

histonu H2A.Z. Może to być związane z destabilizacją chromatyny, z ekspansją regionów heterochromatycznych i może powodować wyciszenie genów supresorowych.

nowych i może powodować wyciszenie genów supresorowych.

E. KOMÓRKI NOWOTWOROWE STEM (CSC)

1. WŁASNOŚCI KOMÓREK CSC

a. Komórki nowotworu

Nowotwór stanowi zazwyczaj heterogenną pod względem składu komórkowego tkankę, która zawiera zarówno komórki nowotworowe, jak i nienowotworowe – komórki układu naczyń krwionośnych, komórki systemu immunologicznego i tkanki łącznej (które zazwyczaj różnią się funkcjonalnie od takich komórek w zdrowych tkankach).

Cechami charakterystycznymi dla komórek nowotworowych są:

- samowystarczalność w produkcji czynników wzrostu z nadmierną stymulacją proliferacji,
- brak reakcji na faktory hamujące wzrost,
- zdolność do nieskończonej samoodnowy (immortalizacja),
- aktywna neoangiogeneza,
- reprogramowanie metaboliczne, zwłaszcza aktywacja glikolizy nawet w normalnych warunkach tlenowych (glikoliza aerobowa),
- uwolnienie się od nadzoru immunologicznego,
- utrata lub ograniczenie stanu zróżnicowania,
- uszkodzenie mechanizmu apoptozy,
- zdolność do inwazji sąsiednich tkanek i do tworzenia odległych przerzutów,
- zdolność do tworzenia przeszczepów do immunoniekompetentnych zwierząt.

Komórki nowotworowe nie są jednorodne i dzielą się na komórki podobne do komórek stem prawidłowych tkanek dorosłych (CSC) i komórki „nowotworowe częściowo zróżnicowane” (nowotworowe niebędące komórkami stem).

Istnienie komórek nowotworowych typu stem było postulowane przez istniejącą od ponad stu lat teorię hierarchiczną nowotworów, która zakłada, że nowotwór jest karykaturą prawidłowej tkanki i tak jak każda prawidłowa tkanka składa się z komórek stem, z proliferujących komórek uwarunkowanych i z komórek zróżnicowanych, z tym że wszystkie te komórki są nieprawidłowe.

Wiele badań potwierdza istnienie i przedstawia pewną charakterystykę komórek CSC:

- W tkankach nowotworowych opisano komórki mało aktywne proliferacyjnie i posiadające zdolność do podziałów asymetrycznych.

- Te spoczynkowe komórki są stosunkowo odporne na chemioterapię i radioterapię.
- Komórki CSC po uszkodzeniu genotoksycznym inicjują autofagię lub wchodzą w stan senescencji, mogą przetrwać stres i naprawiać uszkodzenia DNA.
- Liczba i morfologia komórek CSC zależy od typu nowotworu. W raku piersi nabłonkowe komórki typu stem (**Ep-CSC**) stanowią około 6% komórek nowotworowych.
- Immunofenotyp komórek CSC zależy od rodzaju komórek. Komórki epitelialne stem (**Ep-CSC**) są: CD49⁺ (integryna), EpCAM⁺, Aldh1A3⁺/Aldh1⁺ (dehydrogenaza aldehydowa) dodatnie. Komórki mezenchymalne stem (**Mes-CSC**) są: EpCAM⁺, CD49⁺, CD44⁺ i CD24^{-/lo}.

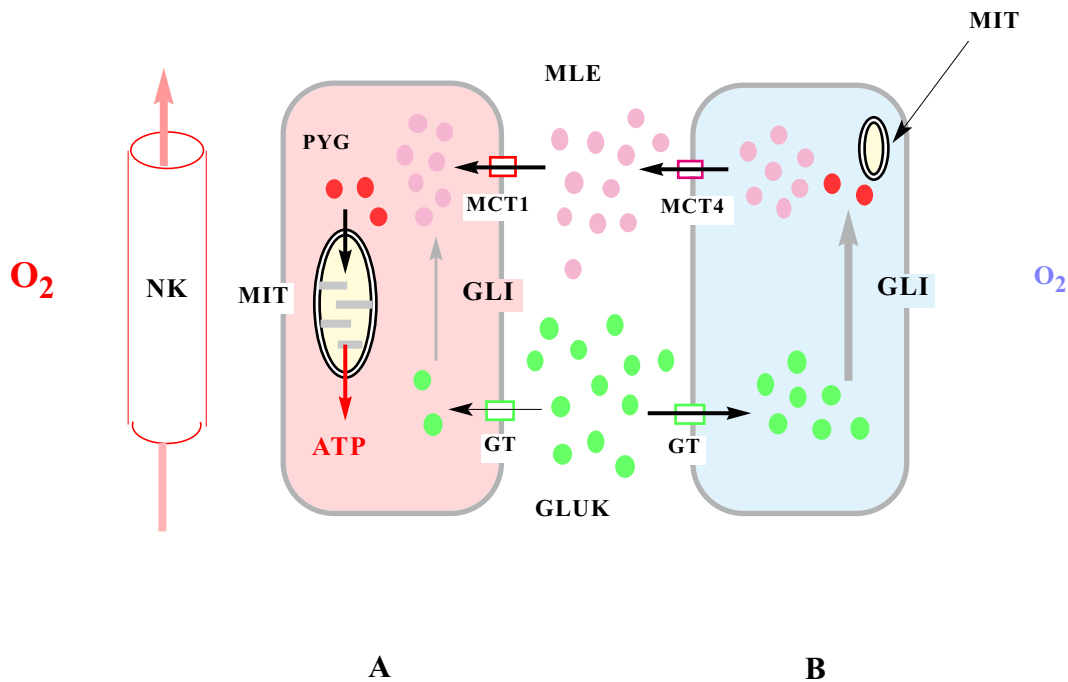
- Komórki CSC wykazują ekspresję genów stanu stem, genów embrionalnych, w tym też genów komórek ESC, pewnych genów meiotycznych i CTA (antygenów nowotworowo-jądrowych).
- Komórki CSC mają dużą zdolność repopulacji nowotworu w organizmach immunoniekompetentnych myszy. Do przeszczepu nowotworu wystarcza około 100 komórek EpCAM⁺, CD44⁺, CD24^{-/lo} ludzkiego raka piersi, ale aż 50 000 niesegregowanych komórek nowotworu. Te eksperymenty bardzo silnie potwierdzają istnienie komórek macierzystych nowotworu.

Podobne komórki opisano w białaczkach, rakach jajnika, płuc, jelita grubego, tarczycy, w mięsakach i glejakach. Liczba komórek CSC i ich własności zależą od rodzaju nowotworu, od jego stanu czynnościowego i od warunków środowiska (w tym od ciśnienia parcjalnego tlenu).

b. Metabolizm energetyczny komórek CSC

Początkowo sądzono, że charakterystyczną cechą metabolizmu komórek nowotworowych jest bardzo aktywna glikoliza przy bardzo silnym zahamowaniu oksydatywnej fosforylacji (**efekt Warburga**).

Komórki nowotworowe zużywają duże ilości glukozy i syntetyzują bardzo dużo kwasu mlekowego. Jednak późniejsze badania Weinhouse wykazały, że komórki nowotworowe wykazują aktywną oksydacyjną fosforylację, ale tylko przy wysokim poziomie NAD⁺ i przy zwiększonej ilości glukozy w środowisku. W zwykłych warunkach tkankowych komórki



Rys. 27. Kooperacja „różnicowanych” komórek nowotworowych (glikolitycznych) i komórek korzystających z oksydatywnej fosforylacji.

(A) – komórki korzystające z oksydatywnej fosforylacji, (B) – komórki korzystające z glikolizy, (GLI) – glikoliza, (MIT) – mitochondria, (NK) – naczynia krwionośne. (GLUK) – glukoza, (GT) – transporter glukozy Slc2A1.p/Glut1.p, (MCT1) – importer mleczanu Mct1.p, (MCT4) – eksporter mleczanu Mct4.p, (MLE) – mleczan, (PYG) – pirogronian.

