

C. NAPRAWA USZKODZEŃ DNA

1. SYSTEM NAPRAWY NHEJ

Naprawa dwułańcuchowych pęknięć DNA rozpoczyna się od detekcji uszkodzenia przez polimerazy poli ADP-rybozy (PARP), przyłączenie białek wiążących RNA i remodulujących chromatynę, ekspresję regulacyjnych RNA i przynajmniej przejściowe przyłączenie kompleksu MRN, kinazy Atm.p i kompleksu białek KU i kinazy Prkdc.p/Dnapkcs.p.

Te reakcje znane jako odpowiedź na uszkodzenie DNA (*DNA damage response* – DDR) już zostały opisane. Skutkiem tych reakcji jest:

- przyłączenie polimeraz ADP-rybozy PARP, stabilizacja i ochrona przed nukleazami końców dwułańcuchowej przerwy DNA,
- przyłączenie białek wiążących RNA i tworzenie „stref ograniczonych” otaczających DSB (przerwę dwułańcuchową),
- korekta braku kompatybilności końców DSB, zwłaszcza defosforylacja końców 3' i fosforylacja końców 5',
- wybór typu naprawy: cNHEJ, altNHEJ/MMEJ, HR lub SSA.

a. Naprawa typu cNHEJ

cNHEJ („kanoniczne” łączenie końców bez wyszukiwania homologicznych sekwencji) jest najszybszą metodą reperacji pęknięć dwułańcuchowych DNA.

W przypadku DSB z „tępyimi” końcami lub „zgodnymi” końcami (spowodowanymi na przykład przez enzymy restrykcyjne) reperacja wymaga tylko obecności dimeru KU (Xrcc5.p i Xrcc6.p), DNA ligazy 4, białek Xlf.p/Nhej1.p i Xrcc4.p. Także brak enzymów PARP i brak syntezy PAR ogranicza, ale nie znosi naprawy typu cNHEJ.

W przypadku skomplikowanych pęknięć dwułańcuchowych (DSB z wystającymi końcami, z fosforylacją końca 3' i defosforylacją końca 5', z ubytkami sekwencji, „odstającymi” końcami, strukturami „szpilki do włosów” lub uszkodzeniami oksydacyjnymi) w mechanizmie cNHEJ uczestniczą także kinazy: Atm.p i Dnapkcs.p/Prkdc.p, nukleazy: DclrelC.p/Artemis.p, DNA polimerazy: PolL.p i PolM.p, i kinazy polinukleotydowe (PNK). Mutacje genu DCLRE1C powodują wrodzony zespół poważnego braku odporności (**SCID typu OMENN**).

W rekombinacji V(D)J genów immunoglobulinowych bierze udział podobna do DclrelC.p egzonukleaza DclrelB.p/Apollo.p. Drożdże *S. cerevisiae* nie mają w ogóle kinaz typu Prkdc.p/Dnapkcs.p i nukle-

azy DclrelC.p. Podobną egzonukleazą drożdży jest białko Snm1.p.

cNHEJ jest naprawą typową dla fazy G1 cyklu. W fazie S cyklu cNHEJ jest powodem niestabilności genomowej i często śmierci komórek. Naprawa typu cNHEJ zachodzi bardzo szybko, nawet przy braku kompatybilności końców DSB i nie jest łatwo ustalić kolejność procesów w niej zachodzących. Wydaje się, że można odróżnić 6 etapów w naprawie cNHEJ:

1. Wykrycie uszkodzenia i tworzenie „strefy ograniczającej” zostało opisane uprzednio. Białka Parp1.p i Parp3.p wykrywają DSB i inicjują tworzenie łańcuchów PAR. Zwykle wiązanie Parp1.p i białek KU jest niestabilne i białka konkurują o przyłączenie do końców DSB.

Acetylacja zwiększa wiązanie Parp1.p i blokada deacetylaz przez trichostatynę A stabilizuje Parp1.p w DSB i hamuje wiązanie dimeru KU. Przejściowe wiązanie Parp1.p i synteza PAR ma znaczenie dla przyłączania białek wiążących RNA, kinazy Atm.p i kompleksu MRN.

PAR wiąże też białko remodulujące chromatynę Chd2.p i białko szkieletowe kompleksu cNHEJ – Xrcc4.p. Chd2.p przejściowo rozluźnia chromatynę i wymienia w regionalnych nukleosomach histon H3 na izoformę H3.3. Histon H3.3 ułatwia tworzenie kompleksu reperacyjnego cNHEJ, ale należy zaznaczyć, że brak Parp1.p i Chd2.p tylko częściowo obniża tę reperację.

2. Decyzja o typie reperacji. Regulacja resekcji końców 5' DSB zachodzi jednocześnie z wyborem typu naprawy tego uszkodzenia DNA. Opisano kilka mechanizmów tej regulacji:

- Obecność i aktywacja kinazy Atm.p powoduje fosforylację białka 53bp1.p, co zwiększa wiązanie białka Rif1.p (*Rap1.p interacting factor 1*) i białek Ptip.p (*PAX transactivation domain interacting protein*). Stymuluje to naprawę typu cNHEJ. Brak białek 53bp1.p i Rif1.p aktywuje nukleazy CtIP.p/Rbbp8.p i Mre11.p, a także kinazę Plk3.p. Hamuje to naprawę cNHEJ w fazie G1, ale nie może aktywować długich resekcji i naprawy HR (brak aktywności nukleazy Exo1.p). Aktywacji ulega naprawa altNHEJ/MMEJ.
- Vcp.p/Cdc48 (*valosin containing protein*) usuwa białko L3mbtL1.p z H4K20me2 i umożliwia wiązanie 53bp1.p. Kofaktorami tego procesu są: Nplc4.p i Ufd1.p – białka rozpoznające ubikwitynę.

- Brak Cdk2.p w fazie G1 jest ważny dla aktywacji 53bp1.p – Rif1.p i dla zahamowania nukleaz resekujących 5' końce DSB.
- Acetylacja histonów, Blm.p i Rbbp8.p/CtIp.p hamują wycinanie końca 5' DSB i aktywują proces cNHEJ. Inhibitory deacetylaz histonów (jak na przykład trichostatyna A) stabilizują Parp1.p w DSB, hamują naprawę cNHEJ i aktywują naprawę alt-NHEJ.
- Niski poziom Brcal.p w fazie G1 skutkuje brakiem kompleksu Brcal.p – Rbbp8.p, który jest odpowiedzialny za stymulację resekcji końca 5' DSB i reperację typu HR.
- Przejściowa kondensacja chromatyny przez aktywację H3K9 metylotransferazy Prdm2.p aktywuje resekcję końców i hamuje cNHEJ.
- Obecność białka Mad2L2.p (*mitotic spindle assembly factor 2 like 2*) hamuje resekcję 5' końca DSB i aktywuje cNHEJ.

3. Wiązanie heterodimeru KU (Xrcc5.p/KU80.p i Xrcc6.p/KU70.p). Dimer KU tworzy pierścień otaczający dsDNA i ślizgający się wzdłuż cząsteczki DNA. Dimer KU ma aktywność 5'-deoksurybozo/AP liazy, usuwającej miejsca pozbawione zasad z końca 5' DSB.

Helikazy Wrn.p i RecqL1.p stymulują wiązanie dimeru KU, a potem stymulują nukleazy korygujące niedopasowania (jak Artemis.p). Helikaza Wrn.p jest też 3'-5' egzonukleazą, ale jej rola nie jest w pełni wyjaśniona.

