

BARBARA TUDEK

*Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
Instytut Genetyki i Biotechnologii  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Warszawski  
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa  
E-mail: tudek@ibb.waw.pl*

## RÓŻNE TWARZE NAPRAWY DNA – NOBEL 2015 W DZIEDZINIE CHEMII

### WSTĘP

Jedną z najbardziej niezbędnych rzeczy do życia każdego organizmu jest zachowanie integralności materiału genetycznego. Strażnikiem wierności przekazywania genów z pokolenia na pokolenie jest sama struktura DNA. Parowanie adeniny z tyminą, zaś guaniny z cytozyną powoduje, że możliwość innych kombinacji jest ograniczona do 1 błędu na 100 par zasad. Budowa centrum aktywnego i aktywność korektorska polimeraz DNA dalej ogranicza prawdopodobieństwo

powstania błędów do  $1/10^7$ – $1/10^8$  par zasad. Jednak częstość mutacji spontanicznych wynosi około  $1/10^9$ – $1/10^{10}$  i jest 100 razy niższa niżby wynikało z możliwości uzyskania wierności dzięki budowie DNA i białek biorących udział w jego powielaniu. Ewidentnie, w czasie replikacji DNA powstają błędy, które po zakończeniu jego syntezy są usuwane. Dodatkowo, DNA jest stale narażone na uszkodzenia przez różnorodne czynniki zewnętrzne, promieniowanie UV i jonizujące, pyły, spaliny, leki, składniki pożywienia itp. Także metabolizm komórki dostarcza



Photo: Cancer Research UK

**Tomas Lindahl**

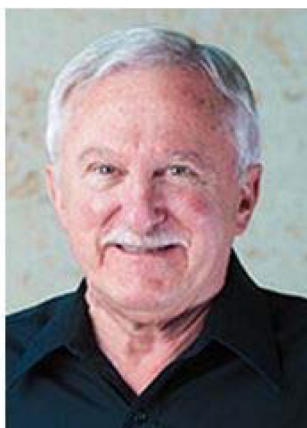


Photo: K. Wolf/AP Images for HHMI

**Paul Modrich**



Photo: M. Englund, UNC-School of Medicine

**Aziz Sancar**

Ryc. 1. Laureaci Nagrody Nobla 2015 w dziedzinie chemii; <http://www.frontlinegenomics.com/wp-content/uploads/Nobel-prize-chemistry-2015.jpg>

**Słowa kluczowe:** Aziz Sancar, naprawa DNA, Nobel z chemii 2015, Paul Modrich, Thomas Lindahl

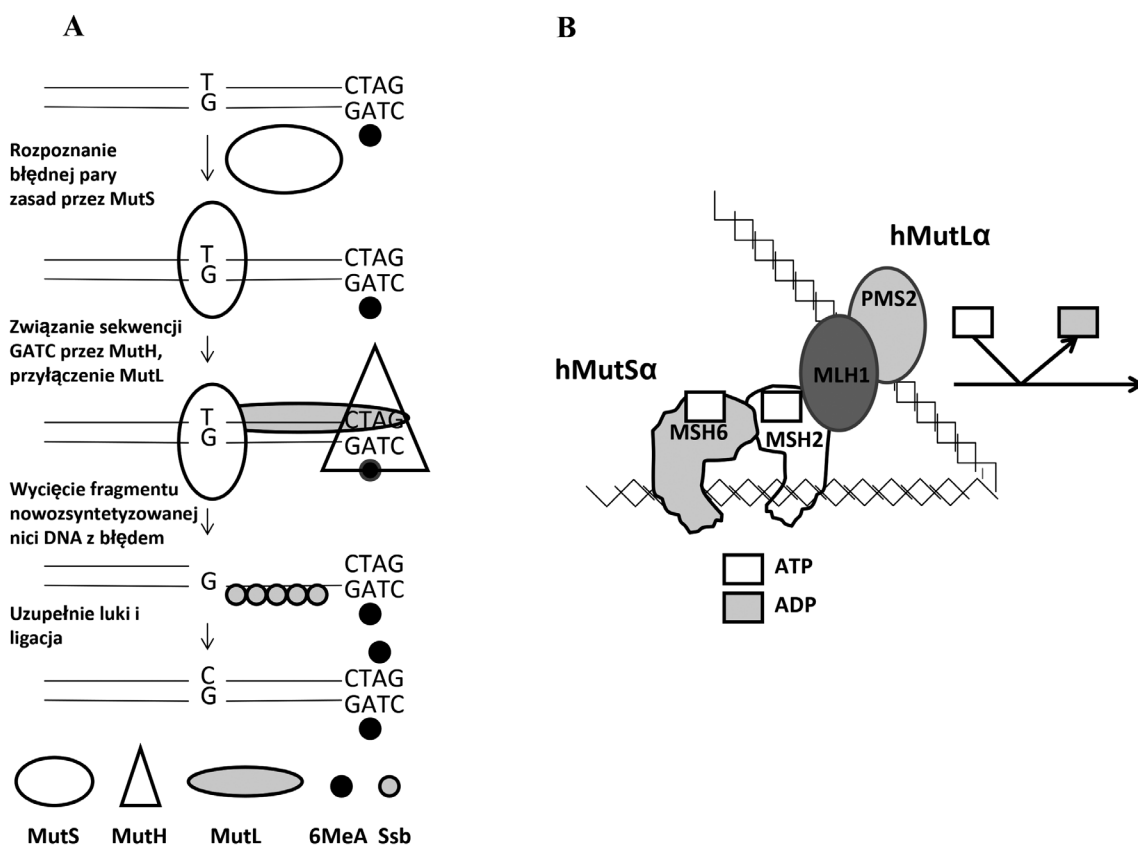
wielu aktywnych substancji, które zmieniają strukturę DNA i stymulują powstawanie mutacji. Wszystkie organizmy wykształciły więc różnorodne systemy usuwania z DNA fragmentów wadliwych i zastępowania ich strukturami prawidłowymi. Istnienie tych różnych systemów naprawy DNA zwiększa około 100-krotnie prawdopodobieństwo zachowania wierności informacji genetycznej. Nagroda Nobla 2015 w dziedzinie chemii została przyznana trzem uczonym, których zainteresowania koncentrowały się wokół różnych czynników uszkadzających DNA, a w konsekwencji różnych systemów naprawczych. Obejmują więc ogromną dziedzinę wiedzy, której nie sposób określić jednym hasłem. Badania te zostały docenione, ponieważ coraz bardziej staje się widoczne, że różne systemy naprawy DNA odgrywają rolę w powstawaniu szeregu chorób człowieka, przede wszystkim nowotworów, poprzez mechanizmy genetyczne i epigenetyczne, tzn. mutacje i/lub regulację ekspresji genów. Systemy naprawy DNA mogą też być znakiem celem terapii przeciwnowotworowych. Artykuł pokrótce przedstawia najważniejsze zagadnienia, którymi zajmowali się tegoroczni Nobliści (Ryc. 1) i znaczenie ich odkryć dla rozwoju nauki i/lub praktyki.

### NAPRAWA BŁĘDÓW REPLIKACYJNYCH

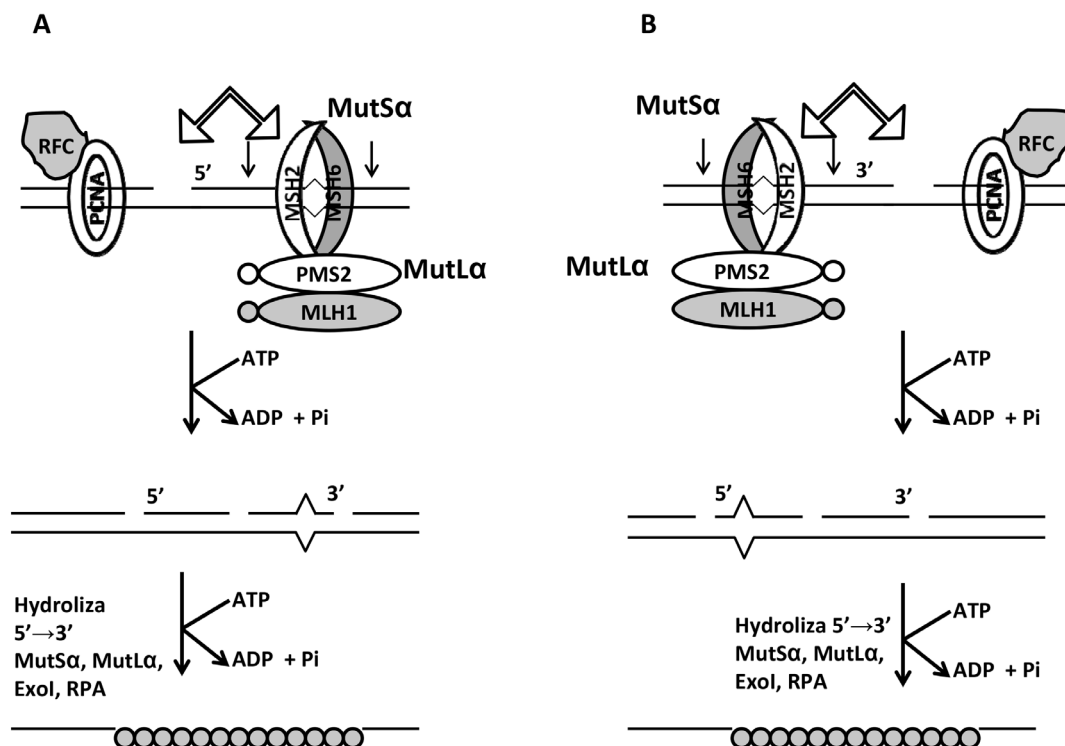
W 2015 r. Paul Modrich (ur. 1946) z Howard Hughes Medical Institute oraz Duke University School of Medicine (Durham, USA) został uhonorowany Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii za wkład w zrozumienie funkcjonowania i znaczenia naprawy źle dopasowanych zasad (ang. mismatch repair, MMR) u bakterii *Escherichia coli* oraz u człowieka. Jest to system naprawy DNA, który eliminuje błędy powstające podczas replikacji DNA. Powstają one wtedy, gdy polimeraza DNA wstawi niewłaściwą zasadę naprzeciw zasady w matrycy, np. T naprzeciw G lub gdy powtarzające się monotonnie sekwencje, takie jak -GTGTGTGT- lub -CAGCAGCAG- są wypętlane i omijane albo kilkukrotnie replikowane, przez co powstają błędy insercyjno-delecyjne. Pierwsze badania prowadzone m.in. w pracowni Paula Modricha pod koniec lat 70. i w latach 80. XX w. pozwoliły na ustalenie mechanizmu MMR u *E. coli*. Modrich odkrył istnienie specyficznej metylotransferazy (dam metylaza), która przenosiła grupy metylowe w pozycję 6 adeniny w sekwencji -GATC- (GEIER i MODRICH 1979). Okazało się, że metylacja adeniny w sekwencji GATC jest swoistym znakiem pozwalającym na rozróżnienie nici „starej” od „nowej”, która ma być skorygowana po błędnym zakończeniu replikacji DNA. Ba-

