

PIOTR WIDŁAK

Zakład Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej

Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-100 Gliwice

e-mail: widlak@io.gliwice.pl

STRUKTURA CHROMATYNY A POWSTAWANIE I NAPRAWA USZKODZEŃ DNA

WPROWADZENIE

Genomy wszystkich organizmów narażone są na działanie czynników mających zdolność modyfikacji chemicznej struktury DNA, czyli indukowania uszkodzeń DNA. Do takich czynników, nazywanych genotoksycznymi, należą różnorodne substancje chemiczne i niektóre rodzaje promieniowania elektromagnetycznego. Jednym z rodzajów endogennych czynników genotoksycznych są reaktywne formy tlenu, będące produktami metabolizmu komórkowego. Efektem działania substancji takich jak wolne rodniki tlenowe są oksydacyjne modyfikacje zasad azotowych DNA (w tym 8-okso-deoksyguanina, traktowana często jako znacznik oksydacyjnych uszkodzeń DNA) oraz pęknięcia jednej lub obu nici DNA (ang. single-, double-strand breaks). Środowiskowe czynniki genotoksyczne to przede wszystkim promieniowanie ultrafioletowe i promieniowanie jonizujące, ale również liczne chemiczne związki alkilujące i aryłujące (wśród nich policykliczne węglowodory aromatyczne). Fotouszkodzenia DNA indukowane przez promieniowanie UV to głównie dimery pirymidynowe, zaś promieniowanie jonizujące indukuje przede wszystkim oksydacyjne modyfikacje zasad i pęknięcia nici DNA. Alkilujące i aryłujące związki chemiczne mogą kowalencyjnie wiązać się z nukleotydami tworząc tak zwane addukty DNA. Wszystkie takie uszkodzenia DNA w mniejszym lub większym stopniu zmieniają strukturę chromosomów i zaburzają procesy ich replikacji. Ponie-

waż replikacja DNA zawierającego uszkodzenia wiąże się z ryzykiem powstania mutacji, obecność takich uszkodzeń jest szczególnie niebezpieczna w komórkach dzielących się.

Komórki dysponują detektorami uszkodzeń DNA i po ich wykryciu uruchamiają kilka typów odpowiedzi. Podstawową odpowiedzią komórki na uszkodzenia DNA jest jego naprawa, pozwalająca na usunięcie uszkodzenia i odtworzenie prawidłowej struktury DNA. Jednocześnie z zainicjowaniem naprawy, w komórkach uruchamiane są mechanizmy prowadzące do zablokowania cyklu komórkowego (ang. checkpoint control system). Zablokowanie cyklu komórkowego wydłuża czas na naprawę DNA przed replikacją i podziałem chromosomów. Uszkodzenia DNA, które nie mogą być naprawione, są często eliminowane razem z całą komórką. Proces umożliwiający takie rozwiązanie nazywamy apoptozą, czy inaczej – programowaną śmiercią komórki. W organizmach funkcjonują różne mechanizmy naprawy DNA. Najprostszy z nich to tak zwana naprawa bezpośrednia, pozwalająca na naprawę niektórych typów fotouszkodzeń (proces katalizowany przez fotolizazy DNA), czy alkilowanych nukleotydów (katalizowany przez odpowiednie metylotransferazy). Wiele typów uszkodzeń usuwanych jest z DNA za pośrednictwem naprawy przez wycinanie. W naprawie takiej uszkodzony nukleotyd usuwany jest wraz z fragmentem jednej nici DNA, a brakujący fragment syntetyzowany jest na ma-

trzy nici komplementarnej. W mechanizmie naprawy przez wycięcie zasady (ang. base excision repair, BER) naprawiane są głównie zasady oksydowane lub alkilowane. Z kolei w mechanizmie naprawy przez wycięcie nukleotydu (ang. nucleotide excision repair, NER) usuwane są fotouszkodzenia indukowane przez promieniowanie UV czy addukty indukowane przez policykliczne węglowodory aromatyczne. W mechanizm ten zaangażowanych jest ponad trzydzieści białek o różnej aktywności enzymatycznej (miedzy innymi helikazy, nukleazy, polimerazy i ligazy DNA). Pęknięcia obu nici DNA, uszkodzenia szczególnie niebezpieczne dla komórek, naprawiane są dzięki mechanizmom rekombinacyjnym: rekombinacji homologicznej (HR) oraz łączenia końców niehomologicznych (NHEJ). Ponieważ powstawanie uszkodzeń DNA jest procesem ciągłym, sprawność mechanizmów naprawy DNA ma ogromne znaczenie dla utrzymania stabilności genomu. Osłabienie wydajności naprawy DNA (wynikające na przykład z mutacji w genach kodujących białka naprawcze) wiąże się ze zwiększonym ryzykiem powstawania mutacji i rozwoju chorób nowotworowych. Szczegółowe omówienie procesów prowadzących do powstawania uszkodzeń DNA i mechanizmów ich naprawy oraz związków z procesami mutagenyzy i nowotworzenia znajdzie Czytelnik w innych pracach przeglądowych, w tym wielu pracach publikowanych w języku polskim (PIETRZYKOWSKA i KRWAWICZ 1999, TRZECIAK i BŁASIAK 1999, TUDEK 1999, ZDZIENICKA 1999).

