

IRENA PIETRZYKOWSKA i JOANNA KRWAWICZ

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Zakład Biologii Molekularnej,

Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

e-mail: asiak@ibb.waw.pl

MECHANIZMY NAPRAWY DNA U BAKTERII I CZŁOWIEKA

WSTĘP

Materiał genetyczny jest ciągle narażony na uszkodzenia i modyfikacje, które mogą prowadzić do poważnych konsekwencji biologicznych, takich jak mutacje, zmiany nowotworowe i choroby genetyczne. O tym, jak bardzo DNA jest narażony na uszkadzające działanie czynników endogennych (m.in. oksydację, dezaminację i metylację zasad w DNA), a także czynników środowiskowych (promieniowanie UV, czynniki chemiczne) świadczy fakt, że w każdej komórce co sekundę powstaje uszkodzenie DNA, a ponad 10.000 zasad dziennie jest uwalnianych z DNA przez tak zwane „spontaniczne” procesy. Oprócz tego, w dzielących się komórkach powstają błędy podczas replikacji DNA, a narażenie na mutageny i kancerogeny środowiskowe powoduje dodatkowe uszkodzenia DNA. Aby przeżyć i zachować ciągłość genetyczną, organizmy żywe wykształciły szereg mechanizmów na-

prawy DNA, które usuwając uszkodzenia przywracają pierwotną informację genetyczną. Najbardziej efektywnymi są: naprawa przez wycinanie zasad BER (ang. base excision repair), naprawa przez wycinanie nukleotydów NER (ang. nucleotide excision repair), naprawa rekombinacyjna, a także naprawa prowadząca do powstawania mutacji (ang. error prone repair). Badania genetyczne i biochemiczne pozwoliły na poznanie szeregu enzymów uczestniczących w procesach naprawy DNA oraz ich regulacji, zarówno w komórkach mikroorganizmów, jak i organizmów wyższych.

Większość białek uczestniczących w procesach naprawy DNA, występujących zarówno u *Escherichia coli*, jak i u człowieka, wyizolowano i poznano ich strukturę oraz oddziaływania z uszkodzeniami w DNA.

USZKODZENIA DNA

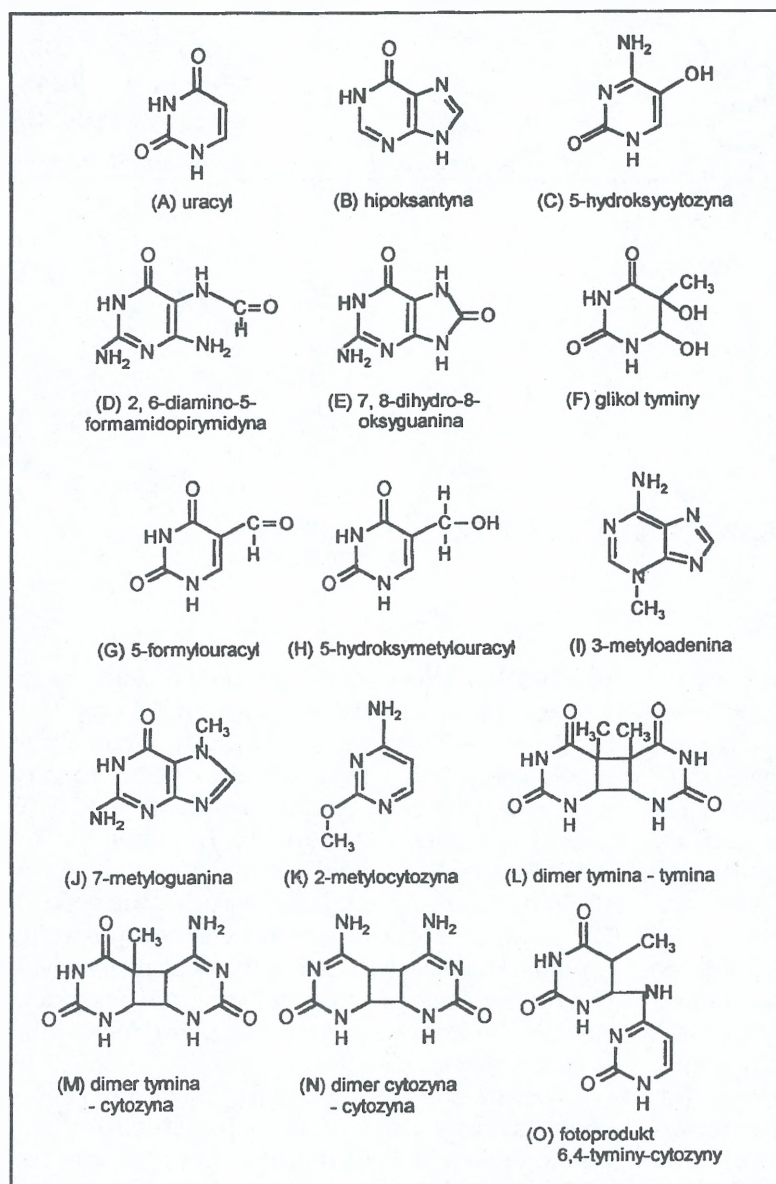
Uszkodzenia DNA mogą powstawać na skutek działania czynników endogennych i egzogennych (FRIEDBERG i współaut. 1995).

Poważnym źródłem endogennego uszkodzenia DNA są powstające w wyniku metabolizmu tlenowego (procesu oddychania) wolne rodniki tlenowe $O_2^{\bullet}$. Głównymi produktami utleniania zasad są: 8-oksyguanina oraz glikole tyminy (Ryc. 1). Ponadto, cytozyna i adenina w DNA mogą ulegać dezaminacji, co prowadzi do powstania w DNA odpowiednio: uracylu i hipoksantyny, a w konsekwencji do zmiany pary zasad, czyli mutacji. Metylacja jest także waż-

nym elementem modyfikującym zasady. Endogennym źródłem metylacji jest S-adenozylometionina, metaboliczny donor grupy metylowej.

Do czynników egzogennych uszkadzających DNA należą: promieniowanie UV o różnej długości fali (UVC 220–280nm, UVB 280–320nm, UVA 320–400nm), promieniowanie jonizujące oraz czynniki chemiczne.

Główne fotoprodukty w naświetlonym promieniami UV DNA stanowią: fotodimery pirymidyn, 6–4 fotoprodukty, fotohydraty cytozyny i glikol tyminy (Ryc. 1). Promieniowanie jonizu-



Ryc. 1. Uszkodzenia zasad w DNA.

A-B — produkty dezaminacji, C-H — uszkodzenia tworzone przez wolne rodniki, I-K — zmetylowane zasady powstałe w wyniku działania czynników alkilujących, L-O — fotoprodukty pirymidyn powstałe w wyniku naswietlania UV.

jące, bezpośrednio lub przez tworzenie silnie reaktywnych wolnych rodników, powoduje modyfikacje zasad, głównie pirymidyn, które stanowią 60% uszkodzeń. Innym źródłem uszkodzeń DNA są czynniki chemiczne znajdujące się w środowisku, tak zwane mutageny lub karcynogeny środowiskowe. Niektóre z nich reagują bezpośrednio z DNA, a inne wymagają aktywacji metabolicznej, aby reagować z zasadami DNA. Do nich należą niektóre czynniki alkilujące, aryłujące oraz węglowodory aromatyczne. Wśród substancji chemicznych produkowanych przez człowieka, na liście mutagenów i karcynogenów znajduje się kilka tysięcy związków.

Oprócz uszkodzeń DNA dotyczących typu modyfikacji zasad DNA, istotnymi uszkodzeniami są jedno- i dwuniciowe pęknięcia łańcuchów DNA. Przyczyną jednoniciowych pęknięć może być uszkodzenie reszty cukrowej w szkielecie fosfocukrowym przez promieniowanie jonizujące, czynniki chemiczne, a także przez działanie nukleaz. Dwuniciowe pęknięcia w DNA mogą powstawać, gdy uszkodzenia na obu niciach DNA znajdują się blisko siebie lub, gdy DNA narażone jest na duże dawki promieniowania jonizującego.

