

KRZYSZTOF SZYFTER

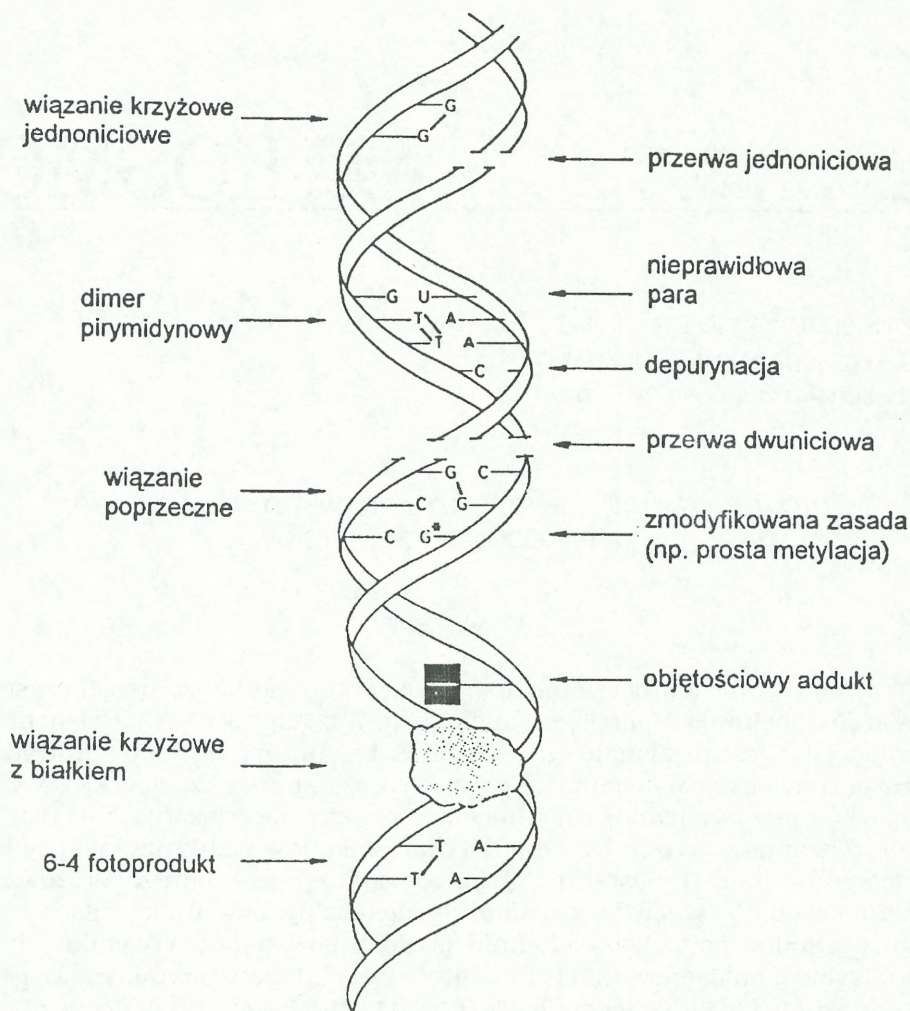
Zakład Genetyki Człowieka PAN
Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

ZRÓŻNICOWANIE PROCESU NAPRAWY DNA W NORMIE I PATOLOGII CZŁOWIEKA

WSTĘP

Trzy podstawowe procesy metaboliczne, w których bierze udział cząsteczka DNA *in vivo* obejmują replikację, transkrypcję oraz naprawę DNA. Celem procesu naprawy DNA jest utrzymanie niezmienności struktury DNA, co sprowadza się do rozpoznawania i usuwania uszkodzeń. Uszkodzenia cząsteczki DNA mogą obejmować przerwy jedno- i dwuniciowe, poprzeczne wiązania obu nici DNA, trwałe wiązania krzyżowe DNA-białko oraz zmiany w strukturze pojedynczych nukleotydów (ryc. 1). Ostatnia grupa uszkodzeń jest bardzo zróżnicowana i zalicza się do niej objętościowe addukty chemicznych czynników genotoksycznych, pochodne podstawowych nukleotydów, powstające w wyniku alkilacji, hydroksylacji, halogenowania i sulfhidroksylacji, dimery pirymidynowe generowane światłem UV i inne modyfikacje (POWELL i McMILLAN 1990). Rozpoznawanie i usuwanie uszkodzeń następuje w wyniku szeregu mechanizmów dostosowanych do rodzaju uszkodzenia a określanych łącznie jako naprawa DNA.

Celem artykułu jest wykazanie zróżnicowania procesu naprawy DNA w populacji ludzkiej, dotyczącego zarówno poziomu całego genomu, fragmentów cząsteczki DNA a nawet sięgającego po różnice w obrębie pojedynczego genu. Na zróżnicowanie procesu DNA ma wpływ szereg czynników identyfikowanych na różnych poziomach od molekularnego, przez komórkowy po fizjologię organizmu. Znaczny jest udział czynników genetycznych, bowiem wiele enzymów uczestniczących w procesie naprawy DNA ma charakter polimorficzny. Czynniki patogeniczne uwidacznia się poprzez wpływ na aktywność enzymów naprawczych w chorobach nowotworowych. Natomiast wiek osobniczy jest traktowany jako czynnik gospodarza. Przegląd czynników wpływających na zróżnicowanie naprawy DNA w populacji ludzkiej stanowi treść niniejszego artykułu. Poza ramami tego opracowania znajduje się natomiast omówienie różnic w szybkości i wydajności naprawy poszczególnych typów uszkodzeń.