Materiał genetyczny ma w komórkach eukariotycznych postać chromatyny, czyli kompleksu DNA, histonów i innych białek. Podstawową jednostką strukturalną chromatyny jest nukleosom, zbudowany z oktameru histonowego (centralny tetramer [H3/H4]₂ i dwa peryferyjne dimery [H2A/H2B]), wokół którego owinięte jest 146 par nukleotydów. Pomiedzy kolejnymi nukleosomami znajduje się, wrażliwy na działanie nukleaz, DNA łącznikowy o zmiennej długości (10-90 par zasad), który może oddziaływać z histonem H1 lub innymi niehistonowymi białkami chromatyny. Włókno nukleosomowe może być pofałdowa-

ne w bardziej skomplikowane struktury o różnym stopniu upakowania; największy stopień upakowania osiąga chromatyna w chromosomie metafazowym. Włókna chromatyny komórek interfazowych mogą oddziaływać z laminą jądrową i z hipotetyczną, wewnątrzjądrową strukturą szkieletową, tak zwaną macierzą jądrową. Oddziaływania chromatyny z takimi białkami szkieletowymi umożliwiają tworzenie strukturalnie i funkcjonalnie wyodrębnionych domen, tak zwanych pętli chromatyny. Kolejne struktury chromatyny pozwalają na uporządkowane upakowanie długich cząsteczek DNA na terenie jądra komórkowego oraz mają istotne znaczenie dla regulacji wszystkich procesów metabolicznych przebiegających w jądrze. Informacje dotyczące struktury nukleosomów i organizacji chromatyny w jądrze znajdzie Czytelnik w innych pracach przeglądowych (HAYES i HANSEN 2001, WOODCOCK i DIMITROV 2001). Nukleosomowa organizacja chromatyny ma, poza funkcjami strukturalnymi, decydujące znaczenie dla regulacji ekspresji materiału genetycznego. We frakcji chromatyny o dużym stopniu kondensacji (tzw. heterochromatyna) nukleosomy są czynnikiem odpowiedzialnym za represję transkrypcji. Zmiana struktury nukleosomów i osłabienie oddziaływań DNA z histonami pozwala na udostępnienie DNA dla swoistych czynników transkrypcyjnych i polimeraz RNA. Zmiany struktury nukleosomów i stopnia upakowania chromatyny, pozwalające na regulację transkrypcji, zależne są między innymi od kowalencyjnych modyfikacji DNA (metylacja) i histonów (acetylacja, metylacja i fosforylacja) oraz od aktywności kompleksów remodelujących chromatynę. Szersze omówienie związków między transkrypcją a nukleosomową strukturą chromatyny można znaleźć w licznych pracach przeglądowych (KORNBERG 1999, ALFS i KINGSTON 2000, WU i GRUNSTEIN 2000). Struktura nukleosomowa chromatyny (i jej ewentualne zmiany) jest czynnikiem decydującym również o przebiegu procesów naprawy. Zagadnienie to jest przedmiotem niniejszej pracy.

STRUKTURA CHROMATYNY MODULUJE PODATNOŚĆ DNA NA CZYNNIKI GENOTOKSYCZNE

Decydujące znaczenie dla powstania danego typu uszkodzeń DNA ma struktura nukleotydu i jej swoiste oddziaływania chemiczne z

czynnikami uszkadzającym. Przykładowo: dodatkowe wiązania indukowane przez promieniowanie UV tworzą się między pierścieniami

sąsiadujących pirymidyn, a związki alkilujące preferują atom N7 guaniny. Jednak podatność konkretnego nukleotydu na uszkodzenia modulowana jest przez szereg innych czynników. Należą do nich struktura przestrzenna danego fragmentu DNA czy kontekst sekwencji DNA (czyli rodzaj sąsiadujących nukleotydów). Dodatkowo podatność konkretnego fragmentu DNA na uszkodzenia modulowana jest przez oddziałujące z nim białka. Od lat znany jest fakt, iż struktura nukleosomowa ma wpływ na ilość uszkodzeń DNA. Poziom adduktów indukowanych przez wiele chemicznych związków genotoksycznych, podobnie jak poziom tzw. (6-4)-fotoproduktów indukowanych przez promieniowanie UV, jest wielokrotnie wyższy w DNA łącznikowym niż w DNA z rdzenia nukleosomów. Z kolei w plemnikach, gdzie histony zastąpione są przez protaminy (co pozwala na silniejszą niż w nukleosomach kondensację chromatyny), DNA jest bardziej oporny na uszkodzenia niż DNA z komórek somatycznych (WIDLAK 1994, 1997). Innymi białkami, których oddziaływanie z DNA moduluje jego podatność na uszkodzenia są czynniki transkrypcyjne. Związanie czynnika transkrypcyjnego może zmniejszyć lub zwiększyć wydajność z jaką czynniki genotoksyczne uszkadzają DNA w obrębie miejsca wiązania. Fakt ten wykorzy-

stywany jest do mapowania miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych w żywej komórce (ang. footprinting); wykorzystuje się do tego najczęściej proste czynniki alkilujące takie jak siarczan dwumetylu (DMS). Stwierdzono, że wiązanie takich czynników transkrypcyjnych jak Sp1, AP-1 czy NF-1 wielokrotnie zwiększa poziom fotouszkodzeń indukowanych przez promieniowanie UV. Wskazuje to, że poziom uszkodzeń w pewnych regionach DNA może mieć charakter swoisty tkankowo (TORNALETTI i PFEIFER 1995).

