

Aleksandra POTERAŁA, Dorota HUDY, Karolina GAJDA, Tomasz HEJMO,
Magdalena SKONIECZNA, Joanna RZESZOWSKA-WOLNY
Politechnika Śląska

ROLA REAKTYWNYCH FORM TLENU W REGULACJI CYKLU KOMÓRKOWEGO PO PROMIENIOWANIU JONIZUJĄCYM

Streszczenie. Ekspozycja komórek na promieniowanie jonizujące może powodować nadprodukcję reaktywnych form tlenu i prowadzić do powstawania w komórce różnego typu uszkodzeń, zahamowania cyklu komórkowego i apoptozy. W napromienionych komórkach nowotworowych jelita grubego, linii HCT116 zaobserwowano wtórną produkcję ROS związanych z DNA oraz blokadę cyklu komórkowego. Pomimo tego, że całkowity poziom wolnych rodników mierzony inną metodą był niższy niż w kontroli, uzyskane wyniki wskazują na powiązany z reaktywnymi formami tlenu proces regulacji cyklu komórkowego oraz indukcję stresu oksydacyjnego zakończonego śmiercią komórkową na drodze apoptozy.

THE ROLE OF THE IONIZING RADIATION-INDUCED REACTIVE OXYGEN SPECIES IN CELL CYCLE REGULATION

Summary. Exposure to ionizing radiation can result in overproduction of reactive oxygen species in cells, and leads to a various types of cell's damage, cell cycle arrest and apoptosis. We observed secondary production of DNA-associated ROS in irradiated human colon carcinoma cells HCT116, however total level of ROS was lower than in control. Obtained results indicated the reactive oxygen species role in the regulation of cell cycle, and oxidative stress induced cellular death - apoptosis.

1. Wstęp

Ekspozycja komórek na promieniowanie jonizujące prowadzi do bezpośrednich zmian w strukturze kwasów nukleinowych, białek i lipidów. Uszkodzenia te mogą być wywoływane również w sposób pośredni, poprzez indukowaną promieniowaniem radiolizę wody i produkcję reaktywnych form tlenu (ROS, reactive oxygen species).

W wyniku radiolizy wody powstają uwodniony elektron i kationorodnik, cząsteczki wody szybko rozpadające się do rodnika hydroksylowego, będącego silnym utleniaczem. Promieniowanie może również wywołać homolityczny rozkład wody w wyniku którego powstaje wodór cząsteczkowy (H_2) oraz nadtlenek wodoru (H_2O_2). Do reaktywnych form tlenu powstających pod wpływem promieniowania zalicza się też anionorodnik ponadtlenkowy i rodniki hydroperoksyłowe [1].

Odpowiedzią komórki na ekspozycję na promieniowanie jonizujące jest uruchomienie procesów naprawy DNA oraz zahamowanie cyklu komórkowego pozwalające na wydłużenie czasu naprawy [8]. Uszkodzenia które nie zostaną naprawione mogą prowadzić do niestabilności genetycznej i nowotworzenia. Reaktywne formy tlenu mogą inicjować programowaną śmierć komórki – apoptozę. Wykazano, że uszkodzenia w mitochondrialnym DNA wywołane przez ROS powodują szybkie wejście na drogę apoptozy, antyoksydanty zaś prowadzą do inhibicji tego procesu i zachowania integralności błon [1].