dania Modricha, a także innych, pozwoliły na zaproponowanie modelu naprawy MMR u *E. coli*, w którym uczestniczą trzy białka MutS, Mut H i MutL (Ryc. 2). Obecność niewłaściwej pary zasad jest rozpoznawana przez białko MutS, które łączy się z DNA w miejscu błędnej pary zasad. Najbardziej wydajnie MutS łączy się z parami G:T i A:C, zaś bardzo słabo z parą C:C. Do kompleksu MutS-DNA zostaje przyłączone białko MutL, z użyciem energii z rozkładu ATP. Białko MutH wiąże się z sekwencją GATC, ale także z kompleksem DNA-MutS/MutL i niejako spina miejsce zawierające błędną parę zasad z sekwencją GATC. Obecność 6MeAde w sekwencji GATC umożliwia rozróżnienie starej od nowosyntetyzowanej nici DNA. Nowa nić jest przecinana przez MutH w sekwencji GATC, a cięcie to jest stymulowane przez MutS i MutL. Kolejny etap to trawienie DNA od miejsca przecięcia do błędnie sparowanej zasady. W proces ten są zaangażowane egzonukleazy 3'→5' (ExoI, ExoX), jeśli błędna para znajduje się po stronie 5' sekwencji GATC, lub 5'→3' (ExoVII, RecJ), jeśli błędna para znajduje się po stronie 3' sekwencji GATC. W ten sposób trawione są nieraz duże fragmenty DNA, do 1000-1500 nukleotydów. Powstająca luka jest następnie uzupełniana przez maszynę replikacyjną, a całość łączona przez ligazę. U *E. coli* brak któregośkolwiek z białek MMR powoduje ok. 100-krotny wzrost częstości mutacji spontanicznych, co świadczy, że błędy replikacyjne są zjawiskiem dość częstym i bez ich usuwania zmienność genetyczna „zmiotłaby” świat żywych organizmów z powierzchni Ziemi bardzo szybko.

O ile u organizmów niższych sygnał do rozróżniania nici DNA nowosyntetyzowanej od matrycowej odbywa się na dość prostej zasadzie opóźnienia metylacji sekwencji GATC w stosunku do replikacji i istnienia „okienka czasowego” na naprawę MMR, w którym „stara nić” jest metylowana, a nowa nie, o tyle dużym problemem było znalezienie takiego sygnału u organizmów eukariotycznych. Wiadomo było, że MMR w jakiś sposób jest związany z replikacją. W trakcie badań prowadzonych w pracowni Prof. Modricha okazało się, że sygnałem do rozpoczęcia naprawy MMR jest nacięcie nici DNA, które może być umieszczone albo od strony 3' albo 5' błędnej pary zasad (Ryc. 3). Odległość między nieprawidłową parą zasad a niezbędnym do aktywacji MMR nacięciem w DNA może wynosić aż 1000 p.n. W naprawie MMR u eukariotów, w tym u człowieka, bierze udział pięć białek podstawowych, które tworzą trzy kompleksy, MutSα (MSH2/MSH6), MutSβ (MSH2/MSH3) i MutLα (PMS2/MLH1), oraz białka dodatko-



Ryc. 2. Schemat systemu naprawy źle dopasowanych zasad u bakterii (A) oraz u człowieka (B).



Ryc. 3. Schemat naprawy źle sparowanych zasad kierowany wolnym końcem 5' (A) lub 3' (B).

we, które są również zaangażowane w inne procesy metabolizmu chromatyny (MODRICH 2006). MutSα rozpoznaje błędnie sparowane zasady, a MutSβ pętle insercyjno-delecyjne i wiążą się z nimi. Pomimo zaangażowania i lat pracy wielu grup badawczych, kolejność i partnerzy dalszych etapów MMR wciąż nie są poznani. Wydaje się, że naprawa MMR w komórkach człowieka może być realizowana przynajmniej na dwa różne sposoby. W jednym zaangażowany jest dodatkowy enzym, egzonukleaza I (Exo 1), która jest aktywowana przez związany z DNA kompleks MutSα. Exo 1 trawi nić DNA od nacięcia w stronę błędnej pary zasad. Po strawieniu fragmentu o długości ok. 200 nukleotydów komplementarny, jednoniciowy DNA (ssDNA) jest opłaszczany białkami stabilizującymi jednoniciową strukturę DNA, tzn. białkami RPA (ang. replication protein A). To ogranicza ładowanie kolejnych cząsteczek Exo1 i dalsze trawienie DNA, które jest jeszcze bardziej hamowane po usunięciu z DNA błędnej pary zasad. W ograniczaniu trawienia DNA niezawierającego błędów biorą udział MutLα oraz polimeraza poli(ADP-rybozy) 1 (PARP1), chociaż w tym modelu białka te nie są potrzebne do przebiegu naprawy MMR. Uważa się, że MMR według tego modelu zachodzi w widelkach replikacyjnych na nici opóźnionej.

W drugim modelu cięcia nici DNA w pobliżu błędnej pary zasad dokonuje kompleks MutLα, który do aktywacji wymaga obecności błędnej pary, przerwy w DNA, MutSα oraz białek replikacyjnych RFC (ang. replication factor C) i PCNA (ang. proliferating cell nuclear antigen). Po nacięciu nić DNA jest trawiona przez Exo1, a luka uzupełniana przez maszynę replikacyjną. Mechanizm wyboru, która nić DNA ma być naprawiana, a która powinna zostać matrycą wciąż jednak nie jest jasny. Badania Modricha sugerują, że takiej informacji może dostarczać interakcja kompleksu MutLα z PCNA, białkiem stanowiącym rusztowanie dla maszyny replikacyjnej, a także biorącym udział w regulacji wyborów komórki pomiędzy różnymi białkami replikacyjnymi oraz pomiędzy replikacją a naprawą DNA. Prof. Modrich swój wykład Noblowski zakończył pytaniem: „Czy to końce 3' i 5' w widelkach replikacyjnych służą jako domyślne sygnały do kierowania naprawą MMR?” Pomimo wielu lat badań nad systemem MMR wciąż nie znamy odpowiedzi na to pytanie.

MMR eliminuje z DNA nie tylko prawidłowe nukleotydy pozostające w nieprawidłowych parach. Substratem systemu są także niektóre uszkodzenia DNA, jak jedno z najlepiej poznanych uszkodzeń oksydacyjnych, 8-oksyguanina, czy nukleotydy RNA błęd-

nie włączone do DNA podczas replikacji, a także pętle insercyjno-delecyjne. Te ostatnie powstają często w powtarzających się sekwencjach, których przykładem są sekwencje mikrosatelitarne występujące na końcach chromosomów i nie niosące informacji genetycznej, ale chroniące komórkę przed utratą genów istotnych dla życia, a także trójki nukleotydów kodujące aminokwasy. Wskutek aktywności systemu MMR, DNA niosący takie sekwencje może ulegać skracaniu albo wydłużaniu. Niektóre białka zawierają trakty poliglutaminianowe. Jeśli liczba cząsteczek kwasu glutaminowego zawarta w traktach jest ograniczona, białko może spełniać swoją funkcję. Jeśli jednak nastąpi ekspansja trójek nukleotydowych białko lub same trakty poliglutaminianowe ulegają agregacji, co prowadzi do śmierci komórki. Tak dzieje się np. w chorobie Huntingtona. Ekspansja jest zależna od długości powtórzeń (prawdopodobieństwo utraty funkcjonalności białka wielokrotnie wzrasta powyżej 40 powtórzeń CAG/CTG) oraz od aktywności systemu MMR. W mysim modelu choroby Huntingtona, brak kompleksu MutSβ chroni przed wydłużaniem traktów poliglutaminianowych (KANTARTZIS i współaut. 2012).