MECHANIZMY NAPRAWY DNA

Do najprostszych mechanizmów naprawy DNA należą enzymatyczna fotoreaktywacja i demetylacja O^6 -metyloguaniny (O^6 MeG) i O^4 -

metylotyminy (O^4 MeT). W obu przypadkach naprawa zachodzi z udziałem jednego białka i prowadzi do bezpośredniego przywrócenia sta-

nu wyjściowego bez usuwania naprawianej zasady. Oba enzymy są specyficznie wobec typu uszkodzenia. Fotoreaktywacja dotyczy fotodimerów pirymidyn (SANCAR 1994a). Enzym — fotoliza — jest monomerycznym polipeptydem (54 kDa), który wiąże się w ciemności do DNA zawierającego fotodimery powstałe w wyniku naświetlania promieniowaniem UV. Pod wpływem światła widzialnego (350–500nm), w obecności dwóch kofaktorów — flawinowego dwunukleotydu adeniny (FAD) i metenylotetrahydrofolianu, dochodzi do rozszczepienia dimeru i przywrócenia wyjściowych pirymidyn. Demetylacja O⁶MeG i O⁴MeT zachodzi z udziałem DNA metylotransferazy I kodowanej u *E. coli* przez gen *ada* (białko Ada). DNA metylotransferaza I przenosi na własne białko grupę metylową z O⁶MeG i O⁴MeT oraz z metylofosfotriestrów powstających w wyniku metylacji grup fosforowych w szkielecie fosfocukrowym DNA. Enzym jest indukowany w czasie adaptacji pod wpływem niskich dawek czynników metylujących (alkilujących). Jest to szczególnie enzym, który działa tylko jeden raz. Wykazano, że grupa metylowa jest przenoszona z O⁶MeG w DNA na cysteinę (Cys32) metylotransferazy I, z jednoczesną inaktywacją enzymu. Natomiast przeniesienie grupy metylowej z fosfotriestru w DNA na cysteinę (Cys69) białka Ada powoduje, że staje się ono aktywatorem transkrypcji genu *ada*, co prowadzi do syntezy nowych cząsteczek O⁶MeG transferazy. W związku z tym, że białko Ada działa tylko jeden raz, konieczna jest jego synteza w dużych ilościach. W komórkach *E. coli* istnieje druga O⁶MeG transferaza, kodowana przez gen *ogt*, którego ekspresja jest kon-

stytutowa i nie wymaga aktywatorów transkrypcji. Ta metylotransferaza II charakteryzuje się mniejszą specyficznością wobec substratu oraz tym, że nie usuwa grup CH₃ z grup fosforanowych. Metyltransferazy oraz mechanizm ich działania zostały pierwotnie wykryte i poznane u *E. coli*, a następnie wykazano ich obecność w komórkach organizmów wyższych, w tym w ludzkich (KARRAN i BIGNAMI 1992).

W komórkach ludzkich wykazano obecność tylko jednej O⁶MeG transferazy, która jest bardziej podobna do O⁶MeG transferazy II *E. coli*, kodowanej przez gen *otg*. O⁶MeG transferaza z komórek ssaków wykazuje podobną specyficzność wobec uszkodzenia (O⁶MeG) do O⁶MeG transferazy I z *E. coli*, natomiast różni się tym, że jest wyrażana konstytutywnie, podobnie jak O⁶MeG transferaza II *E. coli*. Usuwa ona głównie grupę metylową z O⁶MeG w DNA i w ograniczonym stopniu z O⁴MeT, nie usuwa zaś grupy alkilowej ze szkieletu fosfocukrowego. Enzym został wyizolowany i wykazuje duże regiony o podobnej sekwencji aminokwasowej do polipeptydu obu O⁶MeG transferaz I i II z *E. coli* mimo, iż jest małe podobieństwo w sekwencji nukleotydowej (FRIEDBERG i współaut. 1995)

O⁶ alkiloG jest uszkodzeniem o dużym znaczeniu biologicznym, gdyż jak wykazano, istnieje duża korelacja pomiędzy jej obecnością w DNA, a mutagennym i karcynogennym efektem czynników alkilujących. Metyltransferaza wydaje się więc odgrywać ważną rolę w ochronie komórek przed nowotworami indukowanymi przez endogenne i środowiskowe czynniki alkilujące.

NAPRAWA PRZEZ WYCINANIE ZASAD (BER)

Naprawa przez wycinanie zasad — BER jest najlepiej poznana w komórkach *E. coli*, ale występuje także u organizmów wyższych. Ten system naprawy obecnie wydaje się być najważniejszym ze względu na częstość „spontanicznego” występowania zmodyfikowanych zasad w DNA [uszkodzenia oksydacyjne, dezaminacja i metylacja (alkilacja) zasad w DNA], jak też, że usuwa niektóre uszkodzenia spowodowane promieniowaniem jonizującym i UV oraz działaniem czynników alkilujących, chlorku winylu i innych. W systemie BER rozpoznawanie zmodyfikowanych zasad zachodzi z udziałem DNA-glikozylaz, które hydrolizują wiązania glikozyłowe pomiędzy zmodyfikowaną zasadą i resztą cukrową, pozostawiając miejsce apurynowe/apirymidynowe (miejsce AP) (SEEGER i współaut. 1995). W komórkach *E. coli* znanych

jest jedenaście DNA-glikozylaz, większość jest specyficzna wobec określonej modyfikacji zasady (Tabela 1). Ostatnio na podstawie badań krystalograficznych wyjaśniono molekularny mechanizm specyficzności działania dla kilku DNA-glikozylaz, wśród nich DNA glikozylazy uracylowej. Badania strukturalne wskazują, że zmodyfikowana zasada jest wyciągana (ang. flipped out) na zewnątrz helisy DNA do kieszeni enzymu, w której znajdują się odpowiednie aminokwasy warunkujące specyficzne rozpoznanie zmodyfikowanej zasady w DNA. I tak, do kieszeni DNA glikozylazy uracylowej może wejść tylko uracyl, a nie może tymina czy cytozyna. Decyduje o tym obecność asparaginy w pozycji 204 enzymu, która znajduje się w kieszeni i tworzy wiązanie wodorowe z O⁴ pierścienia pirymidynowego uracylu, a nie tworzy z grupą NH₂, co

Tabela 1. DNA glikozylazy

Enzym	Substrat	Produkt
Ura-DNA glikozylaza	uracyl w DNA	uracyl + miejsce AP w DNA
5-mC-DNA glikozylaza	5-metylocytosyna w DNA	5-metylocytosyna + miejsce AP w DNA
Hx-DNA glikozylaza	hipoksantyna w DNA	hipoksantyna + miejsce AP w DNA
Fapy-DNA glikozylaza	formamidopirymidyny lub 8-hydroksyguanina w DNA	2,6-diamino-4-hydroksy-5-N-metyloformamidopirymidyna
3-mA-DNA glikozylaza I	3-metyloadenina w DNA	3-metyloadenina + miejsce AP w DNA
3-mA-DNA glikozylaza II	3-metyloadenina, 7-metyloguanina lub 3-metyloguanina w DNA	3-metyloadenina, 7-metyloguanina lub 3-metyloguanina + miejsce AP w DNA
PD-DNA glikozylaza	dimery pirymidynowe w DNA	dimer pirymidynowy w DNA ze zhydrolizowanym 5' wiązaniem glikozylowym jednej pirymidyny + miejsce AP w DNA
Hmu-DNA glikozylaza	hydroksymetylouracyl w DNA	hydroksymetylouracyl + miejsce AP w DNA
T-G-DNA glikozylaza	G-T pary w DNA	tymina + miejsce AP w DNA
MutY-DNA glikozylaza	G-A pary w DNA	adenina + miejsce AP w DNA
endonukleaza III	5,6-hydrat tyiny w DNA	5,6-dihydroksydihydrotymina lub 5,6-dihydrotymina + miejsce AP w DNA

wyklucza wejście cytozyny. Natomiast obecność tyrozyny w pozycji 147 stanowi zawadę przetrzenną dla grupy CH₃ tyminy. Zmiana aminokwasów w tych dwóch pozycjach powoduje zmianę w specyficzności DNA-glikozylazy (SAVVA i współaut. 1995).

Powstałe w wyniku działania DNA-glikozylaz miejsce AP jest rozpoznawane przez AP-endonukleazę, która tnie wiązanie po 5' stronie AP, co daje 3'OH wolny koniec dla polimerazy DNA. Niektóre z DNA glikozylaz mają także aktywność nukleolityczną wobec miejsc AP (AP-liazy). Dokonują one cięcia po stronie 3' AP miejsca na drodze β -eliminacji. W tym przypadku nacięcie i wycięcie AP miejsca przez AP-endonukleazę zachodzi w sposób skoordynowany i daje jednonukleotydową lukę w DNA. Pozostała reszta cukrowofosforanowa na 3' końcu jest usuwana przez aktywność 3' fosfodwuestryazy AP-endonukleazy.

Komórki *E. coli* posiadają dwie AP-endonukleazy: egzonukleazę III (Exo III), która jest główną AP-endonukleazą i wydajnie przecina szkielet fosfocukrowy w miejscu AP, usuwając ester 3'fosfocukrowy, spowodowany przez uszkodzenie oksydacyjne; wolno jednak przecina w miejscu AP, gdy utlenione są węgle w pozycji 1, 4 lub 5 — takie miejsca są rozpoznawane przez drugą AP-endonukleazę, endonukleazę IV, kodowaną przez gen *nfo*. Obie AP-endonukleazy mają dwie aktywności: 3' fosfodwuestryazy i 3' fosfatazy. Fosfodwuestryaza AP-endonukleazy usuwa resztę fosforanowocukrową z 3' końca pozostałą po działaniu AP liazy związanej z DNA glikozylazą. Wycięcie zmodyfikowanej zasady powoduje powstanie jednonukleotydowej luki, wypełnianej następnie przez polimerazę I DNA

w komórkach *E. coli* lub DNA polimerazę β , w przypadku organizmów wyższych. Ligaza kończy proces.

Naprawa przez wycinanie zasad została odtworzona *in vitro* z udziałem oczyszczonych enzymów *E. coli*: DNA-glikozylazy uracylowej, AP-endonukleazy, białka RecJ, które wycina resztę cukrowo-fosforanową na 5' końcu, powstałą po przecięciu przez AP-endonukleazę oraz polimerazy I DNA i DNA ligazy. Naprawa zachodziła, podobnie jak w ekstraktach komórkowych, z włączeniem tylko jednej zasady (DIANOV i LINDAHL 1994).