Cykl komórkowy to jeden z podstawowych procesów życiowych komórki. Jest to sekwencja zdarzeń prowadząca do replikacji materiału genetycznego i podziału na dwie komórki potomne. Poprawna propagacja cyklu komórkowego wymaga właściwego zajścia wielu złożonych procesów, od przekazywania sygnałów, ubikwitynacji, fosforylacji i defosforylacji, degradacji białek, po reorganizację cytoszkieletu (szczególnie aktyny i tubuliny). Cykl komórkowy złożony jest z czterech faz: G1, S, G2 oraz M, których przebieg jest ściśle regulowany przez złożone mechanizmy w które zaangażowany jest szereg białek, w tym cykliny i kinazy cyklinozależne (CDK) oraz czynniki wzrostu [6]. Stres oksydacyjny powoduje zahamowanie cyklu w fazach G1, S i/lub G2, które może być przejściowe lub trwałe i prowadzić do apoptozy lub nekrozy [3]. Inhibicję cyklu w fazie G1, wywołaną nadtlaniem wodoru, można zaobserwować w komórkach fibroblastów ludzkich NHDF w których proces jest nieodwracalny, co prowadzi do apoptozy (głównie komórek znajdujących się w fazie S) lub zahamowania wzrostu (komórki będące w fazach G1 i G2/M w momencie ekspozycji) [4]. Z kolei w fibroblastach mysich linii NIH 3T3, zahamowanie cyklu jest tymczasowe i obejmuje fazy G1, G2 i S, ale nie M [2]. Indukowane reaktywnymi formami tlenu zahamowanie cyklu w fazie G2/M zostało opisane w komórkach linii H1299 (ludzki niedrobnokomórkowy nowotwór płuc, z nieaktywnym genem p53) [5], HaCaT (unieśmiertelnione keratynocyty) [10], A549 (komórki nabłonka płucnego) [11].

Ubikwitynozależna degradacja cyklina jest istotnym elementem regulującym przebieg cyklu komórkowego. Udowodniono, że reaktywne formy tlenu mogą wpływać na ten mechanizm: w komórkach soczewki oraz siatkówki bydłcej eksponowanej na nadtlenek wodoru zaobserwowano szybki i zależny od dawki spadek ubikwitynowanych białek oraz aktywności enzymu aktywującego ubikwitynę (E1) i enzym transferujący aktywną ubikwitynę (E2) [7]. Stres oksydacyjny spowodowany H_2O_2 może powodować przedłużenie ekspresji cykliny D (D1 i D2) właśnie poprzez hamowanie procesu ubikwitynacji i aktywności proteasomów [9]. Innym mechanizmem oddziaływania ROS na cykl komórkowy jest interakcja z elementami cytoszkieletu – głównie aktyną. Pośrednio, poprzez aktywację receptorów czynników wzrostu lub bezpośrednio, przez tiolowanie aktyny. Nadtlenek wodoru może zatrzymywać reorganizację cytoszkieletu w fazie M [9]. Złożona sieć reakcji i czynników regulujących cykl komórkowy sprawia, że wpływ reaktywnych form tlenu jest trudny do przewidzenia i zależy w dużym stopniu od miejsca produkcji ROS oraz ich typu [3].

2. Materiały i metody

Eksperymenty prowadzono na ludzkich komórkach nowotworu okrężnicy linii HCT116 (human colon carcinoma), hodowanych *in vitro* w medium DMEM z 10% surowicą FBS (PAA), w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂, wilgotność 80%). Komórki napromieniano dawką 4Gy i 12Gy przy użyciu iradiatora terapeutycznego Clinac 600 znajdującego się w instytucie Onkologii w Gliwicach. Oznaczenia cytometryczne dla nietraktowanej populacji kontrolnej oraz komórek napromienionych, wykonywano w następujących punktach czasowych: 1, 3, 6, 8 12 i 24 godziny po napromienieniu.

2.1. Cykl komórkowy

Badanie cyklu komórkowego prowadzono poprzez znakowanie jodkiem propidyny (Sigma) DNA genomowego komórek utrwalonych 70% alkoholem etylowym, po wcześniejszym wytrawieniu RNA enzymem RNAza (Sigma). Jodek propidyny, wnikając do utrwalonych komórek, interkaluje z DNA pozwalając na odróżnienie komórek diploidalnych (faza G₀ i G₁), komórek z podwojonym materiałem genetycznym (faza G₂/M) oraz komórek w fazie syntezy DNA (S). Dodatkowo, możliwe jest wyznaczenie subpopulacji komórek apoptotycznych (faza subG₁).

