

# Mechanizmy regulujące strukturę chromatyny oraz zmiany towarzyszące starzeniu komórkowemu

## STRESZCZENIE

Spodziewana średnia długość życia człowieka nieustająco rośnie. Negatywnym skutkiem tego zjawiska jest coraz częstsze występowanie chorób związanych z wiekiem. Eksperymentalne dane pokazały, że starzenie komórkowe jest przyczyną zmian obserwowanych wraz z upływem lat. Starzenie komórkowe jest nieodwracalnym zatrzymaniem cyklu komórkowego przy zachowaniu funkcji metabolicznych. Do starzenia może dojść zarówno na drodze wyczerpania zdolności komórki do podziałów (starzenie replikacyjne - RS, ang. *replicative senescence*), jak i w wyniku stresu (starzenie przyspieszone indukowane stresem - SIPS, ang. *stress-induced premature senescence*). Oba typy starzenia powodują szereg zmian morfologicznych komórki, a w szczególności zmian na poziomie jądra komórkowego i ekspresji genów. Obserwuje się stopniowy spadek zawartości skondensowanej heterochromatyny na rzecz rozluźnionej euchromatyny. Jest to spowodowane między innymi utratą histonów, zaburzeniem równowagi między represyjnymi a aktywującymi modyfikacjami potranslacyjnymi histonów oraz upośledzeniem działania enzymów modelujących histony i białek stabilizujących strukturę chromatyny. W niniejszej pracy szczegółowo scharakteryzowano zmiany architektury jądra i struktury chromatyny zachodzące podczas starzenia komórek.

## WSTĘP

Starzenie się jest naturalnym procesem dotyczącym niemal wszystkich organizmów żywych. Wiąże się ono ze stopniowym pogorszeniem funkcji tkanek i narządów, ogólnego stanu zdrowia oraz ze zwiększonym występowaniem chorób związanych z wiekiem. Do najczęściej występujących chorób dotykających ludzi w podeszłym wieku należą: choroby neurodegeneracyjne, tj. Alzheimer, Parkinsona, choroby układu krążenia, tj. nadciśnienie, miażdżyca, zawał serca, udar oraz cukrzyca typu II i pewne typy nowotworów. Analiza tkanek zmienionych chorobowo wykazała duży odsetek komórek przejawiających cechy starzenia komórkowego [1]. Starzenie organizmu wiąże się z akumulacją starych komórek [2], a ostatnie badania pokazały, że usunięcie ich z organizmu jest w stanie złagodzić symptomy starzenia [3,4]. Dostępna wiedza pokazuje bezspornie, że u podstaw starzenia się organizmu oraz chorób wieku podeszłego leży starzenie komórek.

## ROLA STARZENIA KOMÓRKOWEGO W STARZENIU ORGANIZMU

Starzenie komórkowe dotyczy wszystkich komórek prawidłowych budujących tkanki i narządy i wiąże się ze stałym i nieodwracalnym zatrzymaniem podziałów komórki z zachowaniem jej funkcji metabolicznych [5,6]. Komórki postmitotyczne, takie jak neurony, również ulegają starzeniu, choć nie ma to związku z zahamowaniem zdolności do podziału. Starzenie komórkowe jest procesem, który nie tylko wpływa na rozwój chorób związanych z wiekiem, ale pełni również wiele ważnych funkcji fizjologicznych w organizmie. Jedną z nich jest udział w rozwoju zarodkowym. Stare komórki pojawiają się na określonych etapach i w ściśle określonych miejscach rozwijającego się zarodka, kontrolując prawidłowy przebieg organogenezy [7]. Starzenie komórkowe pełni analogiczną rolę do apoptozy, która na pewnych etapach rozwoju jest niezbędna w organogenezie. Stare komórki obserwowane w rozwoju zarodkowym charakteryzują się podwyższoną aktywnością  $\beta$  galaktozydazy związanej ze starzeniem (ang. *senescence-associated  $\beta$ -galactosidase*, SA- $\beta$ -gal) oraz wyższym poziomem białka p21 (inhibitor cyklu komórkowego). Wyciszenie p21 powodowało pewne zaburzenia w rozwoju zarodkowym myszy, wskazując, że wystąpienie starzenia komórkowego na tym etapie jest niezbędne w rozwoju organizmu. Co istotne, w takim starzeniu nie obserwuje się wzrostu poziomu białka p53 i p16 (inhibitor cyklu komórkowego), skracania telomerów ani powstawania uszkodzeń DNA. Stare komórki zostają usunięte przez komórki układu odpornościowego - makrofagi, zapewniając prawidłowy rozwój zarodka.

dr Agnieszka Gadecka<sup>1✉</sup>,

dr hab Anna Bielak-Żmijewska<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa

<sup>2</sup>Pracownia Białek Wiążących Wapń, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa

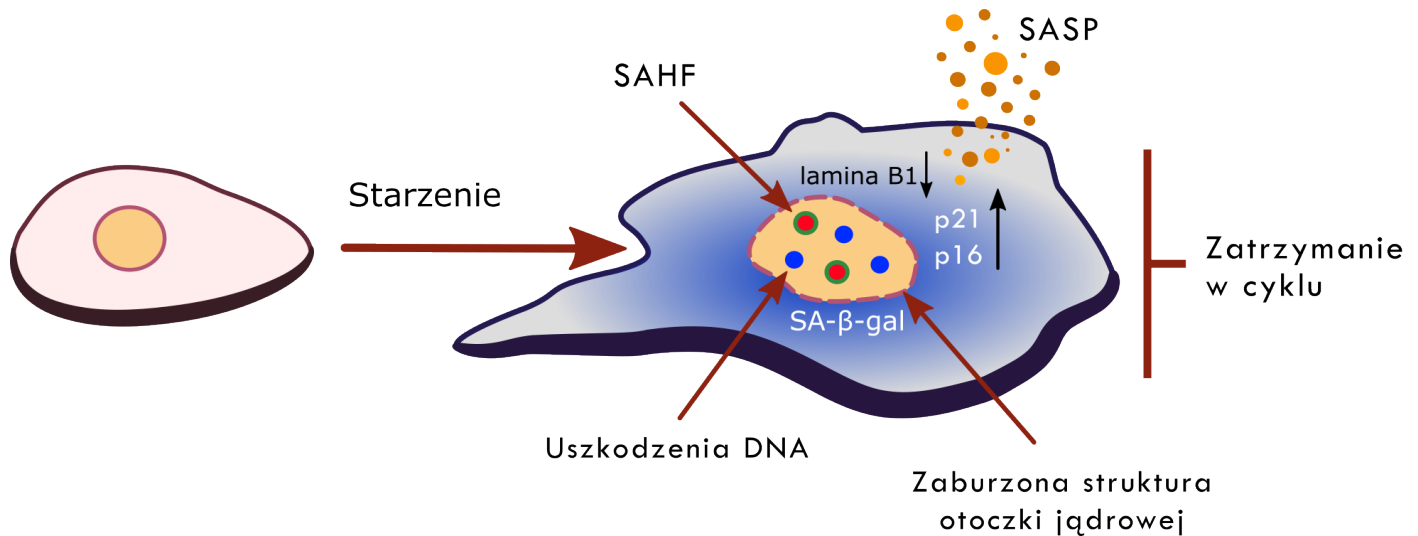
[https://doi.org/10.18388/pb.2017\\_590](https://doi.org/10.18388/pb.2017_590)

✉ autor korespondujący: a.gadecka@nencki.edu.pl

**Słowa kluczowe:** starzenie, kondensacja chromatyny, modyfikacje histonów

**Wykaz skrótów:** DDR - ścieżka odpowiedzi na uszkodzenia DNA (ang. *DNA damage response*); LAD - domeny związane z laminą (ang. *Lamina-associated domains*); NE - osłonka jądrowa (ang. *nuclear envelope*); NPC - pory jądrowe (ang. *nuclear pore complexes*); RS - starzenie replikacyjne (ang. *replicative senescence*); SA- $\beta$ -gal -  $\beta$  galaktozydaza związana ze starzeniem (ang. *senescence-associated  $\beta$ -galactosidase*); SAHF - skupiska heterochromatyny związane ze starzeniem (ang. *senescence associated heterochromatin foci*); SASP - fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem (ang. *senescence-associated secretory phenotype*); SIPS - starzenie przyspieszone indukowane stresem (ang. *stress-induced premature senescence*); TAD - domeny topologiczne (ang. *topologically associating domains*)

**Podziękowania:** Podziękowania dla Karoliny Mosieniak za graficzną oprawę rycin 2, 5, 7. Praca wsparta finansowaniem z Narodowego Centrum Nauki UMO-2016/21/B/NZ3/00370 (Anna Bielak-Żmijewska).



**Rycina 1.** Podstawowe zmiany zachodzące podczas starzenia komórkowego. W starej komórce obserwuje się podwyższony poziom uszkodzeń DNA, spadek poziomu laminy B1, dochodzi do podwyższonej ekspresji białek p21 i p16 i zatrzymania komórek w cyklu oraz wzrostu aktywności SA-β-gal. Ponadto obserwuje się lokalną kondensację chromatyny i tworzenie SAHF, znaczące zaburzenia w strukturze otoczki jądrowej oraz wzmożoną produkcję czynników zewnątrzkomórkowych, czyli SASP. Grafikę przygotowano na podstawie [8]

Starzenie komórkowe jest również kluczowe w zachowaniu prawidłowych funkcji tkanek i narządów na późniejszych etapach życia. Jest kluczowe w gojeniu się ran i naprawie uszkodzonych tkanek, zapobiegając powstawaniu zwłóknień w tkankach (blizn) [8]. Stare komórki, poprzez wytworzenie lokalnego, przejściowego stanu zapalnego (ostry stan zapalny) stymulują np. fibroblasty do migracji w miejsce uszkodzenia, dalszej proliferacji oraz przebudowy tkanki. Ostatnim etapem jest usunięcie starych komórek przez komórki układu odpornościowego, co prowadzi do regeneracji tkanki. Natomiast przewlekły stan zapalny na niskim poziomie, którego źródłem jest fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem, SASP (ang. *senescence-associated secretory phenotype*) wytwarzany przez stare komórki akumulujące się z wiekiem, uważany jest za przyczynę nie tylko starzenia organizmu, ale i rozwoju chorób związanych z wiekiem. SASP wpływa również na zmniejszenie proliferacji i indukcję starzenia fibroblastów, co w efekcie prowadzi do zahamowania odnowy tkanek w miejscu uszkodzenia, a mniej wydajnie funkcjonujący układ odpornościowy uniemożliwia usuwanie starych komórek, przedłużając tym samym czas regeneracji.

Podobnie dwojaki efekt starzenia komórkowego można zaobserwować w przypadku rozwoju nowotworu. Pierwszy z nich to efekt ochronny. Gdy w komórce dojdzie do mutacji w genach supresorowych (np.: kodujących białka p53 lub Rb) i/lub aktywacji onkogenów, wchodzi ona na drogę niekontrolowanej proliferacji. Intensywna proliferacja przy jednoczesnym nieprawidłowo działającym systemie naprawczym DNA wiąże się powstawaniem i nagromadzeniem uszkodzeń DNA. Takie komórki mogą dać początek nowotworowi. Mechanizmem, który temu zapobiega jest indukcja starzenia, któremu towarzyszy zatrzymanie podziałów komórkowych, co zapobiega namnażaniu się wadliwych komórek. Drugi efekt ma znaczenie przeciwstawne do ochrony przed rozwojem nowotworu i wiąże się ze wspieraniem proliferacji zmienionych komórek. Dzieje

się to na skutek wydzielania białek zewnątrzkomórkowych należących do SASP, które mogą wręcz stymulować komórki do podziału i metastazy, poprzez stwarzanie sprzyjającego mikrośrodowiska [5,6]. Wykazano, że wyciszenie białka PTBP1 u myszy powoduje zahamowanie wydzielania SASP, co powstrzymało dalszy rozwój raka wątroby [9]. Komórki nowotworowe utraciły zdolność do spontanicznego starzenia się. Mimo tego podjęto próby wykorzystania zjawiska starzenia komórkowego w terapii nowotworowej, gdzie za pomocą chemioterapeutyków (lub innych czynników) hamowano proliferację komórek poprzez indukcję starzenia i tym samym zatrzymano rozwój nowotworu. Jednakże prowadzone badania pokazały, że starzenie komórek nowotworowych może mieć charakter tylko przejściowy i być odwracalne.

Obecność starych komórek towarzyszy organizmowi na każdym etapie życia, jednak wydajność ich usuwania przez układ odpornościowy zmienia się wraz z wiekiem. W wyniku upośledzenia funkcji komórek układu odpornościowego odpowiedzialnych za usuwanie komórek starych, u osób w podeszłym wieku dochodzi do nagromadzenia takich komórek w tkankach i narządach, co wywołuje przewlekły stan zapalny. Proces ten jest odpowiedzialny za progresję starzenia organizmu i jest nazywany inflammaging (od ang. *inflammation* i *aging*). Prowadzi on do zwiększenia zapadalności na różne choroby związane z wiekiem. Ponadto stwierdzono, że chorobom wieku podeszłego towarzyszy nagromadzenie się komórek starych szczególnie w tkankach zmienionych chorobowo. Zaobserwowano, że usunięcie starych komórek z organizmu zwierząt niweluje negatywne skutki starzenia i poprawia ogólną kondycję fizyczną oraz funkcje poznawcze. Dlatego też komórki stare stały się celem terapeutycznym w przypadku starzenia organizmu oraz chorób wieku podeszłego [3]. Terapia polegająca na usunięciu starych komórek nazwana jest senoterapią, a związki użyte do osiągnięcia tego celu – senolitykami. Wykazano, że usunięcie starych komórek (z podwyższoną ekspresją białka p16) zarówno z organizmu myszy z progerią,

czyli zespołem przedwczesnego starzenia, jak i starych myszy typu dzikiego, przyniosło korzystny efekt na funkcjonowanie narządów wewnętrznych. Zaobserwowano zwiększenie warstwy tłuszczowej oraz grubości włókien mięśniowych, co przyczyniało się do poprawy sprawności ruchowej zwierząt. Ponadto dowiedziono, że podawanie mieszaniny związków dasatynibu i kwercetyny starym szczurom, może poprawić zdolności kognitywne, w tym pamięć, uczenie się czy orientację w terenie [10]. W związku z tym, badania nad możliwością zastosowania senolityków u ludzi stały się intensywnie rozwijaną gałęzią biogerontologii. Obecnie, prowadzonych jest już wiele badań klinicznych z udziałem senolityków, mających na celu terapię chorób związanych z wiekiem i przeciwstarzeniową [11].

Warto również dodać, że starzenie organizmu zachodzi nie tylko z wiekiem, ale może wystąpić przedwcześnie jako skutek przyspieszonego starzenia komórek. W większości przypadków przyspieszone starzenie organizmu wynika z zaburzenia funkcjonowania jądra komórkowego lub nieprawidłowej replikacji i naprawy DNA. Najlepszym dowodem na to są wady genetyczne dotyczące pojedynczych białek zaangażowanych w te procesy. Przykładem skrajnie przyspieszonego starzenia, czyli progerii, są zespoły Hutchinsona-Gilforda (ang. *Hutchinson-Gilford progeria syndrome*, HGPS), Wernera czy Cockayne. HGPS wynika z mutacji genu kodującego białko otoczki jądrowej, laminę A. Mutacja w genie kodującym helikazę Wrn odpowiedzialną za rozplatanie DNA i naprawę uszkodzeń jest przyczyną Zespołu Wernera, a upośledzony mechanizm naprawy DNA, ze względu na mutacje w genach kodujących białka CSA i CSB biorące udział w naprawie poprzez wycinanie nukleotydu z nici (NER, ang. *nucleotide-excision repair*), jest powodem zespołu Cockayne [6].

