

Received: 01.06.2015
Accepted: 11.05.2017
Published: 28.12.2017

Zachowanie stabilności genetycznej embrionalnych oraz indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych podczas terapii przeciwnowotworowych*

The maintenance of genetic stability of embryonic and induced pluripotent stem cells during anticancer therapies

Ewelina Stelcer^{1,2,3}, Magdalena Łukjanow¹, Wiktoria Maria Suchorska^{1,3}

¹Pracownia Radiobiologii, Wielkopolskie Centrum Onkologii

²Studium Medycyny Molekularnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

³Katedra i Zakład Elektroradiologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Medycyna regeneracyjna jest szybko rozwijającą się dziedziną, której postęp umożliwia wydłużenie czasu i poprawę jakości życia chorych cierpiących na nieuleczalne dotąd schorzenia. Komórki macierzyste (stem cells, SCs) są niezróżnicowanymi komórkami zdolnymi do nieograniczonej liczby podziałów i różnicowania w wyspecjalizowane komórki. Terapie oparte na komórkach macierzystych są stosunkowo nową i obiecującą koncepcją w medycynie regeneracyjnej.

Radioterapia jest najczęściej stosowaną metodą w leczeniu zmian nowotworowych. W przyszłości wykorzystanie komórek macierzystych będzie związane z ich nieuniknioną ekspozycją na promieniowanie jonizujące, zarówno podczas leczenia, jak i diagnostyki. Problem stabilności genetycznej komórek macierzystych i komórek zróżnicowanych, pochodzących od nich jest niezwykle ważny, zwłaszcza w praktyce klinicznej. Należy podkreślić, że komórki niezróżnicowane oraz zróżnicowane charakteryzują się odmiennym cyklem komórkowym, metabolizmem, wyjściowym poziomem reaktywnych form tlenu, zdolnością naprawy DNA, podatnością na apoptozę oraz częstotliwością zachodzenia mutacji. Wszystkie te czynniki wiążą się z odmienną promieniowrażliwością SCs i komórek zróżnicowanych.

W artykule omówiono mechanizmy naprawy DNA pluripotencjalnych komórek macierzystych (przez wycinanie zasad, wycinanie nukleotydów, naprawę niesparowanych zasad, homologiczną rekombinację i niehomologiczne scalanie końców) w odpowiedzi na szkodliwe działanie cyto- i genotoksycznych czynników, takich jak promieniowanie jonizujące i cytostatyki. Ocena skuteczności mechanizmów naprawczych jest ważna dla pluripotencjalnych SCs, ponieważ nieefektywne systemy naprawcze mogą się przyczynić do nagromadzenia mutacji w genomie, a w konsekwencji do zmian nowotworowych.

Słowa kluczowe:

pluripotencjalne komórki macierzyste • integralność genomu • naprawa DNA • apoptoza • radioterapia • chemioterapia

*Praca została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki [numer grantu: 2012/07/E/NZ3/01819].

Summary

Regenerative medicine is a very rapidly developing discipline. Its progress contributes to elongated life expectancy and improved quality of life of patients suffering from so far incurable diseases. Stem cells (SCs) are undifferentiated cells that are able to undergo unlimited number of cell divisions and differentiation into specialized cells. Therapies based on SCs constitute a relatively new and promising approach in regenerative medicine.

Radiotherapy is the most often used method in the treatment of cancer. In the future, the usage of SCs will be connected with the inevitable exposure of SCs to ionizing radiation during both treatment and diagnosis. The issue of genetic stability of SCs and cells differentiated from them is crucial, particularly regarding the application of these cells in clinical practice. It is important to emphasize that differentiated and undifferentiated cells possess different cell cycle, metabolism, initial level of reactive oxygen species, DNA repair mechanisms, susceptibility to apoptosis and frequency of mutations. All these factors contribute to the distinct radiosensitivity of SCs and differentiated cells.

The aim of this study was to present the latest literature data concerning DNA repair mechanisms in pluripotent SCs (Homologous Recombination, Non-homologous End Joining, Mismatch Repair, Base Excision Repair and Nucleotide Excision Repair) in response to the influence of cyto- and genotoxic agents, such as ionizing radiation and chemotherapeutics. Evaluation the efficacy of DNA repair mechanisms is relevant for pluripotent SCs, because ineffective DNA repair mechanisms may result in the accumulation of mutations and, consequently, to cancer.

Keywords: pluripotent stem cells • genomic integrity • DNA repair • apoptosis • radiotherapy • chemotherapy

GICID: 01.3001.0010.7615
DOI: 10.5604/01.3001.0010.7615
Word count: 6192
Tables: 1
Figures: 1
References: 81

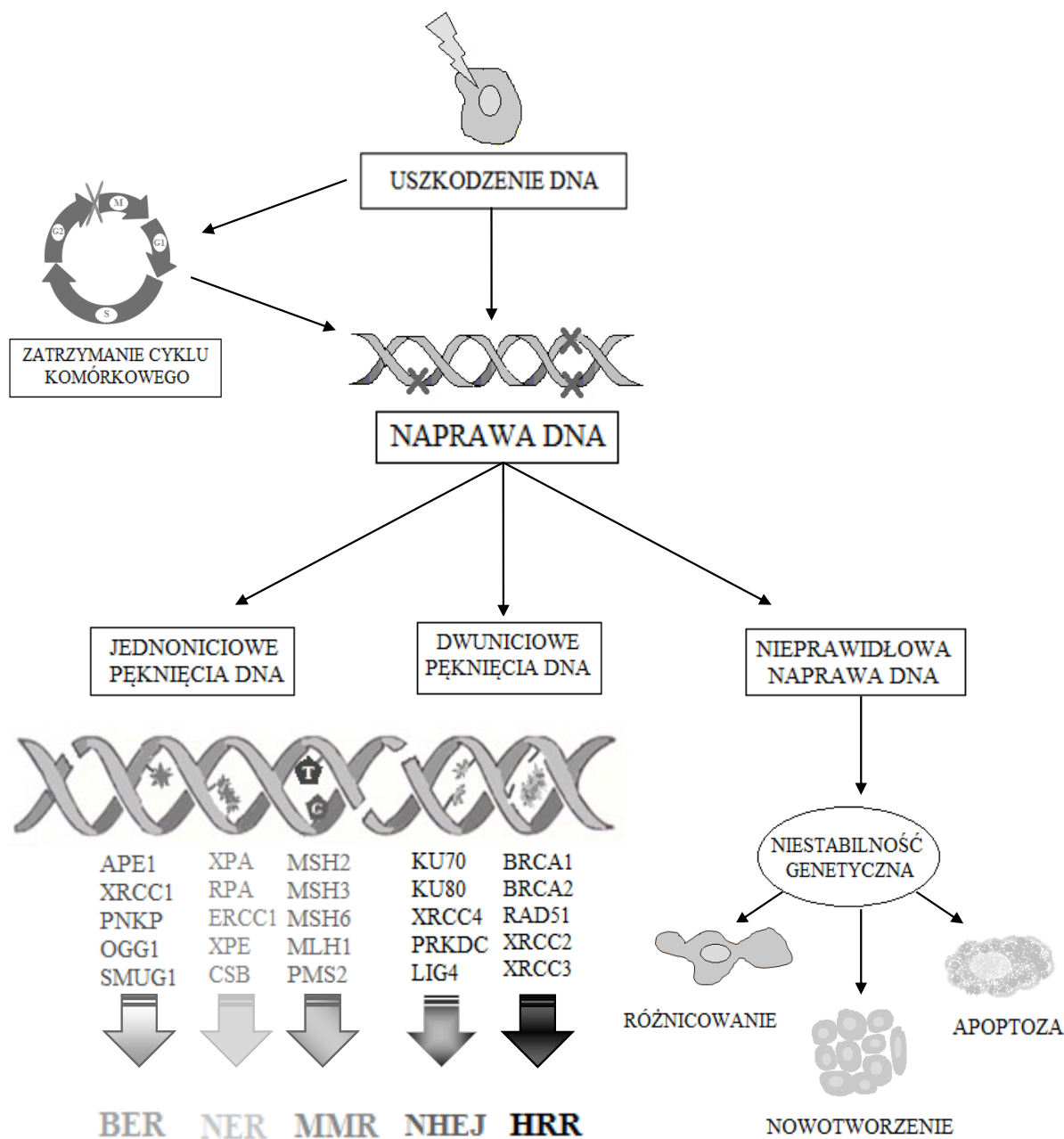
Adres autorki: mgr inż. Ewelina Stelcer, Pracownia Radiobiologii, Wielkopolskie Centrum Onkologii, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań; e-mail: ewelina.stelcer@wco.pl