Analizę wyznakowanych komórek prowadzono przy użyciu cytofluorometru przepływowego FACSAria™ III (Becton Dickinson) dla 10 000 komórek z każdej próbki.

2.2. Poziom reaktywnych form tlenu

Poziom całkowity reaktywnych form tlenu oznaczano poprzez znakowanie dwuocetanem 2',7'-dichlorofluoresceiny (DHCF-DA; SIGMA). DCFH-DA dyfunduje przez błony komórkowe, a następnie zostaje rozłożony do DCFH przez wewnątrzkomórkowe esterazy i utleniony przez reaktywne formy tlenu do fluorescencyjnego produktu jedynie w żywych komórkach.

Poziom reaktywnych form tlenu związanych z DNA oznaczono przy użyciu barwnika CellROX Green (Life Technologies). CellROX Green jest barwnikiem dodatkowo wiążącym się z dsDNA, przez co możliwy jest pomiar reaktywnych form tlenu powiązanych z kwasami nukleinowymi w żywych komórkach. Analizę wyznakowanych komórek prowadzono przy użyciu cytofluorometru przepływowego dla 10 000 komórek.

2.3. Apoptoza i nekroza

Ilościowe oznaczenie poziomu komórek apoptotycznych wykonane zostało z wykorzystaniem aneksyny-V sprzężonej z fluorochromem FITC (FITC Annexin V, BioLegend) i jodku propidyny (Sigma). Test ten opiera się na zdolności aneksynyV do wiązania się z fosfatydyloseryną, która w komórkach apoptotycznych ekspozowana jest na zewnątrz komórki. Jodek propidyny, wnikając do komórek z nieciągłą błoną

komórkową, dodatkowo wskazuje frakcje komórek nekrotycznych lub w późnej fazie apoptozy. Analizę wyznakowanych komórek prowadzono przy użyciu cytofluorometru przepływowego dla 10 000 komórek.

3. Wyniki

3.1. Cykl komórkowy

Wyniki analizy cyklu komórkowego, dla komórek nowotworu jelita grubego linii HCT116, zarówno kontrolnych oraz eksponowanych na różne dawki promieniowania jonizującego, zestawiono na wykresie (rys. 1; a-c). Liczbę komórek znajdujących się w poszczególnych fazach (subG1, G0/G1, S, G2/M) cyklu wyrażono jako procentowy udział w populacji.

Ekspozycja komórek na promieniowanie jonizujące w dawce 4Gy (rys. 1. b) powoduje zahamowanie cyklu w fazie G2/M - zaobserwowano wzrost procentowego udziału (do 35%) komórek znajdujących się w tej fazie. Największe zahamowanie ma miejsce dwanaście godzin po napromienieniu. W ósmej godzinie od napromienienia wzrasta również liczba komórek w fazie S - jest ich dwa razy więcej niż w populacji komórek kontrolnych. Towarzyszy temu spadek komórek w fazie G0/G1.

Większa dawka promieniowania, 12Gy (rys. 1; c), powoduje również zahamowanie cyklu w fazie G2, z maksimum przypadającym na dwunastą godzinę po ekspozycji. Udział komórek w fazie G2/M wzrasta do 42% przy wyraźnym spadku liczebności komórek w fazach G0/G1 (29,5% w dwunastej godzinie). Zaobserwowano również wzrost liczby komórek w fazie S, w ósmej i dwunastej godzinie w porównaniu do nietraktowanej promieniowaniem jonizującym kontroli.