## OGÓLNE ZMIANY ZACHODZĄCE W STAREJ KOMÓRCE

Charakterystyczną cechą komórek starych jest ich zmieniająca się morfologia, cechująca się znacznym powiększeniem powierzchni oraz rozplaszczaniem komórki. Zmiany fenotypowe nie są wystarczającym wskaźnikiem zachodzącego starzenia i należy identyfikować komórki stare na podstawie zestawu znaczników. W wyniku starzenia, komórki mogą być zatrzymane albo w fazie G1 albo G2 cyklu komórkowego, co jest efektem zwiększenia ekspresji białek odpowiedzialnych za regulację cyklu. Są to inhibitory kinaz zależnych od cyklin, białko p16 oraz p21 (odpowiednio, p16<sup>INK4A</sup> i CDKN1A). W cytoplazmie można zaobserwować wzrost ziarnistości wynikającej ze zwiększonej liczby m.in. lizosomów oraz podwyższoną aktywność  $\beta$ -galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA- $\beta$ -gal). Oszacowanie aktywności tego enzymu w cytoplazmie starej komórki jest jednym z podstawowych znaczników używanym do identyfikacji większości typów starzenia komórkowego [5,6]. Jednakże nie jest to znacznik w pełni specyficzny dla starzenia komórki, gdyż w warunkach przegęszczenia hodowli komórek młodych, może dostarczać fałszywie pozytywnych wyników.

Wiele kluczowych zmian towarzyszących starzeniu zachodzi w jądrze komórkowym. Jego rozmiar powiększa się, dochodzi do zaburzeń w budowie otoczki oraz blaszki

jądrowej, a zwykle ściśle upakowana chromatyna, nazywana heterochromatyną, ulega rozluźnieniu zmieniając się w euchromatynę [12,13]. Z drugiej strony, może dochodzić do lokalnej kondensacji chromatyny i tworzenia skupisk heterochromatyny związanej ze starzeniem, czyli SAHF (ang. *senescence-associated heterochromatin foci*). Pod wpływem różnych czynników (endo- i egzogennych) dochodzi też do powstawania i akumulacji pęknięć podwójnej nici DNA. One z kolei aktywują kaskadę białek biorących udział w szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (ang. *DNA damage response*, DDR) [5]. Markerami pozwalającymi wykryć powstałe uszkodzenia jest fosforylowana forma histonu H2AX ( $\gamma$ H2AX) oraz białko 53BP1 (ang. *p53-binding protein 1*), które w formie skupisk gromadzą się wokół powstałych pęknięć. Ostatecznie sygnał jest przekazywany do białka efektorowego p53 i dochodzi do jego fosforylacji. Całkowity poziom tego białka, jak i fosforylowanej formy, znacząco wzrasta w starzeniu, co jest wykorzystywane w identyfikacji starych komórek. Powyższe zmiany to tylko część z tych zachodzących w jądrze komórkowym podczas starzenia, a szczegółowy opis tych zmian znajduje się w dalszej części pracy.

Podczas starzenia, oprócz DNA jądrowego (ang. *nuclear DNA*, nDNA), uszkodzeniom ulega również DNA mitochondrialne (mtDNA) [14]. Przyczynia się do tego wzrost poziomu i akumulacja reaktywnych form tlenu (RFT) w mitochondriach, co skutkuje uszkodzeniami organelli komórkowych oraz zwiększa ryzyko dalszych uszkodzeń DNA (mtDNA, a nawet nDNA) i mutacji. Dochodzi wówczas do upośledzenia funkcji mitochondriów, a wydajność degradacji wadliwych organelli w komórce (mitofagii) ulega znaczącemu zmniejszeniu.

Zmiany zachodzące w jądrze komórkowym mają swoje odzwierciedlenie w ekspresji genów. Jednym z ważnych elementów jest zwiększona synteza białek wydzielanych przez komórki, co skutkuje zmianami w profilu wydzielniczym [5]. Zatem istotnym markerem staje się poziom i skład wydzielanych białek, które określa się jako fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem, SASP (ang. *senescence-associated secretory phenotype*). Do tego typu białek zaliczają się interleukiny (IL-1, IL-6, IL-8), chemokiny (CXCL, CCL), czynniki wzrostu (VEGF, czynnik wzrostu śródbłonnka naczyń – ang. *vascular endothelial growth factor*; EGF, nabłonkowy czynnik wzrostu – ang. *epidermal growth factor*), nierozpuszczalne białka macierzy zewnątrzkomórkowej (fibronektyna, kolagen) i inne. Wiele z nich działa parakrynnie na otaczające komórki i wpływa na mikrośrodowisko tkanek, przynosząc efekt zarówno pozytywny jak i negatywny. W niektórych przypadkach SASP może działać jako sygnał naprawczy stymulujący komórki układu immunologicznego do usuwania uszkodzonych lub starych komórek. Z drugiej strony, nadmiar wydzielanych czynników prozapalnych wywołuje przewlekły stan zapalny, który może przyczyniać się do przyspieszonego starzenia komórkowego, pogorszenia funkcji tkanek, a w rezultacie ogólnego stanu zdrowia oraz rozwoju chorób wieku podeszłego [15].



## RODZAJE STARZENIA KOMÓRKOWEGO I ZWIĄZANE Z NIMI ŚCIEŻKI SYGNAŁOWE

Pierwsze doniesienie dotyczące starzenia komórkowego pojawiły się w 1961 roku, kiedy Leonard Hayflick i Paul Moorhead zauważyli zatrzymanie podziałów fibroblastów w hodowli, które nie wynikało z warunków mogących powodować stres. Wynioskowali oni, że doszło do wyczerpania zdolności komórek do podziałów, a zjawisko nazwano limitem Hayflicka [4]. Określa on maksymalną liczbę podziałów jaką może przejść komórka, zanim ulegnie starzeniu. Limit ten jest silnie zależny od typu komórki i dotyczy jedynie zdolnych do podziału komórek zróżnicowanych, gdyż uważa się, że komórki macierzyste, podobnie jak nowotworowe, są zdolne do nieograniczonej proliferacji. Nie znaczy to jednak, że komórki macierzyste i nowotworowe nie starzeją się. Może do tego dojść spontanicznie w przypadku komórek macierzystych lub na skutek indukcji starzenia w komórkach nowotworowych.

Gdy komórki wyczerpią swój potencjał do podziału, ulegają starzeniu replikacyjnemu (RS). Główną przyczyną i zarazem cechą charakterystyczną tego procesu jest krytyczne skrócenie telomerów znajdujących się na końcach chromosomów, tworzących swego rodzaju „replikometr” kontrolujący liczbę podziałów komórkowych [16]. Telomery zbudowane są z tysięcy powtórzeń krótkiej sekwencji TTAGGG i wraz z białkami zwanymi szelterynami (ang. *shelterins*) tworzą dwie pętle D i T. Dzięki temu telomery zachowują swoją stabilną strukturę i chronią chromosomy przed łączeniem się ze sobą. Do skracania telomerów dochodzi podczas podziałów komórkowych na skutek tzw. problemu końca replikacji. Synteza nowej nici za pomocą polimerazy DNA zawsze odbywa się w kierunku od 3' do 5' końca. W związku z tym, replikacja nici wiodącej jest ciągła i zachodzi w całej nici, zaś nić opóźniona jest dobudowywana krótkimi odcinkami nukleotydów nazywanymi fragmentami Okazaki. Proces rozpoczyna się od dołączenia starterów RNA, a między nimi dochodzi do syntezy DNA. w kolejnym kroku startery są usuwane, a fragmenty łączone ze sobą, co prowadzi do skrócenia nici na jednym z końców. Komórki somatyczne nie mają zdolności do odbudowy brakujących sekwencji telomerowych, ponieważ poziom odpowiedzialnego za ten proces enzymu telomerazy, spada wraz z wiekiem. Gdy dochodzi do krytycznego skrócenia telomerów jest to odczytywane jako uszkodzenie DNA i skutkuje aktywacją ścieżki DDR i komórka ulega starzeniu.

Drugim rodzajem jest starzenie przyspieszone indukowane stresem, SIPS (ang. *stress-induced premature senescence*). Uważa się, że jest ono niezależne od skracania telomerów, choć istnieją badania pokazujące, że pod wpływem stresu oksydacyjnego może dojść do ich skrócenia i uszkodzenia [6]. W przeciwieństwie do starzenia replikacyjnego, SIPS zachodzi znacznie szybciej. Do czynników wywołujących starzenie przyspieszone możemy zaliczyć reaktywne formy tlenu, promieniowanie gamma i UV oraz związki uszkadzające DNA. Starzenie może też być wywołane zwiększoną ekspresją onkogenów w komórce, OIS (ang. *oncogene-induced senescence*), a przykładowymi białkami związanymi z tym procesem są białko Ras, BRAF czy c-Myc [17]. SIPS może być również wywołane w komórkach nowotworo-

wych, które z racji nabycia zdolności do nieograniczonych podziałów utraciły zdolność do spontanicznego starzenia. Starzenie takich komórek może być efektem terapii przeciwnowotworowej (ang. *therapy-induced senescence*, TIS), najczęściej pod wpływem związków uszkadzających DNA. Wiele bodźców indukujących SIPS działa poprzez uszkodzenie DNA. W komórce dochodzi do akumulacji nienaprawionych uszkodzeń DNA, a co za tym idzie aktywacji ścieżki odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Oba typy starzenia aktywują tę samą ścieżkę sygnałową w odpowiedzi na przerwanie ciągłości nici DNA, co w większości przypadków jest bezpośrednią przyczyną starzenia, ale znane są również sytuacje, gdy komórka mimo braku uszkodzeń DNA wchodzi na drogę starzenia [18].

W miejsce uszkodzenia DNA jako pierwsze rekrutowane są białka rozpoznające i zabezpieczające miejsce pęknięcia DNA, do których należą białka kompleksu MRN (MRE11, RAD50, NBS), 911 (RAD9, HUS1, RAD1) oraz białka RPA i RFC [18]. Sygnał informujący o powstałym uszkodzeniu jest przekazywany do kinaz ATM (ang. *Ataxia telangiectasia mutated*) i ATR (ang. *Ataxia telangiectasia and Rad3 related*), które fosforylują histon H2AX na serynie 139. Ufosforylowany H2AX, zwany  $\gamma$ H2AX, tworzy skupiska w okolicy pęknięć DNA i przyczynia się do stabilizacji tworzącego się kompleksu naprawczego, co umożliwia rekrutację białek odpowiedzialnych za przemodelowanie chromatyny. W związku z tym w okolicach pęknięć może dochodzić do lokalnej kondensacji chromatyny bogatej w trimetylowaną lizynę 9 histonu H3 (H3K9me3). Modyfikacja ta służy za miejsce przyłączenia acetylotransferazy Tip60, która poprzez przyłączenie grupy acetylowej do ATM wpływa na aktywację tego białka [19]. Pojawienie się H3K9me3 jest krótkotrwałe, aby zbyt długa kondensacja chromatyny w okolicy uszkodzeń nie uniemożliwiła dostępu maszynerii naprawczej szlaku DDR. Usunięcie grup metylowych i rozluźnienie chromatyny pozwalają na przyłączenie się 53BP1, które dalej przekazuje sygnał białkom odpowiedzialnym za naprawę DNA oraz kinazom punktu kontrolnego cyklu komórkowego (CHK1 i CHK2 – ang. *checkpoint kinase 1 and 2*). Końcowym etapem ścieżki sygnalizacyjnej jest aktywacja i stabilizacja białka p53, m.in. przez jego acetylację na lizynie 382 i fosforylację na serynie 15, oraz synteza białka p21, co w efekcie prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego. Na tym etapie komórka może podjąć jedną z trzech decyzji, które zależą od zakresu uszkodzeń. Jeśli jest ich niewiele, dochodzi do ich naprawy. Natomiast w przypadku zbyt licznych pęknięć, gdy komórka nie jest w stanie ich naprawić, dochodzi do stałego zatrzymania podziałów, czyli starzenia komórkowego lub komórka kierowana jest na ścieżkę apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki. Apoptoza indukowana jest zwłaszcza gdy uszkodzenia dotyczą miejsc kodujących kluczowe dla funkcjonowania komórki geny.

Obok szlaku DDR, istotną rolę w indukcji starzenia pełni ścieżka z udziałem białka Rb (ang. *retinoblastoma protein*) i aktywacja inhibitora kinaz zależnych od cyklin, p16 [4,5]. W wyniku aktywacji białka Rb (defosforylacji) dochodzi do przemodelowania struktury chromatyny przy wykorzystaniu enzymów odpowiedzialnych za modyfikacje epigenetyczne. W początkowej fazie, wyższy poziom białka

p16 blokuje kinazy CDK4/6 (ang. *cyclin-dependent kinase*) odpowiadające za fosforylację, czyli inaktywację białka Rb. Rb w hipofosforylowanej formie wiąże się z czynnikiem transkrypcyjnym E2F (ang. *E2 transcription factor*), odgrywającym ważną rolę w podziale komórkowym. Prowadzi to do zatrzymania komórek w fazie G1 i zahamowania proliferacji.

Uruchomienie powyższych ścieżek sygnałowych jest niezbędne do zainicjowania starzenia w wielu typach komórek. Wzrost poziomu białek zaangażowanych w ten proces (m.in.: p53, p21, p16) towarzyszy starzeniu komórkowemu w hodowlach *in vitro*, oraz *in vivo* w tkankach starzejących się organizmów, w tym ludzi. Dzięki temu poziom tych białek jest jednym z istotnych markerów używanych do identyfikacji komórek starych.