Pewna rozbieżność oceny metabolizmu komórek CSC może wynikać z różnorodności tych komórek w jednym nowotworze. W raku piersi obecne są dwa typy tych komórek w zależności od ciśnienia parcjalnego tlenu.

Pierwszym typem są opisane powyżej komórki mezenchymalne stem (Mes-CSC). Takie komórki stem w warunkach tlenowych są zależne od oksydatywnej fosforylacji, mają bardzo niską glikolizę, odwrotny efekt Warburga i są komórkami spoczynkowymi. Powstają z komórek nabłonkowych na drodze przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT). W warunkach hipoksji korzystają z glikolizy. Stają się komórkami migrującymi i odgrywają ważną rolę w tworzeniu przerzutów.

Drugim typem są komórki epitelialne stem (Epi-CSC). Są to silnie proliferujące komórki ze zdolnością do inwazji miejscowej. Mają złożony fenotyp, w warunkach beztlenowych wykazują wysoką glikolizę, w warunkach tlenowych bardzo aktywną oksydacyjną fosforylację. Powstają z komórek Mes-CSC na

drodze MET (przejścia mezenchymalno-nabłonkowego). Są odporne na działanie metforminy.

Metabolizm energetyczny różnych komórek nowotworowych przedstawia rys. 26.

Jest także możliwe, że w tkance nowotworowej komórki zależne od oksydatywnej fosforylacji i od glikolizy mogą przechodzić w siebie nawzajem zależnie od lokalnego ciśnienia parcjalnego tlenu. Komórki te stale kooperują ze sobą i wspomagają wzajemnie swój metabolizm (rys. 27).

Komórki glikolityczne zwiększają ekspresję białka eksportera mleczanu Mct4.p i importera glukozy Slc2A1.p/Glut1.p. Mitochondria tych komórek ulegają redukcji. Komórki zależne od oksydatywnej fosforylacji mają niską ekspresję importera glukozy, ale bardzo wysoką importera mleczanu Mct1.p. Komórki te wykazują fenotyp podobny nieco do komórek Epi-CSC raka piersi.

c. Glikoliza i OXPHOS w CSC

Komórki CSC różnią się także od komórek stem tkanek dorosłego organizmu (ASC). W warunkach beztlenowych zarówno komórki ASC, jak i CSC są glikolityczne. W warunkach tlenowych komórki ASC pozostają glikolityczne, ale CSC efektywnie inicjują oksydacyjną fosforylację. Pod tym względem komórki CSC przypominają wczesne komórki embrionalne stem (ESC). Innym podobieństwem jest zdolność do nieskończonej samoodnowy obu typów komórek ESC i CSC.

Inna różnica w metabolizmie energetycznym dotyczy komórek zróżnicowanych w normie i w nowotworach. Komórki prawidłowe, nawet immortalizowane, korzystają głównie z oksydatywnej fosforylacji.

„Zróżnicowane” komórki nowotworowe są immortalizowane, nie są jednak zdolne do repopulacji w organizmie immunoniekompetentnych biorców. W warunkach tlenowych komórki te są glikolityczne, chociaż trudno wyjaśnić, jaką korzyść z tego odnoszą.

Zahamowanie oksydatywnej fosforylacji jest powodem zwiększenia glikolizy w komórkach. Takie zahamowanie może być skutkiem inhibicji transportu pirogronianu do mitochondriów.

Transport pirogronianu zależy od kompleksu MPC zawierającego białka Mpc1.p i Mpc2.p. Inhibitorem kompleksu MPC jest acyano-(1-phenylindol-3-yl) akrylan (UK5099). Skutkiem działania tego inhibitora (w stężeniach mikromolowych) jest glikoliza aerobowa, reprogramowanie chromatyny komórek i ekspresja białek stanu stem, zwłaszcza białek Pou5F1.p/Oct4.p i Nanog.p. Synteza białek MPC jest niska w nowotworach.

Zahamowanie OXPHOS obniża ROS w CSC, stabilizuje stan spoczynkowy i samoodnowę.

Zachowanie nieuszkodzonej oksydatywnej fosforylacji jest tak samo ważne dla zachowania stanu stem komórek CSC. Inhibitory OXPHOS, jak metformina czy menadion, hamują wzrost komórek nowotworowych i obniżają samoodnowę komórek CSC. Również farmakologiczny blok podziałów mitochondriów hamuje samoodnowę komórek CSC.

Aktywacja glikolizy może być też skutkiem warunków hodowli. Komórki CSC są zazwyczaj hodowane w wielkim nadmiarze tlenu (normoksja to 21% tlenu wobec 5-10% w tkankach) i w nadmiarze glukozy, co promuje glikolizę.

Zróżnicowane komórki nowotworowe mogą spon-tanicznie nabywać własności komórek CSC. Zależy to (zwłaszcza w raku piersi) od stabilizacji faktora hipoksji Hif1 α .p:

- Mutacje IDH1 genu powodują obniżenie poziomu Idh1.p i brak syntezy α -ketoglutaranu, co zwiększa poziom faktora Hif1 α .p. Mutacje genu IDH1 są obserwowane w glejakach, AML i rakach dróg żółciowych
- Mutacje genów kompleksu SDH powodują blok przemiany bursztynianu na fumaran i ogromny wzrost poziomu bursztynianu. Jest to powodem stabilizacji faktora Hif1 α .p. Mutacje genów SDH są opisywane w nowotworach przewodu pokarmowego, w rakach nerki i tarczycy, paraganglioma, feochromocytoma, neuroblastoma.
- Mutacje genu FH (hydratazy fumaranu) powodują nagromadzenie fumaranu. To uszkadza dioksygenazy zależne od α -ketoglutaranu, jak EglN2.p/Phd1.p, i zwiększa poziom Hif1 α .p. Mutacje genu FH powodują raki nerek, raki jajnika, guzy z komórek Leydiga, mięśniaki.

2. DDR W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH STEM

Nieodwracalne uszkodzenia DNA powodują głównie śmierć tych komórek nowotworowych, które nie są komórkami stem. Powoduje to zwiększenie procentowej liczby komórek CSC w populacji.

Podwyższenie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) w stresie przyspiesza różnicowanie komórek CSC i obniża ich zdolność do tworzenia przerzutów. Dlatego antyoksydanty jak N-acetylocysteina ułatwiają tworzenie przerzutów.

Mniej poważne uszkodzenia DNA indukują zahamowanie cyklu komórkowego, które jest odwracalne i krótkotrwałe – powodują stan spoczynkowy (*quiescent state*). Poważniejsze uszkodzenia DNA indukują trwałe i nieodwracalne uszkodzenie proliferacji – powodują senescencję komórek.

Decyzja o wejściu w senescencję zapada bardzo wcześnie, gdyż inicjacja senescencji rozpoczyna się dopiero w trzeciej dobie po uszkodzeniu, a naprawa trwa nie dłużej niż kilkadziesiąt godzin.

a. DDR w fazie G1 cyklu

ZAHAMOWANIE CYKLU W STRESIE

Natychmiastowym skutkiem stresu komórkowego w fazie G1 cyklu jest blok inicjacji fazy S.

Po wykryciu DSB (przez białko Mdc1.p i kompleks MRN) jest przyłączana kinaza Atm.p, która fosforyluje (w T68) i aktywuje kinazę Chk2.p/Chk2.p.

Po wykryciu SSB przez kompleks 9-1-1 (Rad9.p – Rad1.p – Hus1.p) i kompleks klaspina (Clspn.p)

– Topbp1.p wiązana jest kinaza Atr.p i białko Atrip.p, które fosforylują (w S345) i aktywują kinazę Chk1.p/Chk1.p w (rys. 28).