Część uwarunkowanych genetycznie nowotworów jelita grubego i okrężnicy (ang. colorectal cancer, CRC), a także endometrium i żołądka jest spowodowana mutacjami w genach MMR. Jest to tzw. zespół Lyncha (LI i MARTIN 2016). Mutacje są znajdowane najczęściej w genach *MSH6*, *MSH2* i *MLH1*. Choroba jest autosomalna dominująca. Pacjenci są heterozygotami względem mutacji w genach MMR. Chorzy charakteryzują się bardzo dużą niestabilnością genomową, którą najłatwiej zaobserwować w traktach mikrosatelitarnych, co niestety związane jest także ze złą prognozą. Zespół Lyncha jest diagnozowany u ok. 5% chorych na raka jelita grubego i okrężnicy. Mutacje są albo dziedziczone albo powstają *de novo*. Wśród sporadycznych CRC ok. 15% jest związane z dysfunkcją MMR, z czego 5% jest spowodowane nowymi mutacjami, zaś 10% wynika z wyciszenia genu *MLH1* wskutek metylacji jego promotora.

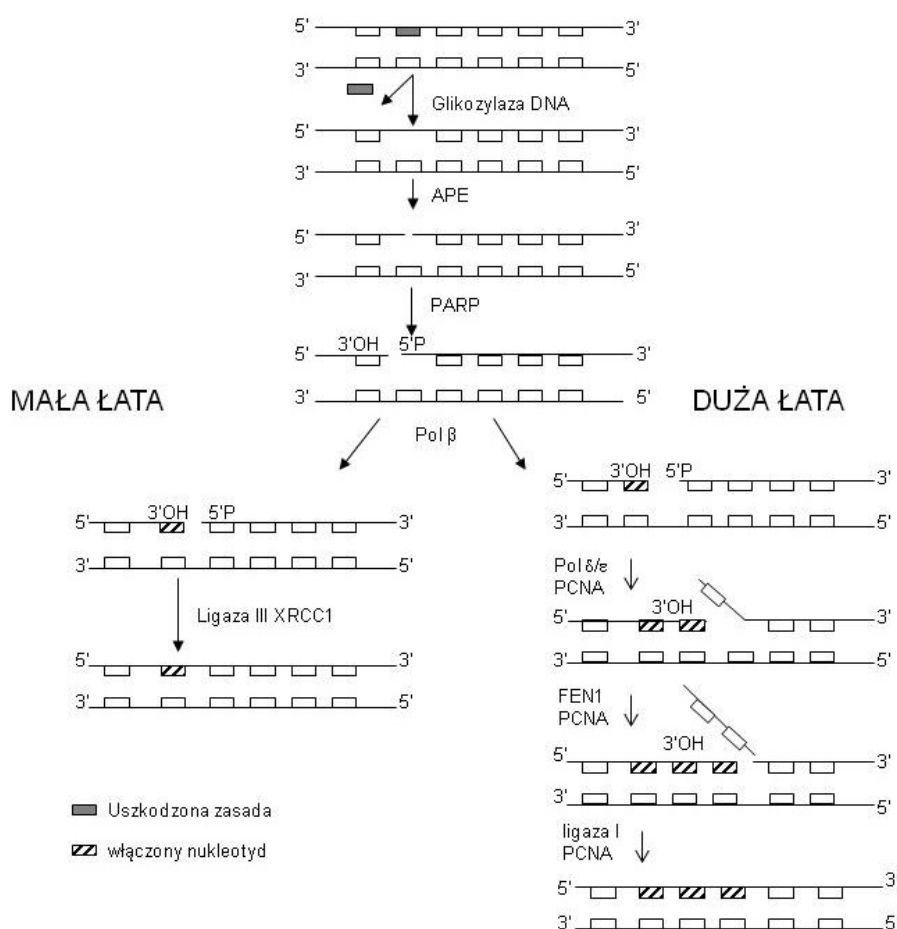
Ostatnie badania wykazały, że system MMR jest potrzebny do prawidłowego działania leków przeciwnowotworowych. Większość z tych związków działa cytostatycznie poprzez uszkodzenie DNA. MMR aktywuje odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA, tzn. zablokowanie cyklu komórkowego, naprawę DNA i apoptozę. Przy braku MMR, nie tylko zwiększa się niestabilność genomu, ale także komórka staje się mniej wrażliwa lub niewrażliwa na działanie terapii przeciwnowotworowych.

Reasumując, badania Prof. Modricha przyczyniły się w znacznej mierze do poznania mechanizmu funkcjonowania systemu MMR zarówno u bakterii, jak i u organizmów wyższych, w tym u człowieka, i pokazały znaczenie tego systemu naprawy DNA dla rozwoju chorób związanych z utratą stabilności genomowej.

### NAPRAWA OKSYDACYJNYCH I ALKILACYJNYCH USZKODZEŃ DNA

Tomas Lindahl (ur. w 1938 r.) ukończył studia medyczne w Karolinska Institute, w Sztokholmie, ale całe życie poświęcił badaniom podstawowym. Jest profesorem chemii medycznej i fizycznej, emerytowanym dyrektorem Cancer Research UK London Research Institute, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Wielka Brytania. Wniósł ogromny wkład do zrozumienia natury alkilacyjnych i oksydacyjnych uszkodzeń DNA, a także mechanizmów ich naprawy. Podstawowe motto jakie przyświecało Lindahlowi w codziennej

pracy to, jak pisze w artykule wspomnieniowym, „Zrozumieć podstawowe mechanizmy naprawy DNA w aspekcie terapii przeciwnowotworowej, chorób uwarunkowanych genetycznie i starożytnego DNA” (LINDAHL 2013). W trakcie swojej długiej pracy naukowej odkrył wiele nowych enzymów naprawy DNA, głównie systemu naprawy przez wycinanie zasad (ang. base excision repair, BER), ale także nukleazy i ligazy biorące udział w różnych typach naprawy. W latach 1970–1980 zajmował się endogennymi procesami prowadzącymi do uszkodzenia DNA, takimi jak: depurynacja, deaminacja cytozyny, utlenianie guaniny czy alkilacja zasad DNA. Przede wszystkim ustalił, że zasady DNA mogą być alkilowane w różnych pozycjach, ale grupy alkilowe są usuwane z różnych pozycji przez różne systemy naprawcze. I tak, najczęściej powstające uszkodzenie alkilacyjne, 7MeGua (60–85% wszystkich uszkodzeń alkilacyjnych) oraz 3MeAde (ok. 18% wszystkich uszkodzeń), są usuwane z DNA przez glikozylazę DNA, enzymy inicjujące napra-



Ryc. 4. Schemat szlaku naprawy przez wycinanie zasad.

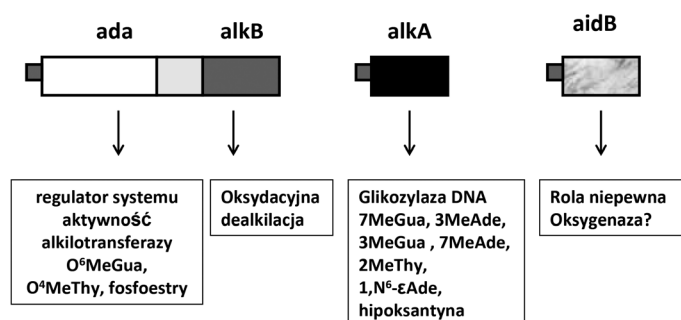
PARP – polimeraza Poli(ADP rybozy); w miejscach przerw ciągłości DNA enzym syntetyzuje długie łańcuchy poli(ADP rybozy) na białkach chromatyny, w tym białkach naprawczych, ułatwiając naprawę DNA. W rekonstruowanych systemach *in vitro* nie jest potrzebny do naprawy DNA.

wę przez wycinanie zasad. W systemie tym uszkodzona zasada DNA jest rozpoznawana przez glikozylazę, która przecina wiązanie N-glikozydowe pomiędzy cukrem a uszkodzoną zasadą pozostawiając w DNA miejsce pozbawione instrukcji dla maszynery replikacyjnej i transkrypcyjnej, czyli pozbawione zasady miejsce apurynowe (AP) (Ryc. 4). Dalej jest ono rozpoznawane przez AP-endonukleazę, która dokonuje cięcia od strony 5' miejsca AP, deoksyryboza jest następnie wycinana przez deoksyrybofosfodiesterazę (u bakterii jest to polimeraza DNA I, u eukariontów Pol  $\beta$ ). Dalsza naprawa może być realizowana dwoma ścieżkami, przez wstawienie małej łaty, gdzie Pol  $\beta$  wstawia jeden brakujący nukleotyd, a nic jest scalana przez ligazę, lub przez wstawienie dużej łaty, gdzie wolny koniec 3'OH przeciętej nici DNA jest wydłużany przez aparat replikacyjny (PCNA/RFC, Pol  $\delta$  lub Pol  $\epsilon$ ) o kilka-kilkaście nukleotydów, a koniec 5' odsuwany na bok. Odsunięty fragment jest odcinany przez endonukleazę FEN1, a całość jest scalana przez ligazę I. Badania podstawowe prowadzone przez LINDAHLA (2000) umożliwiły dokładne poznanie szlaku BER, np. odkrył istnienie wielu ligaz w komórkach ssaków: ligazy III zaangażowanej w szlak małej łaty BER, ligazy I zaangażowanej w szlak dużej łaty BER, endonukleazy FEN1, a także ligazy IV, która bierze udział w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA przez scalanie niehomologicznych końców (ang. nonhomologous-end joining, NHEJ). Jego badania w znacznej mierze przyczyniły się także do poznania mechanizmu działania glikozylaz DNA, polegającym na wyciąganiu uszkodzonej zasady do centrum aktywnego enzymu, co ustalił na przykładzie glikozylazy uracylowej. Badania Prof. Lindahla pokazały też, że niektóre glikozylazy DNA, które były uważane za typowe enzymy naprawy alkilacyjnych uszkodzeń DNA są przez komórki zaangażowane do naprawy uszkodzeń oksydacyjnych. Do takich enzymów należy bakteryjna glikozylaza formamidopirymidynowa (Fpg), której fizjologicznymi substratami są główne uszkodzenia oksydacyjne, 8-oksyguanina i formamidopirymidyny (Fapy) powstające wskutek ataku wolnych rodników na DNA (ASAGOSHI i współaut. 2000). Badania nad uszkodzeniami oksydacyjnymi zajęły Prof. Lindahlowi wiele lat i o nich mówił na 32 Zjeździe Europejskiego Towarzystwa Mutagenety Środowiskowej, który odbył się w Warszawie w 2002 r. Wykazał, że wbrew dotychczas utartym poglądom naprawa 8-oksygua i Fapy-Gua, a także uracylu i alkilacyjnych uszkodzeń DNA zachodzi i to dość intensywnie w mitochondriach. W tym czasie było wiadomo, że organella te nie naprawiają uszko-

dzeń DNA indukowanych przez światło UV, więc wydawało się, że naprawa DNA w mitochondriach w ogóle nie zachodzi. Prace Prof. Lindahla nad mitochondriami rozpoczęły intensywne badania nad tymi organellami i ujawniły obecność w nich większości szlaków naprawy DNA aktywnych w jądrze komórkowym, choć czasem nie były one identyczne z jądrowymi.