WSTĘP

Komórki macierzyste (stem cells, SCs) znalazły zastosowanie w wielu dyscyplinach naukowych. Ze względu na pluripotencjalny charakter, zdolność do nieograniczonej liczby podziałów, komórki te przyczyniają się do szybkiego rozwoju medycyny regeneracyjnej [57]. Mogą być różnicowane we wszystkie typy komórek pochodzących z trzech listków zarodkowych, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [34]. Właściwość ta decyduje o ich przydatności w terapii komórkowej i zwalczaniu wielu chorób [17]: neurodegeneracyjnych [14], cukrzycy [11], serca [5], siatkówki oka [30], a także dystrofii mięśniowej [1]. Bardzo duże oczekiwania i nadzieje wiąże się z wykorzystaniem SCs w schorzeniach, na które obecnie nie ma skutecznej metody leczenia np. w chorobach neurodegeneracyjnych, artretyzmie, chorobach krwi. Bardziej powszechne stosowanie komórek macierzystych zwraca uwagę na niedokładnie poznany i zrozumiany wpływ tych komórek na ludzki organizm. Badania prowadzone

in vivo stanowią tylko niewielką część wszystkich badań nad SCs [29].

Mimo że skuteczność terapii komórkowej opartej na SCs została wiele razy potwierdzona, to jej zastosowanie na skalę kliniczną jest utrudnione. Główną przyczyną trudności dotyczy odpowiedzi SCs i komórek wywodzących się od nich na działanie promieniowania jonizującego i cytostatyków. Jest to bardzo istotne, w szczególności przy obserwowalnym wzroście zachorowalności na raka u chorych powyżej 50 roku życia [41,79]. Obecnie nowotwory są najczęściej diagnozowane u starszych osób, niejednokrotnie dotkniętymi innymi schorzeniami, w których, w przyszłości SCs mogą być rutynowo stosowane. Wciąż nie wiadomo w jaki sposób terapia SCs wpływa na organizm w czasie leczenia zmian nowotworowych (radioterapią i/lub chemioterapią). Wiadomo, że promieniowanie gamma i powszechnie używane cytostatyki uszkodzają DNA w komórkach nowotworowych. Jednak wiedza na temat wpływu terapii przeciwnowotworowych na



Ryc. 1. Czynniki stosowane w terapiach przeciwnowotworowych: promieniowanie jonizujące lub cytostatyki powodują uszkodzenia DNA i zatrzymanie cyklu komórkowego

zdrowe komórki, w tym pluripotencjalne SCs wciąż jest niedostateczna. Wykorzystanie pluripotencjalnych SCs w medycynie będzie się wiązało z możliwą ekspozycją na promieniowanie jonizujące zarówno w czasie leczenia, jak i rutynowej diagnostyki (tomografia komputerowa, pozytronowa tomografia emisyjna, scyntygrafia) [67].

Komórki macierzyste: zachowanie integralności genomu

Akumulacja uszkodzeń molekularnych, przede wszystkim DNA, zaburza funkcjonowanie komórki. Zmiany zachodzące w DNA odgrywają ważną rolę w trakcie

starzenia się, stanów chorobowych i rozwoju zmian nowotworowych [31]. Wyszczególnione mechanizmy naprawcze, punkty kontrolne cyklu komórkowego oraz pewien próg tolerancji komórki na uszkodzenia DNA, chroni integralność genomu, co jest niezbędne do jej prawidłowego funkcjonowania [20]. Uszkodzenia DNA są spowodowane przez wiele czynników i mogą się pojawić spontanicznie podczas trwania procesu replikacji i transkrypcji lub też w odpowiedzi na czynniki egzogenne i endogenne, takie jak promieniowanie jonizujące, UV, reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species, ROS) czy cytostatyki [28]. Niestety, odpowiedź SCs na czyn-

niki uszkodzające DNA i ich mechanizmach naprawczych wciąż jest słabo poznana (ryc. 1).

Ponadto, najnowsze doniesienia literaturowe wskazują na występowanie niestabilności genetycznej ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (human induced pluripotent SCs, hiPSCs) oraz ludzkich embrionalnych komórek macierzystych (human embryonic SCs, hESCs) podczas hodowli *in vitro*. Jest to związane z częstymi rearanżacjami chromosomowymi, aneuploidiami lub nieprawidłowo przeprowadzonymi reakcjami metylacji DNA i prowadzi do niekontrolowanej proliferacji w obu typach komórek. Obniża to zdolność różnicowania i niekontrolowanej proliferacji niestabilnych genetycznie SCs [52]. SCs są bardziej podatne na występowanie mutacji genowych, spowodowanych stresem komórkowym podczas ich cyklicznego zamrażania i rozmrażania. Zjawisko to można zaobserwować również podczas długotrwałej hodowli – przy wysokiej liczbie pasaży, gdzie zwiększa się ryzyko wystąpienia nieprawidłowości. Tak więc, częste manipulowanie warunkami hodowli może korelować z ich zwiększoną niestabilnością epigenetyczną [38]. Proces reprogramowania, w wyniku którego powstają indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste, również przyczynia się do wystąpienia niestabilności genetycznych [44]. Pierwsze doniesienia dotyczące niewłaściwego kariotypu hESCs dotyczą trisomii chromosomu 12. Wiele aberracji chromosomowych obserwuje się także w liniach hiPSCs [55], jak np. trisomię chromosomu 8. Natomiast trisomii chromosomu 17 nie odnotowano w hiPSCs [70].

Inzunza i wsp. [27] zbadali kariotyp trzech wybranych linii hESCs. Dwie z nich nie wykazywały zmian, natomiast w trzeciej linii zaobserwowano monosomię chromosomu X [27]. Zmiany genomowe i fenotypowe mogą być związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem SCs zarówno w stadium niezróżnicowanym, jak i w czasie procesu różnicowania. Zatem, stabilność genetyczna SCs i komórek zróżnicowanych wywodzących się od nich, ma podstawowe znaczenie w ich stosowaniu w leczeniu. Konieczne są dalsze badania, aby wykluczyć szkodliwy wpływ hiPSCs na ludzki organizm.

W artykule omówiono doniesienia literaturowe dotyczące mechanizmów naprawy DNA SCs i komórek pochodzących od nich w odpowiedzi na uszkodzenia wywołane cyto- i genotoksycznymi czynnikami podczas terapii przeciwnowotworowej. Mechanizmy naprawy DNA SCs są intensywnie badane. Jednak na temat zmian zachodzących w tych mechanizmach w czasie procesu różnicowania niewiele wiadomo. Dalsze badania dotyczące odpowiedzi komórek macierzystych, częściowo i w pełni zróżnicowanych są potrzebne. Omówiono również najnowsze dane dotyczące mechanizmów naprawy DNA pluripotencjalnych SCs.