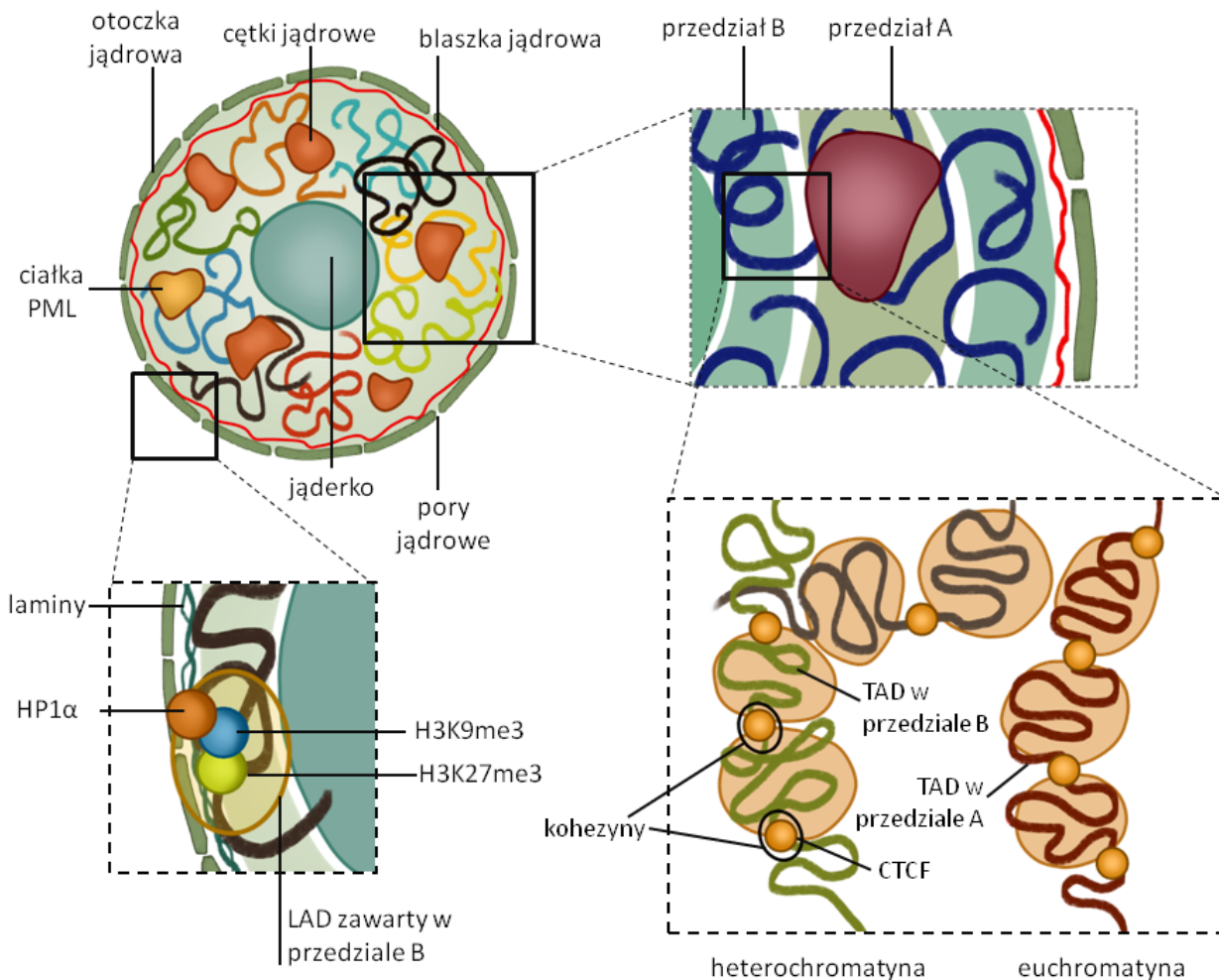
O ile starzenie replikacyjne jest naturalnym zjawiskiem, to starzenie przyspieszone jest wynikiem działania szkodliwych czynników zewnętrznych lub wewnętrznych. W związku z tym prawidłowa identyfikacja przyczyny mogłaby pomóc w ocenie wpływu leków i środowiska na tempo starzenia komórkowego, co w konsekwencji pozwoliłoby uniknąć efektów ubocznych wynikających z przyspieszonego starzenia organizmu.

## STRUKTURA JĄDRA KOMÓRKOWEGO ORAZ REGULACJA UPAKOWANIA CHROMATYNY W WARUNKACH FIZJOLOGICZNYCH

### ARCHITEKTURA JĄDRA KOMÓRKOWEGO

Jądro ma niezwykle dynamiczną i plastyczną strukturę podlegającą ciągłym zmianom zarówno w kształcie jak i sprężystości, co jest obserwowane zarówno w trakcie cyklu komórkowego, migracji jak również pod wpływem czynników stresowych. Wiele zmian, obserwowanych w progerii jak i starzeniu chronologicznym zachodzi na poziomie jądra komórkowego. Dlatego też poznanie ich jest kluczowe w zrozumieniu tego procesu.

Jądro jest największym organelum znajdującym się w centralnej części komórki i to tutaj, zamknięty w podwójnej błonie lipidowo-białkowej, znajduje się materiał genetyczny, a ekspresja kodowanych przez niego genów wpływa na wszystkie procesy komórkowe. Jest to możliwe dzięki skoordynowanej współpracy różnych wyspecjalizowanych enzymów oraz białek strukturalnych odpowiedzialnych za organizację architektury jądra i regulację ekspresji genów. Jądro komórkowe jest oddzielone od cytoplazmy podwójną błoną lipidowo-białkową, nazywaną otoczką jądrową (ang. *nuclear envelope*, NE) (Ryc. 2). W otoczce znajdują się liczne



Rycina 2. Budowa jądra komórkowego oraz organizacja przestrzenna chromatyny. Szczegółowo omówione w tekście. Zmodyfikowano na podstawie [22]

białka międzybłonowe, w tym białka tworzące pory jądrowe (ang. *nuclear protein complex*, NPC), czyli nukleoporyny [20,21]. Główną funkcją kanału zbudowanego z nukleoporyn jest umożliwienie transportu białek, jonów czy innych cząsteczek oraz zapewnienie sprawnej komunikacji między wnętrzem jądra a cytoplazmą komórki. Duże białka, czyli o masie powyżej 40 kDa wymagają transportu aktywnego. Jest to możliwe dzięki krótkim sekwencjom sygnałowym obecnym w strukturze tych białek: NLS (ang. *nuclear localization signal*) oraz NES (ang. *nuclear export signal*). Fragmenty te są rozpoznawane przez białka importyny i eksportyny, które kontrolują sprawne przemieszczanie się białek przez błonę. Sama otoczka jądrowa składa się z błony zewnętrznej (ang. *outer nuclear membranę*, ONM), połączonej z szorstką siateczką śródplazmatyczną, w której odbywa się synteza i fałdowanie białek oraz błony wewnętrznej (ang. *inner nuclear membranę*, INM), będącej w stałym kontakcie z nukleoplazmą. Ponadto INM pozostaje w bliskim kontakcie z blaszką jądrową (ang. *lamina*), dzięki której jądro zachowuje swój kształt, a za pośrednictwem tworzących ją lamin uczestniczy w organizacji struktury chromatyny oraz prawidłowym utrzymaniu porów jądrowych w otoczce [21].

Blaszkę jądrową tworzą włókna białkowe należące do filamentów pośrednich, a w ich skład wchodzi trzy typy lamin: A, B oraz C. Lamin A i C (będące dwoma różnymi formami splicingowymi genu *LMNA*) wyrażane są głównie w zróżnicowanych komórkach, natomiast lamina B jest obecna na wszystkich etapach rozwoju komórki. Lamin są miejscem zakotwiczenia fragmentów skondensowanej chromatyny, tworząc tak zwane domeny związane z laminą (LAD, ang. *Lamina-associated domains*) (Ryc. 2) [22,23]. Są to transkrypcyjnie nieaktywne obszary wzbogacone w H3K9me3 (trimetylowana lizyna 9 histonu 3) i związane z nim białko HP1 $\alpha$  oraz H3K27me3 (trimetylowana lizyna 27 histonu 3, szczegółowo omówione w dalszych rozdziałach). Do interakcji z chromatyną dochodzi za pomocą białek zawierających w swojej strukturze domenę LEM (ang. *LAP2-emerin-MAN1*) oraz poprzez interakcję z receptorem lamin B (LBR, ang. *Lamin B receptor*).

W interfazowym jądrze struktura chromatyny jest wysoce uorganizowana i przybiera ściśle określoną konformację. Po zakończeniu podziału każdy chromosom zajmuje „swoje miejsce” w przestrzeni jądrowej [22]. Małe chromosomy oraz obszary aktywne transkrypcyjnie najczęściej lokują się w środkowej części, natomiast miejsca nieaktywnej transkrypcji oraz większe chromosomy gromadzą się na peryferiach jądra. Biorąc pod uwagę miejsca aktywnej i nieaktywnej transkrypcji, chromatynę można umownie podzielić na dwa odrębne obszary: przedział A, aktywny obszar genomu zawierający euchromatynę oraz bardziej skondensowany i nieaktywny przedział B bogaty w heterochromatynę [24]. Wewnątrz przedziału A spotkamy miejsca bogate w grupy acetylowe oraz znaczniki promujące ekspresję genów. Tam też dochodzi do częstszych interakcji między DNA a białkami znajdującymi się w tym rejonie. Natomiast obszary przedziału B zwykle gromadzą się na peryferiach jądra i często pokrywają się z wcześniej opisanymi strukturami LAD. Wyższy poziom uorganizowania przestrzennego chromatyny to domeny TAD (ang. *topologically-associating domains*). Są to fragmenty chromatyny tworzące obszary ograniczo-

ne kohezynami i białkiem CTCF (ang. *CCCTC-binding factor*) (Ryc. 2), a formowane przez nie charakterystyczne pętle umożliwiają interakcję oddalonych od siebie regionów DNA i wpływając na regulację ekspresji genów.

Kolejną strukturą znajdującą się w jądrze jest jąderko (jedno lub kilka), którego średnica może osiągać 8  $\mu$ m. Wewnątrz jąderka znajdują się kwasy nukleinowe i specyficzne białka, tam też zachodzi synteza rybosomalnego RNA oraz powstają rybosomy. Jąderko, obok ciałek jądrowych, czyli ciałek PML (ang. *promyelocytic leukemia nuclear bodies*), cętek jądrowych (ang. *nuclear speckles*), ciałek PcG (ang. *polycomb-group proteins*) i ciałek Cajala, należy do struktur bezbłonowych zawieszonych w nukleoplazmie [25]. Ciałka PML to dynamiczne struktury związane z regulacją różnorodnych procesów komórkowych, w tym ekspresji genów, odpowiedzi na stres, naprawy uszkodzeń DNA czy regulacji cyklu komórkowego. Tak wszechstronna funkcja możliwa jest dzięki obecności licznych białek wchodzących w ich skład. Oprócz białka rdzeniowego, czyli PML, można w nich spotkać np. białko Sp100, SUMO, DAXX, HP1 $\alpha$  i wiele innych. Ciałka PML stanowią pewnego rodzaju rezerwuar, w którym białka mogą przebywać czasowo, aż do momentu zapotrzebowania w danym procesie. Na przykład białka takie jak kinaza ATR, CHK2, BLM, RPA czy MRE11 po wystąpieniu uszkodzeń DNA, dysocjują z ciałek, aby wziąć udział w naprawie. Ponadto skład ciałek PML oraz ich liczba zmienia się w zależności od cyklu komórkowego, a same skupiska ulegają przemodelowaniu w konkretnych fazach cyklu oraz podczas stresu komórkowego, jakim jest np. uszkodzenie DNA, szok cieplny czy promieniowanie UV i gamma. Cętki jądrowe, nazywane też plamkami jądrowymi, są zawieszane w przestrzeni międzychromatynowej, niezwierającej DNA i na ich terenie wykrywane są czynniki uczestniczące w składaniu mRNA. Są to małe jądrowe nukleoproteiny (ang. *small nuclear ribonucleoprotein*, snRNP) oraz białka SR, czyli białka bogate w serynę i argininę (ang. *serine-arginine rich proteins*). Ciałka PcG to wielobiałkowe kompleksy, które mogą brać udział w przemodelowaniu struktury chromatyny oraz wyciszaniu genów, a ciałka Cajala uczestniczą w procesie wycinania intronów w trakcie dojrzewania RNA.

## MODYFIKACJE EPIGENETYCZNE DNA I HISTONÓW

Jądro komórki eukariotycznej mierzy między 5 a 20  $\mu$ m średnicy [21], a zawarty w nim materiał genetyczny w postaci dwuniciowego DNA w rozwiniętej, liniowej postaci osiągnąłby ok. 2 metry długości. Aby całe DNA mogło pomieścić się w tak ograniczonej przestrzeni, musi zostać odpowiednio upakowane. Dzieje się to dzięki szeregowi mechanizmów modulujących kondensację i strukturę przestrzenną chromatyny. Ponadto, chromatyna musi podlegać dynamicznej regulacji umożliwiającej rozpoczęcie lub zahamowanie transkrypcji, a takimi skutecznymi regulatorami są modyfikacje epigenetyczne. Termin „epigenetyka” został po raz pierwszy użyty i zarazem stworzony przez embriologa Conrada Waddingtona na początku lat 40. XX wieku i opisywał pozagenowe mechanizmy prowadzące do różnicowania komórek [26]. W trakcie swojej pracy nad zarodkami muszki *Drosophila melanogaster*, Waddington zauważył, że poprzez modulację środowiskowe można wpływać na fenotyp rozwijających się owadów. Uzyskane wyniki su-



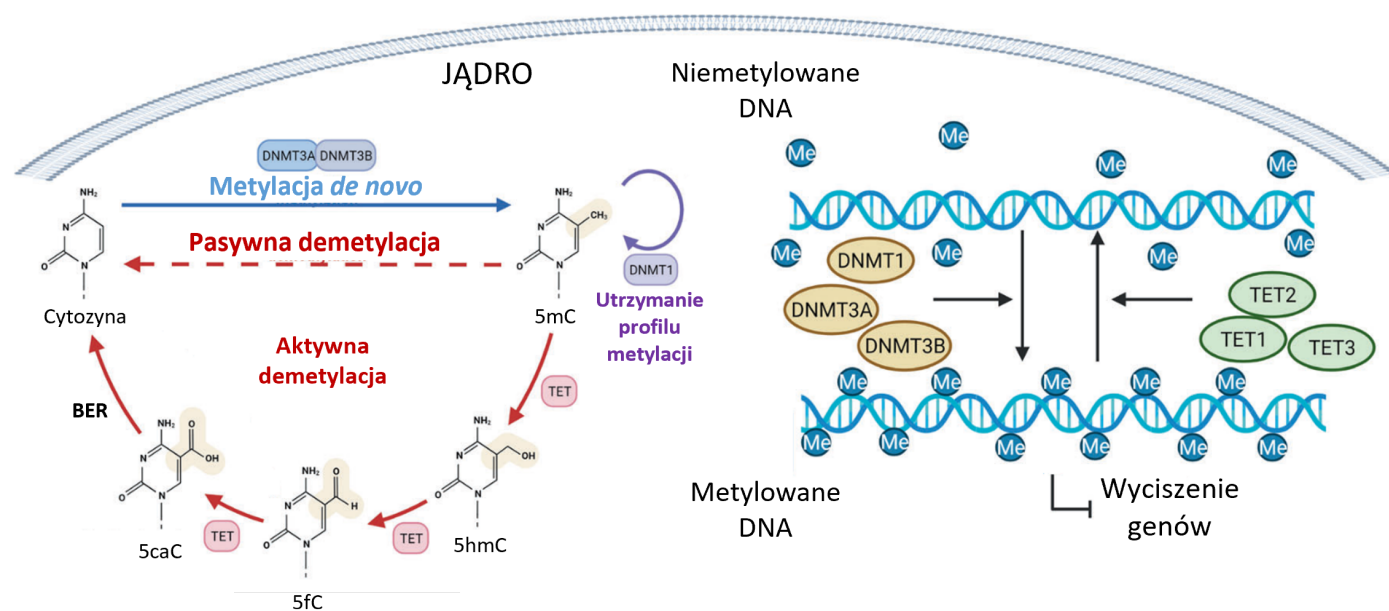
gerowały, że czynniki zewnętrzne działające na zarodek, wpływają jedynie na kierunek różnicowania komórek i przybieranie określonego fenotypu. Dokładny mechanizm epigenetycznej regulacji genów długo pozostawał zagadką. Wraz z postępem badań w tej dziedzinie, definicja epigenetyki kilkukrotnie zmieniała się, aby ostatecznie przybrać formę „badania dziedzicznych i środowiskowych zmian w funkcji genu, które nie pociągają za sobą żadnych zmian w sekwencji DNA” [27]. Obecnie wiadomo, że do takich modyfikacji zalicza się między innymi metylację DNA oraz potranslacyjne modyfikacje histonów (ang. *post-translational modifications*, PTMs). Charakterystyczną cechą obu sposobów regulacji jest ich wysoka specyficzność tkankowa oraz potencjalna odwracalność, co czyni je atrakcyjnym celem terapeutycznym w leczeniu wielu schorzeń, ale również w opóźnieniu procesu starzenia [28]. Dodatkowym, dość niedawno odkrytym sposobem regulacji ekspresji genów jest kontrola ich translacji przez niekodujące RNA, jak np. mikroRNA (miRNA) [5].

