

B. STRES REPLIKACYJNY

Stres replikacyjny towarzyszy zahamowaniu ruchu widełek replikacyjnych w fazie S cyklu komórkowego. Kompleksy białkowe obecne w widełkach replikacyjnych są jeszcze stabilne przez pewien czas i usunięcie przyczyny bloku powoduje reaktywację replikacji (i pewną synchronizację cyklu podziałowego komórki). Potem następuje rozpad kompleksów replikacyjnych z koniecznością ich odtworzenia przed podjęciem na nowo syntezy DNA.

Rozpad kompleksów replikacyjnych powoduje odsłonięcie jednołańcuchowych odcinków DNA, ponadto stymuluje przyłączenie kompleksów białek RPA, białek Atrp.p i kinazy Atr.p, co inicjuje sygnalizację o zahamowaniu replikacji.

Białko Atrp.p wiąże kompleksy białek RPA, a Atr.p fosforyluje H2AX w S139 i kinazę Chek1.p w S317 i S345 i aktywuje ją. Chek1.p fosforyluje i hamuje fosfatazę Cdc25A.p, co powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S.

Komórka podejmuje natychmiast próbę reperacji zablokowanych widełek replikacji i próbę ich odtworzenia. W tym procesie powstają przerwy dwułańcuchowe DNA, w tym „przerwy DNA o jednym końcu”. Bardziej szczegółowy opis mechanizmów sygnalizujących istnienie bloku replikacji lub uszkodzeń DNA, hamujących ruch widełek replikacyjnych oraz naprawiających uszkodzenia, będzie przedstawiony poniżej.

1. STRUKTURA KOMPLEKSU REPLIKACYJNEGO

Powstawanie i funkcja kompleksów prereplikacyjnego i replikacyjnego zostały już opisane w części I. Synteza jest rozpoczynana w licznych miejscach inicjacji (ORI) i obejmuje stosunkowo niewielkie odcinki DNA (replikony). W komórce *Drosophila* replikony są nie większe niż 4 tysiące par zasad, replikacja trwa około 30 sekund i jest synchroniczna we wszystkich replikonach.

U wyższych eukariontów replikacja nie jest synchroniczna, a program inicjacji replikonów jest genetycznie zdeterminowany (być może jest to ważny nabytek ewolucyjny pozwalający na tworzenie bardzo dużych genomów). Ogólnie replikony wyższych eukariontów dzielone są na „wczesne” (rozpoczęcie syntezy DNA zaczyna się na początku fazy S) i „późne” (rozpoczęcie syntezy DNA ma miejsce w drugiej połowie fazy S). Zawsze jednak obowiązują dwie zasady:

– wszystkie replikony muszą być replikowane,

– żaden replikon nie może być replikowany dwukrotnie (rereplikacja).

Zasadniczymi etapami replikacji DNA są:

- rozpoznanie ORI,
- uwarunkowanie do inicjacji replikacji (*licencing*), i tworzenie kompleksu prereplikacyjnego (**Pre-RC**),
- tworzenie kompleksu preinicjacyjnego (**Pre-IC**),
- rozpoczęcie syntezy DNA (*firing*),
- elongacja replikacji.

a. Rozpoznanie ORI

Regiony ORI są rozpoznawane przez **kompleksy białek ORC** (Orc1.p – Orc6.p i Lrwd1.p/OrcA.p), a także Cdt1.p i Cdc6.p.

Kompleks ORC nie wiąże szczególnych sekwencji DNA, rozpoznaje jednak (przez Orc1.p) histon H4 (metylowany w lizynie 20 H4K20me2 przez metylotransferazy histonowe Kmt5B-C.p/Suv4-20h1-h2.p).

Liczba związanych kompleksów ORC znacznie przekracza liczbę aktywnych inicjacji syntezy DNA na początku fazy S.

Orc1.p jest niestabilnym białkiem kompleksu, niszczone po inicjacji syntezy DNA (po jego ubikwitynacji przez ligazę SCF – SKP2). Poziom Orc1.p w komórkach spoczynkowych jest niski, ekspresja jest stymulowana przez kinazę zależną od cyklin G1 i faktory E2F.

Białko Orc1.p ma **domenę BAH**, która rozpoznaje H4K20me2. Orc1.p wiąże acetylotransferazę histonów – Kat7.p/Myst2.p. Mutacje genu ORC1 są obecne w **zespole Meiera-Gorlina 1**.

Białko Orc2.p wiąże białka Mcm10.p, Cdc45.p, Lrwd1.p/OrcA.p, Orc3.p i Orc4.p.

Orc6.p w mitozie znajduje się w kinetochorze, a jego niedostateczna ekspresja powoduje tworzenie wielobiegunowych wrzecion podziałowych i powstawanie komórek wielojądrzastych. Mutacje ORC6 genu powodują **zespół Meiera-Gorlina 3**.

Lrwd1.p/OrcA.p jest białkiem szkieletowym całego kompleksu ORC. Wiaże białka Orc2.p, Cdt1.p (w fazie G1 cyklu) i Gmnn.p/gemininę (w fazie S). Nadmiar gemininy rozbija kompleks Lrwd1.p i Cdt1.p. To jest częstą przyczyną rozpadu Pre-RC.

Białko Cdc6.p (*cell division cycle 6*) jest w jądrze komórkowym aż do momentu rozpoczęcia fazy S, jego ekspresja jest stymulowana przez faktory E2F. Wiaże kompleks fosfatazy PP2A i kinazy zależne od cyklin E, A, B. Jest onkogenem, jego ekspresja wycisza promotor genu INK4/ARF.

Cdt1.p jest obecny w fazie G1 i S cyklu. W fazie S dwa mechanizmy blokują tworzenie nowych kompleksów pre-RC: rosnący poziom gemininy zmniejsza wiązanie Cdt1.p z Lrwd1.p i fosforylacja Cdt1.p przez Cdc2.p aktywuje jego ubikwitynację oraz degradację w proteasomie.

Ligazą ubikwityny dla Cdt1.p jest Cul4.p i defekt tej ligazy powoduje pewien nadmiar Cdt1.p w fazie S cyklu i maszyną rereplikację DNA (jak u *C. elegans* do wartości ponad 100 C).

Dziedziczne defekty genów ORC1, ORC4, ORC6, CDT1 i CDC6 powodują powstawanie zespołu Meiera-Gorlina (karłowatość, małogłowie, hipoplazja uszu, brak rzepki, ale bez niestabilności chromosomów).

b. Uwarunkowanie do replikacji („licencing”)

Uwarunkowanie do replikacji DNA („licencing”) oznacza przyłączenie kilku kompleksów MCM i innych białek do ORI. Każdy kompleks MCM składa się z 6 podjednostek tworzących pierścień otaczający DNA (Mcm2.p do Mcm7.p). Kompleks MCM jest DNA helikazą aktywowaną w czasie inicjacji syntezy DNA. „Licencing” jest możliwy tylko w późnej fazie M i w fazie G1 cyklu, gdy nie działają jego inhibitory:

- Kinazy zależne od cyklin, które fosforylują i hamują liczne składniki Pre-RC.
- Gmnn.p/geminina, inhibitor Cdt1.p. Geminina jest ubikwitynowana przez APC/C i ulega degradacji pod koniec fazy M.
- Kompleks E3 Ub ligazy zawierający Cul4.p, który ubikwitynuje (w obecności PcnA.p) Cdt1.p i prowadzi do jego degradacji. W okresie „licencjonowania” białka Cdt1.p i Cdc6.p odłączają się od kompleksu.

W okresie uwarunkowania ORI do replikacji obserwuje się silną monometylację histonów H4K20me1 przez metylotransferazę Kmt5A.p/Prset7.p, a u drożdży dwumetylację H3K4me2 przez Kmt2A-H.p. W fazie S enzym Kmt5A ulega degradacji, co hamuje „relicencjonowanie”.

Wiązanie kompleksu MCM zależy także od acetylacji histonu H4 przez acetylotransferazę Kat7.p/Hbo1.p. Kat7.p jest koaktywatorem i acetyluje białko Cdt1.p. Geminina hamuje tę acetylację Cdt1.p, ponadto przyłącza deacetylazę Hdac1.p i powoduje blok wiązania kompleksu MCM. W stresie Mapk8.p/Jnk1.p fosforyluje Cdk1.p w T29. Powoduje to dysocjację białka Kat7.p z ORI i utrudnia wiązanie kompleksu MCM.

Białka kompleksu MCM

Mcm2.p jest regulatorem aktywności helikazy i jest fosforylowany przez Cdc2.p i Cdc7.p. Mutacje genu MCM2 powodują niestabilność genomową i podatność na nowotwory.

Mcm3.p wiąże Mcm5.p i Cdc45.p. Acetylacja białka Mcm3.p hamuje replikację DNA.

Białko Mcm4.p jest fosforylowane przez Cdk2.p, co zmniejsza aktywność helikazową i wiązanie kompleksu MCM z DNA. Fosforylacja w domenie N-terminalnej (przez DDK) znosi to działanie. Mutacje genu MCM4 i utrata 50% funkcji białka Mcm4.p powodują małogłowie, podatność na nowotwory i niestabilność genomową.

Białko Mcm7.p jest stabilizowane przez białko Int6.p, a po fazie S ulega fosforylacji.

Inne białka rodziny MCM

Mcm8.p, wiąże istniejące kompleksy MCM i białka Orc2.p i Cdc6.p. Brak Mcm8.p utrudnia wiązanie DNA polimerazy α i PcnA.p.

Białko Mcm9.p, jego wiązanie do Pre-RC warunkuje przyłączenie białka Cdt1.p i kompleksu MCM.

Mcm10.p tworzy cyrkularny heksamer. Wiąże ssDNA i dsDNA, ma znaczenie dla wiązania kompleksu MCM i DNA polimerazy α .

