

CELINA JANION

*Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
02-106 Warszawa, Pawińskiego 5a
e-mail: celina@ibb.waw.pl*

MUTAGENEZA — USZKODZENIA I NAPRAWA DNA

Mam przyjemność przedstawić czytelnikom KOSMOSU zeszyt poświęcony uszkodzeniom DNA, sposobom jego naprawy i konsekwencjom wynikającym z zaburzeń w naprawie, które mogą prowadzić do mutacji, schorzeń lub śmierci organizmów. Procesy te dotyczą całego świata ożywionego i chociaż istnieją pewne różnice w budowie i organizacji DNA, w budowie i specyficzności systemów naprawczych, ich schemat działania w jednokomórkowych organizmach bakteryjnych, diploidalnych komórkach drożdży, u roślin, czy w tkankach ludzkich, jest podobny. Świat ożywiony podlega tym samym prawom, stosuje podobne rozwiązania. Walka o utrzymanie i zachowanie integralności genomu trwa nieustannie. Mutacje nie tylko powodują destrukcje genów, a często są źródłem zmienności ułatwiającej przeżycie w zmieniających się warunkach środowiska, są też motorem ewolucji. Trwałym śladem mutacji są zmiany w zapisie nukleotydów w DNA. Porównując zapis genetyczny białek spełniających w różnych organizmach te same funkcje możemy prześledzić jak przebiegała ich ewolucja, w jakim stopniu organizmy między sobą są spokrewnione, w jakim czasie ich drogi ewolucyjne rozeszły się.

Zasady azotowe w DNA stosunkowo łatwo ulegają uszkodzeniom, takim jak: dezaminacja, depurynacja, czy utlenienie. Szacuje się, że w organizmie ludzkim w ciągu dnia zachodzi około 10 000 reakcji utlenienia i tyle samo reakcji depurynacji DNA. Procesy dezaminacji (cytozyny do uracylu; adeniny do hipoksantyny) przebiegają znacznie wolniej. Uszkodzenia DNA, co może wydawać się paradoksalne, są wynikiem ubocznego działania normalnie występujących w komórkach związków chemicznych i metabolitów, takich jak na przykład S-adenozylometionina — dawca grupy metylowej w wielu reakcjach metylacji w komórce, wolnych rodników, nadtlenu, hormonów sterydowych czy nitrozamin. Uszkodzeniami są też źle sparowa-

ne zasady powstające w przebiegu replikacji DNA na skutek błędów polimeraz, enzymów replikujących DNA lub w wyniku niedoskonałej rekombinacji DNA. Uszkodzenie DNA — powstawanie błędów w kodzie genetycznym, jest więc normalnym przejawem życia — przejawem procesów metabolicznych zachodzących w ustroju, a utrzymanie stałości zapisu genetycznego — wynikiem sprawnie działających systemów naprawczych, wykształconych w długim procesie ewolucji. Niektóre systemy naprawcze są wyrażane na stałym poziomie, inne ulegają indukcji. Indukcja, właściwie prowadzi do podwyższenia poziomu syntezy białek naprawy, czasami o poszerzonej specyficzności w sytuacji, gdy poziom uszkodzeń DNA znacznie wzrasta, co często jest skutkiem inwazji czynników egzogennych. Ekspresja genów, czyli wszczęcie procesów transkrypcji i translacji prowadzących do syntezy białek, jest procesem ściśle regulowanym w komórkach. Gdy regulacji podlegają geny znajdujące się w różnych miejscach genomu, taka jednostka regulacyjna nazywana jest regulonem. W bakteriiach *Escherichia coli* poznane zostały przynajmniej trzy regulony, w których transkrypcja podlegających im genów jest indukowana w wyniku nagłego wzrostu uszkodzeń w strukturze DNA: (i) system SOS regulowany przez białka RecA-LexA, (ii) system odpowiedzi adaptacyjnej komórek na uszkodzenia alkilacyjne (metylacje, czy etylacje zasad i grup fosforanowych) DNA kontrolowany przez białko Ada (ang. the adaptive response) oraz (iii) regulon OxyR, kontrolujący transkrypcję hydroperoksydazy i 9-ciu innych białek redukujących poziom związków generujących reaktywne formy tlenu. Indukcja tych białek jest odpowiedzią komórki na stres oksydacyjny, na przykład obecność nadtlenu wodoru w komórkach. Roli białek regulonu OxyR w obronie przed mutacjami nie udało się nam omówić w tym zeszycie.