3.2. Reaktywne formy tlenu

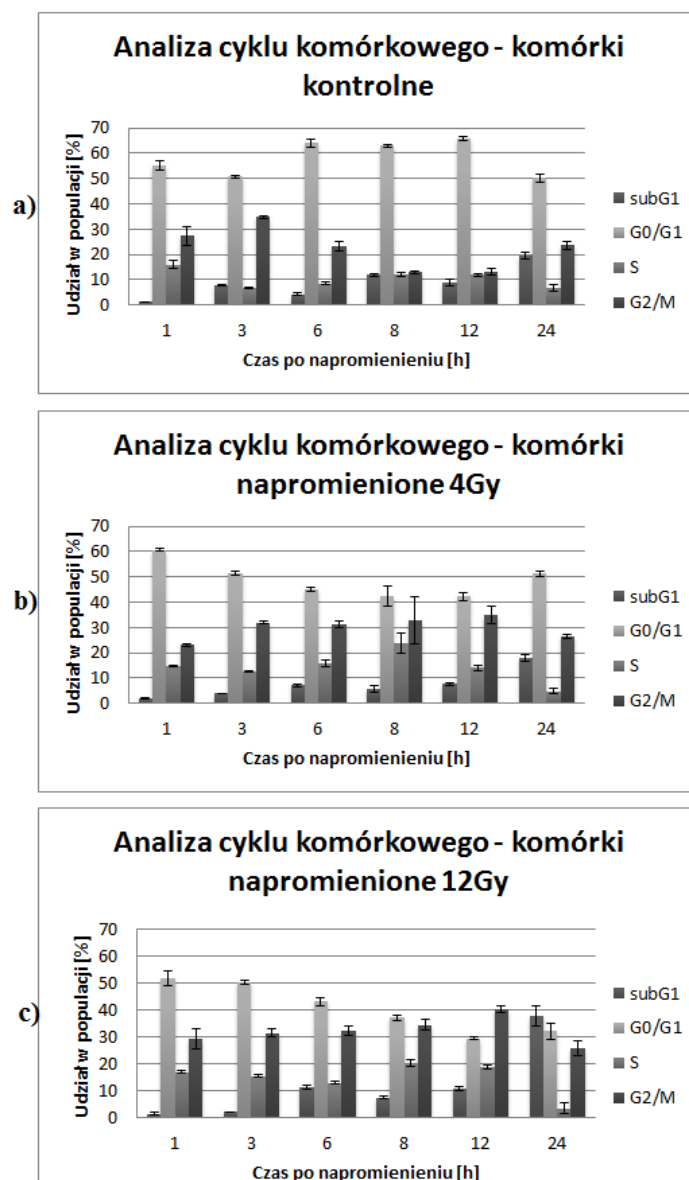
Poziom reaktywnych form tlenu związanych z DNA oraz poziom całkowity w komórkach kontrolnych, nieeksponowanych na promieniowanie oscyluje w czasie – maksima przypadają na szóstą i dwudziestą czwartą godzinę od zmiany medium (rys 2; a).

Indukowany promieniowaniem jonizującym wzrost poziomu reaktywnych form tlenu związanych z DNA (rys.2. b i c) zaobserwowano trzy godziny po ekspozycji na promieniowanie (4Gy i 12Gy). Dawka 12Gy powoduje dodatkowo duży wzrost poziomu reaktywnych form tlenu związanych z DNA, w dwunastej godzinie po napromienieniu – ich poziom jest dwukrotnie wyższy w porównaniu do kontroli.

Całkowity poziom wolnych rodników (rys 2; d-f) w komórkach napromienionych jest niższy niż w komórkach kontrolnych. Jedynie w ósmej godzinie po napromienieniu 12Gy zaobserwowano niewielki wzrost względem kontroli (15%).

3.3. Apoptoza

Badanie apoptozy i nekrozy (rys. 3; a-c) wykazało, że promieniowanie jonizujące w dawce 4Gy powoduje wzrost liczby komórek apoptotycznych w trzeciej, szóstej i dwunastej godzinie, natomiast większa dawka (12Gy) - w pierwszej i trzeciej.