McmBP.p jest w chromatynie w fazie: M, G1 i S. Wiąże Dbf4.p i hamuje fosforylację MCM przez DDK. Hamuje włączanie MCM do Pre-RC.

Inne białka kompleksu Pre-RC

Gmnn.p/geminina jest inhibitorem replikacji, który powoduje odłączenie Lrwd1.p/OrcA.p od Cdt1.p, rozpad pre-RC kompleksu i uniemożliwia wiązanie helikazy MCM. Odgrywa swoją rolę w fazie S i G2 cyklu, a następnie jest ubikwitynowana przez APC/C ligazę i niszczona w przejściu metafaza – anafaza. Brak gemininy pozwala na przyłączanie kompleksów MCM do kompleksów pre-RC („licencjonowanie” kompleksów pre-RC) także w fazach S i G2 cyklu i umożliwia rereplikację DNA.

Gmnc.p (*geminin CC domain containing protein*) jest fosforylowane przez Cdc2.p – CycE.p wiąże także Cdc45.p, a następnie Topbp1.p.

Mcidas.p/Idas.p (*multiciliate differentiation and DNA synthesis associated cell cycle protein*) hamuje wiązanie gemininy do Cdt1.p i przyspiesza inicjację replikacji. Nadekspresja powoduje tworzenie wielobiegowych wrzecion podziałowych i tworzenie komórek wielojądrzastych.

Białko HmgA1.p wiąże ORC, lokalnie kontroluje przyłączenie kompleksu ORC do sekwencji bogatych

w AT (wg A.W. Thomae determinuje to miejsce powstawania ORC).

Innym białkiem, które determinuje przyłączenie ORC, jest Ebnal.p wirusa EBV.

c. Wczesny okres inicjacji syntezy DNA – („ORI firing”)

Inicjacja syntezy DNA zależy od aktywacji helikazy MCM przez liczne faktory, które są aktywowane przez kinazy zależne od cyklin:

- **Kinaza DDK** fosforyluje białko Sld7.p tworzące heterodimer z Sld3.p. Powoduje to przyłączenie całego heterodimeru do kompleksu MCM.
Kinaza DDK (*Dbf4.p dependent kinase*) składa się z Dbf4.p, białka z palcami cynkowymi, które jest regulatorem kinazy Cdc7.p (*S. cerevisiae*) i Cdc7L1.p (u człowieka). DDK fosforyluje białka Mcm2.p, Mcm3.p, Mcm4.p, Clspn.p/claspinę, Dbf4.p i inne, co znosi inhibicję inicjacji syntezy DNA w części „wczesnych Pre-RC”.
Cdc7L1.p jest mniej podobny do kinaz Cdc niż do kinazy Csnk2A1.p/CkII.p.
- **Drf1.p**, homolog Dbf4.p tworzy u ssaków kompleks z kinazą Cdc7L1 (podobny do DDK). Ten kompleks ma ważne znaczenie raczej dla komórek i tkanek embrionalnych.
- **Kinaza Cdk2.p** fosforyluje liczne białka na pograniczu fazy G1-S, między innymi białko Cdt1.p, co jest sygnałem jego ubiquitynacji i degradacji.
Cdk2 fosforyluje też Cdc45.p i jest to warunek jego włączenia do kompleksu.
- **Białko Sld3.p** (*S. cerevisiae*) przyciąga do kompleksu białko Cdc45.p i Sld7.p (odpowiednikiem Sld3.p u wyższych eukariontów jest białko Tcrr.p/treslin.p).
- **Białko Sld7.p** wydaje się nie mieć analogów u wyższych eukariontów).
- **Białko Sld2.p** (*S. cerevisiae*) – helikaza bierze udział w przyłączeniu subkompleksu PolE.p i białek kompleksu GINS. Po fosforylacji przez Cdk2.p subkompleksy są włączane do Pre-RC, tworząc kompleks helikazy replikacyjnej **CMG** (Cdc45.p – MCM – GINS). U wyższych eukariontów odpowiednikiem helikazy Sld2.p jest RecQL4.p – helikaza i translokaza. Mutacje genu RECQL4 powodują zespół **Rothmunda-Thompsona**.
- **Białko Cdc45.p**, którego wiązanie jest zasadnicze dla inicjacji replikacji (*firing*) – głównie dla przyłączenia i stabilizacji kompleksu DNA polimeraz. Fosforylacja Cdc45.p przez Cdk2.p jest konieczna do tworzenia kompleksu helikazy CMG (Cdc45.p – MCM – GINS).

- **Clspn.p**/klaspina wiąże Cdc45.p w Pre-RC. Jest to białko adaptorowe, które destabilizuje spiralę DNA w regionie ORI. W stresie replikacyjnym klaspina jest fosforylowana przez Chek1.p, a w mitozie przez Plk1.p, ubiquitynowana przez Btrc.p (z kompleksu SCF) i ulega degradacji.

We wczesnym okresie inicjacji replikacji w regionie „wczesnych ORI” obserwowana jest silna metylacja H3K36me1 (przyspiesza ona wiązanie Cdc45.p). Metylotransferazami, które powodują tę modyfikację, są Kmt3B.p/Nsd1.p i Kmt3C.p/Smyd2.p. Równie wysoka jest metylacja H3K79me2 (zależna od Kmt4.p/Dot1L.p), ale funkcja tej modyfikacji nie jest jeszcze wyjaśniona.

W regionach „późnych ORI”, gdzie są już obecne kompleksy Pre-RC, nie obserwuje się żadnych oznak inicjacji syntezy DNA. Przeważa tam metylacja histonu H3K36me3 (zależna od Kmt3A.p/SetD2.p) i histonu H3K4me3 (zależna od Kmt2A-H.p i Kmt3E/Smyd3.p). Obie modyfikacje hamują wiązanie Cdc45.p.

Zahamowanie inicjacji replikacji w „późnych ORI” być może wynika z aktywacji mechanizmu kontrolnego fazy S zależnego od kinazy Atm.p. W komórkach *ataxia teleangiectasia* obserwuje się przedwczesne wejście komórek fazy G1 w fazę S, a zwłaszcza brak możliwości zahamowania inicjacji replikacji „późnych ORI”.

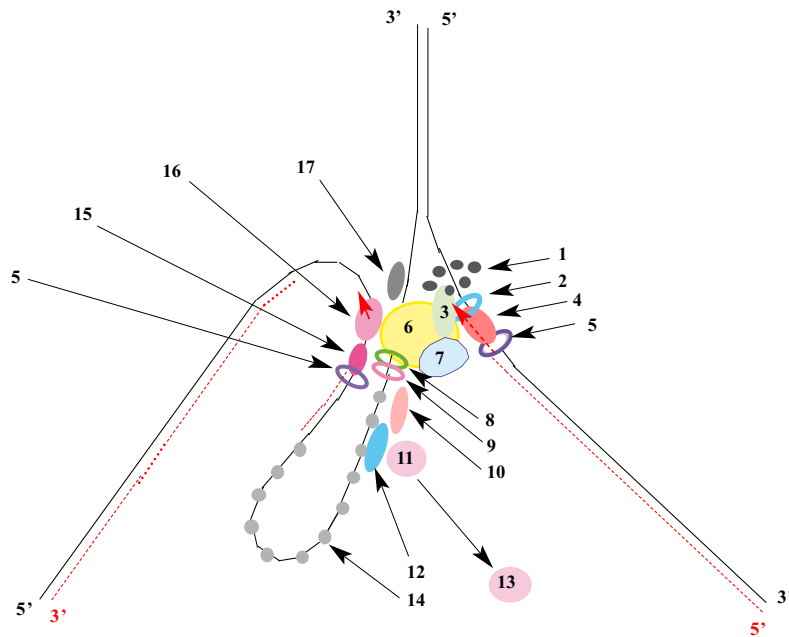
U drożdży kinaza Rad53.p (podobna nieco do kinaz CHEK) może hamować aktywność kinaz DDK i Cdk2.p.

W „regionach inicjacji” istnieją uśpione („dormant”) ORI. Są one uwarunkowane do replikacji i rozsiane między aktywnymi ORI, ale w normalnych warunkach nie mogą inicjować replikacji. Przyczynami mogą być:

- Fosforylacja białek Sld2.p i Sld3.p (RecQL4.p i Tcrr.p u wyższych eukariontów) pozwala na wiązanie białka Dpb11.p drożdży (Topbp1.p u wyższych eukariontów), co blokuje tworzenie „oczka replikacyjnego”.
- Lokalne zmiany metylacji histonów – brak demetylacji H3K36me3 i H3K4me3 zależnej od demetylaz Kdm4A-D.p/Jmjd2A-D.p i Kdm5B.p/Jarid1.p.
- Lokalny brak metylacji H3K36me1 i/lub metylacji H3K79me2.

d. Elongacja i inicjacja „późnych ORI”

Dwukierunkowa elongacja replikacji oznacza powstanie dwóch „widełek replikacyjnych”, które zawierają duże kompleksy białkowe „**replisomy**” replikujące DNA w obu kierunkach od ORI.