Ekspresja Atm.p zależy od syntezy i akumulacji *miR-15b* i *miR-16-2*. Aktywacja Atm.p polega na jej dimeryzacji i autofosforylacji. Kinaza Atm.p fosforyluje histon H2AX w S139. Tworzące się „ognisko” γ H2AX wiąże białko Mdc1.p, które po ufosforylowaniu przez Csnk2A1.p (kinazę kazeinową II) przyłącza E3 ligazę ubikwityny Rnf8.p.

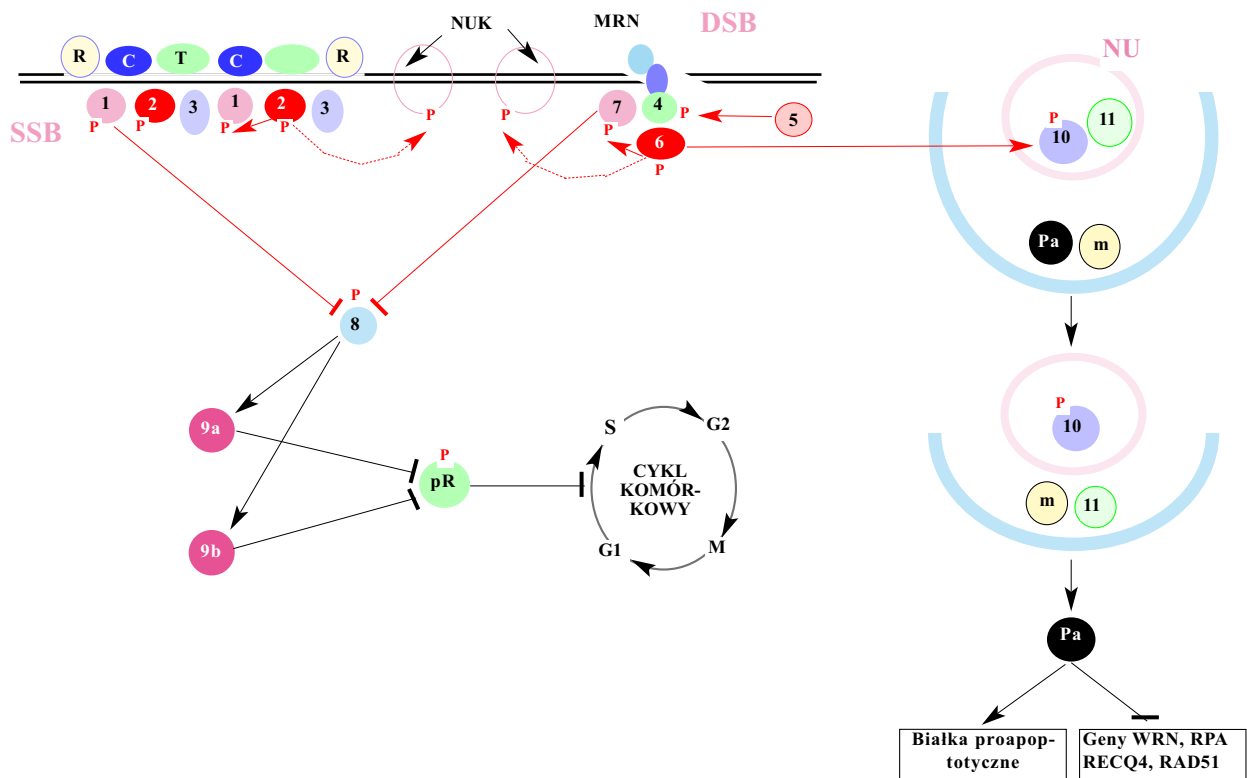
Atm.p kinaza może być zahamowana inhibitorem – Ku55933 (10 μ M).

Kinaza Chk2.p/Chk2.p oligomeryzuje i ulega dalszej aktywacji przez autofosforylację w treoninach 379 i 383 oraz w serynach 456 i 516. Kinaza Chk1.p/Chk1.p również oligomeryzuje i ulega autofosforylacji w S296. Aktywowane kinazy CHEK fosforylują wiele

białek, w tym fosfatazy Cdc25.p aktywujące przejście G1-S.

Aktywacja kinaz CHEK przez Atm.p i Atr.p jest krótkotrwała, gdyż stymuluje także ich poliubikwityzację i degradację (ułatwia to wyjście komórki z bloku w punkcie kontrolnym). Deubikwitynazą białka Chk2.p/ Chk2.p jest Usp7.p, której aktywność zwiększa naprawę typu HRR.

Cdc25A.p jest podwójnie specyficzną fosfatazą (defosforylującą tyrozyny i seryny), która we wczesnej fazie G1 defosforyluje Cdk4Y17 i Cdk6Y24, a przed fazą S defosforyluje Cdk2T14 i Cdk2Y15. Aktywuje to kinazy CDK fazy G1, zwiększa fosforylację pRb i umożliwia transkrypcję mRNA białek fazy S (zależną od czynników transkrypcji E2F).



Rys. 28. Zahamowanie cyklu komórkowego i indukcja apoptozy jako najwcześniejsza odpowiedź komórki na stres genotoksyczny.

(SSB) – przerwa jednołańcuchowa DNA, (DSB) – dwułańcuchowa przerwa DNA, (C) – Clspn.p (klaspina), (m) – Mdm2.p, (MRN) – kompleks Mre11.p – Rad50.p – Nbn.p/ Nbs.p, (NU) – jąderko, (NUK) – nukleosom, (Pa) – izoforma p53 α , (pR) – pRb, (R) – kompleks RPA, (T) – Topbp1.p, (G1-S-M-G2) – fazy cyklu komórkowego.

(1) – Chk1.p/Chk1.p, (2) – Atr.p, (3) – Atrip.p, (4) – Nbs.p/Nbn.p, (5) – Csnk2A1.p/Ck2.p, (6) – Atm.p, (7) – Chk2.p/Chk2.p, (8) – Cdc25A.p, (9a) – Cdk4/6.p, (9b) – Cdk2.p, (10) – białko jądrowe Gltscr2.p/Pict1.p, (11) – Rpl11.p.

Aktywacja pRb oznacza jego defosforylację zwiększającą wiązanie E2F.

Kinaza Chek1.p/Chk1.p fosforyluje Cdc25A.p w S76, co ułatwia jej dalszą fosforylację w S79 i S82 przez kinazę kazeinową Csnk1A1.p. Po fosforylacji Cdc25A.p jest ubikwitynowana przez E3 ligazę SCF i inaktywowana.

Kinaza Chek2.p/Chk2.p fosforyluje Cdc25A.p w S123.

Ekspresja genu CDC25A zależy także od białka E2F1.p. Promotor genu CDC25A zawiera sekwencję A wiążącą pRb (w fazie G0 i wczesnej fazie G1) i sekwencję B wiążącą E2F1.p po rozpadzie kompleksu pRb – E2F1.p. Cdc25A.p zwiększa aktywność kinazy Cdk2.p, ale kompleks cyklina E1 – Cdk2.p fosforyluje Cdc25A.p w N-terminalnej domenie i zwiększa jej aktywność. To dodatkowo sprzężenie zwrotne ma znaczenie w przejściu komórki przez punkt restrykcyjny R fazy G1.

Ekspresja genu CDC25 jest też stymulowana przez faktory transkrypcji Atf3.p, Stat3.p i dimer Myc.p – Max.p. Translacja mRNA *CDC25A* jest stymulowana przez białko Boll.p (podobne do białka mejotycznego Boule.p).

Do czynników, które hamują ekspresję Cdc25A.p, zalicza się p53 (ale p53 nie wiąże bezpośrednio promotora *CDC25A*), hipoksję i szok termiczny. W hipoksji blok ekspresji Cdc25A.p zależy od Cdkn1A.p/p21 i od *miR-21* RNA. Mutacje genu p53 w nowotworach skutkują zwykle wysokim poziomem Cdc25A. W raku piersi podobny skutek ma nadmierna aktywność deubikwitynazy Usp17L2.p/Dub3.p.

