

# Znaczenie mechanizmów naprawy DNA w procesie transformacji nowotworowej u kobiet w okresie menopauzy

## *The significance of DNA repair system in transformation to cancer cells in menopausal women*

Hanna Romanowicz-Makowska<sup>1</sup>, Beata Smolarz<sup>1</sup>, Marcin Makowski<sup>2</sup>, Tomasz Pertyński<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi;  
kierownik Pracowni: prof. dr hab. med. Andrzej Kulig

<sup>2</sup>Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi;  
kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński

Przeгляд Menopausalny 2009; 1: 26–32

### Streszczenie

System naprawy DNA bierze udział w utrzymaniu integralności genomu ulegającego zmianom pod wpływem czynników egzogennych i endogennych. U człowieka bezpośrednio w proces naprawy są zaangażowane produkty białkowe ponad 70 genów, które uczestniczą w kilku systemach naprawczych. Proces naprawy zazwyczaj obejmuje dwa etapy – wycięcie uszkodzenia i syntezę naprawczą. Tak działają systemy naprawy przez wycinanie zasad, przez wycinanie nukleotydów i naprawy błędnie sparowanych zasad. Odmienne przedstawia się działanie systemu naprawy przez bezpośrednią rewersję uszkodzenia – mamy wówczas do czynienia jedynie z jednoetapowym procesem, podczas którego zostaje zachowana integralność łańcucha fosfodiesterowego DNA oraz systemu naprawy rekombinacyjnej. Defekty białek uczestniczących bezpośrednio w naprawie DNA i jej regulacji są związane ze zwiększoną podatnością na nowotwory oraz takimi zaburzeniami, jak zahamowanie wzrostu, postępujące zwyrodnienie układu nerwowego, opóźnienie umysłowe, obniżenie odporności czy przyspieszenie procesu starzenia.

**Słowa kluczowe:** naprawa DNA, uszkodzenia DNA, enzymy naprawcze

### Summary

DNA repair system plays an important role in keeping the integrity of genome which undergoes changes caused by exo- and endogenous factors. Protein products of over 70 genes, involving directly in repair, take part in some repair systems in humans. Repair process usually consists of two steps: excision of DNA damage and repair synthesis. On the contrary, direct repair and recombination repair differ from excision repair systems: base excision repair, nucleotide excision repair and mismatch repair. Direct repair is one-step process which maintains the integrity of DNA phosphodiester bonds. Defects of proteins, which directly participate in the DNA repair and its regulation are linked with cancer predisposition and other diseases like growth retardation, progressive neurological degeneration, mental retardation, immunodeficiency or prematurely aged faces.

**Key words:** DNA repair, DNA damage, repair enzymes

### Wstęp

Prawidłowa naprawa DNA zapewnia utrzymanie integralności genomu i pełni kluczową funkcję w jego ochronie przed działaniem czynników kancerogennych. Wysoka częstość zmian DNA mogłaby mieć śmiertelne konsekwencje dla organizmu, gdyby nie była kontrolowana przez systemy naprawy DNA, takie jak bezpośrednia rewersja uszkodzenia, naprawa przez wycinanie zasad azotowych (*base excision repair* – BER), przez wy-

cinanie nukleotydów (*nucleotide excision repair* – NER), błędnie sparowanych zasad azotowych (*mismatch repair* – MMR) oraz przez rekombinację. Genami, które sterują naprawą DNA zmienionego w wyniku mutacji (geny kodujące enzymy kontrolujące wierność replikacji i naprawy DNA), są geny naprawcze (mutatorowe). Zaburzenia funkcjonowania naprawy poreplikacyjnej błędnie sparowanych zasad prowadzą do niestabilności genomowej, sprzyjającej indukcji i rozwojowi procesu kancerogenezy.

Adres do korespondencji:

dr med. **Hanna Romanowicz**, Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź, tel. +48 42 271 20 71, e-mail: hanna-romanowicz@wp.pl

## Naprawa DNA i nowotwory

Odziedziczone mutacje w genach naprawy DNA są u człowieka silnie powiązane z wysokim ryzykiem zachorowania na nowotwory. Dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer* – HNPCC, zespół Lyncha) jest spowodowany mutacjami w genach kodujących białka zaangażowane w naprawę niesparowanych zasad (*mismatch repair*). Mutacje w genach *BRCA1* i *BRCA2* są związane z wyraźnie zwiększonym ryzykiem wystąpienia raka sutka – kodowane przez te geny białka biorą udział w wielu procesach naprawy DNA, m.in. NHEJ (*nonhomologous end-joining*) i rekombinacji homologicznej.

Z kolei chemioterapia i radioterapia w leczeniu nowotworów działają przez zahamowanie mechanizmów naprawy DNA w komórkach, przez co prowadzą do śmierci komórek, zwłaszcza tych szybko się dzielących, czyli także nowotworowych. Dodatkowo obie formy terapii powodują także znaczne uszkodzenia w samym materiale genetycznym. Leczenie takie powoduje jednak skutki uboczne – uszkodzeniu ulegają też inne, zdrowe komórki o podwyższonym tempie proliferacji – jak komórki pnia szpiku kostnego i komórki mieszków włosowych.

W zapoczątkowaniu rozwoju nowotworu istotną rolę odgrywa wiele czynników, a wśród nich ważne miejsce zajmują czynniki genetyczne [1–6]. Jest mało prawdopodobne, aby analiza zaburzeń jakiegokolwiek jednego genu pozwoliła na wyjaśnienie wszystkich ważnych cech biologicznych nowotworu człowieka. Złośliwy fenotyp jest prawdopodobnie odzwierciedleniem współdziałania produktów wielu genów i z ich obecności lub braku można domyślać się cech biologicznych guza.