Rys. 11. Migrujące „widełki replikacyjne” zawierają kompleks głównej helikazy replikacyjnej (CMG), która składa się z: (1) – kompleksu helikaz MCM (2-7), (2) – subkompleksu białek GINS i (3) – Cdc45.p – regulatora odległości helikazy od kompleksu DNA polimerazy, (4) – DNA polimerazy ξ , (5) – kompleksu Pcn.p, (6) – kompleksu replisomu zawierającego między innymi: białka Mcm8.p, Mcm9.p i Mcm10.p, subkompleks Skp1.p – FoxL2.p – cullin, Wdh1.p/Ctf4.p, Dtd1.p, Gemc1.p, Ticc.p/Treslin.p i helikazę RecQL4.p (białka typu Sld2.p drożdży), (7) – kompleksu FPC (ochrony widełek replikacyjnych) składającego się z białek: Clspn.p/klaspiny, Tim.p/timeless.p i tipin.p, (8) – kompleksu RFC i Rad17.p, (9) – kompleksu 9-1-1 zawierającego białka Rad9.p, Hus1.p i Rad1.p, (10) – białka TopBP1.p, (11) – kinazy Atr.p, (12) – białka Atrp.p, (13) – kinazy Chek1.p, (14) – białka RPA, (15) polimerazy DNA α , (16) – polimerazy DNA δ , (17) – kompleksu helikaz usuwających czterołańcuchową strukturę G, białka przyłączone do DNA i RNA (u eukariontów 5' – 3' helikaza Pif1.p).

Replisomy są kompleksami białek w widełkach replikacyjnych, w węższym znaczeniu subkompleksami maszynarii replikacyjnej (rys. 11).

Kompleks elongacyjny replikacji składa się z podkompleksów DNA helikaz i DNA polimeraz. W skład podkompleksu helikaz wchodzi helikazy replikacyjne główne i pomocnicze:

- Główne helikazy bakteryjne (białko DnaB.p *E. coli*) rozplatają łańcuch opóźniony dsDNA w kierunku 5' – 3'. Natomiast helikazy wyższych eukariontów (kompleks helikaz MCM2-7) przesuwają się na łańcuchu wiodącym w kierunku 3'–5'.
- Energia konieczna do rozplatania DNA pochodzi z ATP (dla DnaB.p 1 cząsteczka ATP na dwie pary zasad DNA).
- Helikazy pomocnicze ułatwiają przejście widełek replikacyjnych przez szczególne struktury DNA lub przez kompleksy DNA z białkami.

Bakteryjne helikazy pomocnicze działają na łańcuchu wiodącym w kierunku 3' – 5' i współdziałają z polimerazą ξ (jak UvrD.p).

U eukariontów helikazy pomocnicze są związane z łańcuchem opóźnionym DNA i działają w kierunku 5' – 3' (helikaza *S. cerevisiae* Rrm3.p i ludzka Pif1.p). W ruchu widełek replikacyjnych odgrywają też rolę helikazy Blm.p i Wrn.p.

DNA polimerazy należą do rodziny B (jest znanych 7 rodzin polimeraz DNA – A, B, C, D, X, Y i RT).

- **Polimeraza DNA α** (PolA.p) jest tetramerem dwóch podjednostek DNA prymazy i dwóch DNA polimerazy.
- **Polimeraza δ** (PolD.p) syntetyzuje DNA łańcucha opóźnionego i jest enzymem o wysokiej wiarygodności replikacji.
- **Polimeraza DNA ξ** (PolE.p) prowadzi syntezę łańcucha wiodącego.

- **Polimeraza γ** (PolG.p) jest replikazą mitochondrialną.

Koordinacja funkcji helikaz i polimeraz

Kompleksy helikaz i DNA polimeraz są w stałym kontakcie. Brak synchronizacji ruchu obu tych kompleksów (przez białko Cdc45.p) powoduje powstanie długich odcinków jednołańcuchowego DNA, co jest sygnałem stresu replikacyjnego. Przed inicjacją syntezy DNA kinaza DDK fosforyluje białko Mcm4.p, co ułatwia wiązanie Cdc45.p.

Kontakt Cdc45.p i MCM2-7 jest regulowany przez kompleks GINS. Białko Gins3.p ulega fosforylacji przez kinazy Atm.p i Atr.p w stresie replikacyjnym. Białko Psf1.p drożdży (Gins1.p u wyższych eukariontów) jest przyłączane do replisomu w obecności białek Dpb11.p/Topbp1.p i Sld3.p. Obecność Psf1.p ułatwia przyłączenie Cdc45.p i inicjację replikacji.

Łącznikiem helikazy i DNA polimerazy α jest białko Wdh1.p/Ctf4.p (faktor progresji replisomu, gra też rolę w kohezji chromatyd siostrzanych). Białko Ctf4.p/Wdh1.p przyłącza helikazy Mcm2.p, białka Mcm10.p, Gins1.p, Gins2.p i DNA polimerazę α .

Klaspina (Clsp.p) odgrywa rolę łącznika helikazy i DNA polimerazy ξ . Klaspina tworzy **kompleks FPC** (*fork protection*) z białkami Timeless.p/Tim1.p i Tipin.p (Csm3.p u *S. cerevisiae*) ważny dla przeżycia komórki w stresie replikacyjnym i genotoksycznym.

Innym subkompleksem w obrębie replisomu jest wiążący helikazę MCM2-7 i ułatwiający rozplatanie DNA – **kompleks FACT**. Zawiera on faktor elongacji białko Ssrp1.p (*structure specific recognition protein 1*) i białko Skpt16h.p/Spt16.p/Cdc68.p. Kompleks FACT reguluje szybkość przemieszczania się widełek replikacyjnych.

W regulacji funkcji replisomu uczestniczą także nietranslatowane RNA, jak *Y-RNA* i inne cząsteczki RNA.

Y-RNA (jak *Y1*, *Y3*, *Y4*, *Y5*) wiążą w późnej fazie G1 niereplikowaną chromatynę i odłączają się po inicjacji replikacji (są więc w pewnym stopniu faktorami licencyjnymi replikacji).

RNA, które tworzą kwartety G, wiążą białko wirusa EBV (Ebna1.p), co pozwala na przyłączenie ORC komórki gospodarza do sekwencji ORI wirusa.

W replisomie znajdują się liczne kompleksy białek obejmujące i ślizgające się wzdłuż spirali DNA (*sliding clamps*):

- **Homotrimer białek Pcn.a.p** ułatwia poruszanie się DNA polimerazy i zwiększa jej procesywność. Kompleks ten jest faktorem licencyjnym replikacji,

jest chaperonem histonów i zwiększa kohezję chromatyd siostrzanych.

W stresie replikacyjnym Pcn.a.p jest ubikwitynowany, co aktywuje polimerazy TLS (replikazy uszkodzonego DNA) lub sumoilowany (hamowanie TLS). Acetylacja Pcn.a.p zwiększa jego wpływ na polimerazę DNA δ .

- **Kompleks RFC** (pentamer białek Rfc1-5.p) ułatwia wprowadzenie kompleksu Pcn.a.p na łańcuch DNA. Białka RFC tworzą też kilka innych podobnych kompleksów.
- **Kompleks RFC** – Chtf18.p/Ctf18.p – Dsccl1.p/Dcc1.p jest alternatywnym kompleksem wprowadzającym Pcn.a.p na dsDNA.
- **Kompleks RFC** – Atad5.p/Elg1.p. Atad.p jest kompleksem białek podobnym do RFC, jego duża ilość w zahamowanych widełkach replikacyjnych wiąże Rad9.p. Pełni rolę w deubikwitynacji Pcn.a.p, wiąże Wdr48.p, aktywator proteazy ubikwityny.
- **Kompleks RFC** – Rad17.p/Rad24.p ułatwia wprowadzenie kompleksu Rad9.p – Hus1.p – Rad1.p (**kompleks 9-1-1**) na dsDNA. Rad9.p jest stale obecny w chromatynie, w stresie replikacyjnym jest fosforylowany przez Atr.p. Umożliwia to zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G2.

„Dojrzewanie” fragmentów Okazaki

DNA polimeraza δ po dojściu do poprzedniego fragmentu oddziela jego 5' koniec ze starterem RNA. Fragment ten ulega odcięciu, a DNA ligaza I zamyka istniejącą przerwę jednołańcuchową.

Terminacja replikacji

Gdy dwa widełki replikacyjne spotykają się, następuje odłączenie helikaz MCM2-7. Pewną rolę w tym procesie odgrywa też białko wiążące kompleks MCM – Mcmbp.p.

Inicjacja „późnych” ORI

Ta inicjacja może polegać na zmianie stanu epigenetycznego chromatyny. Blokowanie inicjacji replikacji wiąże się z metylacją H3K36me3 i H3K4me3 i obniżeniem wiązania białka Cdc45.p. Usunięcie tych trójmetylacji przez demetylasy Kdm4A/Jmjd2A.p i Kdm5B.p/Jarid1B.p oraz metylacja H3K36me1 przez Kmt3B.p/Nsd1.p i Kmt3C.p/Smyd2.p zwiększa wiązanie Cdc45.p i inicjuje replikację.

Początek elongacji związany jest z metylacjami H3K27me2 przez Kmt4.p/Dot1.p, Kmt6.p/Ezh2.p i H3K4me przez Kmt4A.p/Trx1.p. Zmniejszenie aktywności Kmt4.p/Dot1.p może powodować rereplikację DNA.

2. ZAHAMOWANIE RUCHU WIDEŁEK REPLIKACYJNYCH

Zahamowanie ruchu widełek replikacyjnych może być powodowane endogennymi lub egzogennymi dla komórki przyczynami.