CYKL KOMÓRKOWY I MECHANIZMY ROZPOZNAJĄCE USZKODZENIA DNA W KOMÓRKACH MACIERZYSTYCH

Uszkodzenia DNA powstają w każdej komórce organizmu. SCs muszą je skutecznie naprawiać poprzez wyspe-

cializowane mechanizmy [4]. W przypadku wystąpienia poważnego uszkodzenia DNA, cykl komórkowy zostaje zatrzymany w celu zapobiegania błędnej replikacji, transkrypcji czy translacji, jak również oszczędzenia energii. Jednak, gdy naprawa uszkodzeń DNA jest niemożliwa, aktywowane są mechanizmy prowadzące do śmierci komórki [73]. W odpowiedzi na pojawienie się dwuniciowych pęknięć nici DNA (double strand breaks, DSBs) w embrionalnych ludzkich komórkach macierzystych i komórkach zróżnicowanych zostają uruchomione określone ścieżki sygnałowe. Ufosforylowana w pozycji 1981 seryny kinaza ATM (ataxia telangiectasia mutated) przemieszcza się w miejsce DSBs. W mysich embrionalnych komórkach macierzystych (mouse embryonic stem cells, mESCs) traktowanych promieniowaniem jonizującym, kinazy ATM i ATR (ataxia telangiectasia Rad 3-related) fosforylują 700 białek w ponad 900 miejscach [56]. Reakcjom tym towarzyszy fosforylacja histonu H2AX. Jego fosforylacja jest widoczna jako wewnątrzjądrowe skupiska białkowe (foci) γ H2AX. Poziom endogennych foci wzrasta również w obecności nienaprawionego DNA czy nieskutecznej naprawy DSBs, dysfunkcji telomerów, niestabilności genomu lub w czasie starzenia komórki [21]. Rozmiar γ H2AX zależy od struktury chromatyny. Podczas kondensacji regionów chromatyny można zaobserwować mniejsze struktury γ H2AX. Natomiast podczas hiperacetytacji chromatyny lub przy niedoborze histonów H1, foci tworzą większe skupiska [2]. W zróżnicowanych komórkach można zaobserwować obecność kilkuset znacznie mniejszych skupisk γ H2AX, które prawdopodobnie nie są związane z odpowiedzią na uszkodzenie DNA [22]. MESC's nawet przy braku dwuniciowych pęknięć DNA towarzyszy obserwowalny poziom γ H2AX [48]. Innym czynnikiem odgrywającym istotną rolę w mechanizmach naprawy DNA jest białko replikacji A (replication protein A, RPA), którego zadaniem jest wiązanie jednoniciowych odcinków DNA [58].

Większość opisanych w literaturze badań prowadzono na mESCs. MESC's i hESCs nie są równoważne, dlatego należy zwrócić szczególną uwagę na występujące różnice. MESC's nie mają punktu kontrolnego G1, przez co łatwo ulegają apoptozie zależnej od białka p53 [40]. Brak funkcjonalnego punktu kontrolnego G1 jest spowodowane transportem białka p53 do cytoplazmy. Komórki z uszkodzonym DNA przechodzą z fazy G1 do S cyklu komórkowego, w którym może nastąpić powielenie nieprawidłowego materiału genetycznego podczas procesu replikacji. Około 75% mESCs występuje w fazie S cyklu komórkowego, faworyzując homologiczną rekombinację jako główny mechanizm naprawy DSBs. P53 może hamować aktywność białka Nanog, ułatwiając różnicowanie mESCs. Zjawisko to odpowiada za utrzymanie wolnej od uszkodzeń populacji komórek [71]. MESC's wykazują niski próg tolerancji na uszkodzenia DNA, dlatego są kierowane na szlak apoptozy lub ulegają spontanicznemu różnicowaniu. Dzięki tym mechanizmom mESCs generują mniej mutacji niż komórki somatyczne [13]. P53 zapobiega gromadzeniu się nienaprawionego DNA przez zatrzymanie cyklu komórkowego, a na dalszym etapie jego naprawę. Hamuje również

ekspresję genów odpowiedzialnych za pluripotencję. Niektóre badania wskazują, że niższy poziom p53 może się przyczynić do prawidłowego procesu reprogramowania. Jednak obniżony poziom p53 i jego wpływ na ewentualne proonkogenne właściwości mysich i ludzkich iPSCs i ich pochodnych nie zostały w pełni wyjaśnione i wciąż wymagają dalszych badań [80]. Desmarais i wsp. odkryli, że hESCs nie aktywują kinazy punktu kontrolnego 1 (checkpoint kinase 1, CHK1) i ATM po ekspozycji na cisplatynę. W związku z tym, komórki te łatwo ulegają apoptozie. HESCs mogą aktywować CHK1 lub ATM pod wpływem promieniowania jonizującego [8]. Zarówno hESCs i mESCs wykazują mniejszy poziom uszkodzeń oksydacyjnych w porównaniu z komórkami zróżnicowanymi. Zjawisko to mogą wyjaśnić dwie koncepcje: po pierwsze, mESCs i hESCs mają wyższe stężenie przeciwutleniaczy, który maleje wraz z procesem różnicowania. Zmniejszona ekspresja genów antyoksydacyjnych powoduje wzrost poziomu ROS. Po drugie, mESCs i hESCs odznaczają się bardziej wydajnymi mechanizmami naprawy DNA niż komórki zróżnicowane (fibroblasty) [46].

Cykl komórkowy w hESCs i mESCs trwa krócej niż w komórkach somatycznych. Jest to spowodowane znacznie krótszą fazą G1 oraz zwiększoną ekspresją kinazy zależnej od cykliny 4 (CDK4) i cykliny D2 ułatwiających przejście do fazy S. Nieprawidłowe działanie punktu kontrolnego G1/S powoduje akumulację uszkodzeń DNA w fazie S, w której są aktywowane mechanizmy naprawy DNA lub programowana śmierć komórki (tabela 1) [62]. W hESCs zatrzymanie cyklu komórkowego zachodzi w fazie G2. Mechanizmy naprawy DNA tych komórek są bardzo złożone, zapewniając niezwykle skuteczną ochronę genomu. Można zaobserwować wyższy poziom kinazy DNA-PK_{cs} (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit) po napromieniowaniu, który efektywnie naprawia DSBs [23].

Proces naprawy DNA w komórkach macierzystych

Zgodnie z prawem Bergonie-Tribondeau, komórki ulegające częstym podziałom komórkowym, o dużej aktywności mitotycznej, jak również komórki niezróżnicowane, są dużo bardziej narażone na uszkodzenia pod wpływem promieniowania jonizującego niż inne typy komórek. Powyższe prawo było wiele razy potwierdzone w badaniach *in vitro*, z wyjątkiem eksperymentów prowadzonych na limfocytach. Komórki te, mimo wysokiego stopnia zróżnicowania, odznaczają się zmniejszoną radioopornością [6].

Wilson i wsp. [74] zbadali odpowiedź hESCs na działanie niskich i wysokich dawek promieniowania γ . Jak można było się spodziewać, wysokie dawki przyczyniają się do masowej śmierci komórek. Jednak frakcja komórek, które przeżyły promieniowanie (survival fraction, SF) wciąż wykazywała zdolność do formowania nowotworów typu teratoma, co jest niezaprzeczalnym dowodem na zachowanie pluripotencji. Możliwym wyjaśnieniem tego zjawiska jest to, że chociaż wysokie dawki promieniowania zmieniają pewne ścieżki sygnałowe, to nie wpływają na poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za stan pluripotencji [74]. Ponadto badania *in vitro* wskazują na rzadsze występowanie tzw. efektu sąsiedztwa, spowodowanego działaniem promieniowania jonizującego (radiation-induced bystander effect, RIBE) w ludzkich embrionalnych pluripotencjalnych i mezenchymalnych SCs w porównaniu do tych w pełni zróżnicowanych. Jest to bardzo ważne w terapiach przeciwnowotworowych [68].

