Krammer i R. Arnold, Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008. 66(1): p. 52-64.
3. Strasser, A., The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(3): p. 189-200.
4. Jackson, S.P. i J. Bartek, The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 2009. 461(7267): p. 1071-8.
5. d'Adda di Fagagna, F., Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(7): p. 512-22.
6. Ciccia, A. i S.J. Elledge, The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, 2010. 40(2): p. 179-204.
7. Sancar, A., L.A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz and S. Linn, Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 2004. 73: p. 39-85.
8. Gudkov, A.V. i E.A. Komarova, The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(2): p. 117-29.
9. Taylor, R.C., S.P. Cullen i S.J. Martin, Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(3): p. 231-41.
10. Clarke, P.R. i L.A. Allan, Cell-cycle control in the face of damage--a matter of life or death. *Trends Cell Biol*, 2009. 19(3): p. 89-98.
11. Rivera-Munoz, P., L. Malivert, S. Derdouch, C. Azerrad, V. Abramowski, P. Revy i J.P. Villartay, DNA repair and the immune system: From V(D)J recombination to aging lymphocytes. *Eur J Immunol*, 2007. 37 Suppl 1: p. S71-82.
12. Jones, G.G., P.M. Reaper, A.R. Pettitt i P.D. Sherrington, The ATR-p53 pathway is suppressed in noncycling normal and malignant lymphocytes. *Oncogene*, 2004. 23(10): p. 1911-21.
13. Hoeijmakers, J.H., DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*, 2009. 361(15): p. 1475-85.
14. Ljungman, M., The DNA damage response-repair or despair? *Environ Mol Mutagen*, 2010. 51(8-9): p. 879-89.

15. d'Adda di Fagagna, F., P.M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N.P. Carter i S.P. Jackson, A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 2003. 426(6963): p. 194-8.
16. Shiloh, Y., ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(3): p. 155-68.
17. Abraham, R.T., Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*, 2001. 15(17): p. 2177-96.
18. Stokes, M.P., J. Rush, J. Macneill, J.M. Ren, K. Sprott, J. Nardone, V. Yang, S.A. Beausoleil, S.P. Gygi, M. Livingstone, H. Zhang, R.D. Polakiewicz i M.J. Comb, Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(50): p. 19855-60.
19. Zou, L. i S.J. Elledge, Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, 2003. 300(5625): p. 1542-8.
20. Liang, Y., S.Y. Lin, F.C. Brunicardi, J. Goss i K. Li, DNA damage response pathways in tumor suppression and cancer treatment. *World J Surg*, 2009. 33(4): p. 661-6.
21. Neal, J.A. i K. Meek, Choosing the right path: does DNA-PK help make the decision? *Mutat Res*, 2011. 711(1-2): p. 73-86.
22. Haince, J.F., D. McDonald, A. Rodrigue, U. Dery, J.Y. Masson, M.J. Hendzel i G.G. Poirier, PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J Biol Chem*, 2008. 283(2): p. 1197-208.
23. Lee, J.H. i T.T. Paull, ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, 2005. 308(5721): p. 551-4.
24. Bakkenist, C.J. i M.B. Kastan, DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 2003. 421(6922): p. 499-506.
25. Lee, J.H. i T.T. Paull, Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science*, 2004. 304(5667): p. 93-6.
26. Dupre, A., L. Boyer-Chatenet i J. Gautier, Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Struct Mol Biol*, 2006. 13(5): p. 451-7.
27. Kozlov, S.V., M.E. Graham, C. Peng, P. Chen, P.J. Robinson i M.F. Lavin, Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J*, 2006. 25(15): p. 3504-14.