W komórkach ludzkich występuje tylko jedna AP-endonukleaza — HAP1, która katalizuje nacięcie wiązania fosfodwuestrowego wyłącznie po 5' stronie miejsca AP, pozostawiając na końcu 5' fosforan dezoksyrybozy i 3'OH. HAP1 wykazuje duże podobieństwo do głównej AP-endonukleazy *E. coli* — białka Xth.

W przypadku komórek ludzkich, wypełnienie luki zachodzi z udziałem polimerazy DNA β i też włączany jest tylko jeden nukleotyd (DIANOV i współaut. 1992, WIEBAUR i JIRICNY 1990). Polimeraza DNA β spełnia też funkcję dRPazy usuwając resztę fosfocukrową z naciętego miejsca AP. Chociaż polimeraza ta wstawia głównie jeden nukleotyd, to może włączyć także dwa lub trzy, a także powodować odsunięcie nici, wydłużając nowosyntetyzowany fragment. Temu przeciwdziała obecność białka XRCC1, które pełni funkcje molekularnego łącznika (ang. molecular matchmaker). Jak wykazali KUBOTA i współaut. (1996) na N'-końcu białka XRCC1 znajduje się region wiążący polimerazę β , a do końca karboksylowego wiąże się DNA ligaza III. Utworzenie takiego potrójnego kompleksu prze-

ciwdziała tworzeniu dłuższych niż jeden nukleotyd łańcuchów naprawczych, prawdopodobnie dzięki skoordynowanemu działaniu polimerazy DNA β i ligazy. Dłuższe łańcuchy, zdarzające się rzadko w naprawie BER, mogą powstawać także z udziałem polimerazy DNA PCNA-zależnych δ i ϵ (FRROSINA i współaut. 1996).

W badaniach nad mechanizmem BER w komórkach ludzkich odtworzono cały proces naprawy *in vitro* z oczyszczonymi enzymami i uznano, że w procesie tym, podobnie jak u *E. coli*, uczestniczą białka: specyficzna DNA-glikozylaza, AP-endonukleaza, polimeraza DNA β i ligaza (DEMPLE i HARRISON 1994, DIANOV i LINDAHL 1994, KUBOTA i współaut. 1996).

Ostatnio pojawiły się doniesienia o udziale w BER, zwłaszcza przy usuwaniu uszkodzeń oksydacyjnych, niektórych białek uczestniczą-

cych w naprawie przez wycinanie nukleotydów (NER). Wykazano, że białko XPG, które w NER pełni funkcję endonukleazy nacinającej po stronie 3' uszkodzenia (patrz niżej), w naprawie uszkodzeń oksydacyjnych stymuluje wiązanie DNA glikozylazy hNth1 do DNA zawierającego glikol tyminy (KLUNGLAND i współaut. 1999). Według autorów, XPG może zmieniać konformację DNA w miejscu uszkodzenia, co ułatwiłoby, przez ekspozycję zmienionej zasady, wiązanie się DNA glikozylazy hNth1. Białko XPA również okazało się niezbędne do naprawy zasad zmodyfikowanych przez oksydację zasad (LIPIŃSKI i współaut. 1999). Autorzy sądzą, że XPA może działać na wczesnym etapie BER, zwiększając powinowactwo DNA-glikozylaz do oksydacyjnych uszkodzeń DNA.

NAPRAWA PRZEZ WYCINANIE NUKLEOTYDÓW (NER)

W odróżnieniu od BER, NER jest procesem naprawy bardziej złożonym, wymaga większej liczby białek oraz ATP, jako źródła energii (SANCAR 1996, SANCAR i współaut. 1996, WOOD 1996). Ponadto, NER wykazuje małą specyficzność wobec typu uszkodzenia i może usuwać z dwuniciowego DNA zarówno fotodimery pirymidyn, jak i addukty o różnej wielkości podstawnika oraz większość uszkodzeń DNA, które są usuwane na drodze BER (SELBY i SANCAR, 1990). Uszkodzenia DNA w procesie NER są usuwane w formie oligonukleotydu o długości 12–13 nukleotydów u bakterii i 27–29 nukleotydów w komórkach eukariotycznych. Uszkodzone nukleotydy są usuwane przez nukleazę wycinającą, która nacina nić DNA po obu stronach uszkodzenia.

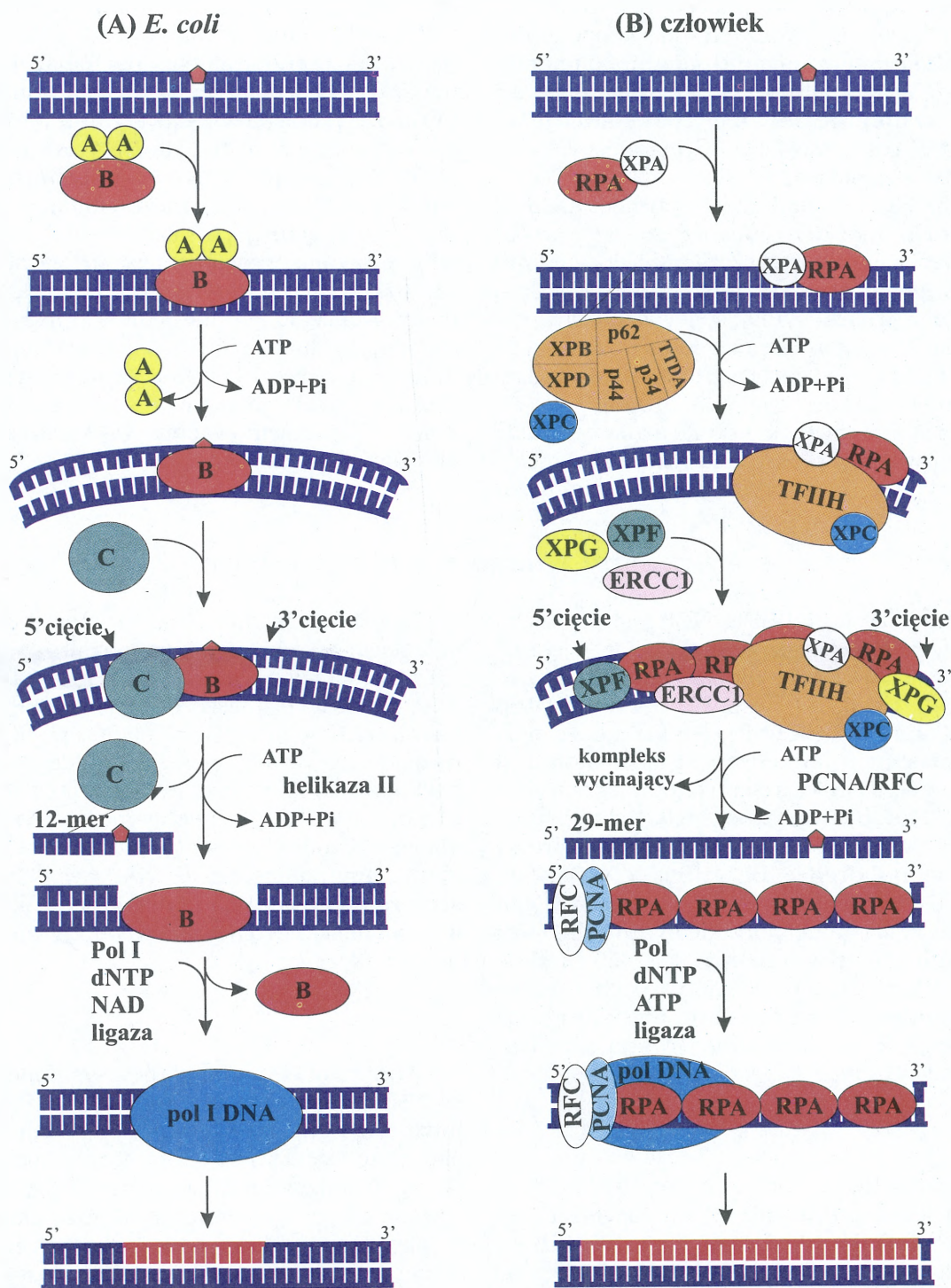
NER U *E. COLI*

W przypadku *E. coli* kompleks UvrABC robi dwa nacięcia: po stronie 3' w odległości 3–4 nukleotydów od uszkodzenia, a po stronie 5' — 7 nukleotydów. Reakcja wycięcia uszkodzenia, zarówno w komórkach *E. coli*, jak i ludzkich, jest wieloetapowa i wymaga ATP. U *E. coli* proces naprawy rozpoczyna UvrABC endonukleaza składająca się z 3 podjednostek: UvrA, UvrB i UvrC (Ryc. 2A). Dwie cząsteczki białka UvrA tworzą kompleks z jedną cząsteczką UvrB. Kompleks UvrA₂UvrB wiąże się z DNA i w reakcji zależnej od ATP powoduje zgięcie DNA o 130°. Następnie UvrA₂ oddysocjowuje, pozostawiając stabilny kompleks UvrB-DNA. Białko UvrC rozpoznaje ten kompleks i przyłącza się, powodując konformacyjną zmianę kompleksu

co umożliwia białku UvrB zrobienie cięcia w odległości 4 nukleotydów po 3' stronie uszkodzenia. Reakcja wymaga związania przez UvrB ATP, które nie jest jeszcze na tym etapie hydrolizowane. Następnie UvrC nacina po stronie 5' uszkodzenia w odległości 7 nukleotydów od uszkodzenia. Przyłączenie się UvrD (helikazy II) uwalnia UvrC i wycięty oligomer, a UvrB pozostaje związany z powstałą luką w DNA do momentu gdy polimeraza I DNA ją wypełni przez syntezę naprawczą na matrycy nieuszkodzonej w tym miejscu drugiej nici DNA. Ligaza kończy proces naprawy.