Zmiany DNA powstające w wyniku oddziaływania czynników uszkadzających oraz błędów replikacji mogą mieć dla komórki poważne konsekwencje. Aby możliwe było jej przetrwanie konieczne jest istnienie systemów naprawy DNA usuwających uszkodzenia i zmniejszających częstość mutacji. Systemy te wykazują dużą specyficzność substratową i specjalizację. Należą do nich: szlak naprawy przez bezpośrednią rewersję uszkodzenia, wycinanie zasad azotowych, wycinanie nukleotydów, naprawa błędnie sparowanych zasad azotowych oraz naprawa przez rekombinację. W usuwanie uszkodzeń DNA zaangażowanych jest przynajmniej 130 białek [7]. Zmiany w kodujących je genach mogą prowadzić do zwiększenia ogólnej częstości mutacji, rozwoju nowotworów i innych poważnych chorób, w tym dziedzicznych.

Organizmy żywe charakteryzują się wysokim stopniem zmienności genetycznej, odgrywającej kluczową rolę w procesie ewolucji. Jej głównymi źródłami są mutacje (genowe, chromosomowe i genomowe) oraz rekombinacja. Punktowe modyfikacje sekwencji nukleotydów powstałe w wyniku utrwalenia różnorodnych uszkodzeń

DNA stanowią pierwotną przyczynę zmienności genetycznej, umożliwiającej powstawanie nowych alleli genów.

Mutacje w genach kodujących białka mają szczególne znaczenie, jeśli powodują zmianę kodowanego aminokwasu na inny (mutacje zmiany sensu) lub kodon stopu (mutacje nonsensowne). Często punktowa modyfikacja genu prowadzi do powstania wariantów gorzej dostosowanych lub nawet letalnych. Mutacja zmiany sensu może nie powodować zaburzeń aktywności białka, jeśli zmieniony aminokwas nie odbiega właściwościami znacząco od poprzedniego oraz jeśli nie nastąpiła ona w miejscu o kluczowym znaczeniu dla funkcjonowania cząsteczki białka (np. centrum aktywnym), może nawet być korzystna. Powstające w ten sposób nowe warianty mogą się rozprzestrzenić w populacji, a jeśli co najmniej jeden z nich osiągnie częstość powyżej 1%, wówczas gen ma charakter polimorficzny.

Populacja ludzka cechuje się polimorfizmem wielu *loci* genowych, w tym genów kodujących białka związane z procesami o kluczowym znaczeniu dla przeżycia komórki. Różne warianty genów przyczyniają się do występowania obserwowanej zmienności fenotypowej, m.in. pod względem reakcji na określone leki, wrażliwości na substancje mutagenne czy zdolności naprawy DNA. Osoby mające niektóre warianty polimorficzne ponoszą większe ryzyko rozwoju nowotworów w przypadku ekspozycji na substancje toksyczne niż osoby z bardziej dostosowanymi allelami.

Obniżona zdolność naprawy DNA może być również powodowana występowaniem określonych wariantów polimorficznych białek uczestniczących w szlakach naprawy DNA. Zwykle polimorficzne wersje cechują się aktywnością zbliżoną do typu *dzikiego*, jednak w przypadku występowania takich wariantów w wielu *loci* i ekspozycji na czynniki uszkadzające, ryzyko rozwoju choroby nowotworowej może być większe, co potwierdzają dane epidemiologiczne. Spośród genów związanych ze szlakami naprawy DNA liczne występują jako warianty polimorficzne, niektóre mają nawet po kilka miejsc podstawień aminokwasowych.

Skuteczność naprawy DNA zależy od indywidualnej aktywności wielu białek, należących do wyspecjalizowanych systemów. Zmiany w strukturze pierwszorzędowej mogą z kolei wpływać na ich właściwości i efektywność usuwania uszkodzeń DNA. Zmniejszona zdolność naprawy często stanowi podłoże rozwoju chorób nowotworowych, zestaw alleli genów kodujących białka naprawcze może więc w dużym stopniu określać indywidualne zdolności usuwania uszkodzeń DNA i podatność na rozwój niektórych schorzeń. Istotne jest więc poznanie wariantów polimorficznych genów związanych z naprawą DNA, ich rozkładu w populacji oraz przeprowadzenie odpowiednich badań epidemiologicznych.

## Mechanizmy naprawy DNA

### Naprawa przez bezpośrednią rewersję uszkodzenia

Naprawa przez rewersję uszkodzenia jest procesem jednoetapowym i nie wymaga usunięcia zmienionej zasady azotowej DNA. U ssaków uczestniczy w niej metylotransferaza O<sup>6</sup>-metyloguaniny DNA (O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase – MGMT) oraz obecne u niektórych grup systematycznych fotolizy, ich aktywności nie stwierdzono jednak u człowieka [8]. Komórki defektywne pod względem MGMT są szczególnie wrażliwe na czynniki alkilujące, a organizmy pozbawione jego aktywności są bardziej podatne na rozwój nowotworów [9].