Ryc. 1. Rodzaje uszkodzeń DNA powstających pod wpływem czynników genotoksycznych.

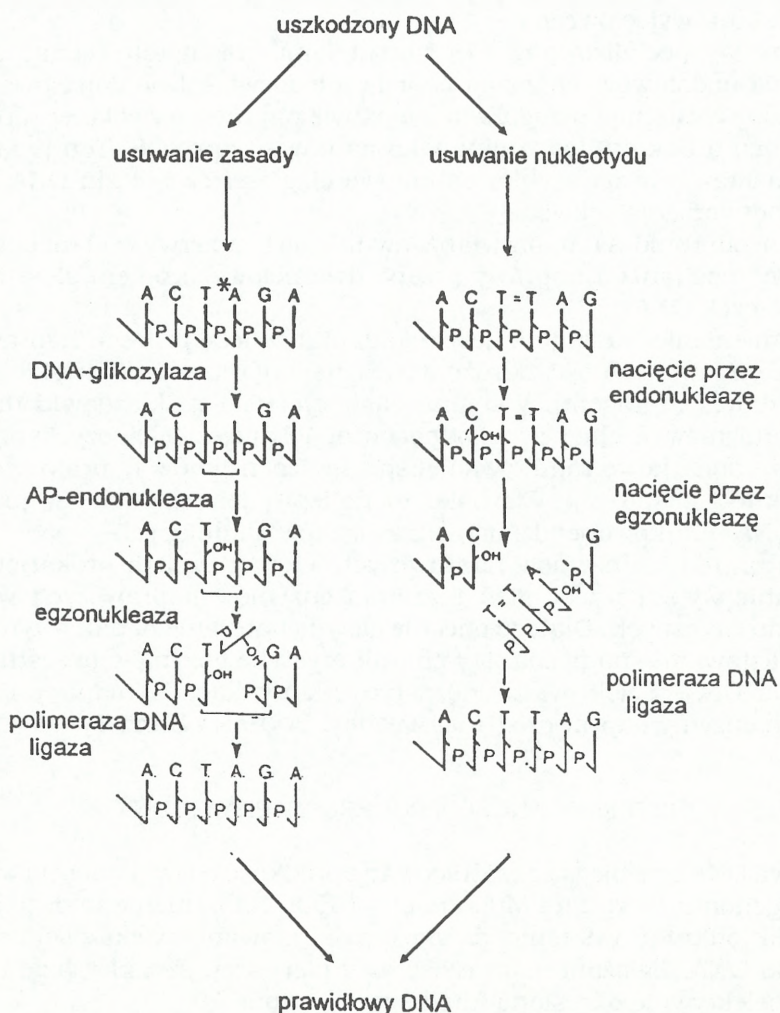
MECHANIZMY PROCESU NAPRAWY DNA

Jak wspomniano wyżej, istnieje kilka mechanizmów naprawy DNA dostosowanych do korygowania poszczególnych typów uszkodzenia DNA (DEFAIS 1990, LINDAHL 1990).

Bezpośrednie i jednostopniowe usuwanie uszkodzeń ma zasięg ograniczony do naprawy niektórych fotouszkodzeń oraz metylacji nukleotydów. Pierwszy proces jest znany pod nazwą fotoreaktywacji. Natomiast grupa alkilowa (w pierwszym rzędzie metylowa) może podlegać wycięciu przy udziale alkiltrans-

ferazy i przeniesieniu na jedną z reszt cysteinowych enzymu. Postulowano także istnienie enzymu odpowiedzialnego za wstawianie puryn w miejsca apurynowe.

Zdecydowana większość uszkodzeń jest usuwana na drodze naprawy przez wycinanie. Pierwszym etapem jest rozpoznanie i usunięcie uszkodzenia, ale charakter uszkodzenia wpływa na wybór jednego z dwóch wariantów znanych jako usuwanie zasady lub usuwanie nukleotydu (ryc. 2). Warianty różnią się między sobą na tym właśnie etapie. Podczas naprawy przez usuwanie zasady przy udziale DNA-glikozylaz powstaje miejsce apurynowe, usuwane w dalszym ciągu wraz z towarzyszącymi kilkoma nukleotydami przy udziale AP-endonukleazy. W odróżnieniu od AP-endonukleaz, cechujących się niską specyficznością, DNA-glikozylazy stanowią grupę enzymów o znacznej specyficzności, bowiem na



Ryc. 2. Schematyczny mechanizm naprawy DNA przez wycinanie. Po lewej stronie widnieją kolejne etapy naprawy DNA przez wycinanie zasady a po prawej stronie przedstawiono naprawę DNA opartą o wycinanie nukleotydu.

ogół rozpoznają tylko jeden, określony typ uszkodzenia. Wśród DNA-glikozylaz na osobną wzmiankę zasługuje DNA glikozylaza formamido-pyrimidynowa — enzym odpowiedzialny za usuwanie uszkodzeń DNA związanych z genotoksycznością wolnych rodników tlenowych. Natomiast naprawa uszkodzenia przez usuwanie nukleotydu obejmuje najpierw nacięcie jednej nici DNA po stronie 5', co wywołuje częściowe rozplecenie podwójnej helisy, a następnie usunięcie uszkodzonego nukleotydu we fragmencie jednej nici o długości do kilkudziesięciu nukleotydów. W bakteriach taką funkcję pełni, na przykład, UVRABC nukleaza. Na tym etapie jest konieczne współdziałanie helikaz. W obu wariantach następuje naówczas wypełnianie powstałej luki przy udziale polimerazy DNA z wykorzystaniem drugiej, nie uszkodzonej nici jako matrycy syntezy DNA. Na tej drodze następuje odtworzenie pierwotnej struktury DNA, czyli całkowity powrót do stanu wyjściowego.