Proces naprawy DNA odgrywa podstawową rolę w utrzymaniu stabilności genetycznej komórek. Mechanizmy naprawy DNA można podzielić na dwie główne grupy: bezpośrednią i pośrednią odpowiedź komórek na uszko-

Tabela 1. Porównanie mechanizmów naprawczych mysich i ludzkich pluripotencjalnych SCs z uwzględnieniem najważniejszych białek

Podwyższony poziom białek			
	Mechanizm naprawy DNA	Ludzkie pluripotencjalne SCs	Mysie pluripotencjalne SCs
Naprawa dwuniciowych pęknięć DNA	Homologiczn rekombinacja	ATM, ATR, BRCA-1, FEN-1, ligaza I DNA, MRE11, NBS-1, PCNA, RAD51 , RPA, XCCR-2	FEN-1, γ -H2AX, PCNA, RAD51 , RAD52, RAD54
	Niehomologiczne łączenie końców	ATM, ATR, BRCA-1, FEN-1, ligaza IV DNA, PKCS, Ku70, Ku80 , MRE11, PCNA , XCCR-4	γ -H2AX, Ku70, Ku80 , PARP1, PCNA , RAD54, XCCR-1
Naprawa jednoniciowych pęknięć DNA	Naprawa poprzez wycinanie zasad	ligaza III DNA, PCNA, UNG-2 , FEN-1, XCCR-1	APE-1, ligaza I DNA, PARP1, PCNA, UNG-2, XCCR-1
	Naprawa poprzez wycinanie nukleotydów	ligaza I DNA, RPA	RPA
	Naprawa niesparowanych zasad	EXO-1, MSH-2, MSH-3, MSH-6, PCNA	MLH-1, MSH-2, MSH-6, PCNA , PMS-1
krótki cykl komórkowy, skrócona faza G1, brak punktu kontrolnego G1			

Pogrubione nazwy białek są wspólne dla pluripotencjalnych SCs bez względu na ich pochodzenie

dzenia DNA (DNA damage responses, DDR). Pierwsza grupa dotyczy aktywności metylotransferazy O⁶-metyloguaniny (O⁶-methyl guanine methyl transferase, MGMT), która odpowiada za usunięcie adduktu metylogowego z nowo utworzonej O⁶metyloguaniny. Związek ten jest niebezpieczny i potencjalnie mutagenny, ponieważ tworzy komplementarne pary zasad z tyminą zamiast z cytozyną [54]. Na pośrednią odpowiedź komórek składa się: mechanizm wycinania nukleotydów (nucleotide excision repair, NER), mechanizm wycinania zasad (base excision repair, BER), mechanizm naprawy niesparowanych zasad (mismatch repair, MMR) oraz mechanizmy obejmujące podwójnoniciowe pęknięcia DNA (double strand breaks, DSB). DSBs są naprawiane przez wolną od błędów homologiczną rekombinację (homologous recombination, HRR) oraz podatne na błędy scalanie niehomologicznych końców (non-homologous end joining, NHEJ). Większość uszkodzeń wywołanych podczas chemio- i radioterapii jest naprawiane za pośrednictwem HRR oraz NHEJ [45]. Wiele białek zaangażowanych w 5 podstawowych mechanizmów naprawy DNA bierze również udział w procesie apoptozy: HRR- kodowane przez gen supresorowy BRCA1, kinaza białkowa serynowo-treoninowa ATM, kinaza białkowa ATR, supresor nowotworowy p53; NHEJ - katalityczna podjednostka DNA-zależnej kinazy białek (DNA-PK); NER - helikaza XPD, p53, helikaza XPB; BER - polimeraza Poli(ADP-rybozy)-1, AP endonukleaza/3 fosfodiesteraza (APE/Ref1), p53; MMR - kompleks heterodimerski MSH2-MSH6, homolog genu MutL *E.coli* [3]. Proces apoptozy omówiono w dalszej części artykułu.

NAPRAWA JEDNONICIOWYCH PĘKNIĘĆ DNA

Szlak naprawy niesparowanych zasad odpowiada za naprawę niedopasowanych zasad utworzonych na komplementarnych niciach DNA. Niesparowania zostają utworzone z powodu „poślizgu” polimerazy podczas procesu replikacji. Powoduje to powstanie błędów i zmian we wstawianiu nukleotydów oraz krótkie insercje i delecje. Niedokładność w przeprowadzeniu mechanizmu MMR może indukować akumulację mutacji oraz pojawienie się niestabilności mikrosatelitarnych, które są charakterystyczne dla dziedzicznego raka jelita grubego niezwiązanego z polipowatością - zespół Lyncha (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC) [33]. Badania przeprowadzone przez Tichy'ego i wsp. [72] udowadniają, że mESCs wykazują wyższy poziom białek uczestniczących w mechanizmie MMR, związany z wydajniejszym mechanizmem MMR w tych komórkach. Co więcej, w tych komórkach można zaobserwować również wyższy poziom białek BER i większe zdolności do naprawy oligonukleotydowej matrycy [72].

Naprawa przez wycinanie zasad obejmuje dwa główne mechanizmy: krótki szlak zależny od polimerazy DNA β oraz długi szlak zależny od PCNA. W krótszym szlaku naprawy pojedyncze nukleotydy są najpierw usuwane, a następnie zastępowane nowymi. Dłuższy mechanizm jest oparty o usuwanie nukleotydów z uszkodzonej nici

DNA, syntezie DNA i łączenia nici. Mechanizmy eliminują uszkodzenia zasad powstałe w wyniku oksydacji, alkilacji i deaminacji, jak również pojedyncze uszkodzenia nici DNA [61].

Naprawa przez wycinanie nukleotydu odpowiada za eliminowanie adduktów objętościowych, czy uszkodzeń zniekształcających helisę DNA, takich jak np. wewnątrznicowe wiązania krzyżowe, które mogą być spowodowane działaniem cisplatyny. Chociaż mechanizmy NER i BER działają w podobny sposób, to NER jest bardziej skomplikowanym procesem. W proces ten jest zaangażowany mechanizm rozpoznania uszkodzenia DNA, lokalnego rozwinięcia helikalnej struktury DNA wokół uszkodzenia, wycięcia krótkich, pojedynczoniciowych fragmentów DNA obejmujących uszkodzenie, jak również syntezę i łączenie nici [66]. Szlak NER dzieli się na dwa mechanizmy: globalną naprawę genomu NER (global genomic NER, GG-NER) i naprawę sprzężoną z transkrypcją (transcription coupled NER, TC-NER). Głównym czynnikiem rozpoznającym uszkodzenia DNA w mechanizmie GG-NER jest kompleks XPC/HR23B/CEN2, który zapobiega lub redukuje liczbę uszkodzeń DNA występujących w całym genomie. Rozpoznanie uszkodzenia DNA w naprawie sprzężonej z transkrypcją obejmuje zatrzymanie polimerazy II (RNAPII) oraz zaangażowanie dwóch białek: CSA i CSB. Zarówno kompleks XPC, jak i białka CSA oraz CSB w miejsca uszkodzenia rekrutują kompleks składający się z 10 białek i wielofunkcyjnego czynnika transkrypcyjnego TFIIH [10]. Mysie komórki pluripotencjalne mają skuteczniejsze mechanizmy NER i BER niż komórki zróżnicowane. Trzeba jednak pamiętać, że to globalna naprawa genomu, a nie naprawa sprzężona z transkrypcją dominuje w komórkach niezróżnicowanych [9].