Na skutek przebudowy chromatyny dochodzi do zmniejszonej ekspresji genów. Regulacja struktury chromatyny i ekspresji genów zachodzi dzięki skoordynowanej współpracy białek, które ze względu na swoją funkcję można podzielić na enzymy wprowadzające (ang. *writers*), usuwające (ang. *erasers*) oraz białka rozpoznające (ang. *readers*) konkretne modyfikacje na DNA lub histonach [13,29]. Do najważniejszych modyfikacji regulujących ekspresję genów należy metylacja i acetylacja, a do enzymów wprowadzających te grupy funkcyjne zalicza się metylotransferazy DNA – DNMTs (ang. *DNA methyltransferases*), metylotransferazy histonów – HMTs (ang. *histone methyltransferases*) i acetylotransferazy histonów – HATs (ang. *histone acetyltransferases*). Odwrotną rolę pełnią demetylasy DNA (ang. *DNA demethylases*), demetylasy histonów – HDMs (ang. *histone demethylases*) oraz deacetylasy histonów – HDACs (ang. *histone deacetylases*). Z kolei do białek odczytujących należą takie, które w swojej budowie posiadają domeny o wyso-

kim powinowactwie do zmodyfikowanych miejsc i poprzez aktywne przyłączanie determinują wynik transkrypcji. Domeny rozpoznające metylowane histony obejmują m.in. domeny chromo (ang. *chromo domain*, CD), PHD, WD40, Tudor, MBT, BAH i inne, podczas gdy acetylacja histonów jest rozpoznawana przez domeny bromo i tandemowe domeny PHD. Co ważne, białka odczytujące mogą celować w wiele PTMs w obrębie histonu, nukleosomu, a nawet wielu nukleosomów, a ich działanie może być kontrolowane przez niekodujące RNA. Co więcej, białka te mogą rekrutować czynniki zaangażowane w transkrypcję, replikację lub naprawę uszkodzeń DNA.

## METYLACJA DNA

Jednym z głównych i zarazem najlepiej poznanych mechanizmów modyfikacji epigenetycznych DNA jest metylacja, która związana jest z wyciszeniem ekspresji genów (Ryc. 3). Jest to modyfikacja bardzo trwała, a jej wzór jest dziedziczony przez komórki potomne. Metylacja zachodzi przy udziale metylotransferaz DNA, gdzie grupa metylowa z S-adenozylometioniny (SAM) jest przenoszona na piątą pozycję pierścienia cytozyny w obrębie dinukleotydu CpG (ang. *Cytosine-guanine dinucleotide*). Do tej pory zidentyfikowano trzy główne białka odpowiedzialne za metylację DNA. Są to metylotransferazy DNMT1, DNMT3a oraz DNMT3b. DNMT1 jest odpowiedzialna za dokładne odwzorowanie profilu metylacji na nowo syntetyzowanym DNA w oparciu o nić matrycową i pomaga utrzymać ciągłość wzoru metylacji w komórkach potomnych [30]. Natomiast enzymy DNMT3a i DNMT3b przeprowadzają metylację *de novo*, czyli koordynują umiejscowienie grupy metylowej w nowych miejscach w genomie zawierających dinukleotyd CpG. Dinukleotyd ten może występować na długości całego genomu, lecz najczęściej spotyka się go w okolicach promotorów genów, gdzie grupuje się w tzw. wyspy CpG (ang. *CpG islands*) [31]. W zależności od stopnia metylacji cytozyny w rejonach wysp, DNA może być hipo-



Rycina 3. Schemat przedstawiający proces metylacji i demetylacji DNA. Po lewej zamieszczono etapy pasywnej i aktywnej demetylacji zachodzącej na cytozynie, a po prawej ogólną zasadę działania metylacji i jej efekt na ekspresję genów (szczegóły w tekście). Zmodyfikowano na podstawie [32]

lub hipermetylowane, co wpływa na ekspresję genów. Hipometylacja skutkuje aktywną transkrypcją, zaś hipermetylacja, wyciszeniem genów. W ludzkim genomie od 60 do 80% wszystkich miejsc występowania CpG pozostaje silnie zmetylowanych, z wyjątkiem wysp CpG, co powoduje aktywną transkrypcję. Jednakże w warunkach patologicznych oraz w procesie starzenia się organizmu wyspy CpG mogą mieć zmieniony wzór metylacji. Wraz z upływem lat obserwuje się globalną utratę metylacji w genomie, jednocześnie ze zwiększoną hipermetylacją promotorów genów kodujących białka niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania komórek lub kodujących wybrane czynniki transkrypcyjne. Prowadzi to do istotnych zmian w profilu ekspresji genów w porównaniu z młodym organizmem. Co ciekawe, zaobserwowane zmiany przyczyniły się do opracowania zegarów epigenetycznych opartych na ocenie profilu metylacji specyficznych miejsc w DNA. Dzięki nim można oszacować wiek biologiczny człowieka, który może być różny od wieku chronologicznego, określić tempo starzenia się organizmu, zidentyfikować podatność na pewne schorzenia a nawet prognozować długość życia [31].

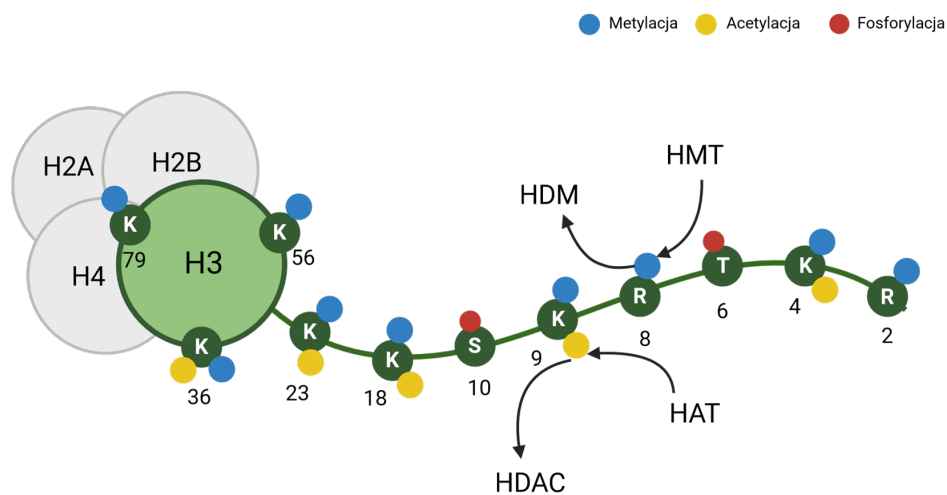
Procesem przeciwnym do metylacji jest demetylacja. Może ona zachodzić pasywnie podczas mitozy, gdy wskutek zaburzonej pracy DNMT1 nie dochodzi do nałożenia grupy metylowej na nowopowstałą nić DNA (Ryc. 3). Drugim sposobem jest aktywna demetylacja przeprowadzana przez enzymy TET (ang. *ten-eleven translocation*) i często zachodzi niezależnie od podziałów komórkowych. Do rodziny enzymów TET należą trzy izoformy: TET1, TET2 i TET3 [30, 33]. W wyniku ich działania metylowana cytozyna zostaje stopniowo utleniana do 5-hydroksymetylocytozyny (5hmC), 5-formylocytozyny (5fC) i 5-karboxymetylocytozyny (5caC), co ostatecznie kończy się usunięciem zmodyfikowanej zasady poprzez mechanizm BER (ang. *base excision repair*) lub dekarboksylację. Sposób w jaki proces demetylacji DNA przebiega *in vivo* jest jednak nadal przedmiotem szeroko zakrojonych badań. Do tej pory pokazano, że komórki budujące różne tkanki wydają się gromadzić 5hmC, a wzbogacenie jest zwykle obserwowane w okolicy promotorów określonych genów. Wskazuje to, że 5hmC służy nie tylko jako półprodukt w aktywnej demetylacji DNA, ale może

również stanowić odrębny epigenetyczny znak regulacyjny kontrolujący ekspresję genów.

#### POTRANSLACYJNE MODYFIKACJE HISTONÓW

Regulacja upakowania chromatyny odbywa się również przy udziale potranslacyjnych modyfikacji białek histonowych [5,13,34]. Podstawową jednostką strukturalną chromatyny jest nukleosom, składający się z łańcucha DNA zbudowanego z 147 par zasad, nawiniętego na osiem cząstek histonów. DNA upakowane w formie nukleosomów tworzy struktury wyższego rzędu, które są stabilizowane przez dodatkowy histon łącznikowy H1. Oktamer histonowy zbudowany jest z dwóch kopii kanonicznych histonów H2A, H2B, H3 oraz H4, a każdy z nich (z wyjątkiem H4) występuje również w postaci wariantów. Warianty różnią się sekwencją aminokwasów i mogą być syntetyzowane niezależnie od replikacji DNA, zarówno w komórkach mitotycznych jak i postmitotycznych. W ciągu życia komórki może dochodzić do wymiany histonów w nukleosomie, a proces ten dotyczy głównie histonów kanonicznych. Mogą być one wymieniane na nowe białka tego samego typu lub na wspomniane warianty. Ważną cechą wszystkich histonów jest ich podatność na modyfikacje, które umiejscawiane są na tzw. ogonach (ang. *histone tails*), czyli N-końcach białek, wystających ponad rdzeniową część histonów. Tym sposobem tworzą łatwo dostępne miejsce dla enzymów dodających bądź usuwających dane modyfikacje z reszt aminokwasowych (np. lizyny, arginy lub seryny) (Ryc. 4). Najwięcej miejsc możliwych do modyfikacji znajduje się w obrębie histonu H3. Do najczęściej przyłączanych cząsteczek należą grupy metylowe, acetylowe, fosforanowe lub niskocząsteczkowe białko jakim jest ubikwityna. W niniejszej pracy, skupiono się głównie na badaniu roli metylacji i acetylacji lizyn.

W wyniku działania enzymów odpowiedzialnych za PTM dochodzi do przekształcenia struktury przestrzennej chromatyny. Jak wspomniano, chromatyna może przybierać dwie główne formy: skondensowaną i niedostępną dla procesu transkrypcji, hipermetylowaną heterochromatynę lub rozluźnioną i aktywną transkrypcyjnie euchromatynę, przeważnie bogatą w grupy acetylowe. Ponadto hetero-



**Rycina 4.** Potranslacyjne modyfikacje histonu H3 oraz enzymy odpowiedzialne za dodanie lub usunięcie grupy acetylowej i metylowej z danej reszty aminokwasowej. Szczegółowo omówione w tekście. Rycina przygotowana za pomocą oprogramowania Biorender.



chromatynę można podzielić na konstytutywną oraz fakultatywną, zależnie od miejsca występowania w genomie oraz podatności na działanie enzymów modułujących. Heterochromatyna konstytutywna pełni kluczową rolę w utrzymaniu stabilności i integralności genomu i jest stale obecna w komórce niezależnie od cyklu komórkowego. Najczęściej spotyka się ją w obszarach centromerów i telomerów, jak również w rejonach niezawierających genów. Dla odmiany heterochromatyna fakultatywna jest dynamiczna i ulega aktywnej regulacji, pojawia się w jądrze komórkowym okresowo, zwłaszcza w rejonach genów ulegających tymczasowemu wyciszeniu. Każdy rodzaj chromatyny charakteryzuje się specyficznymi modyfikacjami.

## METYLACJA HISTONÓW

Spośród wszystkich poznanych modyfikacji histonów, metylacja wydaje się pełnić jedną z najważniejszych ról w regulacji ekspresji genów. Tak jak w przypadku metylacji DNA, grupa metylowa jest przenoszona z cząsteczki SAM na łańcuch boczny lizyny, za pomocą enzymów HMT. W wyniku ich działania, łańcuch boczny aminokwasu ulega mono-, di- lub trimetylacji, a za każdy etap odpowiedzialne są białka specyficzne dla poszczególnych lizyn (Tabela 1) [35].

O ile w przypadku DNA metylacja jest związana z represją genów, to w przypadku histonów może wpływać zarówno na wyciszenie jak i aktywację transkrypcji i jest to zależnie od lokalizacji modyfikowanej lizyny na ogonie histonu. Przykładem aktywnego znacznika obecnego na histonie H3 jest monometylowana lizyna 4 (H3K4me1). Modyfikacja ta jest znajdowana w histonach, które łączą się z enhancerami (czyli regionach dystalnych) genów, trimetylowana lizyna 4 (H3K4me3), której wzbogacenie występuje głównie w miejscach promotorowych, trimetylowana lizyna 36 (H3K36me3), która znajduje się w egzonach oraz di- i trimetylowana lizyna 79 (H3K79me2/3), która może występować w całym obszarze kodujących genów [33]. Za powstanie skondensowanej chromatyny, a tym samym wyciszenie wybranych genów odpowiedzialna jest głównie trimetylacja lizyny 9 (H3K9me3) oraz 27 (H3K27me3). H3K9me3 najczęściej spotykana jest w promotorach oraz ciałach nieaktyw-

nych genów, tworząc heterochromatynę fakultatywną. Ponadto jest niezbędna modyfikacją tworzącą heterochromatynę konstytutywną stabilizującą strukturę chromatyny w rejonach centromerów oraz telomerów. Z kolei H3K27me3 jest związana głównie z powstawaniem heterochromatyny fakultatywnej oraz częściową inaktywacją dodatkowego chromosomu X w żeńskich komórkach, tworząc tak zwane ciało Barra. Co istotne, w zarodkowych komórkach macierzystych dochodzi do akumulacji H3K27me3 w miejscach promotorowych niektórych genów, które wraz z H3K4me3 tworzą domeny biwalentne. To unikalne miejsce tworzy pewnego rodzaju stan „niezdecydowania” komórkowego. Równoczesna obecność sygnału aktywacji (H3K4me3) i represji (H3K27me3) genów wskazuje na obszary będące na granicy ekspresji i wyciszenia. Miejsca biwalentne pełnią znaczącą rolę w procesie różnicowania komórek i rozwoju zarodkowym [36].