4. Naprawa niekompatybilnych końców DSB ma miejsce w czasie przyłączenia dimeru KU lub bezpośrednio po tym przyłączeniu. Tępe końce i kompatybilne końce ligowane są bez żadnej zmiany. Setmar.p/Metnaza jest wiązana przez Prpf19.p/Pso4.p (*pre-mRNA processing factor*) i lokalizowana w regionie DSB. Metnaza metyluje histon H3 (H3K4 i H3K36), co rozluźnia chromatynę, promuje naprawę końców i zwiększa cNHEJ. Najczęstszymi uszkodzeniami DNA w miejscu DSB są:

- Fosforylacja końca 3' usuwana jest przez Pnpk.p (polinukleotydową fosfatazę/kinazę).
- Obecność grup fosfoglikolowych w końcach 3' DSB. Są one usuwane przez Tdpl.p (DNA fosfodiesteraza tyrozylowa) i zamieniane na reszty 3' fosforanowe.
- Obecność grup hydroksylowych w końcach 5' DSB. Są one usuwane i zamieniane na reszty 5' fosforanowe przez Pnpk.p.
- Obecność „czapczek” DNA 3'-pp-5'G na końcach DSB jest zwykle usuwana przez hydrolazę diadenozyno polifosforanu Aptx.p (aprataksynę).

Aptx.p bierze udział w reperacji SSB i DSB (wiąże bezpośrednio Xrcc1.p i Xrcc4.p). Mutacje genu APTX powodują zespół EAOH (*early ataxia, oculomotor apraxia and hypoalbuminemia*).

- Usunięcie 5' wystających końców zależy od aktywności 5'-endonukleazy Dclre1C.p/Artemis.p. Artemis.p usuwa też grupy fosfoglikolowe z 3' końców DSB.
- Przerwy jednołańcuchowe lub jednołańcuchowe końce 5' są wypełniane przez DNA polimerazy PolL.p i PolM.p.

5. Wiązanie kinazy Prkdc.p/Dnapkcs.p zachodzi bardzo szybko po wiązaniu dimeru KU. Wiązanie odsuwa dimer KU od końca DSB. Prkdc.p związana na końcach DSB tworzy strukturę synapsy, blokuje aktywność nukleaz i ligaz.

Wiązanie Prkdc.p w pewnym stopniu zależy od przyłączenia Cbx1.p/Hp1β.p, który fosforylowany w T51 przez Csnk2.p/CkII.p odłącza się od histonu H3K9me3 i wiąże z kinazą Prkdc.p.

Metylacja Prkdc.p w K1150, K2746 i K3248 zwiększa wiązanie do Cbx1.p.

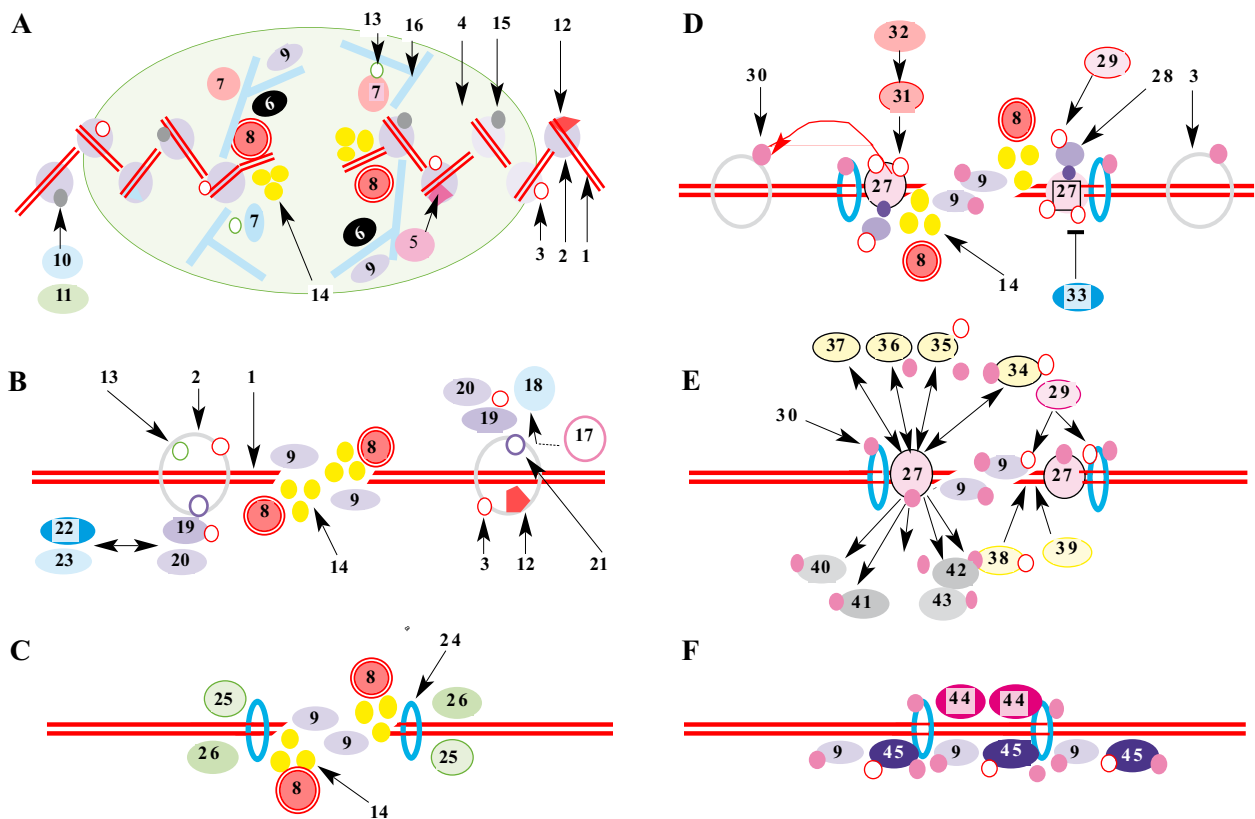
Prkdc.p/Dnapkcs.p początkowo ulega fosforylacji w T2609 przez Atm.p i przez Akt1.p aktywowaną przez kinazę Egfr.p, a następnie licznym fosforylacjom (w 40 resztach aminokwasowych), jak na przykład w regionie S2056. Te fosforylacje aktywują cNHEJ i nawet są konieczne do życia. Natomiast fosforylacje T946 lub S1004 hamują zwykle cNHEJ.

Regulatorami fosforylacji Prkdc.p są fosfatazy: Ppp1CA.p/Pp1.p, PtpA.p/Pp2A.p, Ppp4C.p, Ppp5C.p/Pp5.p i Ppp6C.p/Pp6.p.

Po aktywacji Prkdc.p/Dnapkcs.p fosforyluje białko dimeru KU, H2AX.p, Hsp90AA1.p, Akt1.p, p53, nukleazę Dclre1C.p/Artemis.p, HnRNPU/Safa.p, Pnkp.p, Xrcc4.p, Lig4.p, Nhej1.p/Xlf.p, Aplf.p (*aprataxin and PNKP like factor*, białko odgrywające rolę w reperacji DSB i SSB – wiąże Xrcc4.p i Xrcc1.p).

Przed przyłączeniem kompleksu ligazy kinaza Prkdc.p/Dnapkcs.p ulega autofosforylacji i odłącza się od kompleksu reperującego DSB.

6. Przyłączanie kompleksu ligazy 4. Ligacja. Kompleks ligazy składa się z białka Xrcc4.p (fosforylowanego przez kinazę kazeinową II (Csnk2.p) i stabilizującego końce DSB), z białka Nhej1.p/Xlf.p (wiążącego Xrcc4.p i Aplx.p) i DNA ligazy 4. DNA ligaza 4 (Lig4.p) wiąże DNA przez domenę N-kończącą, a Xrcc4.p przez domenę C końcową (**rys. 34**).