Mechanizmy naprawy podwójnoniciowych pęknięć DNA

DSBs mogą prowadzić do utraty informacji genetycznej, rearanzacji genomowych i/lub śmierci komórek. Ten typ uszkodzeń zostaje naprawiany na dwa sposoby: HR oraz NHEJ. W HR niezbędna jest obecność siostrzanej chromatydy lub chromosomu homologicznego jako matrycy w celu odzyskania oryginalnej sekwencji. W NHEJ homologia nie jest wymagana, ponieważ następuje bezpośrednia modyfikacja i łączenie końców DNA. Skutkiem takiego działania jest częste występowanie delecji lub insercji. Mechanizm HR jest aktywowany w fazie S i G₂, z kolei NHEJ w fazach G₁/S/G₂/M cyklu komórkowego [39,43]. Homolog prokariotycznego genu *RecA*-RAD51 oraz BRCA2 są najczęściej wykorzystywanymi biomarkarami w rozpoznaniu HR, natomiast obecność katalitycznej podjednostki DNA-zależnej kinazy białek (DNA-PK) świadczy o uruchomieniu mechanizmu NHEJ [37]. RAD51 jest rekombinazą, która indukuje wymianę nici DNA podczas HR. Odgrywa bardzo ważną rolę w podwójnoniciowych pęknięciach DNA, ponieważ wiąże się do chromatyny podczas fazy S cyklu komórkowego i oddziałuje z poszczególnymi elementami maszynierii replikacyjnej komórki [65]. RAD51 jest aktywny w 3 fazach homolo-

gicznej rekombinacji: przedsynaptycznej, synaptycznej i posynaptycznej. Podczas pierwszego etapu formowany jest filament przedsynaptyczny złożony z 6 cząsteczek RAD51 i jednoniciowego DNA. W synaptycznej fazie, RAD51 tworzy heterodupleks DNA (pętla D) przez połączenie substratu i dupleksu homologicznej matrycy DNA. Podczas ostatniej fazy RAD51 przez oddysocjowanie od podwójnoniciowego DNA, odsłania grupę 3'-OH niezbędną do syntezy DNA [32]. Naprawa podwójnoniciowych odcinków DNA z wykorzystaniem homologicznej matrycy może obejmować wyżej wymienioną homologiczną rekombinację lub dopasowanie pojedynczych nici DNA (single-strand annealing, SSA). Z mechanizmem SSA zawsze się wiąże występowanie zmian mutagennych. Jest to spowodowane przyłączeniem powtórzonej sekwencji DNA, znajdujących w pobliżu DSB DNA, co powoduje wystąpienie delekcji między tymi powtórzeniami [19]. Udział precyzyjnego mechanizmu HR maleje wraz ze stopniem zróżnicowania, podczas gdy podatnego na błędy NHEJ wzrasta. Udowodniono, że już podczas wczesnych etapów różnicowania ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste wykazują większą śmiertelność. Zjawisko to może zostać wyjaśnione przez udział kaspaz, zarówno w procesie apoptozy, jak i różnicowania [53].

Mechanizm NHEJ naprawia egzogenne podwójnoniciowe pęknięcia spowodowane działaniem promieniowania lub rekombinacji VDJ. Białka zaangażowane w ten proces obejmują formowanie kompleksu składającego się z katalitycznej podjednostki kinazy DNA-PK, Ku70 oraz Ku80 na wolnych końcach DNA. Powoduje to aktywację i wzajemne współdziałania nukleazy, białek Artemis, XLF i XRCC4 oraz DNA-ligazy IV, a finalnie do odbudowania zerwanych nici DNA [31]. Kompleks Ku, dzięki swojemu toroidalnemu kształtowi, może wykrywać uszkodzenia DNA, utrzymywać dwa końce DNA w bliskim sąsiedztwie, zahamować lub regulować aktywność nukleazy oraz rekrutować inne czynniki, np. polimerazę czy ligazę. DNA-PKs jest największym znanym białkiem o aktywności kinazy serynowo-treoninowej. DNA-PKs i Ku wiążą się do dupleksu DNA, wywołując autofosforylację kinazy w ponad 15 miejscach. Aktywowane białko prowadzi do aktywacji kompleksu XRCC-ligazy IV. Można zauważyć występowanie sprzężenia zwrotnego dodatniego: obecność kompleksu XRCC4: DNA-ligazy IV indukuje autofosforylację DNA-PKs. DNA-PKs bierze udział w regulacji aktywności endonukleolitycznej innego ważnego białka biorącego udział w mechanizmie NHEJ - Artemis [36]. Białko Artemis jest hiperfosforylowane przez kinazę ATM w odpowiedzi na działanie promieniowania jonizującego. Kompleks Artemis-DNA PKs, dzięki 5' i 3' endonukleazowej aktywności, tnie uszkodzone DNA tworząc lepkie końce. Ponadto, samo białko Artemis ma aktywność 5' egzonukleazy [75].

Naprawa podwójnoniciowych pęknięć DNA jest bardziej precyzyjna w hESCs niż w komórkach somatycznych. Różnicowanie hESCs zmniejsza skuteczność i dokładność mechanizmów naprawy podwójnoniciowych pęk-

nięć. W hESCs w przeciwieństwie do innych typów ludzkich komórek dominuje HR. Ponadto można zaobserwować spadek dokładności mechanizmu NHEJ wraz z postępowaniem różnicowania. Dlatego też mechanizm NHEJ w hESCs prawdopodobnie działa w sposób niezależny od ATM, DNA-PKs i PARP, a zależny od XRCC4, przez co jest dużo bardziej skutecznym [62]. Zou i wsp. [81] badali odpowiedź hESCs i komórek neuronalnych pochodzących od pluripotencjalnych komórek macierzystych na promieniowanie jonizujące. Wykazali, że hESCs mają porównywalną skuteczność mechanizmów naprawczych DNA w porównaniu do komórek somatycznych. Powyższe dane różnią się z innymi doniesieniami literaturowymi. Udowodniono, że podczas traktowania hESCs wysokimi dawkami promieniowania jonizującego, 90% z nich ulega apoptozie. Po zakończonym procesie różnicowania skuteczność mechanizmów naprawczych DNA komórek pochodzących od komórek macierzystych maleje, a także można zaobserwować podwyższony poziom ROS. Jednak, w przeciwieństwie do hESCs, znacząca frakcja komórek neuronalnych, pochodzących od komórek macierzystych, przeżyła wysokie dawki promieniowania jonizującego [81]. Podsumowując, mimo że hESCs mają niezwykle skuteczne mechanizmy naprawy DNA i tolerancję na stres, to wydają się dużo bardziej wrażliwe na działanie promieniowania jonizującego niż komórki z nich zróżnicowane.

Sokolov i Neumann [69] badali zmiany w ekspresji genów, takich jak inhibitor kinaz zależnych od cyklin (CDKN1A/p21/Cip1), kodującego białko naprawcze GADD45A, jądrowego antygenu komórek proliferujących (PCNA), kodującego białko 2 z rodziny BTG, kodujących białka z rodziny pro- i antyapoptotycznych (Bcl-2), SESN1, DDB2, IER5, PLK3, czynnik wzrostu i różnicowania 15 (GDF15) podczas „wczesnej” i „późnej” odpowiedzi komórek hESCs na promieniowanie jonizujące. Indukcja genów odpowiedzialnych za stres koreluje z odpowiedzią komórek, jednak nie liniowo. Może to wskazywać na istnienie pewnego poziomu progowego ekspresji genów w niektórych hESCs [69]. CDKN1A jest głównym inhibitorem kinaz zależnych od cyklin niezbędnym do aktywacji punktu kontrolnego cyklu komórkowego w fazach G1/S po działaniu promieniowania jonizującego w większości ludzkich komórek hodowanych *in vitro*. Jednak hESCs i hiPSCs w odpowiedzi na działanie promieniowania jonizującego nie aktywują wspomnianego punktu kontrolnego. To zjawisko może być spowodowane obniżonym poziomem białka p21 w komórkach hESCs i hiPSCs traktowanych promieniowaniem jonizującym. Jednak punkt kontrolny w fazie G1/S jest charakterystyczny dla mechanizmu NHEJ, a nie dla HR, który jest powszechny dla pluripotencjalnych komórek macierzystych [49,50].