W niektórych sekwencjach DNA prawdopodobieństwo zaistnienia mutacji jest wielokrotnie wyższe niż w innych fragmentach tego samego genu. Powstanie takich gorących punktów mutacyjnych (ang. mutation hot spots) jest wypadkową kilku czynników, między innymi: (i) szybkości uszkadzania danego nukleotydu, (ii) wydajności naprawy tego nukleotydu i (iii) dokładności z jaką polimerazy DNA odczytują dane uszkodzenie. Struktura chromatyny i obecność związanych białek jest jednym z czynników decydujących o częstotliwości z jaką dany nukleotyd jest uszkadzany. Podobnie, oddziaływanie z białkami jest czynnikiem modulującym wydajność naprawy tego nukleotydu. Zagadnienie to zostanie omówione w dalszej części artykułu.

STRUKTURA CHROMATYNY DECYDUJE O SZYBKOŚCI NAPRAWY DNA

Już w latach 70. stwierdzono, że naprawcza synteza DNA jest szybsza w DNA łącznikowym niż w DNA związanym z rdzeniem nukleosomów. Natomiast rekonstytucja nukleosomów na DNA plazmidowym (tworzenie tak zwanych minichromosomów) jest czynnikiem wielokrotnie spowalniającym jego naprawę (WIDLAK 1997). W połowie lat 80. w laboratorium P. Hanawalta wykryto, że indukowane przez promieniowanie UV dimery pirymidynowe usuwane są wielokrotnie szybciej z aktywnego genu reduktazy dwuhydrofolianowej niż z innych części genomu tych samych komórek. Wkrótce potem stwierdzono, że fotouszkodzenia usuwane są szybciej z nici będącej matrycą w procesie transkrypcji (nić antysensowna), niż z nie transkrybowanej nici sensownej (BOHR 1991). Taka preferencyjna naprawa DNA dotyczy naprawy przez wycinanie nukleotydu (NER). Obecnie wiadomo, że w komórkach funkcjonują dwa rodzaje tego mechanizmu reperacyjnego. Naprawa nici transkrybo-

wanej, (ang. transcription-coupled NER TC-NER), całkowicie zależna jest od transkrypcji, a sygnałem dla jej rozpoczęcia jest zablokowanie polimerazy II RNA na uszkodzonym nukleotydzie. W komórkach bakteryjnych przebieg TC-NER zależny jest od białka TRCF, które inicjuje dysocjację polimerazy RNA z uszkodzonej matrycy i stymuluje wiązanie z uszkodzonym DNA kompleksu naprawczego UvrABC nukleazy. Mechanizm TC-NER w komórkach eukariotycznych nie jest do końca wyjaśniony; czynniki swoiście związane z tym rodzajem naprawy w komórkach ludzkich to białka CSA i CSB. DNA nieaktywny transkrypcyjnie i nie sensowna genów transkrybowanych naprawiana jest w mechanizmie określonym z ang. global genome NER, GG-NER. Czynnikiem swoistym dla GG-NER jest białko XPC; pozostałe białka reperacyjne są wspólne dla obu rodzajów naprawy przez wycięcie nukleotydu (WIDLAK 1997, PIETRZYKOWSKA i KRZAWICZ 1999, TRZECIAK i BŁASIAK 1999).

Preferencyjna naprawa nici transkrybowanej sprawia, że mutacje znacznie częściej wywołwane są przez uszkodzenia nici sensownej niż uszkodzenia nici antysensownej, nawet jeśli obie nici uszkodzane są z podobną częstością. Przykładem może być wolna naprawa uszkodzeń nici sensownej w miejscach odpowiedzialnych za powstawanie „gorących” punktów mutacyjnych w genie *p53* (DENISSENKO i współaut. 1998).

Chociaż, poza aktualnie transkrybowanymi niemi DNA, cały genom naprawiany jest przy udziale mechanizmu GG-NER, to różne obszary genomu naprawiane są różną szybkością. Uszkodzenia usuwane są 2-3-krotnie wolniej z DNA znajdującego się w silnie skondensowanej heterochromatynie niż z genów aktywnych lub potencjalnie aktywnych znajdujących się chromatynie o luźniejszej strukturze (BOHR 1991). Również różne fragmenty tego samego genu mogą być naprawiane z różną szybkością. Decydują o tym swoiste oddziaływania z histonami lub innymi białkami niehistonowymi. Przykładem może być bardzo wolna naprawa

promotora w regionie oddziałującym z czynnikami transkrypcyjnymi (GAO i współaut. 1994). Jedną z cech chromatyny aktywnej transkrypcyjnie są jej oddziaływania ze strukturami szkieletowymi jądra, a frakcja DNA związanego z macierzą jądrową jest zwykle wzbogacona w geny transkrybowane. Wiadomo, że te rodzaje uszkodzeń, które mogą być naprawiane preferencyjnie w mechanizmie TC-NER (np. foto-uszkodzenia) usuwane są najszybciej z frakcji DNA związanego z macierzą jądrową (MULLENDERS i współaut. 1990). Ostatnio stwierdzono, że swoiste dla TC-NER białko CSA ulega przemieszczeniu do macierzy jądrowej w komórkach poddanych działaniu czynników uszkodzających DNA (KAMIUCHI i współaut. 2002). Sugeruje to, że mechanizmy naprawy DNA (a przynajmniej mechanizm TC-NER) zlokalizowane są w macierzy jądrowej. Nie można jednak wykluczyć, że szybka naprawa DNA związanego z macierzą jądrową jedynie odzwierciedla preferencyjną naprawę genów aktywnych transkrypcyjnie, zlokalizowanych w pobliżu tej struktury.