System SOS obejmuje 30–40 białek, które biorą udział w naprawie i mutagenie DNA. Nazwa SOS (ang. save our souls) została nadana przez Miro Radmana, od sygnału wysyłanego alfabetem Morse'a ze statków znajdujących się w niebezpieczeństwie. Indukcja systemu powoduje wzmożoną syntezę białek związanych z replikacją, naprawą i mutagenizacją DNA. Indukcja systemu SOS jest odpowiedzią komórki na pojawianie się w DNA modyfikacji powodującej utratę informacji kodowania i zatrzymania syntezy DNA. Takimi znanymi uszkodzeniami są dimery pirymidynowe, powstające pod wpływem promieniowania ultrafioletowego i jonizującego oraz miejsca pozbawione zasad w DNA. Do niedawna zgadzano się, że kompleks białek UmuD'2UmuC białko RecA i polimerazy III DNA może przechodzić w procesie replikacji DNA poprzez takie nie informacyjne uszkodzenia. Ostatnio stwierdzono jednak, że sam kompleks białek UmuD'2C wykazuje aktywność enzymatyczną polimerazy DNA (polimeraza DNA V), która jest mało dokładna w kopiowaniu i nawet w nieuszkodzonym DNA powoduje indukcję mutacji. Jest to ostatnio największa sensacja w zrozumieniu mechanizmu mutacji SOS. Polimeraza DNA V jest więc już trzecią kolejną polimerazą, której aktywność w czasie indukcji SOS wzrasta. Pozostałe polimerazy to polimeraza DNA II kodowana przez gen *polB* i polimeraza DNA IV kodowana przez gen *dinB*.

System odpowiedzi adaptacyjnej obejmuje indukcję przynajmniej czterech białek: białka Ada, które jest aktywatorem transkrypcji i DNA metylotransferazą, AlkA — o funkcji 3-metylo-DNA glikozylazy II, która podobnie jak 3-metylo-DNA glikozylaza I kodowana przez konstytutywny gen *tag*, usuwa z DNA 3-metylo adeninę, a ponadto 3-metylowaną guaninę i eteno-guaninę oraz O²-metylowane pirymidyny, białka AlkB o nieznannej funkcji oraz dehydrogenazę izowalerylową koenzymu A kodowaną przez gen *aidB*.

W ogólnym ujęciu procesy naprawy DNA przebiegają według kilka schematów. 1) Może nastąpić proste odwrócenie reakcji i odzyskanie pierwotnej struktury zmodyfikowanej zasady. Enzymami zdolnymi do tego typu naprawy są foliazy i DNA metylo (alkilo) transferazy. Foliazy odwracają procesy dimeryzacji pirymidyn. Utworzone dimery 5,6-cyklobutanowe i 6-4 fotoprodukty zostają przekształcone do wyjściowych związków. Transferazy przenoszą grupę metylową (lub etylową) z reszt O⁶alkilo-guaniny lub O⁴- tyminy na reszty cysteinowe własnego białka przywracając pierwotną strukturę zmodyfikowanej zasady, lecz same zostają bezpozwrotnie inaktywowane w tej samobójczej re-

akcji, 2) naprawa typu BER (od ang. base excision repair) zapoczątkowuje hydrolityczne usunięcie zasady z DNA w wyniku działania enzymów: DNA glikozylaz, których aktywność jest często połączona z aktywnością liazy (DNA glikozylaza/liaza) i obok usunięcia zasady następuje przecięcie łańcucha fosfo-cukrowego DNA. 3) Naprawa typu NER (ang. nucleotide excision repair) należą tu białka rozpoznające zaburzenia w strukturze DNA, na przykład UvrABC-endonukleaza *E. coli*, która przecina łańcuch DNA i usuwa 12–13 nukleotydowy fragment z uszkodzonymi zasadami. Proces naprawy typu BER u *E. coli* i eukariontów obejmuje od 1–10 zasad; typu NER, u *E. coli*, 12–13 nukleotydów, a w ludzkim DNA 24–32 nukleotydów.