Odrębny wyspecjalizowany mechanizm (ang. mismatch repair) służy do korygowania podstawowych zasad tworzących niewłaściwie dopasowane pary. Sytuacje takie występują na ogół w następstwie naprawy wywołanej silną dawką mutagenu, co u bakterii jest znane jako naprawa typu SOS. Ten typ naprawy DNA jest nastawiony na szybką odbudowę ciągłości cząsteczki DNA kosztem wierności odtworzenia sekwencji.

Ponadto odrębnie są naprawiane dwuniciowe przerwy w łańcuchu DNA. Podstawowy mechanizm naprawy przerw dwuniciowych opiera się o rekombinację cząsteczek DNA.

Na wymienienie zasługuje jeszcze adaptatywność procesu naprawy DNA. W skrócie adaptatywność odróżnia reakcję organizmu (komórki) na małe i wysokie dawki mutagenu. Wstępna ekspozycja na niskie dawki mutagenu nadaje organizmowi cechę pewnej odporności. Późniejsza ekspozycja na wysoką dawkę może dodatkowo indukować ekspresję izoenzymów naprawczych, łagodzących skutki ekspozycji. Zjawisko to najlepiej jest poznane w przypadku naprawy DNA indukowanej działaniem związków alkilujących.

Wiedza na temat enzymów naprawczych w organizmach prokariotycznych zdecydowanie wyprzedza stopień poznania enzymów naprawczych w organizmach eukariotycznych. Dlatego obecnie główne natężenie badań w tym kierunku jest nastawione na poznanie i charakterystykę enzymów uczestniczących w naprawie DNA. Ściśle wiąże się z tym identyfikacja i mapowanie genów kodujących enzymy naprawcze (HOEJMAKERS i BOOTSMA 1992, THOMPSON 1991).

HETEROGENNOŚĆ PROCESU NAPRAWY DNA

Naprawa DNA przebiega ze zróżnicowaną prędkością i wydajnością w różnych częściach genomu (SZYFTER i MULLENDERS 1993). Na istnienie takiego zjawiska wskazywała odkryta wcześniej dwufazowość usuwania większości uszkodzeń z cząsteczki DNA. Założono naówczas, że w pierwszej, szybkiej fazie naprawie podlegają selektywnie określone fragmenty genomu.

Badania tego zagadnienia przez kilka lat były ograniczone do uszkodzeń indukowanych światłem UV. Opracowano metodę monitorowania powstawania i usuwania dimerów pyrimidynowych z DNA. Metoda ta obejmuje napromienio-

wanie komórek światłem UV, izolację DNA, trawienie enzymami restrykcyjnymi. W tym punkcie próbkę dzieli się na dwie części i jedną z nich poddaje się trawieniu endonukleazą V faga T4, specyficzną wobec dimerów pirymidynowych. Następnie próbki trawioną i nietrawioną endonukleazą V rozdziela się elektroforetycznie, poddaje transferowi techniką Southerna i hybrydyzuje ze specyficznymi sondami DNA. Porównanie sygnału próbki trawionej i nietrawionej pozwala na ocenę ilościową dimerów tymidynowych. Technika ta umożliwia nie tylko ocenę ilościową poziomu dimerów w genomie lecz także w poszczególnych genach a nawet w ich fragmentach (HANAWALT 1991).

Po raz pierwszy różnice szybkości naprawy DNA wykryto porównując całkowity DNA naczelnych i sekwencje alfa, składające się z wysokopowtarzalnych elementów strukturalnych. Naprawa przebiegała wolniej w sekwencjach alfa. Różnice powiązano z nierównomiernym udziałem obu wymienionych klas DNA w procesie transkrypcji i stąd dalsze badania zmierzały w tym kierunku. W szeregu pomysłowo zaprojektowanych doświadczeń wykazano, że rejony aktywnie transkrybowane ulegają naprawie w pierwszej kolejności.

W celu zweryfikowania powyższej hipotezy porównano szybkość naprawy DNA w całym genomie komórek chińskiego chomika z szybkością naprawy segmentu zawierającego gen reduktazy dwuhydrofolianowej (*DHFR*) z tego samego źródła. Dodać należy, że wybrany gen jest aktywny podczas wszystkich faz cyklu komórkowego. Okazało się, że po upływie 26 godzin od napromieniowania liczba dimerów tymidynowych we fragmencie zawierającym gen *DHFR* spadła o 2/3, podczas gdy w całym genomie pozostawało jeszcze około 85% dimerów. Analogicznie przedstawiała się sytuacja w badanym później genomie ludzkim.

W obrębie tego samego modelu wykazano różnice szybkości naprawy pomiędzy nicią aktualnie transkrybowaną a nie transkrybowaną. Badania rozszerzono na analizę domeny naprawy DNA. Wykazano, że rejon preferencyjnej naprawy genu *DHFR* grupuje się wokół końca 5' i przyległego segmentu. Dotyczy to zatem początkowej sekwencji transkrybowanego genu, sekwencji promotorowej i regulatorowej.