Do przyczyn endogennych można zaliczyć:

- Istnienie regionów trudnych do replikacji (jak „**bariery replikacji**” – regiony, gdzie replisom koordynuje inne od replikacji procesy, na przykład parowanie chromatyd lub wbudowywanie nukleosomów). Do regionów trudnych do replikacji zaliczane są telomery, centromery i powtórzenia mikrosatelitarnego DNA.
- Istnienie kompleksów heterochromatyny.
- Regiony aktywnej transkrypcji, jak sekwencje rDNA. U *S. cerevisiae* w sekwencjach rDNA jest wiązane białko Fob1.p, hamujące replikację biegnącą w kierunku przeciwnym do syntezy rRNA. U ludzi podobnym białkiem jest Ttf1.p (faktor terminacji RNA polimerazy I). Odłączenie tych białek wymaga aktywności helikaz pomocniczych typu Rrm3.p.
- Kompleksy Cdk9.p i cykliny T regulują proces transkrypcji przez fosforylację domeny C-terminalnej RNA polimerazy II, ale także wiążą białka Atrp.p i Atp.p, stabilizują widełki replikacyjne i odgrywają rolę we wznowieniu syntezy DNA w stresie replikacyjnym.
- Miejsca częstych złamań są dziedziczone w sposób mendelowski i charakteryzują się małą liczbą tworzonych ORI. Rzadkie miejsca łamliwe mogą być uwidocznione po zadziałaniu egzogennych czynników, jak afidikolina (inhibitor DNA polimerazy α), nadmiar tymidyny, 5-azacytydyna lub bromodezoksyurydyna.
- Tworzenie pewnych struktur DNA, jak helisy typu A, hybrydy RNA-DNA lub skrzyżowania izomeryczne.
- Defekty replisomu.

Do przyczyn egzogennych zaliczyć można:

- Uszkodzenie matrycy DNA przez liczne czynniki genotoksyczne (zwłaszcza powstawanie przerw jednołańcuchowych DNA, dimerów pirymidynowych, 6-4 fotoproduktów, wiązań krzyżowych (na przykład ICL) i innych).
- Uszkodzenie funkcji DNA topoizomeraz przez inhibitory, na przykład: pochodne kamptotecyny dla DNA topoizomerazy I (jak topotekan i irynotekan), pochodne antracyklin (jak doksorubicyna i daunorubicyna) i pochodne epipodofylotoksyn dla topoizomerazy II.

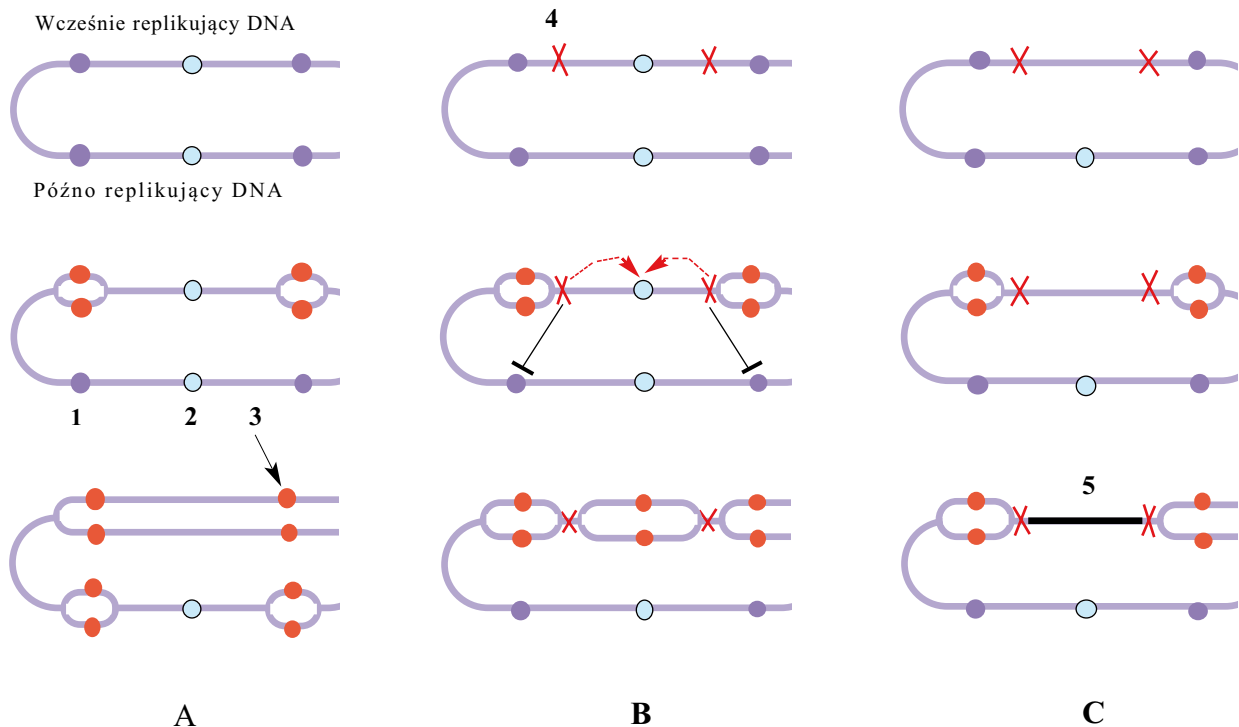
- Obniżenie poziomu deoksynukleotydtrójfosforanów przez blok aktywności reduktazy rybonukleotydowej (hydroksymocznik, fludarabina, kladrybina lub gemcytabina).
- Brak synchronizacji migracji kompleksu DNA polimeraz i DNA helikaz powoduje powstanie długich sekwencji jednołańcuchowych. Główną tego przyczyną jest zahamowanie ruchu DNA polimeraz przez nadfiolet, hydroksymocznik, cisplatynę i afidikolinę. Zahamowanie ruchu widełek replikacyjnych jest rozpoznawane przez białka mechanizmów punktów kontrolnych cyklu. Te mechanizmy powodują:
 - Stabilizację struktury zahamowanych widełek replikacyjnych. Rolę w tej stabilizacji odgrywa między innymi kompleks FPC (klaspina, białko timeless.p i Tipin.p). Liczne białka replisomu ulegają degradacji, co zmniejsza niestabilność genomową. Rolę w degradacji gra kompleks SCF zawierający białko Pof3.p (*S. pombe*) lub FoxL2.p (człowiek).
 - Aktywację „uśpionych ORI” (uwarunkowanych do replikacji, ale nieaktywnych) w regionach bliskich zahamowanych widełek.
 - Inhibicję inicjacji replikacji uwarunkowanych ORI w późno replikującej chromatynie.
 - Aktywację syntezy prekursorów DNA.
 - Stymulację reperacji DNA.
 - Blok cyklu komórkowego.

a. Funkcja „uśpionych” ORI

Liczba uwarunkowanych do replikacji (lub „licencjonowanych”) ORI jest znacznie większa od liczby ORI rzeczywiście inicjujących syntezę DNA. W braku stresu replikacyjnego przejście widełek replikacyjnych przez sekwencję uśpionego ORI znosi jego stan uwarunkowania. Jednak gdy migracja widełek replikacyjnych ulega zahamowaniu, obserwuje się inicjację replikacji w najbliższych uśpionych ORI przy jednoczesnym zahamowaniu syntezy DNA w odległych ORI. Zahamowanie dotyczy głównie replikonów aktywowanych w późnej fazie S cyklu (**rys. 12**).

Zahamowanie ruchu jednych tylko widełek replikacyjnych nie jest przeszkodą w replikacji, podobnie jak zahamowanie ruchu dwóch sąsiednich widełek pod warunkiem, że między nimi obecny jest uśpiony ORI. Jeśli warunek ten nie jest spełniony, pewne sekwencje nie ulegają replikacji.

Mechanizm zahamowania inicjacji replikacji w replikonach późnej fazy S zależy od aktywacji punktu kontrolnego cyklu (głównie przez fosforylację fosfatazy Cdc25Ap przez kinazy Atr.p – Chk1.p) i od braku aktywacji kinaz DDK i Cdk2.p. Aktywacja lokalnych „uśpionych” ORI zależy być może od



Rys. 12. Rola „uśpionych” ORI w replikacji DNA.

(A) – w warunkach normalnych, (B) – w obecności uszkodzeń DNA hamujących postęp widełek replikacyjnych, (C) – w obecności uszkodzeń DNA i braku „uśpionych” ORI.

(1) – uwarunkowany do replikacji ORI, (2) – „uśpiony” ORI, (3) – ORI inicjujący replikację, (4) – uszkodzenia DNA, (5) – sekwencja nieulegająca replikacji.

obecności czynników blokujących mechanizm punktu kontrolnego.

b. Zahamowanie spowodowane obecnością przerw jednego łańcucha DNA

Większość powstających przerw jednołańcuchowych DNA jest spowodowana czynnikami endogennymi (ilość tych przerw jest oceniana na 10^4 na komórkę na dobę). Egzogenne czynniki, które powodują powstawanie jednołańcuchowych przerw DNA, to cisplatyna, afidokolina (inhibitor DNA polimerazy), hydroksymocznik, nadfiolet.

Przerwy jednołańcuchowe DNA (SSB) są rozpoznawane przez zasadową domenę białka Parp2.p i przez domenę palców cynkowych białka Parp1.p. PARylacja histonów regionu SSB umożliwia przyłączenie białek chromodomeny Chd1L.p/Alc1.p i kompleksu NuRD (który reguluje aktywność E3 ligaz ubikwityny Rnf8.p i Rnf168.p).

Głównym faktorem rozpoznającym SSB jest białko szkieletowe kompleksu Xrcc1.p. Białko Xrcc1.p jest fosforylowane przez Csnk2A1.p/CkII.p w warunkach stresu. Białko Xrcc1.p ma dwie domeny BRCT, które wiążą zasadnicze dla reperacji SSB enzymy Apel.p

i Lig3.p. Xrcc1.p wiąże też białko Parp1.p, a przez grupę fosforanową białka Pnkp.p/Pnk.p (kinazę – fosfatazę polinukleotydową), Aptx.p/aprataksynę (hydrolazę polifosforanu diadenozyny) i Aplf.p (Aptx.p i *Pnkp.p like protein*).

Przyłączenie kompleksów białkowych Rad9.p – Hus1.p – Rad1.p (kompleks 9-1-1) i RFC – Rad17.p jest konieczne do wiązania kompleksu kinazy Atr.p.