Pozostawione po replikacji źle dopasowane zasady w DNA są usuwane przez system naprawy niedopasowanych zasad, MMR (ang. mismatch repair). Zainteresowanie tym systemem znacznie wzrosło po wykryciu, że uszkodzenia ich funkcji są przyczyną powstawania u ludzi pewnych wrodzonych typów raka jelita grubego HNPCC (ang. hereditary nonpolyposis colon cancer).

Odniesienia do wszystkich tych procesów naprawy znajdują się w przedstawianych poniżej artykułach. Niektóre zagadnienia, jak na przykład stymulacja procesów naprawy w czasie transkrypcji, rola białka P53 w naprawie uszkodzeń w ludzkim DNA, zostały w niewielkim stopniu uwzględnione, innych, jak na przykład naprawa DNA w roślinach, nie udało się omówić.

Zeszyt otwiera artykuł BRYNA A. BRIDGESA o roli uszkodzeń DNA w powstawaniu mutacji adaptacyjnych, czyli spontanicznych mutacji zachodzących w komórkach bakteryjnych znajdujących się w stacjonarnej fazie wzrostu, w warunkach głodzenia, kiedy pozornie nie zachodzi synteza DNA i brak jest podziałów komórkowych. Ale czy prawdą jest, że w tych warunkach brak jest syntezy DNA i, że powstają tylko mutacje korzystne, te które przywracają zdolność bakterii do wzrostu? BRIDGES odpowiada na te i inne pytania w sposób dyskusyjny, niezwykle dociekliwy i wyczerpujący. Badania nad mutacjami komórek w stanie spoczynku, stanowią w ostatnich latach najbardziej stymulujący nurt badań procesów mutacji. W nieoczekiwany sposób rozszerzyły one znacznie zakres zagadnień związanych z mutagenizacją i rozpalily dyskusję nad mechanizmami powstawania mutacji. Rewersja mutacji często następuje w wyniku utworzenia supresorowego tRNA, czyli tRNA, który na skutek zmiany mutacyjnej w części antykodonowej ma zmienioną zdolność odczytu kodonu w mRNA, lecz zachowaną zdol-

ność do przenoszenia określonego aminokwasu. Udział supresorowego tRNA w procesie translacji może pozwolić na korektę zmutowanego miejsca. Na przykład, gdy mutacja w genie struktury białka spowodowała utworzenie w mRNA kodonu stop, UAA, który jest sygnałem przerwania biosyntezy białka, pojawienie się supresorowego tRNA odczytującego nonsensowny kodon ochre, umożliwi włączenie aminokwasu niesionego przez supresorowe tRNA i dalszą syntezę białka. Otóż ten typ mutacji supresorowej, który łatwo występuje w czasie wzrostu bakterii nie występuje w warunkach głodzenia. Innymi słowy wśród mutacji adaptacyjnych, mutacje prowadzące do otrzymania supresorowego tRNA, nie występują. Przypuszczam, że może to być wynikiem występowania wzmożonej naprawy genów tRNA, opisanego u *E. coli* jako zjawisko MFD (ang. mutation frequency decline). Wydaje się więc, że głównym powodem istnienia różnic między mutacjami spontanicznymi zachodzącymi w warunkach wzrostu i mutacjami adaptacyjnymi pojawiającymi się w warunkach głodzenia bakterii, są różnice w naprawie uszkodzonego DNA. Przypuszczalnie uszkodzenia w genach kodujących tRNA w warunkach ograniczonego wzrostu są naprawiane preferencyjnie.

MALGORZATA MROCZKOWSKA-SŁUSPKA opisuje alternatywne drogi mutagenyzy w bakteryjnych szczepach o właściwościach mutatorowych. Szczepy mutatory pojawiają się na skutek uszkodzenia funkcji w określonych genach naprawy lub w genach zapobiegających mutacji. Szczepy takie cechuje znacznie podwyższony poziom częstości indukowania mutacji spontanicznych. Przedstawia również mutagenne skutki powstawania missensownych tRNA o zmienionym antykodonie, nie odpowiadającym transportowanemu przez nie aminokwasowi, co może spowodować włączenie w procesie translacji niewłaściwego aminokwasu do syntetyzowanej cząsteczki białka i może prowadzić do powstawania tak zwanych białek mutatorowych. Jest to nowy typ indukowania mutacji w czasie procesu translacji, jeszcze jeden przejaw ogromnych możliwości natury. IRENA PIETRZYKOWSKA i JOANNA KRRAWICZ szczegółowo omawiają i porównują różnorodne systemy naprawy DNA u bakterii i u człowieka, mechanizm mutagenyzy SOS oraz choroby genetyczne związane z uszkodzeniem procesów naprawy. Dwa kolejne artykuły dotyczą mechanizmów powstawania i obrony przed oksydacyjnymi uszkodzeniami w DNA. RYSZARD OLIŃSKI i MAREK JURGOWIAK opisują zróżnicowane uszkodzenia oksydacyjne zasad w DNA, zagrożenia wynikające z pojawienia się 8-oksoguaniny, głównego