ZMIANY STRUKTURY CHROMATYNY W TRAKCIE NAPRAWY DNA

Typową cechą niemal wszystkich mechanizmów naprawy jest to, że biorą w nich udział olbrzymie kompleksy białkowe, a naprawiany DNA poddany jest wielu zmianom strukturalnym (rozplatanie, obróbka nukleolityczna czy synteza nici). Można więc łatwo wyobrazić sobie, że upakowana struktura chromatyny (czy sama obecność nukleosomów) jest czynnikiem spowalniającym lub nawet uniemożliwiającym naprawę uszkodzeń. Szereg danych wskazuje, że w trakcie naprawy DNA struktura chromatyny ulega istotnym zmianom. Stwierdzono na przykład, że dimery pirymidynowe usuwane są z DNA rdzenia nukleosomu z szybkością niezależną od ich położenia względem oktameru histonowego. Sugeruje to, że w trakcie naprawy zachodzi reorganizacja struktury nukleosomów (lub nawet ich całkowite usuwanie) (SMERDON 1991).

Procesy, które ułatwiają oddziaływanie białek naprawczych z uszkodzeniami mają swoje analogie w znacznie lepiej poznanych mechanizmach regulujących aktywność transkrypcyjną chromatyny i ułatwiających wiązanie czynników transkrypcyjnych. Dwa spośród wielu mechanizmów modyfikujących strukturę chromatyny wydają się mieć decydujące zna-

czenie dla regulacji aktywności transkrypcyjnej. Jednym z nich jest acetylacja histonów katalizowana przez swoiste acetylotransferazy. Acetylacja reszt lizynowych w aminowych końcach histonów neutralizuje dodatni ładunek grup aminowych, zmieniając ich oddziaływania z DNA i innymi białkami, co inicjuje lokalną decondensację włókna nukleosomowego. Natomiast deacetylacja histonów katalizowana przez swoiste deacetylazy zwiększa stopień kondensacji chromatyny (BROWN i współaut. 2000, CHEN i współaut. 2001). Drugim czynnikiem ułatwiającym wiązanie czynników transkrypcyjnych jest aktywność kompleksów remodelujących chromatynę. Kompleksy te składają się z kilku-kilkunastu podjednostek, w ich skład wchodzi białka posiadające domenę helikazy, a ich aktywność zależna jest od hydrolizy ATP. Efektem działania kompleksów remodelujących chromatynę jest zwykle przemieszczenie DNA względem oktameru histonowego (mechanizm ich działania nie jest jednak jasny) (CALIKOWSKI 2001, FLAUS i OWEN-HUGHES 2001). Zarówno acetylotransferazy (i deacetylazy) histonów, jak i kompleksy remodelujące chromatynę swoście oddziałują z czynnikami transkrypcyjnymi, mając charakter aktywato-

rów (lub represorów) transkrypcji. Przykładem mogą być oddziaływania acetylotransferaz z czynnikiem transkrypcyjnym E2F lub deacetylaz z kompleksem białek pRB i E2F, regulujące aktywność genów decydujących o wejściu komórek w fazę S cyklu komórkowego (HARBOUR i DEAN 2000).

Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach wskazują, że aktywność acetylotransferaz histonów i kompleksów remodelujących chromatynę ma istotne znaczenie dla stymulacji naprawy DNA (przynajmniej w przypadku mechanizmu NER). We wszystkich znanych kompleksach remodelujących chromatynę obecne są białka z rodziny SWI2/SNF2, ATP-azy mające domenę strukturalną helikazy DNA. Do rodziny SWI2/SNF2 należy również kilka białek biorących udział w naprawie DNA: Rad16 (mechanizm GG-NER u drożdży), CSB/Rad26 (mechanizm TC-NER), Rad5 (naprawa postreplikacyjna) i Rad54 (naprawa rekombinacyjna) (FYODOROV i KADONAGA 2001). Stwierdzono, że białko CSB wykazuje zdolność remodelowania struktury nukleosomów (CITTERIO i współaut. 2000). Z kolei naprawa fotouszkodzeń obecnych w minichromosomach stymulowana była przez czynnik remodelujący chromatynę ACF (URA i współaut. 2001). Jednym z czynników związanych z NER jest białko XPE, składające się dwu podjednostek p48 i p127. Białko to swoiście wiąże się z DNA uszkodzonym przez promieniowanie UV (inna jego nazwa to białko UV-DDB), a jego obecność jest niezbędna dla naprawy chromatyny, lecz nie „nagiego” DNA. Stwierdzono, że podjednostka p48 oddziałuje z acetylotransferazą histonów CBP/p300 (DATTA i współaut. 2001). Kolejną acetylotransferazą histonów jest białko GCN5, wchodzące między innymi w skład kompleksu transkrypcyjnego TFTC. Innym składnikiem tego kompleksu jest białko SAP130, wykazujące bardzo silną homologię z podjednostką p127 białka UV-DDB. Stwierdzono, że czynnik TFTC preferencyjnie wiąże się z chromatyną uszkodzoną przez promieniowanie UV i katalizuje acetylację histonów w miejscu uszkodzenia (BRAND i współaut. 2001).