ZAWODNOŚĆ MECHANIZMÓW NAPRAWY DNA: APOPTOZA W SCS

Komórki charakteryzujące się nienaprawionym materiałem genetycznym uczestniczą w programowanej śmierci komórki – apoptozie [64]. Umierające komórki wysyłają swoiste sygnały powodując proliferację komórek macie-

rzystych i progenitorowych. Zjawisko to ma decydujące znaczenie w regeneracji organizmu [35]. Główną funkcją procesu apoptozy jest ochrona przed nagromadzeniem uszkodzeń DNA. Mechanizm programowanej śmierci pozwala na zachowanie integralności genomu komórki [15]. Choć SCs mają bardzo skuteczne mechanizmy naprawy DNA, to brak punktu kontrolnego G1 czyni je wrażliwymi na promieniowanie jonizujące i inne czynniki uszkadzające DNA, przyczyniając się do aktywacji procesu apoptozy [25]. Jednak ostateczna decyzja dotycząca indukcji apoptozy i/lub zatrzymania cyklu komórkowego zależy od natężenia i czasu trwania czynnika uszkadzającego DNA [60]. W komórkach ssaków istnieją dwa główne szlaki inicjujące apoptozę – zewnętrzny (receptorowy) i wewnętrzny (mitochondrialny). W obu mechanizmach, główną rolę odgrywa aktywacja enzymów – kaspaz [24], które można podzielić na inicjujące (kaspazy-8, -9, -12) i efektorowe (kaspazy-3, -6, -9) [7,18]. Istotną rolę w procesie apoptozy pełni białko p53. W prawidłowych warunkach stężenie p53 w cytosolu jest na niskim poziomie. W odpowiedzi na stres komórkowy dochodzi do akumulacji białka p53, co powoduje aktywację apoptozy [77].

Zewnętrzny szlak apoptozy opiera się głównie na wiązaniu liganda do receptora (death receptor, DR). Do DR należą białka z nadrodziny TNF (tumor necrosis factor) – Fas (Apo-1, CD95), TNF-R1 (TNF receptor 1), death receptor 3 (DR-3, Apo-3, TRAMP, WSL-1, LARD), death receptor 4 (TRAIL-R1, DR-4), death receptor 5 (TRAIL-R2, DR-5), DR-6 (death receptor 6), EDA-R (ectodysplasin receptor), NGF-R (nerve growth receptor). Wszystkie DR składają się z zewnątrzkomórkowej domeny, części transbłonowej oraz cytoplazmatycznej domeny DD (death domain), która jest niezbędna do oddziaływania z kompleksem białek adaptorowych. Wiązanie receptora-liganda prowadzi do zmian konformacyjnych w wewnętrznej domenie receptora. Powstaje tzw. kompleks DISC (death-inducing signaling complex) zbudowany z adapterowego białka DR, FADD (*fas*-associated protein with death domain) i prokaspazy-8 lub -10. W wyniku dimeryzacji kompleksu DISC, aktywowana jest kaspaza-8 lub -10. Aktywowane enzymy inicjują kaskadę reakcji, prowadzących do śmierci komórki [47,76,78].

Wewnętrzny szlak apoptozy jest związany z funkcjonowaniem mitochondriów. Pojawienie się uszkodzeń DNA, powoduje zmiany w mitochondrium, takie jak zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej, czy wypływu cytochromu c do cytoplazmy. Następnie cytochrom c aktywuje białko Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) i prokaspazę-9. Dochodzi do formowania się kompleksu – apoptosomu, który indukuje następną kaspazę efektorową [12]. W regulacji tego procesu biorą udział białka błonowe należące do rodziny Bcl-2 (B-cell lymphoma 2). Niektóre z nich, takie jak Bcl-2, czy Bcl-xL są zaliczane do grupy białek antyapoptotycznych, zwiększających prawdopodobieństwo przeżycia komórki. Inne, takie jak Bax (Bcl-2-associated X protein), czy Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) prowadzą do pro-

gramowanej śmierci komórki [63]. Mimo że zewnętrzny i wewnętrzny szlak apoptozy działają w sposób niezależny, to mogą one ze sobą oddziaływać przez białko Bid (BH3 interacting domain death agonist). Kaspaza-8 jest odpowiedzialna za proteolizę białka Bid, który ulega translokacji na powierzchnię mitochondrium. Wywołuje to wypływ cytochromu c do cytosolu i uruchamia wewnętrzny szlak apoptozy [26].

Mechanizm apoptozy różni się w zależności od rodzaju komórki i czynnika powodującego jej śmierć. Filion i wsp. [16] wykazali, że większość hESCs ulegających apoptozie, spowodowanej uszkodzeniem DNA, aktywuje szlak mitochondrialny. W warunkach stresowych, akumulacja białka p53 przyczynia się do zahamowania ekspresji genów Oct-4 (octamer-binding transcription factor 4) i Nanog, odpowiedzialnych za utrzymanie ich pluripotencji. Zjawisko to jest również odpowiedzialne za spontaniczne różnicowanie komórek. Mechanizmy te przyczyniają się do utrzymania integralności genomu hESCs, nie dopuszczając do nagromadzenia zmian mutagenicznych w tych komórkach [16]. W odróżnieniu od hESCs, mESCs wykazują mniejszą podatność do apoptozy i różnicowanie [59]. Niemniej jednak, uszkodzenia DNA w mESCs, także mogą prowadzić do wyciszenia ekspresji Nanog, a w konsekwencji do ich różnicowania [51]. HESCs charakteryzują się niezwykle skutecznymi mechanizmami naprawy DNA oraz zwiększoną częstotliwością zachodzenia procesu apoptozy w porównaniu do zróżnicowanych komórek. W obecności ROS, programowana śmierć komórki w hiPSCs występuje na niższym poziomie w porównaniu do hESCs [13]. Wyizolowane z jelita cienkiego SCs wykazują niską ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2, co czyni je bardziej wrażliwymi na uszkodzenia DNA. W przeciwieństwie do nich SCs wyizolowane z okrężnicy są odporniejsze na działanie promieniowania, ponieważ wytwarzanie białka Bcl-2 kształtuje się na wysokim poziomie. Można zauważyć, że wrażliwość na uszkodzenia DNA i częstotliwość zachodzenia apoptozy indukowanej p53 znacznie różni się we wszystkich SCs [42]. Zatem, jednym z obronnych mechanizmów zdrowych komórek, w obecności czynników geno- lub cytotoksycznych jest skierowanie komórki z nienaprawionym lub błędnie naprawionym DNA na szlak apoptozy. Zjawisko to zapobiega nagromadzeniom mutacji i chroni przed przekazywaniem uszkodzonego materiału genetycznego do komórek potomnych.

WNIOSKI

Podsumowując, komórki macierzyste charakteryzują się unikalnym cyklem komórkowym, co wywołuje ich wzmożoną odpowiedź na czynniki uszkadzające DNA. Mechanizm homologicznej rekombinacji jest głównym mechanizmem naprawy dwuniciowych pęknięć nici DNA w omawianym typie komórek. Nienaprawione uszkodzenia DNA w komórkach macierzystych nasilają apoptozę lub spontaniczne różnicowanie. Zjawisko to zapobiega nagromadzeniu się mutacji, a tym samym przyczynia się do zachowania integralności genomu tych komórek.

