

## **Aktywność ścieżek naprawy jednoniciowych pęknięć DNA, *short-patch* oraz *long-patch*: zależność od fazy cyklu podziałowego i dostępności białek PCNA oraz XRCC1**

### **Streszczenie**

---

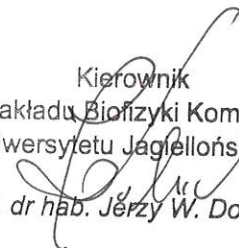
Na skutek oddziaływania czynników endo- i egzogennych każdego dnia w komórkach powstaje nawet kilkanaście tysięcy jednoniciowych pęknięć DNA. Nienaprawione, mogą blokować istotne dla komórek procesy, takie jak replikacja DNA i transkrypcja, oraz mogą ulec przekształceniu w pęknięcia dwuniciowe, poważnie zagrażając stabilności genomu i prowadząc do mutacji genów czy śmierci komórki. Ścieżki naprawy jednoniciowych pęknięć DNA – SP (*short-patch*) i LP (*long-patch*) odpowiadają za efektywną naprawę powstających uszkodzeń. Wykorzystują one wiele wyspecjalizowanych białek, a każde z nich ma swoją precyzyjnie określoną funkcję. XRCC1 (ang. *X-ray Repair Cross Complementing Protein 1*), kluczowy czynnik w naprawie SSBs, bardzo szybko – w przeciągu minut – jest rekrutowany do miejsca uszkodzenia, gdzie tworzy wyraźne ogniska, składające się z bardzo wielu cząsteczek. Służy jako molekularne rusztowanie dla innych białek, koordynując i umożliwiając proces naprawy DNA zarówno w ścieżce SP, jak i LP. Pośród czynników naprawczych są też takie, które biorą udział w innych istotnych dla komórki procesach. Białko PCNA jest markerem replikacji i cząsteczką, bez której proces ten nie mógłby zachodzić, ale jest też kluczowe w naprawie jednoniciowych pęknięć DNA ścieżką LP. Powstaje zatem pytanie, jakimi ścieżkami naprawiane będą SSBs w komórkach replikujących i niereplikujących, jak liczba tych uszkodzeń będzie wpływała na proces naprawy oraz jak wiele jednoniciowych pęknięć DNA komórka może naprawiać jednocześnie.

W niniejszej rozprawie pokazano, iż komórki po lokalnym naświetleniu ich chromatyny promieniowaniem laserowym z zakresu widzialnego (488 nm, pod nieobecność egzogennych fotouczulaczy) wykazują oznaki stresu w postaci blebów, mogą zatrzymać się w cyklu podziałowym, a nawet umrzeć. Dodatkowo, ogniska białka XRCC1 formowane po naświetleniu obszarów replikacji są podobne do tych, które powstają po traktowaniu komórek

topotekaniem (chemioterapeutycznym, inhibitorem topoisomerazy I, wywołującym SSBs). Zaobserwowane zjawiska wskazują zatem na powstanie uszkodzeń DNA (w tym jednoniciowych pęknięć) w wyniku poddania chromatyny działaniu skupionej wiązki światła widzialnego wykorzystywanego w mikroskopii konfokalnej. Obserwacja rekrutacji białek XRCC1 i PCNA do generowanych SSBs pozwoliła na zbadanie aktywacji ścieżek naprawy SP i LP. Otrzymane wyniki wskazują, że generując lokalnie niewielką liczbę SSBs w komórkach HeLa, ścieżka LP może nie być uruchamiana we wczesnej fazie S, a w pozostałych fazach cyklu podziałowego jest rzadziej wykorzystywana niż ścieżka SP. W fazie S zaobserwowano oddysocjowanie XRCC1 z miejsca naprawy po czasie krótszym niż w komórkach niereplikujących, co może wskazywać na szybszą naprawę uszkodzeń podczas replikacji. Zaprezentowane w pracy wyniki pokazują, że jeśli białko PCNA zaangażowane jest w proces replikacji, kiedy dochodzi do powstania SSBs, to istnieje większe prawdopodobieństwo, iż aktywowana zostanie ścieżka naprawy SP. Aby sprawdzić, czy możliwe jest wysycenie procesu naprawy jednoniciowych pęknięć DNA oraz czy takie wysycenie wpłynie na aktywację ścieżek SP lub LP, generowano wiele lokalnych uszkodzeń DNA w krótkich (sekundy) odstępach czasu. XRCC1 rekrutowane było do kilkunastu miejsc naprawy, a PCNA jedynie do 3–4, co pokazuje, że w sytuacji powstania dużej liczby jednoniciowych pęknięć częściej aktywowana jest ścieżka SP niż LP. Otrzymane wyniki wskazują również na to, że komórki nie są zdolne do naprawy wielu SSBs, które pojawiły w dużej liczbie w krótkim czasie. Dodatkowo zaobserwowano, że najwięcej białka XRCC1 rekrutowane jest do pierwszych lokalnych uszkodzeń, a wraz z indukcją kolejnych liczba przywołanych cząsteczek spada aż do poziomu, na którym nie udaje się ich wykryć. Pomimo tego komórka wciąż posiada w jądrze komórkowym widoczny na obrazach fluorescencyjnych rezerwuar tego białka, który nie jest zaangażowany w proces naprawy DNA. Taka obserwacja pozwoliła wysnuć hipotezę, iż wąskim gardłem opisanego zjawiska może być inny czynnik, od którego zależna jest rekrutacja XRCC1. Kolejne eksperymenty przemawiają na korzyść tej hipotezy. Wykazano, że komórki w warunkach obniżonego stężenia tlenu przestają rekrutować białko XRCC1 do miejsc, gdzie wygenerowano jednoniciowe pęknięcia DNA, co może być powiązane z chwilowo zmniejszoną liczbą cząsteczek ATP.

Podsumowując, w przygotowanej rozprawie doktorskiej pokazano, iż lokalne naświetlenie chromatyny światłem widzialnym o niskiej intensywności prowadzi do powstania jednoniciowych pęknięć DNA. Użycie tej metody pozwoliło wykazać, że faza cyklu podziałowego jest istotnym czynnikiem mogącym wpływać na aktywację ścieżek naprawy jednoniciowych pęknięć DNA *short-patch* i *long-patch* oraz na szybkość naprawy SSBs. Ponadto przeprowadzone badania pozwoliły dostarczyć nowych informacji na temat

zdolności komórek do radzenia sobie z dużą liczbą uszkodzeń DNA powstałych w krótkim czasie. Wykazały, że ta zdolność może być ograniczona do kilkuset jednoniciowych pęknięć DNA, a sama rekrutacja XRCC1 do SSBs może zostać zaburzona przez niskie stężenie tlenu w komórkach.

Kierownik  
Zakładu Biofizyki Komórki  
Uniwersytetu Jagiellońskiego  
  
prof. dr hab. Jerzy W. Dobrucki

OSKAR  
3206