Przerwy jednołańcuchowe powodują ekspozycję odcinków ssDNA, które przyłączają kompleksy RPA-Atrip.p-Atr.p. RPA mogą być częściowo zastępowane przez białka NABP. Na początku fazy M i w stresie replikacyjnym białko Rpa2.p jest fosforylowane przez Cdk2.p w S29, a Rpa2.p i Rpa3.p przez kinazę Atr.p.

FPC kompleks (Tim.p/timeless.p – Tipin.p – Clspn.p/klaspina) chroni widełki replikacyjne. Defekty tego kompleksu są przyczyną uszkodzenia funkcji punktu kontrolnego fazy S cyklu komórkowego, braku fosforylacji i aktywacji kinazy Chk1.p.

W stresie replikacyjnym białka RPA wiążą helikazę Brip1.p/Bach1.p/FancJ.p. Mutacje genu BRIP1 powodują wrażliwość komórek na stres replikacyjny i są obserwowane w rakach piersi/jajnika.

W tworzeniu kompleksu bierze udział białko chaperonowe Telo2.p. Tworzy ono kompleks z białkami

Tti1.p i Tti2.p, który stabilizuje kinazy PIKK, odgrywa rolę w punkcie kontrolnym fazy G2 i reguluje długość telomeru.

Białko Cinp.p (*Cdk2.p interacting protein*) jest obecne w replisomie do momentu inicjacji syntezy DNA. Jest sensorem uszkodzenia DNA i czynnikiem stabilizującym genom. Wiąże ono Atr.p, Atrip.p, Mcm5.p, Cdk2.p, Cdc7L1.p, przez które jest fosforylowane. Defekt genu CINP jest przyczyną braku fosforylacji kinazy Chk1.p i wrażliwości komórek na hydroksymocznik.

Kompleks Atr.p – Atrip.p jest stabilizowany przez Nek1.p (kinazę z rodziny NIMA). Jest niezbędna do autofosforylacji Atr.p w S1989.

Ważną rolę w aktywacji Atr.p pełni także białko Topbp1.p (białko Dbp11.p *S. cerevisiae*) Wiąże ono przez domenę AAD domenę PRD, która jest obecna w białku Atr.p (i we wszystkich innych kinazach typu PIKK).

W stresie replikacyjnym Topbp1.p wiąże białka Ticrr.p/Treslin.p, Rbbp8.p/CtIP.p, Bripl.p/Bach1.p/FancJ.p, cały kompleks MRN (co stabilizuje Topbp1.p i aktywuje kinazę Atr.p), Mdc1.p i Rad9.p (z kompleksu 9 – 1 – 1).

Kinaza Atr.p koordynuje:

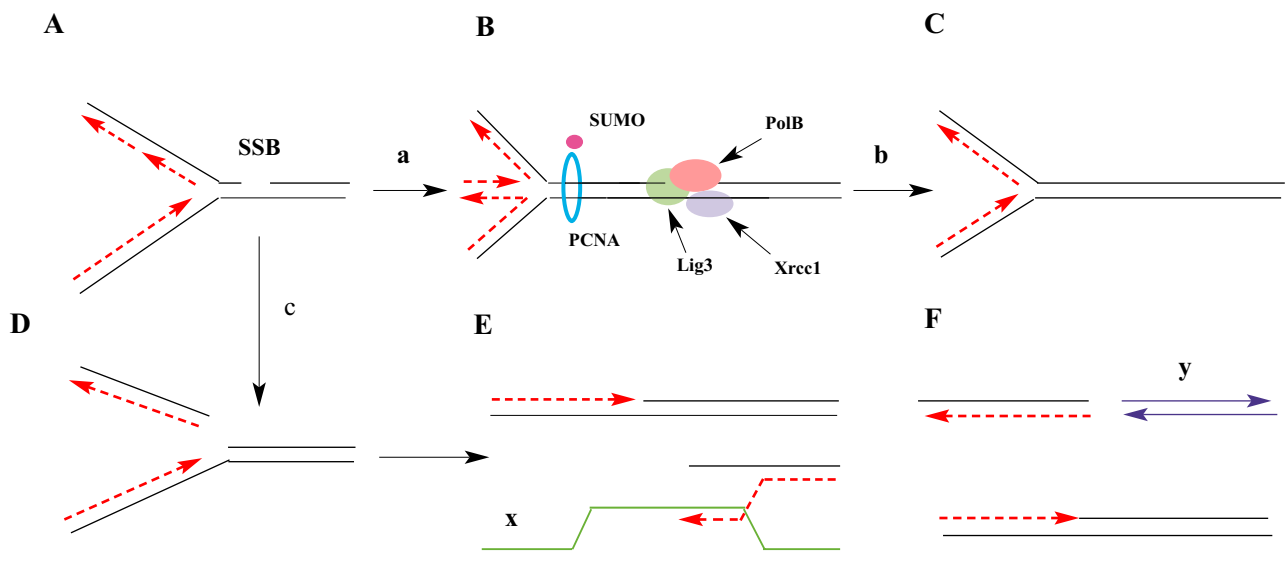
- inicjację syntezy DNA w ORI,
- funkcjonowanie punktu kontrolnego fazy S cyklu komórkowego,
- stabilizację zahamowanych widełek replikacyjnych,
- wznowienie funkcji zatrzymanych widełek replikacyjnych.

Atr.p reguluje aktywność metylotransferazy Mll1.p/Kmt2A.p, która metyluje H3K4me3 w regionie ORI i hamuje ruch widełek replikacyjnych po uszkodzeniach DNA w fazie S. Atr.p fosforyluje histon γ H2AX, białka Mdc1.p, Rpa1.p i Rpa2.p, DNA polimerazę ξ i klaspinę.

ROZPAD ZAHAMOWANYCH WIDEŁEK REPLIKACYJNYCH

Widełki replikacyjne (WR) zahamowane istniejącą przerwą jednołańcuchową mogą być przez pewien czas ustabilizowane (co pozwala na reperację uszkodzenia, a następnie reaktywację replikacji), mogą także ulegać rozpadowi z powstawaniem „DSB o jednym końcu” (rys. 13).

Stabilizacja WR zahamowanych jednołańcuchową przerwą zależy od SUMO-ylacji Pcn.a.p w Y164, Y164,



Rys. 13. Zahamowanie widełek replikacyjnych (WR) przez jednołańcuchową przerwę DNA (SSB).

(A) – widełki replikacyjne napotykać SSB. (a) – stabilizacja zahamowanych WR przez SUMOylację Pcn.a.p (to hamuje reperację typu HR), przez PIK kinazy i kompleks FPC (*fork protection complex*). (B) – Cofnięcie WR (rola białek Wrn.p, Blm.p i FancM.p) oraz naprawa SSB reakcją SP-BER, (b) – reaktywacja widełek replikacyjnych, (C) – replikacja. (c) – rozpad widełek replikacyjnych, (D) – utworzenie przerw dwułańcuchowych DNA z jednym końcem (brak SUMOylacji Pcn.a.p i inaktywacja FPC). (E) – naprawa przez HR (zależy od Rad51.p i Brca2.p) i BIR (replikacja indukowana uszkodzeniem – u drożdży), (x) – DNA homologicznego chromosomu, (F) – naprawa typu NHEJ (zależy od 53bp1.p, prowadzi do niestabilności genomowej), (y) – wolny koniec „obcego” DNA.

Y127 (drożdże) i innych, zależnej od Sae1.p, Uba2.p/Sae2.p, Ube2L.p i E3 SUMO ligazy typu Siz1.p (drożdże).

SUMO-ilacja Pcn.p hamuje reperację DNA zależną od homologicznej rekombinacji. Istnieją też inne mechanizmy chroniące zahamowane WR:

- PARylacja histonów regionu SSB przez Parp1.p zapobiega powstawaniu DSB i ułatwia naprawę uszkodzenia.
- Kompleksy białek RPA wiążą i stabilizują jednołańcuchowe DNA w zahamowanych WR.
- Kompleks FPC – klaspina/Mrc1.p (*S. cerevisiae*) Tim.p/timeless.p i Tipin.p. Tim.p zapobiega uszkodzeniu DNA, ubikwitynacji i degradacji białek replisomu – DNA polimeraz i helikaz.
- PIK kinazy (Atr.p, Atm.p, Prkdc.p/Dnapkcs.p) fosforylują między innymi białka KU i białka Rpa1.p i Rpa2.p. Substrat Atr.p kinaza Chek1.p fosforyluje i aktywuje białka stabilizujące zahamowane WR i reperujące rozpadające się WR.
- Białka Xrcc5.p/Ku80.p i Xrcc6.p/Ku70.p są stabilizatorami zahamowanych WR i Pcn.p.
- Setmar.p/metnaza odgrywa rolę w NHEJ i stymuluje syntezę DNA w ulegających rozpadowi WR.

Stabilizacja WR pozwala na ich regresję, która zależy między innymi od helikaz Wrn.p i Blm.p, i reperację SSB (przez kompleks Parp1.p, Aptx.p, Xrcc1.p, Lig3.p, PolB.p) opisaną poprzednio.

Rozpad WR odbywa się po pewnym czasie jego stabilizacji. Następuje dysocjacja składników replisomu i ich częściowe zniszczenie w proteasomie. Łańcuch wiodący ulega odcięciu przez kompleks nacinający widełki replikacyjne, który zawiera (między innymi) endonukleazę Emel.p specyficzną dla struktur rozgałęzionych i nukleazę specyficznych struktur Mus81.p/Slx3.p.

Naprawa tworzonej dwułańcuchowej przerwy może być typu rekombinacji homologicznej albo BIR (*break induced replication* – raczej tylko u drożdży) albo typu NHEJ, która zwykle prowadzi do rearanżacji, niestabilności genomowej i śmierci komórki.