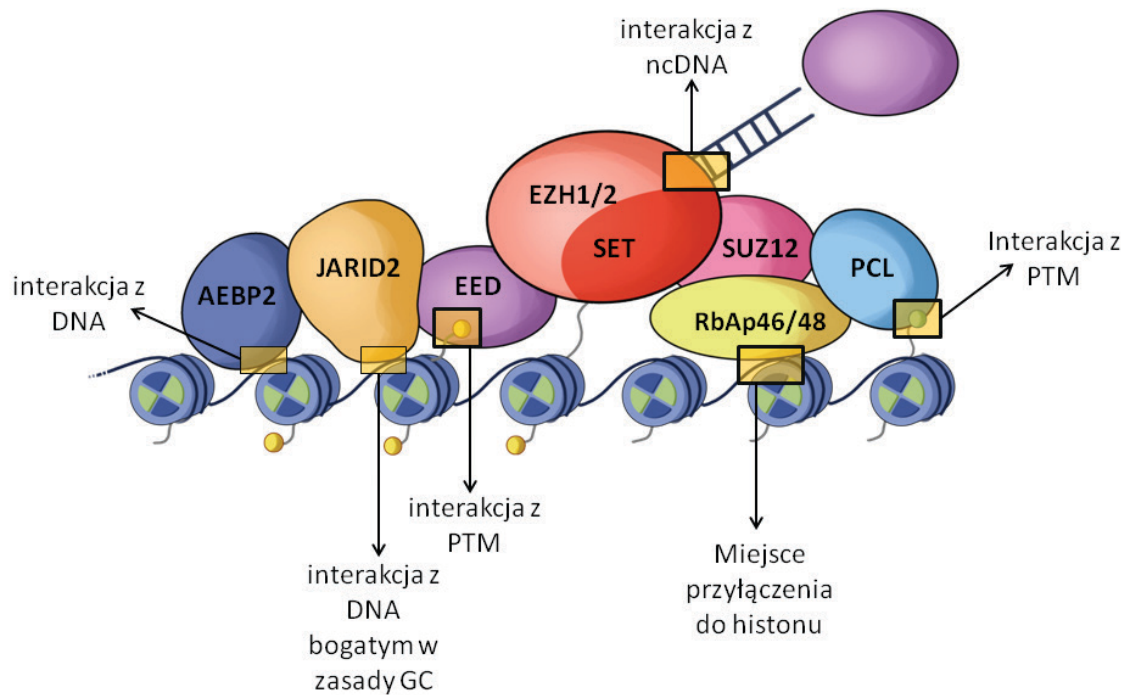
Za metylację poszczególnych lizyn niemal zawsze odpowiedzialny jest specyficzny enzym [35]. W Tabeli 1 zamieszczono listę enzymów odpowiedzialnych za metylację konkretnej lizyny (K4, K9 i K27), a w nawiasie zaznaczono, ile grup funkcyjnych może dołączyć każdy z nich. Metylacja H3K4 może zachodzić dzięki różnym enzymom, a wiele z nich jest w stanie sukcesywnie dołączać kilka grup metylowych do jednej lizyny. Podobnie w przypadku H3K9. Nałożenie pierwszej grupy metylowej zwykle inicjowane jest przez białko G9a lub EHMT1 (inaczej GLP), które w kolejnym etapie mogą dołączyć drugą cząsteczkę CH<sub>3</sub>. Druga grupa może być również nakładana przez PRDM2 (ang. *PR/SET domain 2*) lub SETDB1 (ang. *SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1*). Natomiast trimetylacja może zachodzić również dzięki aktywności SETDB1 lub bardziej typowo, w wyniku działania metylotransferazy SUV39H1 (ang. *Suppressor of Variegation 3-9 Homolog 1*). Jest to enzym najczęściej biorący udział w trimetylacji lizyny 9, przez co wpływa na kondensację chromatyny. Poprzez dodatkowe oddziaływanie z białkiem HP1α oraz metylovanym DNA, stabilizuje upakowaną strukturę chromatyny i wpływa na wyciszenie genów.

Wyjątkowy sposób metylacji dotyczy H3K27 i o ile w poprzednich przypadkach znane są enzymy inicjujące do-

**Tabela 1.** Enzymy zaangażowane w metylację i demetylację lizyny 4, 9 i 27 histonu H3. W nawiasach podano etap dołączania grup metylowych: 1 - monometylacja, 2 - dimetylacja, 3 - trimetylacja, 1-3 - od mono do trimetylacji, 1/3 - mono- i trimetylacja, 2/3 - di- i trimetylacja.

Miejsce metylacji	Metylotransferaza	Demetylaza
H3K4	SETD1A (me1-3), SETD1B, SETD7 (me1), MLL (me1-3), MLL2, MLL3 (me1-3), MLL4, SMYD3 (me2/3), WDR5	LSD1, LSD2, KDM5A-D (JARID1A-D), NO66
H3K9	SUV39H1 (me3), SUV39H2 (me3), SETDB1 (me2/3), SETDB2 (me3), G9a (me1/2), EHMT1/GLP (me1/2), PRDM2 (me2),	Rodzina białka JHDM3 KDM9
H3K27	EZH1/2 (kompleks PRC2)	UTX, UTY, JMJD3

**SETD1A**, ang. *SET domain-containing lysine methyltransferase 1A*, **SETD1B**, **SETDB2**, ang. *SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1, 2*, ang. **SETD7** ang. *SET domain-containing histone lysine methyltransferase 7*, **MLL**, **MLL2**, **MLL3**, **MLL4** ang. *mixed lineage leukemia 2, 3, 4*, **SMYD3** ang. *SMYD lysine methylase family*, **WDR5** ang. *WD40 repeat-containing protein*, **LSD1**, **LSD2** ang. *Lysine-specific demethylase 1, 2*, **KDM5A-D (JARID1A-D)** ang. *lysine demethylases KDM5 sub-family*, **NO66** ang. *histone demethylase, nucleolar protein 66*, **SUV39H1** ang. *Suppressor of Variegation 3-9 Homolog 1*, **SUV39H2** ang. *variegation 3-9 homologue 2*, **EHMT1/GLP**, **EHMT2/G9a**, ang. *enzymes euchromatic histone methyltransferase 1, 2*, **PRDM2** ang. *positive regulatory domain zinc finger protein 2*, **JHDM3/KDM4** ang. *histone lysine demethylase 4*, **KDM9** ang. *histone lysine demethylase 9*, **EZH1/2**, ang. *enhancer of zeste 1/2*, **UTX (KDM6A)** ang. *lysine-specific demethylase 6A*, **UTY (KDM6C)** ang. *lysine-specific demethylase 6C*, **JMJD3** ang. *Jumonji domain-containing protein 3*



Rycina 5. Schemat przedstawiający skład kompleksu PRC2 oraz funkcje tworzących go białek. Szczegółowo omówione w tekście. Zmodyfikowane na podstawie [38].

łączenie pierwszej cząsteczki grupy metylowej, to dokładny mechanizm monometylacji lizyny 27 nadal pozostaje zagadką. Natomiast dalsze etapy, czyli di- i trimetylacja są już w pewnym stopniu poznane. W przeciwieństwie do K4 i K9, metylacja przeprowadzana jest dzięki katalitycznej aktywności jednego enzymu, EZH2 (ang. *enhancer of zeste 2*), wchodzącego w skład kompleksu PRC2 (ang. *polycomb repressive complex 2*) (Ryc. 5). Niekiedy w kompleksie, w zamian EZH2, może występować jego homolog EZH1. Podejrzewa się, że jego obecność może wpływać na mniejszą wydajność metylacji, gdyż posiada znacznie niższą aktywność enzymatyczną w porównaniu do EZH2. Z drugiej strony, EZH1 posiada większą zdolność do wiązania nukleosomów niż EZH2, przez co może wpływać na silniejszą kondensację chromatyny [37]. Kolejną różnicą między tymi białkami, jest ich różny poziom ekspresji w komórkach. Białko EZH2 jest charakterystyczne dla silnie proliferujących komórek (zwłaszcza komórek macierzystych), a jego ekspresja jest kontrolowana przez czynnik transkrypcyjny E2F, którego aktywność jest zależna od cyklu komórkowego. Dzięki temu, EZH2 odwzorowuje profil metylacji H3K27 w nowopowstałych komórkach. Z drugiej strony, poziom EZH1 wydaje się być stały i relatywnie niski w komórkach, niezależnie od etapu rozwoju. Uważa się, że dzięki temu EZH1 może służyć podtrzymaniu poziomu metylacji H3K27 w komórkach. Z racji, że EZH1 i EZH2 pełnią kluczową rolę w procesie i są niezbędne w tworzeniu PRC2, często traktuje się je kolektywnie jako EZH1/2.

Białko EZH1/2 swoją aktywność enzymatyczną zawdzięcza obecności domeny SET, katalizującej przyłączanie grupy metylowej. Jednakże, aby białko mogło prawidłowo wypełniać swoją funkcję, musi współpracować z trzema dodatkowymi, niezbędnymi białkami, tworząc rdzeń kompleksu [38]. Są to białka SUZ12 (ang. *SUZ12 Polycomb*

*Repressive Complex 2 Subunit*), EED (ang. *embryonic ectoderm development*) oraz RbAp46/48 (ang. *retinoblastoma-associated protein 46/48*, znane również jako RBBP4 i RBBP7). Każde z tych białek pełni odrębną rolę w procesie metylacji. Białko EED rozpoznaje i przylacza się do modyfikacji histonu (głównie H3K27me3), a poprzez zmianę konformacji EZH1/2 stymuluje jego aktywność enzymatyczną przyczyniając się do propagacji metylacji na histonach [39]. Z kolei SUZ12 w połączeniu z białkiem opiekuńczym (chaperonem) histonów RbAp46/48, pełni funkcję stabilizującą cały kompleks, dzięki interakcji z N-końcem ogona histonu H3.

Do kompleksu PCR2 mogą przylaczać się inne białka, tworząc dwa podtypy: PRC2.1 i PRC2.2. W pierwszym znajdują się dodatkowe białka PCL (ang. *polycomb-like*), natomiast w drugim typie można spotkać białka AEBP2 (ang. *adipocyte enhancer-binding protein 2*) i JARID2 (ang. *Jumonji and AT-Rich Interaction Domain Containing 2*) [38]. Każde z nich może wpływać nieco odmiennie na funkcję kompleksu, lecz nadal nie jest jasna ich dokładna rola. Uważa się, że białka grupy PCL (czyli PCL1, PCL2 i PCL3 znane również jako PHF1, MTF2 i PHF19), mogą wchodzić w interakcję z białkiem SUZ12 i wpływać na aktywację EZH2, a ich ekspresja jest tkankowo specyficzna. Dzięki obecnej w tych białkach domenie tudor, może dochodzić do rozpoznawania H3K36me3, dołączenia kompleksu PRC2 i tym samym regulacji znajdujących się w pobliżu genów. W przypadku białka AEBP2, będącego częścią kompleksu PRC2.2, nie udało się jeszcze jednoznacznie określić pełnionej przez niego funkcji. Uważa się, że poprzez interakcję z nicią DNA, może w to miejsce rekrutować PRC2 i wzmacniać aktywność enzymatyczną kompleksu. Drugie białko kompleksu PRC2.2, JARID2, może odgrywać znaczącą rolę w rozwoju zarodkowym, a jego wyciszenie w zarodkach myszy prowadzi do groźnych defektów w tworzącym się układzie

krwionośnym. JARID2 łączy się z nicią DNA w miejscach bogatych w guaninę i cytozynę, aby w tę okolicę rekrutować kompleks PRC2 i podobnie jak AEBP2, wpływać na aktywność enzymatyczną. Brak białka (lub jego inaktywacja) może zaburzać przyłączenie się kompleksu do chromatyny, lecz wykazano, że nie wpływało to znacząco na ogólny poziom metylacji H3K27. Dzięki działaniu kompleksu PRC2, modyfikacja H3K27me3 pozwala na przyłączenie się kompleksu PRC1, wpływając na ekspresję genów oraz kondensację i stabilizację chromatyny [40].

Odlączenie grup metylowych z reszt lizyn zachodzi dzięki przeciwnie działającym enzymom HDM i tak jak w przypadku HMT, każda lizyna posiada swój własny zestaw enzymów odpowiedzialnych za usunięcie grupy CH<sub>3</sub> z łańcucha. Demetylacja często jest związana z rozluźnieniem chromatyny, a w miejsce usuniętych grup, mogą być przyłączone inne modyfikacje wpływające na ekspresję genów, jak na przykład grupy acetylowe.

## ACETYLACJA HISTONÓW

Zmiany w acetylacji chromatyny są kluczowym elementem regulacji transkrypcji genów i acetylacja często spotykana jest w miejscach rozluźnionej euchromatyny. Odpowiadają za nią enzymy HAT, które przenoszą grupę acetylową z acetylo-CoA na określone reszty lizyny w ognie histonu [41]. Jednak w przeciwieństwie do HMT, enzymy te nie są przypisane do jednej konkretnej lizyny na histonie i mogą brać czynny udział w acetylacji różnych białek obecnych w komórce. Lista tych białek jest wyjątkowo długa i należą do nich również białka niehistonowe. Wiele enzymów HAT można przypisać do większych grup i kompleksów, takich jak rodziny białek GNAT (ang. *GCN5-related N-acetyltransferases*), białek z rodziny MYST, p300/CBP, Rtt109 (ang. *Regulator of Ty1 Transposition 109*), HAT1 czy kompleksu TFIID [42].

Przeciwną funkcję do HAT pełnią HDAC. Usuwając grupę acetylową z histonów, kontrolują upakowanie chromatyny, przez co mogą wpływać na wyciszenie genów. U ludzi rozpoznano 18 enzymów, które podzielono na cztery klasy bazując na ich strukturze, lokalizacji w komórce, różnicach w pełnionej funkcji, jak również ze względu na kofaktor użyty w reakcji deacetylacji [43].

**Klasa pierwsza (I)** składa się z białek najbardziej do siebie podobnych pod względem strukturalnym. Do nich zalicza się HDAC1, HDAC2, HDAC3 oraz HDAC8. Przeważnie znajdują się w jądrze, choć pojawiają się doniesienia o przemieszczaniu się w wyjątkowych sytuacjach HDAC1 do cytoplazmy.

**Klasa druga (II)** podzielona jest na dwie podklasy, czyli IIa oraz IIb. Do pierwszej z nich zaliczamy białka zdolne do wędrówki między jądrem a cytoplazmą w odpowiedzi na różne sygnały. Są to HDAC4, HDAC5, HDAC7 i HDAC9. W drugiej grupie znajdziemy HDAC6 i HDAC10, które znajdują się głównie w cytoplazmie komórki.

**Klasa trzecia (III)** zawiera specyficzną grupę białek – sirtuiny. W przeciwieństwie do reszty deacetylaz, sirtuiny

charakteryzują się wykorzystywaniem cząsteczek NAD<sup>+</sup> jako substratu reakcji (klasy I, II i IV wymagają Zn<sup>2+</sup> jako kofaktora). Dotąd poznano siedem sirtuin (ang. *Silent information regulator T*, SIRT1-7). Lokalizacją jądrową cechują się SIRT1, SIRT6 i SIRT7. Zależnie od sytuacji, SIRT2 może lokalizować się w jądrze, gdzie bierze udział w regulacji cyklu komórkowego lub w cytoplazmie. Pozostałe trzy białka, SIRT3, SIRT4 oraz SIRT5 spotykane są jedynie w mitochondriach. Efektem działania sirtuin jądrowych jest tworzenie się heterochromatyny konstytutywnej i fakultatywnej, a najlepiej poznanym białkiem jest SIRT1. Wpływa ona na kondensację chromatyny, m.in. poprzez stymulację metylacji H3K9me<sub>3</sub>. Najpierw powoduje usunięcie grupy acetylowej z H3K9, a następnie aktywuje oraz kieruje w to miejsce SUV39H1. Do aktywacji SUV39H1 dochodzi na skutek deacetylacji lizyny 266 w obrębie domeny SET, przez co białko to zmienia swoją konformację.