Białko p53 jest ważnym inhibitorem cyklu komórkowego w DDR. W przypadku braku stresu poziom p53 pozostaje niski, gdyż jest ono skompleksowane z Mdm2.p – E3 ligazą ubikwityny.

Ponadto p53 jest defosforylowane przez Wip1.p/Ppm1D.p fosfatazę, której ekspresja jest hamowana przez *miR-15b* i *miR-16-2*.

Wip1.p reguluje też reakcję DDR przez defosforylację γ H2AX, kinaz Atm.p, Atr.p i CHEK. Wip1.p hamuje izoformę ARF białka Cdkn2A.p, które aktywuje białko Mdm2.p.

Aktywność p53 można zahamować drobnocząsteczkowym inhibitorem Pifithrin α (50 μ M).

We wczesnym okresie po detekcji uszkodzenia DNA i po aktywacji kinaz Atm.p i Atr.p regulacja poziomu p53 nie zachodzi na poziomie transkrypcji, ale przez stabilizację istniejącego białka, zwiększenie translacji i jego uwolnienie z kompleksów w jądrach komórkowych.

Stabilizacja p53 polega na zahamowaniu aktywności E3 ligazy ubikwityny Mdm2.p i na jej separacji od p53. Stabilizacja zależy także od wtórnych mody-

fikacji p53 – acetylacji i deacetylacji (przez Sirt1.p), fosforylacji i defosforylacji przez fosfatazę Ppm1D.p/Wip1.p.

Aktywacja translacji p53 zależy od białek wiążących mRNA. **ElavL1.p**/Hur.p wiąże mRNA p53 (i mRNA apoptotycznego fatora Bax.p) oraz zwiększa ich stabilność. W stresie ElavL1.p/HuR.p jest fosforylowany przez Chek2.p/Chk2.p, co zwiększa jego aktywność i stabilność.

Ekspresja p53 jest także zwiększana przez **Nutlin 3a** (drobnocząsteczkowy analog *cis*-imidazolu), który hamuje Mdm2.p.

W jądrach komórkowych istnieje kompleks p53 α (izoforma α) z białkiem Mdm2.p. Ten kompleks destabilizuje p53 α . W jąderkach znajduje się kompleks białek Gltscr2.p/Pict1.p i Rpl11.p. W stresie genotoksycznym białko Gltscr.p/Pict1.p jest fosforylowane przez kinazę Atm.p (w S233 i w T289) i uwalnia białko Rpl11.p z kompleksu. Białko Rpl11.p wiąże silnie Mdm2.p i uwalnia białko p53 α . Wzrost aktywności izoformy p53 α obserwowany w pierwszych godzinach po irradacji jest głównie spowodowany uwolnieniem p53 α z jąder komórkowych (**rys. 28**).

P53 α raczej hamuje ekspresję białek naprawy DNA (Rad51.p, białka kompleksu RPA, białka Wrn.p i RecqL4.p), a transaktywuje ekspresję genów apoptozy (BAX i BAK).

Ekspresja ta jest silnie aktywowana przez izoformę p33 białka supresorowego **Inglb.p**, która stymuluje syntezę niekodującego *linc-RNA-p21*. To RNA w obecności białek Inglb.p i p53 tworzy kompleks w promotorach genów BAX i BAK (i w promotorze genu CDKN1A/p21).

Ponadto kompleks Inglb.p, p53, Bax.p i Bak.p uwalnia cytochrom c z mitochondriów i inicjuje wewnętrzną drogę apoptozy.

Translacja p53 (i Rad51.p) jest bezpośrednio hamowana przez *miR-34a*, którego poziom rośnie po irradacji. Także *MALAT1* RNA (*metastasis associated long non coding RNA adenocarcinoma transcript 1*) hamuje ekspresję białek MybL2.p i p53. Deacetylaza Sirt1.p też hamuje p53, natomiast kawecolina zwiększa aktywność p53.

NAPRAWA DNA W FAZIE G1

Zahamowanie cyklu komórkowego pozwala na inicjację naprawy DNA. Białko p53 α silnie stymuluje ekspresję Mdm2.p i po osiągnięciu maksymalnego poziomu w około 4 godziny po irradacji jego ilość zaczyna maleć. Zwiększa się natomiast ekspresja **izoformy Δ 133p53**, której transkrypcję inicjuje wewnętrzny promotor. Δ 133p53 nie posiada domeny transakty-

wacji i regionu bogatego w prolinę i nie ma zdolności aktywacji genów apoptotycznych. D133p53 izoforma nie może wiązać białka Mdm2.p, co zwiększa jej stabilność.

Maksymalny poziom izoformy $\Delta 133p53$ w komórkach jest obserwowany 24 godziny po irradacji. Białko wchodzi w kompleksy stymulujące ekspresję genów RAD51, LIG4, RAD52 i innych genów ważnych dla naprawy HRR, SSA i NHEJ. Brak $\Delta 133p53$ obniża efektywność naprawy DNA i zwiększa ilość DSB (rys. 29).

Białka naprawy w fazie G1

Kinazy CHEK (głównie Chk2.p/Chk2.p) fosforylują wiele innych białek (poza p53 lub Cdc25A), w tym: histon H3 w T11 i regulatory DDR i cyklu komórkowego p73, MdmX2.p, Pml.p i białka E2F.

E3 ligazy ubikwityny **Rnf8.p** i **Rnf168.p** są przyłączane przez ufosforylowane białko Mdc1.p i działając wspólnie, poliubikwitynują histony H2A i H2AX w K119. Łańcuchy poliubikwityny wiążą białka Uimc1.p/ Rap80.p, Fam175A.p/Abra1.p i Brca1.p.

Parp1.p – polimeraza poli (ADP-rybozy) jest faktorem zwiększającym wiązanie kompleksów naprawy DNA: MRN i NHEJ. Odgrywa rolę w ALT-NHEJ, w reperfacji pęknięć jednołańcuchowych i w bloku przesuwania się widełek replikacyjnych. Poli ADP-ryboza (PAR) przyłącza się do białek wiążących RNA (Rbm14.p, RbmX.p, Ewrs1.p/Ews.p i do białka Fus.p koniecznego do tworzenia „ognisk” γ H2AX w regionach pęknięć dwułańcuchowych DNA).

Białko Bmi1.p w kompleksie z E3 ligazą ubikwityny Rnf2.p/Ring1.p monoubikwitynuje histon H2A w lizynie 119. W DDR ubikwitynacja H2A-K119 aktywuje naprawę DNA typu HR i NHEJ.

Ektopiczna ekspresja Bmi1.p hamuje tworzenie ognisk γ H2AX w komórkach MCF7 raka piersi i zmniejsza aktywność kinazy Atm.p (podobnie w komórkach prawidłowych nabłonków gruczołu piersiowego – MCF10A).

To obniżenie aktywności Atm.p wynika głównie z konkurencji o wiązanie Nbs1.p z kompleksu NMR. Punkt kontrolny DDR zależny od Atm.p jest główną barierą transformacji nowotworowej. W komórkach MCF7 białko Bmi1.p zwiększa ponadto aktywność kinazy Akt1.p.

Nadekspresja Bmi1.p powoduje uszkodzenie funkcji mitochondriów i znacznie podwyższa poziom komórkowego ROS. Bmi1.p jest najprawdopodobniej markerem jelitowych komórek stem.

Białko Bmi1.p promuje transformację nowotworową i współdziała z białkiem Myc.p (które jest aktywatorem ekspresji genu BMI1). Białko Bmi1.p jest

dodatkowo aktywatorem telomerazy w komórkach nabłonków gruczołu piersiowego.

Kinaza mTor.p stymuluje białko FancD2.p, co aktywuje kinazy Atm.p i Atr.p, przyspiesza reperację DNA i podwyższa odporność komórek nowotworowych na faktory genotoksyczne.