O ile przedstawione wyżej badania dotyczyły usuwania dimerów pirymidynowych, to w ostatnich latach przybyło znacznie więcej przykładów. Korzystając z wypracowanego modelu wykazano preferencyjną naprawę genu *DHFR* w komórkach uprzednio eksponowanych na cisplatynę, nitrogranulogen, 8-metoksypsoralen i aktywny metabolit benzo(a)pirenu. Udowodniono, że zarówno połączenia krzyżowe DNA-białko indukowane działaniem psoralenu i cytotatyków, jak też objętościowe addukty benzo(a)pirenu są usuwane z genu *DHFR* preferencyjnie wobec całego genomu. Z drugiej natomiast strony analogiczne doświadczenia przeprowadzono na innych genach aktywnie transkrybowanych przez cały cykl komórkowy a mianowicie na genie *HPRT* (fosforybotransferaza hipoksantynowa) i *ADA* (dezaminaza adeninowa). Przytoczone fakty są solidną podstawą do generalizacji obserwacji i sformułowania wniosku, że preferencyjna naprawa genów aktywnie transkrybowanych jest powszechna i stanowi naturalną reakcję obronną organizmu wobec czynników genotoksycznych. Zjawisko to łączy się ze zmianami struktury chromaliny podczas transkrypcji, co ułatwia dostęp enzymom naprawczym.

Preferencyjną naprawę aktywnego genu wykazano wobec ludzkiej metalotioneiny. Model ten był bardziej skomplikowany, gdyż metylotioneina jest aktywna tylko w pewnych fazach cyklu komórkowego, a na aktywność wpływa obecność jonów cynku (+2). Wykazano preferencyjność naprawy DNA tylko w odniesieniu do okresu faktycznej aktywności tego genu. Doświadczenia oparte o całkowicie inną metodykę przeprowadzono w odniesieniu do usuwania (6-4)-fotodimerów z genu insuliny. Również i w tym przypadku aktywność transkrypcyjna łączyła się z preferencyjną naprawą DNA.

Teza powyższa uległa pewnemu ograniczeniu po odkryciu, że dodatkowe grupy metylowe wprowadzone do DNA w wyniku ekspozycji na bezpośrednio działające czynniki metylujące są usuwane z tą samą szybkością z genu *DHFR* i całkowicie z genomu. Odkrycie to jest tłumaczone przez naprawę tych uszkodzeń na drodze mechanizmu przez wycinanie zasady. Zatem preferencyjność naprawy w genach transkrybowanych byłaby ograniczona do naprawy przez wycinanie nukleotydu, ale skądinąd wiadomo, że jest to najczęstszy mechanizm usuwania uszkodzeń z DNA.

Dodatkowe przekonujące potwierdzenie preferencyjności naprawy DNA w genach aktywnych uzyskano jeszcze na innym modelu. Badano usuwanie dimerów pirymidynowych z linii fibroblastów mysich. W DNA tych komórek zlokalizowano dwa proto-onkogeny: aktywnie transkrybowany *c-abl* i nieaktywny *c-mos*. Liczba fotodimerów powstałych w wyniku naświetlenia promieniowaniem UV była w obu genach porównywalna. Jednak po 24 godzinach liczba fotodimerów znacząco zmalała w onkogenie *c-abl*, podczas gdy w onkogenie *c-mos* naprawa była praktycznie niezauważalna.

Wydaje się, że najbardziej spektakularne doświadczenie dotyczyło porównania przeżywalności komórek poddanych działaniu światła UV i zdolności naprawy DNA. Przedmiotem porównania były normalne ludzkie fibroblasty, fibroblasty chorego na *xeroderma pigmentosum* (opis choroby poniżej) zdefektowane pod względem naprawy DNA i komórki chomika, które naturalnie cechuje niski poziom naprawy DNA *in vitro*. Naprawa DNA w obrębie genu *DHFR* była wydajna w normalnych komórkach ludzkich i w komórkach chemicznych. Wysoka była też przeżywalność obu typów komórek normalnych w przeciwstawieniu do komórek linii XP. Wnioskuje się zatem, że o przeżywalności w warunkach ekspozycji na światło UV decyduje zdolność naprawy DNA w znaczących rejonach genomu, tożsamy z aktywnie transkrybowanymi genami. Natomiast ogólna zdolność naprawy DNA w całym genomie ma drugorzędne znaczenie.

W ramach badań porównawczych nad naprawą DNA w różnych klasach DNA w pracowni V. A. Bohra (LEDoux 1992) przeanalizowano naprawę szeregu uszkodzeń w jądrowym (nDNA) i mitochondrialnym (mtDNA) DNA. Autorzy mieli na uwadze między innymi zweryfikowanie ugruntowanego przekonania o braku naprawy DNA w mtDNA. Stwierdzono brak naprawy dimerów pirymidynowych i silnych modyfikacji wywołanych działaniem związków alkilujących oraz minimalną naprawę adduktów cisplatyny w mtDNA. Natomiast poprzeczne wiązania nici DNA przy udziale cisplatyny oraz pojedyncze ugrupowania N-metyłowe na zasadach purynowych były wydajnie naprawiane. Konkluzją opisanych badań jest stwierdzenie, że usuwanie uszkodzeń z mtDNA jest w wysokim stopniu funkcją typu uszkodzenia. Wydaje się, że w mtDNA przebiega tylko proces

naprawy DNA przez wycinanie zasad a mechanizm naprawy przez wycinanie nukleotydu, odpowiedzialny za usuwanie objętościowych adduktów, nie funkcjonuje w mitochondriach. Ponieważ mtDNA nie koduje enzymów naprawczych wnioskuje się, że za naprawę DNA są odpowiedzialne enzymy importowane z jądra komórkowego.