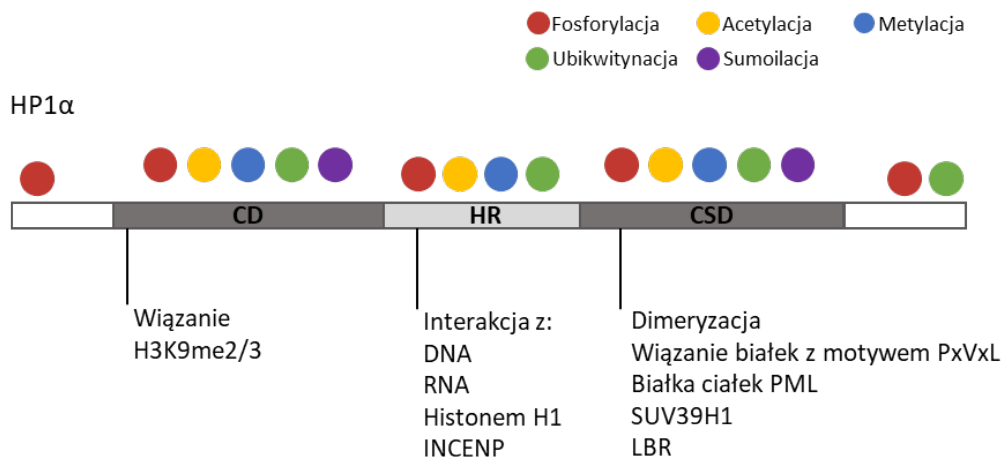
**Klasa czwarta (IV)** składa się z jednego białka HDAC11. Jest ostatnim odkrytym białkiem z rodziny HDAC, w związku z czym nie do końca poznano jeszcze funkcję i mechanizm działania tego białka w regulacji genów. Dotychczasowe badania HDAC11 prowadzone były w kontekście immunologicznym i nowotworowym. HDAC11 najprawdopodobniej powoduje deacetylację czynników E2Fa/E2F4 i hamuje ekspresję genu supresorowego ARHI w komórkach raka piersi.

## HP1α JAKO PRZYKŁAD BIAŁKA ROZPOZNAJĄCEGO MODYFIKACJE – ROLA W ORGANIZACJI STRUKTURY CHROMATYNY

Kolejnym, ważnym elementem związanym z potranskrypcyjną regulacją genów są białka odczytujące dane znaczniki histonów. Do nich zalicza się m.in. białko HP1α, należące do rodziny białek HP1 [44]. Jest to rodzina zachowanych ewolucyjnie białek obecnych u eukariontów (z wyjątkiem *Saccharomyces cerevisiae*). Biorą one udział m.in. w regulacji ekspresji genów, naprawie uszkodzeń DNA oraz stabilizacji struktury chromatyny. Do rodziny ludzkich HP1 zalicza się 3 izoformy: HP1α (kodowane przez gen *CBX5*), HP1β (*CBX1*) oraz HP1γ (*CBX3*). Pomimo wysokich podobieństw w strukturze, każde z nich wykazuje inną lokalizację w jądrze i co za tym idzie, spełnia nieco odmienną funkcję. HP1α można spotkać wyłącznie w rejonach skondensowanej chromatyny, zwłaszcza w okolicach centromerów, telomerów oraz w sekwencjach powtarzalnych. HP1β obserwuje się zarówno w hetero- jak i euchromatynie. Natomiast HP1γ występuje przeważnie w rejonach aktywnych genów regulując ich transkrypcję. W kontekście regulacji struktury chromatyny najbardziej interesująca jest izoforma alfa ze względu na oddziaływanie z H3K9me<sub>3</sub> oraz udział w tworzeniu SAHF, co może mieć wpływ na zmianę ekspresji genów podczas starzenia.

Białko HP1α zawiera dwie funkcjonalne domeny rozdzielone obszarem łącznikowym (ang. *hinge region*, HR) (Ryc. 6), który w swojej strukturze posiada domenę NLS, kierującą białko do jądra. Na N-końcu znajduje się domena CD, która rozpoznaje metylowany histon i umożliwia przyłączenie się HP1α do H3K9me<sub>2/3</sub>. Wykazano ponadto, że HR może oddziaływać z DNA i RNA oraz histonem łącznikowym H1, co dodatkowo ułatwia interakcję i przy-





**Rycina 6.** Schemat budowy białka HP1α z wyszczególnieniem jakim modyfikacjom mogą ulegać poszczególne domeny oraz opis ich funkcji. Zmodyfikowano na podstawie [45]. CD - ang. *chromo domain*; HR - ang. *hinge region*; CSD - ang. *chromoshadow domain*

łączenie się białka do H3K9me2/3. Zarówno domena CD jak i obszar HR, są podatne na potranslacyjne modyfikacje, w tym fosforylację i sumoilację, co wpływa na funkcję białka i jego lokalizację w jądrze. Pokazano, że fosforylacja N-końca powoduje tworzenie się specyficznych, płynnych struktur powstających na drodze separacji faz ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid phase separation*, LLPS). Dzięki temu, HP1α może łączyć ze sobą długie odcinki DNA zawierające wiele nukleosomów tworząc duże kompleksy skondensowanej chromatyny. Ponadto fosforylacja domeny CD zwiększa powinowactwo wiązania HP1α do H3K9me3. Z drugiej strony, fosforylacja odcinka łącznikowego może zmniejszać stopień oddziaływania między HP1α a DNA. Na końcu C cząsteczki HP1α, znajduje się domena CSD (ang. *chromoshadow domain*) odpowiedzialna za homo- i heterodimeryzację (z resztą białek z rodziny HP1) oraz dalsze oddziaływanie z różnymi białkami i czynnikami transkrypcyjnymi. Interakcję z innymi białkami umożliwia specjalna sekwencja PxVxL („P” oznacza prolinę, „V” walinę, „L” leucynę, a „x” dowolny aminokwas) znajdująca się w partnerach białkowych, rozpoznawana przez domenę CSD. Do nich należą m.in. białka wchodzące w skład ciała PML (np. SP100), proteaza SENP7 (ang. *SUMO-specific protease 7*) i receptor laminy B - LBR. Do wyjątków należy białko SUV39H1, które nie posiada w swojej strukturze wymaganej sekwencji, a współpraca obu białek jest niezbędna do tworzenia się heterochromatyny [45,46]. Ponadto, istnieją doniesienia, że HP1α (HP1a u *Drosophila melanogaster*) może przyłączać się do chromatyny z pominięciem H3K9me3.

Tworzenie stabilnej heterochromatyny rozpoczyna się od deacetylacji H3K9 przy udziale SIRT1 i 6. Aktywność SIRT1 wpływa na rekrutację metylotransferazy SUV39H1. Przeniesienie grupy metylowej na H3K9 przyczynia się do rozpoznania modyfikacji przez domenę CD białka HP1α i utworzenie homodimeru. Dimer HP1α przyjmuje charakterystyczną konformację w kształcie litery „Y”, co dodatkowo ułatwia pozycjonowanie cząsteczki na metylowanej lizynie. Następnie HP1α poprzez domenę CSD rekrutuje SUV39H1, prowadząc do metylacji kolejnych histonów i umożliwiając tworzenie heterochromatyny w dalszych częściach genomu. Ponadto, dzięki interakcji obszaru łącznikowego HP1α

z DNA oraz współpracy z DNMT1, dochodzi do wzrostu metylacji DNA i tym samym wyciszenia genów. Na stabilizację heterochromatyny wpływa również interakcja białka HP1α z zakotwiczonym w otoczkę jądrową receptorem LBR, tworząc zwarte i transkrypcyjnie nieaktywne domeny LAD. Niedawne badania wykazały, że HP1α może dodatkowo rekrutować białko CTCF w miejscach okołocentromerowych, wpływając na organizację i utrzymanie stabilnej struktury chromatyny w komórce [47].

Oprócz kontroli stabilności heterochromatyny, HP1α bierze czynny udział w szlaku DDR oraz naprawie powstałych uszkodzeń [5]. W wyniku pęknięcia podwójnej nici DNA dochodzi do lokalnej i krótkotrwałej kondensacji chromatyny. Najczęściej rolę HP1α w procesie naprawy wiąże się z obecnością H3K9me3, czyli stabilizacją heterochromatyny w okolicach uszkodzeń, lecz niektóre badania sugerują, iż HP1α może działać niezależnie od tej modyfikacji. Gdy wywołano uszkodzenia DNA (laser), dochodziło do rekrutacji HP1α do miejsc pęknięcia nici za pomocą kompleksu CAF-1 (ang. *Chromatin Assembly Factor 1*). Wyciszenie HP1α skutkowało upośledzeniem rekrutacji białka 53BP1 oraz RAD51 w miejsca uszkodzeń, zahamowaniem naprawy oraz zmniejszeniem przeżywalności komórek. Nie zauważono natomiast efektu na formowanie się skupisk  $\gamma$ H2AX.

Podsumowując, rola HP1α nie jest jednoznaczna i ograniczona jedynie do tworzenia skondensowanej, stabilnej struktury heterochromatyny w jądrze. Badania dowodzą, że może brać udział w podziale komórki oraz naprawie DNA niezależnie od H3K9me3, przez co może pełnić inne funkcje w komórce, które nadal pozostają nie do końca poznane.

#### PRZEMODELOWANIE STRUKTURY CHROMATYNY POD WPLYWEM KOMPLEKSÓW PRZEBUDOWUJĄCYCH ZALEŻNYCH OD ATP

Nieco odmiennym sposobem regulacji struktury chromatyny (poza modyfikacjami epigenetycznymi) jest reorganizacja nukleosomów za pomocą kompleksów remodelujących (ang. *chromatin remodeling complexes*, CRC) [41, 46, 48]. Ich działanie polega na wykorzystaniu energii pochodzącej z hydrolizy ATP do zmiany oddziaływań między histona-

mi a DNA. Dzięki temu nukleosomy mogą być przesuwane i precyzyjnie pozycjonowane w miejscach genomu, a ich gęstość jest kontrolowana poprzez dodanie bądź usunięcie całych grup nukleosomów z danego obszaru. Do takich kompleksów zalicza się: kompleksy typu ISWI (ang. *imitation switch*), NuRD (ang. *nucleosome remodeling and deacetylase*) oraz INO80, INO80 i SWI/SNF (ang. *switch/sucrose non-fermenting*). Każdy z nich, poza rdzeniową ATPazą, składa się z kilku dodatkowych podjednostek wpływających na ich aktywność i specyficzność. Za pośrednictwem odpowiednich domen znajdujących się w białkach tworzących kompleksy, możliwy jest ich udział w naprawie DNA, ponadto mogą oddziaływać z modyfikowanymi (jak to ma miejsce w przypadku NuRD), jak i niemodyfikowanymi histonami (np. ISWI), doprowadzając do podmiany pojedynczych histonów lub usunięcia całych nukleosomów. Kompleksy mogą brać czynny udział w deacetylacji histonów ze względu na obecność takich białek jak HDAC1 i HDAC2 (NuRD). Często kontrolują kondensację chromatyny i ekspresję genów poprzez oddziaływanie z kompleksem PRC2 (NuRD, SWI/SNF). Ale w przypadku SWI/SNF, kompleks ten może działać zarówno synergistycznie jak i antagoniście do kompleksu PRC2, a sposób działania zależy od miejsca w genomie. Ponadto działanie SWI/SNF skutkuje tworzeniem się heterochromatyny, blokując tym samym dostęp czynników transkrypcyjnych. Co ciekawe, kompleks ten może również hamować ekspresję niekodującego RNA (ang. *non-coding RNA*, ncRNA) poprzez rekrutację i stabilizację nukleosomów w promotorach ncRNA.

#### REGULACJA EKSPRESJI GENÓW PRZEZ NIEKODUJĄCE RNA

Trzecim sposobem kontroli ekspresji genów jest potranskrypcyjna regulacja mRNA przez krótkie, niekodujące RNA, czyli mikroRNA (miRNA), które w 2024 roku doczekały się uhonorowania Nagrodą Nobla. miRNA są najkrótszymi jednociowymi cząsteczkami RNA, składającymi się z 20-25 nukleotydów. Po kilkuetapowym procesie dojrzewania miRNA, którego część zachodzi w jądrze, a część w cytoplazmie, dochodzi do utworzenia dojrzałej nici miRNA, która następnie przyłącza się do końca 3' UTR cząsteczki mRNA. Poprzez swoją komplementarność, miRNA może regulować translację poprzez stabilizację lub kierowanie mRNA do degradacji. Ścieżka jaką obierze kompleks miRNA-mRNA, zależy od stopnia dopasowania tych dwóch cząsteczek. W przypadku całkowitego pokrycia, nić mRNA transkrybowanego genu ulega pęknięciu i dalszej degradacji, a w przypadku mniejszej zgodności ekspresja genu jest jedynie wyciszana [49].

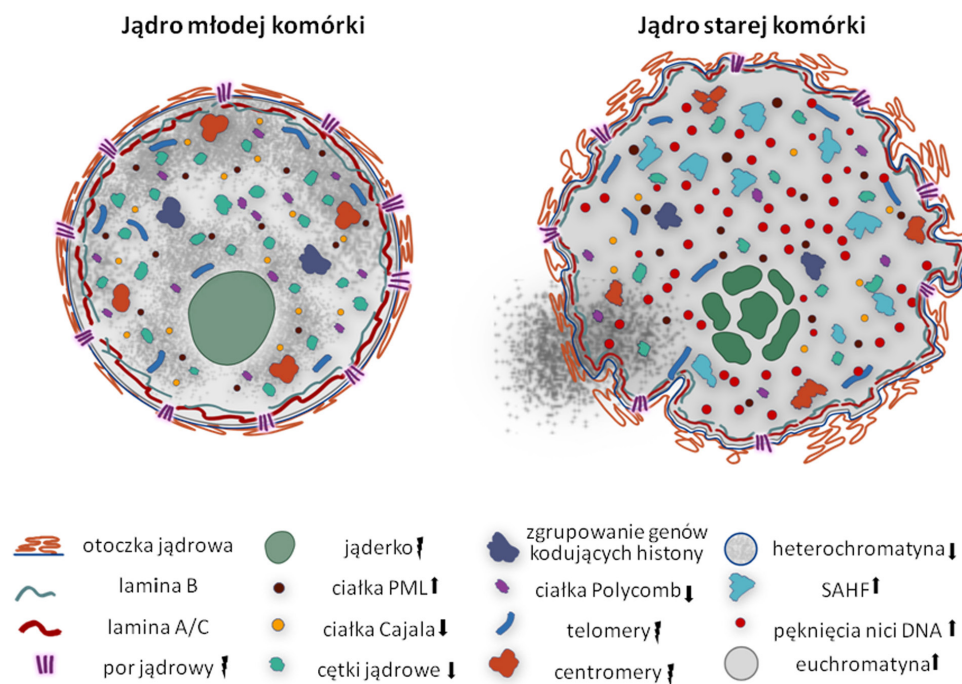
Pierwsze miRNA, *lin-4* i *let-7*, odkryto trzydzieści lat temu (1993) w trakcie badań nad nicieniem *Caenorhabditis elegans* [50]. Do tej pory odkryto już ponad 1000 miRNA (wg bazy danych miRBase.org jest ich prawie 2000) zdolnych regulować ekspresję nawet 30% ludzkich genów. Ponadto dowiedziono, że jedno miRNA jest w stanie jednocześnie wpływać na kilka różnych mRNA. Do białek, których poziom jest regulowany przez miRNA zaliczają się enzymy modyfikujące chromatynę takie jak DNMT, HDAC i HMT. Oprócz tego, że miRNA funkcjonuje jako regulator syntezy białek, jego ekspresja również jest kontrolowana

przez te same mechanizmy epigenetyczne tworząc pewnego rodzaju regulacyjne sprzężenie zwrotne [50]. Badania przeprowadzone w ciągu kilku ostatnich lat dowiodły, że miRNA bierze udział w regulacji niemal wszystkich poznanych dotychczas procesów zachodzących w komórkach. Ponadto, ze względu na niską podatność na działanie RNaz w komórce, miRNA pozostaje stabilne w tkankach i płynach ustrojowych [51], dzięki czemu może stać się potencjalnym markerem zaburzeń i stanów patologicznych zachodzących w organizmie.