Rys. 34. Naprawa przerw dwułańcuchowych DNA przez cNHEJ:

- (A) Wykrycie uszkodzenia i tworzenie „strefy ograniczającej”: (1) – dsDNA, (2) – nukleosom, (3) – γ H2AX i inne fosforylacje białek, (4) – strefa ograniczająca DSB, (5) – Chd2.p, (6) – białka wiążące RNA, (7) – Parp1.p, (8) – Atm.p, (9) – Xrcc4.p, (10) – SetMar.p, (11) – Prpf19.p/Pso4.p, (12) – histon H3.3, (13) – acetylacja, (14) – kompleks MRN – Mre11.p, Rad50.p, Nbs1.p, (15) – H3K4me/H3K36me, (16) – Poli (ADP) rybozaPAR.
- (B) Decyzja o typie naprawy: (17) – Vcp.p, (18) – L3mbtL1.p, (19) – 53bp1.p, (20) – Rif1.p, (21) – H4K20me2, (22) – Brca1.p, (23) – Rbbp8.p/CtIP.p.
- (C) Przyłączenie heterodimeru KU: (24) – dimer KU, (25) – RecqL1.p, (26) – Wrm.p.
- (D) Przyłączenie kinazy Prkdc.p: (27) – kinaza Prkdc.p/Dnapkcs.p, (28) – Cbx1.p/Hp1 γ .p, (29) – Csnk2.p/Ck2.p, (30) – γ H2AX i inne fosforylacje przez Prkdc.p, (31) – Akt1.p, (32) – EGFR, (33) – fosfatazy Ppp1CA.p, PtpA.p, Ppp4C.p, Ppp5C.p, Ppp6C.p.
- (E) Naprawa niekompatybilnych końców: (34) – Aplf.p, (35) – Pnkp.p, (36) – Tdp1.p, (37) – Aptx.p, (38) – Delre1C.p/Artemis.p, (39) – DNA polimerazy PolM.p i PolL.p, (40) – p53, (41) – Hsp90AA1.p/Hsp90 α .p, (42) – Nr4A1.p, (43) – HnRnpU.p/Safa.p.
- (F) Ligacja końców DSB: (44) – Lig4.p, (45) – Nhej1.p/Xlf.p.

b. Naprawa typu Alt-NHEJ/MMEJ

Naprawę typu Alt-NHEJ opisywano jako system wspomagający naprawę cNHEJ przy braku odpowiedniej aktywności białek KU lub Dnapkcs.p. Zastępowanie cNHEJ może funkcjonować w fazie G1, ale nie w fazie S, gdzie cNHEJ jest nieaktywne. Także w późnej fazie G2, gdy zasadniczym systemem naprawy

dwułańcuchowych pęknięć DNA jest HR (naprawa przez homologiczną rekombinację), Alt-NHEJ może pełnić rolę naprawy zastępczej.

Wydaje się, że Alt-NHEJ odgrywa główną rolę w naprawie dwułańcuchowych pęknięć DNA o jednym końcu, pojawiających się po zatrzymaniu i rozpadzie widełek replikacyjnych w czasie replikacji.

Inaktywacja systemu naprawy cNHEJ i aktywacja Alt-NHEJ wymaga:

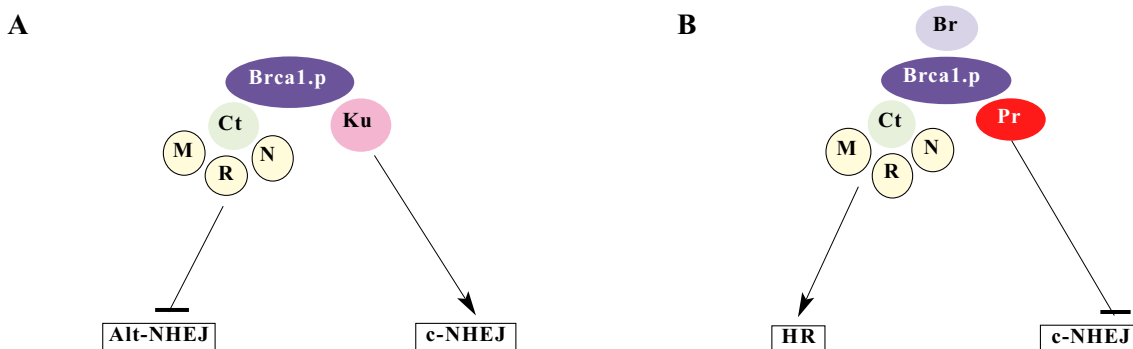
- Usunięcia białek cNHEJ z regionu DSB – jest to stymulowane kompleksem segregazy Cdc48.p/Vcp.p, z faktorem rozpoznającym ubikwitynę Nplc4.p/Npl1.p i Ufd1.p, z białkiem wiążącym Cdc48.p/Vcp.p Sprtn.p/Dvc1.p.
- Inaktywacji białek cNHEJ (jak: Xrcc5.p/Ku80.p, Xrcc6.p/Ku70.p i Prkdc.p/Dnapkcs.p) i aktywacja białek Alt-NHEJ (białka kompleksu MRN i CtIP.p/Rbbp8.p). Aktywacja zależy od wiązania Rbbp8.p/CtIP.p i MRN z kompleksem Brcal.p – Brip1.p – Prkdc.p/Dnapk.p (w fazie G2 cyklu). W fazie G1 Brcal.p aktywuje Ku80.p/Xrcc5.p, a hamuje aktywność nukleaz Rbbp8.p/CtIP i Mre11.p z kompleksu MRN (**rys. 35**).

W fazie G1 poziom Brcal.p jest bardzo niski, jednak komórki MEF Brcal^{-/-} mają obniżoną stukrotnie naprawę typu Alt-NHEJ/MMEJ. Inny kompleks Brcal.p zawierający białka Fam175A.p/Abra1.p i Uimc1.p/Rap80.p wiąże chromatynę przez poliubikwitynę syntetyzowaną przez Rnf8.p – Rnf168.p, hamuje resekcję i aktywuje cNHEJ.

Inicjacja reperacji zależy od równowagi aktywności kompleksów Brcal.p i 53bp1.p. W fazie G1 53bp1.p wiąże H4K20me3 i ubikwitynowany w lizynie 15 histon H2A. Po fosforylacji przez Atm1.p białko 53bp1.p wiąże w fazie G1 faktory hamujące resekcję:

Rif1.p (*replication timing regulatory factor 1*), Mdd2L2.p/Rev7.p i Paxipl.p/Ptip.p i aktywuje naprawę cNHEJ.