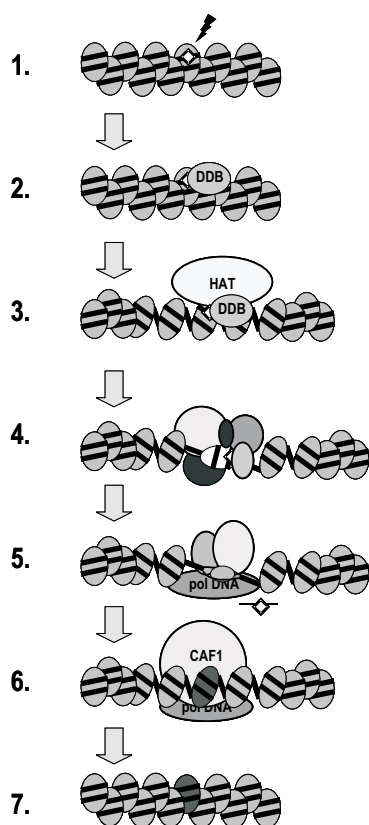
Część „instrukcji” o sposobie ekspresji informacji genetycznej zawarta jest w strukturze chromatyny. Toteż naprawa DNA, poza przywróceniem prawidłowej struktury i sekwencji nukleotydów, musi pozwalać na odtworzenie pierwotnej struktury chromatyny w miejscu uszkodzenia. Precyzyjne odtworzenie struktury nukleosomów jest szczególnie

istotne w regionach regulujących aktywność genów. Tak więc mechanizmy rekonstytucji chromatyny muszą wydajnie współdziałać z mechanizmami naprawy DNA. Zaobserwowano, że jeśli DNA plazmidowy zawierający uszkodzenia indukowane przez promieniowanie UV inkubowany był z ekstraktami komórkowymi, to naprawa uszkodzeń skorelowana była z upakowaniem plazmidu w nukleosomy. Taka rekonstytucja chromatyny przebiegała jednocześnie z syntezą naprawczą DNA i zależna była od kompleksu białkowego CAF1 (ang. chromatin assembly factor 1), czynnika związanego z replikacją DNA (GAILLARD i współaut. 1996). Również inny czynnik związany z replikacją, kompleks białkowy RCAF (ang. replication-coupling assembly factor), może brać udział rekonstytucji nukleosomów na DNA zawierającym fotouszkodzenia (TYLER i współaut. 1999). Mogłoby to sugerować, że rekonstytucja nukleosomów na naprawianym DNA jest mechanicznie związana z reperacyjną syntezą DNA. Jednak fakt, że w trakcie naprawy DNA rearanżacji ulega fragment chromatyny o długości nawet kilku tysięcy par nukleotydów, a nowosyntetyzowana nić DNA ma około 30 nukleotydów (w przypadku NER), wskazuje na bardziej złożony związek między naprawą a rekonstytucją chromosomów. Stwierdzono, że rekonstytucja nukleosomów w trakcie naprawy DNA plazmidowego obejmuje kilka (4 do 6) nukleosomów w obu kierunkach od uszkodzenia. Co ciekawe, taką rekonstytucję nukleosomów obserwowano nawet jeśli reperacyjna synteza DNA (lecz nie wcześniejsze etapy naprawy) została zablokowana przez inhibitor polimerazy DNA (GAILLARD i współaut. 1997). Wskazuje to, że sygnałem dla rekonstytucji nukleosomów są pośrednie produkty naprawy.

Mechanizm NER jest w obecnej chwili najlepiej zbadanym mechanizmem naprawy DNA. Najlepiej znane są również zmiany struktury chromatyny towarzyszące temu rodzajowi naprawy (Ryc. 1). Można przypuszczać, że podobne zmiany, to jest rearanżacja struktury nukleosomów ułatwiająca dostęp białek naprawczych do uszkodzenia i kończące naprawę odtworzenie struktury chromatyny, towarzyszą również innym mechanizmom naprawy DNA. Przykładowo, aktywność kompleksu RCAF niezbędna jest dla naprawy pęknięć nici DNA (TYLER i współaut. 1999).

STRUKTURA CHROMATYNY A ROZPOZNANIE USZKODZEŃ DNA

Rozpoznanie uszkodzenia jest pierwszym etapem wszystkich mechanizmów naprawy DNA. Biorą w nim udział swoiste białka detektorowe. Podobne detektory uszkodzeń rozpoczynają również szlaki przekazywania sygnału prowadzącego do blokady cyklu komórkowego czy indukcji apoptozy. Białka naprawcze rozpoznające uszkodzenia mają dwojaki charakter. Część z nich jest enzymami, dla których uszkodzony nukleotyd jest swoistym substratem (na przykład glikozylazy DNA związane z mechanizmem BER). Inne białka detektorowe rozpoznają nie tyle zmianę struktury chemicznej nukleotydu, co wywołane przez uszkodzenie zaburzenia dwuniciowej struktury DNA.