#### ZMIANY W ARCHITEKTURZE JĄDRA I STRUKTURZE CHROMATYNY TOWARZYSZĄCE STARZENIU KOMÓRKOWEMU

##### ZMIANY MORFOLOGII JĄDRA I BLASZKI JĄDROWEJ

Starzenie to proces wpływający na funkcjonowanie całej komórki i choć zmiany dotyczą wielu struktur i organeli, to te zachodzące na terenie jądra wydają się być pierwotną przyczyną pozostałych (Ryc. 7). Zwiększająca się powierzchnia jądra i globalne rozluźnienie chromatyny, zmiany pojawiają się w blaszce i otoczce jądrowej stały się typowymi markerami starzenia [5,13]. Powierzchnia jądra i kondensacja chromatyny są ze sobą w pewnym stopniu powiązane i pokazano, że poziom upakowania chromatyny może wpływać na rozmiar jądra. W blaszce jądrowej komórek starych obserwuje się znaczący spadek ekspresji białka laminy B1, natomiast poziom laminy A/C może spadać, a w niektórych przypadkach pozostawać bez zmian. Spadek laminy B1 prowadzi do zmian w kształcie jądra i jest jedną z przyczyn zwiększania się jego powierzchni nawet 10-cio-krotnie (z 5–20  $\mu\text{M}$  do 200–400  $\mu\text{M}$ ). Zaburzony poziom laminy A/C jest często związany z gromadzeniem się prekursora tego białka, czyli prelaminy A. Ponadto, mutacja w genie *LMNA* powodująca brak dojrzewania i tworzenie niefunkcjonalnej formy nazywanej progeryną jest przyczyną opisanego powyżej zespołu HGPS. Akumulacja progeryny oraz spadek poziomu laminy B1 w starych komórkach prowadzi do zmian w morfologii jądra oraz defektów w jego strukturze, co skutkuje zwiększoną podatnością na odkształcenia i sprzyja tworzeniu się charakterystycznych wybrzuszeń (ang. *nuclear blebbing*) [5,52]. Zaburzenia w strukturze otoczki niosą za sobą zmiany w funkcjonowaniu porów jądrowych, co prowadzi do zaburzeń w transporcie cząsteczek między jądrem a cytoplazmą. Z jednej strony transport staje się mniej selektywny i na teren jądra dostają się białka, które nie są tam wykrywane w młodej komórce. Z drugiej strony może nie dochodzić do transportu do jądra białek kluczowych w zachowaniu homeostazy komórki. Zauważono np., że w komórkach mięśni gładkich naczyń podwyższony poziom prelaminy A wpływa na przemieszczenie białka Nup153 (wchodzące w skład porów jądrowych) w otoczce, blokując tym samym import 53BP1 w miejsce pęknięć nici DNA [53]. W związku z tym dochodzi do nagromadzenia nienaprawionych uszkodzeń, co sprzyja progresji starzenia. Zmniejszenie syntezy laminy B1 pociąga za sobą spadek poziomu białka LBR będącego miejscem zakotwiczenia HP1 $\alpha$ . To z kolei przyczynia się do zerwania połączenia i destabilizacji LAD, a heterochromatyna przemieszcza się do wnętrza jądra.



Rycina 7. Schemat podsumowujący zmiany zachodzące w jądrze komórkowym podczas starzenia. Strzałka skierowana w górę oznacza wzrost poziomu, strzałka skierowana w dół spadek poziomu, a symbol błyskawicy oznacza uszkodzenia danej struktury jądrowej. Zmodyfikowano na podstawie [52]

## ZMIANY MODYFIKACJI DNA I HISTONÓW

Wraz ze starzeniem dochodzi do rozluźnienia chromatyny a tym samym destabilizacji jej struktury i zmian w profilu ekspresji genów. Kontrola ekspresji genów w starzeniu jest zależna od zmian zachodzących na poziomie DNA oraz modyfikacji histonów. Dowiedziono, że wraz z wiekiem dochodzi do globalnego spadku metylacji CpG w genomie [5,13,46]. Jest to najprawdopodobniej związane ze spadkiem poziomu DNMT1 oraz DNMT3a podczas starzenia. Z drugiej strony w starzeniu replikacyjnym często można zauważyć hipermetylację w promotorach specyficznych genów. Są to geny kodujące białka odpowiedzialne za procesy metaboliczne w komórce lub białka supresorowe. Starzenie jest związane z globalnym spadkiem poziomu histonów i liczby nukleosomów. Szacuje się, że w starzeniu dochodzi do zmniejszenia się puli histonów H3 i H4 o około 30%, a w starzeniu replikacyjnym drożdży nawet o 50%. Może to być wynikiem działania kompleksów przebudowujących chromatynę lub zaburzenia w produkcji histonów. W starej komórce synteza nowych histonów kanonicznych jest zredukowana, gdyż ich ekspresja najczęściej zachodzi w następstwie podziałów komórkowych (które w starych komórkach są wstrzymane). Prowadzi to do utraty nawet całych kompleksów nukleosomów, co ma odzwierciedlenie w destabilizacji struktury chromatyny, jej rozluźnieniu i zwiększeniu podatności na uszkodzenia DNA. Z drugiej strony obserwuje się wzrost wariantów histonów, które gromadzą się w nukleosomach zamiast histonów kanonicznych, ponieważ ich synteza jest niezależna od cyklu komórkowego. Wysoki poziom wariantu H3.3 znaleziono (*post mortem*) w mózgu osób w podeszłym wieku oraz w mysich neuronach. Wraz ze starzeniem w wątrobie, sercu oraz nerkach myszy obserwuje się wzrost obecności wariantu H3.3

oraz zastąpienie nim histonu H3. To z kolei prowadziło do zmian w poziomie metylacji H3 [54]. W mysich fibroblastach poddanych starzeniu (replikacyjnemu i przyspieszonemu indukowanemu uszkodzeniami DNA) oprócz występowania  $\gamma$ H2AX zaobserwowano znacznie większą akumulację wariantu H2A.J, w porównaniu do kontroli. H2A.J jest to wariant, który niedawno przykuł uwagę badaczy ze względu na występowanie w starzeniu indukowanym promieniowaniem jonizującym. H2A.J zastępuje kanoniczny histon H2A w miejscach znajdujących się na pograniczu heterochromatyny i euchromatyny [55]. Gromadzenie się tego wariantu wpływa na reorganizację struktury chromatyny, co może prowadzić do indukcji SASP i rozprzestrzeniania stanu zapalnego na sąsiednie komórki, a nawet indukcji w nich uszkodzeń DNA. Zbyt długo aktywowana ścieżka DDR w komórce przyczynia się do degradacji metylotransferazy G9a i GLP skutkując spadkiem poziomu H3K9me3 i tym samym deheterochromatyzacją [4].

Kolejnym czynnikiem wpływającym na związane z wiekiem rozluźnienie chromatyny jest spadek poziomu metylacji histonów [5]. Podczas starzenia komórek dochodzi do spadku modyfikacji charakterystycznych dla heterochromatyny, takich jak H3K9me3 i H3K27me3. Dotyczy to starzenia replikacyjnego i SIPS oraz jest obserwowane w komórkach osób cierpiących na progerię (zespół Wernera i HGPS). Cechą charakterystyczną takich komórek jest globalny spadek H3K9me3 i związanego z nim białka HP1 $\alpha$ , co jest skutkiem obniżonego poziomu SUV39H1 [56]. Ekspresja genu, jak i poziom białka SUV39H1, spada w starych komórkach, w związku z tym niemożliwe jest dołączenie nowych grup metylowych do lizyny 9 w H3. Niski poziom metylacji H3K9 negatywnie wpływa na utrzymanie prawidłowej struktury heterochromatyny konstytutywnej, która



przechodzi w euchromatynę i staje się podatna na uszkodzenia, zwłaszcza w rejonach telomerowych. Ponadto wykazano, że obniżenie poziomu H3K9me3 i towarzyszący mu wzrost acetylacji H3K9 i H4K16 w promotorach genów IL-6 i IL-8, przyczynia się do ich wzmożonej ekspresji prowadząc do SASP. Obserwowany wzrost acetylacji wspomnianych miejsc koreluje z obniżonym poziomem deacetylaz (w tym sirtuin) w starych komórkach. Niższy poziom SIRT1 zmniejsza aktywność SUV39H1, co z kolei wiąże się ze znacznie niższym poziomem H3K9me3 [46]. Z drugiej strony w niektórych przypadkach może dochodzić do spadku acetylacji, jak na przykład dzieje się w przypadku lizyny 56 histonu H3 podczas starzenia replikacyjnego.

Poziom acetylacji histonów, podobnie jak metylacji, zależy od typu starzenia oraz jest tkankowo specyficzny. W starych ludzkich fibroblastach zauważono wzrost poziomu acetylacji H4K16 w promotorach genów, co skutkowało rozluźnioną chromatyną i ułatwioną wymianą nukleosomów [5,41,46]. Z drugiej strony istnieją doniesienia o spadku acetylacji H4K16 w starych komórkach. W mysim modelu progerii na skutek braku ekspresji białka Zmpste24 (metaloproteinazy hydrolizującej prelaminę A), dochodzi do akumulacji prelaminy A, która zakłóca działanie acetylotransferazy MOF wywołując hipoacetylację H4K16 [57]. W regulacji poziomu acetylacji biorą udział enzymy deacetylazy HAT i HDAC, ale najczęściej opisywanymi w kontekście starzenia są sirtuiny. Uważa się, że sirtuiny są „strażnikami długowieczności” i mogą wpływać na wydłużenie życia [58]. W młodych komórkach wysoki poziom tych enzymów pozwala utrzymać homeostazę komórki dzięki kontroli wielu procesów, w tym regulacji ekspresji genów i cyklu komórkowego, naprawy DNA, apoptozy oraz metabolizmu. Jednak w procesie starzenia dochodzi do znacznego spadku poziomu oraz aktywności sirtuin. Wykazano, że zahamowanie aktywności SIRT6 u myszy przyczynia się do przyspieszonego starzenia i znacznie skraca życie zwierząt. Z drugiej strony, zwiększona ekspresja SIRT6 i wynikająca z tego efektywniejsza deacetylacja H3K9, blokuje szlak sygnalizacyjny NF- $\kappa$ -B, co prowadzi do zmniejszenia syntezy przekaźników stanu zapalnego, a tym samym do wydłużenia życia myszy. Zwiększona synteza SIRT6 może zahamować starzenie szczurzych i ludzkich komórek krążka międzykręgowego HNPC (ang. *Human Nucleus Pulposus Cells*) właśnie przez wpływ na deacetylację H3K9.

#### TWORZENIE SKUPISK SKONDENSOWANEJ CHROMATYNY – SAHF

Pomimo iż globalne rozluźnienie chromatyny jest charakterystyczną cechą starzenia, to lokalnie obserwuje się jej kondensację i tworzenie SAHF. SAHF są to struktury, które często składają się ze skupisk H3K9me3 otoczonych chromatyną bogatą w H3K27me3, tworzących typowy rdzeń wyciszonej chromatyny. Wokół niego może akumulować się aktywna forma chromatyny wzbogacona w H3K36me3 [59]. Chociaż obecność H3K9me3 i H3K27me3 wydaje się być charakterystyczną cechą SAHF, ostatnie badania wykazały, że usunięcie tych znaczników nie wpływało na tworzenie się tych skupisk. Podobnie brak białka HP1 nie zaburzał powstawania SAHF. Wydaje się więc, że do ich tworzenia potrzebne są inne białka, takie jak histon mH2A (makro H2A), HMGA1 (ang. *high mobility group A1*), HIRA (ang.

*histone cel cycle regulator*), ASF1a (ang. *anti-silencing function 1A histone chaperone*) i inne [59]. Poprzez wytworzenie się skupisk miejscowej kondensacji chromatyny dochodzi do reorganizacji jej struktury, co ma przełożenie na zmienioną ekspresję genów. Wyciszeniu ulegają geny kodujące białka odpowiedzialne za proliferację komórki lub czynniki transkrypcyjne np. E2F. Jednak pojawienie się SAHF wydaje się być jedynie cechą charakterystyczną OIS, gdyż tylko w takim modelu zaobserwowano ich obecność w większości komórek. Skupiska takie występują niekiedy w starych replikacyjnie fibroblastach, lecz zwykle dotyczy to tylko kilku procent komórek w populacji. Postuluje się więc, że tworzenie SAHF nie jest uniwersalną cechą starzenia, a służy raczej jako wskaźnik zachodzącego OIS.

#### ZMIANY W CIAŁKACH JĄDROWYCH

Starzenie komórkowe powoduje również zmiany w innych strukturach jądrowych, w tym w jąderkach, ciałkach jądrowych czy ciałkach PML [52]. Morfologia jąderek jest z reguły bardzo zróżnicowana, nawet w młodych komórkach. Jednak wraz z wiekiem najczęściej dochodzi do ich powiększenia oraz zwiększenia ich liczby w jądrze [60]. Badania wskazują, że wzrost powierzchni i liczby jąderek w komórkach nicienia *C. elegans* negatywnie wpływa na długość życia zwierząt. Podobną tendencję zauważono u drożdży, myszy, a nawet u ludzi. Natomiast w komórkach mięśni osób starszych poddanych interwencji przeciwstarzeniowej poprzez restrykcję kaloryczną oraz systematyczny wysiłek fizyczny, zanotowano znacznie mniejsze i mniej liczne jąderka w porównaniu z grupą kontrolną. Zmiany w morfologii jąderka towarzyszące starzeniu często korelują ze wzrostem ekspresji rRNA i białek rybosomalnych i jest to często obserwowane w komórkach pacjentów cierpiących na HGPS [61]. Natomiast zahamowanie ekspresji tych białek skutkuje zmniejszeniem się powierzchni jąderek oraz przedłużeniem życia. Ciałka PML, obserwowane głównie w miejscach wolnych od chromatyny, biorą czynny udział w wielu procesach komórkowych, w tym w starzeniu. W wyniku stresu oksydacyjnego białko PML (czyli białko rdzeniowe ciałka PML) ulega oligomeryzacji i dochodzi do tworzenia ciałek PML. W kolejnym kroku, PML ulega sumoilacji i silnemu upakowaniu. Do tworzących się ciałek dołączają się białka zawierające motyw rozpoznający sumoilację (ang. *SUMO interacting motif*). Do tej pory poznano około 60 takich białek. Co ciekawe, większość z nich bierze udział w odpowiedzi komórki na stres [62]. Przykładem odpowiedzi na stres jest wzrost liczby ciałek PML w ludzkich jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) na skutek ich ekspozycji na promieniowanie jonizujące. Wykazano, że wzrost liczby ciałek jest ogólną cechą starzenia, niezależnie od bodźca indukującego ten proces. W ciałkach PML występują białka, które biorą udział w rozpoznaniu i naprawie uszkodzeń DNA oraz białka kontrolujące cykl komórkowy. Ciałka te są miejscem acetylacji białka p53, które zatrzymuje komórki w cyklu w celu umożliwienia dalszej odpowiedzi na uszkodzenia.