NER W KOMÓRKACH LUDZKICH

Z brakiem i zaburzeniami w systemie naprawy NER związane są trzy choroby dziedziczne u ludzi. Są nimi: *xeroderma pigmentosum* (XP), syndrom Cockayne'a (CS) i trichotiodystrofia (TTD). Ciierpiący na XP wykazują dużą nadwrażliwość na światło słoneczne i dużą skłonność do nowotworów skóry, a niektórzy pacjenci także zaburzenia neurologiczne (CLEAVER i KRAEMER 1989). Pacjenci z CS, oprócz nadwrażliwości na światło, wykazują poważne opóźnienie rozwoju umysłowego. Defekt w naprawie w przypadku CS jest mniejszy niż w XP i wydaje się być ograniczony do naprawy uszkodzeń tylko w nici transkrybowanej aktywnych genów, a ogólna naprawa DNA zachodzi u pacjentów z CS normalnie. Pacjenci z TTD wykazują łamliwość włosów, zmiany skórne (rybia łuska), zaburzenia rozwoju szkieletu i opóźnienia rozwoju umysłowego. Jest to choroba związana z mutacjami w genach: *TTD-A*, *XPB* i *XPD*. Produkty genów:



Ryc. 2. Molekularny mechanizm naprawy DNA przez wycinanie nukleotydów u *E. coli* (A) i u człowieka (B) (według SANCARA 1994b i LEHMANN 1995).

(A) U *E. coli* kompleks UvrA₂B rozpoznaje uszkodzenie na DNA i przyłącza się do niego co powoduje zgięcie DNA o 130°. UvrA₂ oddysocjowuje, a białko UvrC rozpoznaje kompleks DNA-UvrB i łączy się z nim, powodując konformacyjną zmianę, co umożliwia białku UvrB cięcie po 3' stronie uszkodzenia. UvrC nacina DNA po 5' stronie uszkodzenia, a po przyłączeniu helikazy II (UvrD), oddysocjowuje wraz z wyciętym oligomerem. Do DNA z luką przyłącza się polimeraza I DNA i dosyntetyzuje brakujący fragment.

(B) W komórkach ludzkich rozpoznania uszkodzenia dokonuje kompleks XPA-RPA. Do kompleksu RPA-XPA-DNA dołącza się TFIIH. Powoduje to zmianę konformacji DNA. Następnie dołączane są ERCC1, XPF i XPG, które wraz z TFIIH stanowią kompleks wycinający. HPF tnie po 5' stronie uszkodzenia, a XPG po 3' stronie. Po wycięciu oligomeru z uszkodzoną zasadą oddysocjowuje kompleks wycinający, a pozostaje tylko białko RPA, wypełniające całą lukę. Do niego przyłączają się białka pomocnicze RFC i PCNA oraz polimeraza DNA, która dobudowuje brakujący fragment.

XPB i XPD są podjednostkami czynnika transkrypcyjnego TFIIH, uczestniczącego w NER (patrz niżej). Oprócz zaburzeń w NER, TTD powoduje także zaburzenia procesu transkrypcyjnego. Wśród pacjentów XP znanych jest 7 genetycznych grup komplementacyjnych oznaczonych literami od XPA do XPG. W XP defekt dotyczy pierwszego etapu NER, to jest rozpoznania uszkodzenia i tworzenia kompleksu wycinającego uszkodzenie. Poznanie mechanizmu NER u ludzi stało się możliwe dzięki izolacji UV-wrażliwych mutantów w komórkach gryzoni, sklasyfikowanych w 11 grup komplementacyjnych. Następnie zidentyfikowano i sklonowano 11 genów ludzkich, których produkty mogły korygować defekty NER jedenastu UV-wrażliwych mutantów komórek gryzoni. Geny te nazwano *ERCC 1-11* (ang. excision repair cross complementing). Niektóre z tych genów okazały się być genami *XP*. I tak *ERCC 3* odpowiada genowi *XPB*, *ERCC 2* — *XPD*, *ERCC 5* — *XPG*, *ERCC 4* — *XPF* (MA i współaut. 1995, SANCAR 1996).

W komórkach ludzkich NER jest inicjowany (Ryc. 2B) przez wiązanie się kompleksu białek XPA-RPA do DNA zawierającego uszkodzenie (MU i współaut. 1995). RPA (ludzkie białko wiążące się do ssDNA) jest także niezbędne w eta-

pach nacinania i syntezy naprawczej. Do kompleksu XPA-RPA-DNA przyłącza się czynnik transkrypcyjny TFIIH składający się przynajmniej z sześciu podjednostek, wśród których są XPB (helikaza 3'→5') i XPD (helikaza 5'→3'). Powoduje to rozwinięcie DNA i przygotowanie do nacięcia po obu stronach uszkodzenia przez XPG, które jest wiązane przez RPA i TFIIH do uszkodzenia i dokonuje cięcia po stronie 3' w odległości 3–5 nukleotydów od uszkodzenia. To nacięcie powoduje zmiany konformacyjne pozwalające na dołączenie kompleksu XPF-ERCC1, aby XPF mogło dokonać nacięcia po stronie 5' w odległości 20–24 nukleotydów od uszkodzenia. Przyłączenie kompleksu XPF-ERCC1 zachodzi z udziałem XPA i TFIIH. *In vivo*, prawdopodobnie oba nacięcia przebiegają jednocześnie i są ściśle powiązane. Kompleks nacinający oddysocjuje przy udziale białek pomocniczych polimeraz DNA ϵ i δ — RFC i PCNA. Na wolny koniec 3'OH białko RFC nakłada białko PCNA, które pełni funkcje klamry ułatwiającej wiązanie się do DNA polimeraz ϵ lub δ . Wypełnienie luki powstałej po wycięciu oligonukleotydu może dokonać jedna z dwóch polimeraz DNA ϵ lub δ . Jednak nowsze badania wykazują, że tylko DNA polimeraza ϵ daje dosyntetyzowany fragment, który może być połączony

Tabela 2. Białka uczestniczące w systemie naprawy NER w komórkach ludzkich

Białka	Podjednostki	Charakterystyczny motyw w sekwencji	Aktywność	Rola w naprawie
PODJDENOSTKI NUKLEAZY WYCINAJĄCEJ				
I. XPA	XPA	palec cynkowy	wiązanie się do DNA	rozpoznanie uszkodzenia
II. RPA	p70 p34 p11		wiązanie się do ssDNA	rozpoznanie uszkodzenia
III. TFIIH	XPB	helikaza	ATPaza DNA-zależna	formowanie kompleksu wycinającego powiązany z naprawą
	XPD p62 p44 Cdk7 CycH p34	helikaza palec cynkowy kinaza Ser/Tyr cyklina palec cynkowy	helikaza GTF CAK	
IV. XPC	XPC HHR23B		łączenie się z DNA	stabilizacja kompleksu wycinającego
V. XPF	XPF ERCC1		nukleolityczna	5'-cięcie
VI. XPG	XPG		nukleolityczna	3'-cięcie
BIAŁKA SYNTEZY NAPRAWCZEJ				
I. RFC	RFC	ATPaza	ATPaza	łącznik molekularny
II. PCNA	PCNA			klamra polimeraz DNA
III. RPA	RPA			wiązanie się do ssDNA
IV. Pol	ϵ , (δ)	polimeraza	replikacyjna	synteza naprawcza
V. Ligaza				ligacja

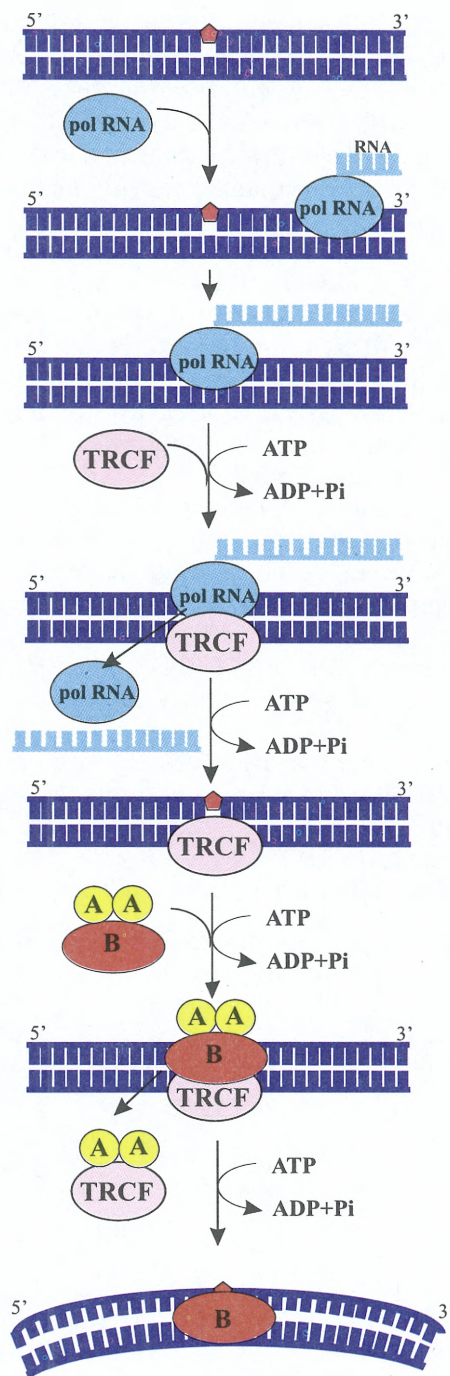
przez ligazę. Ligaza kończy proces. Może w tym uczestniczyć każda z czterech ligaz występujących w ludzkich komórkach.