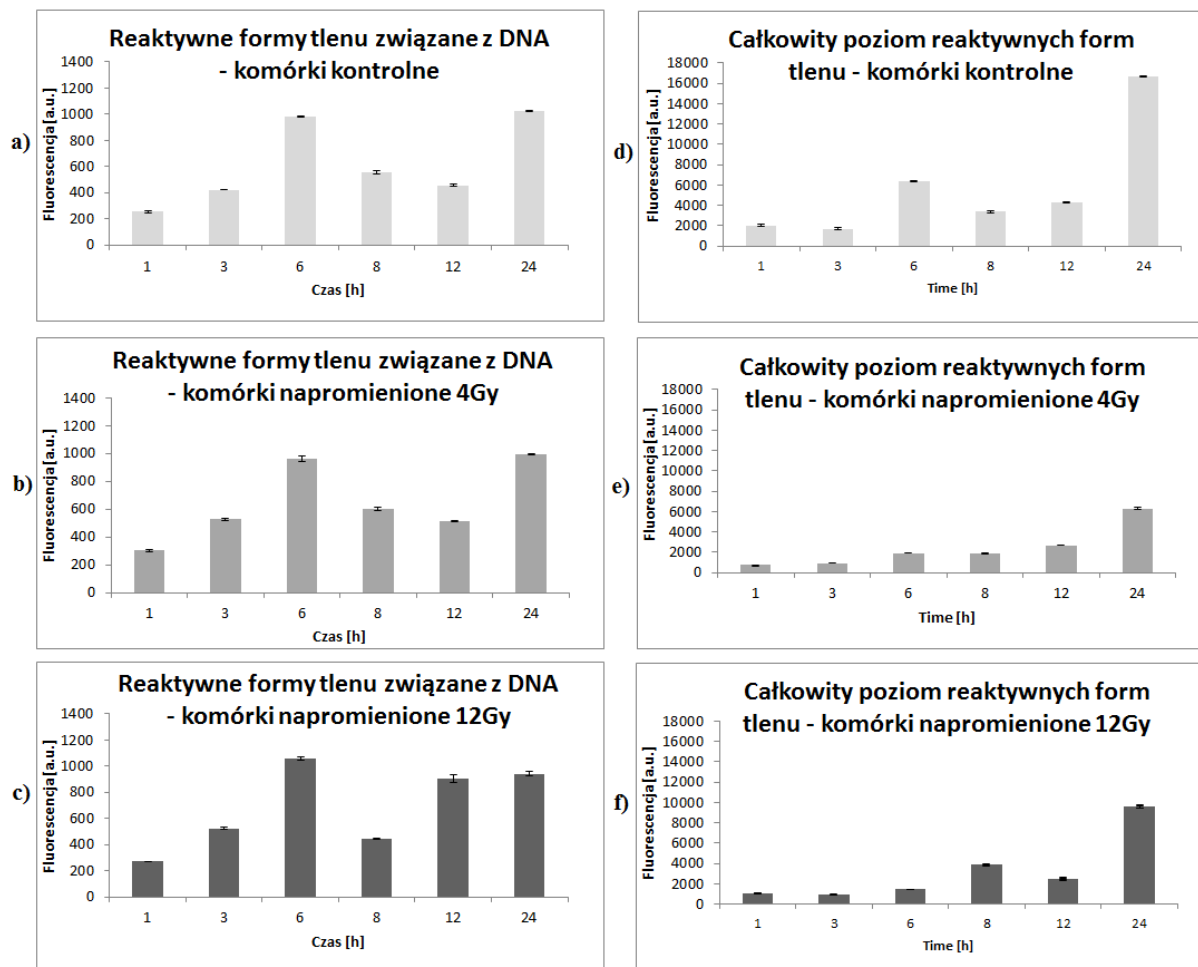


Rys. 1. Analiza cyklu komórkowego – komórki HCT116 kontrolne (a) i napromienione 4Gy (b), 12 Gy (c)