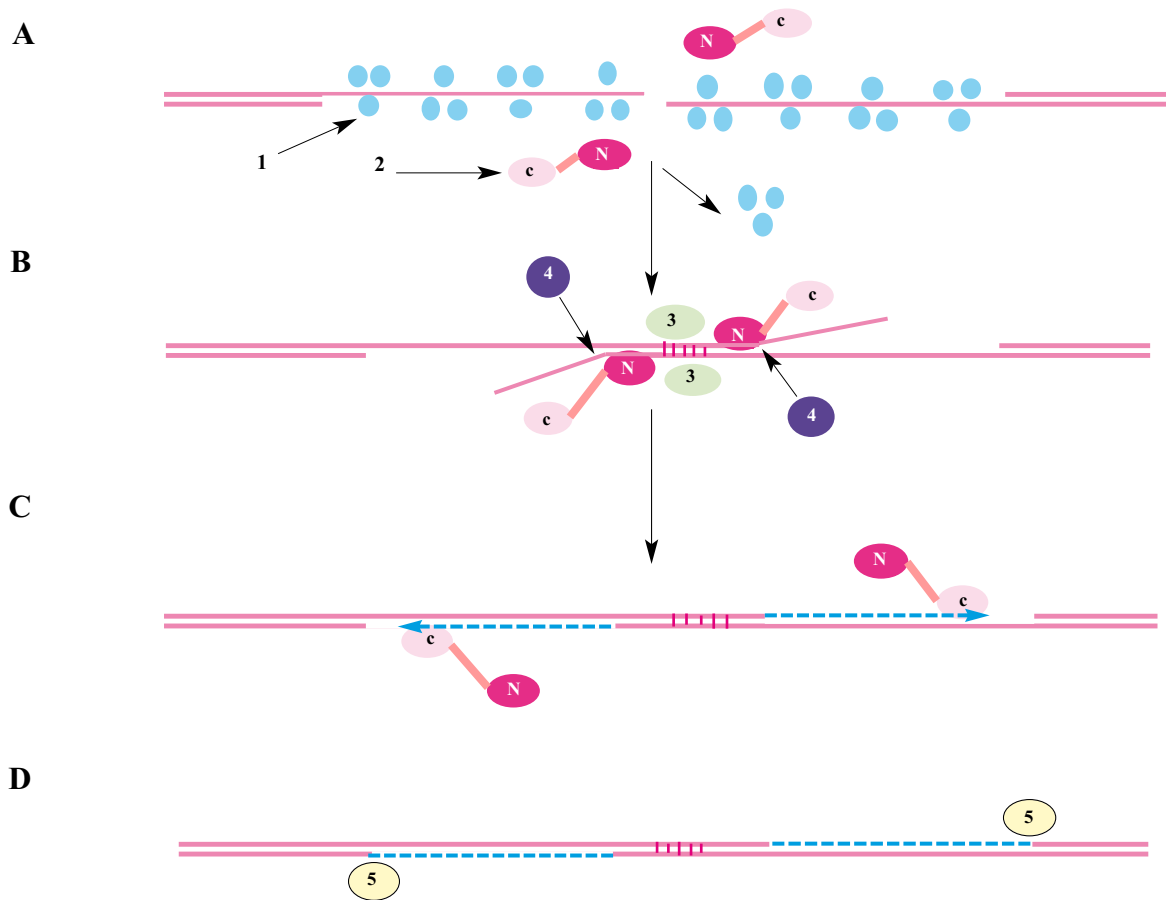
- Kinaza Atm.p aktywowana przez DSB w fazie S i G2 fosforyluje liczne białka, jak: Rbbp8.p/CtIP.p, Brcal.p, Blm.p, białka kompleksu MRN, stymulując naprawę Alt-NHEJ lub HR. Atm.p fosforyluje też histon H2AX, kinazę Chk2.p/Chek2.p i białko chromatyny Smc1A.p.
- Zależna od cyklin kinaza Cdk2.p na początku fazy S fosforyluje i aktywuje białka Brcal.p, Rbbp8.p/CtIP.p i białka kompleksu MRN i stymuluje naprawę typu Alt-NHEJ i HR.
- Kompleksy białek RPA (Rpa1.p/Rpa70.p, Rpa2.p/Rpa32.p i Rpa3.p/Rpa14.p) są helikazą, która rozplata dsDNA (5'-3'), silnie wiąże ssDNA i RNA. Aktywują resekcję, ale hamują parowanie sekwencji mikrohomologicznych (niedobór RPA aktywuje MMEJ). Filament 3' ssDNA – RPA przyciąga i ułatwia wiązanie rekombinazy Rad51.p (aktywacja naprawy HR).
- Parp1 i synteza PAR aktywuje i jest niezbędna w naprawie typu Alt-NHEJ. Myszy z podwójną delecją Parp1^{-/-} i Parp2^{-/-} giną. PAR wiąże i aktywuje PolQ.p (polimerazę theta). Parp1.p wiąże antyrekombinazę Parpbp.p/Pari.p hamującą HR na korzyść reperacji Alt-NHEJ.



Rys. 35. Regulacja reperacji cNHEJ, aktywności białka KU80.p/Xrcc5.p i kompleksu nukleaz Rbbp6.p/CtIP.p – Mre11.p.

(A) Kompleksy Brcal.p w fazie G1. (**Ku**) – Xrcc5.p/Ku80.p, (**MRN**) – kompleks Mre11.p, Rad50.p i Nbn.p/Nbs1.p, (**Ct**) – Rbbp8.p/CtIP.p.

(B) Kompleksy Brcal.p w fazie G2. (**Br**) – Brip1.p/FancJ.p, (**Pr**) – Prkdc.p/Dnapkcs.p.



Rys. 37. Dalsze etapy naprawy DSB mechanizmem MMEJ:

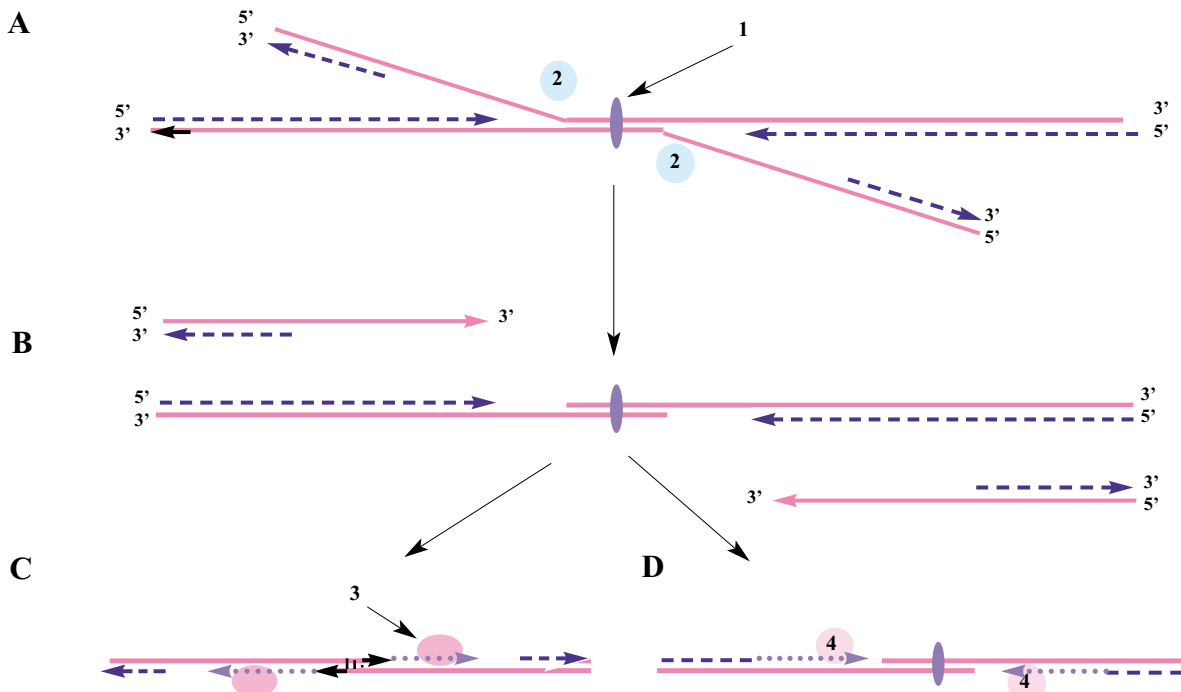
- (A) 3' ssDNA końce DSB przyłączają białka RPA – (1) i DNA polimerazę θ (PolQ.p) – (2), (c) – CTD PolQ (domena polimerazy), (N) – NTD PolQ (domena helikazy).
- (B) Tworzenie synapsy i odcięcie 3' terminalnych sekwencji. (3) – białko Smarcal1.p/Harp.p, (4) – Erc1.p (*excision repair endonuclease* – podjednostka XPF).
- (C) Wypełnienie przerwy jednołańcuchowej przez PolQ.p (domena polimerazy).
- (D) Ligacja przez DNA ligazę 3 (Lig3.p) – (5).

stabilizacji miejsca uszkodzenia, a także dla stworzenia struktury wiążącej faktory reperacji DNA. Zasadniczo łączone sekwencje końców DSB nie zawierają homologii (gdy nie zawierają sekwencji powtarzających się). Znaczna ilość końców DSB zawiera jednak mikrohomologie (komplementarne sekwencje ponad 3 kolejnych nukleotydów), które dość istotnie stabilizują wiązanie łańcuchów 3' końców DSB. Naprawa korzystająca z takich mikrohomologii nazywana jest naprawą typu **MMEJ** (*microhomology mediated end joining*). Naprawa w przypadku braku takich mikrohomologii jest nazywana **Alt-NHEJ** (alternatywny NHEJ), a jej mechanizm różni się od MMEJ jedynie mniejszą

resekcją końca 5' DNA (resekcja zależy tylko od nukleaz Mre11.p i Rbbp8.p).

Łączenie łańcuchów zależy od DNA polimerazy theta (PolQ.p), głównie od helikazowej domeny enzymu znajdującej się w regionie N terminalnym. Łączenie zależy także od obecności łańcuchów poliadenozylu-rybozy (syntetyzowanej przez Parp1.p) i koniecznej do wiązania PolQ.p. PolQ.p usuwa także trimery białek RPA wiążące jednołańcuchowe końce 3' DNA. PolQ.p jest antyrekombinazą i usuwa białko Rad51.p (**rys. 37**).