Informacje o przebiegu NER w komórkach ludzkich pochodzą głównie z badań *in vitro* (WOOD 1996). Biorąc pod uwagę stopień skomplikowania genomu ludzkiego jest bardzo prawdopodobne, że liczba białek uczestniczących w NER jest wyższa, niż 26 obecnie uznawanych za wystarczającą (Tabela 2).

NAPRAWA PRZEZ WYCINANIE NER ZWIĄZANA Z TRANSKRYPCJĄ — TCR

Pierwsze doniesienie o powiązaniu naprawy przez wycinanie NER z transkrypcji pochodzą z obserwacji grupy Hanawalta, w których wykazano, że w komórkach chomika CHO fotodimery pirymidyn były 5 razy szybciej usuwane w aktywnym genie DHFR z transkrybowanej nici DNA, w porównaniu z nicią nietranskrybowaną (MELLON i współaut. 1987). Następnie wykazano, że jest to zjawisko powszechnie występujące w różnych genach, zarówno w komórkach eukariotycznych, jak i prokariotycznych i dotyczy różnych typów uszkodzeń. Powiązanie transkrypcji z NER wyjaśniono kiedy SELBY i SANCAR (1991a, b) oczyścili z komórek *E. coli* białko TRCF (ang. transcription repair coupling factor), które, jak pokazali w badaniach *in vitro*, w obecności UvrABC endonukleazy, podwyższało 5-krotnie szybkość transkrypcji matrycy zawierającej uszkodzenie. Białko TRCF ma niską aktywność DNA-niezależnej ATP-azy. Jeden z regionów białka ma zdolność wiązania się z DNA a drugi, bliżej końca N', wykazuje dużą homologię do regionu białka UvrA odpowiedzialnego za wiązanie UvrB (SELBY i SANCAR 1995). Oczyszczony TRCF specyficznie oddziaływał z polimerazą RNA *E. coli*, zahamowaną w miejscu uszkodzenia, powodując dysocjację potrójnego kompleksu mRNA-DNA-polimeraza RNA (Ryc. 3). Na podstawie badań *in vitro* z oczyszczonym białkiem TRCF (kodowanym przez gen *mfd*) uważa się, że przyłącza się ono do zatrzymanej przez uszkodzenie polimerazy RNA i uwalnia ją oraz niedokończony transkrypt z matrycy DNA. Następnie TRCF, przez wiązanie się za pośrednictwem UvrA, przyłącza kompleks UvrA₂B do uszkodzonego miejsca i po utworzeniu stabilnego kompleksu UvrB-DNA, który inicjuje proces wycinania uszkodzenia, oddysocjowuje wraz z UvrA. TRCF ułatwia więc inicjację procesu NER (SELBY i SANCAR 1994).

W komórkach ludzkich, podobnie jak i u bakterii, transkrybowane DNA jest szybciej naprawiane niż nietranskrybowane i odnosi się to głównie do nici, która służy jako matryca i



Ryc. 3. Molekularny mechanizm preferencyjnej naprawy nici transkrybowanej u *E. coli* (według SELBEGO i SANCARA 1994, 1995).

Polimeraza RNA jest zahamowana przez uszkodzenie na transkrybowanej nici DNA. Białko TRCF wiąże się do kompleksu mRNA-DNA-polimeraza RNA, powodując dysocjację polimerazy i transkryptu oraz wiązanie kompleksu białek UvrA₂B do uszkodzonego miejsca. Po utworzeniu stabilnego kompleksu UvrB-DNA, TRCF i UvrA₂ oddysocjowują i następuje inicjacja i dalsze etapy NER (Ryc. 2A).

dotyczy tylko genów transkrybowanych przez polimerazę II RNA. Uszkodzenie DNA w transkrybowanej nici blokuje transkrypcję (DONAHUE

i współaut. 1994). Mechanizm naprawy związanej z transkrypcją — TRC (ang. transcription repair coupling) nie jest jeszcze do końca poznany. Wiadomo, że w usuwaniu zahamowanej na uszkodzeniu polimerazy II RNA oraz przyłączeniu do uszkodzonego miejsca, uczestniczą przynajmniej dwa białka: CSA i CSB. Należą one do grupy pięciu białek, których brak aktywności powoduje, wspomnianą już wcześniej, dziedziczną chorobę — syndrom Cockayne'a, charakteryzującą się zwiększoną wrażliwością na światło i poważnym opóźnieniem w rozwoju fizycznym i umysłowym. Białko CSA (46 kDa) zawiera motyw, który może uczestniczyć w interakcji z innymi białkami. Natomiast CSB jest znacznie większym białkiem (160 kDa) z motywem helikazy i najprawdopodobniej jego funkcje są podobne do czynnika TRCF z *E. coli*. Białko CSB wiąże się do CSA oraz białek XPA i TFIIH, które są podjednostkami ludzkiej nukle-

azy rozpoznającej uszkodzenie (HENNING i współaut. 1995). Na podstawie właściwości białek CSA i CSB oraz znajomości transkrypcji z udziałem polimerazy II RNA, w komórkach ludzkich zaproponowano model naprawy związanej z transkrypcją (TRC). Polimeraza II RNA zatrzymana w miejscu uszkodzenia jest rozpoznawana przez kompleks CSA-CSB, który prawdopodobnie przy pomocy czynnika transkrypcyjnego TFIIIS cofa polimerazę. Kompleks CSA-CSB wiąże także białko XPA i czynnik transkrypcyjny TFIIH co przyspiesza szybkość tworzenia się kompleksu inicjującego NER. Po naprawie wraca polimeraza II RNA i kontynuuje syntezę wcześniej rozpoczętego mRNA. W przypadku komórek ludzkich podczas naprawy transkrybowanego genu, polimeraza RNA jest raczej odsuwana, a nie oddysocjuje z uszkodzonego miejsca, tak jak w przypadku *E. coli*.

MECHANIZMY POWSTAWANIA MUTACJI

Badania nad *E. coli* wykazały, że większość mutacji indukowanych pod wpływem promieni UV i czynników chemicznych zachodzi z udziałem systemu SOS i jest to tak zwana SOS-mutagenеза. System SOS reguluje także większość mechanizmów naprawy: NER (geny *uvrABD*), naprawę rekombinacyjną (geny *recN* i *uvrD*),

wznowienie replikacji DNA i tym podobne (FRIEDBERG i współaut. 1995).

Regulacja systemu SOS zachodzi z udziałem dwóch białek: LexA i RecA. LexA jest represorem ponad 20 genów indukowanych po uszkodzeniu DNA (Tabela 3). RecA pod wpływem uszkodzenia DNA jest aktywowane do formy RecA*

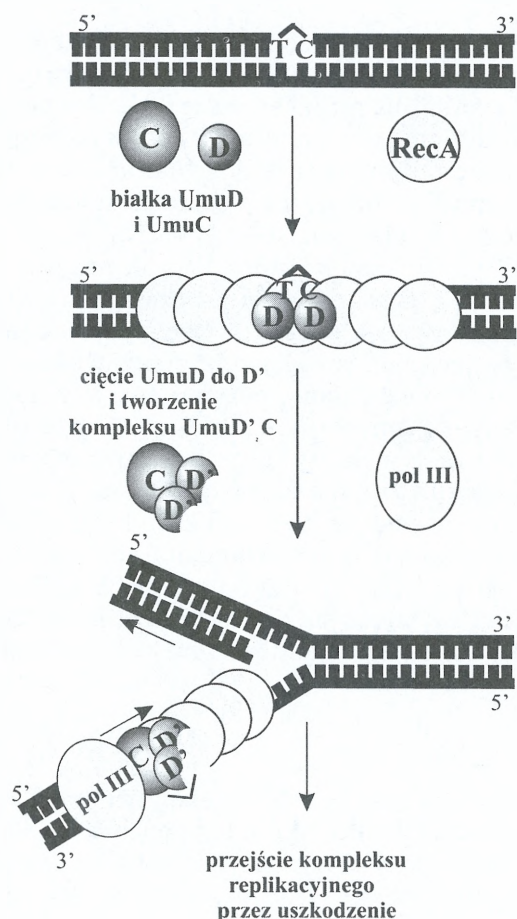
Tabela 3. Geny regulonu SOS i ich funkcje