Ogólny schemat BER jest podobny u bakterii i eukariontów. Jednak u eukariontów, w tym u człowieka, uczestniczy wiele białek dodatkowych, które *in vitro* nie są potrzebne do naprawy, ale bez nich procesy naprawcze nie zachodzą lub tracą wydajność *in vivo*. Do takich enzymów należy zaliczyć polimerazę poli(ADP-rybozy) 1 (PARP1). Jest to enzym, który *in vitro* nie jest potrzebny do naprawy typu BER. W komórce jest aktywowany aż 200-krotnie pojawieniem się jedno- i dwuniciowych przerw w DNA. Wtedy tworzy długie filamenty poli(ADP-rybozy) na białkach docelowych, którymi jest samo białko PARP1, histony i inne białka BER biorące udział w naprawie po pojawieniu się przerwy w DNA. W ten sposób struktura chromatyny ulega rozluźnieniu, a białka naprawcze są rekrutowane do uszkodzenia i wydajność naprawy wzrasta (KLUZEK i współaut. 2012). PARP1 ma także znaczenie w rozluźnianiu promotorów niektórych genów, przez co aktywuje ich transkrypcję, np. genu *c-MYC* (FEKETE i współaut. 2012). PARP1 stał się ostatnio celem terapii przeciwnowotworowych.

Badania Prof. Lindahla nad naprawą alkilacyjnych uszkodzeń DNA wykazały także istnienie białka, które usuwa z DNA O<sup>6</sup>-metyloguaninę bez nacięcia nici. Modyfikacja ta jest ilościowo marginalna (0,6–6% wszystkich uszkodzeń alkilacyjnych), ale odpowiedzialna za 80% mutacji indukowanych przez związki alkilujące. Białkiem tym okazała się specyficzna metylotransferaza przenosząca grupę metylową z pozycji O<sup>6</sup>-guaniny na resztę cysteiny własnego białka. W ten sposób zostaje odtworzona niezmodyfikowana reszta guaniny w DNA, zaś metylotransferaza ulega inaktywacji, jest to więc „enzym samobójczy”. Bakteria *Escherichia coli* ma dwa takie białka: indukowalne białko Ada oraz konstytutywnie wyrażane Ogt. Ada ma dwie reszty cysteiny wiążące grupy metylowe: w pozycji 321, która przenosi resztę metylową z pozycji O<sup>6</sup> Gua oraz O<sup>4</sup>Thy, a także w pozycji 69, wiążącą resztę metylową przyłączoną do grupy fosforanowej łańcucha cukrowo-fosforanowego DNA. Wiązanie reszty metylowej w pozycji Cys69 białka Ada zmienia go w aktywator systemu odpowiedzi na czynniki alkilujące. Pod wpływem zaktywowanego białka Ada ok. 100-krotnie wzrasta transkryp-

System odpowiedzi adaptacyjnej na czynniki alkilujące u *Escherichia coli*

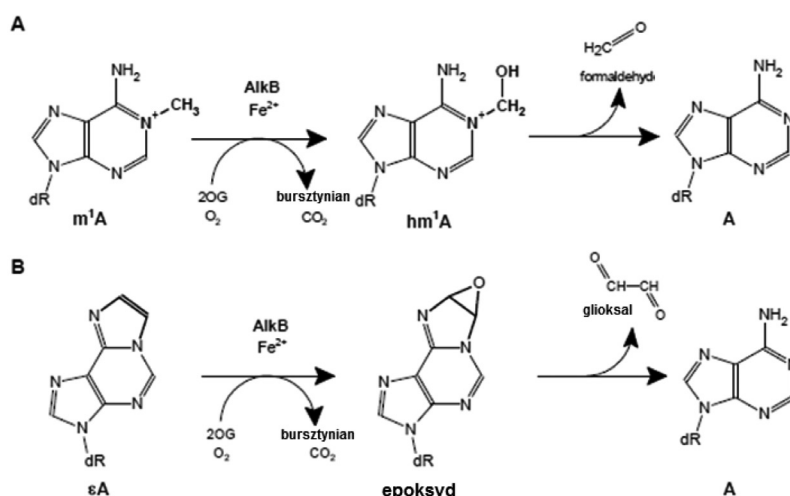
Ryc. 5. System odpowiedzi adaptacyjnej na czynniki alkilujące u *Escherichia coli*: geny i aktywność ich produktów. W jednym boksie zaznaczono geny podlegające transkrypcji jak w operonie.

cja genów kodujących różne białka naprawy alkilowanych zasad: swojego własnego genu *ada*, genu *alkA*, który koduje glikozylazę DNA wycinającą głównie 7MeGua i 3MeAde, a także genów *alkB* i *aidB* (SEDGWICK i LINDAHL 2002) (Ryc. 5).

Ludzki homolog białka Ada, metylotransferaza O<sup>6</sup>-metyloguaniny (MGMT, zwana też AGT z ang. alkyl-guanine transferase) usuwa z DNA jedynie O<sup>6</sup>MeGua, a silnie mutagenna reszta O<sup>4</sup>Thy nie jest naprawiana i gromadzi się w DNA. Wykazano, że poziom O<sup>4</sup>Thy w DNA jest wprost proporcjonalny do liczby wypalanych papierosów i lat palenia (ANNA i współaut. 2011). Aktywność MGMT może być hamowana przez pochodne O<sup>6</sup>MeGua. Najlepszym inhibitorem jest O<sup>6</sup>-benzyloguanina. W terapii nowotworów mózgu z wyboru używane są związki alkilujące, gdyż łatwo przenikają barierę krew-mózg. Zastosowanie inhibitora MGMT w kombinacji z powszechnie stosowanym chemioterapeuty-

kiem o właściwościach alkilujących, temozolomidem, dawało znakomite efekty w układach komórkowych i ksenograftach. Jednak w pierwszych próbach klinicznych inhibitor MGMT okazał się zbyt toksyczny i został „odłożony na półkę” do czasu, kiedy nauczmy się bardziej precyzyjnie kierować leki do komórek nowotworowych.

Dopiero po 30 latach od odkrycia systemu odpowiedzi na czynniki alkilujące u *E. coli* udało się zidentyfikować funkcję jaką pełni białko AlkB, zaś znaczenie AidB do tej pory nie jest w pełni wyjaśnione. Jednym z dwóch laboratoriów, które przyczyniły się do rozwikłania funkcji białek AlkB było laboratorium kierowane przez prof. Lindahla (SEDGWICK i LINDAHL 2002). Białka AlkB to oksydacyjne demetylaza, które wymagają α-ketoglutaranu i żelaza dwuwartościowego. Utleniają grupy metylowe przyłączone do atomów azotu w zasadach DNA (Ryc. 6). Wiązanie powstających w ten sposób grup



Ryc. 6. Mechanizm usuwania grup metylowych (A) i etenowych adduktów zasad DNA (B) przez białka grupy AlkB.