Białka wiążące RNA (RBP)

Białka wiążące RNA są często bezpośrednimi substratami kinaz Atm.p i Atr.p. Do białek RBP odgrywających ważną rolę w DDR zalicza się:

- **Rbm14.p.** Białko to ma domenę PRL (*prion like domain*), która obecna jest także w innych białkach RBP (jak Ewrs1.p/Ews.p i Fus.p/Tls.p – białko stwardnienia zanikowego bocznego). Amplifikacja i wysoka ekspresja genu EWSR1 jest obserwowana w komórkach nowotworowych, a także w komórkach embrionalnych i komórkach stem. Domena PRL wiąże białko Tarbp2.p/Trbp.p (*thyroid hormone receptor binding protein*), jak również acetyltransferazę p300, synaptotagminę (Syt1.p), Runx2.p/Aml3.p i Taf15.p (białko RBP z kompleksu TFIID).
- Białko Rbm14.p wiąże też białko Xrcc5.p/KU80.p (uczestniczące w naprawie typu NHEJ), białko Parp1.p i niekodujący RNA *NEAT1* (faktor stabilizujący Rbm14.p w jądrowych „paraspeckles”).
- Zupełny brak Rbm14.p destabilizuje komórki CSC i czyni je wrażliwymi na promieniowanie jonizujące, obniża autofosforylację Prkdc.p/Dnapkdc.p (co hamuje naprawę typu NHEJ).
- **RbmX.p** wiąże regiony DSB i SSB przez PAR. Brak RbmX.p obniża wiązanie Brca2.p i naprawę DNA typu rekombinacji homologicznej.
- **Prp19.p/Pso4.p** jest E3 ligazą ubikwityny, która reguluje dojrzewanie pre-mRNA, ubikwitynuje białka U4SnRNP, wiąże też RNA polimerazę II i helikazę Wrn.p. W kompleksie z Prp19.p jest także białko Cdc5L.p – aktywator punktu kontrolnego Atr.p i regulator przejścia faz G2-M.
- **Brca1.p** wiąże liczne mRNA (jak: *ATRIP*, *BACH1*, *BCLAF1* i *EXO1*). Białko jądrowe Bclaf1.p (*Bcl2.p associated factor*) odgrywa rolę w wycinaniu intronów i stymulacji apoptozy.
- **HnRNP-UL1.p** jest sensorem DSB. Wiaże ono białko Mre11.p, stymuluje wycinanie końca 5' DSB i naprawę typu HRR, stabilizuje helikazę Blm.p.

Rola MikroRNA

- nadekspresja *miR-29b-3p*, *miR-197*, *miR-494* i *miR-428b* zwiększa odporność komórek na doksorubicynę,

- *miR-138* działa na mRNA *H2AX* i *ERCC1* i obniża reperację DSB,
- *miR-513-3p* działa na mRNA *GSTP1*, który koduje S-transferazę glutaminy zwiększającą odporność na cisplatynę (tak jak *miR-513-3p*).

Rola lncRNA (długiego niekodującego RNA).

- lncRNA *DDSR1*. Ekspresja tego RNA zwiększa się w obecności DSB i odgrywa rolę w systemie naprawy HR.
- Ekspresja lncRNA *bc06912* jest regulowana przez białko p53. Obecność tego lncRNA hamuje apoptozę, wiąże białka Parp1.p i Nmp1.p (nukleofosminę).
- lncRNA *FALEC* (*focally amplified long non coding RNA in epithelial cancer*). Często obserwowana jest amplifikacja genu i nadekspresja tego lncRNA w nowotworach nabłonkowych. Wyciszenie ekspresji lncRNA *FALEC* hamuje wzrost komórek niezależny od podłoża i zwiększa senescencję. lncRNA *FALEC* stabilizuje także helikazę Bmi1.p.
- lncRNA *MEG3* kontroluje ekspresję białek p53 i Bcl2L1.p/BclXL.p. lncRNA *MEG3* wpływa też na odporność komórek na cisplatynę,

DDR W PÓŹNEJ FAZIE G1

Po 48 godzinach od stresu genotoksycznego, gdy reperacja uszkodzeń nie jest skutecznie przeprowadzona, komórki wchodzą w stan wyciszenia wzrostu (*quiescent state*) lub w stan stałego zahamowania wzrostu (stan senescencji), aby uniknąć śmierci w fazie syntezy DNA.

Szlak p53 – Cdkn1A.p/p21

W późnej fazie G1 ponownie wzrasta poziom izoformy p53α. Stymuluje to ekspresję białek senescencji, różnicowania, angiogenezy i autofagii. Ponownie pojawia się blok ekspresji genów naprawy DNA. Stałe utrzymywanie jest zahamowanie inicjacji fazy S cyklu komórkowego (**rys. 29**).

P53α wiąże promotory aktywowanych genów jako tetramer. Obecność zmutowanych białek p53α (zwłaszcza R248Q) powoduje powstanie toksycznych, a być może karcynogennych oligomerów p53.

Zahamowanie cyklu przed inicjacją fazy S chroni komórki przed katastrofą syntetyczną i przed wejściem w fazę G2 cyklu z uszkodzonym DNA. To zahamowanie pozwala na zachowanie zdolności do proliferacji (jedynie w przypadku wyciszenia cyklu – uzyskania stanu kwiescencji).

Cdkn1A.p/p21 jest ważnym białkiem, którego synteza jest stymulowana przez p53. Białko to spełnia wiele funkcji:

- Aktywuje syntezę białka Ppmid.p/Wip1.p, które hamuje p53 i Chek1-2.p, ale stymuluje Atm.p – kinazę aktywowującą p53.
- Hamuje kompleksy kinaz zależnych od cyklin: Cdk2.p – CcnE.p, Cdk4.p – CcnD.p i Cdk6.p – CcnD.p, hamując fosforylację pRb.
- Hamuje apoptozę przez zahamowanie kaspaz: 3, 8, 9, 10, kinaz stresu, jak: Mapk9.p/Sapk.p i Ask1.p/Map3k5.p (aktywującej Mapk9.p i Mapk8.p/Jnk.p).
- Hamuje apoptozę przez blok uwalniania cytochromu c z mitochondriów.
- Fragment 15 kDa białka Cdkn1A.p/p21 (wynik cięcia białka p21 przez kaspazę 3) jest silnym aktywatorem apoptozy.
- Hamuje ekspresję genów cyklu komórkowego.
- Stymuluje ekspresję genów antyapoptotycznych.
- Stymuluje ekspresję genów senescencji.
- Aktywuje ekspresję kinazy Atm.p.

Regulatorami ekspresji Cdkn1A.p/p21 są:

- *Linc-RNA-21*, aktywuje transkrypcję genu p21/CDKN1A.
- *FALEC1* lncRNA/*FAL1* lncRNA (*focally amplified lncRNA chromosome 1*), hamuje syntezę Cdkn2A.p/p21 i stabilizuje białko Bmi1.p.
- *BANCR* lncRNA aktywuje Cdkn1A.p/p21 i hamuje przejście faz G1 – S cyklu komórkowego.
- *PANDAR* lncRNA wiąże Cdkn1A.p/p21 w stresie genotoksycznym. W proliferujących komórkach jest blokowany przez Hnrnp-U.p/Safa.p, z którym tworzy kompleks blokujący ekspresję genu CDKN1A. Wyciszenie genów *PANDAR* i *HNRNP-U.p* zwiększa ekspresję genu CDKN1A i hamuje proliferację.

Szlak sygnalizacji: cytokiny – Mapk – Ing1a.p – p16 – pRB – E2F

Ta droga transmisji sygnału w fazie G1 także prowadzi do zahamowania cyklu życiowego. Jej stymulatorami są najczęściej brak produktów odżywczych, obecność cytokin (na przykład Wnt.p), stres oksydacyjny i mitochondrialny.