28. Daniel, J.A., M. Pellegrini, J.H. Lee, T.T. Paull, L. Feigenbaum i A. Nussenzweig, Multiple autophosphorylation sites are dispensable for murine ATM activation in vivo. *J Cell Biol*, 2008. 183(5): p. 777-83.
29. Roos, W.P. i B. Kaina, DNA damage-induced apoptosis: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett*, 2012.
30. Sun, Y., X. Jiang, S. Chen, N. Fernandes i B.D. Price, A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(37): p. 13182-7.
31. Flynn, R.L. i L. Zou, ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. *Trends Biochem Sci*, 2011. 36(3): p. 133-40.
32. Ward, I.M. i J. Chen, Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*, 2001. 276(51): p. 47759-62.
33. Parrilla-Castellar, E.R., S.J. Arlander i L. Karnitz, Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair (Amst)*, 2004. 3(8-9): p. 1009-14.
34. Kumagai, A., J. Lee, H.Y. Yoo i W.G. Dunphy, TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell*, 2006. 124(5): p. 943-55.
35. Rogakou, E.P., D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova i W.M. Bonner, DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 1998. 273(10): p. 5858-68.
36. Harper, J.W. i S.J. Elledge, The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*, 2007. 28(5): p. 739-45.
37. Xiao, A., H. Li, D. Shechter, S.H. Ahn, L.A. Fabrizio, H. Erdjument-Bromage, S. Ishibe-Murakami, B. Wang, P. Tempst, K. Hofmann, D.J. Patel, S.J. Elledge i C.D. Allis, WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature*, 2009. 457(7225): p. 57-62.
38. Stucki, M., Histone H2A.X Tyr142 phosphorylation: a novel sWItCH for apoptosis? *DNA Repair (Amst)*, 2009. 8(7): p. 873-6.
39. Polo, S.E. i S.P. Jackson, Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev*, 2011. 25(5): p. 409-33.
40. Lukas, J., C. Lukas i J. Bartek, More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol*, 2011. 13(10): p. 1161-9.

41. Celeste, A., O. Fernandez-Capetillo, M.J. Kruhlak, D.R. Pilch, D.W. Staudt, A. Lee, R.F. Bonner, W.M. Bonner i A. Nussenzweig, Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol*, 2003. 5(7): p. 675-9.
42. Kim, J.E., K. Minter-Dykhouse i J. Chen, Signaling networks controlled by the MRN complex and MDC1 during early DNA damage responses. *Mol Carcinog*, 2006. 45(6): p. 403-8.
43. Huen, M.S., R. Grant, I. Manke, K. Minn, X. Yu, M.B. Yaffe i J. Chen, RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell*, 2007. 131(5): p. 901-14.
44. Bonner, W.M., C.E. Redon, J.S. Dickey, A.J. Nakamura, O.A. Sedelnikova, S. Solier i Y. Pommier, GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(12): p. 957-67.
45. Stracker, T.H., T. Usui i J.H. Petrini, Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, 2009. 8(9): p. 1047-54.
46. Darzynkiewicz, Z., F. Traganos i D. Wlodkowic, Impaired DNA damage response--an Achilles' heel sensitizing cancer to chemotherapy and radiotherapy. *Eur J Pharmacol*, 2009. 625(1-3): p. 143-50.
47. Reinhardt, H.C. i M.B. Yaffe, Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. 21(2): p. 245-55.
48. Bartek, J. and J. Lukas, Chk1 i Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 2003. 3(5): p. 421-9.
49. Ahn, J., M. Urist i C. Prives, The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)*, 2004. 3(8-9): p. 1039-47.
50. Lane, D.P., Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 1992. 358(6381): p. 15-6.
51. Kruse, J.P. and W. Gu, Modes of p53 regulation. *Cell*, 2009. 137(4): p. 609-22.
52. Chakraborty, A., T. Uechi i N. Kenmochi, Guarding the 'translation apparatus': defective ribosome biogenesis and the p53 signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2011. 2(4): p. 507-22.
53. Tang, Y., J. Luo, W. Zhang i W. Gu, Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell*, 2006. 24(6): p. 827-39.

54. Sykes, S.M., H.S. Mellert, M.A. Holbert, K. Li, R. Marmorstein, W.S. Lane i S.B. McMahon, Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell*, 2006. 24(6): p. 841-51.
55. Zuckerman, V., K. Wolyniec, R.V. Sionov, S. Haupt i Y. Haupt, Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol*, 2009. 219(1): p. 3-15.
56. Bitomsky, N. i T.G. Hofmann, Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - roles of p53, p73 and HIPK2. *FEBS J*, 2009. 276(21): p. 6074-83.
57. Hu, H. i R.A. Gatti, MicroRNAs: new players in the DNA damage response. *J Mol Cell Biol*, 2011. 3(3): p. 151-8.
58. Jung, Y.S., Y. Qian i X. Chen, Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal*, 2010. 22(7): p. 1003-12.
59. Geng, Y., E.N. Eaton, M. Picon, J.M. Roberts, A.S. Lundberg, A. Gifford, C. Sardet i R.A. Weinberg, Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene*, 1996. 12(6): p. 1173-80.
60. Afshari, C.A., M.A. Nichols, Y. Xiong i M. Mudryj, A role for a p21-E2F interaction during senescence arrest of normal human fibroblasts. *Cell Growth Differ*, 1996. 7(8): p. 979-88.
61. Zhang, Y., N. Fujita i T. Tsuruo, Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene*, 1999. 18(5): p. 1131-8.
62. Roninson, I.B., Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett*, 2002. 179(1): p. 1-14.
63. Dotto, G.P., p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1471(1): p. M43-56.
64. Gartel, A.L., The conflicting roles of the cdk inhibitor p21(CIP1/WAF1) in apoptosis. *Leuk Res*, 2005. 29(11): p. 1237-8.
65. Abbas, T. i A. Dutta, p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(6): p. 400-14.
66. Jiricny, J., The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(5): p. 335-46.