Decyzja o podjęciu reperacji DNA typu NHEJ lub HRR zależy od:

- Modyfikacji kompleksu PCNA w replisomie. Sumo-ilacja Pcn.p blokuje rekombinację, podczas gdy poliubikwitynacja w Pcn.p w K164 przez Ube2N.p/Ubc13.p, Ube2V2.p/Mms2.p (E2 koniugazę) i Rad5.p/Suprh.p (E3 ligazę) stymuluje naprawę typu HRR.
- Przyłączenia białka 53bp1.p, które stymuluje naprawę typu NHEJ, natomiast przyłączenie kompleksu MRN, białek Rbbp8.p/CtIp.p, Brca1.p, Rad51.p i Brca2.p aktywuje naprawę typu HR.

– Białka typu ATPazy i helikazy Srs2.p drożdży, które hydrolizuje ATP, usuwa białko Rad51.p z filamentu presynaptycznego i hamuje HRR. Ludzkimi odpowiednikami Srs2.p są: helikaza RecQL5.p, która wiąże Rad51.p i hamuje jego działanie (brak tego białka u myszy powoduje podatność na nowotwory). Podobnie działa białko Rtel.p, helikaza regulująca elongację telomerów. Brak Rtel.p zwiększa czterokrotnie HRR, a mutacje genu powodują **zespół dyskeratozis congenita**. Białko Parpbp.p/Pari.p reguluje tworzenie filamentu presynaptycznego (nie jest ATPazą ani helikazą), ale wiąże Pcn.p. Do czynników aktywujących HRR można zaliczyć:

- Helikazę HelQ.p, która tworzy kompleks przemieszczający się wzdłuż DNA (w kierunku 3' – 5'). HelQ.p stymuluje naprawę HRR w rozpadających się WR. Myszy HelQ^{-/-} są podatne na nowotwory.
- Białka drożdży Rad55.p i Rad57.p (ludzkie białko Rad51B.p), które stabilizują filament Rad51.p i hamują działanie Srs2.p.
- **Kompleks SHU**, który u drożdży składa się z białek Shu1.p, Shu2.p, Psy3.p i Csm2.p. Ludzkimi odpowiednikami są Xrcc2.p, Efhd2.p i białko Rad51D.p. U ludzi nie ma homologu białka Csm2.p, ale dodatkowe białka, jak Rad51B.p/Rad51L1.p, Rad51C.p/Rad51L2.p i Swsapl.p (ATPaza), mogą go zastępować.

c. Zahamowanie przez addukty miejsca apurynowe i UV

Uszkodzenia tego typu powodują stres replikacyjny przez odkształcenie matrycowej spirali DNA. Tego typu uszkodzenia reperowane są mechanizmami BER (*base excision repair*), NER (*nucleotide excision repair*), TLS (synteza na uszkodzonej matrycy – *translesion synthesis*) opisanymi poprzednio.

Sekwencje niedopasowania są naprawiane przez mechanizm MMR (*mismatch repair*), a dłuższe jednołańcuchowe sekwencje mechanizmem homologicznej rekombinacji (HRR).

Powstanie miejsc apurynowych/apirymidynowych wynika zwykle z przyczyn endogennych (ale czasem także egzogennych, jak usuwanie zmodyfikowanych zasad DNA). Modyfikacje zasad są spowodowane głównie czynnikami egzogennymi.

CDP (cyklobutanowe dimery pirymidynowe) są spowodowane działaniem promieniowania UV, a błędy niedopasowania pomyłkami polimerazy DNA i stanami tautomerycznymi zasad.

MODYFIKACJE ZASAD DNA

Modyfikacje zasad są wykrywane przez DNA glikozylazy, jak Ogg1.p (8-oksyguanino DNA glikozylaza), Nthl1.p/Nth1.p (glikozylaza i endonukleaza rozpoznająca utlenione pirymidyny) lub glikozylazy Neil1.p i Neil2.p (enzymy typu liazы usuwające zasadę i tworzące SSB).

Miejsca apurynowe

Powstające miejsca apurynowe są rozpoznawane i przecinane przez APu/APy endonukleazę Apex1.p/Apel.p po stronie 5' do APu/APy. Przerwy jednołańcuchowe z końcami niekompatybilnymi dla ligacji są modyfikowane przez enzymy, jak Apex1.p, Pnkp.p (kinaza polinukleotydowa i fosfataza), aprataksynę i Tdp1-2.p (fosfodwuesterazy tyrozylowe DNA).

Przerwy jednołańcuchowe

Jednołańcuchowe przerwy z końcami 3'-OH i 5'-P są ligowane przez kompleks białek: Xrccl.p – DNA Pol. β – Ligaza 3.

Po zakończonej reperacji zbędne białka BER są ubikwitynowane przez E3 ligazy Huwel.p/Mule.p lub Stub.p/Chip.p i niszczone w proteasomie. Mutacje genu STUB powodują wrodzony **zespół ataksji rdzeniowo-mózdkowej**.

CPD i 6-4PP

Obecność CPD i 6-4PP. CPD (cyklobutanowe dimery pirymidynowe) i 6-4PP (fotoprodukty 6-4 pirymidynowe) są skutkiem działania UV na DNA. Stres replikacyjny po UVC (ale także po cisplatynie i adriamycynie) stymuluje aktywność kinaz Atr.p i Atm.p, kinaz Chek1/2.p i faktora AP1. Chek1/2.p fosforylują i aktywują p53.

p53 stymuluje białko Ddb2.p (*damage recognition and DNA binding protein*), które razem z Ddb1.p tworzą faktor XPE (składnik mechanizmu naprawy DNA typu NER). Białko p53 stymuluje także inny faktor NER – XpC.p (podobny do Rad4.p u drożdży), który tworzy dimer z Rad23B.p. Ten dimer odgrywa rolę w rozpoznaniu tworzących się CPD i 6-4PP defektów DNA, powoduje rozplatanie uszkodzonej sekwencji. Rozplatanie jest stymulowane także przez helikazę Ercc2.p/XpD.p i Ercc3.p/XpB.p. Wiązanie Ercc2.p/XpD.p przyłącza białko XpA.p do kompleksu z Rpa1.p i Rpa2.p.

Faktor transkrypcji AP1 stymuluje ekspresję białek: Ercc1.p (kofaktor Ercc4.p), Ercc4.p/FancQ.p/XpF.p i Ercc5.p/XpG.p (endonukleaza ssDNA stymulowana przez UV, B(a)P i promieniowanie gamma).

Ercc5.p przecina DNA w kierunku 3' od uszkodzenia, a Ercc4.p – 5' od uszkodzenia.

Wszystkie te białka biorą udział w naprawie GG-NER (opisanej w poprzednim rozdziale).

Synteza na uszkodzonej matrycy (TLS) jest aktywowana przez monoubikwitynację Pcn.a.p obecnego w kompleksie replisomu zatrzymanych widełek replikacyjnych. TLS ma znaczenie w reperacji krótkich (jednonukleotydowych) niedopasowań sekwencji (adduktów, modyfikacji zasad lub miejsc APu/APy).

Monoubikwitynacja Pcn.a.p zależy u ludzi od E2 koniugazy ubikwityny Ube2A.p/Rad6.p i od E3 ligazy Rad18.p. Aktywuje to TLS polimerazy DNA (Polη.p, Polι.p, Polζ.p, Polκ.p lub Rev1.p).

Ubikwitynacja Pcn.a.p jest obserwowana po działaniu czynników alkilujących (MMS), po adduktach typu B(a)P, w obecności wiązań krzyżowych DNA i fotoproduktów UV, ale nie po promieniowaniu jonizującym i bleomycynie. Obecność Brca1.p aktywuje syntezę DNA typu TLS.

BŁĘDY NIEDOPASOWANIA

Błędy niedopasowania są rozpoznawane i reperowane przez mechanizm MMR, ale już po zakończonej replikacji (MMR jest poreplikacyjną naprawą DNA).

Zasadniczym enzymem wiążącym miejsca niedopasowania jest **MUT-Sα** (u ludzi kompleks Msh2.p i Msh6.p) endonukleaza wprowadzająca nacięcia po stronie 5' od miejsca niedopasowania.

MUT-Sα z zespołem białek RPA tworzy kompleks rozpoznający uszkodzenia oksydacyjne, uszkodzenia spowodowane alkilacją, promieniowaniem jonizującym, a także krótkie pętle DNA wynikające z insercji i delecji (*insertion and deletion loops* – **IDLs**).

MUT-Sα jest ATPazą (przy czym ADP obniża jej wiązanie do miejsc niedopasowania, a ATP aktywuje to wiązanie). Kompleks ślizga się po łańcuchu chromatyny, odłącza nukleosomy w miejscach niedopasowania i obniża stopień upakowania chromatyny. Msh6.p pełni zasadniczą rolę, wiążąc deformacje struktury helisy dsDNA i nukleosomy z H3K36me3. Domena N-terminalna białka Msh6.p wiąże Pcn.a.p i ulega wówczas fosforylacji.

Rola Msh2.p polega zasadniczo na stabilizacji Msh6.p. Cały kompleks *in vitro* wiąże oligomery typu G:T, O⁶-meG:T lub G:U. *In vivo* kompleks generuje sygnały o wykryciu uszkodzenia, inicjujące zmiany struktury chromatyny, blok cyklu komórkowego lub apoptozę.

MUT-Lα (zawiera białka Mlh1.p i Pms2.p) tworzy z białkami Pcn.a.p, RFC i DNA polimerazą δ kompleks

nacinający 3' od miejsca niedopasowania i ważny dla transmisji sygnałów.