Gen	Pozycja na mapie (min)	Funkcja produktu genu
<i>recA</i>	58	regulacja systemu SOS, cięcie represorów LexA i CI faga λ oraz białka UmuD, mutagenеза SOS, reperacja DNA, stabilna replikacja, rekombinacja
<i>lexA</i>	92	represor genów SOS
<i>umuDC</i>	26	SOS mutagenеза
<i>sulA</i> (<i>sfiA</i>)	22	inhibitor podziałów komórkowych
<i>uvrA</i>	92	naprawa przez wycinanie
<i>uvrB</i>	18	naprawa przez wycinanie
<i>uvrD</i>	85	DNA helikaza II, naprawa DNA, rekombinacja RecF zależna
<i>ruwA, B</i>	41	rekombinacja RecF zależna, naprawa pęknięć w siostrzanych niciach
<i>recN</i>	58	rekombinacja RecF zależna, naprawa pęknięć w siostrzanych niciach
<i>recQ</i>	85	rekombinacja RecF zależna
<i>himA</i>	37	miejscowo swoista rekombinacja
<i>dinA</i> (<i>polB</i>)	2	polimeraza II DNA
<i>dinB</i> (<i>dinP</i>)	8	polimeraza IV DNA
<i>dinD</i> (<i>pscA</i>)	82	filamentacja w 20°C
<i>dinF</i>	92	nieznana
<i>dinG</i>	17,8	helikaza (?)
<i>dinH</i>	19,8	nieznana
<i>dinJ</i>	24	inhibitor indukcji systemu SOS
<i>mucAB</i> (plazmid pKM101)		mutagenеза SOS

koproteazy, która wspomaga niszczenie represora LexA i w konsekwencji derepresję genów związanych z naprawą DNA. Aktywacja RecA do formy RecA* zachodzi przez wiązanie się białka RecA w obecności ATP, do ssDNA, najprawdopodobniej w widelkach replikacyjnych zatrzymanych przez uszkodzenie. Na ssDNA tworzy się kompleks nukleoproteinowy RecA-ssDNA, do którego przyłącza się LexA. W wyniku interakcji RecA z LexA następuje cięcie LexA represora (między Ala₈₄ — Gly₈₅), co powoduje zwiększoną ekspresję genów i operonów kontrolowanych przez SOS regulon. RecA* nie działa tutaj jako proteaza, ale stymuluje autotrawienie LexA. (LITTLE 1993). Proces SOS-mutagenazy wymaga uszkodzenia DNA oraz aktywności białek RecA*, UmuD i UmuC. RecA* koproteaza pełni trzy funkcje. Powoduje (1) derepresję genów *umuD* i *umuC* przez cięcie LexA, (2) przycina białko UmuD do formy UmuD', aktywnej w procesie mutagenazy; (3) funkcja trzecia RecA* wiadomo, że jest konieczna, ale najmniej poznana (FRIEDBERG i współaut. 1995). Ponieważ RecA* ma zdolność reagowania z białkami Umu, RecA*, mogłaby więc pełnić rolę transportera w dostarczaniu ich do miejsca uszkodzenia (FRANK i współaut. 1993). Funkcje białek UmuD(D') i UmuC, mimo wieloletnich badań, nie są do końca poznane. Zgodnie z powszechnie przyjmowaną hipotezą syntezy przez uszkodzenie (ang. translesion synthesis) (Ryc. 4), białka te modyfikują, zatrzymaną przy uszkodzeniu, holoenzym polimerazy III DNA w sposób, który pozwala na replikację uszkodzonego DNA, ale kosztem wierności tego procesu, co prowadzi do powstania mutacji (FRIEDBERG i współaut. 1995, WALKER 1995).

Grupa Echolsa pracując z wyizolowanymi białkami *in vitro* jako pierwsza wykazała, że synteza przez uszkodzenie AP miejsca wymaga oprócz holoenzymu polimerazy III DNA, aktywnej formy UmuD' oraz UmuC i RecA (RAJAGOPALAN i współaut. 1992). Jednakże na wyjaśnienie funkcji białek UmuD' i UmuC trzeba było czekać jeszcze kilka lat. Przyczyną był fakt, iż nie można było izolować białka UmuC w formie natywnej. Izolowano go więc w formie zdenaturowanej i w małych ilościach, co praktycznie uniemożliwiało badania *in vitro* nad tymi białkami. UmuC w komórce nienaświetlonej UV jest prawie niewykrywalne, a po indukcji UV wzrasta do 200 cząsteczek na komórkę. Natomiast UmuD w komórce jest stale w liczbie 200 cząsteczek, a po indukcji wzrasta do 2400 (WODGATE i ENNIS 1991).

Pytanie jaki jest molekularny mechanizm SOS-mutagenazy i jaką funkcję pełnią białka UmuD i C nurtowało i nurtuje badaczy do



Ryc. 4. Model syntezy przez uszkodzenie zaproponowany przez ECHOLSA i GOODMANA (według ECHOLSA i GOODMANA 1990).

Białko RecA wiąże się do DNA i tworzy nukleoproteinowy filament w miejscu uszkodzenia. UmuD jest cięte w miejscu uszkodzenia przez RecA*-koproteazę i razem z białkiem UmuC tworzy kompleks, który umożliwia polimerazie III DNA przejście przez uszkodzenie.

dzisiaj. Ważnym elementem jest wyjaśnienie w jaki sposób polimeraza III DNA, zazwyczaj bardzo dokładna i nie tolerująca nawet małych zmian w DNA może działać na uszkodzonej matrycy. Również ważne jest wyjaśnienie wpływu białek UmuD'C na polimerazę III DNA podczas syntezy uszkodzonego DNA. Ostatnio dzięki izolacji białek UmuD' i C w kompleksie UmuD'2C, takim jaki uczestniczy w mutagenезie, udało się grupie Goodman'a otrzymać te białka w formie natywnej (BRUK i współaut. 1996). Przyczyniło się to do poznania aktywności tych białek. Rewelacją stały się wyniki TANGA i współaut. (1998, 1999) wskazujące, że kompleks UmuD'2C posiada aktywność specjalnej polimerazy DNA. WALKER (1998) oraz FRIEDBERG i GERLACH (1999) omawiają to zagadnienie w krótkich komentarzach. TANG i współaut. (1998) wykazali używając jako substratu jednoniciowego DNA (ssDNA) ze starterem, które zawierało jedno miejsce AP, że holoenzym poli-

merazy III DNA, do syntezy przez uszkodzenie wymaga aktywnej formy białka RecA*, SSB (białko wiążące się do ssDNA) i kompleksu UmuD'2C. Niespodziewanie okazało się, że oczyszczony kompleks UmuD'2C może także katalizować niski poziom syntezy w miejscu AP bez udziału polimerazy III. Wskazuje to, że UmuD'2C ma cechy szczególnej polimerazy DNA, nazwano ją polimerazą V DNA. UmuD'2C może także włączać nukleotydy, gdy w matrycy zamiast miejsca AP jest prawidłowa zasada — tymina. Wykazano, że w obecności czterech dezoksynukleotydów każdy z nich mógł być włączany, co wskazuje, że kompleks UmuD'2C może tworzyć błędne pary. Ponadto obserwowano, że utworzenie błędnej pary nie hamuje włączania następnych kilku nukleotydów. (TANG i współaut. 1999) uważają, że ważną cechą kompleksu UmuD'2C jest jego zdolność do stymulowania zarówno błędnej inkorporacji, jak i do dalszej syntezy za błędną parą, zarówno na uszkodzonej, jak i normalnej matrycy.

Ostatnio wykazano, że w komórkach *E. coli* istnieje jeszcze jedna nowa polimeraza DNA, polimeraza IV, która jest produktem genu *dinB* (Tabela 3). Białko DinB wykazuje sekwencję aminokwasową podobną do białka UmuC (OHMORI i współaut. 1995), a jego nadprodukcja powoduje bardzo wysoką mutagenезę plazmidu F'lac, nie traktowanego żadnym czynnikiem uszkodzającym DNA, tak zwaną SOS-zależną mutagenезę spontaniczną (KIM i współaut. 1997). Oczyszczone białko DinB okazało się być polimerazą DNA bez korektorskiej aktywności 3'→5' egzonukleazy. Polimeraza ta włącza tylko jeden nukleotyd podczas każdego przyłączenia się do primera i katalizuje prawidłową inkorporację nukleotydu (WAGNER i współaut. 1999).

Podobny mechanizm mutagenезy replikacji przez uszkodzenie postuluje się u eukariotycz-

nych organizmów wyższych, z ludzkimi włącznie (FRIEDBERG i GERLACH 1999). W komórkach drożdży wykryto białko Rev1, które ma aktywność enzymatyczną inkorporującą dCMP *vis a vis* miejsca AP, a także naprzeciwno adeniny, uracylu i guaniny (NELSON i współaut. 1996). Białko Rev1 wykazuje znaczne podobieństwo w sekwencji aminokwasów, do białka UmuC z *E. coli* i jest potrzebne w UV-indukowanej mutagenезie (LARIMER i współaut. 1989). Inkorporacja cytozyny naprzeciwno miejsca AP przez Rev1, pozwoliła na wydłużanie primera przez inną polimerazę DNA ξ , która jest także potrzebna w mutagenезie drożdży. Ostatnio wykryto jeszcze jedną polimerazę DNA η , kodowana przez gen *RAD30*, w której także sekwencja aminokwasów jest podobna do białka UmuC i DinB (MCDONALD i współaut. 1997, ROUSH i współaut. 1998).