67. David, S.S., V.L. O'Shea i S. Kundu, Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 2007. 447(7147): p. 941-50.
68. Friedberg, E.C., A. Aguilera, M. Gellert, P.C. Hanawalt, J.B. Hays, A.R. Lehmann, T. Lindahl, N. Lowndes, A. Sarasin i R.D. Wood, DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst)*, 2006. 5(8): p. 986-96.
69. Hoeijmakers, J.H., Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 2001. 411(6835): p. 366-74.
70. Loeb, L.A. i R.J. Monnat, Jr., DNA polymerases and human disease. *Nat Rev Genet*, 2008. 9(8): p. 594-604.
71. Lieber, M.R., The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem*, 2008. 283(1): p. 1-5.
72. San Filippo, J., P. Sung i H. Klein, Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem*, 2008. 77: p. 229-57.
73. Thornberry, N.A. i Y. Lazebnik, Caspases: enemies within. *Science*, 1998. 281(5381): p. 1312-6.
74. Olsson, M. and B. Zhivotovsky, Caspases and cancer. *Cell Death Differ*, 2011. 18(9): p. 1441-9.
75. Shi, Y., Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, 2002. 9(3): p. 459-70.
76. Baliga, B.C., S.H. Read i S. Kumar, The biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death Differ*, 2004. 11(11): p. 1234-41.
77. Krammer, P.H., R. Arnold i I.N. Lavrik, Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(7): p. 532-42.
78. Nagata, S., R. Hanayama i K. Kawane, Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell*, 2010. 140(5): p. 619-30.
79. Smith, G.C., F. d'Adda di Fagagna, N.D. Lakin i S.P. Jackson, Cleavage and inactivation of ATM during apoptosis. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(9): p. 6076-84.
80. Xu, G. i Y. Shi, Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res*, 2007. 17(9): p. 759-71.
81. Youle, R.J. i A. Strasser, The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(1): p. 47-59.
82. Kelly, P.N. i A. Strasser, The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ*, 2011. 18(9): p. 1414-24.

83. Hao, Z., G.S. Duncan, C.C. Chang, A. Elia, M. Fang, A. Wakeham, H. Okada, T. Calzascia, Y. Jang, A. You-Ten, W.C. Yeh, P. Ohashi, X. Wang i T.W. Mak, Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis. *Cell*, 2005. 121(4): p. 579-91.
84. Vaux, D.L., Apoptogenic factors released from mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1813(4): p. 546-50.
85. Krammer, P.H., CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 2000. 407(6805): p. 789-95.
86. Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J.L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L.E. French i J. Tschopp, Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 1997. 388(6638): p. 190-5.
87. Kataoka, T., R.C. Budd, N. Holler, M. Thome, F. Martinon, M. Irmeler, K. Burns, M. Hahne, N. Kennedy, M. Kovacovics i J. Tschopp, The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol*, 2000. 10(11): p. 640-8.
88. Micheau, O. i J. Tschopp, Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 2003. 114(2): p. 181-90.
89. Green, D.R., A. Oberst, C.P. Dillon, R. Weinlich i G.S. Salvesen, RIPK-dependent necrosis and its regulation by caspases: a mystery in five acts. *Mol Cell*, 2011. 44(1): p. 9-16.
90. Shi, M., C.J. Vivian, K.J. Lee, C. Ge, K. Morotomi-Yano, C. Manzl, F. Bock, S. Sato, C. Tomomori-Sato, R. Zhu, J.S. Haug, S.K. Swanson, M.P. Washburn, D.J. Chen, B.P. Chen, A. Villunger, L. Florens i C. Du, DNA-PKcs-PIDDosome: a nuclear caspase-2-activating complex with role in G2/M checkpoint maintenance. *Cell*, 2009. 136(3): p. 508-20.
91. Kumar, S., Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more? *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(12): p. 897-903.
92. Tischner, D., C. Woess, E. Ottina i A. Villunger, Bcl-2-regulated cell death signalling in the prevention of autoimmunity. *Cell Death Dis*, 2010. 1: p. e48.
93. Benczik, M. i S.L. Gaffen, The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunol Invest*, 2004. 33(2): p. 109-42.