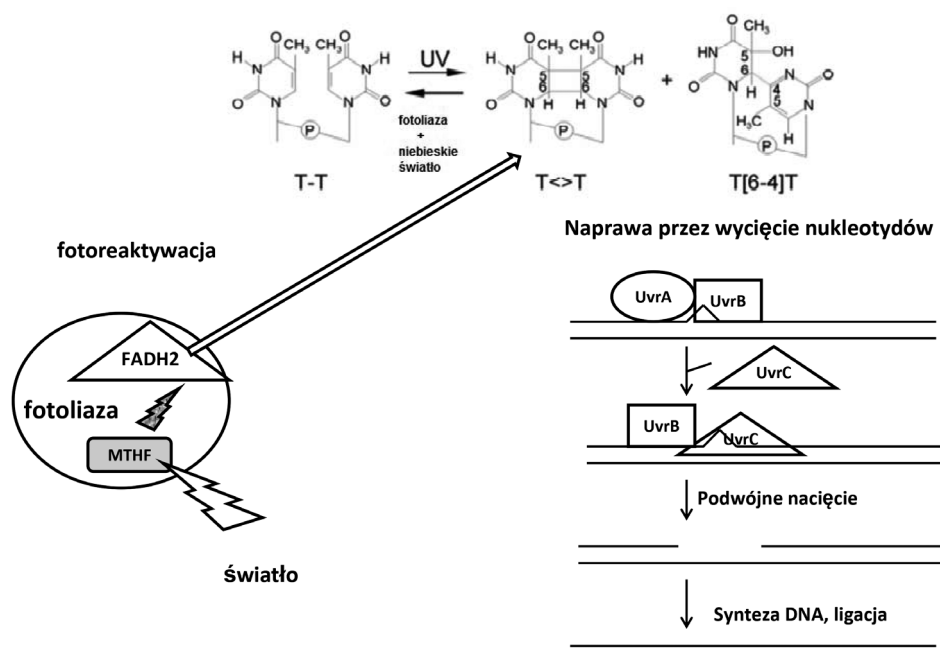
hydroksymetylowych z atomem azotu ulega labilizacji, przez co od zasady jest odłączany formaldehyd i następuje odtworzenie nieuszkodzonej zasady DNA. Białka AlkB utleniają substraty, które mają grupy alkilowe przyłączone w pozycji N1 puryn i N3 pirymidyn. Poza grupami metylowymi, usuwają z DNA także grupy etylowe i etenowe, które powstają wskutek przyłączenia produktów peroksydacji lipidów do DNA. Najciekawsze było to, że wiele białek AlkB usuwało zmodyfikowane zasady nie tylko z dwuniciowego, ale także z jednociowego DNA, co sugerowało ich możliwy udział w kontrolowaniu integralności DNA w widelkach replikacyjnych lub w bańce transkrypcyjnej. Rzeczywiście, w jednym z ludzkich białek AlkB, AlkBH2, znaleziono motyw wiązania do pierścienia PCNA, który oddziałuje z wieloma białkami replikacyjnymi i naprawczymi i w ten sposób bierze udział w regulacji replikacji i naprawy DNA (GILLJAM i współaut. 2009). Nie jest więc wykluczone, że AlkBH2 „patroluje” matrycę DNA w trakcie replikacji usuwając uszkodzenia, które mogłyby wprowadzać mutacje do DNA. Niewątpliwie, aktywność AlkB z *E. coli* silnie obniża częstość mutacji indukowanych przez związki wprowadzające etenoaddukty zasad DNA.

Ponadto, białko AlkB z *E. coli* utlenia grupy alkilowe w RNA i zasugerowano, że bierze udział w modyfikacji i dojrzewaniu RNA, szczególnie tRNA (OUGLAND i współaut. 2015). Niektóre gatunki prokariotyczne mają więcej niż jedno białko AlkB, a u człowie-

ka znaleziono aż 9 homologów (AlkBH1-8 oraz FTO). Niektóre z tych białek wcale nie oddziałują z DNA, ale są właśnie wyspecjalizowane do modyfikacji RNA. Ludzkie białko AlkBH8 ma domenę metylotransferazy, która metyluje 5-karboksymetylo-urydynę (5cmU) do 5-metylo-karboksymetylo-urydyny (5mcmU) w pierwszej pozycji (woble position) antykodonu tRNA<sup>Gly(UCC)</sup>. Następnie grupa metylowa jest utleniana przez domenę AlkB białka AlkBH8 do hydroksypochodnej (5hmcmU). Taki cykl modyfikacji antykodonu tRNA powoduje stymulację translacji mRNA zawierających kodony komplementarne. Białka AlkB pełnią więc także rolę regulatorów translacji.

### NAPRAWA USZKODZEŃ INDUKOWANYCH PROMIENIOWANIEM UV

Jednym z pierwszych obiektów badań nad uszkodzeniami i naprawą DNA były skutki działania promieniowania UV na organizmy żywe. W ten nurt wpisane są badania Prof. Aziza Sancara, profesora biochemii i biofizyki University of North Carolina School of Medicine, Chapel Hill, USA. Prof. Sancar (ur. w 1946 r.) jest obywatelem Turcji i USA. Większość życia pracował w USA. Opublikował 357 prac naukowych o zasięgu międzynarodowym. Wśród nich były prace stanowiące milowe kroki w rozwoju wiedzy o naprawie DNA oraz roli naprawy w funkcjonowaniu komórki i całych organizmów.



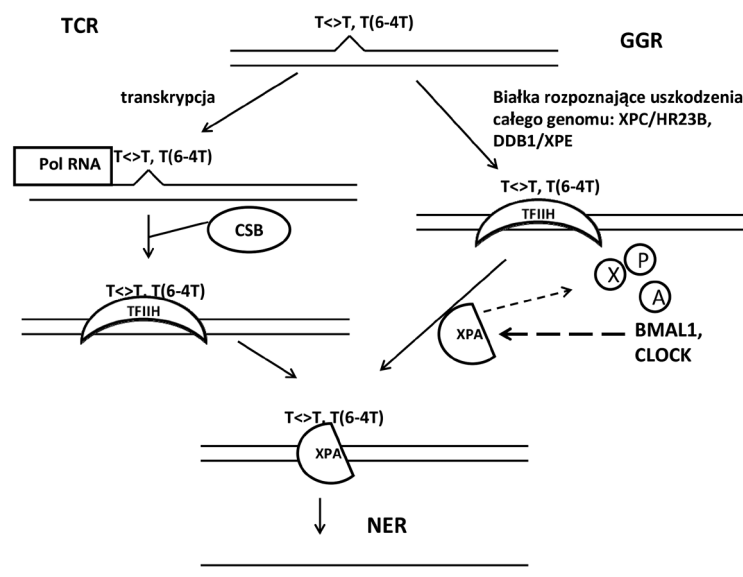
Ryc. 7. Dwie ścieżki naprawy dimerów pirymidynowych i 6-4-fotoproduktów u bakterii, przez fotolizę w procesie fotoreaktywacji oraz na drodze naprawy przez wycięcie nukleotydów (NER).

Wczesne badania Prof. Sancar koncentrowały się na identyfikacji białek uczestniczących w naprawie uszkodzeń indukowanych przez promieniowanie UV. Są nimi głównie dimery pirymidynowe i 6–4 fotoprodukty (Ryc. 7). Mikroorganizmy mają przynajmniej dwa systemy naprawiające te uszkodzenia: fotoreaktywację i system naprawy przez wycinanie nukleotydów (ang. nucleotide excision repair, NER). Prof. Sancar znaczną część swoich badań poświęcił strukturze i funkcji enzymów fotoreaktywacji, fotoliazom. Białka te są obecne u bakterii, niższych eukariontów i roślin, ale nie występują u zwierząt. W skład fotolazy wchodzi specyficzny chromofor, który ulega wzbudzeniu przez światło widzialne. Wzbudzony elektron jest przekazywany na drugą grupę prostetyczną enzymu, FADH<sup>+</sup>, a wzbudzony FADH<sup>+</sup> bierze udział w rozerwaniu pierścienia cyklobutanowego dimeru pirymidynowego lub wiązania kowalencyjnego pomiędzy sąsiadującymi zasadami w 6–4 fotoproducie. *Escherichia coli* ma tylko jeden rodzaj fotolazy. W komórce jest tylko 20 cząsteczek enzymu i działa on powoli. Jednak fotolazy mają ogromne powinowactwo do dimerów pirymidynowych i 6–4 fotoproduktów, a ich aktywność daje się zaobserwować, np. jako obniżenie poziomu mutacji indukowanych światłem UV po naświetleniu bakterii lub drożdży światłem widzialnym, w stosunku do sytuacji, w której po naświetleniu UV komórki rosną w ciemności. Udział fotolazy w usuwaniu uszkodzeń DNA indukowanych UV jest u bakterii i niższych eukariontów stosunkowo niewielki. Jednak u roślin znaczenie tych enzymów w ochronie przed promieniowaniem UV wydaje się być dużo większe. U roślin enzymy te występują licznie; jeden gatunek może mieć nawet 20 różnych fotolaz.

Głównym systemem usuwającym z DNA dimery pirymidynowe i 6–4 fotoprodukty jest system naprawy przez wycinanie nukleotydów (ang. nucleotide excision repair, NER). Poza uszkodzeniami indukowanymi przez UV usuwa także duże addukty zasad DNA, które znacznie odkształcają jego strukturę, a powstają w wyniku interakcji DNA ze środowiskowymi związkami mutagennymi/kancerogennymi, lekami i produktami metabolizmu, takimi jak utlenione kwasy tłuszczowe, żółciowe czy hormony steroidowe (MADDUKURI i współaut. 2007). U bakterii system NER składa się z trzech białek, UvrA, UvrB i UvrC, ale do efektywnej naprawy potrzebne są też białka towarzyszące, takie jak helikaza UvrD. Białko UvrA jest swoistym czujnikiem uszkodzeń DNA i wraz z UvrB ślizga się po DNA w poszukiwaniu „odkształceń”. Po znalezieniu zmienionej struktury DNA wiąże się z nią silniej i podjednostka UvrA

jest zamieniana na UvrC. Kompleks UvrB/C nacina nić DNA trzy nukleotydy od uszkodzenia od strony 3' i 7–9 nukleotydów od strony 5' uszkodzenia. W ten sposób wycinane jest ok. 11–13 nukleotydów, wśród których znajduje się uszkodzona zasada. Wycięty fragment oddysocjowuje od DNA dzięki aktywności helikazy UvrD, powstała luka uzupełniana jest przez polimerazę DNA, a naprawiona nić zostaje scalona przez ligazę DNA (Ryc. 7).