Co ciekawe, w komórkach ludzkich wykryto polimerazę DNA bardzo podobną do polimerazy η u drożdży. Polimeraza ta jest zmutowana w komórkach ludzi ze schorzeniem *xeroderma pigmentosum*, sklasyfikowanych jako grupa XPV (ang. XP variant) (MASUTANI i współaut. 1999, JOHANSON i współaut. 1999a). Komórki XPV wykazują normalny poziom NER, natomiast mają defekt w replikacji uszkodzonego DNA. Polimeraza DNA η z obu źródeł wykazuje zdolność do bezbłędnej replikacji DNA przez fotodimery pirymidyn w DNA (JOHANSON i współaut. 1999b). Jest natomiast bardzo prawdopodobne, że może wstawiać błędne zasady przy syntezie przez 6,4-fotoprodukty (MCDONALD i współaut. 1999). Wykrycie nowych polimeraz DNA zdolnych do syntezy przez uszkodzenie, zbliża nas do pełniejszego zrozumienia procesu mutagenезy, a ponadto wskazuje, że mechanizmy mutagenезy mogą być w dużej mierze podobne u bakterii i u człowieka.

NAPRAWA BŁĘDNIIE SPAROWANYCH ZASAD

Wierność polimeraz DNA jest dość ograniczona i w wyniku replikacji powstaje wiele błędnych par zasad, które mogą być usuwane z nowosyntetyzowanej nici DNA (MODRICH i LAHUE 1996). Mechanizm naprawy błędnie sparowanych zasad (ang. mismatch repair) został dość dobrze poznany w komórkach *E. coli*. Normalnie, DNA w *E. coli* jest zmetylowane w sekwencjach GATC przez metylazę Dam. Po replikacji nić potomna DNA jest przejściowo niezmetylowana i może być rozpoznana przez system naprawy błędnych par zasad — MutHLS. Białko MutS, rozpoznaje i wiąże się w miejscu błędnej pary zasad. MutH wiąże się do hemimetylowa-

nej sekwencji GATC i robi nacięcie nici niezmetylowanej, poczym następuje etap wycinania i resyntezy do miejsca występowania błędnej pary, do którego są przyłączone białka: MutS — rozpoznające błędną parę oraz MutL, które indukuje nukleolityczną aktywność mutH. Ponadto w naprawie uczestniczą białka UvrD-helikaza, egzonukleaza aktywna wobec ssDNA, białko SSB (wiążące się do ssDNA) oraz polimeraza III DNA i ligaza. Ostatnio wykazano istnienie systemu naprawy błędnych par zasad u człowieka, który jest podobny do systemu MutHLS. Wyizolowano ludzkie białka, które są homologami białek MutL i MutS. Ten system

naprawy cieszy się obecnie bardzo dużym zainteresowaniem, ponieważ wykazano zależność pomiędzy defektem w naprawie błędnych par zasad a skłonnością do nowotworów. Pierwsze doniesienia dotyczyły nowotworu jelita grubego, a obecnie wykazano związek pomiędzy defe-

ktem w naprawie błędnie sparowanych zasad a zwiększonym ryzykiem choroby nowotworowej, także dla innych typów nowotworów. Obszernej to zagadnienie jest omówione w artykule P. POLACZKA w tym numerze KOSMOSU.

REGULACJA PROCESÓW NAPRAWY

Czynniki uszkadzające DNA powodują w komórce szereg odpowiedzi, wśród nich zmiany w ekspresji genów, opóźnienie cyklu komórkowego i stymulację naprawy DNA. U człowieka i innych organizmach wyższych mogą także aktywować apoptozę — programowaną śmierć komórki.

REGULACJA W KOMÓRKACH *E. COLI*

W komórkach *E. coli* odpowiedź na wiele różnorodnych uszkodzeń DNA jest regulowana przez system SOS. Regulacja polega na tym, że ponad 20 genów (Tabela 3) związanych z uszkodzeniami i naprawą DNA ma wspólny represor LexA. W reakcji na uszkodzenie DNA, aktywowane jest białko RecA do formy RecA*-koproteazy (patrz wyżej), która stymuluje niszczenie represora LexA przez cięcie wiązania w środku białka pomiędzy Ala84-Gln85, co prowadzi do derepresji i transkrypcji tych genów. O kolejności derepresji genów i indukcji odpowiednich białek decyduje siła wiązania represora do operatorów poszczególnych genów czy operonów. Najniższe powinowactwo LexA wykazuje wobec genów związanych z naprawą przez wycinanie nukleotydów *uvrD>uvrA>uvrB*. Wśród genów regulowanych przez SOS znajduje się gen *suIA* (*sfiA*), który jest inhibitorem podziałów komórkowych. Zahamowanie replikacji, jak i podziałów komórkowych ma na celu umożliwienie naprawy DNA przed replikacją uszkodzonego DNA, co w przeciwnym wypadku prowadziłoby do mutacji oraz do przekazania do komórek potomnych nieprawidłowego DNA. Powszechnie uważa się, że wygaszenie systemu SOS po naprawie DNA zachodzi, gdy znikają fragmenty ssDNA, które aktywowały RecA*-koproteazę. Powoduje to nagromadzenie represora LexA i zahamowanie transkrypcji genów związanych z naprawą (FRIEDBERG i współaut. 1995). Jednakże ostatnio znaleziono dwa geny, *dinI* (YASUDA i współaut. 1998) i *isfA* (BĘBENEK i PIETRZYKOWSKA 1995, 1996), których produkty hamują indukcję SOS. Najprawdopodobniej, ich funkcją jest wygaszanie systemu SOS po zakończonej naprawie poprzez hamowanie aktywności

RecA*-koproteazy (BĘBENEK i PIETRZYKOWSKA 1996).

REGULACJA W KOMÓRKACH LUDZKICH

Białko p53 jest najlepiej poznanym regulatorem odpowiedzi na uszkodzenie DNA w komórkach ssaków i człowieka, a uczestniczy w regulacji odpowiedzi komórki na różne czynniki uszkadzające DNA. p53 aktywuje transkrypcję w odpowiedzi na wiele czynników uszkadzających. Aktywacja białka p53 prowadzi do zwiększenia poziomu białka p53, a także modyfikacji samego białka p53. Aktywowany p53 powoduje zwiększenie ekspresji inhibitora cyklinozależnych kinaz białkowych, białka p21, co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 i pozwala na naprawę DNA przed przejściem do fazy S, w której zachodzi synteza DNA. p53 reguluje także cykl komórkowy w fazie G2. Jest to ważny punkt kontrolny przed segregacją chromosomów do komórek potomnych. Białko p53 decyduje także o reakcji komórek na uszkodzenie poprzez aktywację transkrypcji odpowiednich genów. Przy niższym poziomie uszkodzeń odpowiedzią może być naprawa DNA. Wtedy p53 aktywuje gen *GADD45*. Wyższe dawki czynników uszkadzających DNA wywołują apoptozę. Proces ten uruchomiany jest przez aktywację genu *BAX*, którego produkt jest pozytywnym regulatorem apoptozy (ENOCH i NORBURY 1995). O ważnej roli jaką odgrywa p53 w regulacji odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA, świadczy fakt, że brak aktywności tego białka wiąże się ze zwiększoną zapadalnością na nowotwory. W 50% przypadków chorób nowotwowych u ludzi, gen p53 jest zmutowany. Białko p53 nazwano supresorem nowotworów (ang. tumor suppressor protein).

Innym białkiem, które odgrywa istotną rolę w regulacji odpowiedzi na uszkodzenie, jest białko ATM. Gen kodujący ATM jest zmutowany w komórkach ludzi cierpiących na chorobę genetyczną *ataxia telangiectasia* (AT). Pacjenci cierpiący na AT wykazują różne objawy, wśród nich takie jak: degeneracja neuronów, zwiększona częstość zapadania na białaczkę i bez-

plodność. Są też nadwrażliwi na promienie X i jonizujące, które indukują pęknięcia łańcuchów DNA. Okazało się, że brak aktywności ATM prowadzi do defektu w punktach kontrol-

nych cyklu komórkowego, które są istotne w regulacji odpowiedzi komórki na promieniowanie jonizujące (WANG 1998).

MECHANISMS OF DNA REPAIR IN BACTERIA AND IN HUMANS

Summary

The mechanisms of DNA repair and generation of mutations in the living organisms are subject of great interest since long time. However, during the last decade, significant progress in understanding of these processes became possible due to development of sophisticated methods of molecular biology. Most proteins involved in DNA repair were isolated and investigated by both biochemical and physical methods. In this review recent understanding of

the mechanism of DNA repair is presented. The mechanisms of excision repair of bases (BER) and nucleotides (NER) as well as mutagenic repair in *Escherichia coli*, a model system, and in human cells are described. The most exciting recent findings of a special DNA polymerase activity in the UmuD'2C complex, as well as in human cells of a new DNA polymerase η , which shares some amino acids homology with UmuC protein, are also presented.