Obecnie największą trudnością w stosowaniu SCs jest ich odpowiednie przygotowanie: opracowanie wydajnego protokołu różnicowania, efektywna kultura *in vitro*, powiększanie skali laboratoryjnej, a w końcu dostosowanie do skali klinicznej. Jednak kwestie dotyczące stabilności genetycznej komórek macierzystych i komórek od nich pochodzących w niedalekiej przyszłości będzie bar-

dzo ważnym zagadnieniem z powodu ich nieuniknionej ekspozycji na czynniki geno- i cytotoksyczne podczas rutynowej diagnostyki i stosowania terapii przeciwnowotworowych. Dlatego też dalsze badania dotyczące bezpieczeństwa stosowania pluripotencjalnych komórek macierzystych i ich pochodnych poddanych działaniu promieniowania jonizującego i/lub cytostatyków są niezbędne.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abujarour R., Bennett M., Valamehr B., Lee T.T., Robinson M., Robbins D., Le T., Lai K., Flynn P.: Myogenic differentiation of muscular dystrophy-specific induced pluripotent stem cells for use in drug discovery. *Stem Cells Trans. Med.*, 2014; 3: 149-160
- [2] Banáth J.P., Bañuelos C.A., Klovov D., MacPhail S.M., Lansdorp P.M., Olive P.L.: Explanation for excessive DNA single-strand breaks and endogenous repair foci in pluripotent mouse embryonic stem cells. *Exp. Cell Res.*, 2009; 315: 1505-1520
- [3] Bernstein C., Bernstein H., Payne C.M., Garewal H.: DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 2002; 511: 145-178
- [4] Blanpain C., Mohrin M., Sotiropoulou P.A., Passequè E.: DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011; 8: 16-29
- [5] Bolli R., Chugh A.R., D'Amario D., Loughran J.H., Stoddard M.F., Ikram S., Beache G.M., Wagner S.G., Leri A., Hosoda T., Sanada F., Elmore J.B., Goichberg P., Cappetta D., Solankhi N.K. i wsp.: Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*, 2011; 378: 1847-1857
- [6] Christensen D.M., Iddins C.J., Sugarman S.L.: Ionizing radiation injuries and illnesses. *Emerg Med. Clin. North Am.*, 2014; 32: 245-265
- [7] Creagh E.M., Martin S.J.: Caspases: cellular demolition experts. *Biochem. Soc. Trans.*, 2001; 29: 696-702
- [8] Desmarais J.A., Hoffmann M.J., Bingham G., Gagou M.E., Meuth M., Andrews P.W.: Human embryonic stem cells fail to activate CHK1 and commit to apoptosis in response to DNA replication stress. *Stem Cells*, 2012; 30: 1385-1393
- [9] de Waard H., Sonneveld E., de Wit J., Esvaldt-van Lange R., Hoeijmakers J.H., Vrieling H., van der Horst G.T.: Cell-type-specific consequences of nucleotide excision repair deficiencies: Embryonic stem cells versus fibroblasts. *DNA Repair*, 2008; 7: 1659-1669
- [10] Dexter T.S.: DNA repair pathways and mechanisms. W: DNA Repair of Cancer Stem Cells. Mathews L.A., Carbarcas S.M., Hurt E. (red.) Springer Science+Business Media, Dordrecht 2013; 19-32
- [11] Dominguez-Bendala J., Lanzoni G., Inverardi L., Ricordi C.: Concise Review: Mesenchymal stem cells for diabetes. *Stem Cells Trans. Med.*, 2012; 1: 59-63
- [12] Elmore S.: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 2007; 35: 495-516
- [13] Fan J., Robert C., Jang Y.Y., Liu H., Sharkis S., Byalin S.B., Rassel F.V.: Human induced pluripotent cells resemble embryonic stem cells demonstrating enhanced levels of DNA repair and efficacy of nonhomologous end-joining. *Mutat. Res.*, 2011; 713: 8-17
- [14] Feng Z., Gao F.: Stem cell challenges in the treatment of neurodegenerative disease. *CNS Neurosci. Ther.*, 2012; 18: 142-148
- [15] Ferdousi L.V., Rocheteau P., Chayot R., Montagne B., Chaker Z., Flament P., Tajbakhsh S., Ricchetti M.: More efficient repair of DNA double-strand breaks in skeletal muscle stem cells compared to their committed progeny. *Stem Cell Res.*, 2014; 13: 492-507
- [16] Filion T.M., Qiao M., Ghule P.N., Mandeville M., van Wijnen A.J., Stein J.L., Lian J.B., Altieri D.C., Stein G.S.: Survival responses of human embryonic stem cells to DNA damage. *J. Cell Physiol.*, 2009; 220: 586-592
- [17] Fragma A.M., de Araújo É.S., Vergani N., Fonseca S.A., Pereira L.V.: Use of human embryonic stem cells in therapy. stem cells and cell therapy cell engineering, 2014; 8: 1-19
- [18] Fuchs Y., Steller H.: Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 2011; 147: 742-758
- [19] Fung H., Weinstock D.M.: Repair at single targeted DNA double-strand breaks in pluripotent and differentiated human cells. *PLoS One*, 2011; 6: e20514
- [20] Giglia-Mari G., Zotter A., Vermeulen W.: DNA damage response. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, 2011; 3: a000745
- [21] Gruszecka A., Kopczyński P., Cudziło D., Lipińska N., Romaniuk A., Barczak W., Rozwadowska N., Totoń E., Rubiś B.: Telomere shortening in down syndrome patients - when does it start? *DNA Cell Biol.*, 2015; 34:412-417
- [22] Han J., Hendzel M.J., Allalunis-Turner J.: Quantitative analysis reveals asynchronous and more than DSB-associated histone H2AX phosphorylation after exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res.*, 2006; 165: 283-292
- [23] Harfouche G., Martin M.T.: Response of normal stem cells to ionizing radiation: a balance between homeostasis and genomic stability. *Mutat. Res.*, 2010; 704: 167-174
- [24] He Y.C., Zhou F.L., Shen Y., Liao D.F., Cao D.: Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014; 15: 8335-8351
- [25] Hong Y., Stambrook P.J.: Restoration of an absent G₁ arrest and protection from apoptosis in embryonic stem cells after ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 14443-14448
- [26] Igney F.H., Krammer P.H.: Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 277-288
- [27] Inzunza J., Sahlén S., Holmberg K., Strömberg A.M., Teerijoki H., Blennow E., Hovatta O., Malmgren H.: Comparative genomic hybridization and karyotyping of human embryonic stem cells reveals the occurrence of an isodicentric X chromosome after long-term cultivation. *Mol. Hum. Reprod.*, 2004; 10: 461-466
- [28] Jackson S.P., Bartek J.: The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 2009; 461: 1071-1078
- [29] Jezierska-Woźniak K., Nosarzewska D., Tutas A., Mikołajczyk A., Okliński M., Jurkowski M.J.: Wykorzystanie tkanki tłuszczowej jako źródła mezenchymalnych komórek macierzystych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 326-332
- [30] Jin Z.B., Okamoto S., Mandai M., Takahashi M.: Induced pluripotent stem cells for retinal degenerative diseases: a new perspective on the challenges. *J. Genet.*, 2009; 8: 417-424
- [31] Kenyon J., Gerson S.L.: The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells. *Nucleic Acids Res.*, 2007; 35: 7557-7565