Niedopasowana sekwencja DNA jest usuwana przez egzozukleazę Exo1.p w kompleksie z HmgB1.p.

d. Zahamowanie przez wiązania krzyżowe DNA

Wiązania krzyżowe między komplementarnymi łańcuchami DNA (ICL) są najpoważniejszą przeszkodą w swobodnej migracji widełek replikacyjnych. Kowalencyjne wiązania między zasadami DNA powstają w wyniku działania:

- mitomycyny C (MMC) reagującej z resztami guaniny w małym rowku DNA, powodując nieznaczne odkształcenie spirali DNA,
- iperytu azotowego, który działa na reszty guaniny w sekwencjach GNC,
- cisplatyny, która indukuje wiązania krzyżowe G[N7-N7]G i G[N7-N3]A,
- psoralenu i naświetlania UVA (w terapii łuszczyca i postaci skórnej chłoniaka T komórkowego). Psoralen działa na sekwencje 5'TA/AT,
- kwasu azotowego, który indukuje tworzenie wiązań G[N1-C2]G, G[C8-C5]T, G[C8-C5]C, C[C5-N2]G. Działa głównie na sekwencje dCpG.

W rozpoznaniu ICL w komórce zasadnicze znaczenie ma „rdzeniowy” kompleks białek FA (anemia Fanconiego) i XpC.p (faktor reperacji GG-NER).

W stresie replikacyjnym komórka rozpoznaje ICL przez kompleks MUT-Sβ (zawierający białka Msh2.p i Msh3.p) i Ercc1.p. ICL wiąże też:

- **Faktory XpC.p, XpG.p i Ercc4/XpF.p.**
- **Kompleks PSO4** zawierający białka Prpf19.p/Pso4.p (białko wiążące Setmar.p, jest faktorem dojrzewania pre-mRNA i naprawy DNA po γ-irradiacji, jest E3 ligazą ubiquityny).
- **Cdc5L.p**, Prlg1.p i Bcas.p/Spf27.p (składniki spliceosomu). Cały kompleks jest ważny dla przejścia od fazy S do G2/M i dla blokowania tego przejścia w stresie replikacyjnym.
- **FancM.p** składnik rdzeniowego kompleksu FA jest silnikiem w przemieszczaniu się FA wzdłuż DNA. FancM.p odgrywa ważną rolę w monoubikwitynacji białka FancD2.p i w tworzeniu **superkompleksu BRAFT** w naprawie ICL. Jest łącznikiem między subkompleksami FA i BS (zespołu Blooma). FancM.p tworzy kompleks z białkami Faap24.p i Telo2.p stymulujący mechanizm punktu kontrolnego zależnego od Atr.p – Chk1.p.

- **Kompleks SLX4** zawiera białka Slx4.p/FancP.p (endonukleazę), kompleks MUT-Sβ, nukleazy Mus81.p, Mus81.p, Emel1.p i Ercc1.p, Ercc4.p/XpF.p.
- **α-spektrynę** nieerytrocytarną (Sptan1.p), która tworzy kompleks z białkami Ercc1.p, Ercc4.p/XPF i FancA.p i wiąże ICL powstające po działaniu psoralenu.

Białka kompleksu FA

Anemia Fanconiego jest recesywną chorobą dziedziczną w sprzężeniu z chromosomem X. Objawy obserwowane są już w pierwszych tygodniach życia, czas przeżycia około 30 lat. Częstość występowania choroby 1:200 000.

Główne objawy:

- pancytopenia,
- niski wzrost,
- skłonność do nowotworów – AML, raki skóry, przełyku, narządu rodowego,
- wrażliwość na tworzenie wiązań krzyżowych DNA (po mitomycynie C, cisplatynie, i po dwuepoksybutanie – DEB),
- znaczna wrażliwość DNA komórkowego na uszkodzenia (zalecana ostrożność w stosowaniu wszelkich chemioterapeutyków),
- znanych jest 17 genów FA, częste mutacje są obserwowane w FANCA (70%), FANCC (10%), FANCG (10%), RAD51C/FANCO i SLC4/FANCP,
- kinaza Atr.p fosforyluje białka FancD2.p i Brip1.p/FancJ.p/Bach1.p.

Białka kompleksu BS

Zespół Blooma jest rzadką chorobą autosomalną recesywną zaczynającą się w dzieciństwie. Główne objawy:

- karłowatość z proporcjonalną budową ciała,
- wrażliwość na promieniowanie słoneczne,
- podatność na zakażenia,
- cukrzyca,
- predyspozycja do wielu nowotworów.

Komórki chorych na BS charakteryzują się niestabilnością chromosomową (jak rearanżacje, złamania, SSB). Dziesięciokrotnie rośnie częstość wymiany chromatyd siostrzanych (SCE).

W skład kompleksu BS wchodzi białka: helikaza Blm.p, białka Top3B.p, Rmi1.p (*RecQ mediated genome instability* – białko zasadnicze dla wiązania Bmi1.p i ochrony przed SCE), Rmi2.p, Rpa1.p i być może helikaza RecQL5.p (typu Blm.p).

Naprawa ICL została opisana w poprzednim rozdziale. W skrócie:

- WR zatrzymują się przed ICL. Atr.p aktywuje kompleks rdzeniowy FA, który monoubikwitynuje białka FancD2 i Brip1.p/FancJ.p/Bach1.p.
- WR cofają się z tworzeniem struktur „kurzej stopy” (działanie helikaz Blm.p i Wrn.p oraz białek FancM.p lub FancC.p). Następuje resekcja łańcucha opóźnionego (przez nukleazy Snm1B.p/DclrelB.p/Apollo.p i nukleazę Exo1.p).
- WR rozpadają się z tworzeniem DSB „o jednym końcu” przez działanie kompleksu SLX4 (zawierającego endonukleazy Slx4.p/FancP.p, Slx1.p, Mus.p81.p/Slx3.p i Emel1.p), a także kompleksu MUT-Sβ (Msh2.p i Msh3.p) i białka Ercc1.p, Ercc4.p/XpF.p i Plk1.p.
- Ercc1.p, Ercc4.p/XpF endonukleazy tną DNA 3’ od ICL, 3’-5’ egzonukleazy usuwają odcinek DNA komplementarny do ICL.
- Powstająca jednołańcuchowa przerwa zostaje wypełniona przez polimerazy replikujące uszkodzoną matrycę (TLS polimerazy).
- Usunięcie monoadduktu związanego z krótkim oligonukleotydem mechanizmem NER lub glikozylazą Neill1.p.
- Odtworzenie widełek replikacyjnych systemem naprawy HR w obecności białek FA, Brca2.p, Ercc4.p, Ercc1.p, Rad51.p, Blm.p, Top3A.p, MUT-Lα, jak i Brip1.p/ FancJ.p.

e. Deficyt prekursorów DNA

Inicjacja syntezy DNA, a zwłaszcza warunki stresu replikacyjnego, wymagają podwyższenia poziomu prekursorów replikacji (deoksynukleotrófosforanów – dNTP). Zarówno zbyt niskie, jak i zbyt wysokie stężenie dNTP jest przyczyną powstawania mutacji. Obniżenie stężenia dNTP może być powodem zatrzymania ruchu i rozpadu widełek replikacyjnych.

Poziom dNTP reguluje kompleks enzymu reduktazy rybonukleotydowej Rnr.p. Regulacja ta jest składową mechanizmu punktu kontrolnego fazy S obok innych reakcji:

- aktywacji transkrypcji genów kodujących faktory replikacji,
- zahamowania inicjacji replikacji w replikonach późno replikujących,
- ochrony integralności i stabilizacji zahamowanych widełek replikacyjnych,
- aktywacji reduktazy rybonukleotydowej.

Brak stymulacji Rnr.p w warunkach stresu replikacyjnego w komórce może być spowodowany czynnikami endogennymi, jak obniżenie aktywności kinaz

punktu kontrolnego lub blok migracji wielu widełek replikacyjnych i aktywacja wielu „uśpionych” ORI, jak i czynnikami egzogennymi:

- Stałą obecnością czynników metylujących.
- Zahamowaniem aktywności Rnr.p.
 - 3-AP/triapiną (aminopirymidyno-2-karboksalddehydotiosemikarbazon), związek chelatujący jony Fe^{3+} , jest dość toksyczny,
 - Antysensownym oligonukleotydem do Rnr2.p (GTJ2040), który jest bardzo silnym inhibitorem Rnr2.p, ale jego działanie na zwierzęta doświadczalne nie potwierdziło się u ludzi.
 - Gemcytabiną, która jest fosforylowana na dwufosforan gemcytabiny i rozpoznawana przez RNR jako imitacja substratu. W praktyce wpływ gemcytabiny na czas przeżycia pacjentek z rakiem piersi jest jednak raczej niewielki.

REGULACJA RNR U DROŹDŹY

RNR drożdży składa się z cytoplazmatycznej podjednostki Rnr1.p i z podjednostek jądrowych Rnr2.p i Rnr4.p. W cyklu komórkowym regulowany jest głównie poziom podjednostki Rnr1.p. Import do jądra komórkowego podjednostek Rnr2.p i Rnr4.p regulowany jest przez kinazę Dun1.p.

W fazie syntezy DNA lub po uszkodzeniu DNA kinaza drożdżowa Mec1.p (odpowiada kinazie Atr.p) i Tell1.p (odpowiada Atm.p) fosforylują i aktywują kinazę Rad53.p (odpowiada kinazie Chk1.p u ssaków).