Na podkreślenie zasługuje znaczenie badań prowadzonych w zespole Ph. Hanawalta (Stanford, California), które w najwyższym stopniu przyczyniły się do poznania zjawiska heterogenności procesu naprawy DNA.

MIEDZYOSOBNICZE RÓŻNICE W SPRAWNOŚCI PROCESU NAPRAWY DNA

Efekty genotoksyczne wykazują ogromne zróżnicowanie indywidualne w populacji ludzkiej, co tłumaczy się jej polimorfizmem genetycznym. Udział czynników genetycznych w modulacji efektu genetycznego wykazano w odniesieniu do wszystkich trzech podstawowych etapów oddziaływania czynników genotoksycznych z materiałem genetycznym (HARRIS 1987). Charakter polimorficzny wykazują enzymy biorące udział w aktywacji metabolicznej chemicznych genotoksykantów (faza I), detoksykacji zaktywowanych genotoksykantów (faza II) oraz naprawy DNA. O ile różnice aktywności enzymów fazy I w leukocytach ludzkich sięgają 1000 razy, to według danych różnych autorów różnice UDS nie przekraczają na ogół kilku razy (VAIAKANGAS i współaut. 1984). Leukocyty krwi obwodowej składają się z różnych subpopulacji komórkowych, co może mieć wpływ na poziom UDS. Jednak w znacznie bardziej homogenicznej populacji keratynocytów także obserwowano indywidualne zróżnicowanie UDS indukowanego mutagenami chemicznymi, działającymi bezpośrednio i wymagającymi aktywacji metabolicznej (LAWRENCE i BENFORD 1993). Indywidualne zróżnicowanie naprawy DNA wykrywane jako różnice UDS znajduje potwierdzenie w obserwacjach usuwania adduktów z DNA. Przykładowo, w zespole Oescha (OESCH i współaut. 1987) określono wydajność usuwania adduktów metylowanych oraz PAH: DNA w różnych odcinkach czasowych, stwierdzając istnienie różnic indywidualnych zarówno u palaczy tytoniu, jak i osób niepalących, gdzie zróżnicowanie miało większy zasięg.

Obserwowane różnice stanowią rodzaj wypadkowej pomiędzy zróżnicowaniem aktywności szeregu enzymów współuczestniczących w naprawie DNA. Dlatego określono także różnice aktywności konkretnych enzymów w leukocytach ludzkich. Dla DNA-glikozylazy uracylowej stwierdzono rozrzut aktywności od 1 do 45 razy a dla O⁶-alkilo-guanino-DNA alkilotransferazy od 1 do 90 razy (VAIAKANGAS i współaut. 1991).

Jednocześnie wykazano, że istnieje cały szereg czynników wpływających na sprawność mechanizmu naprawy DNA u człowieka. Istotnym czynnikiem jest charakter ekspozycji obejmującej także palenie tytoniu, bowiem istnieje możliwość wywołania odpowiedzi adaptatywnej, omówionej w punkcie dotyczącej mechanizmów naprawy DNA. Również sposób i składniki pożywienia człowieka wpływają na proces naprawy DNA. W badaniach modelowych na zwierzętach laboratoryjnych wykazano podniesienie sprawności naprawy DNA u szczurów, których dieta miała obniżony poziom tłuszczu i całkowitą wartość kaloryczną.

Stwierdzono zmienność sezonową procesu naprawy DNA. Istotnym czynnikiem jest ogólny stan zdrowia, gdyż obserwowano obniżenie sprawności procesu naprawczego w takich przypadkach, jak choroba Alzheimera czy zespół Downa. W ostatnim przypadku poziom naprawy DNA można było korygować doustnym podawaniem siarczanu cynku. Rola dwóch dalszych czynników, a mianowicie wieku i występowania chorób nowotworowych zostanie omówiona obszerniej w dalszej części.

WPLYW WIEKU NA SPRAWNOŚĆ NAPRAWY DNA

Podwyższona częstość występowania chorób somatycznych indukowanych czynnikami genotoksycznymi sugerowała kumulowanie się uszkodzeń DNA wraz z wiekiem. Konsekwentnie wydedukowano obniżanie się sprawności naprawy DNA w starszym wieku (SETLOW 1983).

Postulowany negatywny wpływ wieku na system naprawy DNA opisali bardzo wcześniej LAMBERT i współpracownicy (1979) na przykładzie syntezy naprawczej DNA indukowanej *in vitro* w leukocytach krwi obwodowej, ekspozowanych na światło UV. Dalsze badania poszerzyły tę korelację na inne typy komórek (m.in. fibroblasty, hepatocyty, neurony). Zwrócono uwagę, że negatywny wpływ na sprawność procesu naprawy DNA ma nie tylko wiek organizmu, ale także wiek komórki. Zastosowanie specyficznych inhibitorów naprawy DNA, działających na poszczególne etapy procesu, pozwoliło na stwierdzenie, że najwyższy stopień zależności od wieku cechują wczesne etapy naprawy fotouszkodzeń, a mianowicie rozpoznanie uszkodzenia oraz nacięcie DNA. Udało się także powiązać wpływ wieku i diety na naprawę DNA. W doświadczeniach na szczurach wykazano, że dieta o obniżonej wartości kalorycznej redukuje utratę sprawności naprawy DNA pojawiającej się wraz z wiekiem.

Wzięto także pod uwagę inne rodzaje ekspozycji (KNUDSEN 1992). Dużo uwagi poświęcono usuwaniu alkilacji puryn z uwagi na wysoki stopień zmetylowania DNA towarzyszący (indukujący ?) procesowi kancerogenezy. Naprawę zalkilowanych puryn cechowała negatywna zależność od wieku jeszcze silniejsza niż w przypadku fotouszkodzeń. Sygnalizowano jednak także brak powiązania poziomu metylacji DNA z wiekiem pacjentów, u których rozpoznano niektóre choroby nowotworowe.