94. Hayflick, L. i P.S. Moorhead, The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 1961. 25: p. 585-621.
95. Jeyapalan, J.C. i J.M. Sedivy, Cellular senescence and organismal aging. *Mech Ageing Dev*, 2008. 129(7-8): p. 467-74.
96. Campisi, J. i F. d'Adda di Fagagna, Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8(9): p. 729-40.
97. Nakamura, A.J., Y.J. Chiang, K.S. Hathcock, I. Horikawa, O.A. Sedelnikova, R.J. Hodes i W.M. Bonner, Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics Chromatin*, 2008. 1(1): p. 6.
98. von Zglinicki, T., G. Saretzki, J. Ladhoff, F. d'Adda di Fagagna i S.P. Jackson, Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev*, 2005. 126(1): p. 111-7.
99. Rodier, F. i J. Campisi, Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*, 2011. 192(4): p. 547-56.
100. Sikora, E., T. Arendt, M. Bennett i M. Narita, Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev*, 2011. 10(1): p. 146-52.
101. Derhovanessian, E., R. Solana, A. Larbi i G. Pawelec, Immunity, ageing and cancer. *Immun Ageing*, 2008. 5: p. 11.
102. Effros, R.B., Replicative senescence of CD8 T cells: effect on human ageing. *Exp Gerontol*, 2004. 39(4): p. 517-24.
103. Brzezinska, A., A. Magalska i E. Sikora, Proliferation of CD8+ in culture of human T cells derived from peripheral blood of adult donors and cord blood of newborns. *Mech Ageing Dev*, 2003. 124(4): p. 379-87.
104. Chebel, A., S. Bauwens, L.M. Gerland, A. Belleville, I. Urbanowicz, A.R. de Climens, Y. Tournour, W.W. Chien, R. Catallo, G. Salles, E. Gilson i M. Ffrench, Telomere uncapping during in vitro T-lymphocyte senescence. *Aging Cell*, 2009. 8(1): p. 52-64.
105. Kruhlak, M., E.E. Crouch, M. Orlov, C. Montano, S.A. Gorski, A. Nussenzweig, T. Misteli, R.D. Phair i R. Casellas, The ATM repair pathway inhibits RNA polymerase I transcription in response to chromosome breaks. *Nature*, 2007. 447(7145): p. 730-4.
106. Dimri, G.P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith i et al., A biomarker that identifies senescent

- human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(20): p. 9363-7.
107. Kurz, E.U., P. Douglas i S.P. Lees-Miller, Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 2004. 279(51): p. 53272-81.
108. Moreno-Villanueva, M., R. Pfeiffer, T. Sindlinger, A. Leake, M. Muller, T.B. Kirkwood i A. Burkle, A modified and automated version of the 'Fluorimetric Detection of Alkaline DNA Unwinding' method to quantify formation and repair of DNA strand breaks. *BMC Biotechnol*, 2009. 9: p. 39.
109. Schonh, I., J. Hennesen i D.C. Dartsch, Cellular responses to etoposide: cell death despite cell cycle arrest and repair of DNA damage. *Apoptosis*, 2010. 15(2): p. 162-72.
110. Tanaka, T., X. Huang, H.D. Halicka, H. Zhao, F. Traganos, A.P. Albino, W. Dai i Z. Darzynkiewicz, Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry A*, 2007. 71(9): p. 648-61.
111. Solier, S. i Y. Pommier, The apoptotic ring: a novel entity with phosphorylated histones H2AX and H2B and activated DNA damage response kinases. *Cell Cycle*, 2009. 8(12): p. 1853-9.
112. Sordet, O., A.J. Nakamura, C.E. Redon i Y. Pommier, DNA double-strand breaks and ATM activation by transcription-blocking DNA lesions. *Cell Cycle*, 2010. 9(2): p. 274-8.
113. Blasiak, J., A. Trzeciak, E. Malecka-Panas, J. Drzewoski, T. Iwanienko, I. Szumiel i M. Wojewodzka, DNA damage and repair in human lymphocytes and gastric mucosa cells exposed to chromium and curcumin. *Teratog Carcinog Mutagen*, 1999. 19(1): p. 19-31.
114. Smith, A.E., C. Chronis, M. Christodoulakis, S.J. Orr, N.C. Lea, N.A. Twine, A. Bhinge, G.J. Mufti i N.S. Thomas, Epigenetics of human T cells during the G0-->G1 transition. *Genome Res*, 2009. 19(8): p. 1325-37.
115. Zhang W, D.J., Qu Y, Hu H, Lin M, Datta A, Larson A, Liu GE i Li B, <Genomic expression analysis by single-cell mRNA differential display of quiescent CD8 T cells from tumour-infiltrating lymphocytes obtained from in vivo liver tumours.pdf>. 2008.