Następuje aktywacja kinaz stresu (Mapk1.p/p38-Mapk.p), dużej izoformy białka Ing1A.p i inhibitorów kinaz Cdk2.p, Cdk4.p i Cdk6.p – (Cdkn2A.p/p16 i p57/Cdkn1C.p). Inhibicja kinaz zależnych od cyklin unieumożliwia fosforylację białka pRb, uwolnienie faktora transkrypcji E2F1.p, inicjację syntezy DNA i postęp cyklu komórkowego.

Białko p53 metylowane w lizynach 370 i 372 tworzy kompleks z białkiem FbxO22.p i hamuje ekspresję genu CDKN2A. Stabilizacja dimetylowanego

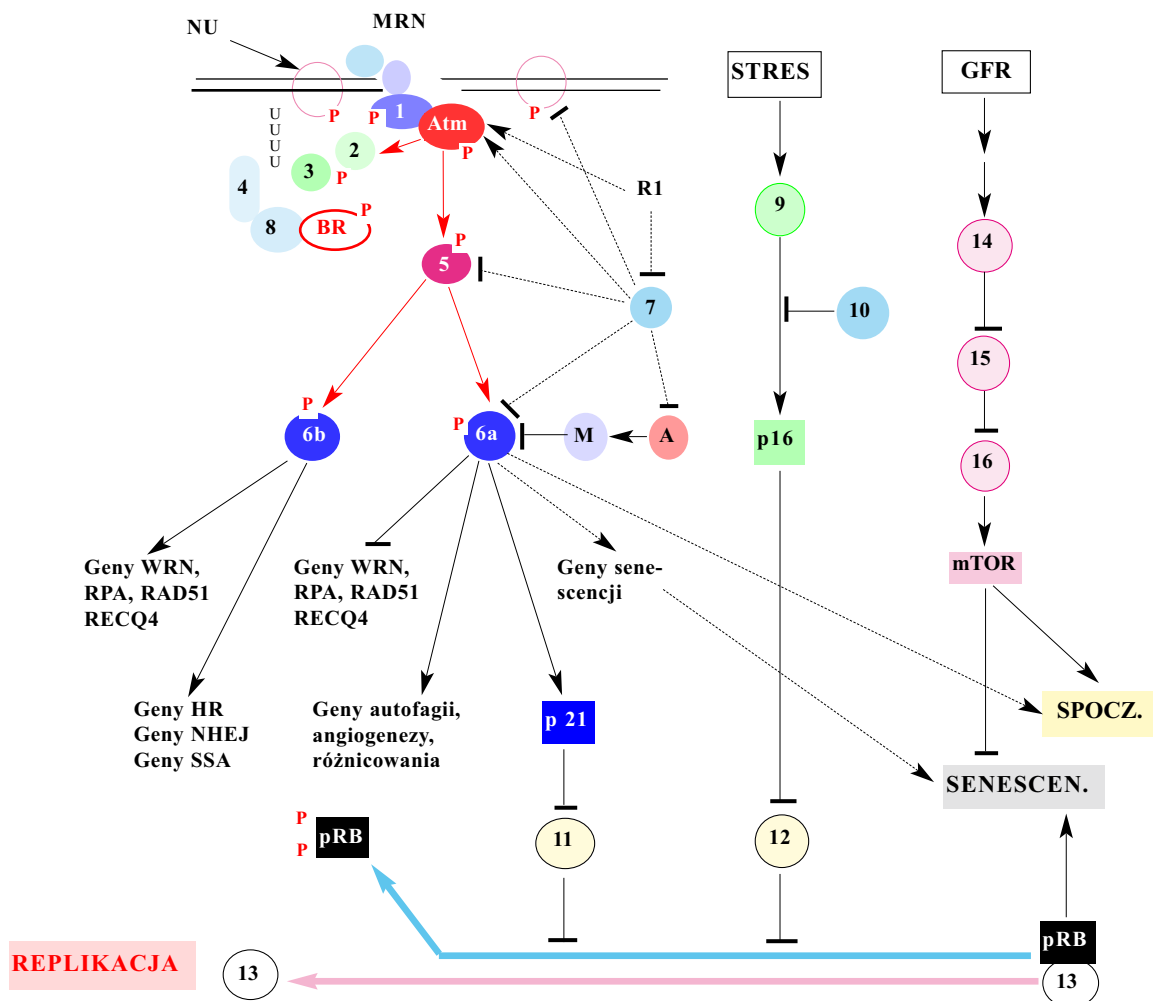
p53 zależy od białka Phf20.p. Wiązanie demetylasy Kdm4A.p i E3 ligazy ubikwityny (kompleksu SCF) do FoxO22.p powoduje demetylację, ubikwytynację i w efekcie zniszczenie białka p53. To zwiększa syntezę białka Cdkn2A.p/p16 i zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G1.

Białko Bmi1.p znajduje się w kompleksie białek Polycomb (PRC1). Z E3 ligazą ubikwityny Rnf2.p/Ring1.p tworzy kompleks monoubikwytynujący histon

H2A w lizynie 119. Hamuje to ekspresję licznych genów (w tym genu CDKN2A/p16).

Lnc-RNA. Ekspresja genu CDKN2A zależy też od obecności długich niekodujących RNA:

- *VAD* lncRNA reguluje strukturę chromaty w locus CDKN2A i aktywuje jego transkrypcję.
- *CDKN2BAS1*-lncRNA antysensowny RNA do locus CDKN2A.
- lncRNA *HOTAIR* wiąże białko Ezh2.p/Kmt6.p (metylotransferazę H3K27me3) represor transkrypcji



Rys. 29. DDR w fazie G1 cyklu komórek nowotworowych.

(A) – Izoforma Arf.p, (BR) – Brca1.p, (GFR) – receptory czynników wzrostu (M) – Mdm2.p, (MRN) – kompleks Mre11.p – Rad50.p – Nbs1.p, (NU) – nukleosom, (R1) – *miR16b* i *miR-16-2*, (P) – reszta fosforanowa, (SPOCZ) – faza spoczynkowa, (U) – ubikwityna, (1) – białko Nbs1.p z kompleksu MRN, (2) – Mdc1.p, (3) – E3 ligaza ubikwityny Rnf8.p, (4) – Uimc1.p/Rap80.p, (5) – kinazy Chek2.p i Chek1.p, (6a) – izoforma białka p53 α , (6b) – izoforma Δ 133p53 α , (7) – fosfataza Ppm1D.p/Wip1.p, (8) – białko Fam175A.p/Abraxas.p, (9) – Mapk1.p/p38-Mapk, (10) – Bmi1.p, (11) – kompleks cyklina E – Cdk2.p, (12) – kompleksy cyklina D z Cdk4.p i Cdk6.p, (13) – białka E2F, (14) – kinaza Akt1.p, (15) – Tsc1.p – Tsc2.p, (16) – Rheb.p. Zahamowanie aktywności białka pRb oznacza jego fosforylację.

w kompleksie Polycomb. Zmniejsza ekspresję genu CDKN1A i reguluje odporność komórek na cisplatinę.

STAN WYCISZENIA PROLIFERACJI W G1

Uszkodzenia DNA mogą powodować zatrzymanie cyklu komórkowego i przejście komórek nowotworu w stan braku aktywności z fenotypem mezenchymalnym (typ przejścia EMT). Takie komórki są podobne do komórek CSC (CSC-L). Przejście EMT zależy od akumulacji białka p53 α , od zwiększenia ekspresji białka Cdkn1A.p/p21, a także od działania faktora wzrostu Tgf β .p, stymulującego regulator transkrypcji Snai2.p/Slug.p i fosfatazę PtpN14.p/Pez.p. Fosfataza ta zwrótnie aktywuje Tgf β .p i nasila proces EMT.

W fazie G1 reperacje DNA typu HRR, c-NHEJ, SSA, BER lub NER są mało aktywne (poza naprawą alt-NHEJ). Przyczyną zahamowania jest wysoka ekspresja Cdkn1B.p/Kipl.p.