### Naprawa przez wycinanie zasad azotowych

Naprawa przez wycinanie zasad azotowych służy głównie usuwaniu nieskomplikowanych, lecz niebezpiecznych w skutkach uszkodzeń DNA, jakimi są utlenione i N-alkilowane zasady azotowe (np. glikol tyminy, 8-oksoguanina, 7-metyloguanina, 3-metyloadenina), uracyl i miejsca AP. Naprawa przez wycinanie zasad azotowych rozpoczyna się rozpoznaniem uszkodzonej lub niewłaściwej zasady przez specyficzny substratowo enzym, glikozylazę DNA. Dokonuje ona hydrolizy wiązania N-glikozydowego między zmodyfikowaną zasadą a resztą cukrową, prowadząc do utworzenia w łańcuchu DNA miejsca AP [10]. Kolejny etap BER związany jest z usunięciem grupy 5'deoksyfosforanowej (dRp) przez enzym o aktywności deoksyrybofosfodiesterazy (polimerazę DNA-β z aktywnością liazy dRp oraz prawdopodobnie glikozylazę OGG1) i uzupełnieniem luki odpowiednim nukleotydem [11]. Po wypełnieniu luki dalsza naprawa następuje wg dwóch odrębnych szlaków – podstawowego lub alternatywnego, w zależności od struktury 5'dRP [12].

W przypadku szlaku podstawowego następuje zastąpienie zmodyfikowanego nukleotydu prawidłowym, co stanowi ostatni etap naprawy. Szlak alternatywny różni się od podstawowego przede wszystkim wymianą aż 2–10 nukleotydów.

Genem kodującym glikozylazę 8-oksoguaniny, białko uczestniczące w szlaku naprawy DNA BER, jest *hOGG1* (8-oxoguanine glycosylase). Znajduje się w chromosomie 3 (3p26.2) i zajmuje 16,68 kbp [13]. Gen *OGG1* ma kilka miejsc polimorficznych [14]. Dziewięciu z nich nie przypisano dotychczas zmian sekwencji aminokwasowej kodowanego białka. Tranzycja C1245G (ekson 7 genu) powoduje natomiast podstawienie w pozycji 326 łańcucha polipeptydowego hOGG1 seryny cysteiną. Według niektórych badań nie wpływa ono na aktywność katalityczną enzymu (nie zaobserwowano różnic pomiędzy wariantami), wg innych jednak wariant 326Ser wykazuje znacząco większą zdolność naprawy uszkodzeń DNA niż 326Cys [15]. Polimorfizm ten jest powszechny

w populacji ludzkiej, stwierdzono jego występowanie u osób o różnej przynależności etnicznej. Polimorfizm ten ma znaczenie epidemiologiczne, gdyż obecność dwóch alleli 326Cys zwiększa ryzyko rozwoju kilku typów nowotworów [3]. Stwierdzono m.in. związek pomiędzy ich występowaniem a nowotworem płuc, przełyku i prostaty [16–18]. Dane literaturowe wskazują na brak związku pomiędzy polimorfizmem Ser326Cys a rakiem piersi [19, 20].

Drugim istotnym genem mechanizmu BER jest *XRCC1* (X-ray repair crosscomplementing group 1). Położony jest w chromosomie 19 (19q13.2), zajmuje ok. 31,9 kbp i zawiera 17 eksonów [21]. Białko XRCC1 bierze udział w wypełnianiu jednonukleotydu przerwy w nici DNA utworzonej przez białka mające właściwości dRpazy lub liazy dRp, współdziałając z polimerazą DNA-β i ligazą DNA IIIα.

Dotychczas stwierdzono istnienie 37 miejsc polimorficznych w obrębie genu *XRCC1*, 14 z nich powoduje zmianę kodowanego aminokwasu, a 4 występują w populacji z częstością 3% lub większą [22]. Trzy z nich (Arg194Trp, Arg280His i Arg399Gln) przebadano pod względem epidemiologicznym [3]. Allel 194Trp występuje w grupach kontrolnych badań epidemiologicznych z częstością 0,06–0,35 [3]. Według wyników uzyskanych w większości z nich już w układzie heterozygotycznym zmniejsza on ryzyko rozwoju nowotworów wielu typów, m.in. piersi, płuc i pęcherza [23, 24]. Polimorfizm w pozycji 399 (ekson 10) jest związany z podstawieniem Arg → Gln w domenie BRCT I i może mieć wpływ na ryzyko rozwoju choroby nowotworowej, powodując zarówno jego wzrost, jak i spadek, w zależności od typu i lokalizacji raka [3]. Stwierdzono korelację między obecnością allelu 399Gln a poziomem uszkodzeń DNA i mutacji, jednak wg badań efektywności naprawy pęknięć jednoniciowych oba warianty cechuje zbliżona sprawność, polimorfizm Arg399Gln może więc mieć niewielki wpływ na domenę BRCT I i funkcjonowanie XRCC1 [25].

### Naprawa przez wycinanie nukleotydów

System naprawy DNA przez NER umożliwia usuwanie wielu rodzajów uszkodzeń, w tym bardziej złożonych niż usuwane przez BER, m.in. fotoproduktów, takich jak dimery pirymidynowe, wewnątrznicowych wiązań, dużych adduktów powstałych w wyniku ekspozycji na aflatoksynę, benzo[a]piren, psoraleny czy policykliczne węglowodory aromatyczne [26].

Naprawa obejmuje rozpoznanie uszkodzonego nukleotydu (jako zniekształcenie podwójnej helisy), jego wycięcie oraz syntezę nowej nici DNA na matrycy nici komplementarnej. W NER zaangażowanych jest 30 różnych białek, niedobór lub brak niektórych z nich powoduje nadwrażliwość na UV i rozwój poważnych chorób, m.in. syndromu Cockayne'a (*Cockayne's syndrome* – CS) czy *xeroderma pigmentosum* (XP) [27].