116. Sordet, O., C.E. Redon, J. Guirouilh-Barbat, S. Smith, S. Solier, C. Douarre, C. Conti, A.J. Nakamura, B.B. Das, E. Nicolas, K.W. Kohn, W.M. Bonner i Y. Pommier, Ataxia telangiectasia mutated activation by transcription- and topoisomerase I-induced DNA double-strand breaks. *EMBO Rep*, 2009. 10(8): p. 887-93.
117. Nitiss, J.L., DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(5): p. 327-37.
118. Nitiss, J.L., Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(5): p. 338-50.
119. Zhao, H., P. Rybak, J. Dobrucki, F. Traganos i Z. Darzynkiewicz, Relationship of DNA damage signaling to DNA replication following treatment with DNA topoisomerase inhibitors camptothecin/topotecan, mitoxantrone, or etoposide. *Cytometry A*, 2012. 81(1): p. 45-51.
120. Jeyapalan, J., A. Leake, S. Ahmed, G. Saretzki, M. Tilby i T. von Zglinicki, The role of telomeres in Etoposide induced tumor cell death. *Cell Cycle*, 2004. 3(9): p. 1169-76.
121. Stahnke, K., S. Fulda, C. Friesen, G. Strauss i K.M. Debatin, Activation of apoptosis pathways in peripheral blood lymphocytes by in vivo chemotherapy. *Blood*, 2001. 98(10): p. 3066-73.
122. Newton, K. i A. Strasser, Ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of Fas or FADD/MORT1 signaling. Implications for cancer therapy. *J Exp Med*, 2000. 191(1): p. 195-200.
123. Wang, P., J.H. Song, D.K. Song, J. Zhang i C. Hao, Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis. *Cell Signal*, 2006. 18(9): p. 1528-35.
124. Wieder, T., F. Essmann, A. Prokop, K. Schmelz, K. Schulze-Osthoff, R. Beyaert, B. Dorken i P.T. Daniel, Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood*, 2001. 97(5): p. 1378-87.
125. de Vries, J.F., L.J. Wammes, I. Jedema, L. van Dreunen, B.A. Nijmeijer, M.H. Heemskerk, R. Willemze, J.H. Falkenburg i R.M. Barge, Involvement of caspase-8 in chemotherapy-induced apoptosis of patient derived leukemia cell lines independent of the death receptor pathway and downstream from mitochondria. *Apoptosis*, 2007. 12(1): p. 181-93.

126. Liu, J., H. Uematsu, N. Tsuchida i M.A. Ikeda, Essential role of caspase-8 in p53/p73-dependent apoptosis induced by etoposide in head and neck carcinoma cells. *Mol Cancer*, 2011. 10: p. 95.
127. Biton, S. i A. Ashkenazi, NEMO and RIP1 control cell fate in response to extensive DNA damage via TNF-alpha feedforward signaling. *Cell*, 2011. 145(1): p. 92-103.
128. Karpinich, N.O., M. Tafani, T. Schneider, M.A. Russo i J.L. Farber, The course of etoposide-induced apoptosis in Jurkat cells lacking p53 and Bax. *J Cell Physiol*, 2006. 208(1): p. 55-63.
129. Lopez-Royuela, N., P. Perez-Galan, P. Galan-Malo, V.J. Yuste, A. Anel, S.A. Susin, J. Naval i I. Marzo, Different contribution of BH3-only proteins and caspases to doxorubicin-induced apoptosis in p53-deficient leukemia cells. *Biochem Pharmacol*, 2010. 79(12): p. 1746-58.
130. Verbrugge, I., C. Maas, M. Heijkoop, M. Verheij i J. Borst, Radiation and anticancer drugs can facilitate mitochondrial bypass by CD95/Fas via c-FLIP downregulation. *Cell Death Differ*, 2010. 17(3): p. 551-61.
131. Mansilla, S., W. Priebe i J. Portugal, Transcriptional changes facilitate mitotic catastrophe in tumour cells that contain functional p53. *Eur J Pharmacol*, 2006. 540(1-3): p. 34-45.
132. Hickson, I., Y. Zhao, C.J. Richardson, S.J. Green, N.M. Martin, A.I. Orr, P.M. Reaper, S.P. Jackson, N.J. Curtin i G.C. Smith, Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res*, 2004. 64(24): p. 9152-9.
133. Shaheen, F.S., P. Znojek, A. Fisher, M. Webster, R. Plummer, L. Gaughan, G.C. Smith, H.Y. Leung, N.J. Curtin i C.N. Robson, Targeting the DNA double strand break repair machinery in prostate cancer. *PLoS One*, 2011. 6(5): p. e20311.
134. Cowell, I.G., B.W. Durkacz i M.J. Tilby, Sensitization of breast carcinoma cells to ionizing radiation by small molecule inhibitors of DNA-dependent protein kinase and ataxia telangiectasia mutated. *Biochem Pharmacol*, 2005. 71(1-2): p. 13-20.
135. Xue, L., D. Yu, Y. Furusawa, R. Okayasu, J. Tong, J. Cao i S. Fan, Regulation of ATM in DNA double strand break repair accounts for the radiosensitivity in human cells exposed to high linear energy transfer ionizing radiation. *Mutat Res*, 2009. 670(1-2): p. 15-23.
136. White, J.S., S. Choi i C.J. Bakkenist, Irreversible chromosome damage accumulates rapidly in the absence of ATM kinase activity. *Cell Cycle*, 2008. 7(9): p. 1277-84.