- [32] Krejci L., Altmannova V., Spirek M., Zhao X.: Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.*, 2012; 49: 5795-5818
- [33] Kunkel T.A., Erie D.A.: DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.*, 2005; 74: 681-710
- [34] Lach M., Trzeciak T., Richter M., Pawlicz J., Suchorska W.M.: Directed differentiation of induced pluripotent stem cells into chondrogenic lineages for articular cartilage treatment. *J. Tissue Eng.*, 2014; 5: 2041731414552701
- [35] Li F., Huang Q., Chen J., Peng Y., Roop D., Bedford J.S., Li C.Y.: Apoptotic cells activate the „Phoenix Rising” pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci. Signal*, 2010; 3: ra13
- [36] Lieber R.M.: The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, 2010; 79: 181-211
- [37] Lund P.K.: Fixing the breaks in intestinal stem cells after radiation: a matter of DNA damage and death or DNA repair and regeneration. *Gastroenterology*, 2012; 143: 1144-1147
- [38] Lund R.J., Närvä E., Lahesmaa R.: Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Genet.*, 2012; 13: 732-744
- [39] Lundin C., Erixon K., Arnaudeau C., Schultz N., Jenssen D., Meuth M., Helleday T.: Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, 2002; 22: 5869-5878
- [40] Luo L.Z., Gopalakrishna-Pillai S., Nay S.L., Park S.W., Bates S.E., Zeng X., Iverson L.E., O'Connor T.R.: DNA repair in human pluripotent stem cells is distinct from that in non-pluripotent human cells. *PLoS One*, 2012; 7: e30541
- [41] Magalhaes J.P.: How ageing processes influence cancer. *Nat Rev Cancer*, 2013; 13: 357-365
- [42] Mandal P.K., Blanpain C., Rossi D.J.: DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2011; 12: 198-202
- [43] Mao Z., Bozzella M., Seluanov A., Gorbunova V.: DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*, 2008; 7: 2902-2906
- [44] Martins-Taylor K., Nishler S.B., Taapken S.M., Compton T., Crandall L., Montgomery K.D., Lalande M., Xu R.H.: Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.*, 2011; 29: 6-9
- [45] Maugeri-Saccà M., Bartucci M., De Maria R.: DNA damage repair pathways in cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, 2012; 11: 1627-1636
- [46] Maynard S., Swistikowa A.M., Lee J.W., Liu L., Liu Y., Liu S.T., Da Cruz A., Rao M., de Souza-Pinto N.C., Zeng X., Bohr V.A.: Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells*, 2008; 26: 2266-2274
- [47] Mcllwain D.R., Berger T., Mak T.K.: Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2013; 5: a008656
- [48] Middel V., Blattner C.: DNA repair in embryonic stem cells. *W: DNA Repair - On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors*. Francesca Storici (red.) In Tech., 2011; 978-953-307-649-2
- [49] Momcilović O., Choi S., Varum S., Bakkenist C., Schatten G., Navara C.: Ionizing radiation induces ATM-dependent checkpoint signaling and G₂ but not G₁ cell cycle arrest in pluripotent human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2009; 27: 1822-1835
- [50] Momcilović O., Knobloch L., Fornasaglio J., Varum S., Easley C., Schatten G.: DNA damage responses in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *PLoS One*, 2010; 5: e13410
- [51] Neganova I., Vilella F., Atkinson S.P., Lloret M., Passos J.F., von Zglinicki T., O'Connor J.E., Burks D., Jones R., Armstrong L., Lako M.: An important role for CDK2 in G1 to S checkpoint activation and DNA damage response in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2011; 29: 651-659
- [52] Nguyen H.T., Geens M., Spits C.: Genetic and epigenetic instability in human pluripotent stem cells. *Hum. Reprod. Update*, 2013; 19:187-205
- [53] Oliver L., Hue E., Séry Q., Lafargue A., Pecqueur C., Paris F., Vallette F.M.: Differentiation-related response to DNA breaks in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2013; 31: 800-807
- [54] Park Y., Gerson S.L.: DNA repair defects in stem cell function and aging. *Annu. Rev. Med.*, 2005; 56: 495-508
- [55] Peterson S.E., Loring J.F.: Genomic instability in pluripotent stem cells: implications for clinical applications. *J. Biol. Chem.*, 2014; 289: 4578-4584
- [56] Pines A., Kelstrup C.D., Vrouwe M.G., Puigvert J.C., Typas D., Mišovic B., de Groot A., von Stechow L., van de Water B., Danen E.H., Vrieling H., Mullenders L.H., Olsen J.V.: Global phosphoproteome profiling reveals unanticipated networks responsive to cisplatin treatment of embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.*, 2011; 31: 4964-4977
- [57] Piskorska-Jasiulewicz M.M., Witkowska-Zimny M.: Okołoporodowe źródła komórek macierzystych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 327-334
- [58] Prendergast Á.M., Cruet-Hennequart S., Shaw G., Barry F.P., Carty M.P.: Activation of DNA damage response pathways in human mesenchymal stem cells exposed to cisplatin or γ -irradiation. *Cell Cycle*, 2011; 10: 3768-3777
- [59] Qin H., Yu T., Qing T., Liu Y., Zhao Y., Cai J., Li J., Song Z., Qu X., Zhou P., Wu J., Ding M., Deng H.: Regulation of apoptosis and differentiation by p53 in human embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 5842-5852
- [60] Rich T., Allen L., Wyllie A.H.: Defying death after DNA damage. *Nature*, 2000; 407: 777-783
- [61] Robertson A.B., Klungland A., Rognes T., Leiros I.: DNA repair in mammalian cells: base excision repair: the long and short of it. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2009; 66: 981-993
- [62] Rocha C.R., Lerner L.K., Okamoto O.K., Marchetto M.C., Menck C.F.: The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. *Mutat. Res.*, 2013; 752: 25-35
- [63] Roos W.P., Kaina B.: DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.*, 2013; 332: 237-248
- [64] Ryoo H.D., Bergmann A.: The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2012; 4: a008797
- [65] Serrano L., Liang L., Chang Y., Deng L., Maulion C., Nguyen S., Tischfield J.A.: Homologous recombination conserves DNA sequence integrity throughout the cell cycle in embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.*, 2011; 20: 363-374
- [66] Shuck S.C., Short E.A., Turchi J.J.: Eukaryotic nucleotide excision repair, from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res.*, 2008; 18: 64-72
- [67] Sokolov M.V., Neumann R.D.: Human embryonic stem cells responses to ionizing radiation exposures: current state of knowledge and future challenges. *Stem Cells Int.*, 2012; 2012: 579104
- [68] Sokolov M.V., Neumann R.D.: Radiation-induced bystander effect in cultured human stem cells. *PLoS One*, 2010; 5: e14195
- [69] Sokolov M., Neumann R.: Effects of low doses of ionizing radiation exposures on stress-responsive gene expression in human embryonic stem cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014; 15: 588-604
- [70] Taapken S.M., Nisler B.S., Newton M., Sampsel-Barron T.L., Leonhard K., McIntire E.M., Montgomery K.D.: Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.*, 2011; 29: 313-314
- [71] Tichy E.D., Liang L., Deng L., Tischfield J., Schwemberger S., Babcock G., Stambrook P.J.: Mismatch and base excision repair proficient

cy in murine embryonic stem cells. *DNA Repair*, 2011; 10: 445-451

[72] Tichy E.D., Stambrook P.J.: DNA repair in murine embryonic stem cells and differentiated cells. *Exp. Cell. Res.*, 2008; 314: 1929-1936

[73] von Stechow L., Ruiz-Aracama A., van de Water B., Peijnenburg A., Danen E., Lommen A.: Identification of cisplatin-regulated metabolic pathways in pluripotent stem cells. *PLoS One*, 2013; 8: e76476

[74] Wilson K.D., Sun N., Huang M., Zhang W.Y., Lee A.S., Li Z., Wang S.X., Wu J.C.: Effects of ionizing radiation on self-renewal and pluripotency of human embryonic stem cells. *Cancer Res.*, 2010; 70: 5539-5548

[75] Wood R.D., Mitchell M., Lindahl T.: Human DNA repair genes. *Mutat Res.*, 2005; 577: 275-283

[76] Würstle M.L., Laussmann M.A., Rehm M.: The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp. Cell Res.*, 2012; 318: 1213-1220

[77] Xu X., Cowley S., Flaim C.J., James W., Seymour L., Cui Z.: The role of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells. *Biotechnol. Prog.*, 2010; 26: 827-837

[78] Yang J.K.: FLIP as an anti-cancer therapeutic target. *Yonsei Med J.*, 2008; 49: 19-27

[79] Zaman M.H.: The role of engineering approaches in analyzing cancer invasion and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 2013; 13: 596-603

[80] Zhao T., Xu Y.: p53 and stem cells: new developments and new concerns. *Trends Cell Biol.*, 2010; 20: 170-175

[81] Zou Y., Zhang N., Ellerby L.M., Davalos A.R., Zeng X., Campisi J., Desprez P.Y.: Responses of human embryonic stem cells and their differentiated progeny to ionizing radiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012; 426: 100-105

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.