Przyczynami wyciszenia komórek CSC-L są:

- Zahamowanie aktywności kinaz zależnych od cyklin przez aktywację inhibitorów Cdkn1A.p/p21, Cdkn1C.p/p57 i Cdkn2A.p/p16.
- Ekspresja inhibitora Cdk2.p – białka **Cdk2ap1.p**. Obok hamowania fosforylacji pRb Cdk2ap1.p hamuje inicjację syntezy DNA przez wiązanie DNA polimerazy α . Brak Cdk2ap1.p obserwowany jest często w nowotworach, ale w fibroblastach brak ekspresji prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego i bloku proliferacji.
- Ekspresja *miR-15b* i *miR-16-2* po ekspozycji komórek na promieniowanie reguluje poziom sygnalizacji Atm.p – Chek2.p – p53.
- *lncRNA-p21* wpływa na ekspresję Cdkn1A.p/p21 i wielu innych genów, których ekspresja jest regulowana przez p53. Hamuje proliferację.
- Ekspresja białek Zabl.p, Smail-2.p i Twist.p.
- Hipoksja spowodowana brakiem unaczynienia.
- Brak koordynacji działania czynników wzrostu i białek adhezji komórkowej.
- Obniżenie sygnalizacji szlaku Mapk1.p/Erk.p.

b. Senescencja w fazie G1 cyklu

Senescencja wydaje się być mechanizmem ochronnym przeciw transformacji spowodowanej niestabilnością chromosomów (przez skracanie telomerów), niestabilnością genomową (przez pęknięcia dwułańcuchowe DNA) lub mutacjami onkogenów (**rys. 30**).

Osiągnięcie stanu senescencji trwa około 3 dni od jej inicjacji. W ciągu pierwszej doby tego procesu obserwuje się gwałtowną inicjację syntezy DNA.

Białko Cdc6.p znajduje się w miejscu ORI od końca poprzedzającej mitozy i blokuje ekspresję genu CDKN2A/ARF (ORI replikacji znajduje się w promotorze ARF). Inicjacja Pre-RC uwalnia Cdc6.p i umożliwia transkrypcję genu ARF.

W czasie następnych dwóch dni trwa proces autofagii z przebudową struktury komórki. Proces inicjacji senescencji jest zależny głównie od szlaku metabolicznego Arf.p – p53 – Cdkn1A.p.

Wieloletnia obecność słabo funkcjonalnych komórek, produkujących szkodliwe substancje (zapalne cytokiny), wydaje się być niebezpieczna. Komórki w stanie senescencji można porównać do „oswojonych” komórek przednowotworowych.

Należy przy tym pamiętać, że „dobra komórka nowotworowa jest martwą komórką nowotworową”. Jak zatem można by wyjaśnić akumulację senescentnych komórek?

- Senescencja może być tylko artefaktem doświadczalnym (Rene Bernards). Nabłonkowe komórki hodowane *in vitro* na plastikowych podłożach ulegają senescencji, podczas gdy te same komórki hodowane na warstwie odżywczej komórek zachowują zdolność do proliferacji. Markery senescencji (SA β gal pH-6) są też obecne w stanie immortalizacji.
- Senescencja może być mechanizmem antywirusowym. W czasie autofagii komórka usuwa struktury i produkuje prozapalne cytokiny, które powodują senescencję komórek sąsiednich. Apoptoza mogłaby być niebezpieczna ze względu na możliwość uwolnienia wirusów.
- Akumulacja komórek w stanie senescencji jest ważniejsza od ubytku ASC dla starzenia się tkanek i dla procesu transformacji. Senescencja chroni przed transformacją komórki organizmu młodego, ale powoduje nowotwory w starym organizmie („antagonistyczna plejotropia” – teoria Judith Campisi). Istotnie w tkankach dzieci jest tylko 1% komórek w stanie senescencji, podczas gdy u ludzi starych do 20%.
- Być może komórki w stanie senescencji są szybko usuwane z tkanek (u ludzi młodych) przez fagocytozę i inne mechanizmy. To nie może być obserwowane w hodowli komórkowej *in vitro*. U ludzi starych ten mechanizm usuwania komórek może być niewydolny.
- Gromadzenie komórek w senescencji może odgrywać rolę w zaprogramowanym starzeniu i śmierci organizmu (co jest ewolucyjnie korzystne).

Są korelacje między senescencją komórek a starzeniem się organizmu. U starych ssaków obserwuje się utratę aktywności Kmt6.p/Ezh2.p, małą metylację histonów H3K9me1/me3 i H3K27me3. To zwiększa ekspresję elementów powtarzalnych i ich rekombinację.

Całkowita ilość 5-metylocytozyny w DNA komórek w stanie senescencji jest obniżona, ale promotory pewnych genów są nadmiernie metylowane. Podobne zmiany metylacji DNA są obserwowane w komórkach nowotworowych.

Inhibitory HDAC powodują zwykle senescencję komórek. Myszy *Sirt5^{-/-}* starzeją się, a **resweratrol** (aktywator sirtuiny) wydłuża życie.

Defekty samoodnowy i zmniejszenie liczby ASC powoduje przedwczesne starzenie (jest to argument przeciw teorii Campisi). Szczególnie nadekspresja p53 zmniejsza liczbę Hem-ASC u myszy i powoduje starzenie. Nadmiar p53 zmniejsza podatność myszy na nowotwory.

Starzenie się może także wynikać ze zmniejszenia liczby zróżnicowanych, funkcjonalnych komórek tkanek. Defektywna ekspresja *Pcgf2.p/Mel18.p* lub hipomorficzne mutanty *BRCA1* (jak na przykład myszy *BRCA^{+ΔH}*) wykazują małą zdolność do samoodnowy ASC, przedwczesne starzenie i skłonność do nowotworów.

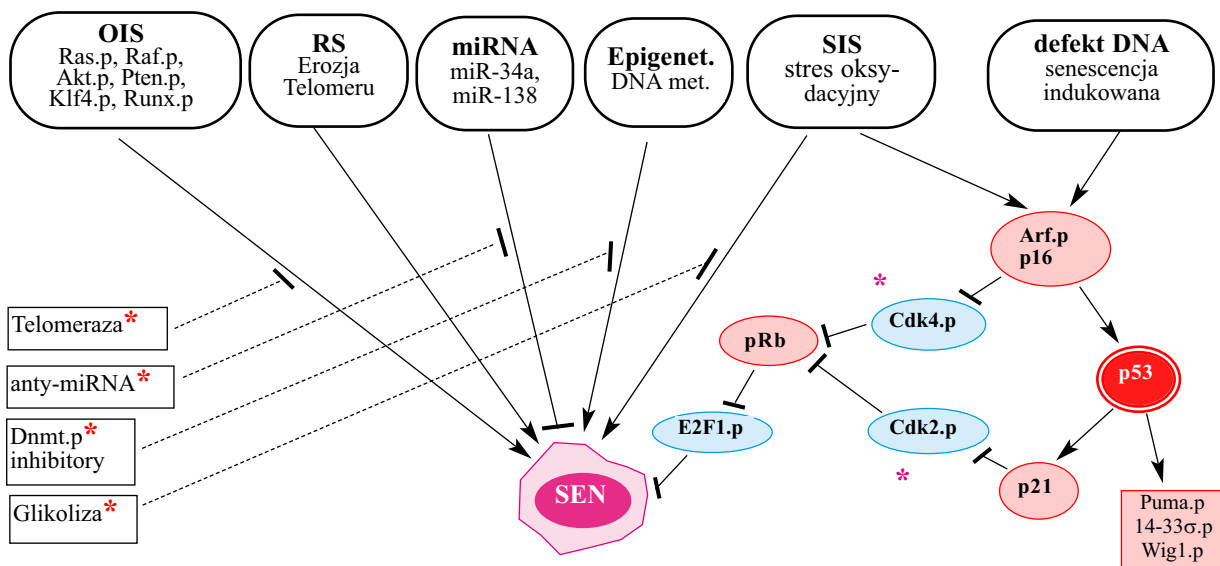
Ważną rolę w regulacji czasu życia i procesu starzenia się organizmu (a także podatności na nowotwory) grają białka rodziny p53. Poziom aktywnego p53

zależy od syntezy *de novo*, od modyfikacji białka, jak fosforylacja, acetylacja i ubiquitynacja i od jego degradacji. Ilość białka p53 w ludzkich ASC jest mała, w mysich ASC p53 jest obecny, ale nieaktywny. W komórkach w stanie senescencji obecna jest izoforma p53β (izoformy Δ133p53 jest bardzo mało).