Ryc. 1. Hipotetyczne zmiany struktury chromaty-ny związane z naprawą przez wycinanie nukleotydu (NER).

Kolejne etapy naprawy: 1) powstanie uszkodzenia (biały romb); 2) rozpoznanie uszkodzenia przez białko DDB; 3) rozluźnienie struktury włókna nukleosomowego (np. dzięki acetylacji histonów); 4) utworzenie kompleksu naprawczego, zmiana struktury (lub usunięcie) nukleosomu zawierającego uszkodzenie (biały owal); 5) usunięcie fragmentu uszkodzonej nici DNA, replacyjna synteza DNA; 6) rekonstrukcja nukleosomu na nowosyntetyzowanym DNA (ciemny owal); 7) odtworzenie struktury włókna nukleosomowego.

Detektorami rozpoznającymi takie zmiany struktury DNA są kompleksy XPC/HR23B i XPA/RPA, związane z mechanizmem NER. Natomiast dwuniciowe pęknięcia DNA rozpoznawane są przez dimer Ku70/Ku86, podjednostkę kinazy białkowej zależnej od DNA (DNA-PK), które to białko bierze udział w mechanizmie łączenia końców niehomologicznych (NHEJ) (WOOD 1999, WIDŁAK 2000).

Chociaż oddziaływania białek detektorowych z uszkodzonym DNA są dość dobrze poznane, to wiedza na temat rozpoznawania tych samych uszkodzeń znajdujących się w środowisku chromaty-ny jest bardzo ograniczona. Między innymi nie jest w pełni jasne, czy rozpoznanie uszkodzeń obecnych w chromaty-ny wymaga dodatkowych białek (takim czynnikiem wspomagającym mogłoby być w przypadku mechanizmu NER białko UV-DDB). Nie wiadomo również czy (i do jakiego stopnia) sygnałem dla białek detektorowych są zmiany struktury chromaty-ny wywołane uszkodzeniem DNA. Takie zmiany w strukturze chromaty-ny poznane są najlepiej w przypadku dwuniciowych pęknięć DNA. W laboratorium W. Bonnera zaobserwowano, że w ciągu kilku minut od powstania pęknięć DNA, indukowanych przez promieniowanie jonizujące (ale również powstających w trakcie apoptozy lub rekombinacji V(D)J), dochodzi do lokalnej fosforylacji histonu H2AX (jeden z wariantów histonu H2A). Taka fosforylacja katalizowana jest przez serynowo/treoninowe kinazy białkowe z rodziny ATM – białka DNA-PK, ATM lub ATR i może prowadzić do zmian w strukturze nukleosomów. W ciągu kilkudziesięciu minut od powstania dwuniciowych pęknięć DNA fosforylację histonu H2AX obserwuje się w obszarach chromaty-ny obejmujących nawet milion par nukleotydów wokół uszkodzenia, tworzących widoczne w mikroskopie *foci*. W domenach chromaty-ny, zawierających ufosforylowany histon H2AX, obserwuje się następnie nagromadzenie szeregu białek związanych mechanizmami rekombinacyjnej naprawy pęknięć DNA: BRCA1, Rad51, Rad50, Mre11, Nbs1 (MODESTI i KAANAR 2001). Można więc spekulować, że sygnałem rozpoznawanym przez te białka są zmiany struktury nukleosomów inicjowane przez fosforylację histonu H2AX. Co ciekawe, dane biochemiczne wskazują, że białka które nagromadzają się w domenach zawierających ufosforylowany histon H2AX (ATM, BRCA1, Rad51, Rad50, Mre11,

Nbs1) tworzą wraz z innymi białkami naprawczymi (BLM, MSH2, MSH6, MLH1) olbrzymie kompleksy białkowe, tak zwany BRCA1-associated genome surveillance complex (BASC) (WANG i współaut. 2000). Białkiem wiążącym się z dwuniciowymi pęknięciami DNA jest heterodimer Ku. Stwierdzono, że białko Ku wiąże się z białkiem Sir3, które wraz z białkami Sir2 i Sir4 tworzy kompleksy oddziałujące z histonami w gęsto upakowanej heterochromatynie (Sir2 jest deacetylazą histonów). Rezerwuarem kompleksów Ku i Sir są telomery i regiony subtelomerowe chromosomów. Zaobserwowano, że w wyniku powstania dwuniciowych pęknięć DNA dochodzi do przemieszczenia tych białek z obszarów telomerowych w miejsce uszkodzeń i formowanie heterochromatyny w regionie zawierającym uszkodzenie (HABER 1999). Znaczenie tego zjawiska dla procesów naprawy DNA nie jest jasne. Można jednak spekulować, że tworzenie struktury heterochromatyny w regionie pęknięcia DNA jest czynnikiem uniemożliwiającym transkrypcję uszkodzonych genów.