System NER to jedyny mechanizm, za pomocą którego komórki zwierząt mogą się bronić przed szkodliwym działaniem promieniowania słonecznego. Jak ważny jest ten proces dla przetrwania organizmów żywych świadczy odkrycie w latach 90. XX w. dodatkowego mechanizmu, który specyficznie chroni nić DNA aktualnie podlegającą transkrypcji. Badania Profesorów Philipa Hanawalta, Vilhelma Bohra (BOHR i współaut. 1985), a także niezależnie Aziza Sancar (SELBY i SANCAR 1994) doprowadziły do odkrycia specyficznego białka Mfd, które jest czujnikiem zatrzymania przez uszkodzenia DNA polimerazy RNA, a więc transkrypcji. Polimerazy RNA są wprawdzie mniej wrażliwe na obecność nieprawidłowych zasad w DNA, ale obecność dużych adduktów (np. benzo[a]pirenu, składnika dymu tytoniowego), dimerów pirymidynowych, niektórych alkilowanych zasad DNA (np. 3-metyloadeiny) czy utlenionych pirymidyn (np. glikolu tyminy) hamuje syntezę RNA i polimeraza RNA zatrzymuje się przed uszkodzoną zasadą. Takie bloki transkrypcyjne są u bakterii monitorowane przez białko Mfd, które przylacza się do miejsca „przystanku” polimerazy RNA, „spycha” ją z matrycy i rekrutuje białka systemu NER (Ryc. 8). Po naprawie uszkodzonego fragmentu matrycy transkrypcja może być kontynuowana lub zaczyna się od nowa. Jest to mechanizm bardzo szybki i konserwowany od bakterii do człowieka. U człowieka naprawa związana z transkrypcją (ang. transcription-coupled repair, TCR) jest aktywowana w ciągu minut, podczas gdy naprawa miejsca, które aktualnie nie podlega transkrypcji (ang. global genome repair, GGR) wymaga godzin. Mechanizm taki jest konieczny prawdopodobnie dlatego, że zahamowanie transkrypcji bardzo szybko prowadzi do programowanej śmierci komórki czyli apoptozy. U człowieka znane jest genetycznie uwarunkowane schorzenie potwierdzające tę tezę. Czujnikiem hamowania transkrypcji przez uszkodzenia DNA jest białko CSB, którego brak w zespole Cockayne'a (CS). Jest to schorzenie, w którym wskutek apoptozy wielu komórek następuje upośledzenie wzrostu i rozwoju dziecka, a także przedwczesne starzenie się i śmierć ok. 12 roku



Ryc. 8. Identyfikacja uszkodzeń, szlaki inicjacji naprawy i regulacja naprawy fotouszkodzeń UV u ludzi.

życia. Chorzy na ogół nie mają skłonności do nowotworzenia, chociaż znana jest mutacja powodująca niewielką dysfunkcję białka, więc ludzie nią obciążeni dożywają ok. 50 roku życia przekazując mutację dzieciom. U tych osób ryzyko nowotworów skóry jest podwyższone. Te obserwacje sugerują, że nawet w nieobecności zewnętrznych czynników uszkadzających DNA, komórka sama wytwarza wiele produktów, które mogą hamować replikację i transkrypcję, a których obecność wymaga naprawy. Do takich produktów metabolizmu niewątpliwie należą reaktywne formy tlenu, produkty peroksydacji lipidów, związki alkilujące powstające masowo w stanach zapalnych czy hormony steroidowe lub kwasy żółciowe. W TCR u człowieka zaangażowane są dwa białka, CSB i CSA. Po zatrzymaniu transkrypcji białko CSB rekrutuje białka systemu NER do uszkodzonego miejsca, co rozpoczyna naprawę nici podlegającej transkrypcji. CSB jest uszkodzone u ok. 80% pacjentów CS. CSA jest ligazą ubikwitynową, która ułatwia proteasomalną degradację polimerazy RNA i przez to ułatwia TCR.

Praca badawcza Prof. Sancar znacząco wzbogaciła też wiedzę na temat głównej ścieżki systemu NER, tzn. mechanizmu naprawy całego genomu, GGR. Uszkodzenie DNA jest rozpoznawane przez kompleks XPC/HR23B lub XPE/DDR (XP, łac. *Xeroderma pigmentosum*; C, E – grupy C, E). Białka te rekrutują ogólny czynnik transkrypcyjny TFIID, w którego skład wchodzi dwie helikazy, XPB, odwijająca nić DNA od strony 5' uszkodzenia oraz XPD odwijająca nić od strony 3' uszkodzenia. Ich aktywność powoduje rozwinięcie nici DNA na długości

27–32 nukleotydów. Następnie do miejsca uszkodzonego rekrutowane jest białko XPA, które wiąże się do uszkodzenia potwierdzając obecność uszkodzonej zasady DNA i ułatwiając oddysocjowanie TFIID oraz przyłączenie endonukleaz, które wycinają 27–32 nukleotydowy fragment DNA zawierający uszkodzoną zasadę. Kompleks ERCC1/XPF przecina nić DNA 5–7 nukleotydów od strony 5' uszkodzenia, zaś endonukleaza XPG 18–25 nukleotydów od strony 3' uszkodzenia. Następnie do wolnego końca 3' w powstałej luce rekrutowany jest aparat replikacyjny, tzn. białka RFC, PCNA i polimeraza DNA, które uzupełniają brakujący fragment DNA, a na koniec ligaza scala naprawianą nić. W populacji ludzkiej istnieją mutacje w białkach systemu NER, których obecność wiąże się albo ze zwiększonym ryzykiem powstawania nowotworów skóry albo z różnymi zmianami rozwojowymi i degeneracyjnymi. Mutacje te powodują rozwój schorzenia o nazwie *Xeroderma pigmentosum* (pol. żółta pergaminowa skóra). Choroba ta objawia się nadwrażliwością na światło UV, nienormalnie cienką skórą o strukturze pergaminu i ok. 1000-krotnie zwiększonym ryzykiem powstania raka skóry, głównie w miejscach ekspozowanych na światło. U niektórych chorych obserwuje się także katarakty i zmiany neurologiczne. Zaobserwowano istnienie siedmiu grup komplementacyjnych, które obrazują funkcje głównych białek systemu NER. Są to: XPA, XPB, XPC, XPD, XPF, XPG, XPE. Należy podkreślić, że mutacje te nie znoszą całkowicie aktywności białek NER, gdyż białka te są zaangażowane także w transkrypcję i ich brak prowadziłby do śmierci organizmów. Mutacje znajdują się w różnych

miejscach białek i powodują różne objawy choroby, a czasem nawet odmienne jednostki chorobowe. Na przykład niektóre mutacje w białkach XPB i XPD mogą prowadzić do objawów obserwowanych w trichotiodystrofii. Jest to choroba, w której spowolniony jest proces transkrypcji (tzw. choroba transkrypcyjna) wskutek mutacji jednego z białek kompleksu czynnika TFIIH, białka p8 lub inaczej TTD. Mutacja w tym białku powoduje łatwiejszą degradację czynnika TFIIH przez proteasom, a w konsekwencji zwiększoną apoptozę komórek. Białka XPB i XPD wchodzi w skład czynnika TFIIH i niektóre ich mutacje mogą wywołać podobny skutek co mutacje TTD. Objawami Trichotiodystrofii są krótkie łamliwe włosy wskutek braku syntezy białek zawierających cysteinę, łuskowata skóra i często zmiany rozwojowe, ale brak skłonności do nowotworzenia.

Zauważono też istnienie ósmej grupy komplementacyjnej XP, tzw. *Xeroderma pigmentosum variant*, w której wszystkie białka systemu NER działają prawidłowo, ale brak alternatywnej polimerazy DNA  $\eta$  (grec. eta), która może syntetyzować DNA naprzeciw uszkodzeń UV wstawiając prawidłowe nukleotydy. To sugeruje, że skutki nieusuniętych fotouszkodzeń mogą być niwelowane przez inkorporację naprzeciw prawidłowych nukleotydów, a proces syntezy DNA przez Pol  $\eta$  jest równie ważny jak wycinanie dimerów pirymidynowych przez system NER.

Kolejnym bardzo ważnym problemem, który w swoich badaniach podjął Prof. Sancar była regulacja aktywności systemu NER w cyklu dobowym. Wiele procesów biologicznych, takich jak odżywianie czy sen, odbywa się rytmicznie, na ogół w 24-godzinny cykl, jednak cykl ten może być zmieniany przez czynniki zewnętrzne takie jak światło lub inne sygnały. Centralny zegar biologiczny umiejscowiony jest w podwzgórzu mózgu, ale prawie we wszystkich tkankach ssaków działają zegary obwodowe. Dobową regulację zaobserwowano dla znacznej liczby genów zaangażowanych w postęp cyklu komórkowego i wzrost, metabolizm, przeżycie, a także odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA. Badania Prof. Sancara pokazały, że naprawa uszkodzeń DNA indukowanych światłem UV również podlega regulacji w cyklu dobowym (KANG i współaut. 2009). Białkiem krytycznym dla tego procesu jest XPA. Ma ono krótki okres półtrwania, co pozwala na regulację jego ilości w przeciągu doby. U myszy ilość XPA jest najniższa o 4:00 rano, zaś najwyższa o 16:00. Rytm aktywności całego systemu NER jest wyznaczany rytmem XPA, a więc naprawa dimerów pirymidynowych i 6–4 fotoproduktów jest najmniej wy-

dajna o 4 rano, a najbardziej o 4 po południu. Co ciekawe, replikacja DNA również waha się w rytmie dobowym, ale przeciwnie w stosunku do aktywności NER, tzn. synteza DNA zachodzi szybciej rano niż po południu. Taki schemat może sugerować łatwiejsze utrwalanie mutacji indukowanych fotouszkodzeniami UV rano niż wieczorem, a w konsekwencji różną podatność na indukcję nowotworów skóry przez światło słoneczne w zależności od pory dnia. Rzeczywiście badania Prof. Sancara udowodniły, że liczba i wielkość nowotworów skóry indukowanych u myszy światłem UV były wyższe, kiedy myszy były naświetlane rano niż wieczorem (GADDAMEEDHI i współaut. 2011).