Hybrydyzację mikrohomologii zwiększa też białko Smarcal1.p/Harp.p. Mutacje genu SMARCAL1



Rys. 38. Udział Alt-NHEJ/MMEJ w naprawie uszkodzonych widełek replikacyjnych.

- (A) Zahamowanie ruchu widełek replikacyjnych przez przeszkodę (międzyłańcuchowe połączenia krzyżowe lub poczworną spiralę G). (1) – przeszkoda, (2) – Ercc1.p i Xpf.p.
 (B) Rozpad widełek replikacyjnych.
 (C) Naprawa Alt-NHEJ uszkodzenia łańcuchów opóźnionych przez DNA PolQ (3).
 (D) Wypełnienie przerw w łańcuchu wiodącym przez DNA polimerazę (4).

powodują **zespół SIOD** (dysplazji immuno-kostnej Schimkego).

3. Obcięcie zbędnych końców 3' ssDNA.

Obcięcie końców ssDNA tworzy zdolny do elon-gacji łańcucha koniec 3'-OH. Reakcja przeprowadzana jest przez Ercc1.p (jednostkę strukturalną tworzącą heterodimer z Ercc4.p/XpF.p/FancQ.p). Podobnymi endonukleazami drożdży są białka Rad10.p i Rad1.p.

4. Synteza DNA – wypełnienie luk sekwencji.

Enzymem wypełniającym luki sekwencji na matrycy 3'-ssDNA jest DNA polimeraza theta (PolQ.p). Wiąże ona końce DSB przez poli-ADP rybozę, ale Olaparib tylko nieznacznie zwiększa wrażliwość komórek na kamptotecynę. Mutacje genu *POLQ* zmniejszają żywotność komórek Brcal^{-/-} (kumulująca się śmiertelność – *synthetic lethality*). W normalnych warunkach brak PolQ.p aktywuje naprawę typu HR.

PolQ ma pewne cechy polimeraz TLS – może ona przeprowadzać syntezę przez pozbawione zasad

miejsca matrycy (zawsze wbudowuje adeninę). Może też dodawać nukleotydy na 3' końcu ss-DNA (ale nie jest enzymem typu Dntt.p/TdT.p). Szczególnie w obecności jonów Mn²⁺ wydłuża łańcuchy 3'-ssDNA (co jest przyczyną powstawania chaotycznych insercji w naprawie Alt-NHEJ).

Mutacja S1932P genu *POLQ* powoduje silną niestabilność genomową i chromosomową (tworzenie mikrojąder w retikulocytach – mutacja „Chaos 1”).

5. Ligacja przerwy jednołańcuchowej zależy od liganzy 3 DNA (Lig3.p).

c. Naprawa uszkodzonych widełek replikacyjnych

Naprawa typu Alt-NHEJ/MMEJ aktywowana jest w komórkach ssaków przez kinazę Cdk2.p i jest ważna dla stabilizacji i naprawy zahamowanych i rozpadających się widełek replikacyjnych.

Rozpad zatrzymanych widełek replikacyjnych skutkuje powstaniem „przerw dwułańcuchowych o jednym końcu” (**rys. 38**).

Przerwy te reperowane są przez naprawę Alt-NHEJ przez PolQ.p. Łańcuch DNA zawierający przeszkodę w replikacji i łańcuchy wiodące nowosyntetyzowanego DNA jest reperowany przez wypełnienie przerw jednołańcuchowych przez polimerazę DNA nawet bez usunięcia przeszkody replikacji.

Dla komórek z defektem naprawy typu HR naprawa Alt-NHEJ/MMEJ jest naprawą ratunkową dla rozpadających się widełek replikacyjnych. Brak PolQ.p w komórkach *Brcal*^{-/-} lub *Brca2*^{-/-} jest letalny. Dotyczy to głównie komórek raka piersi z brakiem aktywnych białek *Brcal*.p i *Brca2*.p. Szczególnie silny efekt letalny na te komórki ma jednocześnie zahamowanie aktywności *Parp1*.p (*Olaparib*), *PolQ*.p (*siRNA*) i zastosowanie czynników tworzących wiązania międzylańcuchowe.

Białko *timeless* (regulator cyklu okołodobowego) jest ważne dla przeżycia komórek w stresie genotoksycznym spowodowanym rozpadem widełek replikacyjnych. Defekty tego białka są czasem obserwowane w rakach prostaty, płuc i piersi.

2. NAPRAWA PRZEZ HOMOLOGICZNĄ REKOMBINACJĘ (HR)

Naprawa przez homologiczną rekombinację polega na wykorzystaniu sekwencji homologicznych do odzyskania sekwencji DNA utraconych przy powstawaniu DSB. Takimi sekwencjami są najczęściej kopie allele powstałe w czasie replikacji (**alleliczna homologiczna rekombinacja** z siostrzanym chromosomem). Ma ona miejsce w fazie S lub w fazie G2 cyklu komórkowego.

Inną rzadko występującą możliwością jest wykorzystanie innych homologicznych sekwencji obecnych w homologicznym chromosomie lub sekwencji powtarzających się i pseudogenów obecnych w innych chromosomach (**niealleliczna homologiczna rekombinacja** – (**NAHR**)).

NAHR może prowadzić do wprowadzenia nieco odmiennej sekwencji od sekwencji utraconej (**konwersja genowa**).

a. Naprawa typu DSBR

Naprawa DSBR (*double strand break repair*) jest „klasycznym” typem naprawy przez rekombinację homologiczną. Jest naprawą typową dla fazy S i G2. W fazie G1 naprawa DSBR powoduje niestabilność genomową.

Gdy znalezienie homologicznych sekwencji jest niemożliwe, DSBR jest zwykle zastępowana przez naprawę typu MMEJ (przy krótkich resekcjach) lub kończy się śmiercią komórki przy długich resekcjach.

INICJACJA DSBR

Inicjacja naprawy DSB jest wspólna dla różnych typów naprawy i została opisana powyżej. Do inicjacji zaliczyć można wykrycie obecności DSB i rozluźnienie struktury heterochromatyny w pobliżu DSB. Rolę w tym procesie odgrywa białko *Phf13*.p/*Spoc1*.p regulujące wiązanie *Trim28*.p/*Kap1*.p, *Cbx5*.p/*Hp1α*.p i metylotransferaz histonów. Poziom białka *Phf13*.p jest szczególnie wysoki w komórkach raka jajnika.

Omówiona została też uprzednio rola białek remodulujących chromatynę i enzymów modyfikujących histony w regionie uszkodzenia.

Do etapu inicjacji zalicza się również przyłączenie do końców DSB kompleksu MRN, czasem razem z dimerem białek KU (w fazie G2 aktywna jest też naprawa cNHEJ). Wiązanie białek MRN zależy od deacetylacji *Nbs1*.p przez *Sirt1*.p. Inhibitory *Sirt1*.p (białka *HIC* i *Dbc1*.p/*Ccar2*.p) hamują wzrost komórek nowotworowych.

Kompleks MRN wiąże przez domenę C-terminalną białka *Nbs1*.p i kinazę punktu kontrolnego *Atm*.p. Kinaza *Atm*.p po autofosforylacji w S367, S1893 i S1981 ulega aktywacji i fosforyluje histon H2AX, białka *Mdc1*.p, *53bp1*.p, *Rif1*.p i inne faktory obecne w „ognisku” reperacji.