Odrębnym zagadnieniem jest wiązanie z uszkodzonym DNA białek nie biorących udziału w naprawie: białek chromatyny i czynników transkrypcyjnych. Powstanie uszkodzeń DNA w obrębie sekwencji rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne zwykle blokuje wiązanie tych czynników (TOMMASI i współaut. 1996). Jednak obecność niektórych uszkodzeń indukuje wiązanie czynników transkrypcyjnych do przypadkowych sekwencji DNA. Przykładem może być czynnik transkrypcyjny Sp1, wiążący się z nieswoistymi sekwencjami zawierającymi addukty indukowane przez benzo(a)pyren, lub czynniki transkrypcyjne zawierające domenę HMG, wiążące się z nieswoisty-

mi sekwencjami zawierającymi uszkodzenia indukowane przez cis-platynę (WIDLAK 2000). Cis-platyna jest związkiem genotoksycznym wykorzystywanym w terapii przeciwnowotworowej, który indukuje w DNA między- i wewnątrz-niciowe wiązania sieciujące. Zaobserwowano, że dwie grupy białek chromatyny: białka HMG-1/2 i histon H1 wykazują bardzo silne powinowactwo do tych fragmentów DNA, których struktura została zmieniona przez takie wiązania sieciujące. Stwierdzono również, że HMG-1 (i inne białka z tej rodziny) mogą hamować naprawę DNA uszkodzonego przez cis-platynę. Na podstawie takich obserwacji zaproponowana została hipoteza opisująca wpływ białek chromatyny na wrażliwość komórek na cis-platynę. Zgodnie z tą hipotezą (ang. repair-shielding model), białka chromatyny mogą współzawodniczyć z białkami naprawczymi w wiązaniu uszkodzonego DNA. Po związaniu białka HMG uszkodzony fragment DNA nie byłby rozpoznawany przez białka naprawcze, co powodowałoby opóźnienie lub uniemożliwienie jego naprawy (ZAMBLE i LIPPARD 1995). Ponieważ białka HMG-1/2 mają podwyższone powinowactwo również do innych typów uszkodzeń DNA (fotouszkodzenia lub addukty indukowane przez policykliczne węglowodory aromatyczne), zaproponowany model ma bardziej uniwersalny charakter i może być rozciągnięty na wiele typów uszkodzeń DNA (WIDLAK 2000). Hipotetycznie, wiązanie z uszkodzonym DNA czynników transkrypcyjnych, białek HMG czy histonu H1 mogłoby mieć przeciwny efekt. Białka te wiążąc się z uszkodzeniem mogłyby wymuszać przesunięcie uszkodzonego fragmentu do DNA łącznikowego, przyczyniając się do jego szybszej naprawy.

CHROMATIN STRUCTURE AND DNA REPAIR

S u m m a r y

Chromatin structure modulates the rate of DNA damage formation and repair in different regions of eukaryotic genomes. Chromatin rearrangement takes place during repair to increase accessibility of damage to repair proteins. Activity of histone acetyltransferases and chromatin remodeling complexes seems to be essential for nucleosome rearrangement during repair. Once repair is completed, reconstitu-

tion of nucleosomes is required to recover primary chromatin structure. Such chromatin assembly is coupled to repair DNA synthesis. DNA damages induce some modifications to chromatin structure (e.g. phosphorylation of a histone H2A variant in response to DNA double-strand breaks). Such chromatin modifications may serve as signals recognized by DNA repair systems.

LITERATURA

ALFS J. D., KINGSTON R. E., 2000. *What does "chromatin remodeling" mean.* Trends Biochem. Sci. 25, 548-555.

BOHR V. A., 1991. *Gene specific DNA repair.* Carcinogenesis 12, 1983-1992.

