

Rola metylotransferazy DNMT2 w odpowiedzi na stres komórkowy oraz w regulacji starzenia komórkowego fibroblastów ssaczych

STRESZCZENIE

Zwiększona zapadalność na tak zwane choroby związane z wiekiem jest ściśle powiązana z procesem starzenia komórkowego, a bezpośrednich dowodów potwierdzających związek między tymi procesami dostarczyły badania kilku ostatnich lat. Poznanie mechanizmów molekularnych oraz przyczyn promujących starzenie na poziomie pojedynczej komórki umożliwić może odkrycie innowacyjnych terapii przeciwstarzeniowych. W związku z powyższym istnieje potrzeba poszukiwania nowych czynników posiadających zdolność modulowania procesu starzenia komórkowego, a potencjalnie atrakcyjnym kandydatem do tego celu jest metylotransferaza DNMT2.

DNMT2 jest enzymem należącym do rodziny metylotransferaz DNA, który katalizuje specyficzną metylację tRNA, jak i DNA. Na przykładzie modelu biologicznego *Drosophila melanogaster* wykazano, że jedną z funkcji dDnmt2 jest oporność na indukowany stres oksydacyjny, co sugeruje rolę tego enzymu w modulacji długości życia muszek owocowych. W związku z powyższym, przeprowadzono badania, których celem było określenie roli metylotransferazy DNMT2 w odpowiedzi na stres komórkowy oraz w regulacji starzenia komórkowego fibroblastów ssaczych *in vitro*.

W przeprowadzonych doświadczeniach oceniono wpływ wyciszenia DNMT2 na starzenie komórek fibroblastów mysich (NIH3T3) oraz ludzkich (WI-38, BJ) w standardowych warunkach laboratoryjnych, a także w warunkach stresu indukowanego nadtlaniem wodoru (HP). Oceniono następujące parametry: aktywność metaboliczną, cykl komórkowy, starzenie komórkowe, apoptozę, długość telomerów, aktywność telomerazy, stres oksydacyjny oraz uszkodzenia DNA. Zbadano również zmiany epigenetyczne, takie jak metylację DNA i RNA oraz ekspresję metylotransferaz DNA. Dane otrzymane w ramach przeprowadzonych doświadczeń umożliwiły charakterystykę i porównanie fibroblastów z wyciszonym DNMT2 do komórek niepoddawanych manipulacjom genetycznym.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że metylotransferaza DNMT2 posiada zdolność modulowania starzenia w fibroblastach ssaczych oraz jest zaangażowana w komórkową odpowiedź na indukowany nadtlaniem wodoru stres. W uniesmiertelnionej linii mysich fibroblastów NIH3T3 stabilne wyciszenie Dnmt2 (technologia CRISPR/Cas9) prowadziło do skracania się telomerów oraz obniżenia aktywności telomerazy. W komórkach obserwowano zależny od wyciszenia Dnmt2 wzrost poziomu karbonylacji białek, co świadczy

może o zaburzeniu równowagi redoks w komórkach. Ponadto wyciszenie Dnmt2 w mysich fibroblastach prowadziło do wzrostu poziomu uszkodzeń DNA oraz ekspresji inhibitorów cyklu komórkowego (p21, p53). Wymienione efekty przyczyniły się do indukowania starzenia mysich fibroblastów w warunkach kontrolnych, a nadtlenek wodoru zwiększał poziom oksydacyjnych uszkodzeń białek.

W prawidłowych ludzkich fibroblastach linii WI-38 oraz BJ z przejściowym obniżeniem poziomu *DNMT2* (technologia siRNA) zaobserwowano wzrost poziomu reaktywnych form tlenu oraz uszkodzeń DNA, a także podwyższoną ekspresją inhibitorów cyklu komórkowego (p16, p21, p53). Obniżenie poziomu *DNMT2* prowadziło do zahamowania proliferacji, niestabilności genetycznej oraz zaburzenia równowagi redoks w fibroblastach ludzkich, które indukowało karbonylację białek. Efekty te promowały starzenie komórkowe oraz śmierć ludzkich fibroblastów na drodze apoptozy. Co więcej, obniżenie poziomu *DNMT2* zwiększało wrażliwość ludzkich fibroblastów na indukowany nadtlaniem wodoru stres oksydacyjny oraz przyczyniało się do zwiększenia liczby komórek ulegających apoptozie. Ponadto nie wykazano, aby nadtlenek wodoru wzmacniał starzenie komórek ludzkich fibroblastów z obniżonym poziomem *DNMT2*. Podczas starzenia replikacyjnego fibroblastów ssaków obserwowano wzrost poziomu *DNMT2*, a białko lokalizowało się w cytoplazmie. Wykazano również podwyższenie poziomu *DNMT2* w komórkach transfekowanych siRNA.

Według obecnego stanu wiedzy, prezentowane w rozprawie wyniki są pierwszym tego typu kompleksowym opracowaniem pokazującym modulacyjną rolę ludzkiej metylotransferazy *DNMT2*, jak i mysiej *Dnmt2* w starzeniu oraz w odpowiedzi na stres komórkowy fibroblastów ssaczy. Na podstawie otrzymanych wyników postuluje się, iż modulowanie poziomu *DNMT2* prowadzące do zaburzeń struktury telomerów, obniżenia aktywności telomerazy, hamowania proliferacji oraz indukowania śmierci apoptotycznej w komórkach starych czy uszkodzonych może stać się potencjalną innowacyjną strategią przeciwstarzeniową (działanie senolityczne) oraz przeciwnowotworową, co niewątpliwie wymaga dalszych dowodów eksperymentalnych *in vivo*.

Jagoda Adamska-Godlewska