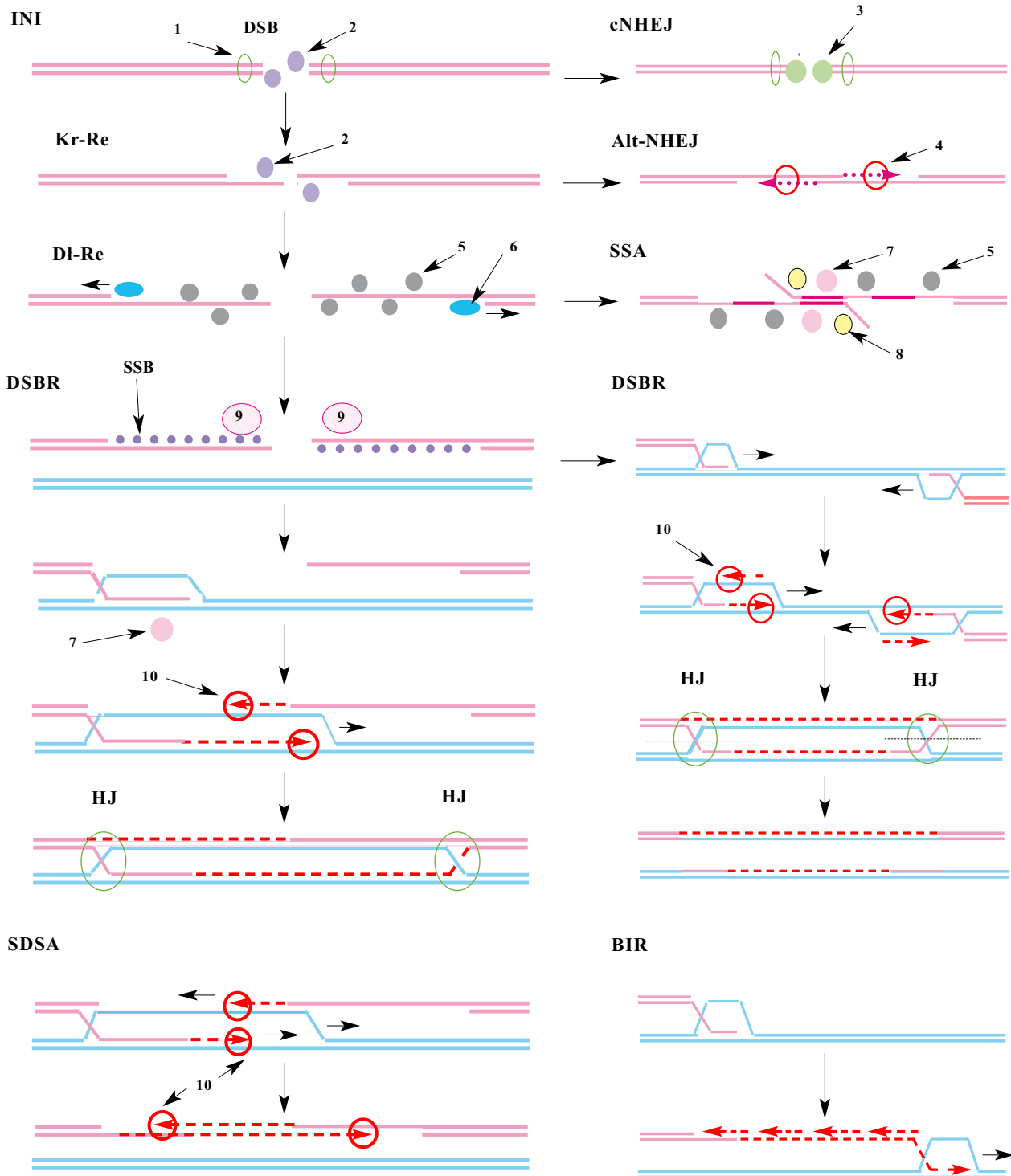
Na tym etapie naprawa przez homologiczną rekombinację może być jeszcze zahamowana i zastąpiona przez reperację typu cNHEJ (**rys. 39**).

KRÓTKA RESEKCJA KOŃCÓW 5' DSB

Aktywacja endonukleazy i 5'-3' egzonukleazy (białka *Mre11*.p z kompleksu MRN) rozpoczyna resekcję końców 5' istniejących DSB. Resekcja zaczyna się od stworzenia jednołańcuchowej przerwy w nici 5' końca DNA, a następnie na wycięciu końca nici 5' przez aktywność 5'-3' egzonukleazy.

Regulatorem aktywności *Mre11*.p jest *Rbbp8*.p/*CtIP*.p, białko, które ma aktywność endonukleazy i jest supresorem nowotworzenia. Podobnym białkiem u drożdży jest *Sae2*.p.

Krótką resekcją w komórkach ssaków tworzy wystające 3' jednołańcuchowe końce DNA o długości ok. 20-50 nukleotydów (u drożdży około 300 nukleotydów). Zahamowanie tej resekcji (na przykład brak białka *Rbbp8*.p/*CtIP*.p w fazie G2) prowadzi do reperacji typu cNHEJ.



Rys. 39. Różne typy naprawy DSB w DNA. (INI) – rozpoznanie uszkodzenia i inicjacja naprawy. (1) – dimer KU, (2) – kompleks MRN, (3) – Prkdc.p/Dnapkcs.p, (cNHEJ) – klasyczny NHEJ, (3) – Prkdc.p, (Kr-Re) – krótka resekcja, (AltNHEJ) – alternatywny NHEJ, (4) – PolQ.p, (Df-Re) – długa resekcja, (5) – RPA, (6) – Exo1.p, (SSA) – reperacja przez łączenie ssDNA, (7) – Rad52.p, (8) – Rad1.p – Rad10.p (drożdże), (DSBR) – reperacja DSB, (9) – kompleks Brca1.p – Brca2.p – Palb2.p, (10) – DNA polimeraza delta, (SSB) – białka wiążące ssDNA, (HJ) – skrzyżowania Hollidaya, (SDSA) – zależne od syntezy DNA parowanie łańcuchów, (BIR) – replikacja indukowana przez dwułańcuchową przerwę DNA.

Krótką resekcja uniemożliwia rozpoczęcie repara-
cji typu cNHEJ, ale jest konieczna w repara-
cjach typu homologicznej rekombinacji lub Alt-NHEJ (co zostało
uprzednio opisane).

WYDŁUŻONA RESEKCJA KOŃCÓW 5' DSB

Inicjacja wydłużonej resekcji końca 5' DNA w prze-
rwie dwułańcuchowej zależy najbardziej od **nukleaz**
Exo1.p i **Dna2.p**. Te nukleazy są stymulowane przez
kompleks MRN, ale nawet zupełny brak aktywności
Mre11.p może być zastąpiony przez 5'-3' egzokleazę
Exo1.p.

Dna2.p jest endonukleazą jednołańcuchowych DNA,
przecina zarówno 5', jak i 3' końce ssDNA. Wybór
miejsca cięcia zależy od helikaz Blm.p u ludzi lub
Sgs1.p u drożdży, a zwłaszcza od kompleksów tych
helikaz z topoizomerazą 3 (Top3.p) i białkami RMI.
Kompleksy te (**BTR** ludzi i **STR** drożdży) są też ważne
dla rozdzielania skrzyżowań Hollidaya w późniejszym
etapie reparaacji.

W regulacji wydłużonej resekcji znaczenie mają
faktory remodulujące chromatynę, jak na przykład
SmarcaD1.p (Fun30.p drożdży). Wiąże on nukleazy
Exo1.p i Dna2.p i białka RPA i jest aktywatorem ich
aktywności. Obecność nukleosomów hamuje resek-
cję, ale wymiana histonu H2A na izoformę H2AZ ak-
tywuje nukleazę Exo1.p. Wymiana histonu wymaga
aktywacji kompleksu SRCAP. Białkiem rdzeniowym
tego kompleksu jest Srcap.p/Domol.p (*Snf2 related*
and Crebbp.p activated protein) – ATPaza i aktywator
transkrypcji.

Wydłużoną resekcję regulują także:

- **Kinazy CDK** przejścia fazy G1-S. Fosforylują one
białka Rbbp8.p/CtIP.p w S327, Nbs1.p w S432, także
Exo1.p i Dna2.p i zwiększają ich aktywność.
- **Rybonukleoproteina HnRNP-UL1.p** wiąże heli-
kazę rozplatającą DNA – Blm.p.
- **Białko rozplatające DNA – Wrn.p** wiąże i aktywuje
nukleazę Dna2.p.
- **Kompleks PCNA** stymuluje nukleazę Exo1.p.
- **Kompleks 9-1-1** (Rad9A.p, Hus1.p, Rad1.p) wiąże
nukleazę Exo1.p i nukleazę/helikazę Dna2.p i akty-
wuje wydłużoną resekcję.