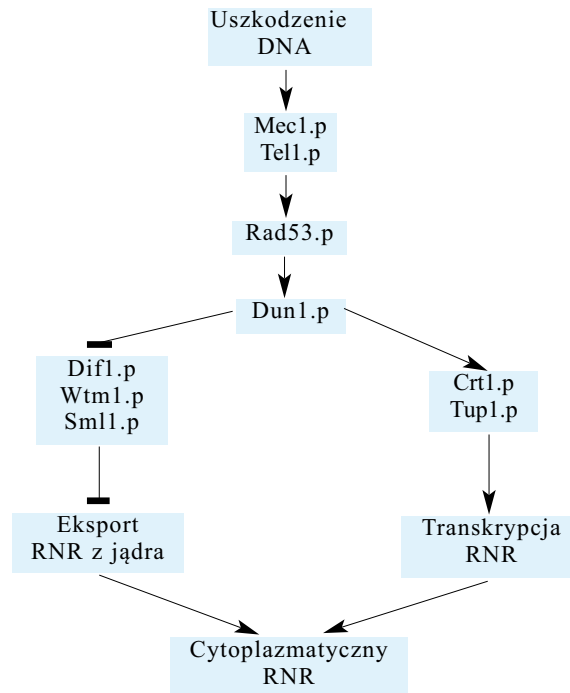
Po autofosforylacji kinaza Rad53.p fosforyluje i aktywuje kinazę Dun1.p (kinaza typu Atr.p *S. cerevisiae*). Kinaza Dun1.p fosforyluje i indukuje degradację białek wiążących w jądrze komórkowym podjednostki RNR:

- Dif1.p adaptor importu jądrowego Rnr2.p,
- Wtm1.p podobny adaptor dla Rnr2.p i Rnr4.p,
- Sml1.p inhibitor wiążący i stabilizujący Rnr1.p. Ludzkim odpowiednikiem Sml1.p jest białko Tff2.p (*trefoil factor 2*).

Kinaza Dun1.p fosforyluje też i inaktywuje represory transkrypcji Crt1.p i Tup1.p (*S. cerevisiae*). Crt1.p powoduje przyłączenie represora Tup1.p do promotorów i hamuje ekspresję genów **RNR**.

Homologiem genu CRT1 u ssaków jest gen RFX1. Rfx1.p jest białkiem posiadającym domenę WH (*winged helix*). Ekspresja białek WH jest specyficzna dla stadium różnicowania komórek.

Regulację ekspresji genów RNR u drożdży przedstawia **rys. 14**.



Rys.14. Regulacja ekspresji genów RNR u drożdży *S. cerevisiae* w warunkach stresu replikacyjnego. Uszkodzenie DNA aktywuje kinazy Mec1.p i Tel1.p (typu Atr.p). Kinazy te fosforylują i aktywują kinazę Rad53.p, a ta fosforyluje kinazę Dun1.p. Aktywna kinaza Dun1.p fosforyluje i inicjuje degradację białek Dif1.p, Wtm1.p i Sml1.p blokujących eksport białek RNR do cytoplazmy. Dodatkowo Dun1.p aktywuje (pośrednio) transkrypcję genów RNR.

REGULACJA RNR U SSAKÓW

Kompleks RNR u ssaków jest kodowany przez trzy geny:

- **RRM1** koduje dwie niejednakowe podjednostki enzymu: R1 i R2. Lokus genu znajduje się w regionie 11p15.5, który zawiera geny supresorów transformacji nowotworowej i jest imprintowany.

Defekty regionu 11p15.5 powodują wrodzony **zespół chorobowy Beckwitha-Wiedemanna**, a także skłonność do wielu nowotworów, jak *rhabdomyoblastoma*, raki płuc, raki jajników i piersi.

W guzie Wilmsa i *hepatoblastoma* jest stwierdzana utrata imprintingu genetycznego. Poziom ekspresji genu RRM1 nie jest regulowany.

- **RRM2** koduje podjednostkę regulatorową M2 i ma dwie izoformy niezbędne dla przebiegu cyklu komórkowego. W przeciwieństwie do RRM1 – RRM2 jest onkogenem. Blokowanie ekspresji Rrm2.p może być ważne w terapii nowotworów.

W senescencji indukowanej onkogenami poziom Rrm2.p maleje. Samo obniżenie poziomu Rrm2.p powoduje senescencję. W przejściu G1-S transkrypcja Rrm2.p zależy od E2F.p, a jego późniejsze niszczenie w cyklu od E3 ligazy ubiquityny APC/C

- Cdh1.p.

- Ekspresja **genu RRM2B** jest stymulowana przez p53, FoxO3.p i przez uszkodzenia DNA (przez UV, promieniowanie γ , adriamycynę), a hamowana przez E2F7.p. Gen koduje małą podjednostkę RNR ważną dla reperacji DNA raczej w fazie G0 i G1 cyklu życiowego komórki. Wiąże i jest fosforylowana przez Atm.p (w S72). Do funkcji Rrm2B.p można zaliczyć:
 - regulację cyklu komórkowego,
 - współdziałanie w procesie naprawy DNA,
 - homeostazę mitochondriów,
 - supresję przerzutów i proliferacji komórek nowotworowych (jednak czasem jest markerem inwazyjności nowotworów),
 - przeciwdziałanie uszkodzeniom komórek przez ROS.

Mutacje recesywne genu RRM2B powodują zespół utraty DNA mitochondrialnego, mutacje dominujące zespół zewnętrznej postępującej oftalmoplegii i zespół mitochondrialnej encefalopatii nerwowo-gastrointestinalnej.

Defekty DNA podwyższają stres oksydacyjny, który zwiększa poziom komórkowego białka p53. Białko to stymuluje wysoką ekspresję genu RRM2B, a jego

produkt wpływa na obniżenie stresu oksydacyjnego i zwiększa aktywność RNR konieczną do replikacji.

– **Rfx1.p** (*regulatory factor XI*) jest ortologiem białka Crt1.p, stymuluje ekspresję genów HLA, ale hamuje ekspresję genów RNR.

C. STRES OKSYDACYJNY

Podwyższone ciśnienie parcjalne tlenu może przyspieszać procesy starzenia komórek i całego organizmu, przyczyniać się do powstawania chorób neurodegeneracyjnych i reumatycznych, a dodatkowo zwiększać prawdopodobieństwo transformacji nowotworowej.

Przyczyną są powstające uszkodzenia DNA, jak na przykład utlenianie zasad, powstawanie miejsc apurynowych i apirymidynowych, tworzenie przerw jednołańcuchowych i dwułańcuchowych DNA, a także uszkodzenia białek i lipidów.

Zwłaszcza uszkodzenia DNA mitochondrialnego są częste u organizmów starzejących się. Jednak ROS (reaktywne cząstki zawierające tlen) mogą być też molekułami sygnalizacyjnymi w fizjologicznych procesach, jak proliferacja, różnicowanie i apoptoza.

Uszkodzenia oksydacyjne lipidów, białek i kwasów nukleinowych były opisane w rozdziale III. W wielkim skrócie są to:

Oksydacje lipidów

Obserwuje się oksydacje wielonienasyconych kwasów tłuszczowych obecnych w strukturach membran komórkowych. Jest to reakcja, w której tworzą się nowe wolne rodniki i substancje, jak:

- dwualdehyd malonowy (**MDA**),
- nadtlenki lipidów,
- skoniugowane dieny,
- toksyczne aldehydy.

Te oksydacje zmieniają silnie własności membran komórkowych, na przykład zwiększa się ich przepuszczalność dla białek i enzymów.

Produkty oksydacji lipidów, jak MDA lub HNE (*4-hydroksy 2-nonenal*), mogą kontrolować ekspresję genów i proliferację komórek. MDA wiąże dA, dG i dC – te addukty są mutagenne i mogą prowadzić do transformacji nowotworowej.

Oksydacje białek

ROS utlenia białka strukturalne i hamuje proteolizę, uszkadza aktywność enzymów, jak na przykład obniża kontrolę dokładności replikacji („proof-reading”).

Uszkodzone białka mogą być odporne na proteolizę i mogą tworzyć różne agregaty w układzie retikulum endoplazmatycznego (przyczyna patologicznego starzenia się).

Oksydacje kwasów nukleinowych

Oksydacje zasad, jak na przykład tworzenie 8-oxo-dG, mogą prowadzić do transwersji G>T. Para zasad Oxo-dG-dC jest słabo rozpoznawana przez DNA metylotransferazy (DNMT-azy) i jest nisko metylowana.

Stres oksydacyjny w komórkach raka

Komórki progenitorowe i komórki stem (w tym także komórki nowotworowe stem) są bardzo wrażliwe na stres oksydacyjny. Zwłaszcza w tkankach gruczolaka i raka jelita grubego poziom ROS i markerów stresu jest bardzo wysoki (NO, 8-oxo dG, nadtlenki lipidów, aktywność GPX, obniżona metylacja cytozyn).

Poziom 8-oxo dG może być badany w surowicy lub w limfocytach krwi obwodowej.

1. REAKCJA NA ROS I RNS

ROS i RNS (reaktywne cząstki zawierające azot) obecne w przestrzeni międzykomórkowej i generowane wewnątrz komórek powodują powstanie pęknięć dwułańcuchowych i innych uszkodzeń DNA jak tworzenie jednołańcuchowych sekwencji.

Pęknięcia dwułańcuchowe DNA aktywują kompleksy MRN – ATM, a następnie kinazę Chek2.p i białko p53. Białko p53 i produkty jego genów docelowych powodują zatrzymanie cyklu komórkowego.

Odcinki jednołańcuchowe i inne uszkodzenia aktywują kompleksy białek RFC (faktor replikacyjny C) z Rad17.p i Atr.p, a także kinazy Chek1.p i **kompleksy BRCC** (zawierające białka Brca1.p i Brca2.p). Kompleksy te uczestniczą w naprawie DNA, która jeśli jest skuteczna, przywraca możliwość replikacji DNA i proliferacji komórek.

Defekty naprawy uszkodzeń DNA lub nieskuteczne zatrzymanie cyklu komórkowego może prowadzić do mutacji, niestabilności genomowej i chromosomowej komórek.

Skutkiem mutacji i niestabilności genomowej są patologie organizmu. Można do nich zaliczyć:

- przedwczesne starzenie się organizmu,
- choroby serca i naczyń krwionośnych,
- nadciśnienie,
- zaburzenia poziomu jonów wapniowych,
- miażdżycę,
- cukrzycę,