## PODSUMOWANIE

Starzenie organizmu jest nieuniknionym procesem i jest nierozdzielnie związane ze starzeniem komórek budujących tkanki i narządy. Wykazano, że obecność i akumulacja starych komórek w tkankach ma znaczący wpływ na pogorszenie ich funkcji i jest ściśle związana z wiekiem. Stare komórki stanowią również istotny składnik zmienionych chorobowo narządów. Starzenie komórkowe jest złożonym procesem, który wpływa na funkcjonowanie komórki począwszy od zmian jej struktury a skończywszy na metabolizmie i fizjologii. Wiele zmian dotyczy struktur wewnątrz jądra komórkowego, co ma istotny wpływ na funkcje innych organelli w komórce poprzez m.in. zaburzony transport między jądrem a cytoplazmą oraz podatność na uszkodzenia makrocząsteczek. Obserwowane w starych komórkach rozluźnienie chromatyny, wynikające ze zmian w modyfikacjach DNA i histonów, spadku i zmiany składu białek histonowych oraz zmian w aktywności enzymów zaangażowanych w PTM, prowadzi do przemodelowania ekspresji genów i zmiany w syntezie białek, ale również do zwiększonej podatności na uszkodzenia DNA. Opisane zmiany niosą za sobą znaczące konsekwencje dla procesu starzenia się komórek oraz organizmu i mają wpływ na rozwój chorób związanych z wiekiem. Poznanie i scharakteryzowanie zmian potranslacyjnych zachodzących podczas starzenia może posłużyć do opracowania strategii umożliwiających ingerencję w tempo starzenia organizmu. Może być również atrakcyjnym celem terapeutycznym w wielu chorobach wieku podeszłego. Doskonałym przykładem wykorzystania tej wiedzy jest opracowanie zegarów epigenetycznych, które pozwalają określić tempo starzenia organizmu. Na podstawie bardzo konkretnych zmian epigenetycznych można wnioskować, czy starzenie jest przyspieszone lub odbywa się wolniej niż u przedstawicieli podobnej grupy wiekowej. Biorąc pod uwagę wiedzę dotyczącą możliwości regulacji zmian na poziomie epigenetycznym poprzez styl życia (dieta i umiarkowana aktywność fizyczna), może to przyczynić się do świadomego regulowania tempa starzenia się i zmniejszenia ryzyka wystąpienia chorób wieku podeszłego. Takie podejście jest ważne zarówno dla poprawy jakości i długości życia, ale ma również ważny aspekt ekonomiczny, gdyż może przyczynić się do zmniejszenia nakładów na opiekę zdrowotną stale powiększającej się grupy osób w podeszłym wieku.

## PIŚMIENNICTWO

1. Tuttle CSL, Luesken SWM, Waaijer MEC, Maier AB (2021) Senescence in tissue samples of humans with age-related diseases: a systematic review. *Ageing Res Rev* 68: 101334
2. van Deursen JM (2014) The role of senescent cells in ageing. *Nature* 509 (7501): 439-446
3. Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G (2019) Targeting normal and cancer senescent cells as a strategy of senotherapy. *Ageing Res Rev* 55: 100941
4. Lucas V, Cavadas C, Aveleira CA (2023) Cellular Senescence: From Mechanisms to Current Biomarkers and Senotherapies. *Pharmacol Rev* 75(4): 675-713
5. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2023) Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* 186(2): 243-278
6. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The Hallmarks of Aging. *Cell* 153(6): 1194-217

7. Munoz-Espin D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreas J, Murillo-Cuesta S, Rodríguez-Baeza A, Varela-Nieto I, Ruberte J, Collado M, Serrano M (2013) Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155(5): 1104-18
8. Burton DGA, Krizhanovsky V (2014) Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cell Mol Life Sci* 71(22): 4373-86
9. Georgilis A, Klotz S, Hanley CJ, Herranz N, Weirich B, Morancho B, Leote AC, D'Artista L, Gallage S, Seehawer M, Carroll T, Dharmalingam G, Wee KB, Mellone M, Pombo J, Heide D, Guccione E, Arribas J, Barbosa-Morais NL, Heikenwalder M, Thomas GJ, Zender L, Gil J (2018) PTBP1-Mediated Alternative Splicing Regulates the Inflammatory Secretome and the Pro-tumorigenic Effects of Senescent Cells. *Cancer Cell* 34(1): 85-102.e9
10. Krzystyniak A, Wesierska M, Petrazzo G, Gadecka A, Dudkowska M, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Figiel I, Włodarczyk J, Sikora E (2022) Combination of dasatinib and quercetin improves cognitive abilities in aged male Wistar rats, alleviates inflammation and changes hippocampal synaptic plasticity and histone H3 methylation profile. *Aging (Albany NY)* 14(2): 572-595
11. Chaib S, Tchkonja T, Kirkland JL (2022) Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. *Nat Med* 28(8): 1556-1568
12. Criscione SW, Teo YV, Neretti N (2016) The Chromatin Landscape of Cellular Senescence. *Trends Genet* 32(11): 751-761
13. Gadecka A, Bielak-Zmijewska A (2019) Slowing Down Ageing: The Role of Nutrients and Microbiota in Modulation of the Epigenome. *Nutrients* 11(6): 1251
14. Miwa S, Kashyap S, Chini E, von Zglinicki T (2022) Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *J Clin Invest* 132(13): e158447 132 (13)
15. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, d'Adda di Fagagna F (2021) Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22(2): 75-95
16. Bielak-Zmijewska A, Grabowska W, Przybylska D (2014) Rola starzenia komórkowego w starzeniu organizmu i chorobach związanych z wiekiem. *Postepy Biochem* 60(2): 147-60
17. Zhu H, Blake S, Kusuma FK, Pearson RB, Kang J, Chan KT (2020) Oncogene-induced senescence: From biology to therapy. *Mech Ageing Dev* 187: 111229
18. Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Sikora E (2018) Is DNA damage indispensable for stress-induced senescence? *Mech Ageing Dev* 170: 13-21
19. Ayrapetov MK, Gursoy-Yuzugullu O, Xu C, Xu Y, Price BD (2014) DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(25): 9169-74
20. Guglielmi V, Sakuma S, D'Angelo MA (2020) Nuclear pore complexes in development and tissue homeostasis. *Development* 147(23): dev183442
21. Lammerding J (2011) Mechanics of the Nucleus. *Compr Physiol* 1(2): 783-807
22. Zheng H, Xie W (2019) The role of 3D genome organization in development and cell differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20(9): 535-550
23. Martins F, Sousa J, Pereira CD, da Cruz e Silva OAB, Rebelo S (2020) Nuclear envelope dysfunction and its contribution to the aging process. *Review Aging Cell* 19(5): e13143
24. Sun L, Yu R, Dang W (2018) Chromatin Architectural Changes during Cellular Senescence and Aging. *Genes (Basel)* 9(4): 211
25. Orti F, Navarro AM, Rabinovich A, Wodak SJ, Marino-Buslje C (2021) Insight into membraneless organelles and their associated proteins: Drivers, Clients and Regulators. *Comput Struct Biotechnol J* 19: 3964-3977
26. Noble D (2015) Conrad Waddington and the origin of epigenetics. *J Exp Biol* 218(6): 816-818
27. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A (2009) An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 23(7): 781-783
28. Zhong Q, Xiao X, Qiu Y, Xu Z, Chen C, Chong B, Zhao X, Hai S, Li S, An Z, Dai L (2023) Protein posttranslational modifications in health

- and diseases: Functions, regulatory mechanisms, and therapeutic implications. *MedComm* 4(3): e261
29. Gillette TG, Hill JA (2015) Readers, Writers, and Erasers. *Circ Res* 116(7): 1245-1253
  30. Unnikrishnan A, Freeman WM, Jackson J, Wren JD, Porter H, Richardson A (2019) The role of DNA methylation in epigenetics of aging. *Pharmacol Ther* 195: 172-185
  31. Bielak-Zmijewska A (2023) Zegar epigenetyczny i jego cofanie - nadzieja na wydłużenie zdrowego życia. *Kosmos* 72(4): 451-468
  32. Shi Y, Zhang H, Huang S, Yin L, Wang F, Luo P, Huang H (2022) Epigenetic regulation in cardiovascular disease: mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduct Target Ther* 7(1): 200
  33. Rocha A, Dalgarno A, Neretti N (2022) The functional impact of nuclear reorganization in cellular senescence. *Brief Funct Genomics* 21(1): 24-34
  34. Paluvai H, Di Giorgio E, Brancolini C (2020) The Histone Code of Senescence. *Cells* 9(2): 466
  35. Hyun K, Jeon J, Park K, Kim J (2017) Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp Mol Med* 49(4): e324
  36. Voigt P, Tee W-W, Reinberg D (2013) A double take on bivalent promoters. *Genes Dev* 27(12): 1318-1338
  37. Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, Dynlacht BD, Reinberg D (2008) Ezh1 and Ezh2 Maintain Repressive Chromatin through Different Mechanisms. *Mol Cell* 32(4): 503-518
  38. Margueron R, Reinberg D (2011) The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469(7330): 343-349
  39. Margueron R, Justin N, Ohno K, Sharpe ML, Son J, Drury 3rd WJ, Voigt P, Martin SR, Taylor WR, De Marco V, Pirrotta V, Reinberg D, Gambelin SJ (2009) Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature* 461(7265): 762-767
  40. Geng Z, Gao Z (2020) Mammalian PRC1 Complexes: Compositional Complexity and Diverse Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci* 21(22): 8594
  41. Saul D, Kosinsky RL (2021) Epigenetics of Aging and Aging-Associated Diseases. *Int J Mol Sci* 22(1): 401
  42. Lee KK, Workman JL (2007) Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(4): 284-295
  43. Park S-Y, Kim J-S (2020) A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Exp Mol Med* 52(2): 204-212
  44. Schoelz JM, Riddle NC (2022) Functions of HP1 proteins in transcriptional regulation. *Epigenetics Chromatin* 15(1): 14
  45. Sales-Gil R, Vagnarelli P (2020) How HP1 Post-Translational Modifications Regulate Heterochromatin Formation and Maintenance. *Cells* 9(6): 1460
  46. Romero-Bueno R, de la Cruz Ruiz P, Artal-Sanz M, Askjaer P, Dobrzynska A (2019) Nuclear Organization in Stress and Aging. *Cells* 1;8(7): 664
  47. Bosch-Presegue L, Raurell-Vila H, Thackray JK, González J, Casal C, Kane-Goldsmith N, Vizoso M, Brown JP, Gómez A, Ausió J, Zimmermann T, Esteller M, Schotta G, Singh PB, Serrano L, Vaquero A (2017) Mammalian HP1 Isoforms Have Specific Roles in Heterochromatin Structure and Organization. *Cell Rep* 21(8): 2048-2057
  48. Clapier CR, Iwasa J, Cairns BR, Peterson CL (2017) Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18(7): 407-422
  49. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C (2018) Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9: 402
  50. Morales S, Monzo M, Navarro A (2017) Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression. *Biomol Concepts* 8(5-6): 203-212
  51. Kupec T, Bleilevens A, Iborra S, Najjari L, Wittenborn J, Maurer J, Sticker E (2022) Stability of circulating microRNAs in serum. *PLoS One* 17(8): e0268958
  52. Pathak RU, Soujanya M, Mishra RK (2021) Deterioration of nuclear morphology and architecture: a hallmark of senescence and aging. *Ageing Res Rev* 67: 101264
  53. Cobb AM, Larriue D, Warren DT, Liu Y, Srivastava S, Smith AJO, Bower RP, Jackson SP, Shanahan CM (2016) Prelamin A impairs 53BP1 nuclear entry by mislocalizing NUP153 and disrupting the Ran gradient. *Aging Cell* 15(6): 1039-1050
  54. Tvardovskiy A, Schwammle V, Kempf SJ, Rogowska-Wrzęsinska A, Jensen ON (2017) Accumulation of histone variant H3.3 with age is associated with profound changes in the histone methylation landscape. *Nucleic Acids Res* 45(16): 9272-9289
  55. Abd Al-razaq MA, Freyter BM, Isermann A, Tewary G, Mangelink A, Mann C, Rube CE (2023) Role of Histone Variant H2A.J in Fine-Tuning Chromatin Organization for the Establishment of Ionizing Radiation-Induced Senescence. *Cells* 12(6): 916
  56. Ashapkin VV, Kutueva LI, Kurchashova SY, Kireev II (2019) Are There Common Mechanisms Between the Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome and Natural Aging? *Front Genet* 10: 455
  57. Krishnan V, Chow MZY, Wang Z, Zhang L, Liu B, Liu X, Zhou Z (2011) Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in Zmpste24-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(30): 12325-12330
  58. Grabowska W, Sikora E, Bielak-Zmijewska A (2017) Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process. *Biogerontology* 18(4): 447-476
  59. Chandra T, Ewels PA, Schoenfelder S, Furlan-Magaril M, Wingett SW, Kirschner K, Thuret J-Y, Andrews S, Fraser P, Reik W (2015) Global reorganization of the nuclear landscape in senescent cells. *Cell Rep* 10(4): 471-483
  60. Tiku V, Antebi A (2018) Nucleolar Function in Lifespan Regulation. *Trends Cell Biol* 28(8): 662-672
  61. Buchwalter A, Hetzer MW (2017) Nucleolar expansion and elevated protein translation in premature aging. *Nat Commun* 8(1): 328
  62. Lallemand-Breitenbach V, de Thé H (2018) PML nuclear bodies: from architecture to function. *Curr Opin Cell Biol* 52:154-161



# Mechanisms regulating chromatin structure and alterations associated with senescence

Agnieszka Gadecka<sup>1✉</sup>, and Anna Bielak-Zmijewska<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Bases of Aging, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland

<sup>2</sup>Laboratory of Calcium Binding Protein, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland

✉corresponding author: a.gadecka@nencki.edu.pl

Keywords: senescence, aging, chromatin condensation, posttranslational histone modification

## ABSTRACT

The expected average human lifespan is constantly increasing. The negative effect of this phenomenon is more frequent incidences of age-related diseases. Experimental data have shown that cellular senescence is the cause of organismal aging. Cellular senescence is an irreversible cell cycle arrest while maintaining metabolic functions and can occur through the exhaustion of proliferative potential (replicative senescence - RS) or stress conditions (stress-induced premature senescence - SIPS). Both types of senescence cause a number of morphological changes, in particular, in the cell nucleus and gene expression. A gradual decrease of condensed heterochromatin in favor of relaxed euchromatin is observed. This is caused by the loss of histones, a disturbance of the balance between repressive and activating post-translational modifications of histones, the impairment in the activity of histone-decorating enzymes and proteins stabilizing the chromatin structure. This review detailed nuclear architecture and chromatin structure alterations during cellular senescence.