Obniżanie się sprawności procesu naprawy DNA wraz z wiekiem koresponduje z danymi epidemiologicznymi, wskazującymi na zwiększoną częstość występowania większości chorób nowotworowych w starszym wieku.

JEDNOSTKI CHOROBY ZWIĄZANE Z NIEDOBOREM SYNTEZY NAPRAWCZEJ DNA

Opisano szereg jednostek chorobowych, w których stwierdzano całkowity lub częściowy brak syntezy naprawczej DNA (HANAWALT i SARASIN 1986). Jak zostanie to wykazane poniżej, jest to zróżnicowana grupa chorób genetycznie uwarunkowanych, których cechą wspólną — oprócz niedoboru syntezy naprawczej DNA — jest zwiększona częstość występowania określonych chorób nowotworowych.

Najwcześniej rozpoznana została *xeroderma pigmentosum* (XP), która (podobnie jak i inne niżej omawiane jednostki chorobowe) dziedziczy się jako choroba recesywna, autosomalna. Cechą, która pozwoliła na wyróżnienie XP, jest nadwrażliwość na światło słoneczne, a zwłaszcza jego ultrafioletową komponentę. W częściach ciała eksponowanych na światło rozwijają się różne postaci raków skóry. Opis pozostałych licznych wad morfologicznych i fizjologicznych, obejmujących przede wszystkim układ neurologiczny, nie mieści się w granicach niniejszego opracowania. Jednak w obrębie cech klinicznych XP wyprowadzono 9 komórkowych klas komplementacyjnych XP, różniących się typem defektu naprawy DNA. Badania przy zastosowaniu inhibitorów poszczególnych etapów naprawy DNA oraz tak zwanej komplementacji komórkowej (korygowanie błędu w danym klonie komórkowym za pomocą innego klonu) wskazują na zdefektowanie etapu nacinania DNA w sąsiedztwie fotouszkodzenia w większości klas XP. Nie jest to jeszcze pełna odpowiedź, bowiem nie tłumaczy istnienia aż tylu różnych klas XP (CLEAVER 1990).

W zespole Blooma także występuje nadwrażliwość na światło słoneczne a ponadto zahamowanie wzrostu sięgające po karłowatość oraz niedobory immunologiczne. Ze wszystkich zespołów chorobowych, w których ma miejsce brak lub niedobór syntezy naprawczej DNA zapadalność na choroby nowotworowe jest najwyższa w zespole Blooma. Najczęściej są to ostre białaczki limfatyczne. Istnieją wskazania, że niedobór syntezy naprawczej DNA jest spowodowany zdefektowaniem DNA-ligazy I i DNA-glikozylazy uracylowej.

Chorobę *ataxia telangiectasia* (AT) cechuje nadwrażliwość na promieniowanie jonizujące oraz szereg innych czynników uszkodzających DNA. Prawdopodobnie ma to wpływ na wysoką mutabilność i częste występowanie aberracji chromosomowych. Wyróżnia się co najmniej 4 grupy komplementarne AT. Defekt molekularny prowadzi do wad układów neurologicznego i immunologicznego. Towarzyszące zespołowi choroby nowotworowe (np. chłoniaki) dotyczą najczęściej komórek immunologicznie kompetentnych. Także część pacjentek z rakiem piersi można zakwalifikować do zespołu AT. Niemniej, do dzisiaj — mimo bardzo intensywnych badań — nie udało się precyzyjnie ustalić błędu w mechanizmie naprawy DNA.

Anemia Fanconiego ma charakter postępujący w kierunku pancytopenii. Nadwrażliwość na działanie czynników genotoksycznych ogarnia szeroki zakres i znajduje odbicie w wysokim poziomie aberracji chromosomowych i spontanicznych wymian chromatyd siostrzanych. Poziom ryzyka wystąpienia chorób nowotworowych, głównie ostrej nieлимfatycznej białaczki w niewielkim tylko stopniu przewyższa statystyczne ryzyko.

Niektóre cechy zespołu Cockayne (CS) przypominają zespół Blooma. Jednak oprócz karłowatości i nadwrażliwości na światło słoneczne do cech stałych zalicza się niedorozwój umysłowy i przedwczesne starzenie. Wyróżniono trzy grupy komplementacyjne. Zespołowi CS nie przypisano żadnej określonej choroby nowotworowej, a ryzyko wystąpienia nie odbiega od statystycznego.

Do chorób, w których występuje całkowity lub częściowy niedobór syntezy naprawczej DNA zalicza się też dziedziczną retinoblastomę. Ryzyko wystąpienia nowotworu gałki ocznej wielokrotnie przekracza w tym przypadku tło statysty-

czne. W odróżnieniu od wymienionych wyżej chorób retinoblastoma dziedziczy się jako cecha autosomalna dominująca.

Opisane wyżej choroby należą do jednostek rzadkich. Niemniej w znaczący sposób wpływają na zróżnicowanie populacji ludzkiej w zakresie sprawności syntezy naprawczej DNA. Oprócz wymienionych jednostek chorobowych donoszono o częściowym niedoborze syntezy naprawczej DNA w przypadku wielu innych chorób, na przykład w schizofrenii, zespole znamion dysplastycznych, zespole zaburzeń rogowacenia, zespole Downa czy w chorobie Alzheimer'a.