137. Veuger, S.J. i B.W. Durkacz, Persistence of unrepaired DNA double strand breaks caused by inhibition of ATM does not lead to radio-sensitisation in the absence of NF-kappaB activation. *DNA Repair (Amst)*, 2011. 10(2): p. 235-44.
138. Habraken, Y. i J. Piette, NF-kappaB activation by double-strand breaks. *Biochem Pharmacol*, 2006. 72(9): p. 1132-41.
139. Li, Y. i D.Q. Yang, The ATM inhibitor KU-55933 suppresses cell proliferation and induces apoptosis by blocking Akt in cancer cells with overactivated Akt. *Mol Cancer Ther*, 2010. 9(1): p. 113-25.
140. Stagni, V., M.G. di Bari, S. Cursi, I. Condo, M.T. Cencioni, R. Testi, Y. Lerenthal, E. Cundari i D. Barila, ATM kinase activity modulates Fas sensitivity through the regulation of FLIP in lymphoid cells. *Blood*, 2008. 111(2): p. 829-37.
141. Zhou, H., C.S. Beevers i S. Huang, The targets of curcumin. *Curr Drug Targets*, 2011. 12(3): p. 332-47.
142. Sikora-Polaczek, M., A. Bielak-Zmijewska i E. Sikora, [Molecular and cellular mechanisms of curcumin action--beneficial effect on organism]. *Postepy Biochem*, 2011. 57(1): p. 74-84.
143. Singh, S., From exotic spice to modern drug? *Cell*, 2007. 130(5): p. 765-8.
144. Sikora, E., A. Bielak-Zmijewska, G. Mosieniak i K. Piwocka, The promise of slow down ageing may come from curcumin. *Curr Pharm Des*, 2010. 16(7): p. 884-92.
145. Salvioli, S., E. Sikora, E.L. Cooper i C. Franceschi, Curcumin in cell death processes: a challenge for CAM of age-related pathologies. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2007. 4(2): p. 181-90.
146. Ravindran, J., S. Prasad i B.B. Aggarwal, Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *AAPS J*, 2009. 11(3): p. 495-510.
147. Sikora, E., A. Bielak-Zmijewska, K. Piwocka, J. Skierski i E. Radziszewska, Inhibition of proliferation and apoptosis of human and rat T lymphocytes by curcumin, a curry pigment. *Biochem Pharmacol*, 1997. 54(8): p. 899-907.
148. Magalska, A., A. Brzezinska, A. Bielak-Zmijewska, K. Piwocka, G. Mosieniak i E. Sikora, Curcumin induces cell death without oligonucleosomal DNA fragmentation in quiescent and proliferating human CD8+ cells. *Acta Biochim Pol*, 2006. 53(3): p. 531-8.
149. Bielak-Zmijewska, A., M. Sikora-Polaczek, K. Nieznanski, G. Mosieniak, A. Kolano, M. Maleszewski, J. Styrna i E. Sikora, Curcumin disrupts meiotic and

