

Odpowiedź na uszkodzenia DNA indukowane stresem oksydacyjnym w komórkach w fazie spoczynku oraz po reinicjacji cyklu komórkowego

Streszczenie

W odpowiedzi na uszkodzenie DNA komórki aktywują kaskadę sygnalizacyjną – odpowiedź na uszkodzenie DNA (DDR). Jednym ze szlaków DDR jest zatrzymanie cyklu komórkowego, które może wydłużyć czas potrzebny do naprawy DNA lub indukować apoptozę. Komórki znajdujące się w fazie spoczynku G₀, są pozbawione kanonicznych punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Komórki w fazie G₀, do których należą komórki uśpione oraz komórki krańcowo zróżnicowane, są mniej podatne na czynniki uszkadzające DNA, niż komórki proliferujące. Spontaniczne uśpione komórki macierzyste oraz komórki w pełni zróżnicowane mają obniżony poziom DDR. W celu zbadania roli cyklu komórkowego w DDR, chemicznie indukowaliśmy fazę G₀, zarówno w stanie uśpienia, jaki i różnicowania, a także ponownie wprowadzaliśmy komórki w cykl komórkowy i analizowaliśmy szlaki DDR indukując stres oksydacyjny. Badaliśmy żywotność komórek, poziom wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu (ROS), uszkodzenia i naprawę DNA, apoptozę i autofagię oraz cykl komórkowy. Komórki w fazie G₀, zarówno w stanie spoczynku jak i różnicujące, były mniej wrażliwe na uszkodzenia DNA i apoptozę wywołane stresem oksydacyjnym, niż komórki proliferujące. Komórki te wykazały podobną kinetykę naprawy DNA oraz rozkład komórek w fazach cyklu komórkowego w porównaniu do komórek proliferujących. W przeciwieństwie do komórek uśpionych, które miały niższy poziom wewnątrzkomórkowych ROS, komórki różnicujące generowały więcej wewnątrzkomórkowych ROS w porównaniu do komórek proliferujących w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Aby potwierdzić, że niższy poziom DDR był specyficzny dla komórek w fazie G₀, komórki uśpione zostały wprowadzone w cykl komórkowy i dokonano pomiaru aktywacji szlaków DDR. Uruchomienie cyklu komórkowego przywracało DDR typową dla komórek proliferujących, w których cykl komórkowy nie został zaburzony: produkcję wewnątrzkomórkowych ROS, wrażliwość na uszkodzenia DNA i apoptozę. Jednakże wraz z reaktywacją cyklu komórkowego poziom autofagii spadł. Nasze wyniki wskazują, że manipulacja cyklu komórkowego wpływa na DDR: obniża DDR w komórkach w fazie G₀ oraz przywraca DDR przy uruchomieniu cyklu komórkowego. Nasze badania wzmacniają koncepcję regulacji DDR przez komórki za pośrednictwem indukcji fazy G₀ oraz reinicjacji cyklu komórkowego.

Paulina Tokar

DNA damage response induced by oxidative stress in G0 cells and cells that re-initiated the cell cycle

Abstract

In response to DNA damage, cells activate a signaling cascade known as the DNA damage response (DDR). DDR can modulate the cell cycle to give the cell prolonged time for DNA repair or to induce apoptosis. Cells residing in G0 phase, out of cell cycle, are deprived of canonical cell cycle checkpoints. G0 cells can be quiescent or terminally differentiated and they are less prone to DNA-damaging factors than cycling cells. Research on quiescent stem cells and terminally differentiated cells, demonstrated their attenuated DDR. To further explore this subject we investigated the role of cell cycle exit and re-entry in DDR induced by oxidative stress. We chemically induced quiescence, differentiation and cell cycle re-entry and studied cell viability, intracellular reactive oxygen species (ROS) production, DNA damage and repair, apoptosis, autophagy and distribution of cells in cell cycle phases. We showed that G0 cells, both quiescent and differentiating were more resistant to DNA damage and apoptosis evoked by oxidative stress than cycling cells. These cells showed similar DNA repair kinetics and distribution of cells in cell cycle phases to cycling cells. Unlike quiescent cells, which reduced the level of intracellular ROS, differentiating cells increased intracellular ROS level in oxidative stress. To further confirm that attenuated DDR was specific to G0, we made quiescent cells re-enter cell cycle and measured the activation of DDR pathways. DDR of cells that re-initiated cell cycle was similar to normally cycling cells followed oxidative stress, including intracellular ROS production, sensitivity to DNA damage and apoptosis. However, autophagy decreased upon cell cycle re-entry. Our results demonstrate that the manipulation of cell cycle status influences DDR: attenuates it in G0 and restores upon cell cycle re-entry. Our study strengthens the conception of DDR regulation *via* G0 phase induction and cell cycle re-initiation.

Paulina Tokar