NAPRAWA DNA W CHOROBACH NOWOTWOROWYCH

Przyjęcie założenia o powiązaniu chorób nowotworowych z ekspozycją na egzogenne lub endogenne czynniki karcynogenne zwróciło uwagę na rolę naprawy DNA, jako czynnika zabezpieczającego przed powstawaniem zmian w strukturze DNA a prowadzących w konsekwencji do transformacji nowotworowej. Rozumowanie to dotyczy tylko genotoksycznych czynników karcynogennych, ale większość z nich posiada taki charakter i działa w następującym ciągu wydarzeń:

czynnik genotoksyczny → uszkodzenie DNA →
mutacja → zmiana genotypu → zmiana fenotypu

Jak wykazano, niedoborowi syntezy naprawczej DNA w omówionych wyżej jednostkach chorobowych towarzyszy zwiększona częstotliwość występowania chorób nowotworowych. Całkowicie koresponduje z tym obniżenie aktywności enzymów naprawczych w materiale klinicznym uzyskiwanym z nowotworów oraz w komórkowych liniach wyprowadzonych z nowotworów. Stwierdzono znaczne obniżenie aktywności O⁶-metyloguanino-DNA metylotransferazy w limfocytach krwi obwodowej pacjentów z nielimfatyczną białaczką. Ten sam enzym wykazywał również obniżoną aktywność w komórkach nowotworów mózgu. Obniżenie aktywności naprawczej DNA występowało jednocześnie w sąsiednich komórkach, rozpoznanych histopatologicznie jako normalne (SILBER i współaut. 1993).

Wydaje się, że zjawisko to ma charakter ogólny, bo fakt częściowego niedoboru syntezy naprawczej DNA odnotowano w odniesieniu do różnych typów nowotworów, między innymi raka okrężnicy i raka jelita grubego. Interesujące jest dalsze rozszerzenie tej obserwacji na zdrowych krewnych w rodzinach, w których występował rak jelita grubego i rak piersi (PERO i współaut. 1989). Analogicznie stwierdzono obniżoną naprawę DNA u córek pacjentek z rakiem piersi. Odkryto również obniżenie naprawy DNA towarzyszące wtórnym nowotworom.

Niemniej, ostatnio zwrócono uwagę na fakt, że nie ma jasności, czy obniżenie aktywności enzymów naprawczych jest skutkiem procesu nowotworzenia, czy też też pierwotny częściowy niedobór syntezy naprawczej DNA przyczynił się do rozwoju choroby nowotworowej.

Z drugiej jednak strony komórki nowotworowe cechuje znacznie zwiększona (w porównaniu z komórkami normalnymi) aktywność metaboliczna. Wysoka proliferacja, której towarzyszy intensywna synteza replikacyjna DNA ułatwia naprawę DNA poprzez zwiększenie dostępności miejsc uszkodzonych dla enzymów naprawczych (STEWART 1992). Mamy zatem do czynienia z dwoma przeciw-

stawnymi procesami w komórkach nowotworowych. Porównanie uszkodzeń DNA w komórkach nowotworowych i normalnych najczęściej wskazywało na wyższy ich poziom w komórkach normalnych niż nowotworowych. Można to interpretować jako przewagę ułatwionej naprawy DNA, związanej z szybką proliferacją komórek nowotworowych nad efektem obniżenia aktywności enzymów naprawczych w komórkach neoplastycznych. Potwierdzenie tej obserwacji znaleźliśmy także w badaniach własnych nad adduktami DNA generowanymi ekspozycją na dym papierosowy u pacjentów z rakiem krtani. Poziom zmetylowania reszt guanozynowych w normalnej tkance krtani przewyższał analogiczne wartości uzyskane dla tkanki guza krtani. Podobne obserwacje poczyniono porównując poziom adduktów PAH:DNA w tkance normalnej i nowotworowej w przypadku raków: języka, warg i jamy ustnej u palaczy tytoniu.

UWAGI KOŃCOWE

Populacja ludzka jest głęboko zróżnicowana pod względem syntezy naprawczej DNA. Ponieważ proces ten ma określone zadania na rzecz komórki a dalej tkanki i organizmu niedobory syntezy naprawczej DNA mają określone konsekwencje (HEMMINKI 1993). W artykule wykazano powiązania sprawcze niedoborów syntezy naprawczej DNA z nowotworzeniem i starzeniem.

Badania nad mechanizmami naprawy DNA oprócz efektów poznawczych przyniosły też skutki praktyczne. Indukcję syntezy naprawczej DNA uznano za biomarker generacji uszkodzeń DNA (ASHBY 1988). Pozwoliło to na opracowanie ilościowej oceny przebiegu procesu naprawy DNA (WATERS 1984). Po zahamowaniu syntezy replikacyjnej DNA mierzy się inkorporację znakowanej tymidyny do komórek, co odpowiada tak zwanej nieprogramowanej syntezie DNA (ang. unscheduled DNA synthesis — UDS) traktowanej jako miernik ilościowy procesu naprawy DNA. Alternatywnie syntezę naprawczą ocenia się techniką autoradiografii, która lokalizuje miejsca naprawy w komórce. Ocena syntezy naprawczej DNA jest istotnym parametrem w analizie czynników genotoksycznych.

PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL VARIABILITY OF DNA REPAIR IN HUMAN

Summary

DNA repair plays a crucial role in protection of human genetic material against genotoxic agents including carcinogens, ensuring genome stability.