Szlak podstawowy jest niezależny od transkrypcji, umożliwia więc usuwanie uszkodzeń z nietranskrybowanych fragmentów genomu oraz nici kodującej (nietranskrybowanej) transkrybowanych obszarów DNA. Szlak sprzężony z transkrypcją uczestniczy w usuwaniu uszkodzeń blokujących syntezę mRNA prowadzoną przez polimerazę RNA II [28].

Helikazę DNA uczestniczącą m.in. w szlaku naprawy DNA NER sprzężonym z transkrypcją koduje gen *XPD* (*ERCC2*) (*xeroderma pigmentosum D, excision repair cross-complementing group 2*). Znajduje się on na chromosomie 19 (19q13.3) i zajmuje ok. 20,73 kbp [29]. W obrębie genu *XPD* stwierdzono dotychczas istnienie 17 miejsc polimorficznych, z których 6 występuje w eksonach. Dwa z nich (kodony 156 i 711), ze względu na degenerację kodu genetycznego, nie powodują zmian struktury pierwszorzędowej białka, natomiast cztery związane są z podstawieniem aminokwasowym (Ile199Met, His201Tyr, Asp312Asn i Lys751Gln) [30].

Podstawienie Lys751Gln (ekson 23) może mieć znaczący wpływ na aktywność helikazową *XPD*, gdyż miejsce polimorficzne zlokalizowane jest w części C-końcowej białka, oddziałującej z p44. Wariant 751Gln występuje w populacji z częstością ok. 0,29 (0,06–0,42 w grupach kontrolnych badań epidemiologicznych) [3]. Według niektórych badań allel 751Gln obniża ryzyko rozwoju niektórych typów nowotworów (m.in. piersi), wg innych właściwości ochronne ma wariant 751Lys [31]. Dane uzyskane dla osób z nowotworami powiązаныmi z paleniem tytoniu wskazują, że wariant 751Gln zwiększa ryzyko rozwoju choroby u osób niepalących, natomiast ma właściwości ochronne u palących tytoń [32]. Stwierdzono również, że allel 751Gln może przyczyniać się do skuteczniejszego usuwania uszkodzeń DNA, przynajmniej wprowadzanych przez UV. Nie zaobserwowano wyraźnej korelacji między wariantem genu a rozwojem choroby nowotworowej, gdyż dane uzyskane w trakcie badań epidemiologicznych nie wykazują takiego związku bądź są sprzeczne [3]. Badania populacji kobiet polskich chorych na raka piersi nie wykazały związku pomiędzy polimorfizmem Lys751Gln genu *XPD* a wystąpieniem procesu nowotworzenia w gruczole piersiowym [33, 34]. Nie stwierdzono różnic w rozkładach genotypów i częstości alleli pomiędzy grupą badaną a kontrolną. Wszystkie rozkłady były zgodne z prawem Hardy’ego-Weinberga.

### Naprawa błędnie sparowanych zasad azotowych

System naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych usuwa głównie błędy powstałe w trakcie replikacji DNA i niewłaściwe pary zasad tworzące się w wyniku rekombinacji DNA oraz spontanicznej lub indukowanej deminacji, utleniania bądź metylacji zasad azotowych [35].

System naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych odgrywa ważną rolę w utrzymywaniu stabilności genomu, dlatego jego defekty prowadzą do poważnych

schorzeń, np. dziedzicznego niepolipowatego raka jelita grubego i innych nowotworów [36].

Rozpoznanie błędnego sparowania zasad dokonują kompleksy białkowe MutS $\alpha$  i MutS $\beta$ , zdolne do wiązania się z uszkodzeniem. Kompleks MutS $\alpha$  składa się z homologów bakteryjnego białka MutS: MSH2 i MSH6 (znanego także jako GTBP – *GT-binding protein*) [37], MutS $\beta$  natomiast złożony jest z MSH2 i MSH3.

Gen *hMSH2*, wraz z *hMLH1*, ulega zaburzeniom w rodzinnym, niepolipowatym raku jelita grubego (HNPCC) [38, 39]. Ta rodzinna przypadłość predysponuje nie tylko do raka jelita grubego, ale też do raka endometrium, żołądka, jajników i dróg żółciowych [40]. Oprócz tego mutacje w *hMSH2* są wykrywane w sporadycznych rakach jelita grubego, endometrium [41, 42], żołądka [43], głowy i szyi [44] i prostaty [45].

Od 30 do 70% pacjentów z klinicznie potwierdzoną diagnozą HNPCC ma mutacje w jednym z genów szlaku MMR, najczęściej w *hMLH1* i *hMSH2*, rzadziej w *PMS1*, *PMS2* i *hMSH6* [46, 47].

Nosiciele mutacji w *hMLH1* i *hMSH2* charakteryzują się wysokim ryzykiem rozwoju raka jelita grubego w czasie całego życia, sięgającym 80% [48]. Jak już wspomniano, guzy z zaburzeniami systemu MMR charakteryzują się niestabilnością mikrosatelitarną (*microsatellite instability* – MSI).