- BRAND M., MOGGS J. G., OULAD-ABDELGHANI M., LEKEUNE F., DILWORTH F. J., STEVENIN J., ALMOUZNI G., TORA L., 2001. *UV-damaged DNA-binding protein in the TFIIIC complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation*. EMBO J. 20, 3187–3196.
- BROWN C. E., LECHNER T., HOWE L., WORKMAN J. L., 2000. *The many HATs of transcription coactivators*. Trends Biochem. Sci. 25, 15–19.
- CALIKOWSKI T. T., 2001. *Przebudowa struktur chromatinowych przez kompleksy wielobiałkowe*. Post. Biochem. 47, 129–137.
- CITTERIO E., VAN DEN BOOM V., SCHNITZLER G., KANAR R., BONTE E., KINGSTON R. E., HOEIJMAKERS J. H. J., VERMEULEN W., 2000. *ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor*. Mol. Cell. Biol. 20, 7643–7653.
- CHEN H., TINI M., EVANS R. M., 2001. *HATs on and beyond chromatin*. Curr. Opin. Cell Biol. 13, 218–224.
- DATTA A., BAGCHI S., NAG A., SHIYANOV P., ADAMI G. R., YOON T., RAYCHAUDHURI P., 2001. *The p48 subunit of the damaged-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferases*. Mutat. Res. 486, 89–97.
- DENISSENKO M. F., PAO A., PFEIFER G. P., TANG M., 1998. *Slow repair of bulky DNA adducts along the non-transcribed strand of the human p53 gene may explain the strand bias of transversion mutations in cancers*. Oncogene 16, 1241–1247.
- FLAUS A., OWEN-HUGHES T., 2001. *Mechanism for ATP-dependent chromatin remodelling*. Curr. Opin. Gen. Devel. 11, 148–154.
- FYODOROV D. V., KADONAGA J. T., 2001. *The many faces of chromatin remodeling: SWItching beyond transcription*. Cell 106, 523–525.
- GAILLARD P. H. L., MARINI E. M. D., KAUFMAN P. D., STILLMAN B., MOUSTACCHI E., ALMOUZNI G., 1996. *Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor 1*. Cell 86, 887–896.
- GAILLARD P. H. L., MOGGS J. G., ROCHE D. M. J., QUIVY J. P., BECKER P. B., ALMOUZNI G., 1997. *Initiation and bidirectional propagation of chromatin assembly from a target site for nucleotide excision repair*. EMBO J. 16, 6281–6289.
- GAO S., DROUIN R., HOLMQUIST G. P., 1994. *DNA repair rates mapped along the human PGK1 gene at nucleotide resolution*. Science 263, 1438–1440.
- HABER J. E., 1999. *Sir-Ku-itous routes to make ends meet*. Cell 97, 829–832.
- HARBOUR J. W., DEAN D. C., 2000. *Chromatin remodeling and Rb activity*. Curr. Opin. Cell Biol. 12, 685–689.
- HAYES J. J., HANSEN J. C., 2001. *Nucleosomes and the chromatin fiber*. Curr. Opin. Gen. Devel. 11, 124–129.
- KAMIUCHI S., SAIJO M., CITTERIO E., DE JAGER M., HOEIJMAKERS J. H., TANAKA K., 2002. *Translocation of Cockayne syndrome group A protein to the nuclear matrix: possible relevance to transcription-coupled DNA repair*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 201–206.
- KORNBERG R. D. 1999. *Eukaryotic transcriptional control*. Trends Biochem. Sci. 24, M46–M49.
- MODESTI M., KANAR R., 2001. *DNA repair: spot(light)s on chromatin*. Curr. Biol. 11, R229–R232.
- MULLENDERS L. H. F., VENEMA J., VAN HOFFEN A., MAYNE L. V., NATARAJAN A. T. VAN ZEELAND A. A., 1990. *The role of the nuclear matrix in DNA repair*. [W:] *Mutation and the Environment*, part A, Wiley-Liss, Inc., 223–232.
- PIETRZYKOWSKA I., KRZAWICZ J., 1999. *Mechanizmy naprawy DNA u bakterii i człowieka*. Kosmos 48, 315–328.
- SMERDON M. J., 1991. *DNA repair and the role of chromatin structure*. Curr. Opin. Cell Biol. 3, 422–428.
- TOMMASI S., SWIDERSKI P. M., TU Y., KAPLAN B. E., PFEIFER G. P., 1996. *Inhibition of transcription factor binding by ultraviolet-induced pyrimidine dimers*. Biochemistry 35, 15693–15703.
- TORNALETTI S., PFEIFER G. P., 1995. *UV light as a footprinting agent: modulation of UV-induced DNA damage by transcription factors bound at the promoters of three human genes*. J. Mol. Biol. 249, 714–728.
- TRZECIAK A., BŁASIAK J., 1999. *Naprawa DNA w komórkach ssaków*. Post. Biol. Kom. 26, 707–729.
- TUDEK B., 1999. *Mechanizmy naprawy utlenionych zasad DNA*. Kosmos 48, 339–352.
- TYLER J. K., ADAMS C. R., CHEN S. R., KOBAYASHI R., KAMAKAKA R. T., KADONAGA J. T., 1999. *The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair*. Nature 402, 555–560.
- URA K., ARAKI M., SAEKI H., MASUTANI C., ITO T., IWAI S., MIZUKOSHI T., KANEDA Y., HANAOKA F., 2001. *ATP-dependent chromatin remodeling facilitates nucleotide excision repair of UV-induced DNA lesions in synthetic dinucleosomes*. EMBO J. 20, 2004–2014.
- WANG Y., CORTEZ D., YAZDI P., NEFF N., ELLEDGE S. J., QIN J., 2000. *BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures*. Genes Dev. 14, 927–939.
- WIDEŁAK P., 1994. *Specyfika powstawania i naprawy mutagennych uszkodzeń materiału genetycznego*. Post. Biochem. 40, 194–199.
- WIDEŁAK P., 1997. *Struktura nukleosomowa chromatinu a naprawa DNA*. Post. Biol. Kom. 24, 325–337.
- WIDEŁAK P., 2000. *Białka rozpoznające i wiążące się z uszkodzonym DNA; udział w mechanizmach naprawy DNA i kancerogenezie*. Post. Biochem. 46, 198–206.
- WOOD R. D., 1999. *DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells*. Biochimie 81, 39–44.
- WOODCOCK C. L., DIMITROV S., 2001. *Higher-order structure of chromatin and chromosomes*. Curr. Opin. Gen. Devel. 11, 130–135.
- WU J., GRUNSTEIN M., 2000. *25 years after the nucleosome model: chromatin modifications*. Trends Biochem. Sci. 25, 619–623.
- ZAMBLE D. B., LIPPARD S. J., 1995. *Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy*. Trends Biochem. Sci. 20, 435–439.
- ZDZIENICKA M. Z., 1999. *Mechanizm naprawy podwójnych pęknięć DNA (DSB) w komórkach ssaków: podstawy molekularne i konsekwencje biologiczne*. Kosmos 48, 359–365.