Dobowa regulacja procesów komórkowych i organizmalnych jest dość skomplikowana i odbywa się poprzez kontrolę transkrypcji genów oraz stabilności białek. Centralnymi regulatorami aktywującymi transkrypcję genów sterowanych w rytmie dobowym są białka CLOCK i BMAL1, które aktywują transkrypcję genów poprzez wiązanie się ze specyficznymi sekwencjami w regionach promotorowych genów docelowych, tzw. E-box. Do genów indukowanych przez CLOCK i BMAL1 należą kryptochromy CRY1 i 2, a także PER1-3. Białka CRY i PER po translokacji do jądra hamują transkrypcję genów indukowanych przez CLOCK/BMAL1, w tym własnych genów, są więc kluczowymi negatywnymi regulatorami zegara biologicznego. Białka CRY 1 i 2 mają krótki okres półtrwania, a regulacja ich degradacji odbywa się przez poliubikwitynację i rozkład w proteasomie (MITRA 2011). XPA jest również białkiem o krótkim okresie półtrwania regulowanym przez degradację proteasomalną regulowaną w rytmie dobowym przez kryptochromy. Co ciekawe, kryptochromy i fotolizy wykazują znaczącą homologię sekwencji i struktury, należąc do tej samej dużej rodziny białek (LIN i TODO 2005). GEHRING i ROSBASH (2003) postulowali, że kryptochromy pierwotnie powstały w celu fotonaprawy uszkodzeń UV. W trakcie ewolucji straciły aktywność fotolizy, ale nabyły funkcje sygnalizacyjne zegara biologicznego. Zatem NER, który pozostał jedynym mechanizmem naprawy uszkodzeń UV u ssaków, nadal należy do rodziny fotolizy, chociaż pośrednio (MITRA 2011).

Badania Prof. Sancara (GADDAMEEDHI i współaut. 2011) sugerują, że ludzie powinni ograniczyć swoją ekspozycję na słońce do godzin, kiedy naprawa uszkodzeń UV jest minimalna. Rytm dobowy u człowieka wydaje się być odwrotny do rytmu myszy, tzn. rano obserwuje się najwyższą aktywność NER, a wieczorem najniższą. Czyżby więc ekspozycja na wieczorne słońce była bardziej

szkodliwa niż na poranne? Jest to niewątpliwie poważny problem medyczno-społeczny, chociaż należy wziąć pod uwagę, że wiele innych czynników może mieć wpływ na działanie rakotwórcze ekspozycji na słońce u ludzi.

### IMPLIKACJE DLA MEDYCyny I NAUK BIOMEDYCZNYCH

Badania nad naprawą DNA zostały docenione głównie ze względu na fakt, że ich rezultaty znalazły przełomowe zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej. Największym problemem terapii jest brak lub nie dość ścisła selektywność, co powoduje poważne skutki uboczne, które są trudne do zniesienia dla pacjentów. Nadzieją na stworzenie selektywnej metody leczenia raka są inhibitory polimerazy poli(ADP-rybozy)1 (PARP1). Polimeraza poli(ADP-rybozy)-1 (PARP-1) jest jądrowym enzymem uczestniczącym w naprawie uszkodzeń DNA. Uczestniczy również w remodelingu chromatyny, regulacji transkrypcji i śmierci komórkowej. Ekspresja i aktywność PARP-1 odgrywają kluczową rolę w komórkowej wrażliwości na stres oksydacyjny oraz w utrzymywaniu stabilności genomu. Enzym ten katalizuje reakcję poli(ADP-rybozylacji), która jest potranslacyjną modyfikacją białek zachodzącą w jądrze komórkowym. PARP-1 jest rekrutowany do jedno- i dwuniciowych przerw DNA powstających po wycięciu uszkodzonej zasady przez glikozylazy DNA, jej aktywność wzrasta aż do 200 razy w odpowiedzi na zetknięcie z wolnymi końcami DNA i syntetyzuje łańcuchy poli(ADP-rybozy) (PAR) na białkach, spośród których najważniejsze to PARP-1 i niektóre inne białka naprawcze oraz histony. PARP-1 uczestniczy następnie w rekrutacji innych białek systemu naprawy przez wycinanie zasad. Zahamowanie aktywności PARP-1 powoduje zahamowanie procesów naprawy jednoniciowych przerw DNA (ang. single-strand break, SSB). W czasie replikacji polimeraza DNA zatrzymuje się przed przerwą w nici, przez co SSB zostaje zamienione w dwuniciową przerwę (ang. double-strand break, DSB). W dzielących się komórkach (faza S) DSB są naprawiane przez rekombinację homologiczną (HR). Niektóre nowotwory niosą mutacje w genach, których produkty uczestniczą w HR. Najbardziej znanym przykładem są pacjenci z mutacjami w genach *BRCA1* lub *BRCA2*. Białka te są zaangażowane w HR, a ich brak powoduje niemożność naprawy DSB przez dokładny system HR. To generuje mutacje, które mogą powodować śmierć komórki lub rozwój nowotworu.

Pacjenci z mutacją w genach *BRCA1* lub *2* mają predyspozycje do rozwoju raka pier-

si, jajnika, endometrium lub trzustki. Osoby takie są heterozygotami, więc jedna kopia genu wystarcza do prawidłowego przebiegu HR. W trakcie transformacji nowotworowej dochodzi do utraty lub mutacji tej jedynej funkcjonującej kopii genu. W związku z tym, komórki nowotworowe nie mogą naprawiać DSB. Zastosowanie inhibitorów PARP1 powoduje zahamowanie naprawy SSB, nagromadzenie DSB i śmierć komórki. Oczywiście tylko komórek bez aktywnej HR, czyli komórek nowotworowych, w których utraczona została jedyna prawidłowa kopia genu *BRCA1* lub *2*. Wszystkie inne komórki pacjenta z mutacją w jednej kopii *BRCA1/2* będą funkcjonowały normalnie. U pacjentów z dziedziczną mutacją *BRCA1/2* inhibitory PARP1 można stosować jako jedyny środek leczniczy (monoterapia).

Gdy produkty dwóch genów leżą na jednym szlaku, a prawidłowe funkcjonowanie choćby jednego z nich wystarczy do przeżycia komórki, wyłączenie obydwu genów spowoduje jej śmierć. Zjawisko takie nazywamy sprzężoną letalnością (ang. synthetic lethality). Nowotwory charakteryzują się bardzo dużą liczbą mutacji w genach krytycznych, czyli takich, które sterują proliferacją, przeżyciem i śmiercią oraz zachowaniem integralności genomu, tak więc mają niejako naturalnie wyłączony któryś z genów krytycznych. Obecnie w laboratoriach całego świata poszukuje się genów z nimi sprzężonych, aby opracować odpowiednie inhibitory, a w konsekwencji nowe, doskonalsze i mniej obciążające dla pacjenta terapie przeciwnowotworowe.

Obecnie opracowano 18 inhibitorów PARP1 (KLUZEK i współaut. 2012). Wszystkie działają na zasadzie hamowania kompetycyjnego. Zastosowanie inhibitorów PARP1 w komórkach z dysfunkcją HR znacznie obniża ich żywotność, a potraktowane czynnikami uszkodzającymi DNA są ok. 100-1000 razy bardziej wrażliwe na czynniki uszkodzające. Kilka inhibitorów PARP1 jest w fazie prób klinicznych, a jeden już wprowadzono do rutynowego leczenia chorych nowotworowych z mutacjami *BRCA1/2* oraz chorych źle rokujących.

Inhibitory PARP1 mogą być także stosowane w innych nowotworach, gdyż w wielu typach występują mutacje genów związanych z homologiczną rekombinacją. Z powodzeniem były stosowane w badaniach klinicznych w raku jajnika i prostaty. Zaburzenia ekspresji, regulacji lub mutacje genów HR odnotowano u prawie połowy pacjentek z surowiczym rakiem jajnika. Dotyczyły one głównie genów *BRCA1* i *BRCA2* (20%), jednak wykazano też m.in. hipermetylację *RAD51C* (3%), mutacje *ATM* lub *ATR* (2%)

oraz mutacje współdziałających z HR genów anemii Fanconiego, *FANC* (5%). Mutacje genów rekombinacji homologicznej, takich jak *RAD54* i *CtIP* odnotowano także w chłoniakach Hodgkina i nowotworach okrężnicy, a *RAD51B* w tłuszczaku oraz mięśniaku gładkokomórkowym macicy (KLUZEK i współaut. 2012).

Ostatnie badania sugerują, że stosowanie inhibitorów PARP1 można będzie także rozszerzyć na chorych z mutacjami w innych genach. Jednym z nich jest gen *PTEN*. Jest to fosfataza katalizująca hydrolizę fosfatydylinozytolo-(3,4,5)-trisfosforanu (PIP3) do fosfatydylinozytolo-(4,5)-bisfosforanu (PIP2), co hamuje sygnał przeżycia. Gen *PTEN* zmutowany jest w ok. 30% glejaków mózgu, raków endometrium, w ok. 12% czerniaków i raków prostaty, a w mniejszym procencie także w innych nowotworach. Jak większość białek komórkowych *PTEN* ma także inne funkcje. W cytoplazmie może ulegać ubikwitynacji i w tej formie zostaje przeniesiony do jądra, gdzie łączy się z czynnikiem transkrypcyjnym E2F1 i razem biorą udział w transkrypcji jednego z genów HR, *RAD51C*. Dla chorych z mutacją w genie *PTEN* inhibitory PARP1 mogą więc być wybiórczym czynnikiem terapeutycznym.