- mitotic divisions via spindle impairment and inhibition of CDK1 activity. *Cell Prolif*, 2010. 43(4): p. 354-64.
150. Sikora, E., A. Bielak-Zmijewska, A. Magalska, K. Piwocka, G. Mosieniak, M. Kalinowska, P. Widlak, I.A. Cymerman i J.M. Bujnicki, Curcumin induces caspase-3-dependent apoptotic pathway but inhibits DNA fragmentation factor 40/caspase-activated DNase endonuclease in human Jurkat cells. *Mol Cancer Ther*, 2006. 5(4): p. 927-34.
151. Blasiak, J., A. Trzeciak i J. Kowalik, Curcumin damages DNA in human gastric mucosa cells and lymphocytes. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 1999. 18(4): p. 271-6.
152. Corona-Rivera, A., P. Urbina-Cano, L. Bobadilla-Morales, J. Vargas-Lares Jde, M.A. Ramirez-Herrera, M.L. Mendoza-Magaua, R. Troyo-Sanroman, P. Diaz-Esquivel i J.R. Corona-Rivera, Protective in vivo effect of curcumin on copper genotoxicity evaluated by comet and micronucleus assays. *J Appl Genet*, 2007. 48(4): p. 389-96.
153. Urbina-Cano, P., L. Bobadilla-Morales, M.A. Ramirez-Herrera, J.R. Corona-Rivera, M.L. Mendoza-Magana, R. Troyo-Sanroman i A. Corona-Rivera, DNA damage in mouse lymphocytes exposed to curcumin and copper. *J Appl Genet*, 2006. 47(4): p. 377-82.
154. Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice i E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 1988. 175(1): p. 184-91.
155. Forchhammer, L., C. Johansson, S. Loft, L. Moller, R.W. Godschalk, S.A. Langie, G.D. Jones, R.W. Kwok, A.R. Collins, A. Azqueta, D.H. Phillips, O. Sozeri, M. Stepnik, J. Palus, U. Vogel, H. Wallin, M.N. Routledge, C. Handforth, A. Allione, G. Matullo, J.P. Teixeira, S. Costa, P. Riso, M. Porrini i P. Moller, Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial. *Mutagenesis*, 2010. 25(2): p. 113-23.
156. Torbergesen, A.C. i A.R. Collins, Recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage; the apparent enhancement of DNA repair by carotenoids is probably simply an antioxidant effect. *Eur J Nutr*, 2000. 39(2): p. 80-5.
157. Mosieniak, G., M. Sliwinska, K. Piwocka i E. Sikora, Curcumin abolishes apoptosis resistance of calcitriol-differentiated HL-60 cells. *FEBS Lett*, 2006. 580(19): p. 4653-60.

158. Guo, Z., S. Kozlov, M.F. Lavin, M.D. Person i T.T. Paull, ATM activation by oxidative stress. *Science*, 2010. 330(6003): p. 517-21.
159. Stolz, A., N. Ertych, A. Kienitz, C. Vogel, V. Schneider, B. Fritz, R. Jacob, G. Dittmar, W. Weichert, I. Petersen i H. Bastians, The CHK2-BRCA1 tumour suppressor pathway ensures chromosomal stability in human somatic cells. *Nat Cell Biol*, 2010. 12(5): p. 492-9.
160. Castedo, M., J.L. Perfettini, T. Roumier, K. Yakushijin, D. Horne, R. Medema i G. Kroemer, The cell cycle checkpoint kinase Chk2 is a negative regulator of mitotic catastrophe. *Oncogene*, 2004. 23(25): p. 4353-61.
161. Magalska, A., M. Sliwinska, J. Szczepanowska, S. Salvioli, C. Franceschi i E. Sikora, Resistance to apoptosis of HCW-2 cells can be overcome by curcumin- or vincristine-induced mitotic catastrophe. *Int J Cancer*, 2006. 119(8): p. 1811-8.
162. Tian, B., Q. Yang i Z. Mao, Phosphorylation of ATM by Cdk5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death. *Nat Cell Biol*, 2009. 11(2): p. 211-8.
163. Bush, J.A., K.J. Cheung, Jr. i G. Li, Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp Cell Res*, 2001. 271(2): p. 305-14.
164. Prakobwong, S., S.C. Gupta, J.H. Kim, B. Sung, P. Pinlaor, Y. Hiraku, S. Wongkham, B. Sripa, S. Pinlaor i B.B. Aggarwal, Curcumin suppresses proliferation and induces apoptosis in human biliary cancer cells through modulation of multiple cell signaling pathways. *Carcinogenesis*, 2011. 32(9): p. 1372-80.
165. Zhang, N., K. Hopkins i Y.W. He, c-FLIP protects mature T lymphocytes from TCR-mediated killing. *J Immunol*, 2008. 181(8): p. 5368-73.
166. Papagno, L., C.A. Spina, A. Marchant, M. Salio, N. Rufer, S. Little, T. Dong, G. Chesney, A. Waters, P. Easterbrook, P.R. Dunbar, D. Shepherd, V. Cerundolo, V. Emery, P. Griffiths, C. Conlon, A.J. McMichael, D.D. Richman, S.L. Rowland-Jones i V. Appay, Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. *PLoS Biol*, 2004. 2(2): p. E20.
167. Effros, R.B., N. Boucher, V. Porter, X. Zhu, C. Spaulding, R.L. Walford, M. Kronenberg, D. Cohen i F. Schachter, Decline in CD28+ T cells in centenarians and in long-term T cell cultures: a possible cause for both in vivo and in vitro immunosenescence. *Exp Gerontol*, 1994. 29(6): p. 601-9.
168. Rudd, C.E., A. Taylor i H. Schneider, CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev*, 2009. 229(1): p. 12-26.