Pacjenci *p53^{+/-}* (z zespołem **Li-Fraumeni**) są wysoce podatni na nowotwory, a czas ich życia ulega skróceniu. Myszy *p53^{+m}* ze skróconą izoformą p53 (allel „m” zawiera tylko eksony 7 do 11, produkt białkowy jest bardziej stabilny i aktywny) są odporne na nowotwory, ale długość ich życia ulega skróceniu o 30%, ekspresja allele *m* u heterozygot jest niska.

„Super p53” myszy mają dodatkowe kopie prawidłowego genu kodującego p53. Ekspresja białka p53 jest niska w warunkach prawidłowych, ale bardzo wysoka po uszkodzeniach DNA. Te super p53 myszy są odporne na nowotwory, ale nie wykazują żadnych objawów przedwczesnego starzenia się. Podwójne super p53/super *Arf.p/p19* myszy są odporne na nowotwory i sprawnie usuwają komórki z uszkodzonym DNA bez objawów przedwczesnego starzenia się.

Mysie heterozygoty zawierające allele zerowe lub hipomorficzne genu *MDM2* i wykazujące tylko 30% normalnej aktywności *Mdm2.p* mają wysoki poziom p53. Są odporne na powstawanie nowotworów i mają normalny czas przeżycia.



Rys. 30. Różne typy senescencji komórkowej: (OIS) – senescencja indukowana onkogenami, (RS) – senescencja replikacyjna, (SIS) – senescencja indukowana stresem oksydatywnym.

Inhibitory senescencji w lewej kolumnie, gwiazdki – możliwe punkty interwencji terapeutycznej. Inhibitory Cdk.p: flawopiridol, roskowityna, UCN-01 (raczej indukują apoptozę komórek).

Badania polimorfizmu genu TP53 u ludzi w 72 reszcie aminokwasowej dowodzą, że:

- Genotyp Pro – Pro zwiększa ryzyko nowotworu 2,54 razy, ale też zwiększa przeżycie o 40%.
- Allel Arg aktywuje apoptozę komórek.

$\Delta N63\alpha.p$ – dominująco negatywna izoforma białka p53 może też przyspieszać procesy starzenia się.

Wiadomości na temat wpływu białek rodziny p53 na czas życia nie są kompletne.

FENOTYP WCZESNEJ SENESENCJI

Dawniej powszechny był pogląd, że komórki w stanie senescencji są zawsze w fazie G1 cyklu. Fenotyp takich komórek jest bardzo charakterystyczny:

- komórki powiększają się,
- stają się płaskie z ziarnistą cytoplazmą,
- zachodzą zmiany składu i lokalizacji białek cytoskeletonu i adhezji komórkowej,
- maleje ekspresja laminy B1, która wiąże sekwencje MAR w DNA i domen LAD (*lamin associated chromatin domains*),
- maleje ilość łącznikowego histonu H1,
- rośnie poziom białka HmgA2.p,
- inicjowane są modyfikacje epigenetyczne chromatydu z reorganizacją subdomen TAD (*topologically associated domains*), podobnie jak w czasie różnicowania,
- maleje ekspresja białek grupy Polycomb (PCG) i liczba kompleksów tych białek,
- aktywuje się system autofagii (głównie w czasie dwóch pierwszych dni senescencji), potem autofagia hamuje senescencję,
- wysoki jest poziom cyklin fazy G1 (cyklin D i cykliny E, a niski cyklin fazy G2 (cyklin B),
- poziom białka inhibicyjnego Cdkn1A.p/p21 jest wysoki w początkowej fazie, a Cdkn2A.p/p16 w późniejszej fazie senescencji,
- białko pRb jest defosforylowane,
- aktywują się enzymy lizosomalne, w tym marker senescencji – SA- β -galaktozydaza,
- rośnie ekspresja RNA sekwencji SINE i LINE,
- aktywuje się transkrypcja wielu mikroRNA regulujących senescencję: *miR-182* (zwiększa translację SA β -Gal), *miR-183* i *miR-20a*.

Nadekspresja *miR-20a* stymuluje senescencję, a *miR-LET7* hamuje ten proces.

INICJACJA SENESENCJI

Przyczyny inicjacji senescencji komórek w fazie G1 cyklu są przedstawione na **rys. 30**:

- Zahamowanie cyklu komórkowego w punkcie restrykcyjnym fazy G1.
- Skrócenie sekwencji końcowych powtórzeń choćby w jednym chromosomie, spowodowane przekroczeniem limitu podziałowego.
- Stres genotoksyczny (**SIPS**). Warunkiem powstania tego stanu jest ekspresja niezmutowanych białek p53 i Cdkn1A.p/p21.
- Stres oksydacyjny (21% O₂) lub hipoksja.
- Wysoki poziom ROS.
- Hiperaktywacja onkogenów – (**OIS**).
- Dysfunkcja mitochondriów – (**MIDAS**).
- Nadekspresja Bcl2.p nawet w komórkach p53^{-/-} i CDKN2A^{-/-}.
- Brak ekspresji białka Xrcc5.p/KU86.p.
- Ekspresja pewnych typów mikroRNA i innych niekodujących RNA.
- Niekorzystne warunki mikrośrodowiska.

Obserwuje się generalną demetylację DNA z lokalną hipermetylacją wysp CpG genów cyklu komórkowego i proliferacji. Demetylacja zależy od aktywacji 5mC specyficznej dioksygenazy Tet1.p.

Podobne zmiany są obserwowane w komórkach nowotworowych, ale hipermetylacja dotyczy sekwencji zawierających anty-onkogeny.

Modyfikacje histonów są różne w różnych typach senescencji. W OIS obserwuje się silną metylację H3K9me3, ale w senescencji komórek w zespole progerii Hutchinsona-Gilforda (**HGPS**) i w senescencji replikacyjnej ilość H3K9me3, H3K27me3 i białek CBX/HP1 jest raczej niska.

Demetylacja histonów H3K9me3, H3K27me3 i H3K4me3 zależy od demetylaz KDM: 2, 4, 5 i 6.

Wczesna faza senescencji powoduje głównie zahamowanie proliferacji i jest podobna do stanu spoczynkowego (kwiescencji). Jest stanem odwracalnym w pewnych warunkach, ale decyzje o inicjacji senescencji zapadają wcześniej w odpowiedzi komórki na uszkodzenie DNA. Objawem tego jest przejściowa aktywacja autofagii, która umożliwia głęboką zmianę fenotypu. Wielką rolę w tej fazie odgrywają białka p53, Cdkn1A.p/p21, białka autofagii, białka z rodziny RB, Ccar2.p/Dbcl.p, Arf.p, Morf4.p i kompleks NFkB.

p53 jest białkiem supresorowym i regulatorem ekspresji genów: CDKN1A/p21, GF11, GADD45A, WIG1/ZMAT3 (białko supresorowe wiążące dsRNA). Białko p53 aktywuje geny proapoptotyczne: BAX, BBC3/PUMA, NOXA, a hamuje antyapoptotyczne jak BCL2.

Białko p53 jest fosforylowane i stabilizowane przez kinazy: Atr.p, Atm.p, Prkdc.p/Dnapkcs.p i Chk2.p/Chk2.p. Acetylacja i białka Ing1A.p, nukleoporyna