Białka Brcal.p i 53bp1.p regulują aktywność wy-
dłużonej resekcji. 53bp1.p i białko Rif1.p są barierą dla
resekcji, a białka Brcal.p i Psmd14.p/Poh1.p aktywują
resekcję.

Psmd14.p/Poh1.p jest białkiem kompleksu prote-
asomu, a Brcal.p stymuluje jego wiązanie do Uimc1.p/
Rap80.p. Uimc1.p/Rap80.p chroni poliubikwitinację
histonu H2AK15, która jest konieczna do wiązania

53bp1.p w ognisku reparaacji. Degradacja tej ubikwity-
nacji powoduje utratę białka 53bp1.p i stymuluje resek-
cję. Utrata ekspresji 53bp1.p powoduje hiperrecesję
końca 5' ssDNA.

Utrata ekspresji Brcal.p powoduje niestabilność
genomową, ale podwójna utrata Brcal.p i 53bp1.p
zmniejsza znacznie tę niestabilność.

W wydłużeniu resekcji końca 5' DNA i stabilizacji
końca 3' ważną rolę odgrywają białka wiążące taki
DNA. Są to:

- **Białka RPA** tworzące trimer Rpa1.p – Rpa2.p
i Rpa3.p. Ich przyłączenie zależy od pewnej minimal-
nej długości 3' ssDNA. Kompleks RPA aktywuje
rozplątywanie DNA przez Blm.p i zwiększa cięcie 5'
ssDNA przez endonukleazę Dna2.p. Kompleksy RPA
wchodzą też w skład uprzednio opisanych komplek-
sów STR i BTR.
- **Białka NABP/SSB/SOSS** tworzą kompleksy słabiej
wiążące ssDNA niż kompleksy RPA. Można tu za-
liczyć kompleksy: Nabp2.p/SsB1.p/Soss1.p, Ints3.p/
SossA.p i Inip.p/Ssbip.p/SossC.p.
Białko Nabp2.p fosforylowane przez Atm.p wiąże
końce DSB przez białko Nbs1.p, aktywuje nukleazę
Exo1.p i zwiększa wiązanie białek Brcal.p i Rad51.p.
Białko Nabp2.p nie tylko aktywuje nukleazę Exo1.p,
ale znosi jej hamowanie przez dimer białek KU.
- **Białka INTS** (14 białek kompleksu integracyjnego)
pełnią różne role. Ints6.p jest składnikiem integru-
jącym kompleks i odgrywa rolę w reparaacji typu
homologicznej rekombinacji (HR).
- **Białko Inip.p** wiąże Rpa1.p i Rbbp8.p/CtIP.p.

TWORZENIE FILAMENTU PRESYNAPTYCZNEGO

Filament presynaptyczny zawiera odcinek łańcu-
cha 3' ssDNA, który jest skompleksowany z białka-
mi Rad51.p. Spiralna struktura zawiera 6 cząsteczek
Rad51.p i 18 nukleotydów na jeden skręt (**rys. 40**).

Stworzenie filamentu Rad51.p wymaga usunięcia
kompleksów białek RPA pokrywających 3' koniec
ssDNA. Te kompleksy RPA wiążą ssDNA, stymulują
kinazę Chek2.p/Chk2.p i uruchamiają punkt kontrolny
blokujący cykl komórkowy,

Kompleksy RPA usuwają „wtórne struktury” DNA
i aktywują drożdżowe białko Sgs1.p (odpowiednik
Blm.p u ssaków).

Fosforylacja białek RPA przez kinazy Atm.p, Atr.p
lub Cdk1.p zwiększa wiązanie Rad52.p.

Rpa1.p jest także sumoilowane (wiąże SUMO2
i SUMO3) przez ligazy Pias1.p i Pias4.p (co hamuje
naprawę SSA i BIR, a stymuluje włączenie Rad51.p

i naprawę typu HR). Rpa1.p jest desumoilowane przez Snp6.p peptydazę.

Białko Rad52.p zwiększa wiązanie Rad51.p do ssDNA, a u drożdży jest także mediatorem rekombinacji. Po uszkodzeniu DNA Rad52.p ulega sumoilacji w lizynach K10, K11, K220, co chroni go przed degradacją. U ssaków Rad52.p jest częściowo zastąpione przez Brca2.p (brak Rad52.p w komórkach Brca2^{-/-} jest letalny).

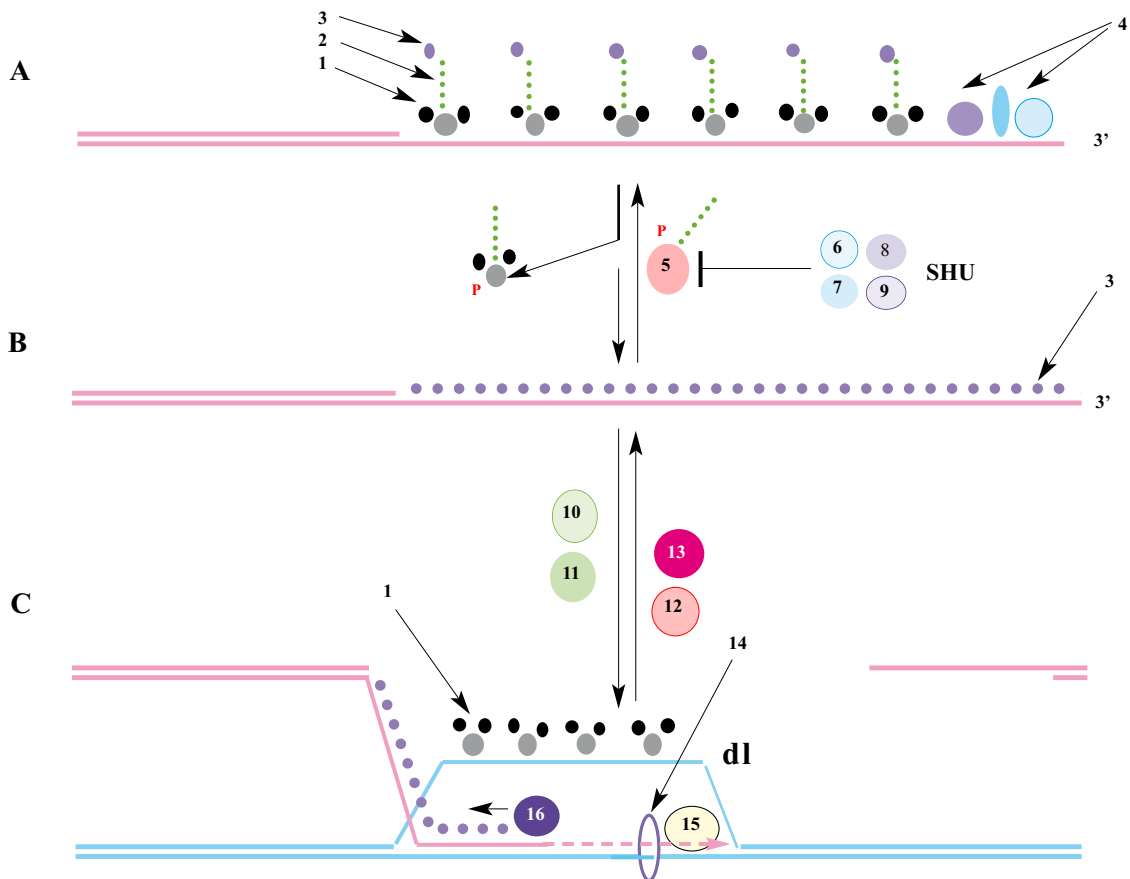
Białko Rad51.p jest nieco podobne do rekombinazy RecA.p u bakterii *E. coli*. Tworzenie filamentu Rad51.p jest regulowane przez:

- **Srs2.p** antyrekombinaza drożdży zwiększa naprawę rekombinacyjną typu SDSA (hamuje tworzenie podwójnych skrzyżowań Hollidaya), usuwa Rad51.p i wprowadza trimery RPA. Ssaki nie mają odpowiednika Srs2.p. W naprawie uszkodzeń DNA w telomerach i w widelkach replikacyjnych białko Srs2.p

mogą być zastąpione przez helikazy RecQL5.p, Blm.p i Wrn.p. Srs2.p jest fosforylowane przez kinazy zależne od cyklin i sumoilowany.