4. Dyskusja i wnioski

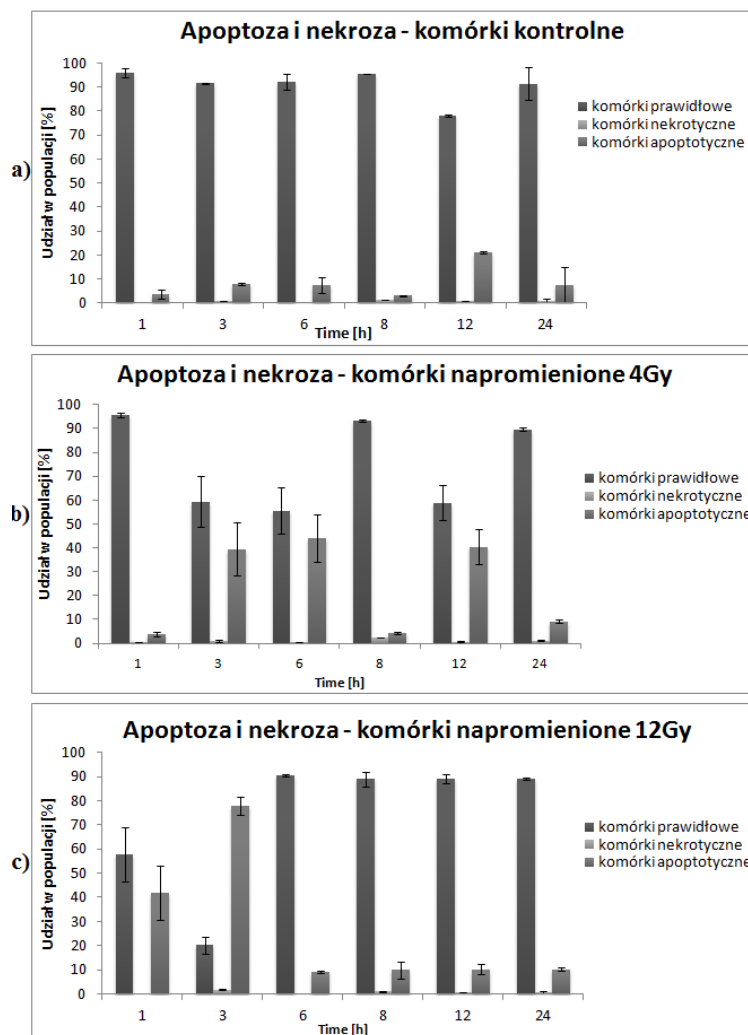
W komórkach nowotworu jelita grubego HCT116 wtórną produkcję reaktywnych form tlenu indukowaną promieniowaniem zaobserwowano analizując formy związane z DNA, zatem głównie w jądrze i mitochondriach. Wtórnej indukcji wolnych rodników, mierząc ich całkowity poziom za pomocą fluoresceiny, w napromieniowanych komórkach nie zaobserwowano. Największy wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (w porównaniu do kontroli) zaobserwowano jedynie w komórkach napromienionych 12Gy, w dwunastej godzinie od ekspozycji. W tym samym punkcie czasowym przypada maksimum zahamowania cyklu komórkowego w fazie G2/M spowodowane promieniowaniem. Mniejsza dawka promieniowania również powoduje zahamowanie cyklu, z maksimum w dwunastej godzinie, jednak nie zaobserwowano zmian w poziomie ROS w tym punkcie czasowym. Z kolei zmiany

w poziomie ROS, zasocjowanych z DNA, w trzeciej godzinie od napromienienia (zarówno 4 jak i 12Gy) nie korelują ze zmianami w cyklu.



Rys. 2. Poziom reaktywnych form tlenu związanych z DNA (a-c) oraz całkowity (d-f) w komórkach HCT116

Promieniowanie jonizujące powoduje wzrost liczby komórek apoptotycznych w różnych punktach czasowych. Wzrost liczby komórek apoptotycznych w trzeciej godzinie od napromienienia 4Gy i 12Gy pokrywa się ze wzrostem poziomu reaktywnych form tlenu wykrywanych w jądrze i mitochondriach. Jednak porównanie poziomu ROS związanych w DNA i liczbę komórek apoptotycznych w dwunastej godzinie (w komórkach napromienionych 4Gy wzrost liczby komórek apoptotycznych, poziom ROS niezmienny względem kontroli, w komórkach napromienionych 12Gy spadek liczby komórek apoptotycznych i wzrost poziomu ROS związanych z DNA) można wnioskować, że produkcja reaktywnych form tlenu nie jest bezpośrednio powiązana z apoptozą.



