Abstract

Project Code : TRG5880214

Project Title : Characteristics of replication-independent endogenous double-strand breaks in human and mutant yeast strains

Investigator : Asst. Prof. Dr. Monnat Pongpanich, Chulalongkorn University

E-mail Address : monnat.p@chula.ac.th

Project Period : July 1, 2015 – June, 30, 2018

Abstract

The mechanism that causes genomic instability in nondividing aging cells is unknown. Our previous study of mutant yeast suggested that 2 types of replication-independent endogenous DNA double-strand breaks (RIND-EDSBs) exist and that they play opposing roles. The first type, known as physiologic RIND-EDSBs, were ubiquitous in the G0 phase of both yeast and human cells in certain genomic locations and may act as epigenetic markers. Low RIND-EDSB levels were found in mutants that lacked chromatin-condensing proteins, such as the high-mobility group box (HMGB) proteins and Sir2. The second type is referred to as pathologic RIND-EDSBs. High pathological RIND-EDSB levels were found in DSB repair mutants. Under normal physiologic conditions, these excess RIND-EDSBs are repaired in much the same way as DNA lesions. Here, chronological aging in yeast reduced physiological RIND-EDSBs and cell viability. A strong correlation was observed between the reduction in RIND-EDSBs and viability in aging yeast cells ($r = 0.94$, $P < 0.0001$). We used galactose-inducible HO endonuclease (HO) and *nhp6aΔ*, an HMGB protein mutant, to evaluate the consequences of reduced physiological RIND-EDSB levels. The HO-induced cells exhibited a sustained reduction in RIND-EDSBs at various levels for several days. Interestingly, we found that lower physiologic RIND-EDSB levels resulted in decreased cell viability ($r = 0.69$, $P < 0.0001$). Treatment with caffeine, a DSB repair inhibitor, increased pathological RIND-EDSBs, which were distinguished from physiologic RIND-EDSBs by their lack of sequences prior to DSB in untreated cells [odds ratio (OR) ≤ 1].

Caffeine treatment in both the HO-induced and *nhp6aΔ* cells markedly increased OR $\leq$ 1 breaks. Therefore, physiological RIND-EDSBs play an epigenetic role in preventing pathological RIND-EDSBs, a type of DNA damage. In summary, the reduction of physiological RIND-EDSB level is a genomic instability mechanism in chronologically aging cells.

Keywords : RIND-EDSBs, epigenetics, senescence, DNA lesions, DNA damage

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5880214

ชื่อโครงการ : ลักษณะของการฉีกขาดของคู่ของสายดีเอ็นเอแบบไม่มีสาเหตุภายนอกในระยะที่ไม่มีการจำลองตัวของดีเอ็นเอในมนุษย์และในยีสต์สายพันธุ์กลาย

ชื่อนักวิจัย : ผศ. ดร.มนนัทธ์ พงษ์พานิช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : monnat.p@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2558 – 30 มิถุนายน 2561

บทคัดย่อ

กลไกที่ทำให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนมในเซลล์ที่ไม่มีการแบ่งตัวยังไม่เป็นที่ทราบ การศึกษาของคณะผู้วิจัยในก่อนหน้านี้ในยีสต์สายพันธุ์กลายแสดงให้เห็นว่าการฉีกขาดของคู่ของสายดีเอ็นเอแบบไม่มีสาเหตุภายนอกในระยะที่ไม่มีการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (RIND-EDSBs) มี 2 แบบ และสองแบบนี้มีบทบาทที่ตรงกันข้าม แบบแรกเรียกว่า การฉีกขาดของคู่ของสายดีเอ็นเอแบบไม่มีสาเหตุภายนอกในระยะที่ไม่มีการจำลองตัวของดีเอ็นเอทางสรีรวิทยา (physiologic RIND-EDSBs) ซึ่งพบได้ทั่วไปในระยะ G0 ของทั้งในเซลล์ยีสต์และเซลล์มนุษย์ในบริเวณบางตำแหน่งของจีโนมและอาจทำหน้าที่เป็น epigenetic mark ในยีสต์สายพันธุ์กลายที่ไม่มีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขดตัวของโครมาติน เช่น โปรตีน high-mobility group box (HMGB) และ Sir2 จะพบ RIND-EDSBs ในระดับต่ำ แบบที่สองเรียกว่าการฉีกขาดของคู่ของสายดีเอ็นเอแบบไม่มีสาเหตุภายนอกในระยะที่ไม่มีการจำลองตัวของดีเอ็นเอทางพยาธิวิทยา (pathologic RIND-EDSBs) ในยีสต์สายพันธุ์กลายที่บกพร่องในการซ่อมแซมการฉีกขาดของคู่ของสายดีเอ็นเอ พบ pathologic RIND-EDSBs ในระดับสูง ภายใต้สภาวะปกติทางสรีรวิทยา RIND-EDSBs ที่เป็นส่วนเกินนี้จะได้รับการซ่อมแซมในรูปแบบเดียวกับรอยแผลของดีเอ็นเอ ในที่นี้ยีสต์ที่มีอายุมากขึ้นตามลำดับเวลามี physiologic RIND-EDSBs และความมีชีวิตของเซลล์ลดลง พบความสัมพันธ์ระหว่างการลดลงของ RIND-EDSBs กับความมีชีวิตของเซลล์ในยีสต์ที่มีอายุเพิ่มขึ้น ($r = 0.94$, $P < 0.0001$) เราใช้ galactose-inducible HO endonuclease (HO) และ *nhp6aΔ* ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีโปรตีน HMGB ผิดปกติ เพื่อประเมินผลลัพธ์จากการที่ระดับ physiologic RIND-EDSB ถูกลดลง เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย HO แสดงการลดลงของ RIND-EDSBs ในหลายระดับอย่างต่อเนื่องเป็นเวลาหลายวัน เราพบว่าระดับ physiologic RIND-EDSB ที่ลดลงส่งผลให้ระดับความมีชีวิตของเซลล์ลดลง ($r = 0.69$, $P < 0.0001$) การใส่

คาเฟอีนซึ่งเป็นสารยับยั้งการซ่อมแซมการฉีกขาดของคู่ของสายดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการเพิ่มระดับของ pathologic RIND-EDSBs ซึ่งมีความแตกต่างจาก physiologic RIND-EDSBs โดยดูจากการไม่มี sequence ที่ปรากฏอยู่หน้าตำแหน่งฉีกขาดของคู่ของสายดีเอ็นเอในเซลล์ที่ไม่ได้ใส่คาเฟอีน [odds ratio (OR) ≤ 1] การใส่คาเฟอีนทั้งในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย HO และ *nhp6aΔ* ส่งผลให้เพิ่ม OR ≤ 1 breaks ดังนั้น physiologic RIND-EDSB จึงมีบทบาททาง epigenetic ในการป้องกัน pathologic RIND-EDSBs ซึ่งเป็นความเสียหายประเภทหนึ่งของดีเอ็นเอ โดยสรุปแล้วการลดระดับของ physiologic RIND-EDSBs เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับความไม่เสถียรของจีโนมในเซลล์ที่มีอายุมากขึ้นตามลำดับเวลา

คำหลัก : RIND-EDSBs, อีพีเจเนติกส์, การเสื่อมตามอายุ, บาดแผลของดีเอ็นเอ, ความเสียหายของดีเอ็นเอ