W genomie komórek raka piersi wykryto zaburzenia w krótkich, powtarzających się sekwencjach nukleotydów (sekwencje mikrosatelitarne), rozsianych w warunkach prawidłowych po całym genomie. Za zmiany te określone mianem niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych odpowiedzialny jest uogólniony defekt mechanizmów odpowiadających za wierność replikacji DNA lub za poreplikacyjną naprawę DNA. Defekty tego typu pojawiają się w wyniku mutacji genów mutatorowych MMR (*mismatch repair*), biorących udział w naprawie nieprawidłowo sparowanych zasad DNA oraz zasad niesparowanych powstających wskutek insercji lub delecji. Sekwencje mikrosatelitarne są szczególnie podatne na błędy w replikacji, a zaburzenia wykryte w ich obrębie są markerem zahamowania czynności genów mutatorowych. Do tej pory wykryto mutacje w genach *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1* i *hPMS2*. Z danych literaturowych wiadomo, że najczęściej spotykane są mutacje w genie *hMLH1* [49, 50].

### Naprawa przez rekombinację

Naprawa przez rekombinację umożliwia usuwanie wielu poważnych uszkodzeń DNA, przede wszystkim pęknięć dwuniciowych. Pęknięcia te mogą powodować utratę części chromosomów oraz translokację materiału genetycznego między nimi. Ponadto są one silnymi induktorami programowanej śmierci komórki [51].

U eukariontów istnieją dwa główne szlaki naprawy pęknięć dwuniciowych – rekombinacja homologiczna

(*homologous recombination* – HR) oraz rekombinacja niehomologiczna (*nonhomologous end-joining* – NHEJ), ponadto wyróżnić można jeszcze system łączący cechy HRR i NHEJ – dopasowanie pojedynczych nici DNA (*single-strand annealing* – SSA). Zwykle w danej grupie systematycznej przeważa jeden ze szlaków, np. u drożdży głównym systemem naprawy pęknięć dwuniciowych jest rekombinacja homologiczna, natomiast u ssaków dominuje rekombinacja niehomologiczna [52, 53].

### Rekombinacja homologiczna

Szlak naprawy przez rekombinację homologiczną umożliwia usunięcie uszkodzenia, jednocześnie zapewniając dużą wierność odtwarzania pierwotnej sekwencji zmodyfikowanego DNA. Jako matryca w naprawie uszkodzonego chromosomu wykorzystywana jest cząsteczka DNA cechująca się homologią sekwencyjną, zwykle stanowi ją nieuszkodzony homolog tego chromosomu [54].

Najważniejszym białkiem biorącym udział w naprawie przez rekombinację homologiczną jest RAD51, stanowiący główny składnik kompleksu rekombinacyjnego z białkami pomocniczymi z jednoniciowym fragmentem powstałym na końcu uszkodzonej cząsteczki DNA, tworząc kompleks presynaptyczny, po czym rozpoznaje homologiczną sekwencję w obrębie nieuszkodzonej cząsteczki. Powstanie kompleksu rekombinacyjnego ułatwiają białka pomocnicze będące paralogami RAD51, w tym RAD51B, C, D, XRCC2 i XRCC3 [55, 56].

Gen *RAD51* zlokalizowany jest na chromosomie 15 (15q15.1), zajmuje 36,99 kpb, białko o masie cząsteczkowej 37 kDa składające się z 339 reszt aminokwasowych [57] odgrywa kluczową rolę w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA przez HRR oraz w rekombinacji DNA w trakcie mitozy i mejozy. Białko to stanowi główny komponent kompleksu rekombinacyjnego RAD51/RAD52/RPA. Uczestniczy ono w poszukiwaniu regionów homologii między nićmi, tworzeniu kompleksu presynaptycznego (w którego skład wchodzi nić mające ulec wymianie oraz białka związane z rekombinacją) oraz trójniciowego kompleksu synaptycznego. RAD51 promuje wymianę nici (w kierunku 3' → 5' w stosunku do nici tworzącej kompleks presynaptyczny), w trakcie której powstaje heteroduplex i pętla D. Dotychczas nie stwierdzono istnienia wielu wariantów polimorficznych genu *RAD51*, a ze znanych większość znajduje się w intronach, natomiast obecne w eksonach nie są związane z podstawieniami aminokwasowymi. W obrębie tego genu stwierdzono istnienie dwóch miejsc polimorficznych w regionie 5' niepodlegającym translacji: G135C oraz G172T [58].

RAD51 uczestniczy w naprawie DNA, a ponadto oddziałuje z białkami BRCA, których mutacje są często spotykane w raku piersi, dlatego też polimorfizm G135C może być powiązany z większym ryzykiem rozwoju tego

nowotworu. Stwierdzono, że wariant C może zwiększać ryzyko rozwoju tego raka u nosicielek mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* [58], nie stwierdzono natomiast jego wpływu na zachorowalność u kobiet bez tych mutacji [59]. Polimorfizm G135C może powodować zmianę sposobu składania mRNA, co z kolei wpływa na funkcjonowanie białka bądź efektywność translacji [58].

W populacji kobiet polskich stwierdzono związek pomiędzy polimorfizmem powtórzeń dwunukleotydu genu *RAD51* a rakiem piersi. Genotyp CA<sub>17</sub> w obszarze 13q12-13 może być czynnikiem ryzyka procesu transformacji nowotworowej w piersi [60].