Rys. 3. Udział komórek prawidłowych, apoptotycznych i nekrotycznych w populacji

Obniżenie całkowitego poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach HCT116 ekspozycji na relatywnie wysokie dawki promieniowania jonizującego, w porównaniu do komórek kontrolnych, przy jednoczesnym zahamowaniu cyklu oraz wzroście liczby komórek apoptotycznych, tylko w niektórych punktach czasowych, sugeruje na brak bezpośrednich korelacji pomiędzy produkowanymi wolnymi rodnikami a cyklem komórkowym i indukowaną apoptozą. Wydaje się zatem, że w komórkach nowotworowych linii HCT 116 istnieją wydajne systemy antyoksydacyjne, które sprawnie redukują wygenerowane promieniowaniem jonizującym pule wolnych rodników. Efekty pro-apoptotyczne są zatem wynikiem zahamowania cyklu komórkowego na skutek powstałych uszkodzeń w komórkach po ekspozycji na promieniowanie jonizującego w wysokich dawkach (> 4Gy).

*Praca finansowana ze środków BKM/506/RAU1/2016/ (A.P., D.H., K.G.),
BK-213/Rau1/2016, t.3. (T.H), NCN 2012/07/B/NZ1/00008 (J.R.W.),
NCBiR PBS3/B3/32/2015 (M.S).*

LITERATURA

1. Azzam E.I., Jay-Gerin J.P., Pain D.: Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters*, 2012, Vol. 327, p. 48–60.
2. Barnouin K., Dubuisson M.L., Child E.S., De Mattos S.F., Glassford J., Medema R.H., Mann D.J., Lam E.W.F.: H₂O₂ induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, Vol. 277, p. 13761–13770.
3. Boonstra J., Post J.A.: Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*, 2004, Vol. 337, p. 1–13.
4. Chen Q.M., Liu J., Merrett J.B.: Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. *Biochemical Journal*, 2000, Vol. 347, p. 543–51.
5. Chung Y., Jeong D., Won J., Choi E., Choi H., Kim I.: H₂O₂-induced AP-1 activation and its effect on p21WAF1=CIP1-mediated G2/M arrest in a p53-deficient human lung cancer cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, Vol. 293, p. 1248–1253.
6. Hulleman E., Boonstra J.: Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, Vol. 58, p. 80–93.
7. Jahngen-Hodge J., Obin M.S., Gong X., Shang F., Nowell T.R., Gong J., Abasi H., Blumberg J., Taylor A.: Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, Vol. 272, p. 28218–28226.
8. Lomax M.E., Folkes L.K., O'Neill P.: Biological consequences of radiation-induced DNA damage: Relevance to radiotherapy. *Clinical Oncology*, 2013, Vol. 25, p. 578–585.
9. Martinez Munoz C., van Meeteren L., Post A., Verkley A., Verrips C., Boonstra J.: Hydrogen Peroxide Inhibits Cell Cycle Progression By Inhibition Of The Spreading Mitotic CHO Cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002, Vol. 33, p. 1061–1072.
10. Thorn T., Gniadecki R., Petersen B., Vicanova J., Wulf H.C.: Differences in activation of G2/M checkpoint in keratinocytes after genotoxic stress induced by hydrogen peroxide and ultraviolet A radiation. *Free Radicals Research*, 2001, Vol. 35, p. 405–16.
11. Zhang Z., Leonard S.S., Huang C., Vallyathan V., Castranova V., Shi X.: Role of reactive oxygen species and MAPKs in vanadate-induced G2/M phase arrest. *Free Radical Biology & Medicine*, 2003, Vol. 34, p. 1333–1342.