Główną funkcją Srs2.p jest hamowanie nadmiernej rekombinacji w unieruchomionych widelkach replikacyjnych.

- **Kompleks SHU/PCSS** *S. cerevisiae* składa się z 4 białek: Psy3.p, Csm.p, Shu1.p i Shu2.p. Jest inhibitorem antyrekombinazy Srs2.p, zwłaszcza w mitozie. Kompleks SHU aktywuje tworzenie filamentu Rad51.p.
- **Fosforylacje Rad51.p** w T54 przez Abl1.p, co obniża wiązanie DNA, w S192 przez Mec1.p/Atr.p, w S14 przez Plk1.p, w Y13 przez Csnk2A1.p/CkII.p i Y315 przez Bcr-Abl.p.
- **Sumoilacje Rad51.p** przez E3 SUMO ligazę NsmcE2.p/Mms21.p.



Rys 40. Początek homologicznej rekombinacji w HR.

- (A) Tworzenie końca 3' ssDNA pokrytego białkami RPA – (1), (2) – poliubikwitinacja RPA, (3) – Rad51.p, (4) – kompleks Brca1.p, Brca2.p, Palb2.p lub Rad52.p drożdży.
- (B) Tworzenie filamentu presynaptycznego. (5) – Srs2.p drożdży, kompleks SHU *S. cerevisiae* zawiera: (6) – Psy3.p, (7) – Csm.p, (8) – Shu1.p, (9) – Shu2.p.
- (C) Tworzenie pętli D (dl) i rekombinacja DNA. Aktywatory procesu – Rad54.p – (10), (11) – Rad51AP1.p. Inhibitory – (12) – FancM.p lub Mph1.p drożdży, Rtel1.p – (13). (14) – trimer PCNA, (15) – DNA polimeraza δ , (16) – Rad54.p.

- **Paralogi białka Rad51.p** ułatwiają tworzenie filamentu i stabilizują go:
 - Rad51C.p ułatwia rozplatanie dsDNA i odgrywa rolę w naprawie HR.
 - Rad51A1.p stabilizuje pętlę D i ułatwia rekombinację.
 - Rad51B.p i Xrcc2.p w rozdzielaniu podwójnych wiązań Hollidaya.
- **Białka Rad54.p i Rad54B.p** ułatwiają wiązanie Rad51.p z ssDNA, a utrudniają z dsDNA.
- **Brca2.p** jest białkiem podobnym do Rad52.p i u ssaków odgrywa podobną rolę w wymianie RP trimerów i w tworzeniu filamentu presynaptycznego. Stabilizuje wiązanie Rad51.p z 3' ssDNA. Regulatorami funkcji Brca2.p są:
 - **Sem1.p/Dss1.p** bezpośrednio wiążące CTD białka Brca2.p i stymulujące tworzenie filamentu ssDNA – Rad51.p. Sem1.p jest białkiem 19S proteasomu i ulega nadprodukcji w brodawkach i rakach skóry.
 - **Brca1.p** białko supresorowe, sensor DSB i regulator transkrypcji. Mutacje genu *BRCA1* są obecne w 40% dziedziczonych raków piersi. W kompleksie BRCC wiąże Brca2.p, Bard1.p i Rad51.p. Z Bard1.p tworzy E3 ligazę ubikwityny.
 - **Palb2.p/FancN.p**, wiąże Brca2.p i Rad51ap1.p. Germinalne mutacje powodują raka piersi.
 - **Rad51ap1.p** stabilizuje wiązanie Rad51.p z ssDNA, wiąże też RNA i dsDNA.
 - **p53** wiąże Brca2.p i hamuje rekombinację. Brak Brca2.p zwiększa apoptozę zależną od p53.
 - **McpH1.p** (mikrocefalina) hamuje Brca2.p, hamuje tworzenie mikrofilamentu Rad51.p i zmniejsza naprawę typu HR.

Regulację tworzenia filamentu presynaptycznego przedstawiono na **rys. 40B**.

TWORZENIE PĘTLI D I SYNAPSY

Ludzki filament presynaptyczny składający się z białka **Rad51.p** i 3'-ssDNA wyszukuje matrycową sekwencję komplementarną i tworzy z nią heterodupleks. Drugi łańcuch tej matrycy tworzy pętlę D (*displacement loop* – **rys. 40C**).

Interesująca jest obserwacja, że poziom białka Rad51.p w komórkach nowotworowych jest bardzo wysoki. Rad51.p obecne w nadmiarze może tworzyć skupienia (*foci*) na nieuszkodzonym dwułańcuchowym DNA.

Ważnym białkiem w tworzeniu synapsy filamentu Rad51.p z komplementarną sekwencją siostrzanej chromatydą jest (w mitozie) białko **Rad54.p** i jego homologi, jak Rad54B.p. Są to białka z rodziny helikaz

DEAD typu Swi2.p-Snf2.p i ATPaz zależnych od DNA. Białka typu Rad54.p pełnią różne funkcje w naprawie typu HR:

- stabilizują wiązanie Rad51.p do ssDNA,
- stymulują tworzenie heterodupleksu z DNA komplementarnej sekwencji matrycowej,
- destabilizują wiązanie Rad51.p z dwułańcuchowym DNA (głównie w heterodupleksie).

Uwalnia to koniec 3' ssDNA od Rad51.p i umożliwia syntezę DNA przez kompleks DNA polimerazy δ i PcnA.p.

W mejozie (u *S. cerevisiae*) obok Dmc1.p (paralogu Rad51.p) działa paralog Rad54.p – białko Tid1.p. Ludzkim paralogiem Tid1.p jest białko DnajA3.p.

Białko FbxO18.p/Fbh1.p 3'-5' DNA helikaza i ATPaza zależna od ssDNA jest w kompleksie SCF ligazy ubikwityny. Bierze udział w ubikwitynacji białka Rad51.p i uwalnia go z kompleksu z ssDNA.

FbxO18.p jest antyrekombinazą, hamuje syntezę DNA. Białko hamuje naprawę typu HR, a stymuluje naprawę typu TLS.

Białko FancM.p (Fml1.p u *S. pombe* i **Mph1.p** u *S. cerevisiae*) jest fosforylowane po uszkodzeniu DNA i ma duży wpływ na jego reperację:

- stymuluje dysocjację trójłańcuchowych DNA,
- stymuluje monoubikwitynację FancD2.p,
- powoduje dysocjację pośredników rekombinacji,
- obniża naprawę HR na korzyść SDSA,
- wiąże białka Mhf1.p (drożdże) i C190-ORF40.p/Faap24.p (regulacja punktów kontrolnych),
- jest translokazą DNA i wpływa na ruchomość skrzyżowań Hollidaya i widełek replikacyjnych.

Wiele faktorów stabilizuje synapsę końca 3' ssDNA i matrycowego łańcucha siostrzanego chromosomu, a także wytworzoną pętlę D. Obok białka Rad54.p można tu zaliczyć:

- Rad52.p i podobne białko Rad59.p. W stresie genotoksycznym ulega sumoilacji w lizynach K10, K11 i K220. Sumoilacja chroni białko Rad52.p przed degradacją, ale utrudnia jego wiązanie do DNA.
- Rad51A1.p stabilizuje pętlę D.
- Rad51AP1.p stabilizuje pętlę D.
- Palb2.p/FancN.p przyłącza białko Rad51AP1.p i stabilizuje pętlę D.

Koniec 3' ssDNA w synapsie staje się starterem replikacji DNA na łańcuchu matrycowym po przyłączeniu kompleksu PCNA i DNA polimerazy δ .

Powiększa to pętlę D i umożliwia odtworzenie sekwencji straconych przy powstawaniu DSB. Koniec 3' ssDNA drugiego końca DSB tworzy heterodupleks z łańcuchem pętli D i staje się starterem replikacji.