Paralog białka RAD51 koduje gen *XRCC2* (*X-ray repair cross-complementing group 2*) [61]. Gen *XRCC2* zlokalizowany jest na chromosomie 7 (7q36.1), i zajmuje 29,68 kpb. W obrębie genu *XRCC2* stwierdzono obecność dwóch miejsc polimorficznych związanych z podstawieniem aminokwasowym: w eksonie 2 – Ala16Ser i w 3 – Arg188His oraz dwóch w regionach niepodlegających translacji: 5' G4234C oraz 3' G41796A [4, 62]. Dotychczas przeprowadzono badania epidemiologiczne polimorfizmu Arg188His. Zgodnie z ich rezultatami, rzadszy wariant 188His (o częstości 0,05 w populacji amerykańskiej) może zwiększać ryzyko zachorowania na raka piersi, zależność ta jest szczególnie wyraźna w przypadkach choroby u osób młodych, w przypadku których nowotwór ten występował także u innych członków rodziny [62]. Ponadto stwierdzono, że podstawienie Arg → His może mieć wpływ na aktywność tego białka [63].

Innym genem, który podobnie jak *XRCC2* koduje białko będące paralogiem RAD51, uczestniczące w rekombinacji homologicznej prawdopodobnie poprzez ułatwianie powstawania kompleksów nukleoproteinowych RAD51 i ich stabilizację, jest gen *XRCC3* (*X-ray repair cross-complementing group 3*). Jest on zlokalizowany na chromosomie 14 (14q32.3) i zajmuje 17,85 kpb [64].

Gen *XRCC3* ma trzy znane miejsca polimorficzne: w regionie 5' 4541A → G, w pozycji 17893A → G oraz w eksonie 7, związane z podstawieniem aminokwasowym Thr241Met [62]. Wariant 241Met występuje w grupach kontrolnych badań epidemiologicznych z częstością 0,230,38 [3]. Stwierdzono, że większa on ryzyko zachorowania na nowotwór pęcherza moczowego oraz czerniaka, nie zaobserwowano natomiast takiej zależności dla raka płuc [65].

Dane literaturowe wskazują na brak związku pomiędzy polimorfizmami genów *XRCC2* i *XRCC3* a rakiem piersi [66, 67]. W populacji kobiet polskich chorych na raka piersi nie stwierdzono zmian w rozkładach genotypów i częstości alleli badanych polimorfizmów. Wszystkie rozkłady były zgodne z prawem Hardy'ego-Weinberga.

Wiadomo, że na inaktywację *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *BRCA1*, *BRCA2* może wpływać utrata heterozygotyczności (LOH) w *loci* 15q15.1, 12p13, 1p32, 17q21 i 13q12-13 [68],

co może prowadzić do rozwoju nowotworu. Utrata heterozygotyczności w genach *RAD51*, *52* i *54* oraz *BRCA1/2* może być związana ze złymi prognozami dla chorych [68]. W populacji kobiet w Polsce chorych na ten nowotwór nie stwierdzono utraty heterozygotyczności w regionie 8q12-q24.1 obejmującym gen *RAD54B* [69]. Niestabilność mikrosatelitarna w genach *RAD54/54B* może być natomiast związana z procesem nowotworzenia w gruczole piersiowym u tych kobiet [70].

### Rekombinacja niehomologiczna

Szlak naprawy DNA przez rekombinację niehomologiczną umożliwia połączenie pękniętych nici, nie wymagając istnienia homologii między nimi, system ten cechuje się więc małą wiernością odtwarzania sekwencji wyjściowej. Pomimo tego może on stanowić główny szlak naprawy pęknięć dwuniciowych w komórkach ssaków [70]. Białkiem, które uczestniczy w rekombinacji niehomologicznej, jest XRCC4. Jego funkcje nie zostały jeszcze bliżej określone, jednakże wiadomo, że oddziałuje ono z ligazą IV i białkiem Ku [71].

### Podsumowanie

W ostatnich latach dokonał się znaczny postęp w poznaniu mechanizmów naprawy DNA. Dzięki możliwości szybkiego sekwencjonowania oraz analizy sekwencji DNA pochodzących od różnych organizmów stało się możliwe wykrycie i poznanie struktury oraz funkcji wielu białek systemu naprawy ssaków. Wiedza o tych procesach, ich regulacji oraz o różnych czynnikach wpływających na ich aktywność i wydajność pozwoli w przyszłości na skuteczniejsze zapobieganie wielu chorobom związanym z niedostateczną naprawą uszkodzeń DNA, prowadzącą w konsekwencji do mutacji, niestabilności genomu oraz chorób nowotworowych. Z drugiej strony, mutacje związane z genami naprawy, zwłaszcza ich zwielokrotnienie w komórkach rakowych, przyczyniają się do nieskuteczności chemioterapii nowotworów. Pogłębienie wiedzy o funkcjonowaniu systemów naprawy DNA u człowieka może pozwolić na opracowanie nowych leków przeciwnowotworowych, a zwłaszcza inhibitorów enzymów naprawy odpowiedzialnych za oporność niektórych rodzajów nowotworów na leczenie.