uszkodzenia oksydacyjnego w DNA oraz schorzenia wynikające z braku lub osłabienia systemów naprawy uszkodzeń oksydacyjnych w DNA. Natomiast BARBARA TUDEK szczegółowo przedstawia mechanizm działania DNA glikolazy/liazy usuwającej reszty 8-oksoguaniny z DNA oraz DNA glikozylazy/liazy glikolu tyminy, usuwającej ten produkt reakcji utlenienia tyminy z DNA. O uszkodzeniach DNA wynikających z niedokładności jego kopiowania i wstawiania do nici DNA nie pasujących zasad w procesie replikacji, ewolucji systemów enzymatycznych biorących udział w naprawie tych uszkodzeń, istnieniu homologicznych sekwencji w białkach naprawy bakterii, drożdży i człowieka i o fenotypowych skutkach braku tego typu naprawy pisze PIOTR POLACZEK.

Częstym uszkodzeniem w DNA są jedno- i dwułańcuchowe pęknięcia w szkieletcie fosforanowo-cukrowym. Uszkodzenie procesów naprawy podwójnych pęknięć prowadzi do inaktywacji, delecji lub inwersji genów. U bakterii naprawa ich zachodzi głównie w wyniku rekombinacji homologicznej, natomiast w komórkach ssaków naprawa jest wynikiem rekombinacji NHEJ — nie homologicznego łączenia końców DNA (ang. non homologous end joining). Molekularny mechanizm tego procesu, konsekwencje biologiczne wynikające z jego uszkodzenia przedstawia i uzupełnia o własne przemyślenia MALGORZATA Z. ZDZIENICKA. O strukturze i ewolucji sekwencji DNA w chromosomie człowieka pisze JAN FILIPSKI. Jest to dziedzina badań wytwarzająca nowe kierunki badań nad genomami i skutkami występowania procesów mutacji w skali ewolucyjnej. Zeszyt zamyka artykuł ZBIGNIEWA DOMIŃSKIEGO dotyczący procesów związanych z apoptozą, genetycznie zaprogramowanym procesem śmierci komórek. Apoptoza usuwa z organizmu komórki zbyteczne w tym nowotworowe, które na skutek licznych mutacji utraciły kontrolę nad cyklem podziałów komórkowych. W artykule przedstawiona jest funkcja i rola w tym procesie proteaz cysteinowych, caspaz (od ang. cysteine-aspartate specific proteases) oraz roli apoptozy w powstawaniu i leczeniu chorób, zwłaszcza nowotworowych.

Wybór autorów artykułów do tego zeszytu nie był przypadkowy. Są wśród nich obecni (B. TUDEK, I. PIETRZYKOWSKA, J. KRRAWICZ, C. JANION) i byli pracownicy, doktoranci i habilitanci (M. MROCZKOWSKA-SŁUSPKA, P. POLACZEK, Z. DOMIŃSKI, M. Z. ZDZIENICKA, J. FILIPSKI) Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN lub osoby związane z Instytutem naukową współpracą (B. A. BRIDGES, R. OLIŃSKI i M. JURGOWIAK). Instytut jest bowiem od wielu lat ważnym centrum badań nad mutagenizacją. Ogromną zaletą artykułów

jest to, że zostały napisane przez Autorów osobiście zaangażowanych w badania w reprezentowanej przez nich dziedzinie. Oryginalne poglądy i twórczy wkład Autorów zostaną z pew-

nością docenione przez Czytelników KOSMO-SU. Wszystkim Autorom składam serdeczne podziękowania za ich udział w przygotowaniu niniejszego zeszytu i ogrom włożonej w to pracy.

Celina Janion