Variability of DNA repair was observed on many levels. There are several mechanisms of damage removal and a number of enzymes taking part in the specific steps of DNA repair. Hence, variations in efficiency of DNA repair among healthy individuals can be explained in terms of genetic polymorphism. There are also some exogenous and endogenous factors affecting the DNA repair machinery in human organism. The first group includes diet and genotoxic exposure whereas the second comprises age (negative linear correlation) and health status. Within the group of health status factors neoplasticity and diseases with hereditary DNA repair deficit are discussed extensively.

The well documented heterogeneity of DNA repair inside the genome concerns differences between classes of DNA (e.g. nuclear *v.* mitochondrial or repetitive *v.* single copy) and preferential repair of actively transcribed genes.

The main message of the article is that DNA repair should be recognized as fairly individual and, moreover, as being modulated by many factors.

LITERATURA

- ASHBY J., 1988. *Comparison of techniques for monitoring human exposure to genotoxic chemicals*. *Mutat. Res.*, 204, 543-551.
- BOHR V. A., 1991. *Gene specific DNA repair*. *Carcinogenesis*, 12, 1983-1992.
- CLEAVER J. E., 1990. *Do we know the cause of Xeroderma pigmentosum?*, *Carcinogenesis*, 11, 875-882.
- DEFAIS M., 1990. *Mechanisms of repair in mammalian cells*. W: *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis II* (red.) COOPER C. S. i GROVER P. L., Springer Verlag, Berlin, 51-70.
- HANAWALT Ph. C., 1991. *Heterogeneity of DNA repair at the gene level*. *Mutat. Res.*, 247, 203-211.
- HANAWALT Ph. C., SARASIN A., 1986. *Cancer-prone hereditary diseases with DNA processing abnormalities*. *Trends in Genetics*, May 1986, 124-129.
- HARRIS C. C., 1987. *Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair*. *Carcinogenesis*, 10, 1563-1566.
- HEMMINKI K., 1993. *DNA adducts, mutations and cancer*. *Carcinogenesis*, 14, 2007-2012.
- HOEJMAKERS J. H., BOOTSMA D., 1992. *DNA repair: two pieces of the puzzle*. *Nature Genetics*, 1, 313-314.
- KNUDSEN L. E., 1992. *Evaluation of UDS in human lymphocytes as an indicator of genotoxic exposure*. Ph. D. Thesis, Copenhagen Univ.
- LAMBERT B., RINGBORG U., SKOOG L., 1979. *Age-related decrease of UV-induced DNA repair synthesis in human leukocytes*. *Cancer Res.*, 39, 2792-2795.
- LAWRENCE J. N., BENFORD D. J., 1993. *Chemically-induced UDS in cultures of adult human epidermal keratinocytes*. *Mutat. Res.*, 291, 105-115.
- LEDoux S. P., WILSON G. L., BEECHAM E. J., STEVNSNER K., BOHR V. A., 1992. *Repair of mtDNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells*. *Carcinogenesis*, 13, 1967-1973.
- LINDAHL T., 1990. *Repair of intrinsic DNA lesions*. *Mutat. Res.*, 238, 305-313.
- OESCH F., AULMANN W., PLATT K. L., DOERJER G., 1987. *Individual Differences in DNA repair capacities in man*. *Arch. Toxicol., Suppl.* 10, 172-179.
- PERO R. W., JOHNSON D. B., MARKOVITZ M., DOYLE G., LUND-PERO M., SEIDEGARD J., HALPER M., MILLER D. G., 1989. *DNA repair synthesis in individuals with and without a family history of cancer*. *Carcinogenesis*, 10, 683-697.
- POWELL S., McMILLAN T. J., 1990. *DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation*. *Radiotherapy and Oncology*, 19, 95-108.
- SETLOW R. B., 1983. *Variations in DNA repair among humans*. W: *Human Carcinogenesis* (red.) HARRIS C. C., AUTRUP H., Academic Press, New York 231-254.
- SILBER J. R., MUELLER B. A., EWERS T. G., BERGER M. S., 1993. *Comparison of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity in brain tumors and adjacent normal brain*. *Cancer Res.*, 53, 3416-3420.
- STEWART B. W., 1992. *Role of DNA in carcinogenesis*. W: *Mechanisms of carcinogenesis in risk identification*. (red.) VAINIO H., MAGEE P. N., MCGREGOR D. B., MCMICHAEL A. J., Int. Agency Res. Cancer, Lyon, 307-320.
- SZYFTER K., MULLENDERS L. H. M., 1993. *Genome heterogeneity in mutagen-induced DNA repair*. *Current Topics in Biophys.*, 16, 53-61.
- THOMPSON L. H., 1991. *Properties and applications of human DNA repair genes*. *Mutat. Res.*, 247, 1991, 213-219.
- VAHAKANGAS K., AUTRUP H., HARRIS C. C., 1984. *Interindividual variation in carcinogen metabolism, DNA damage and DNA repair*. *Int. Agency Res. Cancer*, 59, 85-98.
- VAHAKANGAS K., TRIVERS G. E., PLUMMER S., HAVES R. B., KROKAN H., ROWE M., SWARTZ R. P., YEAGER H. J. R., HARRIS C. C., 1991. *O⁶-metGuo DNA methyltransferase and uracil DNA glycosylase in human broncho-alveolar and peripheral blood mononuclear cells from tobacco smokers and non-smokers*. *Carcinogenesis*, 12, 1389-1394.
- WATERS R., 1984. *DNA repair tests in cultured mammalian cells*. W: *Mutagenicity testing. A practical approach*. (red.) VENITT S. i PARRY J. M., IRL Press, Oxford-Washington, 99-117.