### Piśmiennictwo

- Didkowska JU. Epidemiologia nowotworów złośliwych piersi w Polsce. *Nowotwory* 2007; 57: 15-6.
- Hayes DF. Prognostic and predictive factors for breast cancer: translating technology to oncology. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1596-7.
- Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1513-30.
- Kuschel B, Auranen A, McBride S, et al. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1399-407.
- Nowacka-Zawisza M, Brys M, Romanowicz-Makowska H, et al. Dinucleotide repeat polymorphisms of *RAD51*, *BRCA1*, *BRCA2* gene regions in breast cancer. *Pathol Int* 2008; 58: 275-81.
- Romanowicz-Makowska H, Smolarz B, Kulig A. Polymorphisms in *XRCC1* and *ERCC4/XPF* DNA repair genes and associations with breast cancer risk in women. *Pol Merkur Lekarski* 2007; 22: 200-3.
- Ronen A, Glickman BW. Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen* 2001; 37: 241-83.
- Von Wronski MA, Shiota S, Tano K, et al. Structural and immunological comparison of indigenous human O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase with that encoded by a cloned cDNA. *J Biol Chem* 1991; 266: 1064-70.
- Tsuzuki T, Sakumi K, Shiraishi A, et al. Targeted disruption of the DNA repair methyltransferase gene renders mice hypersensitive to alkylating agent. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1215-20.
- Schärer OD, Jiricny J. Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays* 2001; 23: 270-81.
- Matsumoto Y, Kim K, Katz DS, Feng JA. Catalytic center of DNA polymerase beta for excision of deoxyribose phosphate groups. *Biochemistry* 1998; 37: 6456-64.
- Nakamura J, La DK, Swenberg JA. 5'-nicked apurinic/aprimidinic sites are resistant to beta-elimination by beta-polymerase and are persistent in human cultured cells after oxidative stress. *J Biol Chem* 2000; 275: 5323-8.
- Ishida T, Hippo Y, Nakahori Y, et al. Structure and chromosome localization of human *OGG1*. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 85: 232-6.
- Kohno T, Shinmura K, Tosaka M, et al. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the *hOGG1* gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 1998; 16: 3219-25.
- Janssen K, Schlink K, Götte W, et al. DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (*OGG1*) in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser<sup>326</sup>/Cys<sup>326</sup>. *Mutat Res* 2001; 486: 207-16.
- Le Marchand L, Donlon T, LumJones A, et al. Association of the *hOGG1* Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 409-12.
- Xing D, Qi J, Miao X, et al. Polymorphisms of DNA repair genes *XRCC1* and *XPD* and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Int J Cancer* 2002; 100: 600-5.
- Xu J, Zheng SL, Turner A, et al. Associations between *hOGG1* sequence variants and prostate cancer susceptibility. *Cancer Res* 2002; 62: 2253-7.
- Cai Q, Shu XO, Wen W, et al. Functional Ser326Cys polymorphism in the *hOGG1* gene is not associated with breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 403-4.
- Romanowicz-Makowska H, Smolarz B. Ser326Cys polymorphism in DNA repair genes *hOGG1* in breast cancer women. *Pol J Pathol*, w druku.
- Trask B, Fertitta A, Christensen M, et al. Fluorescence in situ hybridization mapping of human chromosome 19: cytogenetic band location of 540 cosmid and 70 genes or DNA markers. *Genomics* 1993; 15: 133-45.
- Mohrenweiser HW, Xi T, Vázquez-Matías J, Jones IM. Identification of 127 amino acid substitution variants in screening 37 DNA repair genes in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1054-64.
- Duell EJ, Millikan RC, Pittman GS, et al. Polymorphisms in the DNA repair gene *XRCC1* and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 217-22.
- Stern MC, Umbach DM, van Gils CH, et al. DNA repair gene *XRCC1* polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 125-31.
- Hu JJ, Mohrenweiser HW, Bell DA, et al. Symposium overview: genetic polymorphisms in DNA repair and cancer risk. *Toxicol App Pharmacol* 2002; 185: 64-73.
- Huang JC, Hsu DS, Kazantsev A, Sancar A. Substrate spectrum of human excinuclease: repair of abasic sites, methylated bases, mismatches, and bulky adducts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12213-7.
- Vermeulen W, de Boer J, Citterio E, et al. Mammalian nucleotide excision repair and syndromes. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 309-15.
- Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the *DHFR* gene of the CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* 1985; 40: 359-69.
- Flejter WL, McDaniel LD, Askari M, et al. Characterization of a complex chromosomal rearrangement maps the locus for *in vitro* comple-