169. Effros, R.B., R. Allsopp, C.P. Chiu, M.A. Hausner, K. Hirji, L. Wang, C.B. Harley, B. Villeponteau, M.D. West i J.V. Giorgi, Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS*, 1996. 10(8): p. F17-22.
170. Brzezinska, A., A. Magalska, A. Szybinska i E. Sikora, Proliferation and apoptosis of human CD8(+)CD28(+) and CD8(+)CD28(-) lymphocytes during aging. *Exp Gerontol*, 2004. 39(4): p. 539-44.
171. Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P.G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P.G. Pelicci i F. d'Adda di Fagagna, Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, 2006. 444(7119): p. 638-42.
172. Wallace, D.L., J.E. Masters, C.M. De Lara, S.M. Henson, A. Worth, Y. Zhang, S.R. Kumar, P.C. Beverley, A.N. Akbar i D.C. Macallan, Human cytomegalovirus-specific CD8(+) T-cell expansions contain long-lived cells that retain functional capacity in both young and elderly subjects. *Immunology*, 2011. 132(1): p. 27-38.
173. Spaulding, C., W. Guo i R.B. Effros, Resistance to apoptosis in human CD8+ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Exp Gerontol*, 1999. 34(5): p. 633-44.
174. Dennett, N.S., R.N. Barcia i J.D. McLeod, Age associated decline in CD25 and CD28 expression correlate with an increased susceptibility to CD95 mediated apoptosis in T cells. *Exp Gerontol*, 2002. 37(2-3): p. 271-83.
175. Pan, C., B.H. Xue, T.M. Ellis, D.J. Peace i M.O. Diaz, Changes in telomerase activity and telomere length during human T lymphocyte senescence. *Exp Cell Res*, 1997. 231(2): p. 346-53.
176. Herndler-Brandstetter, D., K. Landgraf, B. Jenewein, A. Tzankov, R. Brunauer, S. Brunner, W. Parson, F. Kloss, R. Gassner, G. Lepperdinger i B. Grubeck-Loebenstein, Human bone marrow hosts polyfunctional memory CD4+ and CD8+ T cells with close contact to IL-15-producing cells. *J Immunol*, 2011. 186(12): p. 6965-71.
177. Brunner, S., D. Herndler-Brandstetter, C.R. Arnold, G.J. Wieggers, A. Villunger, M. Hackl, J. Grillari, M. Moreno-Villanueva, A. Burkle i B. Grubeck-Loebenstein, Upregulation of miR-24 is associated with a decreased DNA damage response upon etoposide treatment in highly differentiated CD8(+) T cells sensitizing them to apoptotic cell death. *Aging Cell*, 2012.

178. Brzezinska, A., Does in vitro replicative senescence of human CD8+ cells reflect the phenotypic changes observed during in vivo ageing? *Acta Biochim Pol*, 2005. 52(4): p. 931-5.
179. Goligorsky, M.S., J. Chen i S. Patschan, Stress-induced premature senescence of endothelial cells: a perilous state between recovery and point of no return. *Curr Opin Hematol*, 2009. 16(3): p. 215-9.
180. Toussaint, O., P. Dumont, J.F. Dierick, T. Pascal, C. Fripiat, F. Chainiaux, J.P. Magalhaes, F. Eliaers i J. Remacle, Stress-induced premature senescence as alternative toxicological method for testing the long-term effects of molecules under development in the industry. *Biogerontology*, 2000. 1(2): p. 179-83.
181. Sliwinska, M.A., G. Mosieniak, K. Wolanin, A. Babik, K. Piwocka, A. Magalska, J. Szczepanowska, J. Fronk i E. Sikora, Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mech Ageing Dev*, 2009. 130(1-2): p. 24-32.