LITERATURA

- BEBENEK A., PIETRZYKOWSKA I., 1995. A new mutation in *Escherichia coli* K12, *isfA*, which is responsible for inhibition of SOS functions. *Mol. Gen. Genet.* 248, 103–113.
- BEBENEK A., PIETRZYKOWSKA I., 1996. The *isfA* mutation inhibits mutator activity and processing of UmuD protein in *Escherichia coli* *recA730* strain. *Mol. Gen. Genet.* 250, 674–680.
- BRUCK I., WOODGATE R., MCENTEE K., GOODMAN M.F., 1996. Purification of a soluble UmuDC complex from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 271, 10767–10774.
- CLEAVER J.E., KRAEMER K.H., 1989. [W:] *The metabolic basis of inherited disease*. SCRIVER C. R., BEAUDET A. L., SLY W.S., VALLE D. (red) 2: 2949–71. New York: McGraw-Hill.
- DEMPLE B., HARRISON L., 1994. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 915–948.
- DIANOV G., LINDAHL T., 1994. Reconstruction of the DNA base excision-repair pathway. *Curr. Biol.* 4, 1069–1076.
- DIANOV G., PRICE A., LINDAHL T., 1992. Generation of single repair patches following excision of uracil residues from DNA. *Mol. Cell Biol.* 12, 1605–1612.
- DONAHUE B.A., YIN S., TAYLOR J.-S., REINES D., HANAWALT P., 1994. Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8502–8506.
- ECHOLS H., GOODMAN M. F., 1990. Mutation induced by DNA damage: a many-protein affair. *Mutation Res.* 236, 301–311.
- ENOCH T., NORBURY C., 1995. Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *TIBS* 20, 426–430.
- FRANK E.G., HAUSER A.S., LEVINE A.S., WOODGATE R., 1993. Targeting of the UmuD, UmuD' and Muca' mutagenesis proteins to DNA by RecA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8169–8173.
- FRIEDBERG E.C., 1996. Relationships between DNA repair and transcription. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 15–42.
- FRIEDBERG E.C., GERLACH V.L., 1999. Novel DNA polymerases offer clues to the molecular basis of mutagenesis. *Cell* 98, 413–416.
- FRIEDBERG E.C., WALKER G.C., SIEDE W., 1995. *DNA repair and mutagenesis*. ASM PRESS Washington DC.
- FRROSINA G., FORTINI P., ROSSI O., CARROZZINO F., RASPAGLIO G., COX L.S., LANE D.P., ABBONDANDOLO A., DOGIOTTI E., 1996. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 271, 9573–9578.
- HENNING K.A., LI L., IYER N., MCDANIEL L.D., REAGAN M.S., LEGERSKI R., SCHULTZ R.A., STEFANINI M., LEHMANN A.R., MAYNE L.V., FRIEDBERG E.C., 1995. The Cockayne syndrome group A encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIF. *Cell* 82, 555–564.
- JOHANSON R.E., KONDRATICK C.M., PRAKASH S., PRAKASH L., 1999a. hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science* 285, 263–265.
- JOHANSON R.E., PRAKASH S., PRAKASH L., 1999b. Efficient bypass of thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Pol η . *Science* 283, 1001–1004.
- KARREN P., BIGNAMI M., 1992. Self-destruction and tolerance in resistance of mammalian cells to alkylation damage. *Nucl. Aci. Res.* 20, 2933–2940.
- KIM S., MAENHAUT-MICHEL G., YAMADA M., YAMAMOTO Y., MATSUI K., SOFUNI T., NOHMI T., OHMORI H., 1997. Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an overexpression of *dinB/dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13792–13797.
- KLUNGLAND A., HOSS M., GUNZ D., CONSTANTINOU A., CLARKSON S.G., DOETSCH P.W., BOLTON P.H., WOOD R.D., LINDAHL T., 1999. Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein. *Mol. Cell* 3, 33–42.
- KUBOTA Y., NASH R.A., KLUNGLAND A., SCHAR P., BARNES D.E., LINDAHL T., 1996. Reconstruction of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase β and the XRCC1 protein. *EMBO J* 15, 6662–6670.
- LARIMER F.W., PERRY J.R., HARDIGREE A.A., 1989. The REV1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: isolation, sequence, and functional analysis. *J. Bac.* 171, 230–237.
- LEHMANN A.R., 1995. Nucleotide excision repair and the link with transcription. *TIBS* 20, 402–405.
- LIPINSKI L.J., HOEHR N., MAZUR S.J., DIANOV G.L., SENTURKER S., DIZDAROGLU M., BOHR V.A., 1999. Repair of oxidative DNA base lesions induced by fluorescent light is defective in xeroderma pigmentosum group A cells. *Nucleic Acids Res.* 27, 3153–3158.
- LITTLE J.W., 1993. LexA cleavage and other self-processing reactions. *J. Bacteriol.* 175, 4943–4950.
- MA L., HOEIJMAKERS J.H.J., van der Eb A.J., 1995. Mammalian nucleotide excision repair. *Biochem. Biophys. Acta* 1242, 137–164.
- MASUTANI C., KUSUMOTO R., YAMADA A., DOHMAE N., YOKOI M., YUASA M., ARAKI M., IWAI S., TAKIO K., HANAOKA F., 1999.

- The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature* 399, 700–707.
- MCDONALD J.P., LEVINE A.S., WOODGATE R., 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD30 gene, a homologue of *Escherichia coli* *dinB* and *umuC*, is DNA damage inducible and functions in a novel error-free postreplication repair mechanism. *Genetics* 147, 1557–1568.
- MCDONALD J.P., RAPIĆ-OTRIN V., EPSTEIN J.A., BROUGHTON B.C., WANG X., LEHMANN A.R., WOLGEMUTH D.J., WOODGATE R., 1999. Novel human and mouse homologs of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase η . *Genomics* 60, 20–30.
- MELLON I., SPIVAK G., HANAWALT P.C., 1987. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* 51, 241–245.
- MODRICH P., LAHUE R., 1996. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 101–133.
- MU D., PARK C.H., MATSUNAGA T., HSU D.S., REARDON J.K., SANCAR A., 1995. Reconstruction of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *J. Biochem.* 270, 2415–2418.
- NELSON A.L., LAWRENCE C., HINKLE D.C., 1996. Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein. *Nature* 382, 729–732.
- OHMORI H., HATADA E., QIAO Y., TSUJI M., FUKUDA R., 1995. *dinP*, a new gene in *Escherichia coli*, whose product shows similarities to *UmuC* and its homologues. *Mutation Research* 347, 1–7.
- RAJAGOPALAN M., LU C., WOODGATE R., O'DONNELL M., GOODMAN M.F., ECHOLS H., 1992. Activity of the purified mutagenesis proteins *UmuC*, *UmuD'*, and *RecA* in replicative bypass of an abasic DNA lesion by DNA polymerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10777–10781.
- ROUSH A.A., SUAREZ M., FRIEDBERG E.C., RADAMAN M., SIEDE W., 1998. Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* gene RAD30 encoding an *Escherichia coli* *DinB* homolog confers UV radiation sensitivity and altered mutability. *Mol. Gen. Genet.* 257, 686–692.
- SANCAR A., 1994a. Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* 33, 2–9.
- SANCAR A., 1994b. Mechanisms of DNA excision repair. *Science* 266, 1994–1996.
- SANCAR A., 1996. DNA excision repair. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 43–81.
- SANCAR G.B., SIEDE W., van ZEELAND A.A., 1996. Repair and processing of DNA damage: a summary of recent progress. *Mutat. Res.* 362, 127–146.
- SAVVA R., MCAULEY-HECHT K., BROWN T., PEARL L., 1995. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature* 373, 487–493.
- SEEBERG E., EIDE L., BJORAS M., 1995. The base excision repair pathway. *TIBS* 20, 391–397.
- SELBY C.P., SANCAR A., 1990. Structure and function of the (A)BC excinuclease of *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 236, 203–211.
- SELBY C.P., SANCAR A., 1991a. Gene- and strand-specific repair in vitro: partial purification of a transcription-repair coupling factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 8232–8236.
- SELBY C.P., SANCAR A., 1991b. *Escherichia coli* *mdf* mutant deficient in "mutation frequency decline" lacks strand-specific repair: in vitro complementation with purified coupling factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11574–11578.
- SELBY C.P., SANCAR A., 1994. Mechanisms of transcription-repair coupling and mutation frequency decline. *Microbiol. Rev.* 58, 317–329.
- SELBY C.P., SANCAR A., 1995. Structure and function of transcription-repair coupling factor. *J. Biol. Chem.* 270, 4882–4889.
- TANG M., BRUCK I., ERITJA R., TURNER J., FRANK E.G., WOODGATE R., O'DONNELL M., GOODMAN M.F., 1998. Biochemical basis of SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: reconstruction of in vitro lesion bypass dependent on the *UmuD'*2C mutagenic complex and *RecA* protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9755–9760.
- TANG M., SHEN X., FRANK E.G., O'DONNELL M., WOODGATE R., GOODMAN M.F., 1999. *UmuD'*2C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9219–9224.
- WAGNER J., GRUZ P., KIM S-R., YAMADA M., MATSUI K., FUCHS R.P.P., NOHMI T., 1999. The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Mol. Cell* 4, 281–286.
- WALKER G.C., 1995. SOS-regulated proteins in translesion DNA synthesis and mutagenesis. *TIBS* 20, 416–420.
- WALKER G.C., 1998. Skiing the black diamond slope: Progress on the biochemistry of translesion DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10348–10350.
- WANG J.Y.J., 1998. Cellular responses to DNA damage. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 240–247.
- WIEBAUER K., JIRICNY J., 1990. Mismatch-specific thymine DNA glycosylase and DNA polymerase β mediate the correction of G-T mispairs in nuclear extracts from human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5842–5845.
- WOODGATE R., ENNIS D., 1991. Levels of chromosomally encoded *Umu* proteins and requirements for in vivo *UmuD* cleavage. *Mol. Gen. Genet.* 229, 10–16.
- WOOD R.D., 1996. DNA repair in Eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 135–67.
- YASUDA T., MORIMATSU K., HORII T., NAGATA T., OHMORI H., 1998. Inhibition of *Escherichia coli* *RecA* coprotease activities by *DinI*. *EMBO J.* 11, 3207–3216.