- mentation of *xeroderma pigmentosum* group D to human chromosome band 19q13. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 5: 335-42.
30. Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* 1998; 58: 604-8.
  31. Spitz MR, Wu X, Wang Y, et al. Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61: 1354-7.
  32. Stern MC, Johnson LR, Bell DA, Taylor JA. XPD codon 751 polymorphism, metabolism genes, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1004-11.
  33. Romanowicz-Makowska H, Sobczuk A, Smolarz B, et al. XPD Lys751Gln polymorphism analysis in women with sporadic breast cancer. *Pol J Pathol* 2007; 58: 245-9.
  34. Romanowicz-Makowska H, Smolarz B. Polymorphism Lys751Gln of XPD gene and breast cancer risk in women. *Pol Merkur Lekarski* 2007; 23: 107-9.
  35. Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 101-33.
  36. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-6.
  37. Palombo F, Gallinari P, Iaccarino I, et al. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* 1995; 268: 1912-4.
  38. Charames GS, Bapat B. Genomic instability and cancer. *Curr Mol Med* 2003; 3: 589-96.
  39. Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Langner E, et al. Genetic analysis of microsatellite markers in patients from hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families. *Exp Oncol* 2004; 26: 205-9.
  40. Lynch HT, Smyrk T, Lynch JF. Molecular genetics and clinical-pathology features of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome): historical journey from pedigree anecdote to molecular genetic confirmation. *Oncology* 1998; 55: 103-8.
  41. Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, et al. Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am J Pathol* 1996; 148: 1671-8.
  42. Sobczuk A, Romanowicz-Makowska H, Smolarz B, Pertynski T. Microsatellite instability (MSI) and MLH1 and MSH2 protein expression analysis in postmenopausal women with sporadic endometrial cancer. *Exp Clin Cancer Res* 2007; 26: 369-74.
  43. Renault B, Calistri D, Buonsanti G, et al. Microsatellite instability and mutations of p53 and TGF-beta RII genes in gastric cancer. *Hum Genet* 1996; 98: 601-7.
  44. Field JK, Kiaris H, Howard P, et al. Microsatellite instability in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 1995; 71: 1065-9.
  45. Watanabe M, Imai H, Kato H, et al. Microsatellite instability in latent prostate cancers. *Int J Cancer* 1996; 69: 394-7.
  46. Seifert M, Reichrath J. The role of the human DNA mismatch repair gene hMSH2 in DNA repair, cell cycle control and apoptosis: implications for pathogenesis, progression and therapy of cancer. *J Mol Hist* 2006; 37: 301-7.
  47. Romanowicz-Makowska H, Smolarz B, Langner E, et al. Analysis of microsatellite instability and BRCA1 mutations in patients from hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) family. *Pol J Pathol* 2005; 56: 21-6.
  48. Wheeler JM, Loukola A, Aaltonen LA, et al. The role of hypermethylation of the hMLH1 promoter region in HNPCC versus MSI+ sporadic colorectal cancers. *J Med Genet* 2000; 37: 588-92.
  49. Luqmani YA, Temmim LL, Mathew M. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in breast cancer. *Oncol Rep* 2002; 9: 417-21.
  50. Bryś M, Romanowicz-Makowska H, Zych A i wsp. Mutacje genu hMLH1 a sporadyczny rak piersi kobiet. *Prz Menopauz* 2004; 6: 47-9.
  51. Dikomey E, Dahm Daphi J, Brammer I, et al. Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int J Radiat Biol* 1998; 73: 269-78.
  52. Cromie GA, Connelly JC, Leach DR. Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol Cell* 2001; 8: 1163-74.
  53. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 1998; 17: 5497-508.
  54. Sonoda E, Takata M, Yamashita YM, Takeda S. Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 8388-94.
  55. Masson M, Niedergang C, Schreiber V, et al. XRCC1 is specifically associated with poly (ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3563-71.
  56. Wiese C, Collins DW, Albala JS, et al. Interactions involving the Rad51 paralogs Rad51C and XRCC3 in human cells. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1001-8.
  57. Shinohara A, Ogawa H, Matsuda Y, et al. Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to *RAD51* and *recA*. *Nat Genet* 1993; 4: 239-43.
  58. Wang WW, Spurdle AB, Kolachana P, et al. A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of *RAD51* and risk of cancer among *BRCA1/2* mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 955-60.
  59. Romanowicz-Makowska H, Smolarz B, Zadrozny M, Kulig A. Analysis of *RAD51* polymorphism and *BRCA1* mutations in Polish women with breast cancer. *Exp Oncol* 2006; 28: 156-9.
  60. Nowacka-Zawisza M, Brys M, Romanowicz-Makowska H, et al. Dinucleotide repeat polymorphisms of *RAD51*, *BRCA1*, *BRCA2* gene regions in breast cancer. *Pathol Int* 2008; 58: 275-81.
  61. Johnson RD, Liu N, Jasin M. Mammalian *XRCC2* promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Nature* 1999; 401: 397-99.
  62. Mohrenweiser HW, Xi T, Vázquez-Matías J, Jones IM. Identification of 127 amino acid substitution variants in screening 37 DNA repair genes in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1054-64.
  63. Rafii S, O'Regan P, Xinarianos G, et al. A potential role for the *XRCC2* R188H polymorphic site in DNA-damage repair and breast cancer. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1433-8.
  64. Tebbs RS, Zhao Y, Tucker JD, et al. Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the *XRCC3* DNA repair gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 6354-8.
  65. Winsey SL, Haldar NA, Marsh HP, et al. A variant within the DNA repair gene *XRCC3* is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 5612-6.
  66. Brooks J, Shore RE, Zeleniuch-Jacquotte A, et al. Polymorphisms in *RAD51*, *XRCC2*, and *XRCC3* are not related to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 1016-9.
  67. Gonzalez R, Silva JM, Dominguez G, et al. Detection of loss of heterozygosity at *RAD51*, *RAD52*, *RAD54* and *BRCA1* and *BRCA2* loci in breast cancer: pathological correlations. *Br J Cancer* 1999; 81: 503-9.
  68. Bryś M, Nowacka-Zawisza M, Romanowicz-Makowska H, et al. Loss of heterozygosity in the *RAD54B* region is not predictive for breast carcinoma. *Pol J Pathol* 2007; 58: 3-6.
  69. Romanowicz-Makowska H, Smolarz B. Analiza utraty heterozygotyczności i niestabilności mikrosatelitarnej genów *RAD52*, *RAD54* i *RAD54B* oraz mutacji genu *BRCA1* w raku piersi. *Pol Merkur Lek* 2006; 126: 5-9.
  70. Jeggo PA, Tesmer J, Chen DJ. Genetic analysis of ionizing-radiation sensitive mutants of cultured mammalian cell lines. *Mutat Res* 1991; 254: 125-33.
  71. Frank KM, Gekiguchi JM, Seidl KJ, et al. Late embryonic lethality and impaired V (D) J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature* 1998; 396: 173-7.