Podobnie, ostatnio okazało się, że być może zastosowanie inhibitorów PARP1 będzie można rozszerzyć także na raka jelita grubego. Wprawdzie mutacje w genach *BRCA1* lub 2 praktycznie nie występują w tym typie nowotworu, ale często występuje wariant splicingowy białka *BARD1*, który uniemożliwia tworzenie prawidłowego kompleksu *BRCA1* podczas naprawy HR. Komórki z takim typem białka *BARD1* mają obniżoną naprawę HR, więc są wrażliwe na inhibitory PARP1.

Ostatnio zaobserwowano również, że bardzo dobrym celem terapii przeciwnowotworowej mogłaby być endonukleaza miejsc pozbawionych zasad w DNA, *APE1*. Opracowano inhibitory tego enzymu, które skutecznie wspomagają niszczenie różnych komórek rakowych, np. jednego z najtrudniejszych w leczeniu raka mózgu, glejaka (BAPAT i współaut. 2010).

Uhonorowanie nagrodą Nobla trzech badaczy za odkrycia mechanistyczne w różnych szlakach naprawy DNA było swoistym hołdem dla tej ważnej dziedziny, która pokazuje mechanizmy zapewniające integralność genomu i wierne przekazywanie informacji z pokolenia na pokolenie. Z drugiej strony, wiedza o podstawowych mechanizmach naprawy DNA zaczyna być wykorzystywana do stworzenia nowoczesnych terapii przeciwnowotworowych, które selektywnie mogłyby celować wyłącznie w komórki nowotworowe

bez obciążania organizmu toksycznymi substancjami lub opracowania skutecznej profilaktyki chorób nowotworowych.

#### STRESZCZENIE

W 2015 r. Nagroda Nobla w dziedzinie chemii została przyznana za badania mechanistyczne nad naprawą DNA Paulowi Modrichowi, Tomasowi Lindahlowi i Azizowi Sancarowi. Paul Modrich pracuje w Howard Hughes Medical Institute oraz Duke University School of Medicine, Durham, USA. Nagrodą zostały wyróżnione jego prace nad naprawą źle dopasowanych zasad, które powstają głównie podczas replikacji, zaś ten typ naprawy jest „pierwszą linią ochrony” stabilności genomu. Tomas Lindahl jest profesorem chemii medycznej i fizycznej, emerytowanym dyrektorem Cancer Research UK London Research Institute, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Wielka Brytania. Nagrodę Nobla otrzymał za odkrycia w dziedzinie naprawy przez wycięcie zasady usuwającej z DNA niewielkie uszkodzenia, głównie oksydacyjne i alkilacyjne. Aziz Sancar jest profesorem biochemii i biofizyki na University of North Carolina School of Medicine, Chapel Hill, USA. Nagrodę Nobla otrzymał za osiągnięcia w dziedzinie naprawy przez wycięcie nukleotydu. System ten usuwa z DNA duże modyfikacje takie jak dimery pirymidynowe indukowane światłem ultrafioletowym. Badania uczonych stworzyły podwaliny pod zrozumienie mechanizmu ewolucji światła ożywionego, a także procesów nowotworowych i opracowanie nowoczesnych terapii.

#### LITERATURA

- ANNA L., KOVÁCS K., GYORFFY E., SCHOKET B., NAIR J., 2011. *Smoking-related O4-ethylthymidine formation in human lung tissue and comparisons with bulky DNA adducts*. *Mutagenesis*. 26, 523-527.
- ASAGOSHI K., YAMADA T., TERATO H., OHYAMA Y., MONDEN Y., ARAI T., NISHIMURA S., ABURATANI H., LINDAHL T., IDE H., 2000. *Distinct repair activities of human 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase and formamidopyrimidine DNA glycosylase for formamidopyrimidine and 7,8-dihydro-8-oxoguanine*. *J. Biol. Chem.* 275, 4956-4964.
- BAPAT A., GLASS L. S., LUO M., FISHEL M. L., LONG E. C., GEORGIADIS M. M., KELLEY M. R., 2010. *Novel small-molecule inhibitor ofapurinic/apyrimidinic endonuclease 1 blocks proliferation and reduces viability of glioblastoma cells*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334, 988-998.
- BOHR V. A., SMITH C. A., OKUMOTO D. S., HANAWALT P. C., 1985. *DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall*. *Cell* 40, 359-369.
- FEKETE A., KENESI E., HUNYADI-GULYAS E., DURGO H., BERKO B., DUNAI Z. A., BAUER P. I., 2012. *The guanine-quadruplex structure in the human c-myc gene's promoter is converted into B-DNA form by the human poly(ADP-ribose)polymerase-1*. *PLoS One* 7, e42690.
- GADDAMEEDHI S., SELBY C. P., KAUFMANN W. K., SMART R. C., SANCAR A., 2011. *Control of skin cancer by the circadian rhythm*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 18790-18795.
- GEIER G. E., MODRICH P., 1979. *Recognition sequence of the dam methylase of Escherichia coli*

- K12 and mode of cleavage of Dpn I endonuclease.* J. Biol. Chem. 254, 1408-1413.
- GEHRING W., ROSBASH M., 2003. *The coevolution of blue light photoreception and circadian rhythms.* J. Mol. Evol. 57(Suppl. 1), S286-S289.
- GILLJAM K. M., FEYZI E., AAS P. A., SOUSA M. M., MÜLLER R., VÅGBØ C. B., CATTERALL T. C., LI-ABAKK N. B., SLUPPHAUG G., DRABLØS F., KROKAN H. E., OTTERLEI M., 2009. *Identification of a novel, widespread, and functionally important PCNA-binding motif.* J. Cell Biol. 186, 645-654.
- KANG T. H., REARDON J. T., KEMP M., SANCAR A., 2009. *Circadian oscillation of nucleotide excision repair in mammalian brain.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 2864-2867.
- KANTARTZIS A., WILLIAMS G. M., BALAKRISHNAN L., ROBERTS R. L., SURTEES J. A., BAMBARA R. A., 2012. *Msh2-Msh3 interferes with Okazaki fragment processing to promote trinucleotide repeat expansions.* Cell Rep. 2, 216-222.
- KLUZEK K., BIAŁKOWSKA A., KOCZOROWSKA A., ZDZIENICKA M. Z., 2012. *Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in BRCA1/2 cancer therapy.* Postepy Hig. Med. Dosw. 66, 372-384.
- LI S. K., MARTIN A., 2016. *Mismatch repair and colon cancer: mechanisms and therapies explored.* Trends Mol. Med. 22, 274-289.
- LIN C., TODO T., 2005. *The cryptochromes.* Genome Biol. 6, 220.
- LINDAHL T., 2000. *Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair.* Mutat. Res. 462, 129-135.
- LINDAHL T., 2013. *My journey to DNA repair.* Genom. Proteom. Bioinformat. 11, 2-7.
- MADDUKURI L., DUDZIŃSKA D., TUDEK B., 2007. *Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 4. The role of nucleotide excision DNA repair (NER) system in mammalian cells.* Acta Biochim Pol. 54, 469-482.
- MITRA S., 2011. *Does evening sun increase the risk of skin cancer?* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 18857-18858.
- MODRICH P., 2006. *Mechanisms in eukaryotic mismatch repair.* J. Biol. Chem. 281, 30305-30309.
- OUGLAND R., ROGNES T., KLUNGLAND A., LARSEN E., 2015. *Non-homologous functions of the AlkB homologs.* J. Mol. Cell Biol. 7, 494-504.
- SEDGWICK B., LINDAHL T., 2002. *Recent progress on the Ada response for inducible repair of DNA alkylation damage.* Oncogene 21, 8886-8894.
- SELBY C. P., SANCAR A., 1994. *Mechanisms of transcription-repair coupling and mutation frequency decline.* Microbiol. Rev. 58, 317-329.

**KOSMOS Vol. 65, 3, 309-322, 2016**

#### DIFFERENT FACES OF DNA REPAIR – NOBEL PRICE 2015 IN CHEMISTRY

BARBARA TUDEK

*Institute of Biochemistry and Biophysics PAS, Institute of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, e-mail: tudek@ibb.waw.pl*

#### Summary

The Nobel Prize in chemistry for 2015 was awarded to Paul Modrich, Tomas Lindahl and Aziz Sancar for mechanistic studies on DNA repair. Paul Modrich works in Howard Hughes Medical Institute and Duke University School of Medicine, Durham, USA. The prize has been awarded for his work on Mismatch Repair, which removes mismatched nucleotides formed mainly during replication and is the “first line of defense” of genome stability. Tomas Lindahl is a professor of medical and physical chemistry, emeritus director of Cancer Research UK London Research Institute, Clare Hall Laboratories, South Mimms, United Kingdom. The Nobel Prize was awarded to him for discoveries on Base Excision Repair, which removes from the DNA small lesions, mainly alkylated and oxidatively formed damages. Aziz Sancar is a professor in biochemistry and biophysics at University of North Carolina School of Medicine, Chapel Hill, USA. He was awarded for the achievements on Nucleotide Excision Repair. The system removes from the DNA big lesions, such as pyrimidine dimers induced by ultraviolet light. Studies of these researchers made a basis for understanding of the evolution of living world as well as carcinogenic process and for elaboration of novel therapies.